

# 共振散射光猝灭法测定小扁豆和贼小豆中微量硒

高向阳<sup>1,2</sup>, 吴云静<sup>2</sup>, 王莹莹<sup>1</sup>

(1. 郑州科技学院食品科学与工程学院, 河南 郑州 450064; 2. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 建立一种共振散射光猝灭法测定粮食中微量硒的新方法。以小扁豆和贼小豆为样品, 用pH3.500的B-R缓冲溶液为介质, 硒(IV)与一定量的 $I^-$ 反应生成等物质的量 $I_3^-$ , 进一步与阳离子染料罗丹明6G反应生成离子缔合物, 引起592.2nm共振散射光的线性猝灭。结果表明: 在最佳测定条件下, 测定体系共振散射光的相对猝灭强度 $\Delta I$ 与硒在0~60 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内有良好线性关系, 方法的检出限为1.710 $\mu\text{g/L}$ , 小扁豆和贼小豆硒含量测定的相对标准偏差(RSD)分别为3.9%、1.9%( $n=7$ ), 回收率分别为95.56%、96.80%, 测定结果令人满意。

**关键词:** 小扁豆; 贼小豆; 硒; 共振散射光猝灭法

## Determination of Microamounts of Selenium in Seeds of *Lens culinaris* and *Vigna minima* by Resonance Scattering Light Quenching Method

GAO Xiang-yang<sup>1,2</sup>, WU Yun-jing<sup>2</sup>, WANG Ying-ying<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, University for Science and Technology Zhengzhou, Zhengzhou 450064, China;  
2. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A new method to determine microamounts of selenium in the seeds of *Lens culinaris* and *Vigna minima* was established using resonance scattering light quenching. In pH 3.500 B-R buffer solution, selenium (IV) reacted with a certain amount of  $I^-$  to produce an equal molar amount of  $I_3^-$ , which further reacted with rhodamine 6G to form an ion association complex causing linear quenching of resonance scattering light at 592.2 nm. The results showed good linear relationship between resonance scattering light relative quenching intensity  $\Delta I$  and Se(IV) concentration in the range of 0–60  $\mu\text{g/L}$  under optimized conditions. The detection limit of the method was 1.710  $\mu\text{g/L}$ . The precision (RSD) for 7 replicate measurements of selenium in the seeds of *Lens culinaris* and *Vigna minima* was 3.9% and 1.9%, respectively, and the average spiked recovery was 95.56% and 96.80%, respectively. These results were satisfactory.

**Key words:** lentils (*Lens culinaris*); *Vigna minima*; selenium; resonance scattering light quenching method

中图分类号: O657.39

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0261-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316053

小扁豆(*Lens culinaris*)为豆科(*Leguminosae*), 一年或越年生草本, 又名滨豆、鸡眼豆, 有消炎解毒, 治疗咽喉炎、扁桃体炎等功效。贼小豆(*Vigna minima* (Roxb.) Ohwi et Ohashi), 豆科, 一年生缠绕草本, 又名山绿豆、野绿豆, 是我国北部、东南部和南部野生自然食品资源, 生于林中或草丛, 茎纤细, 无毛或被疏毛。

硒是人体必需微量元素<sup>[1]</sup>, 可降低致癌物的毒性, 抑制癌症病灶的发育, 增强对外来致癌因子的抵抗力。缺硒会导致大骨节病、心血管病、糖尿病、白内障、爱滋病等疾病; 硒摄入过量则产生硒中毒<sup>[2]</sup>。硒的测定主要有分光光度法<sup>[3]</sup>、原子荧光法<sup>[4-8]</sup>、分子荧光光谱法<sup>[9-10]</sup>、原子吸收法<sup>[11]</sup>、示波极谱法<sup>[12]</sup>、比浊法<sup>[13]</sup>、电感耦合等离子体质谱法<sup>[14]</sup>等。共振光散射(resonance light scattering,

RLS)技术因其灵敏度高、仪器简单、操作方便等优点已广泛应用于生物大分子的测定<sup>[15]</sup>、药物分析<sup>[16]</sup>、纳米微粒研究<sup>[17]</sup>, 但共振散射光猝灭法测定粮食中的微量硒尚未见报道。本实验以小扁豆和贼小豆为样品测定微量硒的质量分数时, 用微波密闭消解, 样品不污染环境也不被环境所污染, 反应物快速分解, 大大提高工作效率。在B-R缓冲溶液中, Se(IV)将 $I^-$ 氧化生成等物质的量的 $I_2$ ,  $I_2$ 与 $I^-$ 结合生成 $I_3^-$ , 进一步与罗丹明6G反应生成离子缔合物, 引起592.2nm共振散射光的线性猝灭, 体系的共振光相对猝灭强度 $\Delta I$ 与硒在0~60 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内有良好线性关系。这为粮食等食品中硒的测定提供了一种全新的分析方法, 有一定的推广应用价值。

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 河南省重点学科建设基金项目(10466-X-082301)

作者简介: 高向阳(1949—), 男, 教授, 研究方向为食品安全分析、食品新资源开发。E-mail: ndgaoyx@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

小扁豆采自南阳市唐河县桐寨铺镇,呈椭圆形,长8~13mm,宽6~9mm,厚4~7mm,表面平滑呈灰白色或淡黄色,千粒质量为29.0729g;贼小豆采自郑州市龙子湖区,呈长圆形,长约4mm,宽约2mm,黑色或灰黑色,种脐线形,凸起,长3mm,千粒质量为27.3425g,由河南农业大学植物分类学朱长山教授鉴别。

pH3.500B-R缓冲溶液:100mL磷酸、乙酸、硼酸混合液,各酸浓度均为0.040mol/L,用0.20mol/L氢氧化钠溶液调至pH3.500;100μg/mL硒(IV)标准储备溶液:准确称取硒(光谱纯)100.00mg,用少量硝酸溶解后,加2.00mL高氯酸,至沸水浴中加热3~4h,冷却后加0.10mol/L盐酸8.40mL,置沸水浴中2min,冷至室温,用重蒸水定容至1L;硒标准使用液:取100μg/mL硒标准储备液用重蒸水逐级稀释为0.20μg/mL,备用;0.20mol/L碘化钾溶液;1.00×10<sup>-5</sup>mol/L罗丹明6G溶液(RH6G);所用试剂均为分析纯,水为去离子重蒸水。

### 1.2 仪器与设备

970CRT荧光分光光度计 上海分析仪器厂;DHG-9143BS-III电热恒温鼓风干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;PXSJ-216离子分析仪 上海精密科学仪器有限公司;WL-100高速中药粉碎机 瑞安市威力制药机械厂。

玻璃仪器及聚四氟乙烯杯均用2mol/L硝酸浸泡3~4h,依次用自来水、去离子重蒸水洗净后使用。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 标准曲线的绘制

吸取0.20μg/mL硒标准溶液0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00mL分别置于10mL容量瓶中,依次加入pH3.500 B-R缓冲溶液0.80mL、1.0×10<sup>-5</sup>mol/L RH6G溶液0.80mL、用水定容、摇匀、放20min,测定体系中硒的质量浓度分别为0.00、20.00、30.00、40.00、50.00μg/L和60.00μg/L。在 $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}=592.2\text{nm}$ 波长处测定空白溶液的散射光强度 $I_0$ 和硒标准溶液离子缔合物散射光强度 $I$ ,共振散射光相对猝灭强度 $\Delta I=I_0-I$ 。以测定体系中Se(IV)的质量浓度( $\rho$ , μg/L)为横坐标,  $\Delta I$ 为纵坐标绘制标准曲线。

#### 1.3.2 样品中硒的测定

取约10g样品,用粉碎机粉碎,全部过80目(孔径0.20mm)尼龙筛,于105℃烘至恒质量,称取0.1~0.2g(称准至0.0001g)于聚四氟乙烯杯中,加4.00mL硝酸、1.00mL过氧化氢,按表1设定的程序微波消解至无色透明,冷至室温,消解液移至小烧杯中,用去离子水少量多次洗涤消解罐,洗涤液并入小烧杯,在通风橱中加热排酸至微干,用水定量移至10mL容量瓶中定容、混

匀,准确移取1.00mL于另一10mL容量瓶中,依次加入0.80mL pH3.500 B-R缓冲溶液,0.80mL 1.0×10<sup>-5</sup>mol/L RH6G、用水定容、摇匀、以下按1.3.1节操作,同时进行平行测定。根据相对荧光猝灭强度 $\Delta I$ 和回归方程计算样品液中硒的质量浓度( $\rho$ , μg/L),按下式计算样品中硒的含量。

$$\omega = \frac{\rho \times 10 \times 10}{m \times 1000}$$

式中: $\omega$ 为样品中硒的含量/(μg/g); $\rho$ 为样品液中硒的质量浓度/(μg/L); $m$ 为样品的质量/g。

表1 微波消解程序  
Table 1 Hermetic microwave digestion parameter

步骤	预置压力/MPa	微波时间/min	微波功率/W
第1步	0.2	4	600
第2步	0.5	4	800
第3步	1.0	4	800
第4步	1.5	5	800

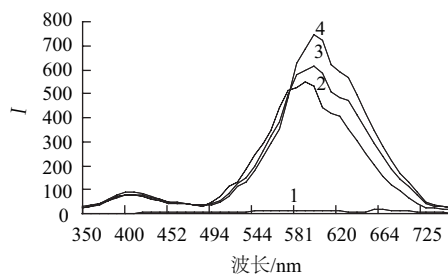
### 1.4 数据处理方法

实验数据采用Microsoft Office Excel 2003软件处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 共振散射光测定波长的确定

荧光分光光度计在350~750nm波长范围内固定 $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$ ,以波长为横坐标,体系溶液散射光的相对强度 $I$ 为纵坐标进行同步扫描,获得共振散射光光谱的自动扫描图如图1所示。



1. Se(IV); 2. Se(IV)-I<sup>-</sup>-RH6G(50μg/L); 3. Se(IV)-I<sup>-</sup>-RH6G(40μg/L); 4. I<sup>-</sup>-RH6G。

图1 测定体系共振光散射光谱

Fig.1 Resonance light scattering spectra of reaction systems

由图1可知,硒(IV)溶液无明显的散射光强度;当B-R缓冲溶液介质中不存在硒(IV),只有RH6G和I<sup>-</sup>与之共存时,体系在 $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}=592.2\text{nm}$ 波长处有最大散射峰;硒(IV)存在时,随硒(IV)含量增加,592.2nm共振散射光强度 $I$ 线性减弱。故选择 $\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}=592.2\text{nm}$ 为测定波长。

### 2.2 反应条件的优化

#### 2.2.1 酸度的影响

用B-R缓冲溶液控制体系溶液的酸度,于10mL

容量瓶中依次加入KI溶液0.40mL、0.20 $\mu$ g/mL硒溶液1.00mL、RH6G溶液1.50mL,在pH2.800~6.700范围内测定体系的共振散射光相对猝灭强度 $\Delta I$ ,结果见图2。

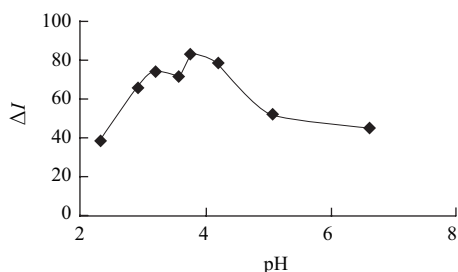


图2 测定体系酸度的影响

Fig.2 Effect of reaction system pH on  $\Delta I$

由图2可知,体系溶液的pH3.800左右具有较大的 $\Delta I$ 值,测定的灵敏度较高。实验表明,向测定体系中加入pH3.500的B-R缓冲溶液0.80mL时,体系溶液的pH值为3.840,测定效果最为理想。

#### 2.2.2 碘化钾溶液用量的影响

于10mL容量瓶中依次加入pH3.500 B-R缓冲溶液0.80mL、0.20 $\mu$ g/mL硒溶液1.00mL、RH6G溶液1.50mL,在加入0.20mol/L碘化钾溶液0.40~1.40mL范围内测定,体系的共振散射光相对猝灭强度 $\Delta I$ 见图3。

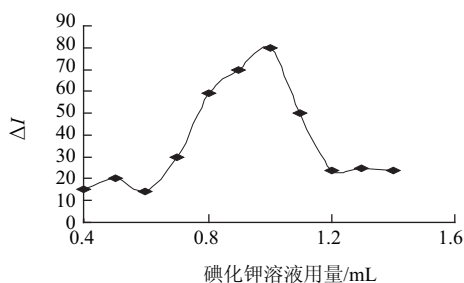


图3 碘化钾溶液用量的影响

Fig.3 Effect of KI solution amount on  $\Delta I$

由图3可知,加入0.20mol/L碘化钾溶液1.00mL时 $\Delta I$ 值最大。

#### 2.2.3 罗丹明6G溶液用量的影响

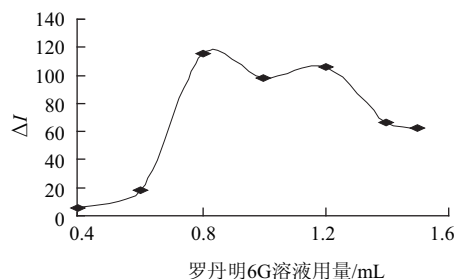


图4 罗丹明6G溶液用量的影响

Fig.4 Effect of rhodamine 6G solution amount on  $\Delta I$

于10mL容量瓶中,依次加入pH3.500 B-R缓冲溶液0.80mL、0.20mol/L KI溶液1.00mL、0.20 $\mu$ g/mL硒溶液1.00mL,在加入 $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L RH6G溶液0.40~1.50mL范围内,测定体系的共振散射光相对猝灭强度 $\Delta I$ 如图4所示。加入 $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L RH6G为0.80mL时,体系产生的 $\Delta I$ 值最大。

#### 2.2.4 反应时间的选择

于10mL容量瓶中,依次加入pH3.500 B-R缓冲溶液0.80mL、0.20mol/L KI溶液1.00mL、0.20 $\mu$ g/L Se(IV)标准溶液1.00mL、 $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L RH6G溶液0.80mL。在0~40min时间段内,按实验方法测定体系的 $\Delta I$ 值,结果如图5所示。

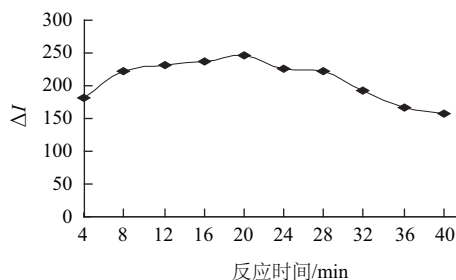


图5 反应时间的影响

Fig.5 Effect of reaction time on  $\Delta I$

由图5可知,反应达到20min时 $\Delta I$ 值最大,故选择反应时间为20min进行测定。

#### 2.3 标准曲线及相关系数

按1.3.1节绘制标准作曲线表明,Se(IV)质量浓度在0~60 $\mu$ g/L范围内与 $\Delta I$ 有良好的线性关系,线性回归方程为 $\Delta I = 3.4417\rho + 7.8309$ ,线性相关系数 $r = 0.9961$ 。

#### 2.4 检出限及定量限

取硒质量浓度为20 $\mu$ g/L标准溶液,按实验方法进行11次平行测定,以3倍标准偏差计算的方法检出限为1.710 $\mu$ g/L,按10倍标准偏差计算的定量限为5.700 $\mu$ g/L。

#### 2.5 测定结果与精密度

按1.3.2节方法处理和测定样品,各样品分别进行7次平行测定,每次平行测定读3次读数,检验无可疑值后,取3次读数的平均值作为平行测定值报告,测定结果如表2所示。

表2 样品中硒的测定结果  
Table 2 Precision of the method

样品	平行测定值/( $\mu$ g/g)							均值/( $\mu$ g/g)	RSD/%
小扁豆	0.220	0.219	0.239	0.227	0.235	0.228	0.237	0.229	3.9
贼小豆	0.325	0.311	0.323	0.313	0.310	0.315	0.318	0.316	1.9

由表2可知,小扁豆中硒含量的平均测定值为0.229 $\mu$ g/g,相对标准偏差(RSD)为3.9%。贼小豆中硒含量的平均测定值为0.316 $\mu$ g/g,RSD为1.9%。

表 3 样品中硒的回收率  
Table 3 Recovery of selenium from spiked real samples

样品	样品加标前测定均值/(μg/L)	加标量/(μg/L)	样品加标后测定值/(μg/L)	加标后的测定均值/(μg/L)	平均加标回收率/%
小扁豆	32.48	25.00	56.33, 57.10, 56.92, 56.13, 55.98, 55.87, 56.24, 55.93, 56.46, 56.74	56.37	95.56
贼小豆	25.01	20.00	45.01, 44.98, 44.73, 43.74, 43.92, 44.81, 44.52, 44.23, 43.89, 43.85	44.37	96.80

2.6 加标回收率

按1.3.2节方法处理和测定, 用含硒20.00、25.00μg/L的标准溶液分别进行10次加标回收率<sup>[18]</sup>实验, 检验无可疑值后取平均值报告, 结果如表3所示。小扁豆、贼小豆样品硒的平均加标回收率分别为95.56%和96.80%

2.7 标准溶液对照检验

用20μg/L Se(IV)的标准溶液按实验方法进行10次平行测定, 结果为20.00、19.70、20.50、20.10、19.50、20.50、19.80、20.00、21.10、21.20μg/L, 平均值为20.24μg/L, 标准偏差为0.57μg/L, 相对误差为1.2%。按公式(2)计算得 $t$ 为1.33, 在置信度为95%,  $f=9$ 时,  $t=2.26$ ,  $1.33<2.26$ 。因此, 有95%的把握认为测定数据的平均值与标准值之间不存在显著性差异。

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{S} \sqrt{n} \quad (2)$$

式中:  $n$ 为平行测定次数;  $\bar{x}$ 为标准溶液测定的平均值;  $\mu$ 为标准溶液的浓度示值;  $S$ 为 $n$ 次平行测定的标准偏差。

3 结 论

用共振散射光猝灭技术, 探讨了Se(IV)-I<sup>-</sup>-RH6G共振散射光体系的光谱特征, 优化了测定的最佳条件, 建立了共振散射光猝灭法分析粮食中硒含量的新体系。该法灵敏度较高, 选择性好, 分析成本低, 反应条件温和且易于控制, 对20μg/L Se(IV)的标准溶液测定的相对误差为1.2%。用于小扁豆和贼小豆的测定, 硒含量分别为0.229μg/g和0.316μg/g, 相对标准偏差分别为3.9%和1.9%, 回收率分别为95.56%和96.80%, 方法的检出限为1.710μg/L, 结果令人满意, 有一定的推广应用价值。

参考文献:

[1] JOHANSSON L, GAFVELIN G, AMERE S J. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1726(1): 1-13.

[2] JIANG Jianbo. Determination of total selenium and aqueous and exchangeable selenium in crude rice[J]. Journal of Jishou University, 2004, 25(2): 86-88.

[3] 李人宇, 陶明涛, 李咏梅, 等. 离子缔合体系分光光度法测定食盐中微量硒[J]. 盐业与化工, 2009, 38(5): 29-32.

[4] 孙连伟, 韩雪, 付爱瑞, 等. 高压罐消解-氢化物发生原子荧光法测定花生中硒含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19): 11950-11951.

[5] 王铁鹏, 孙晓萌, 许强, 等. 氢化物原子荧光法测定生姜中的硒[J]. 贵阳医学院学报, 2011, 36(6): 569-571.

[6] 王梅, 张红香, 邹志辉, 等. 原子荧光光谱法测定富硒螺旋藻片中不同形态、价态硒[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 179-182.

[7] 肖辉, 吴向阳, 仰榴青, 等. 氢化物-原子荧光法测定姬松茸实体中硒含量[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 247-249.

[8] 刁娟娟, 李莉, 阳胜, 等. 氢化物原子荧光法测定大蒜及其制品中的硒[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 166-168.

[9] 郭华, 侯冬岩, 回瑞华, 等. 4-甲基-邻苯二胺荧光光度法测定痕量硒[J]. 光谱实验室, 2006, 23(1): 88-90.

[10] 吴艳华, 李健, 刘伟, 等. 密封微溶样荧光法测定食物中微量防癌元素硒含量[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2001, 17(1): 51-54.

[11] 李晓燕, 吕述萍. 微波消解-石墨炉原子吸收光谱法测定大气颗粒物中的硒[J]. 内蒙古石油化工, 2012(1): 21-22.

[12] 刘光忠. 食品中硒的示波极谱测定[J]. 环境与健康杂志, 2000, 17(增刊1): 22.

[13] 李咏梅, 李人宇, 秦纪亮. 比浊法测定食盐中微量硒[J]. 盐业与化工, 2008, 37(3): 41-44.

[14] 刘军, 陈建平. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定灵芝孢子粉中锗和硒[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 531-532.

[15] 刘潇威. 生物大分子光谱探针的研究及其分析应用[D]. 济南: 山东大学, 2010.

[16] 覃明丽. 共振光散射技术在有机小分子药物分析中的应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.

[17] 郭艳丽, 孙凤. 金纳米微粒-血清蛋白体系的光谱特性研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(11): 7-8.

[18] 伍云卿, 涂杰峰, 范超, 等. 加标回收实验方案探讨[J]. 福建分析测试, 2010(3): 67-71.