

HPLC-ICPMS 测定粮谷中硒代半胱氨酸和 硒代蛋氨酸含量

ICPMS-177

摘要：参考《粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法》标准，建立了一种测定粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICPMS）。样品经过处理后，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 系列检测进行定量分析。结果表明硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸与其他硒代氨基酸及亚硒酸盐和硒酸盐分离度良好，线性范围在 0.1~10.0 ng/mL 范围内回归系数大于 0.9999，准确度 98.83~100.58%，保留时间重现性 RSD% 低于 0.57%，浓度重现性 RSD% 低于 2.56%，回收率 90.87%~99.40%，方法定量限分别为硒代半胱氨酸 2.3 μg/kg，硒代蛋氨酸 1.2 μg/kg，低于标准定量限要求，适用于粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的含量分析。

关键词：HPLC-ICPMS 硒代半胱氨酸 硒代蛋氨酸 粮食 谷物

硒是人体生命活动中必需的微量元素之一，近年来受到人们的广泛关注。它具有使人体抗衰老、预防癌变、保护与修复营养细胞、解毒排毒、提高免疫力等多种生理功能，被称为主宰生命的元素之一。硒对人体的重要性已十分明确，但权威资料表明硒的功能随其形态不同而异，只有有机形态的硒，如硒蛋白、硒代氨基酸、硒代多糖、硒多肽等，在有机体内才能转化为生理活性物质，被人体所吸收。

据调查，世界上有 40 多个国家和地区缺硒，我国也有 72% 的缺硒地区或低硒地区，其中 1/3 为严重缺硒地区，而缺硒是导致的克山病的重要因素。植物具有不同程度地吸收、利用和转化土壤环境中硒的能力，

是自然界硒生态循环中的重要环节。营养元素的形态分析越来越受到权威监管机构的重视。众所周知，微量元素的形态决定了其生理功能，因此单纯的总量分析已经无法满足分析需求。

参考《NY/T 3556-2020 粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱 - 电感耦合等离子质谱法》标准，建立了一种测定粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICPMS）。样品经过处理后，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 系列检测进行定量分析。

■ 实验部分

1.1 对照品

硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒 - 甲基硒代半胱氨酸、亚硒酸根、硒酸根（MUCKLIN）

1.2 样品

市售面粉

1.3 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 系列联用系统。具体配置为 LC-20Ai×2 输液泵，DGU-20A3 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，ICPMS-2030 系列电感耦合等离子体质谱仪，LabSolutions ICPMS Version 1.02 工作站；AY-120 电子天平（日本岛津公司）；Vortex-5 微型涡旋混合仪（中国其林贝尔公司）；Advantage A10 超纯水仪（瑞士 Milli-Q 公司）等。

1.4 试剂

甲醇购自德国 Merck 公司；实验用水由 Milli-Q 水净化系统经去离子与二次净化制得；蛋白酶购自 MUCKLIN；HCl、三羟甲基氨基甲烷、乙酸铵、四丁基氢氧化铵、乙酸及其他试剂均为分析纯购自国药集团

■ 方法

2.1 对照品溶液配制

流动相配制以“Se”含量计浓度分别为 0.10、0.50、1.0、2.0、5.0 及 10.0 ng/mL 的混合标准溶液。

2.2 Tris-HCl 缓冲液配制

称取 1.817 g 三羟甲基氨基甲烷溶于 450 mL 水中，用 HCl 调节 pH 至 7.5，加水稀释至 500 mL。

2.3 样品的处理方法

称取 1 g 面粉于 50 mL 离心管中，加入 10 mL Tris-HCl 缓冲液，室温下于超声水浴中超声 30 min。取出，加入 25 mg 蛋白酶，混匀，置于 (37±2) °C 恒温振荡器中（转速 300 r/min）震荡酶解 20 h，取出，于 5000 r/min 下离心 10 min。吸取 2 mL 上清液至 10 mL 容量瓶中，加流动相稀释至刻度，混匀，过 0.22 μm 进样分析。

2.4 色谱条件

色谱条件参见表 1

表 1 HPLC 分析条件

参数	参数设定
色谱柱	InertSustain C18 4.6×250 mm, 5μm
流动相	15 mmol/L 乙酸铵, 0.2mmol/L 四丁基氢氧化铵, 5% 甲醇, pH5.5
流速	1.2 mL/min
柱温	30°C
进样量	20 μL
洗针液	10% 甲醇水溶液
洗脱程序	等度洗脱

2.5 质谱条件

ICP-MS 仪器分析条件见表 2。

表 2 ICP-MS 分析条件

参数	参数设定	参数	参数设定
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	9.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

■ 结果与讨论

3.1 专属性考察

配制硒代半胱氨酸、硒-甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、亚硒酸根、硒酸根混合溶液，确认基线分离，实际样本中避免假阳性检出，见图 1。

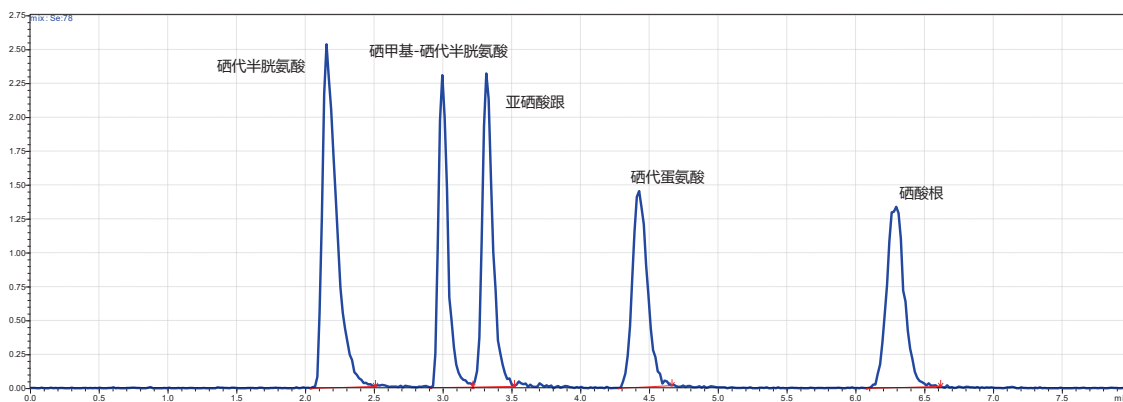


图 1 典型色谱图

3.2 线性关系考察

按“2.1 对照品溶液的配制”项下规定进行标准曲线系列浓度的配制，记录各成分的峰面积，以浓度（浓度均以 Se 计）与峰面积做线性回归绘制标准曲线，结果见图 2 和图 3 所示。

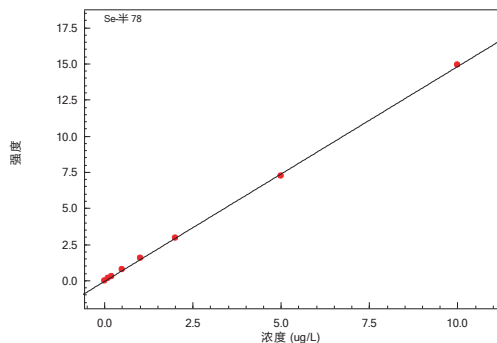


图 2 硒代半胱氨酸校准曲线 $r=0.9999$

$$\text{Conc.} = 0.6729 * I + 0.0052$$

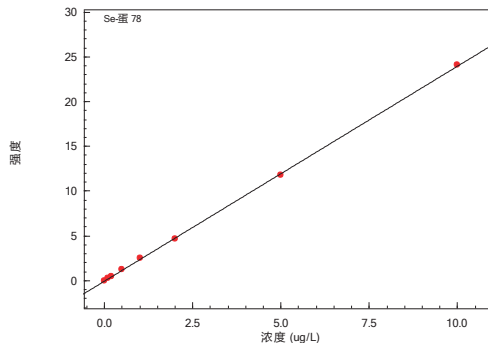


图 3 硒代蛋氨酸的校准曲线 $r=0.9999$

$$\text{Conc.} = 0.4166 * I - 0.0019$$

3.3 准确度考察

配制高中低三水平浓度，对方法学准确度进行考察，结果以 $\bar{X} \pm SD$ ，见表 3。

表 3 准确度结果 (n=6)

添加浓度 (ng/mL)	准确度 (%)	
	硒代半胱氨酸	硒代蛋氨酸
0.20	99.33 ± 0.004	99.08 ± 0.005
2.0	98.83 ± 0.048	100.58 ± 0.030
8.0	99.44 ± 0.034	99.98 ± 0.063

3.4 精密度考察

配制高中低三水平浓度，对方法学浓度和保留时间精密度进行考察，结果以 RSD% 表示，见表 4。

表 4 浓度及保留时间精密度结果 (n=6)

添加浓度 (ng/mL)	浓度 (%)		保留时间 (%)	
	硒代半胱氨酸	硒代蛋氨酸	硒代半胱氨酸	硒代蛋氨酸
0.20	2.15	2.56	0.47	0.20
2.0	2.48	1.49	0.33	0.19
8.0	0.43	0.78	0.57	0.25

3.5 检出限考察

对浓度为 0.10 ng/mL 对照品溶液考察硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的信噪比，折算信噪比 S/N=3 时仪器检出限以及 S/N=10 仪器定量限。

以如下既定公式进行计算：

$$\omega_{lod/loq} = \frac{C_{lod/loq} \times V}{m}$$

其中

- $\omega_{lod/loq}$ —— 方法检出限 / 方法定量限，单位为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；
- $C_{lod/loq}$ —— 仪器检出限 / 仪器定量限，单位为 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；
- V —— 样液最终定容体积，单位为 mL；
- m —— 试样溶液所代表试样的质量，单位为 g；

计算结果依标准保留 2 位有效数字。

结果见表 5：

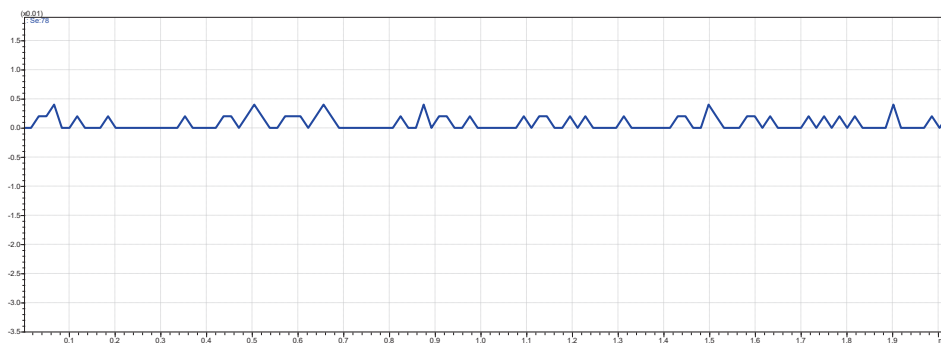


图 4 基线考察

表 5 方法检出限考察结果

名称	方法检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	方法定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
硒代半胱氨酸	0.68	2.3
硒代蛋氨酸	0.36	1.2

结果显示，本方法的检出限低于标准要求的 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3.6 实际样品分析

对市售面粉进行硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸检测，每份样品平行三次测试。

以如下既定公式进行计算：

$$\omega_i = \frac{(c_i - c_0) \times V}{m \times 1000}$$

其中

- ω_i —— 试样中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量，单位为 mg/kg；
- c_i —— 样液中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸浓度，单位为 $\mu\text{g/L}$ ；
- c_0 —— 空白试液中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸浓度，单位为 $\mu\text{g/L}$ ；
- V —— 样液最终定容体积，单位为 mL；
- m —— 试样溶液所代表试样的质量，单位为 g；

计算结果依标准保留 2 位有效数字。

待测物质浓度结果见表 7。

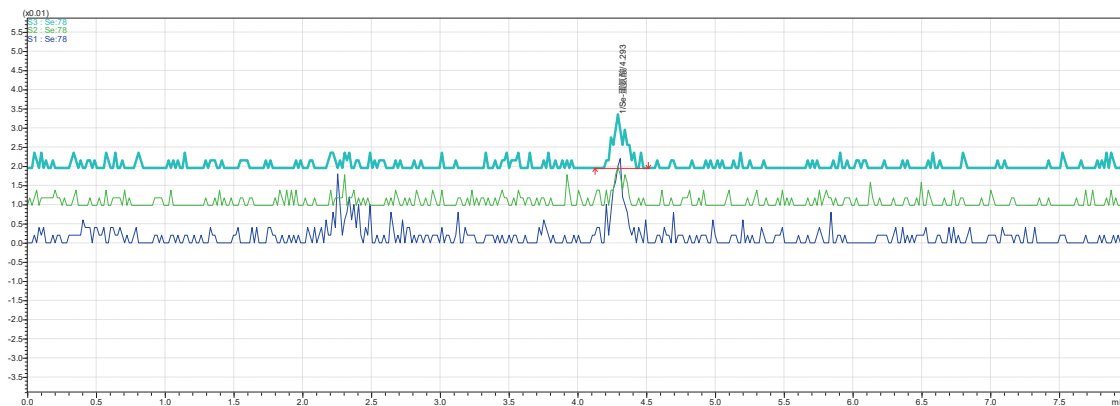


图 5 实际样品色谱图

表 7 面粉测试结果 ($\mu\text{g/kg}$)

样品名称	硒代半胱氨酸	硒代蛋氨酸
样品 1	N.D.	2.68
样品 2	N.D.	1.42
样品 3	N.D.	1.80

注：N.D. 表示未检出

3.7 回收率考察

对三份市售面粉，并对其进行 0.50 ng/mL 添加，按“2.3 样品的处理方法”进行处理后进 HPLC-ICPMS 分析，考察回收率。结果见表 6：

表 6 回收率考察结果

样品名称	回收率 (%)	
	硒代半胱氨酸	硒代蛋氨酸
样品 1	94.87	99.40
样品 2	90.87	98.67
样品 3	95.00	97.53

■ 结论

参考《NY/T 3556-2020 粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱 - 电感耦合等离子质谱法》标准，建立了一种测定粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的高效液相色谱电感耦合等离子质谱法（HPLC-ICPMS）。样品经过处理后，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸进行分离，电感耦合等离子质谱 ICPMS-2030 系列检测进行定量分析。结果表明硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸与其他硒代氨基酸及亚硒酸盐和硒酸盐分离度良好，线性范围在 0.1~10.0 ng/mL 范围内回归系数大于 0.9999，准确度 98.83~100.58%，保留时间重现性 RSD% 低于 0.57%，浓度重现性 RSD% 低于 2.56%，回收率 90.87%~99.40%，方法定量限分别为硒代半胱氨酸 2.3 μg/kg，硒代蛋氨酸 1.2 μg/kg，低于标准定量限要求，适用于粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的含量分析。

岛津应用云

