

AGNIESZKA GAWŁOSKA, JOANNA MASŁOWSKA

## WYKORZYSTANIE METODY HPLC DO OZNACZANIA Se(IV) I Se(VI) W WODACH MINERALNYCH

### Streszczenie

Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) badano specjację selenu w naturalnych wodach mineralnych. Wykresy kalibracyjne były linearne z bardzo dobrym współczynnikiem korelacji. Czas retencji Se(IV) wynosił 2,27 min, a Se(VI) 4,37min. Proponowana metoda RP-HPLC-UV daje odzysk 99,6%. Najwyższą zawartość selenu(IV) stwierdzono w wodach mineralnych: "Oda"; "Nałęczowianka" i "Muszynianka", a najniższą w "Ostromecko citron". Najniższą zawartość Se(VI) stwierdzono w wodzie gazowanej "Galicjanka". Zawartość selenu w badanych próbkach wód mineralnych nie przekraczała dopuszczalnych norm. Proponowana metoda RP-HPLC-UV może być wykorzystana do badania specjacji selenu w wodach mineralnych.

### Wprowadzenie

Jednym z mikroelementów, który w ostatnich latach wzbudza zainteresowanie ze względu na swoje właściwości jest selen. Jeszcze na początku XX wieku uważano ten pierwiastek za najbardziej toksyczny, powodujący wiele objawów chorobowych u ludzi i zwierząt [6]. Dopiero w połowie XX wieku uległ zmianie pogląd na temat roli selenu w żywieniu. Do zmiany tej przyczynili się m.in. dwaj badacze Schwarz i Foltz [21], którzy wykazali, że brak selenu w diecie prowadzi do groźnych zaburzeń metabolicznych, które można usunąć podając jego małe dawki. W 1951 r. selen został zaliczony do niezbędnych pierwiastków śladowych dla zwierząt, a późniejsze badania udowodniły, że jest on także niezbędny dla ludzi. Obecność selenu w przyrodzie jest niezmiernie ważna. Stężenie, przemiany i akumulacja selenu w środowisku zależą od wartości pH, warunków redukująco-utleniających, temperatury, obecności substancji nieorganicznych i/lub organicznych, jak również od działalności drobnoustrojów. Razem procesy te stanowią cykl biogeochemiczny [17]. Selen wchłaniany jest przez ro-

śliny z gleby lub z atmosfery, potem ulatnia się przez procesy biometylowania, wreszcie dostarczany jest zwierzętom i ludziom. Jest on niezbędny do rozwijania metod specjacji niezawodnych i czułych, pozwalających na oznaczenie całkowitej jego zawartości, ale również do określenia różnych jego form fizykochemicznych (specjacja) [19].

Toksyczność i aktywność biologiczna selenu zależą od jego formy fizykochemicznej. Zmiana charakteru pierwiastka, z niebezpiecznego na prozdrowotny, następuje w bardzo wąskim zakresie stężenia. Dla dorosłych zalecana dawka dzienna wynosi 70 µg Se/dzień, podczas gdy zawartość toksyczną oszacowano na poziomie 800 µg Se/dzień [17]. Toksyczność wobec ekosystemów zmienia się w zależności od formy występowania selenu. Może on być obecny tak w postaci nieorganicznej na różnych stopniach utlenienia (-2,0,+4,+6), jak i w postaci organicznej (aminokwasy i związki metylowe) [4]. Postacie nieorganiczne seleniny i seleniany są w szczególności toksyczne. Często spotykaną formą aminokwasową selenu jest selenometionina (SeMet) i selenocysteina (SeCys) [2].

W naturalnych wodach selen występuje przeważnie w utlenionych formach Se(IV) jako selenin ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) i Se(VI) jako selenian ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) [8]. W kwaśnych glebach, mało napowietrzonych, selen jest obecny jako selenek metaliczny nierozpuszczalny, a w glebach zasadowych, dobrze napowietrzonych, obecne są seleniany rozpuszczalne i bezpośrednio przyswajalne przez rośliny [9].

W badaniach nad specjacją stosowane są prawie wszystkie znane metody analityczne, w tym różne odmiany chromatografii. Jedną ze stosowanych metod chromatograficznych w badaniach specjacji jest metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [18].

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC) do badania specjacji selenu w wybranych naturalnych wodach mineralnych.

## **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiło 11 różnych wód mineralnych, w 1,5 litrowych butelkach plastikowych, zakupionych w punktach handlu detalicznego na terenie Łodzi. Były to: Muszynianka, Nałęczowianka, Oda, Multi Vita, Mazowszanka, Ostromecko citron, Zdroje Grodziska, Krakowianka, Fructom i Galicjanka, gazowane i niegazowane.

We wszystkich badanych próbkach, formy selenu (specjacja) oznaczano wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC), stosując aparat firmy Dionex-Softran GmbH (Szwecja) wyposażony w degazer DG-1310, pompę p580A HPG, autosampler Gina 50T, piec STH 585, detektor UV/VIS UVD 170s oraz dodatkowo wyposażony w program Chromeleon ver 6.00.

### Odczynniki i roztwory

- a) dejonizowana woda destylowana o przewodnictwie  $0,03 \mu\text{S}$ ,
- b) metanol do HPLC, cz.d.a., firmy POCh-Gliwice,
- c)  $5 \text{ mmol/l}$  fosforan tetrabutylamoniowy, cz.d.a., firmy Fluka,
- d) jako roztwór podstawowy (A) służył roztwór selenianu(IV) sodu  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  przygotowany ze stałego odczynnika cz.d.a., firmy Fluka. W celu jego przygotowania odważano  $2,190 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  i rozpuszczano w dejonizowanej – destylowanej wodzie w kolbie miarowej o poj.  $1000 \text{ ml}$ ,
- e) jako roztwór podstawowy (B) służył roztwór selenianu(VI) sodu  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  przygotowany ze stałego odczynnika cz.d.a., firmy Aldrich. W celu jego przygotowania odważano  $2,393 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  i rozpuszczano w dejonizowanej, destylowanej wodzie w kolbie miarowej o poj.  $1000 \text{ ml}$ .

Świeże standardy  $\text{SeO}_3^{2-}$  i  $\text{SeO}_4^{2-}$  (pojedyncze lub mieszane) były przygotowywane codziennie, z roztworów podstawowych A i B. Roztworami roboczymi były świeże standardy.

Rozdziały chromatograficzne uzyskiwano na kolumnie z fazą odwróconą C18, ( $250 \times 4,0 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ , firma Z.O.Ch. Lublin). Jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę  $5 \text{ mmol/l}$  fosforanu tetrabutylamoniowego,  $50/50$  woda/metanol o  $\text{pH}$   $3,4$ . Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła  $1 \text{ ml/min}$ . W badaniach stosowano detekcję przy długości fali  $\Phi = 210 \text{ nm}$ . Badane próbki były sączone przez sączki Filtrak Sorte:  $390 \Phi 125 \text{ mm}$  (Ref. Nr:3.103.125) przed injekcją na kolumnę. Objętość badanych próbek była stała i wynosiła  $5 \mu\text{l}$ . Wszystkie warunki pomiarów uprzednio zoptymalizowano.

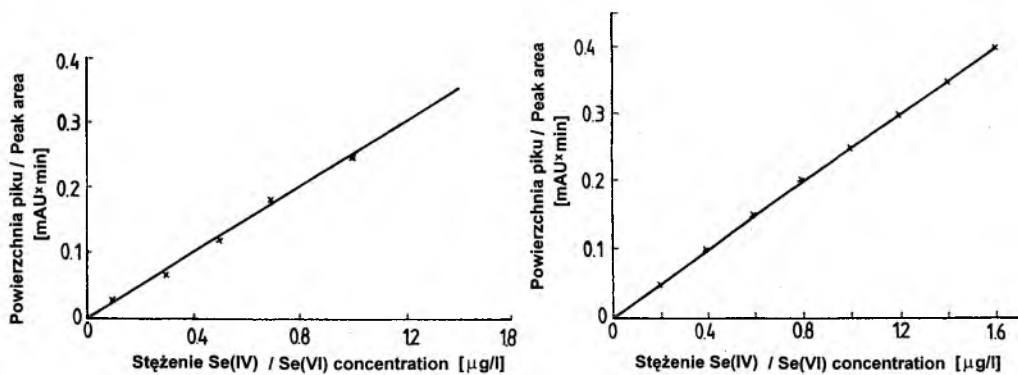
Odzysk badano metodą dodatku znanej ilości wzorca selenu.

### Wyniki i ich omówienie

Wykresy kalibracyjne miały postać linii prostej, o współczynniku korelacji  $r > 0,999$ . Na rys. 1. zamieszczono wykres kalibracyjny roztworów standardowych selenu (IV) i (VI). Czas retencji Se(IV) wynosił  $2,27 \text{ min}$ , a Se(VI)  $4,37 \text{ min}$  (rys. 2.). Względne odchylenie standardowe (R.S.D.) Se(IV) wynosiło  $1,89\%$ , a Se(VI)  $2,87\%$ . Limity detekcji wynosiły odpowiednio  $0,14 \text{ ng}$  ( $7 \mu\text{g/l}$ ) – jon Se(IV) i  $2 \text{ ng}$  ( $100 \mu\text{g/l}$ ) – jon Se(VI). Proponowana przez nas metoda RP-HPLC-UV daje odzysk  $98,3 \%$  przy  $1,0 \mu\text{g/ml}$   $\text{SeO}_3^{2-}$  i  $97,4\%$  przy  $1,0 \mu\text{g/ml}$   $\text{SeO}_4^{2-}$ .

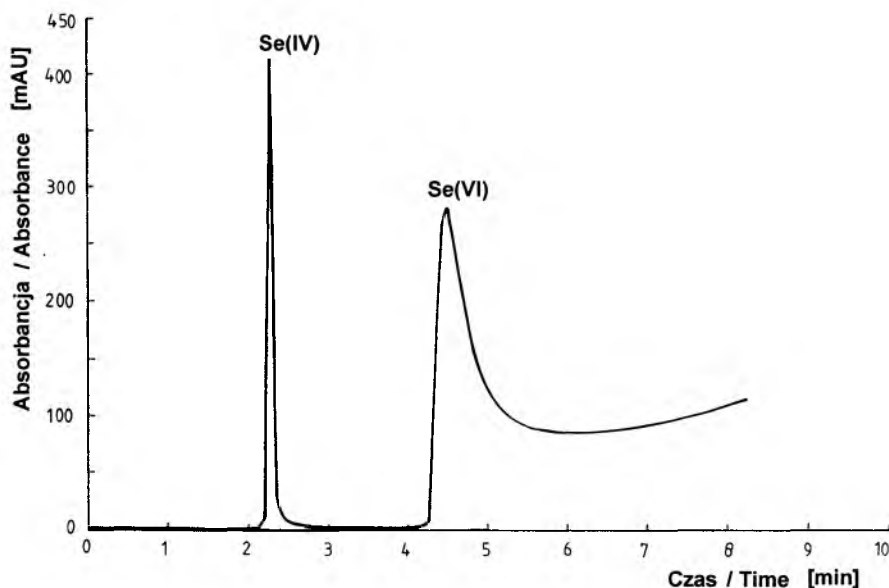
### Analiza specjacji selenu w badanych próbkach

Przydatność metody RP-HPLC-UV do oznaczania specjacji selenu wykazano badając wybrane próbki naturalnych wód mineralnych. Pomiar każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Metoda RP-HPLC-UV, w przypadku każdej z badanych próbek, daje odzysk  $99,6\%$  ( $2,42\%$  R.S.D.). Czas retencji pików Se(IV) wynosił od  $2,44 \text{ min}$



Rys. 1. Wykres kalibracyjny roztworów standardowych selenu(IV) i selenu(VI).

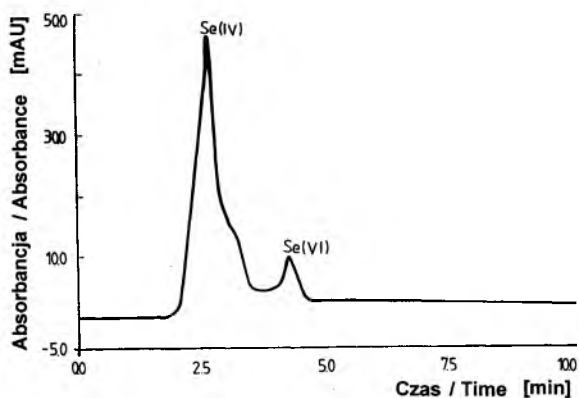
Fig. 1. Calibration plot of standard solutions of selenium(IV) and selenium(VI).



Rys. 2. Chromatogram próbki roztworu standardowego selenu(IV) i selenu(VI).

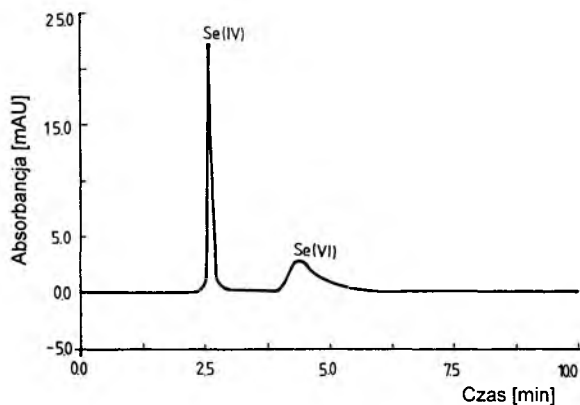
Fig. 2. Chromatogram of the standard solution of selenium(IV) and selenium(VI).

do 2,60 min, zaś pik Se(VI) 4,24–4,53 min. Taki sam czas retencji pik Se(IV) – 2,59 min uzyskano na chromatogramach naturalnych wód mineralnych: Muszynianka, Nałęczowianka, Multi Vita, Mazowszanka, Zdroje Grodziska i Krakowianka. Podobny czas retencji pik Se(VI) – 4,38 min uzyskano na chromatogramach wód mineralnych takich, jak: Muszynianka, Multi Vita i Zdroje Grodziska. Największą absorbancję od Se(IV) stwierdzono na chromatogramie wody mineralnej gazowanej “Fructom” – 49,521 [mAU], a najniższą na chromatogramie wody niegazowanej “Muszynianka” –



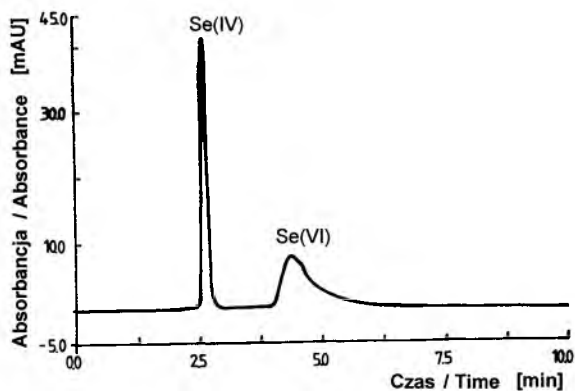
Rys. 3. Chromatogram próbki wody mineralnej niegazowanej "Oda"

Fig. 3. Chromatogram of the sample of mineral water "Oda"



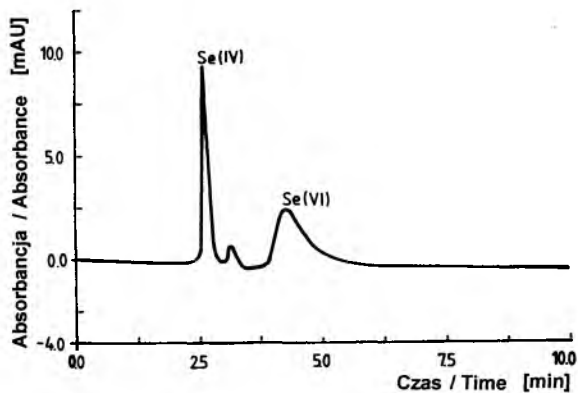
Rys. 4. Chromatogram próbki wody mineralnej "Nałęczowianka"

Fig. 4. Chromatogram of the sample of mineral water "Nałęczowianka".



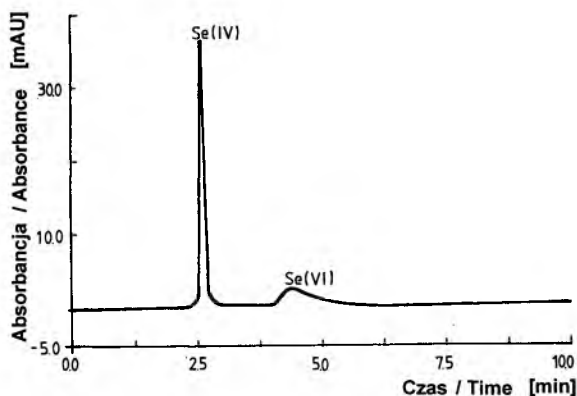
Rys. 5. Chromatogram próbki wody mineralnej gazowanej "Zdroje Grodziska".

Fig. 5. Chromatogram of the sample of sparkling mineral water "Zdroje Grodziska".



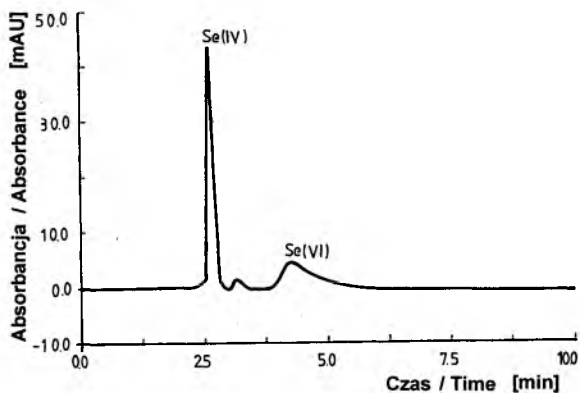
Rys. 6. Chromatogram próbki wody mineralnej gazowanej "Krakowianka".

Fig. 6. Chromatogram of the sample of sparkling mineral water "Krakowianka".



Rys. 7. Chromatogram próbki wody mineralnej gazowanej "Ostromecko citron".

Fig. 7. Chromatogram of the sample of sparkling mineral water "Ostromecko citron".



Rys. 8. Chromatogram próbki wody mineralnej gazowanej "Fructom".

Fig. 8. Chromatogram of the sample of sparkling mineral water "Fructom".

3,725 [mAU]. W badanych wodach uzyskano niskie absorbancje od Se(VI) – 0,010 do 14,728 [mAU]. Rys. 3–8 przedstawiają chromatogramy wybranych próbek naturalnych wód mineralnych gazowanych i niegazowanych. W wodzie mineralnej gazowanej “Oda” nie stwierdzono obecności pików Se(IV). W wodach mineralnych gazowanych “Fructom” i “Krakowianka” oprócz pików Se(IV) i Se(VI) stwierdzono dodatkowy pik, który może być pikiem pochodzącym od innego pierwiastka występującego w tych wodach. Na chromatogramie próbki wody mineralnej niegazowanej “Oda” pik Se(IV) wyraźnie odbiega swym kształtem od pozostałych, co może być spowodowane interferencją z innym składnikiem zawartym w tej wodzie. We wszystkich badanych próbkach wód pik Se(VI) jest mniejszy od pików Se(IV). Otrzymane pikki selenu są podobne swym kształtem i czasami retencji do pików przedstawionych w pracy Jen-Fon Jen i wsp. [7]. W tab. 1. podano wyniki zawartości Se(IV) i Se(VI) w naturalnych wodach mineralnych. Średnia zawartość Se(IV) w badanych wodach wynosiła 4,10  $\mu\text{g/l}$ , a Se(VI) 4,27  $\mu\text{g/l}$ . Najwyższą zawartość selenu(IV) stwierdzono w wodzie mineralnej niegazowanej “Oda”, a najniższą w wodzie mineralnej gazowanej “Ostromecko cytron”. Woda mineralna gazowana “Galicjanka” charakteryzowała się najniższą zawartością Se(VI). Mediana z 11 wód mineralnych wynosiła w przypadku Se(IV) 3,8,

Tabela 1

Zawartości Se(IV) i Se(VI) w analizowanych naturalnych wodach mineralnych [ $\mu\text{g/l}$ ].

Content of Se(IV) and Se(VI) in analysed natural mineral waters [ $\mu\text{g/l}$ ].

L. p.	Woda mineralna Mineral water	Zawartość Se(IV) Se(IV) content**	Zawartość Se(VI) Se(VI) content**
1	“Oda” *	6,84±0,40	7,82±0,30
2	“Oda”	7,84±0,35	8,02±0,95
3	“Muszynianka”	4,68±0,20	4,90±0,12
4	“Nałęczowianka”	4,69±0,30	4,80±0,15
5	“Multi Vita”	3,08±0,16	3,99±0,08
6	“Mazowszanka”	3,80±0,18	4,09±0,15
7	“Galicjanka” *	2,69±0,25	0,94±0,55
8	“Zdroje Gordziska”*	2,14±0,25	1,54±0,25
9	“Krakowianka”*	5,42±0,21	5,72±0,14
10	“Ostromecko cytron”*	1,42±0,10	2,23±0,16
11	“Fructom”*	2,50±0,11	3,00±0,30

\* gazowane / sparkling

\*\* średnia ± odchylenie standardowe / average ± standard deviation

zaś Se(VI) 4,09. Uzyskano wyższą wartość kwartyła w odniesieniu do Se(VI). Podobne wyniki zawartości selenu uzyskali Sikorowska [20] oraz Duda [3], a także Masłowska [10-15], nie notowano natomiast tak wysokich zawartości jakie podają Arruda, Gallego i Valcarcel [1]. W niniejszej pracy stwierdzono wyższe poziomy selenu we wszystkich badanych produktach, w stosunku do oznaczonych przez Varo i wsp. [22], co wiąże się z faktem niskiej zawartości selenu w produktach żywnościowych Finlandii. Zawartość selenu w badanych próbkach naturalnych wód mineralnych nie przekraczała dopuszczalnych norm określonych przez WHO [5, 16].

## Podsumowanie

Wyniki badań wskazują na możliwość równoczesnego oznaczania Se(IV) i Se(VI) w wodnych roztworach metodą RP-HPLC z detektorem UV. Proponowana przez nas metoda może z powodzeniem służyć do badania specjacji selenu w wodach mineralnych.

Fragmenty pracy były przedstawione podczas V Sesji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, 29-31.05.2000 r. w Ryni.

## LITERATURA

- [1] Arruda A.Z., Gallego M., Valcarcel M.: Determination of selenium in fruit juices by flow injection electrothermal atomization atomic absorption spectrometry; *J. Anal. Atom. Spectr.* **9**, 1994, 657.
- [2] Bernhard M., Schramel P.: Selenium speciation in human milk; *Z. Ernahrungswiss.* **36**, (1), 1997, 68.
- [3] Duda J., Masłowska J.: Polarograficzna metoda oznaczania śladowych ilości selenu w wodach pitnych i napojach; *Bromat. Chem. Toksykol.*, **18**, 1, 1985, 11.
- [4] Emsley J.: *Chemia. Przewodnik po pierwiastkach*, PWN, Warszawa, 1997.
- [5] European standards for drinking water, WHO, 1992, 105.
- [6] Holfard P.: *Smak zdrowia. Zasady prawidłowego odżywienia*, Świat Książki, Warszawa, 1999.
- [7] Jen-Fon Jen, Youn-Jung Yang, Cheng-Hsien Cheng: Simultaneous speciation aqueous selenium(IV) and selenium(VI) by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A*, **791**, 1997, 357.
- [8] Kabata-Pendias A.: *Selen w środowisku – fakty i mity. Referat wygłoszony w ramach Uniwersytetu Otwartego*, Kraków, AGH, 26.04.1997.
- [9] Kabata-Pendias A., Pendias H.: *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa, 1999.
- [10] Masłowska J., Duda J.: Polarograficzna metoda oznaczania śladowych ilości selenu w wodach pitnych i napojach, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **18**, 1, 1985, 11.
- [11] Masłowska J.: *Woda mineralna w Piaskach z ujęć odwodnień KWB "Bełchatów"*, Węgiel Brunatny, **67**, 1993, 9.
- [12] Masłowska J., Gawłowska A.: *Oznaczanie selenu w wodach mineralnych metodą ASA*", *Roczn. PZH*, **50**, (3), 1999, 261.
- [13] Masłowska J., Gawłowska A.: *Poziom selenu w naturalnych wodach mineralnych, sokach i barwionych napojach*, *Zeszyty Naukowe PŁ, Chem. Spoż. i Biotech.*, z. 62, **832**, 2000, 13.



- [14] Masłowska J., Gawłowska A.: Ocena zawartości selenu w naturalnych wodach mineralnych dostępnych na rynku w Polsce, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **20**, (3), 1999, 109.
- [15] Masłowska J., Gawłowska A.: Spektralne metody oznaczania śladowych ilości selenu w wodach naturalnych oraz sokach owocowych, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **33**, (1), 2000, 91.
- [16] PN-76/C-04624. Woda i ścieki. Badania zawartości selenu. Oznaczanie selenu w związkach nieorganicznych metodą z 3,3'-diaminobenzzydynam (DAB).
- [17] Potin-Gautier M.: Interet de la speciation: l'exemple du selenium, *Analisis*, **25**, (2), 1997, M22.
- [18] Pyrzyńska K.: Speciation of selenium compounds, *Anal. Sci.*, **14**, 1998, 479.
- [19] Pyrzyńska K.: Związki selenu w środowisku naturalnym, *Wiad. Chem.*, **54**, (1/2), 2000, 139.
- [20] Sikorowska C.: Selen w wodach wodociągowych w Polsce, *Roczn. PZH*, **16**, 1965, 11.
- [21] Schwarz K., Foltz C.: Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1957, 3292.
- [22] Varo P., Nuurtarmo H., Saari P., Koivostoinen P.: Level of selenium in food products in Finland, *Acta Agr. Scand. Suppl.*, **22**, 1980, 37.

#### APPLICATION OF HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF SE(IV) AND SE(VI) IN MINERAL WATERS

##### S u m m a r y

The aim of the study was application of a high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector for selenium speciation in samples of mineral water. Basic solutions  $1000\mu\text{g/l}$   $\text{SeO}_3^{2-}$  and  $\text{SeO}_4^{2-}$  were prepared by dissolving 2,190 g of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  and 2,393 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  in 1000 ml of water, respectively. Recent standards  $\text{SeO}_3^{2-}$  and  $\text{SeO}_4^{2-}$  (single or mixed) were prepared every day from the basic separation of Se(IV) and Se(VI) was obtained using a C18 column (250x4.0mm;  $5\mu\text{m}$ ) with mobile phase comprising 5mmol/l phosphate tetrabutylammonium, 50/50 water:methanol at pH 3,4. Flow rate was 1ml/min. Detector was set at 210 nm. Injection volume was 5  $\mu\text{l}$ . Retention time of selenium(IV) was 2.27 min and of selenium(VI) 4.37 min. Recovery of Se determined using a HPLC method was 99.6 %. The determined content of Se(IV) was 4,10  $\mu\text{g/l}$  and Se(VI) – 4,27  $\mu\text{g/l}$ . The method worked out can be therefore recommended for determination of Se in samples of mineral water. ☒