

离子色谱法测定胡蜂酒中 5 种无机阴离子的含量

鲁广秋¹ 田先娇² 党凌婧³ 刘贵有³ 杨新周^{2,4*}

(1. 玉溪师范学院 化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100;

2. 德宏师范高等专科学校 理工学院, 云南 德宏 678400;

3. 德宏职业学院, 云南 芒市 678400;

4. 德宏师范高等专科学校 民族医药研究所, 云南 芒市 678400)

摘 要 为了探究胡蜂酒中无机阴离子的含量和组成, 利用离子色谱法测定胡蜂酒中 5 种阴离子(F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})含量, 建立了一种同时测定胡蜂酒中 5 种无机阴离子的方法。并测定不同产区胡蜂酒阴离子含量, 分析不同产区胡蜂酒阴离子含量之间的差异, 以为胡蜂酒的评价提供新思路。结果表明, 5 种无机阴离子标准曲线相关系数良好, 相关系数范围在 0.998 0~0.999 9, 检出限在 0.024~4.33 mg/L, 5 种阴离子的加标回收率在 84.1%~100%, RSD 为 0.17%~1.2%, 所建立的分析方法准确、可靠, 能满足胡蜂酒中阴离子分析的要求。不同产区胡蜂酒中阴离子含量存在差异, 5 种阴离子平均含量高低次序为 PO_4^{3-} (2 666.825 mg/L)、 Cl^- (77.550 mg/L)、 NO_3^- (9.408 mg/L)、 F^- (6.220 mg/L)、 Br^- (0.760 mg/L)。16 个不同产区胡蜂浸泡酒中 F^- 变异系数最大, 说明不同产区中 F^- 含量波动较大。 Cl^- 、 PO_4^{3-} 变异系数最小, 说明不同产区胡蜂之间含量较稳定。

关键词 胡蜂酒; 离子色谱; 阴离子

中图分类号: O657.7 TH833 文献标志码: A 文章编号: 2095-1035(2022)03-0151-05

Determination of Five Anions in Vespa Wine by Ion Chromatography

LU Guangqiu¹, TIAN Xianjiao², DANG Lingjing³, LIU Guiyou³, YANG Xinzhou^{2,4*}

(1. College of Chemical Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi, Yunnan 653100, China;

2. Science and Engineering Department of Dehong Teachers College, Dehong, Yunnan 678400, China;

3. Dehong Vocational College, Mangshi, Yunnan 678400, China;

4. The Research Institute of Ethnic Minority Medicine, Dehong Teachers' College, Dehong, Yunnan 678400, China)

Abstract In order to explore the content and composition of inorganic anions in wasps wine, a method for simultaneous determination of five kinds of anions (F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-}) in vespa wine was established by ion chromatography. The anion content of vespa wine from different production areas was determined, and the differences of anion content in vespa wine from different production areas were analyzed, it

收稿日期: 2021-09-02 修回日期: 2021-12-02

基金项目: 云南省中医联合专项面上项目(202001AZ070001-076); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202005AC160061)

作者简介: 鲁广秋, 女, 讲师, 主要从事分析化学及环境分析研究。E-mail: zhlguangqiu@yxnu.edu.cn

* 通信作者: 杨新周, 男, 硕士, 教授, 主要从事民族药物及分离分析化学研究。E-mail: YXZ1149@126.com

引用格式: 鲁广秋, 田先娇, 党凌婧, 等. 离子色谱法测定胡蜂酒中 5 种无机阴离子的含量[J]. 中国无机分析化学, 2022, 12(3): 151-155.

LU Guangqiu, TIAN Xianjiao, DANG Lingjing, et al. Determination of Five Anions in Vespa Wine by Ion Chromatography [J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2022, 12(3): 151-155.

provide a new idea for the evaluation of vespa wine. The results showed that the correlation coefficient of five kinds of inorganic anions was good, the correlation coefficient was in the range of 0.998 0—0.999 9, the detection limit was in the range of 0.024—4.33 mg/L, the recovery of five kinds of anions was in the range of 84.1%—100%, the RSD was in the range of 0.17%—1.2%. The established method is accurate, reliable and can meet the requirements of anion analysis in vespa wine. There were differences in the anions content in vespa wine from different regions, and the order of the average anions content was PO_4^{3-} (2 666.825 mg/L), Cl^- (77.550 mg/L), NO_3^- (9.408 mg/L), F^- (6.220 mg/L) and Br^- (0.760 mg/L). The coefficient of variation of F^- in vespa soaked wine from 16 different production areas was the largest, indicating that F^- content fluctuated greatly in different production areas. The coefficients of variation of Cl^- and PO_4^{3-} were the smallest, indicating that the contents of vespa in different production areas were stable.

Keywords vespa wine; ion chromatography; anions

胡蜂酒来源于景颇民族医药^[1],目前中国药典中主要记载了胡蜂酒的制法、性状,检查项目主要包括 pH 值、乙醇量、总固体物、其他酒剂有关各项规定^[1]。但对胡蜂酒中阴离子含量的测定未见报道。

目前对白酒、啤酒中有机酸和阴离子研究较多^[2-6],研究表明无机阴离子对白酒和啤酒的质量有一定的影响。如阴离子对酒的感官有贡献,酒会因为某些无机阴离子含量过高而产生沉淀^[2]。成品啤酒的风味和口感与无机阴离子的含量高低有一定关系,而且会影响啤酒的饮用安全。氯离子能够赋予啤酒醇厚、丰满的口味,但过量的氯化物会使咸味增加^[4]。高浓度的硝酸盐在亚硝化细菌的作用下会转化成亚硝酸盐,亚硝酸盐可与食物或胃中的仲胺类物质发生反应生成亚硝胺,有强烈的致癌作用。磷酸盐是体液的重要成分,维持体压的稳定^[4]。氟是人体所必需的微量元素,适量的氟可以促进人体骨骼和牙齿的钙化,增强骨骼的强度,若长期过多摄入,可干扰骨代谢乃至引发人全身性中毒,肌体内各组织器官都会受到一定程度的损害,且氟不易通过代谢排出体外^[7]。所以对胡蜂酒中阴离子的测定十分必要。

测定阴离子的方法主要有离子色谱法、滴定法、离子选择性电极法以及分光光度法等^[8-10]。目前测定酒中阴离子含量的主要方法为离子色谱法,该法快速、简便、灵敏度高,已经用于白酒^[2,11]、啤酒^[3-4]、葡萄酒^[12]等酒中的阴离子含量测定。本研究离子色谱法测定胡蜂酒中阴离子含量,建立了一种同时测定胡蜂酒中 5 种无机阴离子的方法,并测定不同产区胡蜂酒阴离子含量,分析不同产区间胡蜂酒阴离子含量之间的差异,以为胡蜂酒的评价提供新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

Thermo Fisher 离子色谱仪(ICS-900)、上海科

导 SK6210HP 超声清洗器、奥豪斯 CP114 电子分析天平。所用到的 5 种阴离子(F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})标准品购买自中国计量科学研究院(国家标准物质中心),用到的化学试剂如 Na_2CO_3 等均为天津风船生成的优级纯,实验使用的纯水为 UPR-II 型优普超纯水机所制 UP 水。

1.2 胡蜂酒的制作

按照 2020 版药典,称取 100 g 鲜胡蜂(成熟职蜂)于玻璃瓶中,加入 1 000 mL 50%~60%(Vol)白酒,浸泡 90 d,得胡蜂酒。

1.3 胡蜂样品信息

胡蜂收集于云南不同地区,经德宏师专郭云胶教授鉴定为胡蜂科金环胡蜂(*Vespa mandarinia* Smith)。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Samples information

序号	采集地	序号	采集地
1	德宏州陇川县	9	德宏州陇川
2	德宏州芒市	10	德宏州芒市
3	德宏州盈江	11	文山州广南县
4	德宏州陇川	12	文山州广南县
5	德宏州陇川	13	文山州广南县
6	德宏州盈江	14	文山州广南县
7	德宏州陇川县	15	德宏州芒市
8	德宏州陇川县	16	德宏州陇川县

1.4 检测条件

离子色谱使用的色谱柱为:AS22 阴离子分析柱(250 mm×4 mm,5 μm)和保护柱(50 mm×4 mm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;抑制器类型:ASRS 300×4 mm,40 mA,自循环抑制;电导检测器;配制浓度为 4.5 mmol/L Na_2CO_3 和 1.4 mol/L NaHCO_3 的淋洗液,等度洗脱;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL 。

1.5 阴离子混合标准溶液配制

用购买的中国计量科学研究院(国家标准物质中心)生产的5种阴离子的标准储备液: F^- (100.0 mg/L)、 Cl^- (1 000 mg/L)、 Br^- (100.0 mg/L)、 NO_3^- (1 000 mg/L)、 PO_4^{3-} (1 000 mg/L),分别按 F^- 浓度0.10、0.20、0.40、0.80、1.0、2.0、4.0 mg/L, Cl^- 浓度1.0、2.0、4.0、8.0、10.、20.、50.00 mg/L, Br^- 浓度0.10、0.20、0.40、0.80、1.0、2.0、4.0 mg/L, NO_3^- 浓度0.20、0.50、1.0、5.0、20.、40.、80.00 mg/L, PO_4^{3-} 浓度1.0、3.0、5.0、10.、20.0、50.0、100.0 mg/L,配制得到7个不同浓度的混合标准系列溶液。

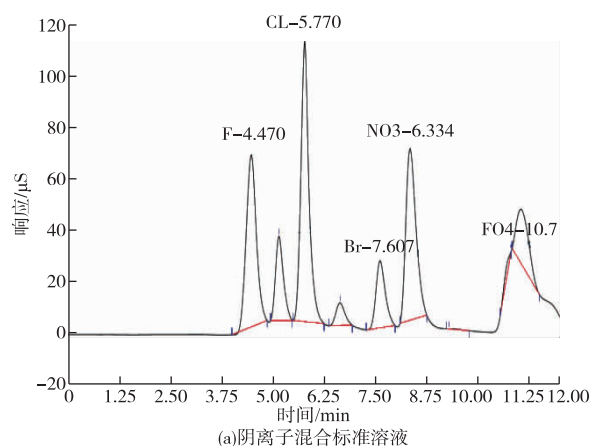


图1 阴离子混合标准溶液离子色谱图(a)和白酒空白样品离子色谱图(b)

Figure 1 Ion chromatograms of anion mixed standard solution(a)and blank sample ion chromatogram of Baijiu(b)

1.6 样品溶液的制备

取适量样品原液至50 mL离心管中,35℃条件下热水浴加热30min,去除一定量乙醇后,静置冷却至室温,然后在3 500 r/min转速下离心5 min。再准确吸取离心后的样品5.00 mL,转移至25 mL容量瓶中,随后加入UP水定容至刻度线,混合均匀,再经0.45 μm 滤膜过滤,得到待测试液。

2 结果与讨论

2.1 混合标准和胡蜂酒样品色谱图

按实验方法测定阴离子混合标准溶液和胡蜂酒的色谱图见图1和图2。

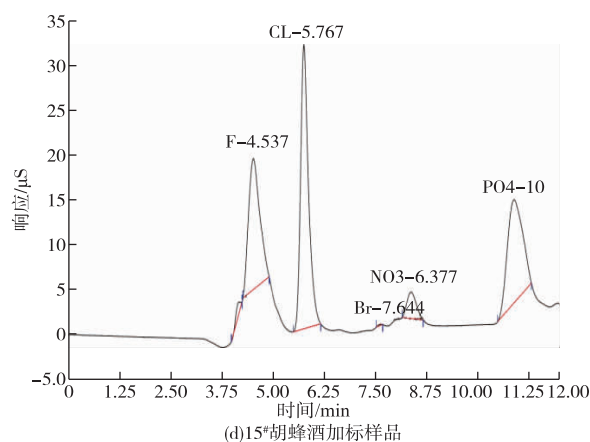
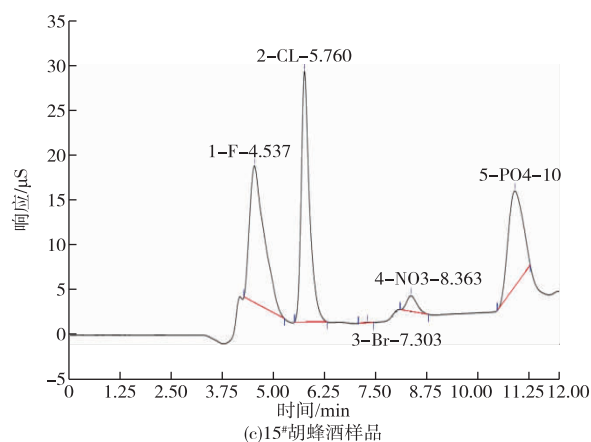
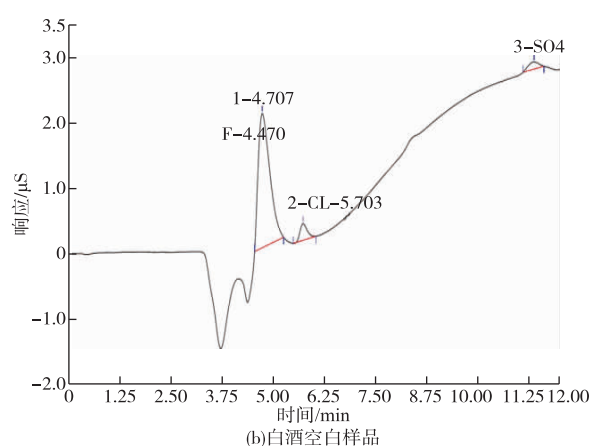


图2 15#样品离子色谱图(c)和15#加标样品离子色谱图(d)

Figure 2 15# sample ion chromatogram(c)and 15# added sample ion chromatogram (d)

以15#样品的离子色谱图为例,对实际样品检测结果进行分析,可以从图1、2中看出,使用所建立的离子色谱实验方法分析胡蜂酒样品,测定的5种阴离子有较好的分离度。通过检测0#白酒空白样品和

1#~16#来自不同地区的胡蜂所泡制的药酒样品,分析图谱发现,白酒空白样品中所含阴离子较少,但浸泡过胡蜂后的实际样品中 F^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 明显增加,说明在浸泡过程中有物质溶出到了白酒中。

2.2 标准曲线、相关系数及检测限

用 5 种阴离子标准储备液配制 7 个不同浓度的标准溶液系列,以质量浓度(mg/L)为横坐标,所对应的峰面积($\mu\text{S} \times \text{min}$)为纵坐标绘制标准曲线,并计算回归方程及相关系数 r 。计算结果如表 2 所示;5 种水溶性无机阴离子的相关系数范围在 0.998 0~0.999 9,各组分峰面积与质量浓度相关性良好,可以满足定量测定的需要。

2.3 加标回收及精密度实验

将 5 种阴离子标准溶液分别按 0.128、1.28、

0.80、1.60 mg/L 浓度添加到样品中,设定 3 个平行进行加标回收实验,同时用 UP 水作为试剂空白,0# 样品作为白酒样品空白,进行对照实验。每个组分的保留时间作为定性依据,再配制标准溶液测得标准曲线进行定量分析。加标样品的 3 次平行测定回收率结果及相对标准偏差(RSD)如表 3 所示,结果表明胡蜂酒中 5 种阴离子的加标回收率在 84.1%~100%,RSD 为 0.17%~1.2%,所建立的分析方法准确、可靠,能满足胡蜂酒中阴离子分析的要求。

表 2 线性回归方程及相关系数

Table 2 Linear regression equation and correlation coefficient

阴离子	线性范围/(mg · L ⁻¹)	线性回归方程	相关系数 r	检出限/(mg · L ⁻¹)
F ⁻	0.1~4.0	$y=4.742x+0.1033$	0.9994	0.024
Br ⁻	0.1~4.0	$y=1.7228x-0.1272$	0.9987	0.108
NO ₃ ⁻	0.2~80.0	$y=0.2402x-0.2209$	0.9990	0.201
Cl ⁻	1.00~50.0	$y=0.5006x-0.5818$	0.9995	0.026
PO ₄ ³⁻	1.00~100.0	$y=0.0196x-0.0044$	0.9980	4.33

表 3 回收实验及精密度测定结果

Table 3 Results of recovery experiment and precision measurement

阴离子	加标量/(mg · L ⁻¹)	加标回收率/%			平均加标回收率/%	RSD/%
		1	2	3		
F ⁻	0.128	84.00	83.90	84.50	84.13	0.38
Cl ⁻	0.800	100	99.00	102	100	1.2
Br ⁻	0.128	95.40	94.5	96.3	95.40	0.93
NO ₃ ⁻	1.28	86.40	87.40	85.40	86.40	1.2
PO ₄ ³⁻	1.60	98.30	98.00	97.50	97.93	0.41

2.4 不同产区胡蜂酒中阴离子的测定结果及分析

不同产区胡蜂浸泡的胡蜂酒样品通过上述离子色谱法分析检测后,测得的阴离子含量结果如表 4 所示。从表 4 中可以看到,白酒空白样品中未检出 F⁻、Br⁻、NO₃⁻、PO₄³⁻,16 个不同地区胡蜂浸泡的胡蜂酒均检出 F⁻、Br⁻、NO₃⁻、PO₄³⁻,说明胡蜂酒中阴离子主要来自胡蜂,浸泡过程中存在离子渗透作用。对结果进一步分析可以看出,5 种阴离子中含量由高至低得顺序为 PO₄³⁻>Cl⁻>NO₃⁻>F⁻>Br⁻,即 PO₄³⁻ 含量最高的,其平均为 2 666.83 mg/L,是其他离子含量的大约 34 倍以上,说明在浸泡过程中有大量含脂溶性含磷化合物溶出渗透到了白酒中。含量最低的是 Br⁻,其平均含量为 0.760 mg/L,样品中只存在极少的溴化物。其余阴离子 F⁻、NO₃⁻、Cl⁻ 平均含量依次为 6.220、9.408、77.550,其中 Cl⁻ 含量仅次于 PO₄³⁻,说明还有大量氯化物被溶出。16 个不同产区胡蜂浸泡酒中 F⁻ 变异系数最大,说明不同产区中 F⁻ 含量波动较大。Cl⁻、PO₄³⁻ 变异系数最小,说明不同产区胡蜂之间含量较稳定。

表 4 胡蜂酒阴离子含量

Table 4 Contents of anions in vespa wine /(mg · L⁻¹)

样品编号 #	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
0	-	6.32	-	-	-
1	7.20	78.7	1.03	10.4	2 947
2	5.06	70.8	0.738	9.94	2 614
3	0.71	83.2	-	8.93	3 152
4	9.08	62.2	0.731	10.0	2 419
5	6.72	87.0	-	6.91	2 372
6	8.65	66.7	-	10.4	2 562
7	12.6	70.6	0.687	9.61	2 930
8	10.7	66.3	0.684	10.3	2 588
9	6.72	84.8	0.747	10.2	3 003
10	7.77	82.5	0.670	9.37	2 744
11	0.536	83.0	0.671	7.96	2 512
12	0.809	95.5	0.895	10.0	2 759
13	0.729	84.3	0.846	8.34	1 843
14	7.37	73.6	-	5.71	2 532
15	6.54	70.0	0.404	14.9	2 959
16	8.39	81.6	1.02	7.52	2 736
平均值	6.22	77.6	0.760	9.41	2 667
最大值	12.6	95.5	1.03	14.9	3 152
最小值	0.536	62.2	0.404	5.71	1 843
极差	12.0	33.3	0.623	9.14	1 309
标准差	3.72	9.17	0.170	2.02	315.1
变异系数/%	59.8	11.8	22.4	21.5	11.82

3 结论

利用离子色谱法测定胡蜂酒中5种阴离子(F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})含量,检测条件为:柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,淋洗液条件为 $4.5\text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3$ 和 1.4 mol/L NaHCO_3 等度洗脱,流速为 1.0 mL/min ,进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。在此条件下5种无机阴离子标准曲线相关系数良好,检出限在 $0.024\sim 4.33\text{ mg/L}$,验证了方法的加标回收率和精密度,其加标回收率在 $84.1\%\sim 100\%$, RSD 为 $0.17\%\sim 1.2\%$,所建立的分析方法准确、可靠,能满足胡蜂酒中阴离子分析的要求。不同产区胡蜂酒中阴离子含量存在差异,5种阴离子平均含量高低次序为 PO_4^{3-} ($2\ 666.825\text{ mg/L}$)、 Cl^- (77.550 mg/L)、 NO_3^- (9.408 mg/L)、 F^- (6.220 mg/L)、 Br^- (0.760 mg/L)。16个不同产区胡蜂浸泡酒中 F^- 变异系数最大,说明不同产区中 F^- 含量波动较大。 Cl^- 、 PO_4^{3-} 变异系数最小,说明不同产区胡蜂之间含量较稳定。

参考文献

- [1] 李秀林,田先娇,田孟华,等.电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)法测定胡蜂酒中无机元素[J].中国无机分析化学,2022,12(1):155-162.
LI Xiulin, TIAN Xianjiao, TIAN Menghua, et al. Determination of inorganic elements in vespa wine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES)[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2022, 12(1): 155-162.
- [2] 王小琴,练顺才,李杨华,等.白酒无机阴离子色谱测定及感官影响研究[J].食品与发酵科技,2014,50(2):64-66,88.
WANG Xiaoqin, LIAN Shuncai, LI Yanghua, et al. Determination of inorganic anions in white spirit by ion chromatography and the sense influence for white spirit[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(2): 64-66, 88.
- [3] 宋卫得,杨立明,李兆杰,等.电导抑制-梯度淋洗离子色谱法同时测定啤酒中多种有机酸和阴离子[J].化学研究与应用,2018,30(3):426-431.
SONG Weide, YANG Liming, LI Zhaojie, et al. Simultaneous determination of various organic acids and anions in beer by gradient elution ion chromatography with suppressed conductivity detection[J]. Chemical Research and Application, 2018, 30(3): 426-431.
- [4] 刘珍珠,张辉珍,崔鹤,等.离子色谱法测定啤酒中6种无机阴离子的含量[J].理化检验(化学分册),2017,53(4):404-408.
LIU Zhenzhu, ZHANG Huizhen, CUI He, et al. Determination of 6 inorganic anions in beer by ion chromatography[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2017, 53(4): 404-408.
- [5] 王春慧,刘霁欣,毛雪飞.直接进样钨丝电热蒸发-原子荧光光谱法快速测定蒸馏酒中镉[J].中国无机分析化学,2022,12(1):
WANG Chunhui, LIU Jixin, MAO Xuefei. Rapid determination of cadmium in distilled liquor by direct sampling W-coil electrothermal vaporization-atomic fluorescence spectrometry[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2022, 12(1):
- [6] 宋卫得,李兆杰,杨立明,等.离子色谱法快速测定白酒中多种有机酸和阴离子[J].中国酿造,2017,36(11):153-157.
SONG Weide, LI Zhaojie, YANG Liming, et al. Rapid determination of various organic acids and anions in Baijiu by ion chromatography[J]. China Brewing, 2017, 36(11): 153-157.
- [7] 邹沫君,唐诗文.离子色谱-电导法检测白酒中氟化物[J].中国酿造,2021,40(4):164-167.
ZOU Mojun, TANG Shiwen. Determination of fluoride in Baijiu by ion chromatography conductance-method[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 164-167.
- [8] 郭晋君,刘建利,宋蓓.水中阴离子表面活性剂测定方法的对比研究[J].化学试剂,2017,39(12):1322-1324.
GUO Jinjun, LIU Jianli, SONG Bei. Determination of anionic surfactants in water[J]. Chemical Reagents, 2017, 39(12): 1322-1324.
- [9] 周悦,周曼菲,沈禹,等.离子色谱法测定南京市道路灰尘中的四种无机阴离子[J].中国无机分析化学,2021,11(2):9-14.
ZHOU Yue, ZHOU Manfei, SHEN Yu, et al. Determination of four inorganic anions in road dust in nanjing by ion chromatography[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2021, 11(2): 9-14.
- [10] 刘爽,张娟,徐楠,等.离子色谱测定农用硫酸铵中4种杂质阴离子[J].中国无机分析化学,2020,10(4):36-40.
LIU Shuang, ZHANG Juan, XU Nan, et al. Determination of four impurity anions in agricultural ammonium sulfate by ion chromatography[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2020, 10(4): 36-40.
- [11] 王慧丽.青稞酒酿酒用水中6种阴离子检验方法的研究[J].酿酒科技,2018,4(11):65-69.
WANG Huili. Detection of 6 anions in liquor-making water for highland barley liquor[J]. Liquor Making Science & Technology, 2018, 4(11): 65-69.
- [12] 宋卫得,李兆杰,刘冰,等.离子色谱法同时测定葡萄酒中26种有机酸和阴离子[J].酿酒科技,2018,4(4):106-111.
SONG Weide, LI Zhaojie, LIU Bing, et al. Simultaneous determination of 26 organic acids and anions in grape wine by ion chromatography[J]. Liquor Making Science & Technology, 2018, 4(4): 106-111.

湿法消解-原子荧光光谱法测定全血中硒

张晓梅 潘兴富*

(北京市化工职业病防治院, 北京 100093)

摘 要 以全血样品为原料,探讨湿法消解-原子荧光光谱法测定全血中的硒含量。血样经硝酸-高氯酸消解后,用硼氢化钠将硒还原成硒化氢,由氩气载入原子化器,产生的原子荧光强度与试液中硒元素含量在一定范围内呈正比,外标法定量。以消解效率为指标,优化样品的消解条件,测定血中硒在 0~10 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性情况良好,相关系数为 0.999 2,最低检出限为 0.143 $\mu\text{g/L}$,相对标准偏差为 1.5%~1.6%,平均加标回收率为 90.9%~105%。方法灵敏度高,精密度和稳定性好,可应用于血中硒的生物监测。

关键词 全血;硒;原子荧光光谱;小样品

中图分类号: O657.31 TH744.16 **文献标志码**: A **文章编号**: 2095-1035(2022)03-0156-05

Determination of Selenium in Whole Blood by Atomic Fluorescence Method with Wet Digestion

ZHANG Xiaomei, PAN Xingfu*

(Beijing Prevention and Treatment Hospital of Occupational Disease for Chemical Industry, Beijing 100093, China)

Abstract Using whole blood samples as raw materials, the wet digestion combined atomic fluorescence method was used to determine the selenium content in blood. The blood sample is digested with nitric acid-perchloric acid, the selenium is reduced to hydrogen selenide with sodium borohydride, and the hydrogen selenide is loaded into the atomizer by argon. The fluorescence intensity of the generated selenium atoms is within a certain range with the concentration of selenium in the test solution. It is proportional and quantified by external standard method. Use the digestion efficiency as an indicator to optimize the digestion conditions of the sample, the determination of selenium in blood is linear in the range of 0—10 $\mu\text{g/L}$, the correlation coefficient is 0.999 2, the minimum detection limit is 0.143 $\mu\text{g/L}$, the relative standard deviation is 1.5%—1.6%, and the average recovery is 90.9%—105%. The atomic fluorescence determination method of selenium in blood has high sensitivity, good precision and stability, and can be applied to biological monitoring of selenium in blood.

Keywords whole blood; selenium; atomic fluorescence; small sample

硒是人体必需的微量元素,缺硒可引发大骨节病与克山病等^[1-2],硒过量又会引发毒害作用,所以

准确测定人体内硒含量意义重大。血是人体硒水平的生物标记物之一,可反应人体几天内的硒水平,是

收稿日期:2021-07-06 修回日期:2021-11-22

作者简介:张晓梅,女,助理工程师,主要从事化学分析研究。E-mail:zxm12177@163.com

* 通信作者:潘兴富,男,副研究员,主要从事职业卫生检测与评价研究。E-mail:13581951422@163.com

引用格式:张晓梅,潘兴富.湿法消解-原子荧光光谱法测定全血中硒[J].中国无机分析化学,2022,12(3):156-160.

ZHANG Xiaomei, PAN Xingfu. Determination of Selenium in Whole Blood by Atomic Fluorescence Method with Wet Digestion[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2022, 12(3): 156-160.

国际上比较认可的硒监测指标^[3-4]。血液样品中的硒检测主要有原子吸收光谱法^[5]、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法^[6]、原子荧光光谱法^[7]等,其中ICP-MS因灵敏度高、特异性强,但存在多原子干扰和质谱干扰等问题^[8];原子吸收光谱法需根据样品进行基体改进,操作繁琐,周期长。目前,原子荧光光谱法因灵敏度高、检测限低被广泛应用于土壤、食品、金属材料等领域^[9-11],将原子荧光光谱应用于血中硒的检测研究主要集中在血清样本,样品前处理多用微波消解,而对于全血中硒的原子荧光光谱法检测研究较少。样品常用的消解法有干法、湿法和微波消解,其中干法消解温度高,耗时长,微波消解耗时长,且消解后仍需赶酸,操作复杂,湿法消解操作简单,耗时短,被广泛应用。由于生物样本的珍贵性,检测时降低样本体积的必要性不言而喻,国外在十年前便提出了低体积概念,使小样品分析成为许多环境和医学相关研究目标的可能^[12-13],而我国在低体积样品方面的研究未见报道。本文参考卫生行业标准(WS/T 109—1999)《血清中硒的氢化物发生-原子吸收光谱法》^[14],低体积取样后采用湿法消解,以消解效率为评价指标,优化样品的消解条件,调试仪器参数,建立全血中硒含量测定的原子荧光光谱分析方法,以期监测人群健康提供技术支持,同时为原子荧光光谱法检测全血中硒的标准制定提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

AFS-9770 原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司),配 AS-50 自动进样器;智能型电热板(林茂科技有限公司);实验中所用玻璃器具均以硝酸(50%)浸泡过夜,以去离子水清洗烘干后使用。

水中硒标准溶液(1 000 mg/L,坛墨质检科技股份有限公司),全血质控样品(Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-2 RUO),硝酸(电子级 70%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),高氯酸(AR 70.0%~72.0%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),盐酸(GR,国药集团化学试剂有限公司),硼氢化钠(AR,国药集团化学试剂有限公司),氢氧化钠(GR,北京化工厂有限责任公司)。

混酸(1+1):浓硝酸与高氯酸按体积比 1:1 混合。

氢氧化钠(5 g/L):称取 5.0 g 氢氧化钠溶于水

中,冷却后用水定容至 1 000 mL。

硼氢化钠碱溶液(10 g/L):称取 10.0 g 硼氢化钠溶于氢氧化钠中,用氢氧化钠定容至 1 000 mL。

盐酸溶液(5+95):吸取 50 mL 浓盐酸缓慢加入 900 mL 水中,冷却后用水定容至 1 000 mL。

1.2 实验方法

根据样品中硒浓度与标准曲线线性范围,调节仪器灯电流、负高压等参数值,使其荧光强度响应值在合适范围。调节后的仪器参数为:载气 300 mL/min,屏蔽气 800 mL/min,负高压 280 V,原子化器高度 8 mm,Se 总灯电流 60 mA,辅助灯电流 30 mA。

1.2.1 标准系列配制与测定

用盐酸溶液(5+95)将 1 000 mg/L 硒标准品逐级稀释成 100 μg/L 标准使用溶液后配制成 0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg/L 的标准系列。以盐酸溶液(5+95)为载流,硼氢化钠碱溶液(10 g/L)为还原剂,连续用标准系列的零管进样,待读数稳定之后,将硒标准系列溶液按质量浓度由低到高的顺序分别导入仪器,测定其荧光强度,以质量浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标建立标准曲线。

1.2.2 样品预处理与测定

取 200 μL 血样,加入 1.8 mL 超纯水后加 1 mL 混酸,于(150±10)℃消解至淡黄色或无色透明并伴有白烟产生时,取下冷却,加入 0.5 mL 浓盐酸继续加热 10 min,取下冷却后定容至 10 mL。

空白样品:以 200 μL 超纯水代替样品,其他操作与样品处理方法相同。

与测定标准系列溶液相同的条件下,分别测定空白、样品溶液的荧光强度,与标准系列比较定量。计算方法如式(1)所示:

$$\rho = \frac{(\rho_1 - \rho_0)V_0}{V} \quad (1)$$

式中, ρ 为样品中硒的质量浓度,μg/L; ρ_1 和 ρ_0 分别为校准曲线计算出的试样和空白试样中硒的质量浓度,μg/L; V_0 为样品的定容体积,mL; V 为样品的取样体积,mL。

1.2.3 消解效率评价方法

以市售质控样品为实验材料,采用控制变量法优化样品前处理条件,以质控样品标准值为参考,分别计算各个不同条件下样品的消解效率,具体计算方法如公式(2)所示,以消解效率评价优化前处理条件。

$$E/\% = \frac{\rho - \rho_z}{\rho_z} \times 100\% \quad (2)$$

式中, E 为样品的消解效率, %; ρ 为测定样品中硒的质量浓度, $\mu\text{g/L}$; ρ_z 为质控样品中硒的浓度值[本实验所用质控样品的硒质量浓度为 $(161 \pm 32) \mu\text{g/L}$, 消解效率计算中取 $161 \mu\text{g/L}$ 作为 ρ_z 。

1.2.4 数据分析方法

数据以 Excel 统计, 以 Origin 8.6 作图。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线配制改进

比较标准曲线与工作曲线对样品测定影响, 分取不同体积的硒标准溶液, 按照实验方法进行消解, 定容至 10 mL 后上机测定绘制工作曲线, 标准曲线按照实验方法进行配制, 结果如表 1 所示。两条曲线的相关系数均在 0.995 以上, 对于同一质控样品的测定结果一致。以标准曲线测定浓度 $5 \mu\text{g/L}$ 为工作曲线点, 结果为 $(4.97 \pm 0.08) \mu\text{g/L}$, 进一步说明了标准曲线对于工作曲线的可取代性, 建议直接以 $\text{HCl}(5\%)$ 将有证硒标准物质稀释后配制标准曲线, 操作简单且检测效率高。

表 1 不同曲线参数及样品测定结果

Table 1 Different curve parameters and sample measurement results

曲线类型	曲线方程	相关系数	样品浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
标准曲线	$y = 41.219x + 0.7676$	0.999 2	146.817
工作曲线	$y = 48.621x - 7.8595$	0.998 5	144.267

2.2 样品预处理方法的选择

2.2.1 消解温度的确定

取 $200 \mu\text{L}$ 全血质控样品, 加入 1 mL 混酸后, 分别置于 (120 ± 10) 、 (150 ± 10) 和 $(180 \pm 10) ^\circ\text{C}$ 条件下进行消化。结果统计如表 2 所示。由表 2 可知, 随温度上升, 消解液颜色变浅, 消解效率升高, 但在 $(180 \pm 10) ^\circ\text{C}$ 消解 30 min 后, 由于温度较高, 消解速率快, 消解液挥发至近干, 此过程中部分硒因温度过高挥发损失, 导致消解效率下降, 这点与 WS/T 109—1999 中的说明相一致。所以实验采用 $(150 \pm 10) ^\circ\text{C}$ 作为后续样品消解温度。在样品前处理过程中需注意观察消解状态, 防止消解温度过高导致使消解效率下降。

表 2 不同温度下的消解情况

Table 2 Digestion at different temperatures

消解温度/ $^\circ\text{C}$	消解时间/min	消解液状态	浓度值/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	消解效率 $E/\%$
120 ± 10	30	溶液呈黄色, 基本澄清	2.459	76.37
150 ± 10	30	溶液呈淡黄色, 澄清	2.767	85.93
180 ± 10	30	溶液呈淡黄色, 澄清	2.387	74.13

2.2.2 混酸添加量的确定

取 5 组血液样品, 分别加 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 混酸, 其余操作按照实验方法进行, 其消解效率变化如图 1 所示。混酸添加量 0.5 mL 时消解液最终呈黄色, 消解不完全, 消解效率仅为 32.28%, 混酸添加量 1~2 mL 时, 均在 80% 以上, 而混酸添加量为 2.5 mL 时, 消解率有明显下降。混酸添加量大于 1.5 mL 时, 消解 30 min 后消解液面未出现白烟, 故延长了消解时间。可能由于消解时间过长导致样品中硒大部分转变为六价硒, 后续与盐酸反应不充分导致消解效率的下降。混酸添加量为 1 mL 时, 平均消解率达到最大值 89.61%。在确定样品预处理方法时, 尽量减少试剂用量以减少污染, 所以本实验采取混酸添加量为 1 mL。

2.2.3 消解时间的确定

样品在 $(150 \pm 10) ^\circ\text{C}$ 分别消解 15、20、25、30、35 min 后取下, 其余操作按实验方法进行。消解率变化如图 2 所示。消解 15 min 时溶液呈黄色, 基本澄清, 但消解效率仅为 67.32%, 随时间延长, 消解

效率先上升后趋于平缓, 在 30 min 时达到最大值 97.26%, 继续延长时间致使消解液近干, 硒含量损失, 消解效率下降, 所以选取 30 min 作为消解时间。同时因电热板控温情况不同应及时观察消解液状态, 防止消解时间过长导致消解效率下降。

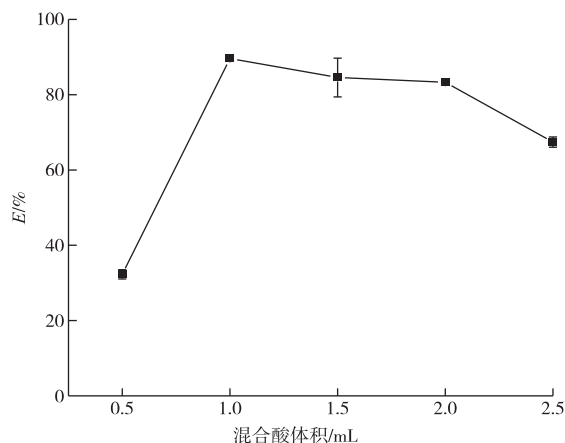


图 1 混合酸添加量对消解效率的影响

Figure 1 The effect of the amount of mixed acid added on the digestion efficiency.

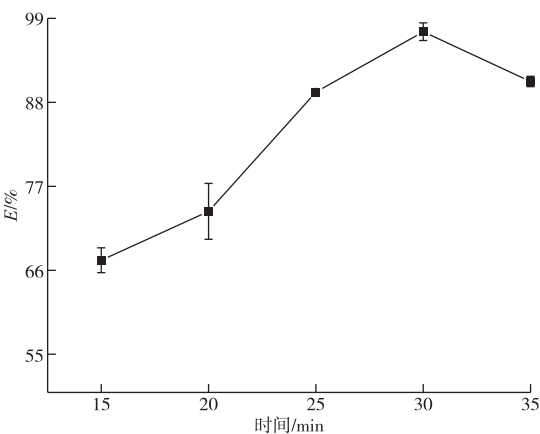


图 2 消解时间对消解效率的影响
Figure 2 The effect of digestion time on digestion efficiency.

2.3 线性范围与检出限

配制 0、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{g/L}$ 共计 7 个浓度点,进行血中硒含量标准曲线的测定,其线性范围为 0~10 $\mu\text{g/L}$,相关系数为 0.999 2,根据 GBZ/T 210.5—2008《职业卫生标准制定指南第 5 部分生物

材料中化学物质测定方法》中标准差法进行最低检出浓度实验。按上述优化后的方法连续测定 10 次空白溶液,由测定值计算浓度平均值和标准差,以 3 倍标准差计算最低检出浓度为 0.143 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4 方法准确度与精密度实验

配制 50、150、250 $\mu\text{g/L}$ 剂量水平的加标样品,按照实验方法进行处理,同批测定样品浓度后计算精密度和加标回收率。结果显示,样品的平均加标回收率为 90.9%~105%,精密度的 1.5%~1.6%,方法的精密度和准确度均满足生物材料中化学物质测定方法要求,见表 3。

2.5 质控样品测定

以 Sero 全血质控为样品,经上述方法检测,结果为 $(147.367 \pm 7.415) \mu\text{g/L}$,符合质控标准证书要求的 $(161 \pm 32) \mu\text{g/L}$ 。根据质控标准证书中其他金属元素含量,推测样品中较高含量金属元素 Pb $(337 \pm 68) \mu\text{g/L}$ 、Zn $(7.1 \pm 1.4) \text{mg/L}$ 、Cu $(1.34 \pm 0.27) \text{mg/L}$,对血中硒含量检测基本无影响。

表 3 准确度与精密度测试结果
Table 3 Accuracy and precision measurement results

样品本底值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	加标量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	测定浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	平均加标回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
156.583	50.00	206.608 ± 3.268	100 ± 6.5	1.6
156.583	150.00	313.533 ± 2.964	105 ± 2.0	1.6
146.817	250.00	373.958 ± 5.659	90.9 ± 2.3	1.5

3 结论

建立了全血中硒含量测定的湿法消解-原子荧光光谱分析方法,测定全血中硒线性情况良好,相对标准偏差和平均加标回收率均符合职业卫生标准生物材料中化学物质测定方法的相关要求,具有灵敏度高,精密度和稳定性好等特点。方法前处理操作简单,样品用量和消解用酸量均较少,微波消解法取样量一般为 1 mL,而本实验取样量仅为 200 μL ,在很大程度上节省了实验样品和资源,也为环境和医学相关研究中的小样品分析提供了可能性。

参考文献

[1] ZHANG Y, GLADYSHEV V N. Comparative genomics of trace elements; emerging dynamic view of trace element utilization and function[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(10): 4828-4861.
[2] RAYMAN M P. The argument for increasing selenium intake[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2002,

61(2): 203-215.
[3] 王宇璇,孟淑娟,王雅栋,等. 人体内硒检测与富硒食品开发的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022(4): 428-437.
WANG Yuxuan, MENG Shujuan, WANG Yadong, et al. Research progress of selenium detection in human body and development of selenium-rich food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022(4): 428-437.
[4] ZHONG Q, LIN R, NONG Q. Adiposity and serum selenium in U. S. adults[J]. Nutrients, 2018, 10(6): 727.
[5] 李小勇,杨树泉,崩磊. 血清硒水平评估颅脑损伤患者病情和预后的研究[J]. 山西医药杂志, 2020, 49(23): 3256-3257.
LI Xiaoyong, YANG Shuquan, BENG Lei. Study on serum selenium level in evaluating the condition and prognosis of patients with head injury [J]. Shanxi Medical Journal, 2020, 49(23): 3256-3257.
[6] BEATA J, MALGORZATA T, RENATA B. Selenium determination in plasma/serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): Comparison

- with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS)[J]. *Medycyna Pracy*, 2011, 62(5): 489-98.
- [7] 陈晓霞, 赵叶. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定血清中硒含量研究[J]. *中国测试*. 2016, 42(7): 43-46.
CHEN Xiaoxia, ZHAO Ye. Determination of selenium in serum by HG-AFS[J]. *China Measurement & Test*, 2016, 42(7): 43-46.
- [8] VACCHINA V, DUMONT J. Total selenium quantification in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1661: 145-152.
- [9] 钟雪雯, 杨曦, 刘方, 等. 石墨消解-原子荧光光谱法测定土壤中的总硒[J]. *中国无机分析化学*, 2021, 11(3): 42-46.
ZHONG Xuewen, YANG Xi, LIU Fang, et al. Determination of total selenium in soil by graphite digestion-atomic fluorescence spectrometry[J]. *Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry*, 2021, 11(3): 42-46.
- [10] 李鸿, 蒋越华, 秦玉燕, 等. 原子荧光光谱(AFS)和石墨炉原子吸收光谱(GFAAS)法测定富硒粮食中硒含量[J]. *中国无机分析化学*, 2021, 11(3): 89-93.
LI Hong, JIANG Yuehua, QIN Yuyan, et al. Determination of selenium content in selenium-rich grains by atomic fluorescence spectroscopy (AFS) and graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS)[J]. *Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry*, 2021, 11(3): 89-93.
- [11] 陈殿耿, 袁玉霞, 王皓莹. 氢化物发生-原子荧光光谱法(HG-AFS)测定特硬铅合金中硒和碲[J]. *中国无机分析化学*. 2012, 2(2): 38-40.
CHEN Diangen, YUAN Yuxia, WANG Haoying. Determination of selenium and tellurium in extra-hard lead alloy by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) [J]. *Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry*, 2012, 2(2): 38-40.
- [12] MICHALKE B, GRILL P, BERTHELE A. A method for low volume and low Se concentration samples and application to paired cerebrospinal fluid and serum samples[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2009, 23(4).
- [13] ZHAO Q, CHEN Y, BELZILE N, et al. Low volume microwave digestion and direct determination of selenium in biological samples by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 665(2): 123-128.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 血清中硒的氢化物发生-原子吸收光谱法: WS/T 109—1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Hydride generation-atomic absorption spectrometry of selenium in serum: WS/T 109—1999 [S]. Beijing: China Standard Press, 1999.