

HPLC-ICP-MS 法测定茶叶中多种形态硒的含量

ICPMS-112

摘要：本文采用蛋白酶 K 提取茶叶中的硒化合物，建立了使用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 和电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 联用测定茶叶中形态硒含量的方法。该方法线性范围在 2.0~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内回归系数大于 0.9995，加标回收率在 88~113.3% 之间，重现性 <3.0%，方法定量限在 0.034-0.048 mg/kg 之间，适用于茶叶中的形态硒含量分析。

关键词：HPLC-ICP-MS 茶叶 形态硒

硒是人体必需的微量元素之一。自然界中的硒具有丰富、复杂的化学形态，整体上可分为无机硒和有机硒两大类，无机硒（硒酸根 [Se(VI)]、亚硒酸根 [Se(IV)]）具有很强的毒性，不能被人体利用；而有机硒（硒代蛋氨酸 (SeMet)、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、甲基-硒代 -L 半胱氨酸 (SeMC) 等）广泛存在于蛋白质中，参与酶的合成，保护细胞膜，所以有机硒具有保护心脏，抗衰老，预防癌变，细胞修复，提高免疫力等多种用途。

基于硒元素的重要功效，一些富硒食品也陆续被研发出来，用于补充人群对硒的摄入。在食品富硒的过程中通常人为地引入硒添加剂，而以无机形态存在的硒又是毒性较大的。因此，准确地定性和定量茶叶

中的无机硒，对食品安全有着重要的指导意义；另外，不同环境地区中，硒的存在含量及形态也有所差别。了解环境和样品中硒的具体形态，有助于准确评价生物活性、毒性、对环境的生态效应和物品产地等信息。

目前，在元素形态分析技术中，色谱与质谱的联用已成为主要趋势。本文根据在阴离子交换色谱体系中，不同形态硒的保留时间有所不同的机理，使用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 和电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 联用建立了分离并准确定量茶叶中多种形态硒的方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

亚硒酸根 [Se(IV)]、硒酸根 [Se(VI)]、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、硒代蛋氨酸 (SeMet) 和甲基 - 硒代半胱氨酸 (SeMC) 标准物质

1.2 样品

茶叶

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 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 电感耦合等离子体质谱仪，LabSolutions ICPMS TRM 工作站；AUW220D 电子天平（日本岛津公司）。

1.4 试剂

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 K（Merk 公司）；柠檬酸（天津大茂）。

■ 方法

2.1 标准溶液配制

以硒的单形态溶液标准物质为对照品，使用纯水配制浓度分别为 0.0、2.0、10.0、25.0、50.0 及 100.0 $\mu\text{g/L}$ 的亚硒酸根 [Se(IV)]、硒酸根 [Se(VI)]、硒代胱氨酸 (SeCys₂) 系列混合标准溶液。

2.2 样品的处理方法

准确称 0.2 g 茶叶样品置于 10 mL 离心管中，加入 1 mL 10 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液，加入超纯水定容至 10 mL，将离心管放置到超声仪中超声 1 h，取出离心管放置到离心机中，以 10000 r/min 的转速离心 15 min，取上清液经 0.22 μm 的滤膜过滤后上机测定。

2.3 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	Hamilton PRP-X100 (250*4.1mm; 10 μm)
流动相	流动相 A: 10 mM 柠檬酸溶液 (pH 5.5); 流动相 B: 超纯水
流 速	1.0 mL/min
柱 温	30°C
进样量	50 μL
洗脱程序	梯度洗脱 (梯度程序见表 2)

表 2 梯度洗脱条件

Time	Flow	A.Conc	B.Conc
0.0	1.0	14.0	86.0
6.5	1.0	14.0	86.0
7.0	1.0	80.0	20.0
13.5	1.0	80.0	20.0
14.0	1.0	14.0	86.0
16.0	1.0	14.0	86.0

2.4 质谱条件

ICP-MS 仪器分析条件见表 3

表 3 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	8.0 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

对空白和亚硒酸根 [Se(IV)]、硒酸根 [Se(VI)]、硒代胱氨酸 (SeCys₂)、硒代蛋氨酸 (SeMet) 和甲基-硒代半胱氨酸 (SeMC) 混合标准溶液及单形态标准溶液进样考察, 考察各个形态硒之间的分离度以及保留时间, 以确保实际样品分析过程中不会造成形态之间的干扰, 见图 1。

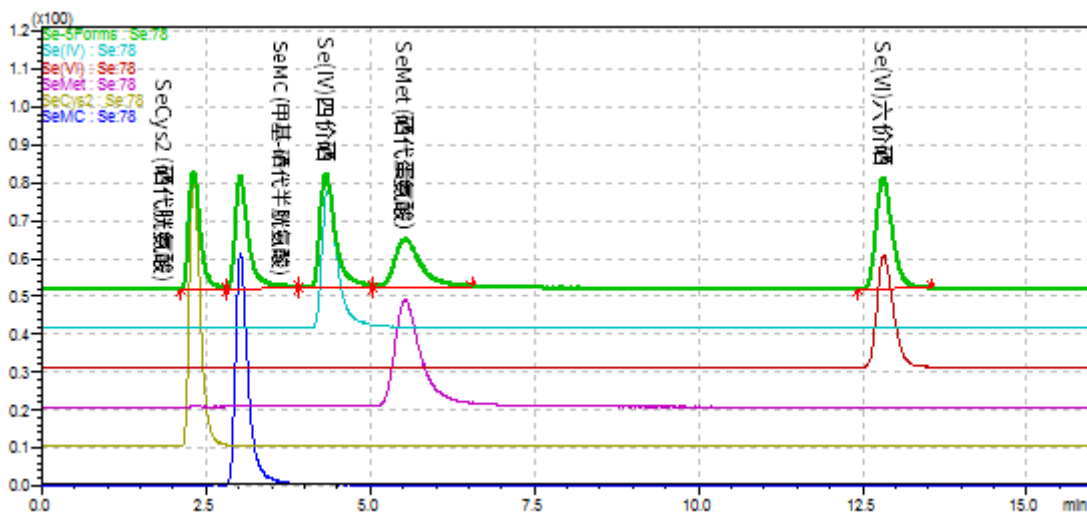


图 1 形态硒的色谱图

3.2 线性关系考察

按“2.1 标准溶液的配制”项下规定进行标准曲线系列浓度的配制, 测试各浓度点不同形态硒色谱峰的面积, 以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线, 结果见图 2 所示。

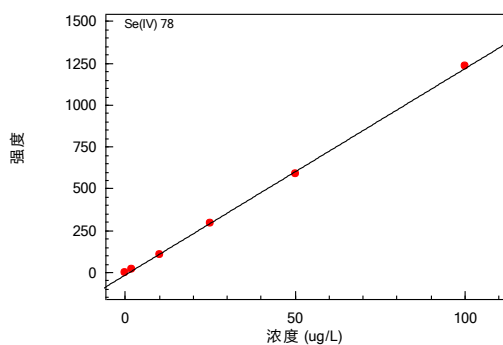


图 2 Se(IV) 校准曲线 $r=0.99976$

$$\text{Conc.} = 0.0810530 * I + 0.9324$$

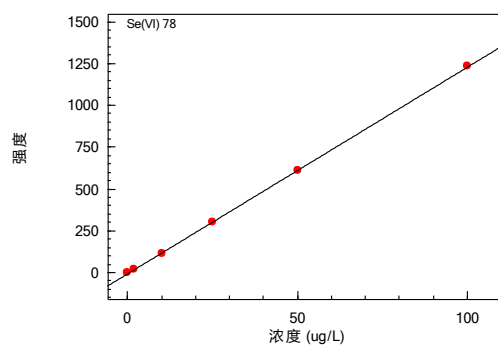


图 3 Se(VI) 校准曲线 $r=0.99998$

$$\text{Conc.} = 0.0809386 * I + 0.3755$$

3.3 检出限考察

在进样体积为 50 μL 时, 对浓度为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 样品溶液考察亚硒酸根 [Se(IV)]、硒酸根 [Se(VI)]、硒代胱氨酸 (SeCys₂) 的信噪比, 折算信噪比 $S/N=3$ 时为仪器检出限, 并依据样品前处理过程计算方法检出限, 结果如下:

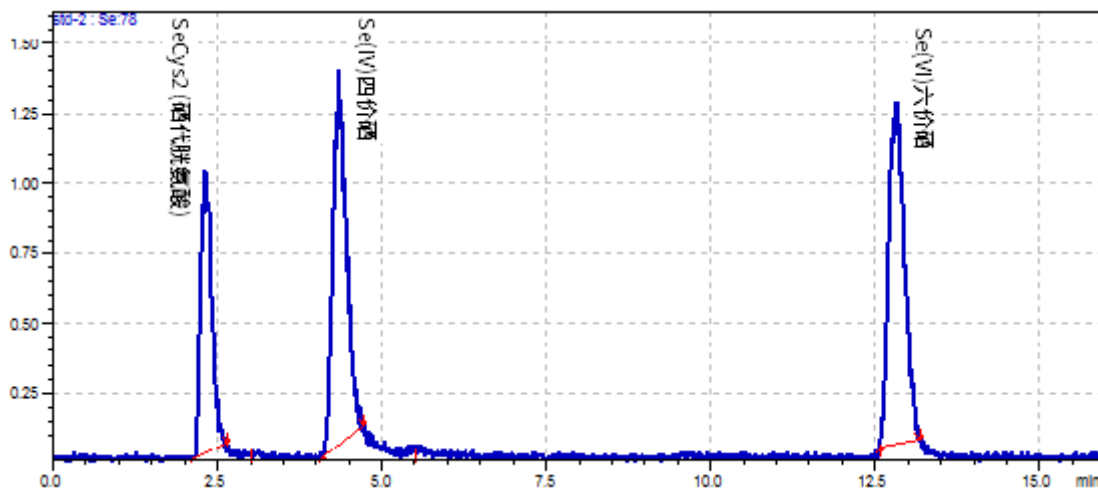


图 4 2.0 µg/L 形态硒标准溶液的色谱图

表 2 梯度洗脱条件

名称	仪器检出限 (µg/L)	方法检出限 (mg/kg)	定量下限 (mg/kg)
Se(IV)	0.21	0.011	0.034
Se(VI)	0.23	0.012	0.038
SeCys2	0.29	0.015	0.048

3.4 样品分析结果

使用 HPLC 分离亚硒酸根 [Se(IV)]、硒酸根 [Se(VI)]、硒代胱氨酸 (SeCys₂)，ICPMS-2030 测定了茶叶中的几种形态硒，并进行加标回收率实验。同一样品重复进样 3 针考察测量重复性。实验结果见表 5：

表 5 样品测定及回收率考察结果

名称	测定结果 (µg/L)	加标量 (µg/L)	加标后测定值 (µg/L)	加标回收率 (%)	RSD (n=3) (%)
Se(IV)	0.93	10.0	11.6	106.7	0.86
		20.0	23.6	113.3	2.48
Se(VI)	0.38	10.0	10.9	105.2	1.89
		20.0	22.7	111.6	0.67
SeCys2	1.05	10.0	9.85	88	1.12
		20.0	20.8	98.8	0.48

■ 结论

本文将高灵敏度的 ICPMS-2030 与岛津高效液相色谱 LC-20Ai 联用，利用阴离子交换色谱分离的机理，建立了 HPLC-ICP-MS 快速测定茶叶中形态硒含量的分析方法。分析结果线性相关系数良好， $r > 0.9995$ ，加标回收率良好，方法准确、可靠。且具操作简单、快速高效、精密度高和环境友好的特点，适用于茶叶中形态硒的定性和定量分析。