

HPLC-ICPMS 测定粮谷中硒代半胱氨酸和 硒代蛋氨酸 (SOP)

标准号：NY/T3556-2020

■ 参考标准

中华人民共和国国家农业行业标准《NY/T3556-2020 粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法》

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

《NY/T3556-2020 粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法》规定了粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱测定法的原理

2.2 方法使用范围

本标准方法适用于稻米、小麦、玉米、高粱、小米中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的测定。

2.3 方法技术指标

本标准中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的方法定量限均为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

■ 方法原理

试样中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸用蛋白酶水解提取，经反相离子对液相色谱分离，电感耦合等离子质谱仪测定，外标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备要求

4.1 仪器设备

电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 系列。

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W；

移液枪：10 mL，1 mL，200 μL ，20 μL 。

■ 标准品、试剂、耗材

硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸，美国 MUCKLIN；

蛋白酶（Protease XIV 型），美国 MUCKLIN；

盐酸、三羟甲基氨基甲烷、乙酸铵、四丁基氢氧化铵、乙酸，国药集团

甲醇，德国 Merk

离心管：50 mL；

无针注射器：5 mL

微孔过滤膜：0.22 μm ；

■ 操作步骤

6.1 Tris-HCl 缓冲液配制

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

6.2 流动相配制

称取 1.156 g 乙酸铵溶解于 900 mL 水中，加入 0.2 mL 1 mol/L 的四丁基氢氧化铵，用乙酸调节 pH 至 5.5，加入 50 mL 甲醇，加水稀释至 1000 mL，摇匀，于水浴中超声脱气 10 min，备用。

6.3 标准工作曲线制作

6.3.1 硒代半胱氨酸标准储备液

称取 21.2 mg 硒代半胱氨酸标准品，用水溶解并定容至 10 mL (1000 mg/L，按 Se 计)。0°C ~4°C 避光保存，有效期 3 个月。

6.3.2 硒代蛋氨酸标准储备液

称取 24.8 mg 硒代蛋氨酸标准品，用水溶解并定容至 10 mL (1000 mg/L，按 Se 计)。0°C ~4°C 避光保存，有效期 3 个月。

6.3.3 混合标准储备液

分别准确吸取 1.0 mL 硒代半胱氨酸标准储备液和硒代蛋氨酸标准储备液与 100 mL 容量瓶中，加水稀释并定容至刻度，配制成 10.0 mg/L 混合标准储备液。0°C ~4°C 避光保存，有效期 1 个月。

6.3.4 混合标准溶液

用流动相将混合标准储备液逐级稀释成浓度 0.10 µg/L、0.5 µg/L、1.0 µg/L、2.0 µg/L、5.0 µg/L 和 10.0 µg/L 的混合标准使用液，现用现配。

表 2 化合物标准溶液浓度

化合物	标准曲线浓度 (µg/L)						
	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
硒代半胱氨酸	0.00	0.10	0.50	1.0	2.0	5.0	10.0
硒代蛋氨酸	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0

6.2 仪器条件

等离子体参数：

高频功率：1.2 kW

辅助气流速：1.1 L/min

炬管类型：Mini

雾化室：旋流

采样深度：5.0 mm

碰撞池参数：

碰撞气种类：He

池电压：-21 V

液相色谱参数：

色谱柱：InertSustain C18 4.6×250 mm，5 µm

流速：1.2 mL/min

进样量：20 µL

洗针液：10% 甲醇水溶液

等离子体气流速：9.0 L/min

载气流速：0.7 L/min

雾化器类型：同心

雾室温度：5°C

高频频率：27.12 MHz

碰撞气流速：6.0 mL/min

能量过滤器电压：7.0 V

流动相：15 mmol/L 乙酸铵，0.2 mmol/L 四丁基氢氧化铵，5% 甲醇，pH5.5

柱温：30°C

6.3 样品前处理

称取试样 1 g (精确至 0.01 g) 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) 振荡酶解 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 微孔滤膜，待测。

6.4 测定

按照 6.2 的仪器分析条件，取试样溶液进行测定，根据标准溶液的色谱保留时间定性，从标准曲线得到的样品中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸浓度。试样中 2 种硒形态的响应值均应在标准曲线线性范围内；当试液超出线性范围时，应用流动相进行适当稀释后进样测定。

6.5 计算和报告

试样中各物质含量按照下式计算：

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

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 —— 样品溶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；
计算结果保留 2 位有效数字。

■ 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不得超过算数平均值的 20%。

岛津应用云

