

15. Эмануэль Н.М. Химическая и биологическая кинетика // Успехи химии. 1981. Т. 50. № 10. С. 1721-1809.

16. Крайник В.В., Ушкалова В.Н., Катанаева В.Г. Спектроскопическое исследование процессов окисления в присутствии комплексов меди / Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2009. № 6. С. 101-105.

**Вадим Викторович ЕРМАКОВ** —  
зав. лабораторией биогеохимии окружающей среды,  
профессор, доктор биологических наук

**Сергей Федорович ТЮТИКОВ** —  
старший научный сотрудник лаборатории  
биогеохимии окружающей среды,  
кандидат биологических наук

**Сабзбахор Давлатовна ХУШВАХТОВА** —  
старший научный сотрудник лаборатории  
биогеохимии окружающей среды,  
кандидат химических наук

**Валентина Николаевна ДАНИЛОВА** —  
младший научный сотрудник лаборатории  
биогеохимии окружающей среды

*Институт геохимии и аналитической химии  
РАН им. В.И. Вернадского  
ermakov@geokhi.ru*

**Виктор Александрович БОЕВ** —  
доцент кафедры геоэкологии  
Тюменского государственного университета,  
кандидат биологических наук  
vikboev2009@mail.ru

**Людмила Николаевна БАРАБАНЩИКОВА** —  
преподаватель кафедры химии

**Елена Александровна ЧУДИНОВА** —  
преподаватель кафедры анатомии и физиологии  
acadagro@tmn.ru

*Тюменская государственная  
сельскохозяйственная академия*

УДК 543:546.711 + 546.23

## **ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА В БИОМАТЕРИАЛАХ**

## **PECULIARITIES OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SELENIUM IN BIOLOGICAL MATERIALS**

**АННОТАЦИЯ.** Представлены данные по сравнительному определению селена в биоматериалах посредством атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС), спектрофлуориметрии и высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Установлена принципиальная возможность определения селена в сыворотке крови методом ААС с электротермической атомизацией, а при спектрофлуориметрическом определении более приемлемо сочетание с ВЭЖХ.

*SUMMARY. The data on the comparative determination of selenium in biomaterials by atomic absorption spectrometry (AAS), spectrofluorimetry, and a highly effective liquid chromatography (HPLC) are presented. The fundamental possibility of determining selenium in blood serum by AAS method with electrothermal atomization is discovered. The combination with HPLC is more suitable for spectrofluorimetric determination of selenium in blood serum.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Селен, сыворотка крови, спектрофлуориметрия, атомно-абсорбционный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография.

**KEY WORDS.** Selenium, blood serum, spectrofluorimetry, atomic absorption analysis, high-performance liquid chromatography.

Селен — жизненно важный, необходимый микроэлемент с уникальными биологическими функциями и широким спектром биологического действия его соединений. Он играет важную антиоксидантную роль в биосфере. В организмах существует класс Se-содержащих и Se-зависимых ферментов. Их синтез регулируется генетически и они осуществляют важные биохимические и физиологические функции. Недостаток селена в среде и организмах приводит к развитию ряда сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний человека. Поэтому в большинстве стран мира проводится коррекция селенодефицита с учетом статуса микроэлемента в среде [1], [2], [3], [4], [5], [7], [11], [12], [13], [16], [21].

Распределение селена в биосфере неравномерно. Основные континентальные участки распространения селеновой недостаточности: ряд районов США и Канады, Австралии, Новой Зеландии, Сербии, стран Балтии, Республики Беларусь, Норвегии и Финляндии, России, Монголии и Китая. Локальные участки Se-дефицита встречаются и в Республике Кыргызстан [3], [5], [11], [12], [17], [20].

В настоящее время изучению биогеохимии селена и биологическому действию микроэлемента посвящено большое число публикаций. Тем не менее, ряд вопросов аналитической химии селена и поведения его в биосфере остается недостаточно освещенным [8], [9], [10], [14], [15], [18].

Для определения микроколичеств селена в биоматериалах используют различные методы: спектрофлуориметрию, нейтроноактивационный анализ, атомно-абсорбционную спектрометрию (ААС), эмиссионную спектроскопию с индуктивно связанной плазмой, масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой, газовую и жидкостную хроматографию, рентгено-флуоресцентный анализ и другие. Наиболее часто используют ААС в сочетании с гидридной техникой, а также ААС с электротермической атомизацией. При этом коррекция с эффектом Зеемана вносит свои преимущества в ААС анализ [1], [6], [18], [20], [22], [24].

Одним из основных этапов при диагностике микроэлементозов животных и человека является использование селективных и высоко чувствительных методов их определения в продуктах питания, кормах, почвах и других объектах. В этом отношении существуют трудности при определении селена в биоматериалах, обусловленные ограничениями методов измерения. В частности, при использовании ААС предпочтение отдают гидридному способу. Однако, учитывая, присутствие селена в биоматериалах в различной степени окисления, не полноту восстановления его соединений до селеноводорода, неустойчивость гидридной формы и мешающее влияние матричных элементов, в особенности

железа, гидридный метод ААС в ряде случаев оказывается недостаточно эффективным. Использование же спектрофлуориметрического (флуориметрического) метода также сопряжено с трудностями, связанными с окислением реагента 2,3-диаминонафталина и мешающим влиянием матричных компонентов [1], [10], [15], [16]. Поэтому мы попытались оценить некоторые стадии определения селена, используя уже известные методы.

В данной работе основное внимание акцентировано на наиболее приемлемых методах количественного определения селена в биоматериалах с использованием спектрофлуориметрического варианта в сочетании с высоко эффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и ААС на отечественных приборах, имеющих свои конструктивные особенности по сравнению с зарубежными.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были цельная кровь крупного рогатого скота, сыворотка крови коров из хозяйств Московской области и Забайкальского края, а также почвы и сено. Растения (0,5–1 г) разлагали смесью азотной и хлорной кислот, почвы (50–250 мг) — смесью азотной, фтористоводородной и хлорной кислот. Кровь (1 мл) и сыворотку (1 мл) разлагали смесью азотной и хлорной кислот при спектрофлуориметрическом (СФМ) определении селена, азотной кислотой и пероксидом водорода — при измерении концентраций селена методом ААС. В последнем случае 1 мл сыворотки смешивали с 1 мл концентрированной азотной кислоты и гидролизовали в кварцевых стаканах в печи ПДП-18М по следующей программе: 1 — нагревание при 60°C 10 мин., при 100°C 20 мин. и при 120°C 30 мин. (табл. 1).

Таблица 1

**Программа термического разложения сыворотки**

№ этапа	Время (мин.)	Температура (°C)
1	10	60
2	10	100
3	30	120

Затем вносили 1 мл 30%-ной перекиси водорода, смесь нагревали на водяной бане 10 мин. И содержимое разбавляли до 2–5 мл бидистиллированной водой. Измерение концентраций селена в цельной крови и пробах сыворотки осуществляли на спектрометре «КВАНТ-Z.ЭТА» (электротермическая атомизация) с зеемановской коррекцией фона по стандартной программе (табл. 2).

Таблица 2

**Программа нагрева печи «Se\_q» при ААС определении селена**

Этап	Время (секунды)		Температура (°C)	Газ
	Нарастание	Выдержка		
Испарение	1	1	50	Включен
Пиролиз 1	6	6	60	Тоже
Пиролиз 2	1	6	800	Тоже
Пиролиз 3	0	1	900	Выключен
	Время (миллисекунды)			
Атомизация	0	600	2300	Выключен
Очистка	0	2500	2650	Включен

Спектрофлуориметрически селен определяли после его восстановления до Se (IV) HCl и образованием пиазоселенола по реакции селенита с 2,3-диаминонафталином. При измерении концентраций селена в почвах и цельной крови селен отделяли от матрицы на колонке сильнокислого катионита по способу [1] или устраняли мешающее влияние компонентов, используя комплексообразование с трилоном Б и уксусной кислотой в присутствии фторида натрия.

С целью более селективного определения селена в виде комплекса с 2,3-диаминонафталином пользовались методом ВЭЖХ на колонке модифицированного силикагеля С16 (колонка металлическая 100×4,6 мм, зернение сорбента 6 мкм, элюент — смесь этанола и гексана 1:1 по объему, расход — 0,5 мл/мин.). В колонку инъецировали шприцом 20 мкл гексанового экстракта. Хроматографическое определение пиазоселенола осуществляли, используя ВЭЖХ хроматограф со спектрофлуориметрическим детектором RF-530 (Shimadzu), насосами «Кнауэр», жидкостной кюветой объемом 13 мкл. Возбуждающий свет с максимумом при 376 нм, а максимум флуоресцирующего света при 520 нм.

**Результаты исследований.** В процессе аналитических работ были установлены некоторые трудности спектрофлуориметрического метода в классическом исполнении (без применения ВЭЖХ). Прежде всего, результаты количественного определения селена зависят от способа разложения. Целесообразно длительное время нагревать пробу при медленном выделении перхлоратов (до 10-15 мин) с целью более полного разложения материала. И в этом случае процесс нагревания необходимо контролировать, используя для этой цели программируемые электрические нагреватели, например, печь «ПАР». Следующей особенностью способа является полнота восстановления селена до селенита посредством внесения в раствор 6М раствора хлороводородной (соляной) кислоты. При этой реакции самоокисления-самовосстановления в растворе образуется много свободного хлора, который следует удалить, выдержав раствор на водяной бане при 80°C около 30 мин., а затем оставить пробы на 10-12 часов под вытяжным шкафом до полного удаления хлора. Остатки хлора способствуют разложению 2,3-диаминонафталина и образованию неспецифических флуоресцирующих веществ. Существенную роль играют матричные эффекты. Как правило, минерализаты крови и почв целесообразно очистить на колонке сильнокислого катионита (например, КУ-2, сшивка 8) по способу [1]. На этой стадии следует проверить работу колонки на модельных растворах, установив режим элюирования веществ. Кроме того, существенное значение имеет качество реагента. При длительном хранении 2,3-диаминонафталина (более 10 лет) происходит его окисление, и возникают сложности в комплексообразовании с селенитом. Раствор реагента чистят перед анализом, устраняя примеси гексаном или циклогексаном. Наконец, после экстракции пиазоселенола органическую фазу не обрабатывают обезвоживающими средствами. Например, некоторые партии тонко размолотого безводного сульфата натрия адсорбируют пиазоселенол до 50% от его количества в органической фазе.

С учетом выше перечисленных особенностей метода определения селена были получены следующие результаты. Анализ цельной крови крупного рогатого скота ААС-методом с помощью электротермической атомизации оказался мало эффективным. При концентрациях селена в крови менее 100 мкг/л разброс между параллельными определениями селена в одном и том же образце достигал 50%. И только лишь при содержании микроэлемента более 140-150 мкг/л ре-

зультаты между параллельными определениями селена двумя методами становились более близкими (рис. 1).

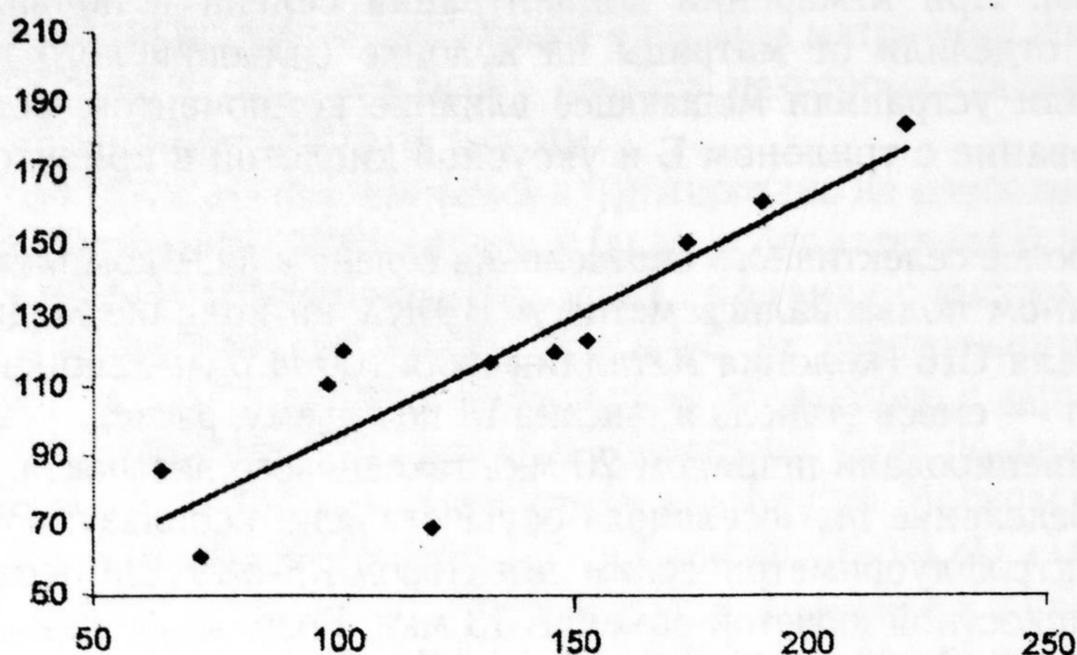


Рис. 1. Соотношение между результатами ААС- и СФМ-определения селена в цельной крови животных

Следует заметить, что спектрофлуориметрическое определение селена в цельной крови также было сложным. Измерение концентраций элемента оказалось возможным только после устранения избытка железа посредством колонки сильно кислого катионита или введения в раствор комплексообразователей (уксусная кислота, фторид натрия).

Определение селена в сыворотке крови методом ААС было более эффективным. На рис. 2 приведены данные о соотношении аналитических результатов, полученных двумя способами измерения концентраций селена. В этом случае различия между параллельными измерениями не превышали для одного и того же образца 10%. И только в области низкого уровня селена в сыворотке ошибка определения возрастала до 20%.

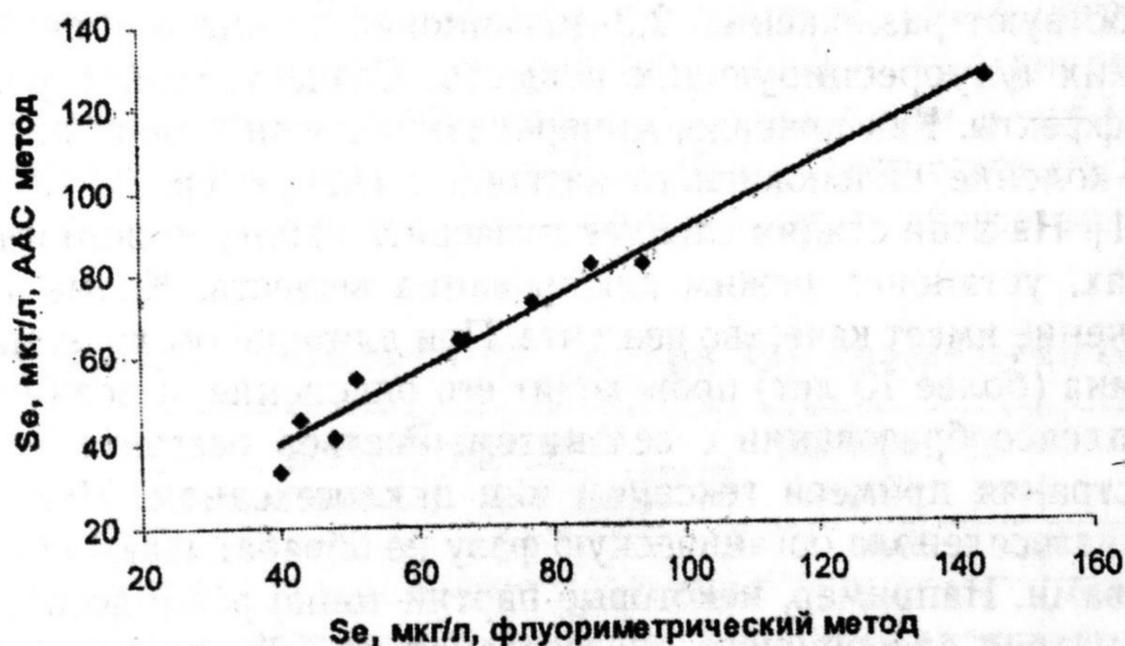


Рис. 2. Соотношение между результатами ААС- и СФМ-определения селена

В процессе измерения концентраций селена посредством ААС с термической атомизацией существенную роль играет модификатор матрицы. Как правило, хорошие результаты дает применение нитрата палладия. Подобные результаты получены с нитратом никеля.

Учитывая сложности при СФМ-определении селена в биоматериалах, был использован методический прием, рекомендованный японскими учеными — применение ВЭЖХ [17]. Этот метод позволяет отделить основное комплексное соединение селена от примесей, которые образуются в процессе анализа (рис. 3). Известно, что 2,3-диаминонафталин легко окисляется под действием окислителей (азотистая кислота, хлор и др.), а также в присутствии дневного света.

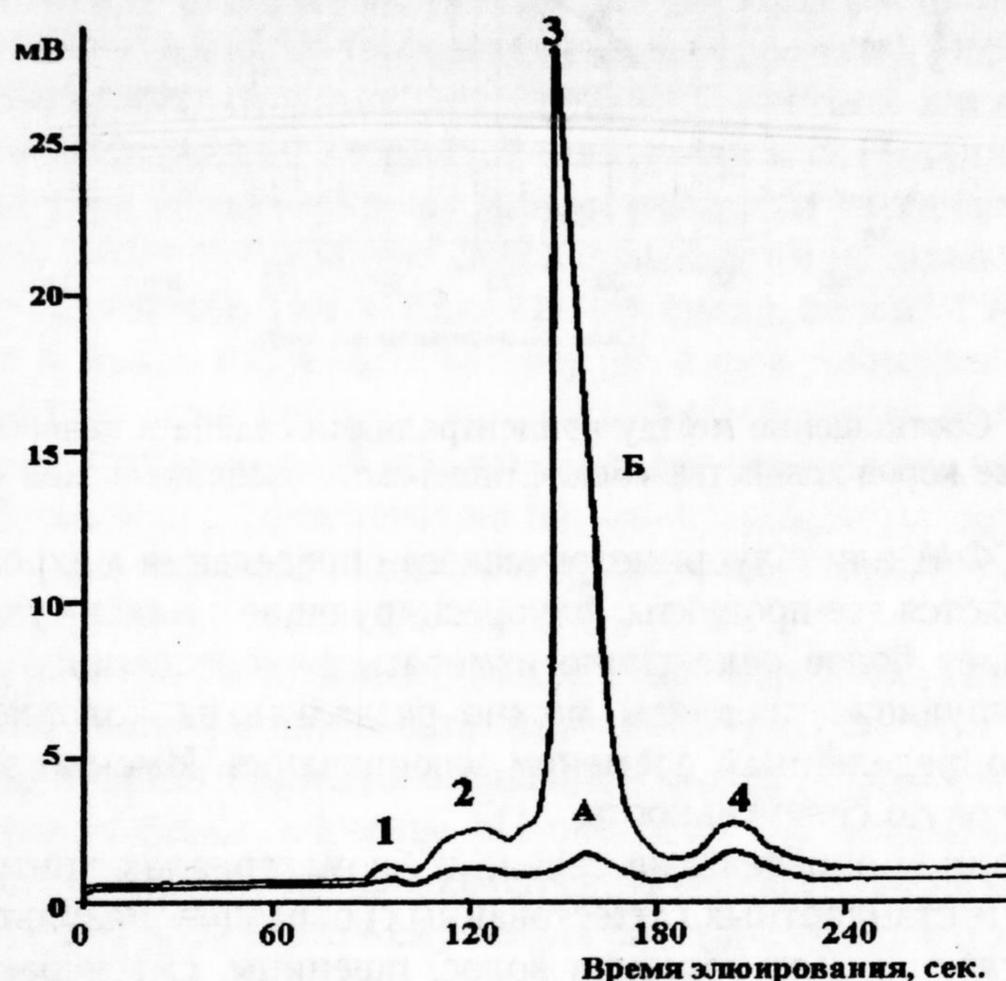


Рис. 3. Сравнительные хроматограммы, полученные по методу ВЭЖХ-спектрофотометрии. 40 нг пиасенола (Б) и контрольного (холостого) экстракта (А). 1, 2, 4 — примеси, 3 — пик пиаселенола.

Объем анализируемой пробы — 20 мкл.

Расход элюента — смеси гексана и этанола, 1-0,5 мл/мин.

Следует обратить внимание на наиболее часто определяемый уровень содержания селена не в цельной крови, а в сыворотке. Именно уровень селена в сыворотке имеет диагностическое значение при оценке обеспеченности животных и человека данным микроэлементом. Это связано с более быстрым разложением сыворотки смесью кислот и низким содержанием железа. Однако анализ цельной крови более привлекателен тем, что концентрация селена в цельной крови заметно больше, чем в сыворотке (рис. 4). Если учесть географические особенности распределения селена в крови животных, то коэффициент варьирования по сыворотке составляет в среднем 2,0 (50-100 мкг/л), а по цельной крови около 3 (90-300 мкг/л). По-видимому, для практических целей можно анализировать как сыворотку, так и цельную кровь, так как между концентрациями селена в этих объектах существует заметная прямая корреляция (рис. 4).

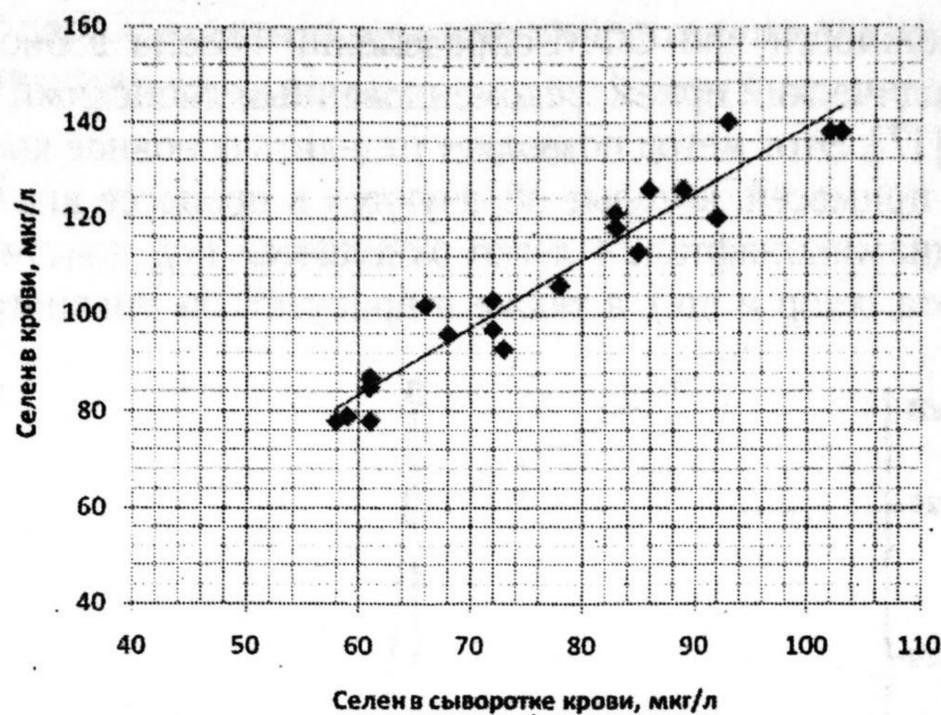


Рис. 4. Соотношение между концентрациями селена в цельной крови и сыворотке коров хозяйства «Беклемишевское» (Забайкальский край);  $n=20$

В случае СФМ или флуориметрического определения микроэлемента практически измеряются все продукты, флуоресцирующие с максимумом 500-530 нм. ВЭЖХ позволяет более селективно измерять флуоресценцию пиазоселенола, так флуоресцирующие продукты можно разделить на колонке и определять соединения с определенным временем элюирования. Именно это придает методу более высокую селективность.

Количественное определение селена в биоматериалах контролировалось с использованием стандартных (аттестованных) образцов. Результаты измерений приведены в табл. 3. Для образцов волос, пшеницы, смеси растений и почвы получено достаточно близкое к стандартному значение концентраций селена. Однако относительная ошибка определения селена в почвах достигает 15%, что связано с трудностями разложения материала и необходимостью введения дополнительных стадий анализа.

Таблица 3

Результаты анализа стандартных биологических образцов с аттестованным содержанием селена (в мкг/г сухого вещества)

Образец	Анализируемая масса, г	Число анализов	Стандартное значение $M \pm m$	Полученное значение $M \pm m$
Волосы CRM 397	0,25	5	0,60±0.03	0,61±0,02
Пшеница SBMP-02	0,50	6	0,091±0,005	0,092±0,004
Смесь растений SBMT-02	1,00	6	0,060±0.003	0,058±0,002
Почва SRM 2709	0,25	5	0,30±0.03	0,28±0,04

Учитывая уникальные биологические функции селена, его определение в биоматериалах проводится с давних пор. Но наиболее эффективным методом стало появление статьи Дж. Уоткинсона о применении 2,3-диаминонафталина (ДАН) [22-24], впервые описанного К. Паркером и Л. Харли в 1962 г. [19]. В по-

следующем флуориметрический способ определения селена нашел широкое применение для анализа природных объектов. Он постоянно совершенствовался и в настоящее время считается одним из наиболее надежных, несмотря на появление новых физико-химических методов (сочетание гидридной техники с ААС и ИСП-масс-спектрометрии). Критическими стадиями анализа биоматериалов с использованием ДАН является подготовка образца, переводение его в раствор, стадия восстановления Se (VI) до Se (IV) и рН раствора при комплексобразовании селенита с ДАН (образование пазоселенола). Образцы (0,1-1,0 г), как правило, выдерживают с концентрированной азотной кислотой не менее 12 часов. После этого вводят хлорную кислоту или в сочетании с фтористоводородной кислотой и концентрируют минерализат при температуре испарения азотной кислоты. Затем температуру смеси повышают и нагревают до появления паров хлорного ангидрида. После охлаждения смеси, вносят 1 мл бидистиллированной воды и вновь нагревают раствор до паров хлорного ангидрида. На этой стадии процесс «дымления» в полузакрытых системах длится до 15 мин. В этом случае остатки азотной кислоты удаляются полностью. Применение микроволновой техники эффективно на первой стадии (использование азотной кислоты и пероксида водорода), но в последующем необходимо удалить азотную кислоту.

Затем полученный бесцветный минерализат обрабатывают разбавленной хлороводородной кислотой для восстановления Se (VI) до Se (IV). И, наконец, минерализат разбавляют бидистиллированной водой, добавляют маскирующие реагенты и устанавливают значение рН около 2,5-3,0, используя индикаторы (метиловый оранжевый, феноловый красный, тимоловый синий), а затем вносят раствор ДАН в 0,1 М HCl. В этом случае рН раствора становится оптимальным, достигая 1,8-2,0 [8].

Полученные данные позволили уточнить некоторые стадии количественного определения селена в биоматериалах. Оказалось возможным определить микроколичества селена в сыворотке крови, используя ААС с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией сигнала после сравнительно простой стадии подготовки пробы (минерализация азотной кислотой и пероксидом водорода). С целью стандартизации условий минерализации образца была испытана специальная программируемая электропечь ПДП-18М. Получены удовлетворительные результаты. В отношении СФМ-метода с 2,3-диаминонафталином необходимы дополнительные исследования, несмотря на мировую известность этого способа. При этом весьма перспективно применение ВЭЖХ хроматографии со СФМ детектированием пазоселенола. Кроме того, представляет практический интерес уточнение условий восстановления селената до селенита при обработке раствора хлороводородной кислотой и удалении окислителей. Во всех случаях необходимо использовать стандартные образцы биоматериалов и дополнительные методы анализа (например, нейтронно-активационный анализ или РФА с синхротронным излучением).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермаков В.В. Флуориметрическое определение селена в продуктах животноводства, органах (тканях) животных и объектах окружающей среды // Методические указания по определению пестицидов в биологических объектах. М.: ВАСХНИЛ, 1985. С. 28-35.

2. Ермаков В.В. Биогеохимия селена и его значение в профилактике эндемических заболеваний человека // Вестник отделения наук о Земле РАН. 2004. № 1 (22). 17 с. URL: [http://www.scgis.ru//russian/cp\\_1251/h\\_dggma/1-2004/scpub-4.pdf](http://www.scgis.ru//russian/cp_1251/h_dggma/1-2004/scpub-4.pdf)
3. Ермаков В.В., Иованович Л.Н. Дефицит селена как отражение дезорганизованности биосферных процессов и ее преодоление // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии, 2009. № 1(9). С. 98-105
4. Ермаков В.В., Ковальский В.В. Биологическое значение селена. М.: Наука. 1974. 300 с.
5. Ермаков В.В., Сафонов В.А., Тютиков С.Ф. Географические особенности варьирования микроэлементов в крови крупного рогатого скота // Биогеохимия элементов в субстратной и пищевой цепях агро- и аквальных систем. Тюмень: ТГСХА, 2007. С. 157-161.
6. Ермаков В.В., Тютиков С.Ф. Геохимическая экология животных. М.: Наука, 2008. 310 с.
7. ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for selenium. Prepared for U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA. September, 2003.
8. Bayfield, R.F., Romalis, L.F. pH control in the fluorometric assay for selenium with 2,3-diaminonaphthalene // Analytical Biochemistry, 1985. Vol. 44. No 2. P. 569-576.
9. Bujdos, M., Kubova, J., Stresko, V. Problems of selenium fractionation in soils rich in organic matter // Analytica Chimica Acta, 2000. Vol. 408. No. 1-2. P. 103-109.
10. Campbell, A.D. Determination of selenium in biological materials and water // Pure & Appl. Chem., 1984. Vol. 56. No. 5. P. 645-651.
11. Canadian Soil Quality Guidelines. Selenium. Environmental and Human Health Effects. Scientific Supporting Document. PN 1386. ISBN 978-1-896997-69-8 PDF. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Manitoba, 2007. 127 ps.
12. Ermakov, V.V. Selenic deficiency as a reflection of a disorganization of biosphere processes and its overcoming // Ecologica, 2007. Vol. 14. No. 14. P. 7-12.
13. Ermakov, V. Se deficiency and manifestation of Urov disease in East Siberia // Cell Biology and Toxicology, 2008. Vol. 24. No. 1. P. S 80-81.
14. Govasmark, E., Grimmett, M.G. A method for determination of selenium in organic tissue using microwave digestion and liquid chromatography // Journal of AOAC International, 2007. Vol. 90. No 1. P. 838-843.
15. Haddard, P.R., Smythe, L.E. A critical evaluation of fluorometric methods for determination of selenium in plant materials with 2,3-diaminonaphthalene // Talanta, 1974. Vol. 21. No. 8. P. 859-865.
16. Hansson, L., Johansson, K., Olin, A., Siman, G. Method for the determination of selenium in low-selenium grain and the effect of limiting on the uptake of selenium by barley and oats // Acta Agriculturae Scandinavica (section B), 1994. Vol. 44. No. 4. P. 193-200.
17. Kang, Yumei, Yamada, H., Kyuma, K., Hattori, T. Selenium content and distribution in various Japanese soils // Soil Sci. Plant Nutr., 1990. Vol. 36. No. 3. P. 475-482.
18. Lobinski, R., Edmonds, J.S., Suzuki, K.T., Uden, P.C. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials // Pure Applied Chemistry, 2000. Vol. 72. No. 3. P. 447-481.
19. Parker, C.A. and Harley, L.G. Luminiscence of some Piazselenols. A new Fluorometric Reagent for Selenium // The Analyst, 1862. Vol. 87. No. 6. P/ 558-565.
20. Ralston, N.V.C., Unrine J., Wallschager D. Biogeochemistry and analysis of selenium and its species. Washington, 2009. 55 ps.
21. Tan, J., Zhu, W., Wang, W., Li R., Hou, S., Wang, D., Yang, L. Selenium in soil and endemic disease in China // The Science of the Total Environment, 2002. Vol. 284. No 1. P. 227-235.
22. Watkinson, J.H. Fluorimetric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene // Analytical Chemistry, 1966. Vol. 38. No 1. P. 92-87.
23. Watkinson J.H. Semiautomated fluorimetric determination of nanogram quantities of selenium in biological material // Analytica Chimica Acta, 1979. Vol. 105. No 3. P. 319-325.
24. Whetter, P.A. and Ullrey, D.E. Improved Fluorometric Method for Determining Selenium // J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1978. Vol. 61. No. 4. P. 927