

ICP-MS等三种测定蛹虫草硒含量方法的比较

王莹¹, 铁梅³, 康平利⁴, 吕永通¹, 贾松彬¹, 陈长兰^{2*}

1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036
2. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036
3. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036
4. 辽宁大学化学学院, 辽宁 沈阳 110036

摘要 采用微波消解法对试验样本进行消解, 分别通过 ICP-MS 法、HPLC/ 荧光法和 3, 3-二氨基联苯胺比色法三种方法测定了富硒蛹虫草菌丝体中硒的含量, 对上述几种硒含量测定方法的工作条件、检出限和精确度进行了对比研究。实验结果表明: ICP-MS 法、HPLC/ 荧光法和 3, 3-二氨基联苯胺比色法的检出限分别为 0.260 7、0.182 1 和 10.485 9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, ICP-MS 法的检出限最低, 3, 3-二氨基联苯胺比色法的检出限最高。在精密度方面, 对同一样品以 ICP-MS 法测硒的标准差为最低, 以 3, 3-二氨基联苯胺比色法测硒为最高。建议当分析样品中硒含量很低时, 可选用 HPLC/ 荧光法和 ICP-MS 法, 如分析样品含硒量相对较大, 可采用 3, 3-二氨基联苯胺比色法。

关键词 蛹虫草; 硒; ICP-MS; 测定方法

中图分类号: TQ266.1 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0815-04

引言

蛹虫草为我国名贵中草药, 是一类极具保健功能的大型药用真菌, 隶属于真菌界、真菌门、子囊菌亚门、核菌纲、肉座菌目、麦角菌科。它不仅含有多种活性物质, 而且含有大量为人体所必需的微量元素, 其中硒是人们最新发现的一种重要的微量元素, 具有抗癌、抗疾病、抗衰老的作用; 对砷、汞、镉等重金属有解毒作用; 但是过量的硒又会引起中毒。

人们对硒产生了浓厚的兴趣, 化学、环境和生物学家都在积极探索更好的测硒方法。我国科学家们, 在 20 世纪 90 年代, 就开始研究测定硒的方法, 如王旗等运用气相色谱法测定硒元素^[1]; 张权等用催化动力学法测定硒(IV)^[2]; 彭茵用石墨炉原子吸收光谱法直接测定生物样品痕量硒^[3]; 陈建华等还通过阳离子交换树脂分离 ICP 光谱法测定茶叶中微量硒^[4]。荧光分光光度法作为国标法, 在实际中应用很多, 邓桂春等利用此法进行了富硒蛹虫草试样中硒的形态分析^[5]。孙立波等、黎远冬等、马莺等探讨了用高压液相结合荧光检测测定生物样品中硒的方法^[6-8]。现在测硒方法日益成熟, 国内外科学家近年来又发展出了氢化物原子吸收光

谱法 HG-AAS^[9-14]、氢化物原子荧光光谱法 HG-AFS^[15]、石墨炉原子吸收光谱法 GFAA^[16]、电感耦合等离子体质谱 ICP-MS^[17]等方法测定微量硒元素。由于含硒样品种类繁多, 且每种测定方法都有其优缺点, 所以根据不同的分析样品, 选择合适的测定方法, 有着非常重要的意义。

我们在已经进行的蛹虫草中 ICP-MS 测硒方法基础上^[18], 又用 HPLC/ 荧光法和 3, 3-二氨基联苯胺比色法进行了对蛹虫草中的硒含量进行了测定, 并对测定结果进行了对比分析, 探讨三种测硒方法的各自特点。

1 实验方法

1.1 仪器及试剂

微波消解仪, Waters 高效液相色谱仪, 日本日立荧光检测器; 美国 Agilent 公司 7500c 型电感耦合等离子体质谱仪, 日本日立紫外-可见光远红外分光光度计。

硒标准储备液: 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (国家环保总局标准样品研究所); 优级纯浓硝酸和浓盐酸; 分析纯 EDTA; 分析纯盐酸羟胺; 分析纯 3, 3-二氨基联苯胺; 色谱纯 2, 3-二氨基萘 (Sigma 公司); 色谱纯环己烷; 分析纯二甲苯; 色谱纯乙腈。

收稿日期: 2008-03-06, 修订日期: 2008-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671176)资助

作者简介: 王莹, 女, 1982 年生, 辽宁大学生命科学院研究生 e-mail: wangyingbio@yahoo.cn

* 通讯联系人 e-mail: chenchanglanbio@yahoo.com.cn

1.2 样品的预处理

以本实验室得到的最佳富硒条件, 发酵培养蛹虫草, 过滤、洗涤并烘干, 磨碎过 40 目筛。准确称取适量样品于干燥的聚四氟乙烯消解罐内, 加入 5 mL 硝酸, 摇匀, 密封, 置入微波消解系统中, 按照表 1 的工步程序进行逐步消解, 将消解罐取出, 冷却后打开, 至于电热板(调至低温档)上赶尽棕色烟雾, 冷却, 加入等体积的盐酸, 加热至产生白烟为终点(ICP MS 法省略还原步骤), 冷却后定容, 转移至三角瓶中, 待测定。

Table 1 Microwave acid digestion operation process

工步	T/min	压力/kPa	工步	T/min	压力/kPa
1	2	300	3	6	900
2	4	600	4	8	1 000

1.3 ICP MS 法测定硒含量

工作曲线的绘制, 样品定量分析采用外标法, 内标元素选用 ^{89}Y 。将硒标准储备液($400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)逐级稀释成硒标准溶液, 0, 10, 50, $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度, 测定时采用样品与内标物同时进样, 绘制标准曲线。

1.4 HPLC/荧光法测定硒含量

工作曲线的绘制, 将硒标准储备液($400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)逐级稀释成 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硒标准溶液, 分别取 0, 0.2, 1, 2, 3, 4 mL 进行消化, 于上述消化液中加入 1 mL EDTA(2%) 和 2~4 滴甲酚红指示剂摇匀, 溶液应呈桃红色, 用 30% NaOH 调至浅橙色, 此时溶液 pH 值为 1.5~2.0, 再加入 2.0 mL 0.1% 2, 3-二氨基萘溶液摇匀, 置沸水浴内加热 5 min, 取出冷却。生成的 4,5-苯并苯硒脑用 3.0 mL 环己烷萃出。取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 以保留时间定性, 峰面积外标定量。色谱条件为色谱柱, YMC C₁₈-10 μm , $4.6\times 250\text{ mm}$; 流动相, 乙腈, 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为室温; 荧光检测器激发波长 $E_x=378\text{ nm}$, 发射波长 $E_m=558\text{ nm}$ 。观察保留时间, 绘制标准曲线。

1.5 3,3-二氨基联苯胺比色法测定硒含量

工作曲线的绘制, 准确吸取 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 硒溶液 0, 5, 10, 15, 20, 25 mL 加入分液漏斗, 加水至 35 mL, 分别加 5% EDTA-2Na 1 mL 摇匀, 1:1 盐酸调 pH 至 2~3, 加入 0.5% 3,3-二氨基联苯胺 4 mL, 摇匀置暗处 30 min, 用 5%

NaOH 溶液调至中性, 加入 10 mL 二甲苯, 摇 20 次, 静置 2 min 分层, 留二甲苯层, 二甲苯层倒入比色皿, 置于分光光度计 420 nm 波长测定吸光值, 用对照调零。记录数据。绘制标准曲线。

1.6 各种方法的灵敏度和精密度

采用食用菌消化样品的空白溶液, 重复进样测定 10 次, 计算其标准偏差, 方法的检出限由标准偏差的 3 倍确定, 检测下限由检出限的 3 倍确定。

在仪器最佳工作条件下, 制作各种方法的校准曲线, 对各个样品进行测定。每个试样重复测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 ICP MS 样品采集积分时间的选择

由于硒的每个同位素上采集数据所花费的时间是可以改变的, 因而对于强度较低、响应信号较小的同位素可以通过延长采集时间来改善其计数值。因此本实验在协调状态下, 改变积分 0 时间, 保证 $RSD\%<5.0$ 时, 采集不同浓度的硒溶液计数率, 结果见表 2。

由结果可知, 浓度、积分时间与响应值呈正相关, 当样品中硒的浓度小于 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 必须采用高于 2.0 s 的积分时间, 浓度在 $5\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内可采用 0.5~1.0 s 的积分时间, 硒浓度大于 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 采用 1.0 s 积分时间即可。

Table 2 Relationship between the integration times of ICP MS and response value of different concentration of Se

硒浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.1(s)	0.5(s)	1.0(s)	1.5(s)	2.0(s)
空白溶液	10	48	79	105	171
1	29	135	286	375	598
5	90	450	886	1 285	1 786
10	306	1 518	2 955	4 427	5 193
20	620	3 032	5 612	8 405	9 711
50	1 390	6 194	12 158	18 172	21 829
100	2 793	13 545	24 258	36 573	42 484

2.2 HPLC/荧光法工作条件的选择

对 HPLC/荧光法的工作条件分别进行了优化选择, 最佳工作条件见表 3。

Table 3 Working conditions of HPLC/fluorometric method

色谱柱	流动相	流速	柱温	激发波长 λ_{Ex}	发射波长 λ_{Em}	保留时间
YM C ₁₈ 10 μm $4.6\times 250\text{ mm}$	Acetonitrile	$1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	Room temperature	378 nm	558 nm	5.058 min

在反相色谱中常用的流动相是甲醇、乙腈和四氢呋喃, 据文献[18]报道, 4,5-苯并苯硒脑在乙腈水体系中的荧光强度比在甲醇水体系中的荧光强度强, 100% 乙腈中荧光强度最强, 且峰分离最好, 灵敏度最高。所以本法选用 100% 乙腈为流动相。用一定量硒标准溶液的消化处理液多次注入液相

色谱仪, 分别选用不同波长进行实验, 波长在 558 nm 处有最大吸收。从图 1 HPLC/荧光测定硒的谱图可以看出, HPLC/荧光法对样品具有很好的分离和测定效果。

2.3 三种硒含量测定方法工作曲线的线性范围

将标准液稀释不同浓度, 按样品消化方法步骤进行。各

方法在各浓度范围中的线性关系见表 4。

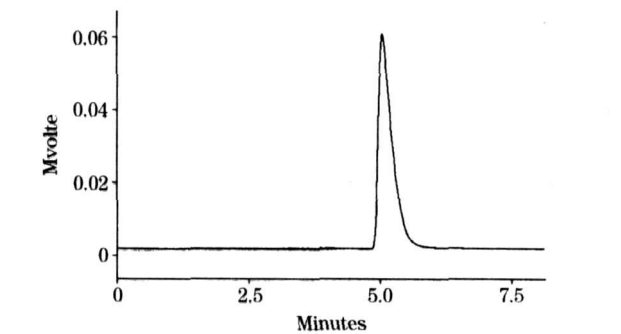


Fig 1 Fingerprint of Se detected by HPLC/fluorometric method

Table 4 Linear ranges of three analytical methods		
检测方法	测定范围	r
ICP-MS method	1.0~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.000
HPLC/fluorometric method	0.2~ 4.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.992
3,3'-diaminobenzidine method	5.0~ 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.999

2.4 三种硒含量测定方法的检出限和精密度

空白溶液重复测定 10 次，取 3 倍标准偏差所对应的浓度为每种方法的检出限，结果见表 5。

Table 5 Limit of detection and RSD of every detection methods		
方法	检出限/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%
ICP-MS method	0.182 1	0.060 7
HPLC/fluorometric method	0.260 7	0.086 9
3,3'-diaminobenzidine method	10.485 9	3.495 3

2.5 加标回收实验

采用最佳实验条件，用 ICP-MS 法、HPLC/ 荧光法和 3,3'-二氨基联苯胺比色法分别做加标实验结果，见表 6。上述三种方法的回收率均在 95%~ 103% 的允许范围内。

2.6 富硒蛹虫草中硒的测定方法比较

取同一样品，分别按 HPLC/ 荧光法、ICP-MS 法和 3,3'-

Table 6 Recovery ratio of every method				
方法	样品含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定值 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 /%
ICP-MS	48.24	10	58.51	102.70
HPLC/fluorometric	10.93	1	11.81	99
3,3'-diaminobenzidine	59.0	20	75.0	95

二氨基联苯胺比色法三种不同的分析方法测定硒含量，比较三种不同方法间的相对标准偏差如表 7。结果表明：对于样品中硒的测定三种方法结果基本一致。对于痕量硒的分析，3,3'-二氨基联苯胺比色法精密度、灵敏度有限。HPLC/ 荧光法、ICP-MS 法在测定痕量硒时均能达到要求。相对而言，ICP-MS 的稳定性和线性相对较好，且能进行多元素同时分析。

Table 7 Comparison of the analytical results of three analytical methods corresponding to every sample

样品号	HPLC / 荧光法	ICP-MS 法 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	基联苯胺比色法 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均值 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	5.6	5.25	4.06	4.97
2	3.8	3.72	3.14	3.55
3	6.75	7.91	6.25	6.97

3 结 论

本实验以富硒的蛹虫草菌丝体为分析样品，分别用 HPLC/ 荧光法、ICP-MS 法、3,3'-二氨基联苯胺比色法等三种方法进行测定，对测定结果进行比较。结果表明，HPLC/ 荧光法具有灵敏度高、干扰少、样品用量少等优点，但实验操作相对繁琐；ICP-MS 法具有样品处理简单、灵敏度高、准确性好等优点，但实验仪器昂贵、测定成本高、样品用量相对较多；3,3'-二氨基联苯胺比色法实验仪器要求水平低，实验操作相对简便，测定成本低，但灵敏度低。因此每个实验室要根据自己的实验条件及样品含硒量大小选择不同的测硒方法。

参 考 文 献

[1] WANG Qi, LÜ Shu-qing, WU Bing-fu(王 旗, 吕姝清, 吴炳辅). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1992, 2(4): 199.

[2] ZHANG Quan, LI Dong-hui(张 权, 李东辉). Physical Testing and Chemical Analysis Part B(Chemical Analysis)(理化检验·化学分册), 1992, 28(5): 274.

[3] PENG Yin(彭 茵). Chemical Research and Application(化学研究与应用), 1993, 5(1): 93.

[4] CHEN Jiar-hua, FENG Li, CUI Hai-rong(陈建华, 冯 莉, 崔海容). Inspection and Quarantine Science(检验检疫科学), 2000, 10(3): 20, 25.

[5] DENG Gui-chun, HOU Song-mei, TIE Mei, et al(邓桂春, 侯松岷, 铁 梅, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2006, 22(1): 21.

[6] SUN Li-bo, LI Jing, GUO Xia-yan, et al(孙立波, 李 静, 郭晓燕, 等). Chinese Journal of Public Health(中国公共卫生), 1997, 13(1): 14.

[7] LI Yuan-dong, LIU Zong-he, LI Dan-rong, et al(黎远冬, 刘宗河, 黎丹戎, 等). Chin. J. Prev. Med.(中华预防医学杂志), 1999, 33(2): 117.

- [8] MA Ying, YANG Xue dong, LIU Bo, et al(马 莺, 杨学冬, 刘 波, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1998, 26(4): 496.
- [9] Kommisrud I E, Osteras O, Vatn I T. Acta vet. Scand., 2005, 46: 229.
- [10] Sivertsen T, Overnes G, Osteras, O, et al. Acta Veterinaria Scandinavica, 2005, 46(4): 177.
- [11] Sivertsen T, Vie E, Bernhoft A, et al. Acta Veterinaria Scandinavica, 2007, 49: 1.
- [12] ZHANG Zhao hui(张朝晖). Journal of Ocean University of Qingdao(青岛海洋大学学报), 2001, 31(3): 375.
- [13] CUI Hai rong, CHEN Jian hua, GU Jia yue, et al(崔海容, 陈建华, 谷家越, 等). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2005, 21(5): 545.
- [14] GAO Jian zhong, QIN Shun yi, HUANG Ke he(高建忠, 秦顺义, 黄克和). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2006, 22(2): 157.
- [15] Chen C, Yu H, Zhao J, et al. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(2): 297.
- [16] Chen Y, Hall M, Joseph H. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2007, 16(2): 207.
- [17] Peters U, Foster C B, Chatterjee N, et al. Am. J. Clin. Nutr., 2007, 85(1): 209.
- [18] TIE Mei, ZANG Shu liang, ZHANG Wei, et al(铁 梅, 臧树良, 张 威, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 551.

Comparison of ICP-MS and Two Other Analytical Methods for Determination of Selenium Content in *Cordyceps Militaris*

WANG Ying¹, TIE Mei³, KANG Ping-li⁴, LÜ Yong tong¹, BEN Song bin¹, CHEN Chang lan^{2*}

1. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

2. Department of Pharmaceutical Engineering, Liaoning University, Shenyang 110036, China

3. School of Environment Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

4. School of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract Samples were digested by microwave digestion. The selenium content in selenium enriched *Cordyceps militaris* was determined by ICP-MS method, HPLC/fluorometric method, and 3,3'-diaminobenzidine method separately. And the detection conditions, the lowest detection limit and the relative standard deviation (RSD) of the three determination methods were compared. The detection conditions of the three methods for the detection of selenium content in selenium enriched *Cordyceps militaris* were established. It was showed that the lowest detection limit of ICP-MS method, HPLC/fluorometric method, and 3,3'-diaminobenzidine method was 0.2607 , 0.1821 and $10.4859 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, and this means that the lowest detection limit of ICP-MS method was the lowest and that of 3,3'-diaminobenzidine method was the highest. For the same sample the relative standard deviation (RSD) of ICP-MS method was the lowest and the RSD of 3,3'-diaminobenzidine method was the highest. It was recommended that selenium content is determined by ICP-MS and HPLC/fluorometric method when the selenium in the sample is very low and by 3,3'-diaminobenzidine method when the content is rather high.

Keywords *Cordyceps militaris*; Selenium; ICP-MS; Analytical method

(Received Mar. 6, 2008; accepted Jun. 8, 2008)

* Corresponding author