

Kapilláris gázkromatográfiás módszer biológiai anyagok szeléntartalmának 4,6-dibróm-piazzselenol formában történő meghatározására

NAGY ISTVÁN – DUDÁS TIBOR

Agrártudományi Egyetem (Keszthely) Állattenyésztési Kar, Kaposvár

Érkezett: 1987. március 25.

A szelén az állatok számára essenciális mikroelem. Korábban főként toxikus hatásai alapján ítélték meg, de ismeretes, hogy hiánya is számos rendellenesség okozója lehet. Schroeder (1) szerint a szelén felesleges teratogén, hepatotoxikus és neurotoxikus hatású, hiánya viszont visszaesést okozhat a növekedésben és a tömeggyarapodásban, izomelfajulást, magzatelhalást eredményezhet (2).

Egyes hatásaiban a szelén biokémiai szerepe az E-vitaminéval rokon (3), miáltal elősegíti a növekedést és fokozza a termékenységét. A szelén fontos sajátosága továbbá, hogy képes csökkenteni számos nehézfém toxikus hatását (2).

Biológiai eredetű minták szeléntartalmának meghatározására a gyakorlatban fluorimetriás (4, 5), atomabszorpciós (6, 7) és gázkromatográfiás (8, 9) módszerek terjedtek el. A közölt eredményeket, a módszerek eszközigényét és teljesítőképességét értékelve a gázkromatográfiás meghatározási lehetőségeket ítéltük a legkedvezőbbeknek.

Az állatok megfelelő szelénellátottságának jelentőségét az állattenyésztők is egyre inkább felismerik és egyre fokozódó igény jelentkezik részükről takarmányok és állati szervek szeléntartalmának ismerete és meghatározása iránt. A cél a megfelelő takarmányozás biztosítása.

Ezért dolgoztunk ki laboratóriumunkban olyan kapilláris gázkromatográfiás szelénmeghatározási eljárást, amely egyrészt megfelelően érzékeny és pontos, másrészt kis eszköz- és időigényével rutinjellegű mérések végzésére is alkalmas.

Anyagok és eszközök

A felhasznált anyagok:

- kristályos magnézium-nitrát ($MgNO_3 \cdot 6H_2O$) a.l.t., Reanal
- 65%-os salétromsav-oldat, RPE, Carlo Erba
- 37%-is sósavoldat, a. l.t., Reanal
- toluol, a.l.t., Reanal. A toluolt tisztítás céljából granulált aktív szénről desztilláltuk.
- standard szelén törzsoldat: 1,095 g nátrium-szelenitből (a.l.t., Reanal) 500 cm^3 oldatot készítettünk bidesztillált vízzel. Ez az oldat $1,00\text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ koncentrációjú szelénre nézve.
- standard szelén munkaooldat: a fenti törzsoldatból bidesztillált vízzel történő hígítással $1000\text{ pg} \cdot \text{mm}^{-3}$ koncentrációjú oldatot készítettünk.
- reagensoldat: 4,6-dibróm-orto-feniléndiamin-hidroklorid telített oldata $1\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sósavoldatban.

A reagens kereskedelmi forgalomban nem kapható, előállítására és a reagensoldat készítésére Shimoishi (8) és Dandegaonker (10) közleményeinek felhasználásával történt a következőkben leírtak szerint:

- a) 4,6-dibróm-2-nitro-anilin előállítása: 130 g brómot 100 cm³ jégcetben feloldottuk, csepegtető tölcserbe töltöttük. 46 g 2-nitro-anilint 200 cm³ jégcetben feloldottunk, csiszolatos gömblobbikba töltöttük és spirálhűtőt szereltünk rá. A brómdatot a hűtőn keresztül az elegybe csepegtettük, állandó keverés mellett. A csepegtetés befejezése után a lombikot egy éjszakán át állni hagytuk. A kivált csapadékot leszűrtük, a szűrlethez 500 cm³ vizet töltöttünk és az újonnan kivált csapadékot is leszűrtük. A csapadékokat egyesítettük, etanol-víz elegyből átkristályosítottuk. A termék 4,6-dibróm-2-nitro-anilin, olvadáspontja 127 °C, az irodalommal egyezően (10).
- b) 3,5-dibróm-orto-feniléndiamin-hidroklorid előállítása: 500 cm³-es főzőpohárba 100 cm³ vizet, 200 cm³ etanolt és 50 cm³ koncentrált sósavoldatot töltöttünk és 2 g 4,6-dibróm-2-nitro-anilint mértünk bele, majd vízfürdő felett 60–70 °C között kis részletekben vasport adtunk hozzá. A kiindulási anyag teljes feloldódása és sárga színének eltűnése után a vapor adagolását befejeztük. Az oldatot kb. 100 cm³-re bepároltuk és állni hagytuk. A kivált kristályokat üvegszűrőn leszűrtük és 1 mól·dm⁻³-es sósavoldatból átkristályosítottuk. A termék 3,5-dibróm-orto-feniléndiamin-hidroklorid (a továbbiakban DBPD·HCl).
- c) Reagensoldat: 50 cm³ 1 mól·dm⁻³ töménységű sósavoldatban 0,1 g DBPD·HCl-t mértünk, majd kevergetve enyhén megmelegítettük. Egy napi állás után a fel nem oldódott reagenst kiszűrtük, a telített szűrletet 3×25 cm³ toluollal extrahálva tisztítottuk. Az így elkészített reagensoldat hűtve legalább 1 hónapig eltartható.
- Kristályos 4,6-dibróm-piazszenol: 0,76 g nátrium-szenenitet oldottunk fel 32 cm³ 0,1 mól·dm³ töménységű sósavoldatban, 80 °C-ra melegítettük. 0,6 g DBPD·HCl-t oldottunk fel 92 cm³ 0,1 mól·dm⁻³ sósavoldatban, ezt is felmelegítettük és a két oldatot összeöntöttük. Teljes lehűtés után a kívánt kristályokat üvegszűrőn leszűrtük, toluol-etanol elegyből átkristályosítottuk. A termék sárga tükrisztályos 4,6-dibróm-piazszenol (a továbbiakban: DBPS), olvadáspontja 219–220 °C. (Irodalmi érték: 217–218 °C (8).)
 - Standard DBPS munkaoldat: 10,79 mg DBPS-t oldottunk fel 25 cm³ toluolban. Ezen oldat szelénre nézve 0,1 mg·cm⁻³-es koncentrációjú.
 - Kalibráló DBPS oldatok: a fenti oldatból toluolos hígítással készültek, a szelénre nézve 0–500 pg·mm⁻³-es koncentráció tartományban.

A felhasznált eszközök:

Packard Model 419 gázkromatográf
 Model 714 EC detektorral és Model 736 ECD lineariszerrel
 Chromatopac C–R 3 A integrátor
 MTA KUTESZ TÍP. 615 kémcsőtermosztát
 OMSZÖV OH 63 tokos kemence
 PIERCE gyártmányú teflon-szilikon gumi betétes csavaros kupakos fiolák
 Továbbá a szokásos laboratóriumi eszközök és anyagok.

M ó d s z e r e k

Roncsolás és törzsoldatkészítés

A szerves mátrix elroncsolásánál McCarthy és munkatársai (6) módszerét alapul véve jártunk el.

1 g eredeti nedvességtartalmú biológiai eredetű mintát (takarmányok, illetve állati szervek) mértünk 100 cm³-es főzőpohárba. 10 cm³ koncentrált salétromsavat és 4 g magnézium-nitrátot adtunk hozzá, elkevertük és egy éjszakán át állni hagytuk. Másnap a poharat homokfürdőre állítottuk és 100 – 120 °C hőmérsékleten időnként megkeverve melegítettük, Amikor az anyag szirupsűrűségű lett, újabb 5 cm³ salétromsavat adtunk hozzá. A melegítést 150 – 160 °C-on folytattuk. A kissé felhabozó anyagot megdermedése után hideg izzítókemencébe helyeztük. A kemence hőmérsékletét 30 perc alatt 500 °C-ra emeltük és 30 percig ott tartottuk.

A roncsolási maradékot kihűlés után 10 cm³ 6 mól·dm⁻³-es sósavoldatban feloldottuk, 100 °C-on 30 percig melegítettük az esetlegesen jelenlevő szelén (VI) szelén(IV)-é történő redukálása céljából.

Ezután az oldathoz 3 cm³ 7,5 mól·dm⁻³-es nátrium-hidroxid oldatot adtunk, majd mérőlombikban bidesztillált vízzel 25 cm³-re töltöttük.

Az oldat minden további tisztító lépés nélkül felhasználható a szelén meghatározására.

DBPS-származékképzés

A fenti oldatból 2,00 cm³-t mértünk reagensfiolába, 0,500 cm³ DBPD·HCl reagensoldatot adtunk hozzá. A lezárt fiolát 20 percig melegítettük 75 °C-on. Lehűlés után a képződött DBPS-t 0,500 cm³ touollal extraháltuk. Az extraktumból közvetlenül injektáltunk a gázkromatográfba.

Gázkromatográfiai elemzési körülmények

Kolonna és megosztófázis: 30 m×0,75 mm-es „Wide bore” kapilláris, SPB – 35 megosztófázissal nedvesítve (SUPELCO)

Vívógáz: nitrogén, 20 cm³·perc⁻¹

Segédgáz a detektornál: nitrogén, 40 cm³·perc⁻¹

Hőmérsékletek: detektor: 270 °C, injektor: 230 °C, kolonnatér: 200 °C

Injektált térfogat: 2 mm³, de a kolonna viszonylag nagy kapacitását kihasználva akár 5 mm³ is injektálható a készülékbe.

Injektálás: splitter nélkül, közvetlenül a kolonnába.

Eredmények és értékelés

A kalibráló oldatokkal megvizsgáltuk a gázkromatográfiai mérés paramétereit és a következőket állapítottuk meg:

1. A DBPS csúcsa az ismertett körülmények között 7,9 perc retenciós idővel jelenik meg.
2. A legkisebb detektálható mennyiség 0,5 pg szelén, ami a bemérési és hígítás viszonyaink mellett 0,003 mg szelén/kg minta érzékenységnek felel meg.
3. A csúcsterület-koncentráció összefüggés 5 – 500 pg·mm⁻³ tartományban lineáris.
4. A meghatározás relatív hibája 1 – 5 pg·mm⁻³ szelén koncentráció értékek között 2%, míg 5 – 500 pg·mm⁻³ szelén koncentráció tartományban 1% alatti érték.

A szelénviszanyerést és a módszer alkalmazhatóságát kukorica, keverékta-karmány, sertésvese, -máj és -húsmintáknál vizsgáltuk meg, standard adációs módszerrel.

Vizsgáltuk továbbá néhány, a takarmányokban jellemzően jelenlevő fémion és a foszfátion hatását a szelén meghatározásának eredményére. A vizsgált intenzív

süldőtáp (keveréktakarmány) összetételét az 1. táblázatban, a tanulmányozott egyéb ionok szelenithez viszonyított arányát a 2. táblázatban adjuk meg. Két jellemző kromatogramot az 1. és a 2. ábrán mutatunk be.

1. táblázat

A módszer ellenőrzésére használt „Intenzív süldőtáp” megnevezésű keveréktakarmánynak a gyártó által megadott összetétele

Komponens	Arány, %
Kukorica	40
Búza	20
Szója	12
Búzakorpa	3
Árpa	12
Borsó	6
Hallsiszt	2
Premix**	5

* Környei Mezőgazdasági Kombinát

** A premix megadott szeléntartalma 2,7 mg/kg

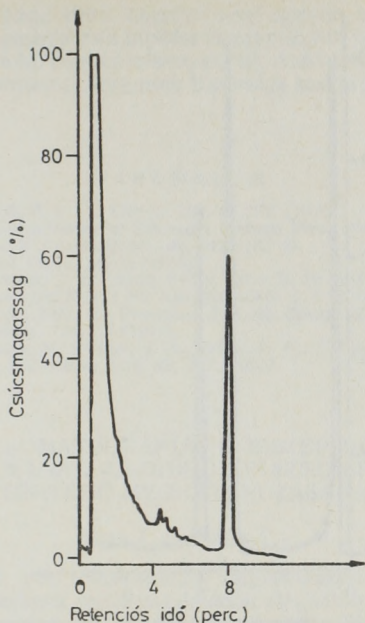
2. táblázat

Az idegen ionok minősége, a bemért forma, az ionok koncentrációja* és az [ion] [szelenit] koncentrációarány

Ion	Vegyület	Ionkoncentráció mól.dm ⁻³	[ion]/[SeO ₃ ²⁻]
Ca ²⁺	CaCO ₃	2,0 · 10 ⁻²	7,9 · 10 ⁴
Mg ²⁺	MgSO ₄	5,0 · 10 ⁻³	2 · 10 ⁴
K ⁺	KH ₂ PO ₄	1,28 · 10 ⁻³	5 · 10 ³
Mn ²⁺	MnCl ₂	3,64 · 10 ⁻³	1,4 · 10 ⁴
Zn ²⁺	ZnSO ₄	3,04 · 10 ⁻³	1,2 · 10 ³
Fe ³⁺	FeCl ₃	3,58 · 10 ⁻⁴	1,4 · 10 ³
Cu ²⁺	CuSO ₄	3,76 · 10 ⁻⁵	1,5 · 10 ³
PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄	1,28 · 10 ⁻³	5 · 10 ³
SeO ₃ ²⁻	Na ₂ SeO ₃	2,54 · 10 ⁻¹⁰	1

* A bemért ionkoncentrációk nagyságrendben megfelelnek a takarmányminták feldolgozásánál kapott roncsolási végoldatban kapható értékek maximumának.

A 2. ábra alapján megállapítható, hogy az alkalmazott pH-érték mellett a toluolos fázisban áttoldódó reagens a meghatározást nem zavarja. Megállapítható továbbá, hogy a McCarthy és munkatársai (9) által alkalmazott hidroxilamin + EDTA + karbamind hozzáadásra nincs szükség, mivel a kromatogramon a reagens csúcsa után nem jelenik meg olyan csúcs, amely zavarná és lassítaná a sorozatméréseket. A kísérleti eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze.



1. ábra. Kalibráló DBPS-oldat kromatogramja
 Injektált térfogat: 2 mm³, szelér.mennyiség: 40 pg ATTEN: 5

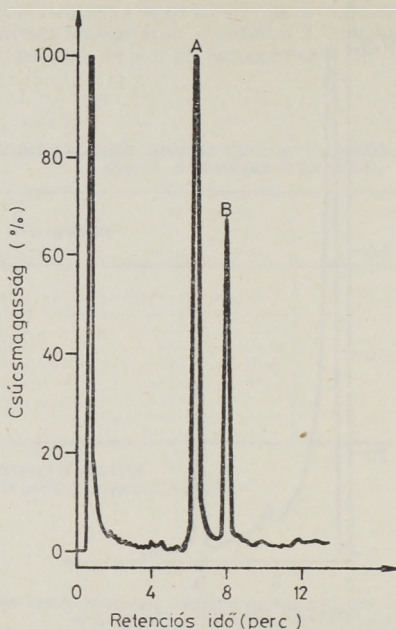
3. táblázat

A különböző vizsgálati mintákkal végzett szelénmeghatározási és visszanyerési kísérletek eredményei

Minta	A hozzáadott szelénstandard koncentrációja, mg/kg*	Kapott szeléntartalom** (x ±SD), mg/kg	Standard visszanyerés átlagosan %
Vakpróba	0	0,003 ±0,00015	—
Vakpróba	0,125	0,126 ±0,004	101
Vakpróba	0,312	0,322 ±0,011	103
Vakpróba	0,625	0,644 ±0,018	103
Idegen ionos modelloldat	0,312	0,313 ±0,010	100
Sertésvese	0	2,272 ±0,077	—
Sertésvese	1,25	3,452 ±0,014	94
Sertésmáj	0	0,599 ±0,016	—
Sertésmáj	0,625	1,190 ±0,041	101
Sertéshús	0	0,104 ±0,003	—
Sertéshús	0,625	0,734 ±0,023	101
Keveréktakarmány	0	0,149 ±0,009	—
Keveréktakarmány	0,625	0,729 ±0,023	91
Kukorica	0	0,027 ±0,002	—
Kukorica	0,312	0,330 ±0,016	97

* A mintára vonatkoztatva

** Minden esetben 5 párhuzamos meghatározást végeztünk



2. ábra. Sertésvese szelénmeghatározási kromatogramja
 Injektált térfogat: 2 mm³. szelénmennyiség: 727 qg ATTEN: 9
 A: a DBPD csúcsa B: a DBPD csúcsa B: a DBPS csúcsa

A 3. táblázat adataiból a következőket állapíthatjuk meg:

1. A standard visszanyerése gyakorlatilag 100%-os.
2. A módszer hibája 3% körüli variációs koefficienssel jellemezhető.
3. A vizsgált idegen ionok a meghatározást nem zavarják. (Az idegen ionok hatása azonban a touolos extraktum színén megfigyelhető. Standardok esetében az extraktum szintelen, egyéb ionokat is tartalmazó oldatoknál sárgás színű. A feltehetően fellépő mellékreakciók azonban nem befolyásolják a kapott eredményeket).

Összegzésképpen megállapíthatjuk, hogy az általunk kidolgozott meghatározási eljárás jól használható a legkülönbözőbb minták szeléntartalmának meghatározására.

Bár az alkalmazott DBPD·HCl reagens kereskedelemben nem kapható, egy munkamenetben nagy mennyiségben előállítható.

Az alkalmazott "wide bore" kapilláris kolonna szelektivitása és a roncsolási módszer együttesen biztosítja azt, hogy külön tisztító eljárásokra nincs szükség.

A kolonna nagy kapacitása lehetővé teszi nagyon kis szelénkoncentrációk meghatározását is (a bemérési és a hígítási viszonyok változtatásával elérhető akár a 10^{-4} – 10^{-5} mg szelén/kg minta érzékenység is). A módszer érzékenységének gyakorlati határát az alkalmazott reagensek tisztasága szabja meg.

I R O D A L O M

- (1) Schroeder, H. A., Frost, D. V.: J. Chrom. Dis. 23, 227 (1970).
- (2) Shamberger, R. J.: Biochemistry of Selenium Plenum Press. New York – London (1983)
- (3) Talmi, Y., Andren, A.W.: Anal. Chem. 46, 2122 (1974).
- (4) Watkinson, J. H.: Anal. Chem. 38, 91 (1966).
- (5) Brown, M. M., Watkinson, J. H.: Anal. Chim. Acta 89, 29 (1977).
- (6) Fernandez, F. J., Monning, D. C.: At. Abs. Newslett. 7, 5 (1968).
- (7) Piwonka, J., Kaiser, G., Tölg, G.: Fresenius Z. Anal. Chem. 321, 225 (1985).
- (8) Shimoishi, Y.: J. Chrom. 136, 85 (1977).
- (9) McCarthy, T. P., Brodie, B., Milner, J. A., Beville, R. F.: J. Chrom. 225, 9 (1981).
- (10) Dandegaonker, J.: J. Ind. Chem. Soc. 42, 777 (1965).

KAPILLÁRIS GÁZKROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER BIOLÓGIAI ANYAGOK SZELÉNTARTALMÁNAK 4,6-DIBRÓM-PIAZSELENOL FORMÁBAN TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSÁRA

Nagy I. és Dudás T.

Szerzők kapilláris gázkromatográfiai meghatározási eljárást dolgoztak ki különböző biológiai anyagok szeléntartalmának meghatározására. A szerves mátrix elroncsolását magnézium-nitrát – salétromsav keverékkel végezték. A roncsolmány sósavas feloldása, majd redukció után a szelén (IV)-ből 4,6-dibróm-piazselenol származékot képeztek. Az ehhez szükséges 3,5-dibróm-orto-fenilén-diamin reagenst maguk állították elő. A szelénszármazék meghatározását gázkromatográfian végezték, „wide bore” kapilláris kolonna alkalmazásával. A módszer érzékenysége 0,003 mg szelén/kg minta, variációs koefficiense 3% körüli érték. Az eljárás ellenőrzését standard addíciós módszerrel végezték el különböző állati szervek és takarmányok esetében.

DETERMINATION OF SELENIUM-CONTENT IN BIOLOGICAL MATTERS ON THE WAY OF 4,6-DIBROMO-PIAZSELENOL BY CAPILLARY GASCHROMATOGRAPHIC METHOD

Nagy, I. and Dudás, T.

The authors developed capillary gaschromatographic method for the determination of Selenium content in different biological matters. The organic substance were broken down by compound of magnesium-nitrate-nitric acid. They formed from the Selenium (IV) the derivative of 4,6-dibromo-piazselenol after the hydrochloric solving and reduction of the decomposed matter. The required 4,6-dibromo-ortho-phenylene-diamine reagent was produced by themselves. They made the determination of Selenium derivate by gaschromatography on wide bore capillary column. The sensitivity of the method is 0,003 mg Selenium/kg sample, coefficient of variation is about 3%. They performed the control of the method by standard additive method in case of different animal organs and feeds.

МЕТОД КАПИЛЛЯРНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕЛЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ В ФОРМЕ 4,6-ДИБРОМ-ПИАЗСЕЛЕНОЛА

И. Надь и Т. Дудаш

Авторы разработали метод капиллярной газовой хроматографии для определения содержания селена в различных биологических материалах. Минерализация органического матрикса проводилась с помощью смеси состоящей из нитрата магния и соляной кислоты. После растворения минерализата в соляной кислоте и после редукции, 4-х валентный селен превращали в производное: 4,6-дибром-пиазселенол. Необходимый для этого реактив 3,5-дибром-орто-фенилен-диамин, авторы синтезировали самостоятельно. Определение производного селена проводилось газохроматографически с применением капиллярной колонны «wide bore». Чувствительность метода равнялась 0,003 мг селена/кг пробы, величина вариационного коэффициента составляла около 3%-в. Проверку метода определения авторы проводили с помощью метода добавления стандартных растворов (метод аддиции) для случая испытания различных органов животных, а также для испытания фуража.

KAPILLARGASCHROMATOGRAPHISCHE METHODE FÜR DIE BESTIMMUNG DES SELENGEHALTES VON BIOLOGISCHEN MATERIALEN IN FORM VON 4,6-DIBROMPIAZSELENOL

Nagy, I. und Dudás, T.

Verfasser haben ein kapillarschromatographisches Verfahren für die Bestimmung des Selengehaltes von verschiedenen biologischen Materialien ausgearbeitet. Die Zerstörung des organischen Materials wurde mit einem Gemisch von Magnesiumnitrat und Salpetersäure durchgeführt. Nach der Auflösung des Rückstandes mit Salzsäure und der Reduktion wurde aus dem Selen (IV) eine 4,6-Dibrompiazselenol-Verbindung gebildet. Die dazu notwendige 3,5-Dibromortophenyldiamin-Reagenz haben die Verfasser selbst hergestellt. Die Selenverbindung wurde gaschromatographisch mit einer Kapillarkolonnen "wide bore" bestimmt. Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei 0,003 mg Se/kg Probe, wobei der Variationskoeffizient etwa 3% beträgt. Das Verfahren wurde mit der Standardadditionsmethode mit Hilfe von verschiedenen tierischen Organen und Futtermitteln überprüft.