

高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱 (HPLC-HG-AFS)联用技术检测 水产品中硒的赋存形态

尚德荣¹, 秦德元², 赵艳芳^{1*}, 翟毓秀¹, 宁劲松¹, 丁海燕¹, 盛晓风¹, 徐正¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 国家水产品质量监督检验中心, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071; 2. 北京吉天仪器有限公司, 北京 100015)

摘要: **目的** 采用高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱联用技术(HPLC-HG-AFS)对水产品中硒的赋存形态检测进行研究。**方法** 通过实验优化流动相、提取剂、提取时间及其仪器条件, 建立 HPLC-HG-AFS 联用技术检测水产品中硒形态的分析方法。用去离子水在 70 °C 水浴下超声提取 1 h, 流动相为 pH 6.0 的 40 mmol/L(NH₄)₂HPO₄ 溶液, 阴离子交换柱分离, HG-AFS 检测。**结果** 样品加标量在 0.10、1.00 mg/kg 时的回收率均在 86.6%以上, 相对标准偏差均小于 5%。**结论** 本研究证明使用该方法测定水产品中的硒形态较为准确、可靠, 为科学评价水产品质量、进一步细化富硒水产品的判定标准和鉴别其真伪提供技术手段, 为科学有效地开展其风险评估提供技术支撑和数据支持。

关键词: 高压液相色谱; 氢化物发生原子荧光光谱; 水产品; 硒形态

Selenium speciation analysis in aquatic products by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry

SHANG De-Rong¹, QIN De-Yuan², ZHAO Yan-Fang^{1*}, ZHAI Yu-Xiu¹, NING Jin-Song¹,
DING Hai-Yan¹, SHENG Xiao-Feng¹, XU Zheng¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, National Center for Quality Supervision and Test of Aquatic Products, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Beijing Titan Instruments Co., Ltd., Beijing 100015, China)

ABSTRACT: Objective The determination of selenium speciation in aquatic products by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HPLC-HG-AFS) was analyzed in this study. **Methods** The mobile phases, extraction reagents, extraction time and instrumental conditions were optimized and then selenium speciation in aquatic products was analyzed by HPLC-HG-AFS. Samples were extracted at 70 °C for 1 h by ultrasonic extraction and the flow phase was 40 mmol/L (NH₄)₂HPO₄ (pH6.0). The different selenium speciation was separated with anion exchange column and detected by HG-AFS. **Results**

基金项目: 科技支撑计划项目(2011BAD130B6, 2013BAD13B03)、农业财政专项(2011)

Fund: Supported by Key Technologies R&D Program of China (2011BAD130B6, 2013BAD13B03) and Fiscal Agriculture Special Funds (2011)

*通讯作者: 赵艳芳, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: zhaoyf@ysfri.ac.cn

*Corresponding author: ZHAO Yan-Fang, Associate Professor, Major in the quality and safety of seafood. No.106, Nanjing Road, Qingdao 266071, China. E-mail: zhaoyf@ysfri.ac.cn

The average recoveries of 0.10 mg/kg and 1.00 mg/kg in samples were all above 86.6% and the relative standard deviations were all below 5% with a high accuracy. **Conclusion** The established method was accurate and reliable for selenium speciation analysis. It could provide technological support for scientific evaluation of the aquatic product quality, as well as the authenticity of the selenium enriched aquatic products. At the same time, the method also could provide important information for risk assessment of the aquatic products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; hydride generation atomic fluorescence spectrometry; aquatic products; selenium speciation

1 前言

元素的不同存在形态决定了其在环境和生命过程中表现出不同的行为;不同的元素形态由于具有不同的物理化学性质和生物活性,在环境和生命科学领域发挥着不同的作用。元素总量或者浓度的相关信息已经不能满足环境和生命科学研究的需要,有时候甚至会给出一些错误的信息。硒(Se)是人体生命活动中必需的微量元素之一^[1],具有增强免疫力、抗衰老和预防多种疾病的作用^[2,3],但过量的硒会导致疾病。国际学术组织联合会(FAO/WHO/IAEA)根据基础代谢率,取用75%的酶活力饱和度折算以及安全因子的处理后,建议成年男女膳食硒的适宜需要量分别为40 μg/日和30 g/日^[4]。硒的安全阈值很窄,而长期食用硒含量高于1.0 mg/kg的食物则会引起硒中毒^[5,6]。食物是人体硒的主要来源,而食品中硒的可利用价值由硒的存在形态决定^[7,8]。研究表明,生物源有机硒的安全性高,不易发生硒中毒,也易于被人体吸收。由于人体不能合成,只有通过植物性食品来补充^[9,10]。然而,目前有关硒的国家检测方法标准^[11-13]和判定标准都是以总硒含量为依据^[14],这就导致在市场上出现了一些通过添加无机硒来提高总硒含量

的所谓“富硒”产品。已有研究表明,长期摄入无机硒化合物可造成人和动物肝毒性和畸形发生^[10]。因此开展水产品中硒的赋存形态分析,为科学评价水产品质量、制定水产品中有毒无机硒限量标准,为科学有效地进行风险评估提供技术支撑和数据支持。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

Se^{VI}标准溶液(GBW 08675)、Se^{IV}标准溶液(GBW(E) 080215)、硒代胱氨酸(SeMet)标准溶液(GBW 08617)均从国家标准物质中心购得;硒代蛋氨酸(SeCys)标准物质从美国Sigma-Aldrich公司购得。

HPLC-HG-AFS联用仪由三部分组成:①HPLC:使用LC-10ATVP高压液相泵(日本SHIMADZU公司),配有100 μL定量环的7725i六通进样阀;②形态分析预处理装置(SAP-10,北京吉天仪器有限公司)、PRP-X100(长250 mm,内径4.1 mm,粒度10 μm)阴离子交换柱(Hamilton,美国);③AFS-9130原子荧光光谱仪,配有激发光源、高性能硒空心阴极灯、形态分析测量软件(北京吉天仪器有限公司);离心机(LD5-10,北京雷勃尔离心机有限公司);数控超声波仪(昆山市超声波仪器有限公司)。测定条件详见表1。

表1 硒形态测定HPLC-HG-AFS条件
Table 1 Experimental conditions for determination of selenium speciation with HPLC-HG-AFS

仪器	项目	条件		
高压液相色谱(HPLC)	色谱柱	Hamilton PRP-X100 (250 mm×4.1 mm <i>i.d.</i> , 10 μm)		
	保护柱	Hamilton PRP-X100 (25 mm×2.3 mm <i>i.d.</i> , 12~20 μm)		
	等度分离流动相	40 mmol/L (NH ₄) ₂ HPO ₄ , pH 6.0		
	进样体积	100 μL		
氢化物发生-原子荧光光谱(HG-AFS)	还原剂	1.2% KBH ₄ + 0.2% KOH	载流	7% HCl
	负高压	300 V	灯电流	60 mA
	载气	400 mL/min	屏蔽气	600 mL/min
	氩气(Ar)			

2.2 实验方法

(1) 提取 准确称取经粉碎过 40 目筛的干样约 0.500 g 于 25 mL 具塞刻度试管中, 加去离子水 10 mL 混匀, 置于 70 °C 超声提取 1h, 使试样充分浸提, 取出冷却。4000 r/min 离心 15 min, 取出适量上清液用 0.45 μm 的水系微孔滤膜过滤, 上机测定硒形态的值。

(2) 测定 标准系列溶液的配制: 通过稀释相应量的 Se^{IV}、Se^{VI}、SeMet、SeCys 得到 1 mg/L 的混合标准溶液储备液 (可置于 4 °C 冰箱存放备用)。再用流动相逐级稀释成 5.0、25.0、50.0、75.0、100.0 ng/mL 的标准使用液, 现用现配。测定条件详见表 1。

(3) 结果与计算

定性: 开机后按表 1 条件进行设置, 待稳定后, 先做标准曲线, 然后测定处理好的样品溶液。用出峰时间定性。

定量: 吸取样品提取液 100 μL 进样, 以样品加标的保留时间定性, 以峰面积外标法定量。即可得到待测溶液中的 SeCys、Se^{IV}、SeMet、Se^{VI} 的浓度, 按式(a)计算可得试样中待测物的含量:

$$X=C \times V \times F / m \times 1000 \dots \dots \dots (a)$$

式中:

- X—样品中待测物的含量, mg/kg;
- C—待测液中无机硒的浓度, ng/L;
- m—称样量, g;
- V—测定液体总体积(20 mL);
- F—稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 流动相的选择

目前, 国内外在硒的形态分析中大多在大米、植物、环境及生物样品中, 而对水产品中硒形态分析的报道是通过差减法计算样品中有机硒的含量^[15], 而采用仪器联用技术分析水产品中硒的赋存形态的研究报道尚属匮乏。目前常用到的流动相有: 磷酸盐缓冲剂^[16,17]、三氟乙酸、五氟丙酸和七氟丁酸等全氟羧酸^[18], 或者添加离子对试剂作为流动相成分^[19], 也有加入少量甲醇等有机溶剂来提高有机硒的分离效果^[20]。我们经过分析研究并结合水产品中各种硒形态的结合状态与之相似的形态特征, 本实验选择了磷

酸二氢铵弱酸盐溶液作为流动相进行分离。实验发现使用磷酸二氢铵溶液作为流动相, 四种硒形态在 15 min 内即可完全分离, 重复性和线性相关系数良好 (图 1)。

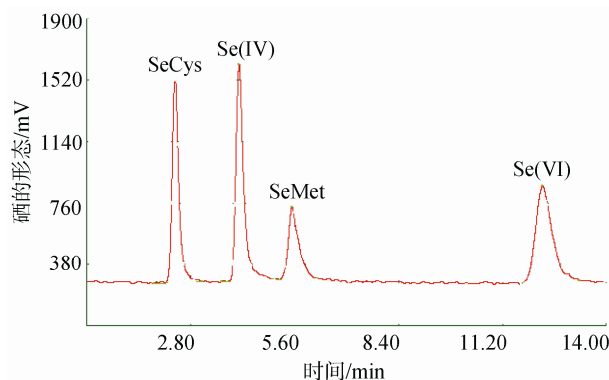


图 1 硒的 4 种形态标准溶液的色谱图
Fig. 1 Chromatogram of a standard solution for four selenium species

3.2 硒形态的提取

根据文献报道, 影响提取效率的主要因素有: 提取过程中的温度、pH、选用缓冲体系的种类、提取液的性质、该物质种类以及其中硒化合物的种类^[21-24]。结合 SeCys、Se^{IV}、SeMet、Se^{VI} 均为水溶性物质的特性, 为尽可能地避免在提取过程中硒形态的转化, 我们采用不同温度下水提取的方法。实验采用的样品为海参、扇贝和鱼, 样品分别采自山东荣成、辽宁大连和山东胶南。

提取时间和提取温度的选择: 分别采用不同温度下恒温超声提取, 从提取率和提取液中硒形态含量结果可得: 70 °C 恒温超声浸提 1 h 的效果很好, 硒的提取率均达到 90% 以上。实验结果见表 2。

3.3 不同形态硒的结果分析

为了确定 HPLC-HG-AFS 联用仪的分析性能, 采用联用技术对 4 种主要硒形态进行分离分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 采用该联用仪器分离分析 4 种硒形态的线性相关系数均大于 0.995, 相对标准偏差均小于 4.0%, 对 4 种硒形态 SeCys、Se^{IV}、SeMet、Se^{VI} 的检出限分别为 1.2、1.4、0.8、2.1 ng/mL。该仪器的分析性能完全符合测定 4 种硒形态的要求。

3.4 方法回收率和精密度加标回收试验

在确定检测方法后,我们分别以扇贝、海参和鱼为测试对象,进行加标回收率和精密度试验,以考察方法的准确度和重现性。实验称取 0.500 g 样品,分别添加 0.05、0.5 μg 的 SeCys、Se^{IV}、SeMet、Se^{VI} 的混标液,添加量相当于 0.10 mg/kg 和 1.00 mg/kg,实验结

果见表 4。图 2 图 3 分别是扇贝和海参样品谱图。

从表 4 中可知,样品加标量在 0.10、1.00 mg/kg 时 2 种测试样品的平均回收率都在 86.6% 以上,相对标准偏差小于 5%,具有较高的灵敏度和精密度。以上试验结果可证明,该方法可以满足水产品中硒形态的检测要求。

表 2 三种水产品在不同温度下的硒提取率
Table 2 Extraction efficiency under different temperatures in different time

样品编号	总硒值(mg/kg)	提取率(%)*			
		20 °C	60 °C	70 °C	80 °C
1	1.686	88.4	85.5	90.7	85.9
2	1.417	89.7	86.1	91.9	86.7
3	0.364	90.4	89.1	96.0	94.5

*提取率%=试样经恒温超声浸提 1 h 各种形态硒含量的总和与现行国标^[11]试样经酸消解后测得的总硒含量的比值乘 100%。

表 3 高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱仪对 4 种硒形态的分析性能
Table 3 Analytic characteristics of HPLC-HG-AFS for 4 selenium species

	SeCys	Se ^{IV}	SeMet	Se ^{VI}
线性范围(ng/mL)	2.0~100	2.0~100	2.0~100	3.0~100
线性相关系数(R^2)	0.9994	0.9991	0.9989	0.9986
检出限*(ng/mL)	1.2	1.4	0.8	2.1
相对标准偏差(RSD)(%)	2.92	3.05	3.12	3.93

*检出限:以空白(流动相)的 3 倍标准偏差($n=5$)计算(峰面积),定量限则根据 1980 年美国化学会环境改善委员会的提议以 10 倍空白标准偏差计算(峰面积)。

表 4 回收率及精密度($n=6$)
Table 4 Recovery ratio and accuracy($n=6$)

硒形态	加标量/(mg/kg)	扇贝			海参			鱼		
		样品空白含量	加标回收率/%	RSD/%	样品空白含量/(mg/kg)	加标回收率/%	精密度 RSD/%	样品空白含量/(mg/kg)	加标回收率/%	RSD/%
SeCys	0.10		87.2	2.90		89.95	2.88		89.59	3.62
	1.00	0.174	88.6	2.94	0.260	86.62	2.96	0.073	87.92	3.96
Se ^{IV}	0.10		92.2	3.03		92.26	3.01		92.66	3.86
	1.00	ND	94.6	3.05	0.957	90.20	3.09	ND	91.27	4.12
SeMet	0.10		89.1	3.10		91.68	3.06		90.68	3.12
	1.00	1.306	95.2	3.14	ND	89.96	3.18	0.193	89.92	3.82
Se ^{VI}	0.10		93.5	3.96		89.02	3.96		90.16	3.56
	1.00	ND	94.6	3.90	ND	91.04	3.90	ND	91.24	3.68

*ND: not detected

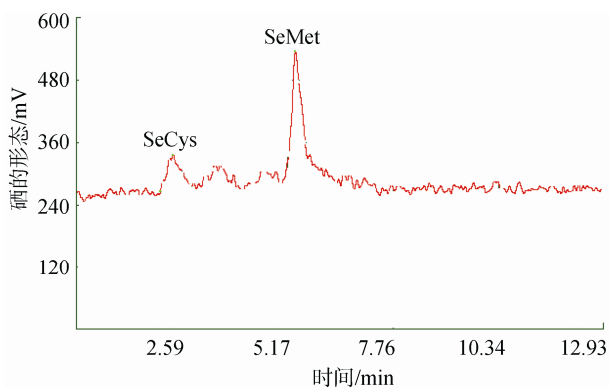


图 2 扇贝样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of selenium species in *C. farreri*

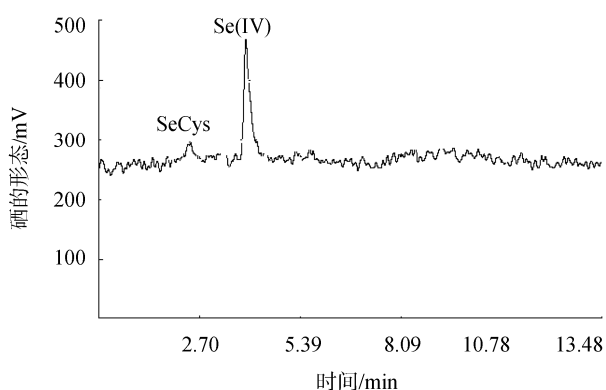


图 3 海参样品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of selenium species in *S. japonicus*

4 结 论

水产品中的硒经浸提后,由于阴离子交换色谱柱对硒的各种形态吸附能力不同,流动相将其依次洗脱,洗脱液经过硼氢化钾还原剂和盐酸发生氢化反应,生成氢化物进入原子化器,与原子荧光联用进行分析测定。通过对 4 种硒形态提取率、加标回收率试验的研究,优化了水产品中硒形态的前处理条件和仪器条件,建立了水产品中硒形态含量的测定方法。该方法为进一步细化富硒水产品的判定标准和鉴别其真伪提供了技术手段;为科学评价水产品质量、制定水产品中有毒无机硒限量标准、科学有效地进行风险评估提供了技术支撑和数据支持。

参考文献

[1] Stadtman TC. Selenocysteine [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65(1): 83-100.

[2] Burk RF. Biological activity of selenium[J]. *Annu Rev Nutri*, 1983, 3(1): 53-70.

[3] 梁光裕. 硒的保健功能[J]. *世界元素医学*, 2008, 15(3): 24-28.
Liang GY. The health care function of selenium[J]. *World Element Med*, 2008, 15(3): 24-28.

[4] 杨光圻, 顾履珍. 微量元素硒的人体需要量和安全摄入量范围[J]. *生理科学进展*, 1992, 23: 184-196.
Yang GQ, Gu LZ. Human requirements and safe intake range of selenium [J]. *Progr In Physiol Sci*, 1992, 23: 184-196.

[5] Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386: 1304-1323.

[6] Zhang ZY, You Y, Guo QQ, *et al.* Preliminary study on the standard of selenium content in agricultural products [J]. *Asian Agr Res*, 2012, 4(10): 83-85.

[7] Jorge MP, Antonio MP, Vanessa RH, *et al.* In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood [J]. *Food Chem*, 2013, (139): 872-877.

[8] Jiri S, Miroslav P, Branislav RN, *et al.* Effect of selenium in organic and inorganic form on liver, kidney, brain and muscle of Wistar rats[J]. *Cent Eur J Chem*, 2012, 10(5): 1442-1451.

[9] Scrapper GN, White DA. Elemental selenium in organic selenium compounds their chemistry and biology [J]. *Bioinorg Chem*, 1983, 8 (3): 303-305.

[10] 张永志, 王钢军, 叶雪珠. 联用技术测定富硒农产品中硒的形态研究进展[J]. *广东微量元素科学*, 2012, 19(8): 1-6.
Zhang YZ, Wang GJ, Ye XZ. Advance of Study on Speciation Analysis of Selenium in Agricultural Products by Hyphenated Technique[J]. *Guangdong Trace Elements Sci*, 2012, 19(8): 1-6.

[11] GB 5009.93-2010 食品安全国家标准 食品中硒的测定[S].
GB 5009.93-2010 National food safety standard Determination of selenium in foods [S].

[12] SN/T2208-2008 水产品中钠、镁、铝、钙、铬、铁、镍、铜、锌、砷、锑、钼、铅、汞、硒的测定[S].
SN/T2208-2008 Determination of sodium, magnesium, aluminium, calcium, chymium, iron, nickel, copper, zinc, arsenic, strontium, molybdenum, cadmium, lead, mercury, and selenium in aquatic products Microwave digestion-ICP/MS method [S].

[13] GB/T13883-2008 饲料中硒的测定 [S].
GB/T13883-2008 Determination of selenium in feeds [S].

[14] GB/T 22499-2008 富硒稻谷[S].
GB/T 22499-2008 Rich selenium Paddy[S].

[15] 张美琴, 季华曼, 杨洪生, 等. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定水产品中有机硒和无机硒[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 900-905.

- Zhang MQ, Ji HM, Yang HS, *et al.* Determination of organic and inorganic selenium in aquatic products by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. *J Fishery Sci China*, 2012, 19(5): 900-905.
- [16] Mazej D, Falnoga I, Veber M, *et al.* Determination of selenium species in plant leaves by HPLC-UV-HG-AFS[J]. *Talanta*, 2006, (68): 558-568.
- [17] 尚德荣, 宁劲松, 赵艳芳, 等. 高效液相色谱-氢化物发生原子荧光联用技术检测海藻食品中无机砷[J]. *水产学报*, 2010, 34(1): 132-138.
- Shang DR, Ning JS, Zhao YF, *et al.* Study on the detection of inorganic arsenic in seaweed food using HPLC-HG-AFS[J]. *J Fisheries of China*, 2010, 34(1): 132-138.
- [18] Kotrebai M, Tyson JF, Block E, *et al.* HPLC of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma-and electrospray ionization-mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 866: 51-63.
- [19] Zheng J, Ohata M, Furuta N, *et al.* Speciation of selenium compounds with ionpair reversed phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 874: 55-64.
- [20] 喻宏伟, 陈春英, 高愈希, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析生物样品中硒的化学形态[J]. *分析化学*, 2006, 34(6): 749-753.
- Yu HW, Chen CY, Gao YX, *et al.* Chemical Speciation Analysis of Selenium in Biological Samples by a Hyphenated Technique of High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry[J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34(6): 749-753.
- [21] 王丙涛, 谢丽琪, 林燕奎, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法检测食品中的五种硒形态[J]. *色谱*, 2011, 29(3): 223-227.
- Wang BT, Xie LQ, Lin YK, *et al.* Determination of selenium species in food by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(3): 223-227.
- [22] 铁梅, 李晶, 臧树良, 等. Se 酵母中可溶态 Se 的形态分析[J]. *辽宁大学学报*, 2006, 33(2): 108-111.
- Tie M, Li J, Zang SL, *et al.* Morphological Analysis of Selenium in Se-enriched Yeast[J]. *J Liaoning Univ*, 2006, 33(2): 108-111.
- [23] Chatterjee A, Shibata Y, Tanaka A, *et al.* Determination of selenoethionine by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry/high-performance liquid chromatography-hydride generation-high power nitrogen microwave-induced plasma mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 436(2): 253-263.
- [24] Gómez-Ariza JL, Bernal-Daza V, Villegas-Portero MJ. Comparative study of the instrumental couplings of high performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for chiral speciation of selenomethionine in breast and formula milk [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 520(1): 229-235.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

尚德荣, 高级工程师, 主要研究方向为水产品质量安全评价及元素形态分析技术研究。

E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn

赵艳芳, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: zhaoyf@ysfri.ac.cn