

2,3-二氨基萘荧光法测定人血中的硒

杨容甫 黄家琛 冯公侃 梅承恩

(肿瘤研究所)

2,3-二氨基萘荧光法是目前测定人血中微量硒的广泛使用和最灵敏的分析方法之一^[1~4]。样品预处理一般采用硝酸-高氯酸消化法,但高氯酸冒烟时,会不同程度地引起硒的损失^[1,2,5]。我们发现,如果控制高氯酸冒烟温度(约200~220℃),使白烟不逸出瓶口,这样既能消化好样品,又可避免硒的损失,回收率达98%以上。本文报道这方面的试验结果,并对人血中的硒分析方法作了一些改进。本法检出限为0.0012微克硒/毫升环己烷。

材料和方 法

仪器

日立MPF-4型荧光分光光度计, 1厘米石英荧光杯。

主要试剂

1. 硝酸 AR

2. 高氯酸 GR

3. 0.1%2,3-二氨基萘 0.1克2,3-二氨基萘溶解于70~80℃的0.1NHCl中,冷却后用数份10毫升环己烷萃取分离杂质,至有机层无色为止。分出有机层,将水相移入棕色玻璃瓶内,储于冰箱保存备用。

4. 硒标准溶液

(1) 储备溶液 I 准确称取25.00毫克元素硒(光谱纯)于50毫升烧杯中,用10毫升浓硝酸加热溶解后,蒸发至2毫升左右,加入2毫升高氯酸,将烧杯置沸水浴上蒸发,赶尽硝酸,冷却,用少量水稀释溶液,移入250毫升容量瓶中,稀释至标线,摇匀备用。此液每毫升含硒100微克。

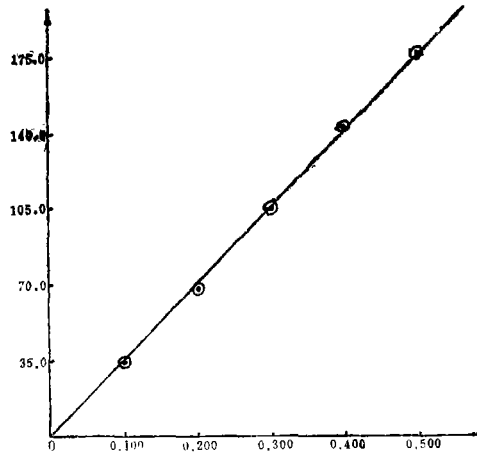
(2) 储备溶液 II 准确吸取上述储备溶液 I 1毫升于100毫升容量瓶中,用0.1NHCl稀释至标线,摇匀。此液1毫升含有1微克硒。

(3) 使用溶液 准确吸取上述储备溶液 II 10毫升于100毫升容量瓶中,用0.1NHCl稀释至标线,摇匀。此液1毫升含有0.100微克硒。

分析手续

1. 标准曲线的绘制 准确吸取硒标准使用溶液0.000, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500微克硒于125毫升锥形瓶中,加入2毫升高氯酸,用水稀释至10毫升左右,加入2毫升1%EDTA-二钠溶液,5滴0.1%麝香草酚兰乙醇溶液(指示剂),先用1:1氨水调至

溶液刚好变黄，再用1N HCl调至淡红（此时PH约等于1），加入2毫升10%盐酸羟胺，2毫升0.1%2,3-二氨基萘溶液，摇匀，盖上玻璃表面器，置于75℃水浴上，保温10分钟，取下冷却，移入60毫升分液漏斗内，准确加入10毫升环己烷，振摇萃取1分钟，待两相澄清后，放出水相，将有机相倾入预先盛有1克无水硫酸钠的10毫升具塞比色管中，加塞轻摇，使无水硫酸钠吸去残留于有机相中的水份。以环己烷作参比，在激发波长378nm，发射波长520nm处测出各标准溶液的荧光强度（毫米）。绘制浓度（微克硒）—荧光强度（毫米）曲线，见下图。



硒 的 标 准 曲 线

2. 血样（或试液）的预处理 准确吸取全血1.00毫升（或一定量的硒标准溶液，干扰试验物质溶液）于125毫升锥形瓶中，加入5~10毫升浓硝酸，盖上玻璃表面皿，于垫有石棉网的电炉上加热煮沸至溶液澄清，取下，准确加入2毫升高氯酸，继续加热消化，当高氯酸将要冒烟时，切断电源使高氯酸冒烟（约200~220℃）能缓慢进行，以白烟不逸出瓶口为准。冒烟持续10分钟后，取下冷却，用少量水洗涤表面皿及瓶壁，再加入1毫升浓硝酸，重新盖上表面皿，继续加热冒烟数分钟（白烟不逸出瓶口），此时样品溶液即澄清无色，表明已消化完全（否则可再加少量硝酸继续消化）。取下冷却，用少量水洗涤表面皿及瓶壁，并稀释至10毫升左右。

3. 血样（或试液）中硒的测定 按标准曲线的绘制手续进行，同时作一个试剂空白试验。

结 果 和 讨 论

1. 高氯酸冒烟硒的损失问题 当加热含硒试液，让高氯酸连续冒白烟5分钟，并让白烟逸出瓶口，硒的损失可达10~15%，10分钟可达20~25%甚至30%。如果控制高氯酸冒烟温度（约200~220℃），并防止白烟逸出瓶口，硒的损失则甚微，结果见表1。

表1 高氯酸冒烟硒的损失情况

加入硒 (微克)	测出硒(微克)			收 回 率 (%)
	高氯酸冒烟逸出瓶口		高 氯 酸 冒 烟 不 逸 出 瓶 口	
	5 分 钟	10 分 钟		
0.200	0.180			90.0
0.200	0.170			85.0
0.200		0.162		81.0
0.200		0.151		75.5
0.200		0.137		68.5
0.200			0.196	98.0
0.200			0.204	102

2. 关于六价硒还原为四价硒的试验: 硝酸—高氯酸消化样品后, 需将六价硒还原成四价, 它才与2,3-二氨基萘生成络合物而被环己烷所萃取。六价硒的还原一般采用盐酸还原法, 为避免在煮沸的高酸度盐酸介质中可能引起硒的挥发损失(因四价硒可成 $\text{SeO}_2 \cdot \text{HCl}$ 而挥发), 本法在0.1NHCl溶液中, 加入2毫升10%盐酸羟胺, 于75℃保温10分钟, 即可将六价硒还原成四价, 回收率达99%(平均), 结果见表2。

3. 做了9例全血样品分析, 结果见表2。从分析结果可知, 重现性及回收率尚好, 因此, 本法用于人血中硒的测定是可行的。

表2 人全血样品分析结果

样品名称	吸取样品 分析体积 (毫升)	加入硒 (微克)	测出硒 (微克)	回收率 (%)	样品含硒量 (微克/100毫升)
人全血A	1.00	0.200	0.334	97.5	
人全血A	1.00	0.200	0.340	101	
人全血A	1.00	0.000	0.138		13.8
人全血A	1.00	0.000	0.140		14.0
人全血B	1.00	0.184			18.4
人全血C	1.00		0.143		14.3
人全血D	1.00		0.170		17.0
人全血E	1.00		0.117		11.7
人全血F	1.00		0.107		1.07

参 考 文 献

- [1] Watkinson J H : Fluorimetric determination of Selenium in biological material with 2,3-diamino-naphthalene, *Anal Chem* 38 : 92, 1966
- [2] Cukor P et al : The application of isotopic dilution analysis to the fluorimetric determination of selenium in plant material. *Anal Chem Acta* 30 : 473, 1964
- [3] Parker C A & Harvey L G : Luminescence of some selenols-A new fluorimetric reagent for selenium. *Analyst* 87 : 558, 1962
- [4] Allaway W H & Cary E E : Determination of submicrogram amounts of selenium in biological material. *Anal Chem* 36 : 1359, 1964
- [5] Hall R J & Gupta P L : The determination of very small amounts of selenium in plant samples. *Anal Chem* 94 : 292, 1969
- [6] Назаренко И И и Кислюва И В : Определение разных форм Селена в Вод-ах. *Изв АН УССР Химия* 33 : 1857, 1978
- [7] Clarke W E : Fluorimetric determination of Selenium in cast iron With naphthalene 2,3-diamine. *Analyst* 95 : 65, 1970

Fluorometric Determination of Selenium in Human Blood with 2,3-Diaminophthalene

Yang Rongpu Huang Jiachen Feng Gongkan Mei Zhengen

(Cancer Institute, Zhongshan Medical College)

Abstract

The determination of micro-amounts of selenium in human blood samples with 2,3-diaminophthalene has been developed. Losses of selenium in digested the samples are prevented by controlling fume temperature of perchloric acid at 200~220°C and not allowing white fume in heating to run away from beaker flask.

Detection limit of this method 0.0012ug selenium per millilitre cyclohexane. The apparent recovery of selenium (0.2ug) added to the samples is 97.5~101%.