

LEONIA SŁUŻEWSKA

SPEKTROFOTOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA SELENU
W MATERIALE ROŚLINNYM

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

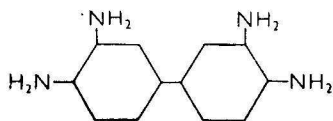
Kierownik Zakładu: prof. dr M. Nikonorow

Zastosowano spektrofotometryczną metodę oznaczania selenu, pozwalającą wykryć w materiale biologicznym 0,5 µg Se. Podano sposób mineralizacji substancji organicznych przy użyciu mieszaniny kwasów azotowego i nadchlorowego.

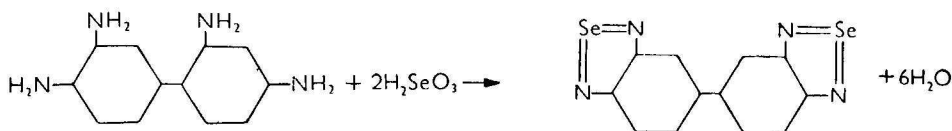
Omówione w poprzedniej pracy (1) toksykologiczne właściwości selenu oraz jego biologiczna rola jako niezbędnego pierwiastka śladowego uzasadniają konieczność opracowania metody oznaczania tego pierwiastka w środkach spożywczych, a także w innym materiale biologicznym.

Klasyczne metody oznaczania selenu w substancjach organicznych w przeważającej większości polegają na częściowej mineralizacji na mokro badanego materiału i izolowaniu selenu za pomocą destylacji z kwasem bromowodorowym w postaci lotnego czterobromku selenu (2—7). Zasadą oznaczania selenu w destylacie jest przeważnie redukcja połączeń selenu do selenu pierwiastkowego przy zastosowaniu takich czynników redukujących, jak np. dwutlenek siarki i chlorowodorek hydroksyloaminy (2), kwas askorbinowy (4, 8), chlorek cynawy (9), hydrazyna (10—12), tiomocznik (13), po czym selen elementarny oznacza się wagowo, turbidymetrycznie, miareczkowo (głównie jodometrycznie) lub kolorymetrycznie. Większość z tych metod nie spełnia wymagań obecnych, których celem jest oznaczanie mikrogramowych ilości tego pierwiastka w materiale biologicznym, co stało się niezwykle ważne z chwilą stwierdzenia fizjologicznej roli selenu i korzystnego działania w minimalnych ilościach w razie schorzeń zwierząt na tle niedoboru selenu. Odkrycie przez Hoste'a (14) 3,3'-dwuaminobenzydyny jako specyficznego odczynnika na selen i wykorzystanie jej przy spektrofotometrycznym oznaczaniu (15) było wielkim postępem w metodyce oznaczania selenu. Obecnie stosowane są do tego celu również metody chromatograficzne (34, 35), polarograficzne (36), a także metody oparte na badaniu fluorescencji wywołanej promieniami rentgenowskimi (37) oraz na zastosowaniu izotopów promieniotwórczych (38, 39).

Przed wyborem do oznaczania selenu dwuaminobenzydyny, odczynnika na razie trudno dostępnego, próbowałam posługiwać się łatwo osiągalną kodeiną, polecaną przez niektórych autorów (16, 17), jednakże nie otrzymałam zachęcających wyników i zaniechałam dalszych prób z tym odczynnikiem.



3,3'-Dwuaminobenzydyna (DAB) jest to odczynnik po raz pierwszy zastosowany przez Piena do oznaczania dwuacetylu w maśle (18). Ściśła nazwa tej substancji powinna brzmieć 3,3'-4,4'-czteroaminodwufenyl, lecz przez analogię z benzydyną, od której się wywodzi, Pien nazwał ją 3,3'-dwuaminobenzzydyną. Związek ten okazał się także czułym odczynnikiem na selen. W przeciwieństwie do większości reakcji, stosowanych do wykrywania i oznaczania selenu, reakcja z dwuaminobenzzydyną nie zależy od procesów oksydoredukcyjnych. Dwuaminobenzzydyna nie jest utleniana przez kwas selenawy, lecz w reakcji z nim tworzy barwny (żółty) związek — piazselenol o pięciocłonowym pierścieniu:



Istnieje wiele metod oznaczania selenu opartych na pomiarze absorpcji (5, 6, 15, 19—24, 28) lub fluorescencji (25—27) widma piazselenolu, a także metod, w których stosuje się DAB i oznaczanie spektrofotometryczne w połączeniu z techniką izotopową (7) lub oznaczaniem polarograficznym (29). Tylko niektóre z przytoczonych prac dotyczą oznaczania selenu w materiale biologicznym, większość opisanych metod stosowano do oznaczania śladów selenu w substancjach mineralnych, jak np. w kwasie siarkowym, arsenie, siarce, tellurze.

Przy opracowaniu opisanej niżej metodyki spektrofotometrycznego oznaczania Se wzorowano się częściowo na pracy Chenga (19), wprowadzając pewne modyfikacje do metody, stosowanej przez autora do oznaczania śladów selenu w arsenie.

Sposób postępowania ustalono, posługując się roztworami wzorcowymi przygotowanymi z seleninu sodu oraz z dwutlenku selenu, przy czym dla obu roztworów otrzymano pokrywające się krzywe absorpcji, co pozwoliło wyeliminować oznaczenie zawartości selenu w substancjach wzorcowych metodami konwencjonalnymi.

Stwierdzono, że maksimum absorpcji piazselenolu (mierzonej na spektrofotometrze Colemana) przypada na 420 mμ, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa.

Zbadano wpływ obcych jonów na wyniki oznaczania selenu. Stwierdzono, że obecność jonów Na, K, Ca, Mg, Zn, SO₄ nie wywiera wpływu na wyniki oznaczenia, a przy zastosowaniu 0,1 M roztworu wersenianu dwusodowego (sól dwusodowa EDTA) nie przeszkadzają także jony Fe, Cu, Pb, Mo, PO₄, nawet w ilościach stokrotnie przewyższających ilości selenu.

Poza wspomnianymi jonami, które bez zastosowania EDTA mogą przeszkadzać w oznaczeniu, niekorzystny wpływ mogłyby mieć tylko te substancje, które albo utleniają DAB, albo redukują selenin do Se

pierwiastkowego. Wobec tego jednak, że opisany niżej sposób postępowania eliminuje obecność tych czynników, metodę należy uznać za specyficzną i selektywną dla Se.

Przy oznaczaniu selenu w substancjach organicznych ważnym zagadnieniem jest sposób mineralizacji. W związku z lotnością połączeń selenu nie można stosować spalania na sucho w zwykłych warunkach. Daje ono dobre wyniki jedynie przy zastosowaniu specjalnych aparatów, pozwalających na spalanie w strumieniu tlenu w temperaturze 800—900° (30—32).

Przeprowadzono szereg prób mineralizacji substancji organicznej na mokro, stosując przy tym następujące kwasy w różnych stosunkach ilościowych: 1) kwas azotowy + kwas siarkowy, 2) kwas azotowy + kwas siarkowy z dodatkiem HgO jako katalizatora, 3) kwas azotowy + kwas siarkowy + kwas nadchlorowy, 4) kwas azotowy + kwas nadchlorowy.

Jako ostateczny sposób mineralizacji wybrano spalanie mieszaniną kwasów azotowego i nadchlorowego w stosunku 3:1, dające najbardziej zadowalające wyniki, korzystne też z tego względu, że dzięki wyeliminowaniu kwasu siarkowego unika się tworzenia — w czasie spalania substancji bogatych w wapń — osadu siarczanu wapnia, przeszkadzającego w dalszym oznaczaniu selenu; kwas nadchlorowy ma natomiast tę zaletę, że dzięki wysokiej rozpuszczalności większości nadchloranów zapobiega się kłopotliwemu wytrącaniu osadów.

Mineralizację przeprowadzano w kolbach stożkowych poj. 500 ml, zgodnie z obserwacją *Gorsucha* (33), który zaleca ten sposób spalania w razie niemożności korzystania ze specjalnego aparatu do spalań. Wysokie stosunkowo boki kolb stożkowych oraz niewielki otwór stwarzają możliwość deflegmacji przy spalaniu, dzięki czemu unika się strat w czasie mineralizacji.

Przy opracowywaniu warunków mineralizacji jako substancją organiczną posługiwano się kwasem taninowym, mąką i suszem marchwi z dodatkiem znanych ilości wzorca; dla porównania wykonano także oznaczenia selenu w zmineralizowanych roztworach wzorcowych.

Jak wspomniano wyżej, sposób postępowania przy oznaczaniu selenu ustalono w oparciu o metodykę podaną przez *Chenga* (19). Wprowadzone odstępstwa od tej metodyki polegają na: 1) zastosowaniu innych związków selenu do przygotowania roztworów wzorcowych; 2) ustaleniu czasu powstawania piaszelenolu na 1 godzinę; 3) przeprowadzaniu całego oznaczenia (łącznie z ekstrakcją toluenem) w cylindrach z doszlifowanymi korkami; 4) bezpośrednim pomiarze absorpcji, bez wirowania wyciągów toluenowych; ponadto metodę przystosowano do oznaczania Se w substancjach organicznych.

OPIS METODY

1. O d c z y n n i k i:

kwas azotowy cz. d. a. (c. wł. 1,40),
kwas nadchlorowy cz. d. a. 60%,
kwas solny cz. d. a. (c. wł. 1,19),
wodorotlenek amonu cz. d. a. stęż. i roztwór 7 M,
kwas mrówkowy cz. d. a. roztwór 2,5 M,

purpura m-krezolowa 0,1% roztwór w 50% alkoholu,
wersenian dwusodowy (sól dwusodowa EDTA) cz. d. a. roztwór 0,1 M,
toluen cz. d. a.,
chlorowodorek 3,3'-dwuaminobenzydiny *), (prod. „Prolabo”, Paryż),
roztwór 0,5%.

Roztwory wzorcowe w zależności od posiadanych odczynników można przygotować z seleninu sodu lub z dwutlenku selenu.

a. Przygotowanie roztworu z seleninu sodu:

roztwór A: 0,5476 g Na_2SeO_3 (cz. d. a.) rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie mierniczej na 250 ml. 1 ml roztworu zawiera 1 mg Se; roztwór B: 10 ml roztworu A rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie mierniczej na 10 ml. 1 ml roztworu zawiera 100 μg Se; roztwór C (roboczy): 10 ml roztworu B rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie mierniczej na 100 ml. 1 ml roztworu zawiera 10 μg Se.

b. Przygotowanie roztworu z dwutlenku selenu:

roztwór A': 0,3513 g SeO_2 (cz. d. a.) rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie mierniczej na 250 ml. 1 ml roztworu zawiera 1 mg Se; roztwór B': 10 ml roztworu A' rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie mierniczej na 100 ml. 1 ml roztworu zawiera 100 μg Se; roztwór C' (roboczy): 10 ml roztworu B' rozcieńczyć wodą destylowaną w kolbie mierniczej na 100 ml. 1 ml roztworu zawiera 10 μg Se.

2. Mineralizacja:

Badaną próbę w ilości 2—10 g (materiał roślinny wysuszony w suszarce w temp. 60° umieszcza się w kolbie stożkowej poj. 500 ml, zalewa się 10—30 ml kwasu azotowego, tak aby cała próba była zwilżona i pozostawia pod przykryciem na 2—3 godziny. Następnie dodaje się kwas nadchlorowy w takiej ilości, ażeby stosunek $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ wynosił 3:1, po czym kolbę umieszczoną na siatce azbestowej ogrzewa się ostrożnie, stopniowo zwiększając płomień palnika. W razie ściemnienia próby przerywa się ogrzewanie i po ostygnięciu dodaje się jeszcze po kilka ml kwasu azotowego i nadchlorowego (zachowując stosunek 3:1), ogrzewa w dalszym ciągu aż do całkowitego zmineralizowania próby i wydzielania się obfitych białych dymów kwasu nadchlorowego. Po ostygnięciu dodaje się 20 ml wody destylowanej, w dalszym ciągu ogrzewa i od momentu ponownego ukazania się białych dymów HClO_4 ogrzewanie kontynuuje się przez 10 minut. Wygotowanie próby z wodą ma na celu całkowite usunięcie kwasu azotowego, przeszkadzającego w oznaczaniu selenu. Następnie do zimnego roztworu dodaje się 5 ml kwasu solnego i ogrzewa przez kilka minut, przeprowadzając w ten sposób redukcję sześciowartościowych połączeń selenu do czterowartościowych, gdyż tylko takie reagują z 3,3'-dwuaminobenzydynam. Roztwór przenosi się ilościowo do kolbki mierniczej na 25 lub 50 ml, uzupełnia do kreski wodą destylowaną i pobiera odpowiednią ilość do oznaczenia.

*) Rozpoczęcie doświadczeń umożliwiło mi otrzymanie próbek odczynnika od p. J. Pien, dyrektora Laboratoires Laiterie des Fermiers Réunis. St. Ouen (Seine) oraz prof. Keihei Ueno, Kyushu University, Fukuoka, Japonia, za co na tym miejscu dziękuję.

3. O z n a c z a n i e s e l e n u :

Do cylindrów z doszlifowanymi korkami (poj. 80—100 ml) pobiera się z kolbek po 5—10 ml zmineralizowanych roztworów (w razie pobrania z poszczególnych kolbek mniejszych ilości należy uzupełnić zawartości wszystkich cylindrów wodą destylowaną do 10 ml) i doprowadza pH badanych roztworów do 2—3 stężonym wodorotlenkiem amonu wobec 1 kropli roztworu purpury m-krezolowej (zmiana barwy z czerwonej na żółtą). Następnie do cylindrów dodaje się po 2 ml kwasu mrówkowego (w obecności HCOOH szybciej tworzy się barwną połączanie Se z DAß), 10 ml wersenianu sodowego i 2 ml 0,5% roztworu 3,3'-dwuaminobenzydyny. W momencie dodawania odczynnika pH roztworu powinno wynosić 2—3, gdyż przy tej wartości pH odczynnik nie ulega utlenianiu. Zawartość cylindrów miesza się wirowym ruchem i pozostawia w temperaturze pokojowej na 1 godzinę. Po upływie tego czasu pH roztworów doprowadza się 7 M roztworem NH_4OH do 7—8 (zmiana barwy z żółtej na fioletowoczerwonawą); jest to wartość pH, przy której następuje całkowita ekstrakcja piaszselenu toluenem. Z biurety odmierza się do cylindrów po 10 ml toluenu, zamyka korkiem i wytrząsa silnie cylindry przez 30 sekund. Po rozdzieleniu się warstw ściąga się pipetami warstwy toluenowe do probówek i mierzy absorpcję na spektrofotometrze Colemana przy 420 mμ.

Należy pamiętać o wykonaniu ślepej próby z każdej nowej partii kwasów i wodorotlenku amonu użytych do mineralizacji i zobojętniania badanych prób.

Próbe „zerową” oraz skalę wzorcową przygotowuje się jednocześnie z próbami badanymi w następujący sposób: do cylindrów pobiera się roztwór wzorcowy C (lub C') w ilości odpowiadającej 0,5, 1, 2, 3, 4..... 20 μg Se, uzupełnia wodą destylowaną do takiej samej objętości, jaką zajmują w cylindrach zobojętnione wodorotlenkiem amonu próby (żółto zabarwione), dodaje jedną kroplę wskaźnika i następnie wszystkie odczynniki, analogicznie jak do prób badanych; próbe „zerową” stanowi odpowiednia ilość wody destylowanej.

Precyzję metody (odchylenie standartowe) ilustrują tabele I i II; podane wyniki dotyczą mineralizacji roztworów wzorcowych oraz kwasu taninowego, maki i suszu marchwi z dodanymi ilościami selenu.

Opisana powyżej spektrofotometryczna metoda pozwala na oznaczanie 0,5 μg Se w zmineralizowanej próbce substancji organicznej, przy czym w zakresie do 30 μg krzywe kalibracji podlegają prawu Lamberta-Beera.

Na wyniki korzystnie wpływa przeprowadzanie całego oznaczenia w cylindrach, dzięki czemu unika się ewentualnych strat, spowodowanych przenoszeniem badanych roztworów do rozdzielaczy, w których Cheng poleca wykonywać ekstrakcję toluenem. Stwierdzono także, że niekonieczne jest zalecane wirowanie warstw toluenowych, gdyż po ściągnięciu ich pipetami są dostatecznie klarowne i można od razu oznaczać ich absorpcję. (W wyjątkowych, bardzo rzadkich wypadkach pojawienia się nieznacznego zmętnienia, wystarczające jest przesączenie przez zwykły suchy sączek).

Sposób mineralizacji przeprowadzanej w kolbach stożkowych przy zastosowaniu do spalania mieszaniny kwasu azotowego i nadchloro-

Tabela I

Roztwór wzorcowy		Odchylenie		Standartowe odchylenie S (%)*)
Zawartość $\mu\text{g Se}$	Wykryto $\mu\text{g Se}$	μg	%	
4,00	4,20	+ 0,20	+ 5,00	6,96
	3,95	— 0,05	— 1,25	
8,00	6,90	— 1,10	— 13,70	
	7,45	— 0,55	— 7,00	
10,00	9,90	— 0,10	— 1,00	
	10,00	0,00	0,00	
	9,60	— 0,40	— 4,00	
	9,70	— 0,30	— 3,00	
20,00	9,80	— 0,20	— 2,00	
	17,60	— 2,40	— 12,00	

*) Obliczono wg wzoru (19):
$$S = \sqrt{\frac{\sum (\% \text{ odchylenie})^2}{n-1}}$$

Tabela II

Produkt	Se μg		Odchylenie		Standartowe odchylenie S (%)
	dodano	wykryto	μg	%	
Susz marchwi	4,00	3,90	— 0,10	— 2,50	5,28
		3,70	— 0,30	— 7,50	
	8,00	7,90	— 0,10	— 1,25	
		7,90	— 0,10	— 1,25	
	10,00	9,50	— 0,50	— 5,00	
		9,30	— 0,70	— 7,00	
Mąka	4,00	3,90	— 0,10	— 2,50	9,62
		3,95	— 0,05	— 1,25	
		3,70	— 0,30	— 7,50	
	8,00	7,00	— 1,00	— 12,50	
		7,20	— 0,80	— 10,00	
		7,90	— 0,10	— 1,25	
	10,00	7,70	— 0,30	— 3,75	
		8,20	— 1,80	— 18,00	
		9,10	— 0,90	— 9,00	
Kwas taninowy	2,00	2,10	+ 0,10	+ 5,00	5,92
		1,90	— 0,10	— 5,00	
		2,20	+ 0,20	+ 10,00	
	10,00	10,00	0,00	0,00	
		10,00	0,00	0,00	
		9,50	— 0,50	— 5,00	

wego oraz kwasu solnego do redukcji związków selenu jest prosty i szybki, a odzyskiwanie znanych ilości selenu, dodawanych do mineralizowanych prób, jest zadowalające. W zależności od mineralizowanego materiału uzyskane standartowe odchylenie wynosi 5,28—9,62%.

Dobre wyniki zastosowanego sposobu mineralizacji i redukcji związków Se upraszczają stosowaną dotychczas metodykę oznaczania selenu w materiale biologicznym.

Л. Служевска

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Содержание

Разработан спектрофотометрический метод определения селена при помощи 3,3'-диаминобензидина. Позволяет он определить 0,5 мкг селена в пробе растительного материала, причем до 30 мкг селена кривая калибровки подвергается закону Lambert-Beera.

Представлен простой и быстрый способ минерализации органической субстанции, применяя смесь азотной и хлорной кислот а также соляной кислоты, редуцирующей соединения селена. Обратное получение добавляемых известных количеств селена перед минерализацией пробы, вполне удовлетворительно, а стандартное отклонение в зависимости от минерализованного материала выносит 5,28—9,62%.

Хорошие результаты применяемого способа минерализации и редукции соединений селена упрощают применяемый до сих пор метод определения селена в растительном материале.

L. Służewska

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SELENIUM DETERMINATION IN PLANT MATERIAL

Summary

The described spectrophotometric method with use of 3,3'-diaminobenzidine allows for determination of 0.5 ug selenium in combusted organic substance and the calibration curve up to 30 ug Se indicates agreement with Lambert-Beer law.

Simple and quick method of mineralization based on combustion with use of nitric, perchloric and hydrochloric acids mixture is described. Recovery is good and Pearson's coefficient amounts some 5.3—9.6% depending on the material.

Satisfactory results of mineralization and reduction of selenium compounds in described procedure allows to simplify the method used up to date for selenium determination in biological material.

PIŚMIENNICTWO

1. Służewska L.: Roczniki PZH, XIII, 31, 1962. — 2. Robinson W. O., Dudley H. C., Williams K. T., Byers H. G.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 6, 274, 1934. — 3. Official Methods of Analysis AOAC, Waszyngton 1950. — 4. Fogg D. N., Wilkinson N. T.: Analyst, 81, 525, 1956. — 5. Handley R., Johnson C. M.: Anal. Chem., 31, 2105, 1959. — 6. Pien J., Desirant J., Orsini F., Avril P.: Ann. Falsif. Expert.

Chim., 53, 83, 1960. — 7. Kelleher W. J., Johnson M. J.: Anal. Chem., 33, 1429, 1961. — 8. Dingwall D., Williams W. D.: J. Pharm. Pharmacol., 13, 12, 1961. — 9. Kotarski A., Marczenko Z.: Chemia Analit., 5, 235, 1960. — 10. Leontovitch N.: Chim. Anal., 41, 56, 1959.

11. Feigl F.: Anal. Chim. Acta, 24, 501, 1961. — 12. Tarajan W. M., Awakim T. T.: Zawod. Labor., 27, 967, 1961. — 13. Sitaramachandramurthy A., Chandrasekhariah M. S.: Current Sci. (India), 30, 336, 1961, wg C. A. 56, 2885a, 1962. — 14. Hoste J.: Anal. Chim. Acta, 2, 402, 1948. — 15. Hoste J., Gillis J.: ibid, 12, 158, 1955. — 16. Horn M. J.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 6, 34, 1934. — 17. Gortner R. A., Lewis H. B.: ibid, 11, 198, 1939. — 18. Pien J., Baisse J., Martin R.: Le Lait, 17, 673, 1937. — 19. Cheng K. L.: Anal. Chem., 28, 1738, 1956. — 20. Taeko Danzuka, Keihei Ueno: ibid, 30, 1370, 1958.

21. Bonhorst C. W., Mattice J. J.: ibid, 31, 2106, 1959. — 22. Luke C. L.: ibid, 31, 572, 1959. — 23. Veale C. R.: Analyst., 85, 130, 1960. — 24. Magin G. B., Thatcher L. L., Rettig S., Levine H.: JAWWA, 52, 1199, 1960. — 25. Watkinson J. H.: Anal. Chem., 32, 981, 1960. — 26. Cousins F. B.: Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 38 (part 1), 11, 1960. — 27. Parker C. A., Harvey L. G.: Analyst, 86, 54, 1961. — 28. Iwankowa A. I., Blum I. A.: Zawod. Labor., 27, 371, 1961. — 29. Le Peintre C.: Compt. Rend., 252, 1968, 1961. — 30. Zabrodina A. S., Bargejewa M. R.: Vest. Moskow. Uniw., Chim., 13, Nr 4, 187, 1958, wg C. A. 53, 12946a, 1959.

31. Zabrodina A. S., Chystowa A. P.: ibid, ser. 11, 15, Nr 1, 69, 1960, wg C. A. 54, 19301g, 1960. — 32. Meier E., Shaltiel N.: Mikrochim. Acta, zesz. 4, 580, 1960. — 33. Gorsuch T. T.: Analyst, 84, 150, 1959. — 34. Weatherley E. G.: ibid, 81, 404, 1956. — 35. Levi M. C., Danon J.: J. Chromatography, 3, 584, 1960. — 36. Faulkner A. G., Knoblock E. C., Purdy W. C.: Clin. Chem., 7, 22, 1961, wg Anal. Abstr., 8, 5132, 1961. — 37. Olson E. C., Shell J. W.: Anal. Chim. Acta, 23, 219, 1960. — 38. Otwinowski W., Jakowlew Ju. W.: Acta Chim. Sci. Hung., 26, 243, 1961, wg C. A. 55, 21976b, 1961. — 39. Bowen H. J. M., Cawse P. A.: Analyst, 88, 721, 1963.

Otrzymano: 9.XII.1963 r.