

## 海洋生物中硒的催化动力学光度测定与形态分布研究

许 卉, 贺 萍

(烟台大学应用化学系, 山东 烟台 264005)

摘要: 建立了一种测定海洋生物中不同形态硒的催化动力学光度法。在  $\text{pH} = 3$  的 Clark-Lubs 缓冲介质中, 硒(IV)能催化溴酸钾氧化甲基紫的褪色反应, 硒(IV)含量在  $0.14 \sim 8 \mu\text{g/L}$  范围内与褪色反应速率成正比, 生物样品经  $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$  消化后直接测定硒(IV)和有机硒含量, 再经盐酸还原后测定总硒含量, 两者差减得硒(VI)含量。结合 MIBK 萃取分离干扰组分, 该方法具有良好的选择性和准确度, 用于海洋生物材料中不同形态硒的测定, 操作简便快速, 结果令人满意。对几种海藻和双壳类样品中硒的形态分析结果表明, 在海洋生物中, 硒主要以有机硒和硒(IV)的形式存在于难溶性的大分子蛋白质中, 硒(VI)的含量普遍较低, 且存在显著的种间差异。

关键词: 催化动力学光度法; 硒; 形态分布; 海洋生物

中图分类号: O656; P734.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)02-0036-04

作为人体必需的微量元素, 硒及其化合物具有提高免疫力、抗衰老、抗肿瘤等重要的生理功能和广泛的药理作用。近年来研究表明, 硒的生理作用与其存在形态密切相关, 而且各种形态之间存在显著的生物差异<sup>[1]</sup>。海洋生物是人体获取硒的一个重要来源, 因此, 建立一种高灵敏度、高选择性、简便快速、试剂易得且稳定的测定海洋生物材料中痕量硒的分析方法, 在此基础上研究其中硒的形态分布特征, 对于进一步了解其生物活性和生物利用率具有重要意义。

作者研究发现, 在  $\text{pH} = 3$  的 Clark-Lubs 缓冲介质中, 硒(IV)能够选择性地催化溴酸钾氧化甲基紫褪色的反应。作者对这一催化反应条件进行了优化, 研究了有机硒及硒(VI)转化为硒(IV)的反应条件, 在此基础上建立了一种适用于海洋生物材料中硒形态分析的催化动力学光度法, 利用这一方法测定了几种常见海藻和贝类中不同形态硒的含量, 并对其在生物体内的分布进行了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

723 型分光光度计 (上海精密仪器有限公司), 501 型超级恒温水浴 (深圳国华电器厂)。

硒(IV)、硒(VI)和有机硒标准溶液: 分别用  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  和硒代蛋氨酸配制含硒  $1 \text{ g/L}$  的储备液, 使用时逐级稀释为  $0.1 \text{ mg/L}$  的工作标准。Clark-Lubs 缓冲溶液:  $20 \text{ mL } 0.2 \text{ mol/L HCl}$  与  $50 \text{ mL } 0.2 \text{ mol/L KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  混匀, 加水稀释至  $200 \text{ mL}$ ,

此溶液  $\text{pH} = 3$ ,  $20 \text{ mg/L}$  甲基紫溶液,  $0.05 \text{ mol/L KBrO}_3$  溶液, 甲基异丁基酮 (MIBK) 等。所用试剂均为分析纯, 海带、扇贝等海洋生物鲜样采于烟台大学附近海域。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 制作工作曲线

取 2 支  $25 \text{ mL}$  比色管, 其中一支加入适量硒(IV)标准溶液 (催化反应, 吸光度为  $A$ ), 另一支不加 (非催化反应, 吸光度为  $A_0$ ), 然后分别依次加入  $3.0 \text{ mL}$  缓冲溶液,  $1.0 \text{ mL KBrO}_3$  溶液和  $3.0 \text{ mL}$  甲基紫溶液, 加水至刻度, 摇匀后同时放入  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中, 准确恒温  $6 \text{ min}$ , 迅速取出比色管, 流水冷却  $5 \text{ min}$ , 与室温平衡后, 以蒸馏水为参比, 于  $590 \text{ nm}$  波长处分别测定  $A_0$  和  $A$  值, 并计算  $\Delta A = A_0 - A$ , 以  $\Delta A$  对相应的硒(IV)浓度作图绘制工作曲线。

#### 1.2.2 分离提取

取  $500 \text{ g}$  个体均匀的贝类鲜样, 蒸馏水洗净, 用不锈钢刀具取出软体可食部, 将其与洗净的海藻分别用高速组织捣碎机中粉碎、匀浆。准确称取  $5.0 \text{ g}$  匀浆试样于小烧杯中, 加入  $20 \text{ mL}$  蒸馏水, 加热煮沸  $1 \text{ h}$ , 冷

收稿日期: 2002-08-01, 修回日期: 2003-02-18

基金项目: 烟台大学青年基金资助项目 (HY02Z5)

作者简介: 许卉 (1971-), 女, 理学硕士, 讲师, 从事环境分析与化学研究, E-mail: xuhui33@sina.com

却后过滤,滤液(水溶液提取物)和滤渣(固体残余物)分别留待后续处理。

### 1.2.3 消化与纯化

滤液、滤渣分别加入 5 mL 硝酸放置过夜,于 140~160 °C 电热板上缓慢加热至大量 NO<sub>2</sub> 冒出,加入 2 mL 混合酸(4 HNO<sub>3</sub> + 1HClO<sub>4</sub>),加热至试样全部溶解,并蒸发至溶液呈无色或浅黄色,继续升温至 190 °C,使高氯酸白烟冒尽。消化液冷却后,用 6 mol/L HCl 溶解并转移至分液漏斗中,用 MIBK 萃取纯化(每次 10 mL)2 次,水相转入 50 mL 容量瓶中,6 mol/L HCl 定容至刻度。

### 1.2.4 催化光度测定

准确移取一定体积经萃取纯化处理的消化液 2 份,其中一份于沸水浴上加热 20 min,另一份则不加热。然后分别用 3 mol/L NaOH 溶液调节至 pH = 3,再按 1.2.1 的步骤进行催化光度测定,根据工作曲线计算硒含量。前者所得结果为总硒含量,后者为有机硒与 Se(IV)的含量,两者差减计算得 Se(VI)含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 测量波长的选择

配制不同组成的溶液,按 1.2.1 的步骤反应后,以蒸馏水为参比,在可见光区扫描绘制吸收曲线,如图 1 所示。图中 3 条曲线形状一致,最大吸收均在 590 nm 处,但吸光度值由曲线 1~3 明显降低,表明溴酸钾能氧化甲基紫褪色,而 Se(IV)对此反应应具有灵敏的催化活性。作者选择 590 nm 作为测量波长。

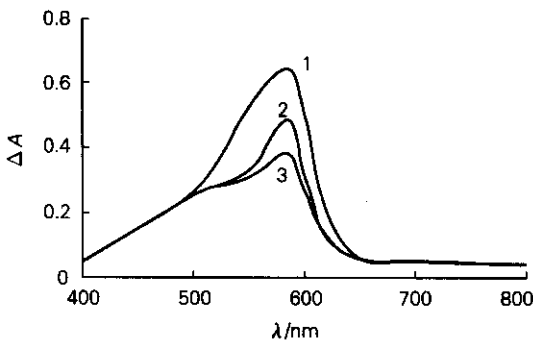


图 1 甲基紫的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of methyl purple (MP)

1. 3.0 mL MP + 3.0 mL buffer; 2. (1) + 1.0 mL KBrO<sub>3</sub>; 3. (2) + 2.0 mL Se(IV)

### 2.2 催化反应条件的优化

改变 Clark-Lubs 缓冲溶液的 pH 值,考察了介质酸度对 Se(IV)催化活性的影响。结果表明,在 pH =

3 的 Clark-Lubs 缓冲体系中 Se(IV) 的催化活性最强(图 2)。缓冲溶液、溴酸钾及甲基紫溶液用量分别在 2.0~5.0 mL, 1.0~1.5 mL, 2.5~4.0 mL 范围内 ΔA

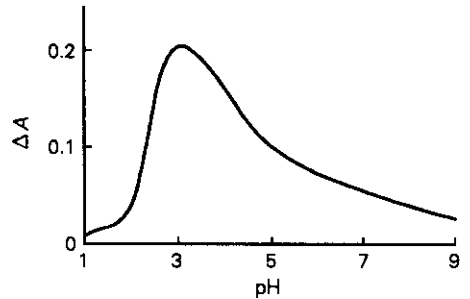


图 2 pH 值对 Se(IV)催化反应活性的影响

Fig. 2 Effect of pH value on ΔA

值高且稳定,作者分别选用 3.0, 1.0 和 3.0 mL。

该体系的催化和非催化反应在室温下都不进行。随温度升高,催化反应速率加快,ΔA 值在 90 °C 时达到最大,此后非催化反应速率明显加快,ΔA 显著下降(图 3)。进一步实验表明,在 3~6 min 内 ΔA 值与加热时间呈线性关系,以流水冷却 5 min 终止反应后,室温下放置 5 h,溶液的吸光度值变化小于 7%。作者

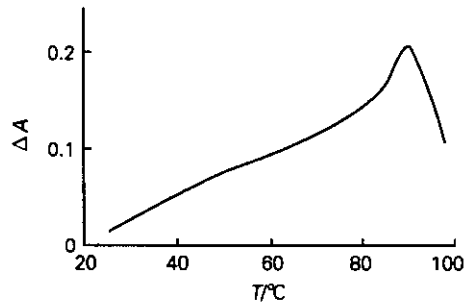


图 3 温度对 Se(IV)催化反应活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on ΔA

选择在 90 °C ± 0.5 °C 的水浴中恒温 6 min,流水冷却 5 min,与室温平衡后 5 h 内测定吸光度。

### 2.3 硒(IV)、硒(VI)和有机硒的选择性测定

实验表明,在硒的各种不同形态中,只有硒(IV)能在选定的条件下显著催化溴酸钾氧化甲基紫褪色的反应,而硒(VI)和有机硒对此指示反应均不具备催化活性,因此,按 1.2.1 步骤直接测定时,只有硒(IV)能定量检出;还原测定时有机硒不能检出,而硒(IV)和硒(VI)均能定量检出。

## 2.4 有机硒的消化

硒易挥发损失, 消化方法的选择对准确测定尤为重要。作者选择在硝酸预分解后, 用硝酸-高氯酸(体积分数=4/1)混酸消解试样。混酸消化前, 用硝酸浸泡样品过夜以分解大部分有机质, 可有效避免冒沫、崩溅等剧烈反应而造成样品损失。对含硒 0.1 μg 的有机硒标准溶液进行消解测定, 回收率 95.2%~99.7%, 表明基本没有硒的挥发损失。进一步试验表明, 此消化方法只能将有机硒氧化成硒(IV), 而硒(VI)不发生变化。

## 2.5 硒(VI)的还原

HBr, HCl 均可还原硒(VI)为硒(IV)<sup>21</sup>。由于 HBr 毒性较大, 同时考虑尽量与萃取纯化的介质条件一致, 以简化分析程序, 作者选择环境毒性小、操作简便的盐酸还原法。实验表明, 在 6 mol/L 盐酸介质中沸水浴加热 20 min 即可将硒(VI)全部还原为硒(IV)。

## 2.6 共存离子的影响及消除

对 0.1 μg 硒(IV), 考察了一些常见离子对测定的影响。结果表明, 相对误差控制在 ±5% 以内, 5 000 倍 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, 2000 倍 Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 1000 倍 Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup> 和 100 倍 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> 共存时均不干扰测定。在海洋生物中含量较高的 Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 的允许倍量较小, 仅为 10, 在测定前须进行分离。实验表明, 在 6 mol/L HCl 介质中, 经 MIBK 萃取分离, 可有效消除大量 Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 共存的干扰。

## 2.7 线性范围与检出限

实验结果表明, 在优化条件下, 硒含量在 0.14~8 μg/L 范围内与 ΔA 值的线性关系良好, 对生物体中硒的绝对检出限为 3.5 ng。

## 2.8 精密度与准确度

以扇贝样品为例, 按实验方法对其中不同形态硒的含量进行了平行测定和回收实验, 并与 DAN 荧

表 1 扇贝样品中不同形态硒测定的精密度、回收率及分析结果对照

Tab.1 Results for precision, recovery and contrast of speciation analysis of selenium in scallop

硒的形态	本法平均结果 (n=4, μg/g, 湿质量)	RSD (%)	加标量 (μg/g, 湿质量)	回收值 (μg/g, 湿质量)	回收率 (%)	荧光法结果 <sup>[3]</sup> (μg/g, 湿质量)	相对误差 (%)
总硒	0.483	7.8	0.400	0.407	102	0.510	-5.3
有机硒+硒(IV)	0.392	9.0	0.400	0.385	96	0.374	4.8

光法进行对照, 结果如表 1 所示。由表 1 可见, 作者所建立的催化动力学光度法精密度、准确度良好, 适用于海洋生物中硒的形态分析。

## 2.9 不同化学形态硒在海洋生物中的分布

由表 2 数据可以看出, 在所测定的几种海藻和双壳贝类海洋生物中, 有机硒和硒(IV)是硒的主要存在形式, 占总硒含量的 80% 以上, 在个别物种(如黄蛤)中甚至达到 97%。硒(VI)的含量则普遍较低, 一

般不超过 0.1 μg/g 湿重水平, 而且物种间的差异相当大, 可超过一个数量级(如黄蛤和扇贝)。

## 2.10 不同提取物中硒的含量及其形态分布特征

选择黑蛤和黄蛤 2 种样品, 对不同提取物中硒的含量及其形态分布特征进行了初步研究, 结果见表 3。

由表 3 可见, 在这 2 种蛤蜊中, 绝大部分硒用水难以提取, 硒主要存在于难溶性物质中。固体残余物

表 2 海洋生物样品中不同形态硒的测定结果

Tab.2 Results of speciation analysis of selenium in several marine organisms

样品	含量测定(μg/g, 湿质量)			RSD(%, n=4)		回收率(%)	
	总硒	有机硒+硒(IV)	硒(VI)	总硒	有机硒+硒(IV)	总硒	有机硒+硒(IV)
海带	0.401	0.383(95.5)	0.018(4.5)	4.4	6.8	101	98
裙带菜	0.336	0.276(82.1)	0.060(17.9)	9.5	4.3	106	102
扇贝	0.483	0.392(81.2)	0.091(18.8)	7.8	9.0	96	105
牡蛎	0.636	0.592(93.1)	0.044(6.9)	8.9	7.0	103	99
黑蛤	0.180	0.161(89.4)	0.019(10.6)	5.1	6.7	98	101
黄蛤	0.280	0.272(97.1)	0.008(2.86)	7.5	8.3	105	97

注: 括号中数据为各种形态硒在总硒中所占的质量百分数。

表 3 蛤蜊不同提取物中硒的含量及形态分布

Tab.3 Mass percentage and species distribution of selenium in different abstracts of clams

样品	硒(%)					
	水溶液提取物			固体残余物		
	有机硒 + 硒(IV)	硒(VI)	T	有机硒 + 硒(IV)	硒(VI)	T
黑蛤	47.4	52.6	10.6	94.4	5.6	89.4
黄蛤	74.8	25.2	9.7	99.6	0.4	90.3

注: T 为不同提取物中的硒占总硒含量的百分比。

中, 硒主要以有机硒和硒(IV)的形式存在, 特别是黄蛤, 其比例高达 99.6%。水溶液提取物中硒(VI)的比例较在固体残余物中高, 而且波动范围较大。结合文献研究<sup>[1]</sup>可以推测, 海洋生物, 尤其是贝类生物中的硒可能大部分以有机硒的形式存在于难溶性的分子蛋白质中, 而在水溶性蛋白质中硒含量较低。

### 3 结论

硒的测定方法有荧光法、原子吸收法、中子活化分析法等, 但因需要二氨基萘等特殊试剂或昂贵仪器而不易推广。作者提出的催化动力学光度法, 其线性检测范围及检出限与 DAN 荧光法<sup>[2]</sup>、原子吸收法<sup>[3]</sup>在数量级上相当, 对生物样品中不同形态硒的测定结果与荧光法一致(相对误差 < 10%)。该方法选择性好, 灵敏度、准确度高, 适用于包括海洋生物在内的多种环境样品中硒的形态分析, 且易于推广使用。

对几种海藻和海贝的测定结果表明, 硒在海洋生

物中主要以有机硒的形式存在于难溶性的大分子蛋白质中。由于有机硒化合物毒性低于无机硒化合物, 而且有机结合形式的硒在激发免疫反应时较无机硒化合物显著<sup>[4]</sup>, 因此, 富含有机硒的海洋生物是开发高营养价值和生物利用率的补硒功能食品和药品的重要资源。

#### 参考文献:

- [1] 毛文君. 几种海洋动物中硒化学形式和分布[J]. 海洋科学, 1997, 21(2): 8-9.
- [2] 熊远福, 刘军鸽, 文祝友, 等. 荧光法测定水样中的硒(IV)、硒(VI)和有机硒[J]. 分析科学学报, 1999, 15(2): 154-157.
- [3] 姜建生, 黄淦泉, 钱沙华, 等. 交联壳聚糖在硒的形态分析中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(2): 75-77.
- [4] 李翎, 毛文君, 赵林. 贻贝富硒提取物中硒生物活性的初步探讨[J]. 海洋科学, 1997, 21(5): 56-57.

## Studies on speciation analysis and distribution of selenium in marine organisms by catalytic kinetic spectrophotometry

XU Hui, HE Ping

(Department of Applied Chemistry, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Aug., 1, 2002

Key words: catalytic kinetic spectrophotometry; selenium; species distribution; marine organisms

**Abstract:** Trace selenium(IV) can catalyze the discolouring oxidization of methyl purple by potassium bromate in Clark-Lubs buffer solution with a pH value of 3.0. Based on this selective reaction of Se(IV), a new catalytic spectrophotometric method for the speciation analysis of selenium in marine organisms was developed. Digested with HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> and reduced with HCl, organic Se was oxidized to Se(IV) and Se(VI) was reduced to Se(IV), the contents of total Se, Se(VI), Se(IV) and organic Se then could determined by catalytic spectrophotometry and differential method respectively. The method covers a linear detection range of Se of 0.14~8 μg/L and its absolute detection limit for Se in bio-material is 3.5 ng. Speciation analysis of selenium in several seagrass and bivalves was conducted with satisfactory results. Demonstrations that organic Se and Se(IV), the major species of selenium, mainly exist insoluble macro molecular proteins. The content of Se(VI) is commonly low and differs significantly between biologic species.

(本文编辑 张培新)