

氢化物发生-原子荧光光谱法测定虾中的硒含量

高建忠, 张庆华 (上海水产大学生命学院, 上海200090)

摘要 建立了氢化物发生-原子荧光光谱法测定虾中硒含量的分析方法。研究了仪器的工作条件、试剂对硒测定的影响;探讨了消化试剂对样品消化的影响和共存离子的干扰及消除。在优化的工作条件下,硒的检出限为0.078 ng/ml,相对标准偏差为0.45%,线性范围为0~50 ng/ml。应用该方法检测了不同虾中的硒含量为0.14~0.33 ng/kg,加标回收率为94.4%~103.8%。

关键词 氢化物发生-原子荧光光谱法;虾;硒含量

中图分类号 S968.22 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09095-02

Determination of the Selenium Content in Shrimp by Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry

GAO Jianzhong et al (College of Life, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract An analytical method for the determination of the Selenium Content in shrimp by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) was established. The effects of the working conditions of instruments and reagents on Selenium determination were investigated; the effects of digest reagents on digestion of samples and the interference and elimination of coexisting ions were discussed. The detection limit for selenium was 0.078 ng/ml under the optimum working condition, the relative standard deviation was 0.45%, and linear range of 0~50 ng/ml. The selenium content in different shrimps of 0.14~0.33 ng/kg, which were detected by this method, and the recoveries of standard addition were 94.4%~103.8%.

Key words Hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS); Shrimp; Selenium content

硒是人和动物所必需的微量元素,具有多种重要的生物学功能^[1-2]。虾含有丰富的蛋白质,营养价值高,其肉质和鱼一样松软,易消化,是对人类健康极有裨益的佳品。虾肉中硒、碘、锌等微量元素的含量要高于其他食品,它的肌纤维细嫩,易于消化吸收。

已报道的测定硒的方法很多,如原子吸收光谱法^[3]、原子荧光光谱法^[4-5]、气相色谱法^[6]、高效液相色谱法^[7]、质谱法^[8]、原子发射光谱法^[9]等。氢化物发生-原子荧光光谱法测硒具有准确度和灵敏度高、精密度好、干扰小、线性范围宽、所用试剂毒性小等优点。笔者建立了氢化物发生-原子荧光光谱法测定虾中硒含量的方法,具简便、快速、灵敏、准确等优点。

1 材料与方 法

1.1 仪器及工作条件 AFS-930 双道原子荧光光度计(北京吉天仪器公司),高性能硒空心阴极灯(北京有色金属研究总院),微波消解系统。AFS-930 型双道原子荧光光度计测定最佳工作条件:负高压PMI 265 V,加热温度200℃,A道灯电流0 mA,载气流量400 ml/min,B道灯电流75 mA,屏蔽气流量800 ml/min,观测高度8 mm,测定方法Std. Curve,读数方式Peak Area,读数时间8 s,延迟时间0.5 s,测量重复次数1次。

1.2 试剂 硒标准储备液:吸取5 ml 100 μg/ml 硒标准溶液(国家标准物质研究中心提供,标准号为GBW(E)080215),以0.05 mol/L 盐酸溶液定容至50 ml。不同浓度工作溶液由标准储备液配制;0.8% 硼氢化钠溶液(0.2% 的氢氧化钠);10% 铁氰化钾溶液。硝酸、盐酸、高氯酸、亚硒酸钠。上述试剂均为优级纯或分析纯,试验用水为去离子水。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线。取1.25 ml 硒标准使用溶液(1 μg/ml)用18%的盐酸溶液定容至25 ml 的比色管中。此时,硒标准溶液的浓度为50 ng/ml。上机单标在线自动配制标准曲线,其

系列为:0.000、10.000、20.000、30.000、40.000、50.000 ng/ml。在试验选定的最佳工作条件下进行测定,绘制标准曲线;进行样品测量。

1.3.2 样品处理。将样品去壳后的所有可食部分充分搅碎和混匀,准确称取0.50 g,聚四氟乙烯高压消解罐中,加入5 ml 硝酸和3 ml 过氧化氢,盖好安全阀,于微波消解系统中消解。消解完毕,冷却,用去离子水转移至三角烧杯内,置电热板加热至140~160℃,至剩余体积2 ml 左右。冷却,再加入5 ml 6 mol/L 的盐酸溶液,继续加热至清亮无色,并伴有白烟出现,再继续加热至剩余溶液为2 ml 左右,冷却,用18% HCl 定容至10 ml 比色管待测,同时做空白试验。

2 结果与分析

2.1 酸度和硼氢化钠浓度的影响 选用盐酸作为介质,盐酸的作用在于其对Se(Ⅵ)的还原作用和SeH₄的生成提供酸性条件,故酸度对硒的测定有较大的影响。当盐酸浓度为2~5 mol/L 时,荧光信号强度最大。试验表明,Se(Ⅵ)在酸性溶液中不能与硼氢化钠反应,为了保证所有的硒为Se(Ⅳ)形态,选用6 mol/L 盐酸为还原剂,将Se(Ⅵ)在盐酸中加热煮沸3~5 min 即可定量还原成Se(Ⅳ),再进行测定。

硼氢化钠作为还原剂和氩氢焰的氢气来源,其浓度大小影响着氢化物的生成率和氩氢焰的质量。试验表明,当硼氢化钠浓度为0.5%~2% 时,荧光信号保持稳定。综合各方面因素考虑,该试验采用6 mol/L 的盐酸溶液和0.8% 的硼氢化钠溶液进行测定。

2.2 样品消化方式的选择 试验比较了HNO₃、HNO₃-HClO₄、HNO₃-H₂O₂ 3种消解体系对样品的消解情况,发现在相同条件下,HNO₃-H₂O₂ 消解体系能较好地分解样品,对测定的影响较小,结果也比较稳定。因此,该试验选用HNO₃-H₂O₂(5:3) 消解体系。

2.3 共存离子的干扰及消除 在测定过程中,Cu²⁺、B³⁺、N²⁺等的存在对硒的荧光信号有干扰,徐宝玲曾报道加入一定量的铁氰化钾作掩蔽剂可以消除许多重金属的干扰,并使硒化氢较好地发生^[10]。试验结果表明,当加入10% 铁氰化钾时,500 倍的Cu²⁺、B³⁺、N²⁺对硒的测定没有干扰,从而保

基金项目 上海水产大学博士科研启动基金;上海市重点学科建设项目(Y1101)。

作者简介 高建忠(1965-),男,宁夏盐池人,博士,副教授,从事水产动物疾病研究。

收稿日期 2008-04-29

证了测定结果的准确性。

2.4 标准曲线、检出限与精密度 按试验确定的最佳仪器工作条件进行测定,绘制标准曲线。硒(IV)在0~50 ng/ml 范围内呈良好的线形关系,其线性回归方程为: $I = 53.9665C - 3.0529$,相关系数 $r = 0.9994$ 。连续11次测量样品空白对照液,其相对标准偏差为0.45%,检出限($n=3$)为0.078 ng/ml。

表1 虾中硒含量的测定结果

Table 1 Determination results of selenium content in shrimp

样品编号 Sample No.	硒含量 Selenium content ng/kg	
	罗氏沼虾	南美白对虾
1	0.19	0.21
2	0.18	0.14
3	0.33	0.22
4	0.14	0.21
5	0.17	0.16

表2 回收率

Table 2 Recovery rate

样品号 Sample No.	样品硒含量 Selenium content in sample ng/L	加入量 Addition amount ng/L	测定值 Measured value ng/L	回收率 Recovery rate %
1	0.19	0.20	0.405	103.8
2	0.18	0.20	0.374	98.5
3	0.33	0.30	0.601	95.4
4	0.14	0.15	0.274	94.4
5	0.17	0.20	0.376	101.6

2.5 样品测定及回收率

2.5.1 虾中硒含量的测定。由表1可见,罗氏沼虾中的硒含量在0.14~0.33 ng/kg 范围内,平均0.202 ng/kg;南美白对虾

(上接第9066页)

2.2.3 不同免疫日龄抗体变化。不同免疫日龄,抗体检出阳性率不同。从A~K11个免疫试验组看,55日龄以上开始免疫,抗体产生早,注射14d后,抗体转阳率在50%以上,C、H和I组抗体阳性率达100%(表3)。

3 讨论

(1)PRRS 疫苗的研制是世界各国兽医研究领域关注的热点之一,目前预防该病的疫苗主要是PRRS 灭活疫苗和PRRS 弱毒疫苗。与弱毒苗比较,灭活疫苗的优点是安全性好,但灭活苗的免疫剂量大、免疫保护期短、免疫抗体产生期较长等缺点同样明显,且灭活疫苗采用全病毒包被,不可避免存在的异体蛋白易引起变态反应,家畜免疫注射后应激反应较大^[4]。近年来随着疫苗制作工艺的提升,疫苗安全性能大大提高,试验猪注射灭活疫苗后,免疫副反应较小未有过敏症状出现。

(2)目前,蓝耳病的免疫方案是仔猪断奶后进行初免,初免时间主要集中在21~30日龄^[5],试验对28~90日龄的仔猪进行免疫,结果不同厂家生产的疫苗,免疫仔猪后免疫抗体产生时间、阳性检出率都不同,抗体仅维持15~30d后迅速衰退。表明PRRS 灭活苗免疫效果不理想。

中的硒含量在0.14~0.22 ng/kg 范围内,平均0.188 ng/kg。

2.5.2 回收率。取5种样品,分别加入不同量硒的标准溶液。按照试验中“1.3.2”的方法,样品消化、还原,测定回收率。由表2可知,加标回收率为94.4%~103.8%。

参考文献

- [1] KOHRLJ, BRIGELIUS FLOHE R, BOCK A, et al. Selenium biology: facts and medical perspective[J]. *Biological Chemistry*, 2000, 381(9/10): 849-864.
- [2] BROWN K M, ARTHUR J R. Selenium, selenoproteins and human health: A review[J]. *Public Health Nutr*, 2001, 4: 593-599.
- [3] CHATTERJEE A, SHIBATA Y, TANAKA A, et al. Determination of selenomethionine by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry/high performance liquid chromatography-hydride generation-high power nitrogen microwave induced plasma mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 436: 253-263.
- [4] SMRKLJ P, SIBLJ V. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 512: 11-17.
- [5] LGÓMEZ ARZA J, BERNAL DAZA V, VILLEGAS PORTERO MJ. Comparative study of the instrumental couplings of high performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for chiral speciation of selenomethionine in breast and formula milk[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 520: 229-235.
- [6] BERLISCI OGLU, EM R HENDEN. Determination of selenoamino acids by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 505: 101-106.
- [7] CHASSAIGNE H, CHRYC C, BORDING, et al. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 976: 409-422.
- [8] JORGE RUIZ ENCINAR, MAGDALENA SIVKA KASZYNSKA, ALEKSANDRA POLATAJKO, et al. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 500: 171-183.
- [9] 陈小娥, 夏文水. 天然产物中硒含量测定及形态分析[J]. *理化检验-化学分册*, 2003, 39(4): 250-254.
- [10] 徐宝玲. 氢化物-原子荧光法测定硒时元素的干扰及其消除[J]. *分析化学*, 1985, 13(1): 29-33.

(3)据有关资料报道,PRRS 病毒具有抗体依赖性病毒增强作用(ADE),低水平抗体的存在可介导和加强病毒感染,形成长期病毒血症和持续性感染^[6-7]。因此,什么样的抗体水平能提供足够的保护力,如何选择一种安全有效的疫苗,制定怎样合理的免疫程序使猪能够免疫PRRS 强毒感染,尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 328-331.
- [2] HANJ, LIU GP, WANG Y, et al. Identification of conserved regions of the nsP2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR2332 for replication in cell culture[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(18): 9878-9890.
- [3] KUMADY, JAY G, CALVERT, et al. Expression and stability of foreign tags inserted into nsP2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *Virus Research*, 2007, 128: 106-114.
- [4] 蔡宝祥, 姜平. 我国PRRS 诊断技术与疫苗研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2007, 39(8): 1-4.
- [5] 母安雄, 濮文正, 蒋建一, 等. 4种猪生殖和呼吸综合征灭活疫苗免疫效果比较[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(9): 18-19.
- [6] 郭致君, 王文全, 关智慧, 等. 猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗的研制[J]. *当代畜牧*, 2002(3): 12-14.
- [7] 吴延功, 徐天刚, 王志亮, 等. 重组N蛋白抗原检测PRRSV 抗体ELISA的研究IV 与IDEXX EL-ISA 试剂盒及Western blot 的比较[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(6): 614-615.