

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240228001

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定 植物性富硒食品中 7 种硒元素形态含量

梁志森^{1,2*}, 陈玉珍^{1,2}, 李建华^{1,2}, 尧向洁^{1,2}, 黄伟乾^{1,2}, 霍霖霖^{1,2}

[1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广州 511447; 2. 国家加工食品质量检验检测中心(广东), 广州 511447]

摘要: **目的** 考察微波辅助下酶解法的提取效果, 基于动态反应池(dynamic reaction cell, DRC), 建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)同时测定植物性富硒食品中 7 种硒元素(硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、L-硒甲基硒代半胱氨酸、L-硒代蛋氨酸、甲基亚硒酸、硒代乙硫氨酸)形态的含量。**方法** 样品经微波辅助胰蛋白酶酶解, 高速离心后取上清液过水相滤膜。采用 HPLC-ICP-MS 仪, 以甲烷为反应气体 DRC 模式消除质谱干扰, 内标校正, 以外标法进行定量分析。优化色谱和质谱条件, 从酶的种类、酶的用量、萃取温度、萃取时间、加标回收率等方面考察前处理方法对待测物的提取效果。**结果** 7 种目标物在 0.5~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好线性关系, 相关系数(r)均大于等于 0.9998, 平均回收率为 91.45%~102.75%, 检出限为 0.10~0.30 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 0.30~0.90 $\mu\text{g/kg}$, 日间日内精密密度($n=6$)分别小于 5%和 9%。**结论** 该方法准确、灵敏, 适用于食品中 7 种硒元素形态的同时检测。

关键词: 硒元素形态; 高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱法; 动态反应池; 富硒食品

Simultaneously determination of the content of 7 kinds of selenium species in plant-based selenium-enriched food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

LIANG Zhi-Sen^{1,2*}, CHEN Yu-Zhen^{1,2}, LI Jian-Hua^{1,2}, YAO Xiang-Jie^{1,2},
HUANG Wei-Qian^{1,2}, HUO Pei-Lin^{1,2}

[1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou 511447, China; 2. National Quality Inspection and Testing Center for Processed Foods (Guangdong), Guangzhou 511447, China]

ABSTRACT: Objective To study the extraction effects of microwave-assisted enzymatic hydrolysis, establish a method for determination of 7 kinds of selenium species (selenate, selenite, selenocysteine, L-selenium methyl selenocysteine, L-selenomethionine, methyl selenite acid and selenoethionine) in plant-based selenium-enriched food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) based on dynamic reaction cell (DRC). **Methods** The samples were enzymatically hydrolyzed by microwave-assisted

基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目(2023CZ07)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Market Supervision Administration (2023CZ07)

*通信作者: 梁志森, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与分析检测技术。E-mail: 522794556@qq.com

*Corresponding author: LIANG Zhi-Sen, Ph.D, Senior Engineer, Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou 511447, China. E-mail: 522794556@qq.com

trypsin, and the supernatant was removed from the aqueous phase filter membrane after high-speed centrifugation. MS interference was eliminated by DRC using methane as reaction gas with HPLC-ICP-MS method, and quantitative analysis was achieved by external standard after calibrated by the internal standard. After the conditions of chromatography and mass spectrometry were optimized, the extraction effect of pretreatment method was investigated from the aspects of enzyme type, enzyme dosage, extraction temperature, extraction time and spike recovery. **Results** The results showed a good linearity from 0.5–100.0 $\mu\text{g/L}$ and the value of the corresponding correlation coefficients r were all larger than 0.9998. The average recoveries were 91.45%–102.75%, the values of limit of detection were 0.10–0.30 $\mu\text{g/kg}$, and those of limit of quantification were 0.30–0.90 $\mu\text{g/kg}$, and the intra-day and interday precision values were below 5% and 9%, respectively. **Conclusion** The results shows that the established method is accurate, sensitive, and is suitable for the analysis of 7 kinds of selenium species in food simultaneously.

KEY WORDS: selenium speciation; high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry; dynamic reaction cell; selenium-enriched food

0 引言

硒元素在自然界中可分为无机硒和有机硒。无机硒主要为硒酸盐和亚硒酸盐,而有机硒主要为大分子硒和以硒代氨基酸及其衍生物为主要存在形态的小分子硒化物组成。硒代氨基酸是人们日常膳食中获取硒的主要途径^[1]。硒的安全阈值很窄,过高或过低的摄入量都会影响人体健康^[2],硒摄入不足可能引起心克山病^[3]、血管病、关节炎和大骨节病等^[4–5];而摄入量过多则会引起硒中毒^[6]。硒的毒性和生物利用度与其形态密切相关^[7–8],无机硒的毒性较大,不易被人体吸收,生物有效性低,而有机硒毒性低,生物利用率高^[9–10]。近年市场中不断推出富硒、补硒概念的食品,硒元素的种类和含量仍需明确。因此,准确区分和定量测定食品中硒元素形态对评价食品安全和食品营养有重要的意义。

对于硒元素形态,目前主要利用气相色谱-电感耦合等离子体质谱法(gas chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, GC-ICP-MS)^[11–12]、液相色谱-原子荧光光谱法(liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry, LC-AFS)^[13–15]和高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱法(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)^[16–18]进行测定。使用 HPLC-ICP-MS 对硒元素形态进行检测的相关研究,主要分为利用阴离子交换色谱柱和反相色谱柱等两种方法^[19–20]。陈绍占等^[21]采用 Hamilton PRP X100 阴离子交换柱结合 HPLC-ICP-MS 对水样中 5 种硒形态进行了测定。孟莉等^[22]采用超声辅助酶解法提取,利用 Hamilton PRP X100 阴离子交换柱结合 HPLC-ICP-MS, 对谷类食品中 4 种硒形态进行了测定,检出限范围为 4.5–7.0 $\mu\text{g/kg}$ 。陆奕娜等^[23]采用 C_{18} 反相色谱柱,以己烷磺酸钠作为离子对试剂,用水提取法结合 HPLC-ICP-MS 对食品中 7 种硒形态进行了测定。但有研究指出^[24–25]用于实

际样品时水浸泡提取的效率较低,可能导致部分硒形态无法有效提取。魏琴芳等^[26]采用 C_{18} 反相色谱柱,以四丁基溴化铵作为离子对试剂,利用链霉菌蛋白酶 E 提取结合 HPLC-ICP-MS 对大豆样品中 5 种硒形态进行了测定。林樾等^[27]采用 C_8 反相色谱柱,以七氟丁酸作为离子对试剂,利用两种酶依次提取,结合 HPLC-ICP-MS 测定了碎米荠中 5 种硒形态。上述研究结果表明,阴离子交换柱可分离的硒形态一般不超过 5 种,反相色谱柱则可分析更多种类硒形态。但由于反相柱无法保留硒酸根离子和亚硒酸根离子,因此需要结合离子对试剂进行分离。且反相柱一般使用有机溶剂作为流动相,高浓度有机溶剂会导致 ICP-MS 熄火,因此要求反相柱耐受高水相。使用酶解法提取硒元素形态具有反应条件温和、硒元素形态不易发生转化或破坏以及适用于食品等复杂基质等优点,但酶解时间较长,从而限制了常规检测方法中的应用。

HPLC-ICP-MS 具有检出限低、灵敏度高等优势,常用于元素形态的检测^[28–29],但 ^{80}Se 受质谱干扰较大,前述研究均选择相对丰度比较低的 ^{78}Se 、 ^{82}Se 核素,利用碰撞模式进行定量,导致方法的灵敏度下降,检出限较高^[30–31]。针对以上难点,本研究以甲烷为反应气采用 DRC 技术和微波辅助提取酶解,建立同时测定食品中硒酸、亚硒酸、硒代胱氨酸(selenocystine, SeCys₂)、L-硒甲基硒代半胱氨酸(L-se-methylselenonocysteine, SeMC)、L-硒代蛋氨酸(L-selenomethionine, SeMet)、甲基亚硒酸和硒代乙硫氨酸(selenoethionine, SeEt) 7 种硒元素形态的 HPLC-ICP-MS 分析方法,为食品中硒元素形态种类和含量的测定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验样品均购自广州超市和市场,富硒食用菌 10 份、富硒茶叶 10 份、富硒大米 15 份、富硒豆乳粉 5 份,共 40

份样品。

高纯甲烷(纯度 99.999%, 广州市广气气体有限公司); 硒酸根[Se(VI)]标准溶液、亚硒酸根[Se(IV)]标准溶液(质量浓度均为 1000 mg/L, 美国 Inorganic Ventures 公司); SeCys₂ 标准溶液、SeMC 标准溶液、SeMet 标准溶液(浓度分别为 0.560g、0.433 及 0.499 $\mu\text{mol/g}$, 中国计量科学研究院); SeEt(纯度>98%, 加拿大 TRC 公司); 甲基亚硒酸(methane-seleninic acid, MSA)(纯度>98%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 氨水、柠檬酸氢二铵、甲酸、己烷磺酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 甲醇(色谱纯, 美国默克公司); 胰蛋白酶(2500 U/mg, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 中性蛋白酶(14000 U/g, 上海源叶生物科技有限公司); 链霉蛋白酶 XIV (3500 U/g, 美国默克公司); In、Ge 单一内标标准溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$, 国家有色金属及电子材料分析测试中心); Be、Ce、Fe、In、Li、Mg、Pb、U 调谐液(1 $\mu\text{g/L}$, 美国铂金埃尔默公司)。

1.2 仪器与设备

NexSAR 高效液相色谱仪(美国铂金埃尔默公司); NexION 1000 电感耦合等离子体质谱仪(美国铂金埃尔默公司); A11 basic 研磨机(德国 IKA 公司); XPE 304 电子天平(感量 0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); REVO 微波萃取系统(北京莱伯泰科公司); Milli-Q Gradient 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 3K15 型高速离心机(德国 Sigma 公司); XSelect[®]HSS T3 色谱柱[250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm 沃特世科技(上海)有限公司]; AcclaimTM Mixed-Mode WAX-1 色谱柱[250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; SuperLu C₁₈-AQ 色谱柱[250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 广州菲罗门科学仪器有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

单一标准储备液的配制: 准确称取 7 种目标物标准品 0.1 g(精确至 0.0001 g), 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用水配制成 1000 mg/L 的单一标准储备液, 于 4℃下保存。

混合标准储备液的配制: 吸取 7 种目标物单一标准储备液 1 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 用水配制成 10 mg/L 的单一标准储备液, 于 4℃下保存。

混合标准系列工作溶液: 将 7 种目标物的混合标准储备液按比例用水稀释成混合标准系列工作溶液, 质量浓度分别为 0.0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$, 现配现用。

1.3.2 样品前处理

将样品粉碎均匀, 将制备好的试样装入洁净的塑料容器中, 做好标记, 密封保存于 4℃冰箱中。

准确称取 0.5 g(精确到 0.1 mg)待测样品, 置于聚四氟乙烯消解管中, 依次加入 15 mL 水、45 mg 链霉蛋白酶 XIV,

于 37℃进行微波辅助提取 40 min。将提取液转移至 25 mL 离心管, 以 8000 r/min 离心 10 min。上清液过 0.22 μm 水相滤膜, 供 HPLC-ICP-MS 进行平行测定, 同时做空白实验。

1.3.3 测试条件

(1)色谱条件

流动相 A 为 1 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠+2%甲醇, pH 为 3.2, 流动相 B 为 65 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠+2%甲醇, pH 为 3.2。梯度洗脱程序: 0~7.0 min, 100% A, 流速为 0.5 mL/min; 7.1~28.0 min, 100% B, 流速为 1.3 mL/min; 28.1~35.0 min, 100% A, 流速为 0.5 mL/min。柱温为 25℃, 进样量为 10 μL 。

(2)质谱条件

射频功率为 1600 W; 雾化器流速为 1.04 L/min; 等离子体流速为 15 L/min; 辅助气体流速 1.2 L/min; 分析模式为动态反应池(dynamic reaction cell, DRC)模式, 反应气体为高纯甲烷, 流速为 0.6 mL/min; 质荷比(m/z)为 79.92, 采集时间 900 ms, 带阻参数 q (rejection parameter q , RPq) 为 0.45。7 种目标化合物的标准溶液色谱图见图 1, 其中各化合物的质量浓度均为 100 $\mu\text{g/L}$ 。

1.4 数据处理

实验重复 3 次测定, 结果采用 Microsoft Excel 2007 软件进行统计学分析, 测量数据使用 Origin 9.0 进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的优化

2.1.1 酶种类的优化

考察胰蛋白酶、中性蛋白酶、链霉蛋白酶 XIV 等 3 种酶对 7 种硒元素形态提取的影响。以空白食用菌为基质在 50 $\mu\text{g/L}$ 的 7 种硒元素形态混合标准溶液, 按 1.3.2 步骤分别加入上述 3 种酶各 40 mg 进行微波辅助酶解提取, 结果如图 1 所示。当使用链霉蛋白酶 XIV 时, L-硒甲基硒代半胱氨酸和硒代乙硫氨酸的回收率低于 70%; 当使用胰蛋白酶和中性蛋白酶时, 7 种目标物的回收率范围基本一致; 使用胰蛋白酶提取时 7 种目标物回收率稍优于使用中性蛋白酶提取的回收率, 且胰蛋白酶的价格较低, 因此选择胰蛋白酶作为实验条件。这可能是由于胰蛋白酶、中性蛋白酶在中性至微碱条件下活性较高, 且均具有较好的热稳定性, 避免热变性导致的失活, 而链霉蛋白酶 XIV 对酸碱性和温度更为敏感, 若酸碱性和温度范围条件不合适会导致其活性降低, 导致酶解效果不佳。

2.1.2 酶用量的优化

考察不同胰蛋白酶用量对硒元素提取的影响。保持其他条件一致, 胰蛋白酶用量分别为 20、30、40、45、50、60 mg, 实验重复 3 次计算标准偏差, 结果如图 2 所示。当

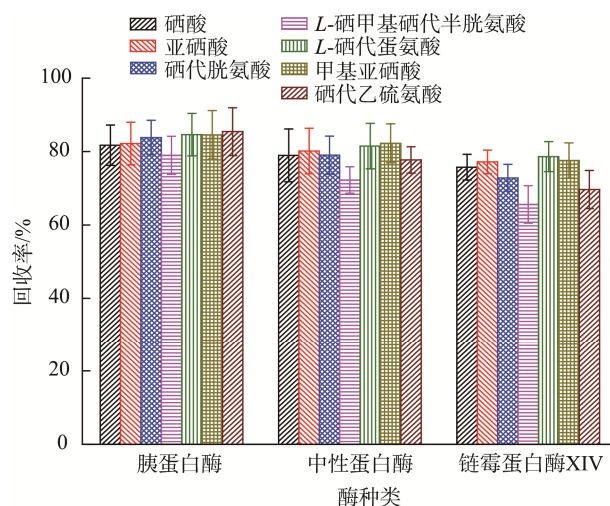


图1 酶种类与7种目标物回收率的关系

Fig.1 Relationship between the type of enzyme and recoveries of 7 kinds of analytes

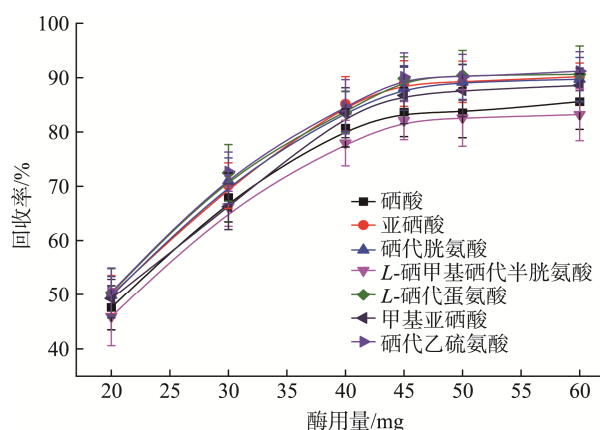


图2 酶用量与7种目标物回收率的关系

Fig. 2 Relationship between the amount of enzyme and recoveries of 7 kinds of analytes

酶用量小于 40 mg 时, 提取效率与酶用量的增加呈正相关的趋势; 当酶用量大于 50 mg 时, 提取效率未有明显提升; 这是由于酶用量不足时, 无法充分分解底物导致回收率偏低, 而酶用量过多时可能导致非特异性水解, 产生副产品并增加成本。当酶用量为 45 mg 和 50 mg 时, 提取效率基本一致, 考虑到节约成本, 适当降低酶用量, 因此酶用量选为 45 mg。

2.1.3 微波加热温度的优化

考察不同微波加热温度对 7 种目标物回收率的影响。保持其他条件一致, 将温度分别设置为 30、35、37、40、45℃, 实验重复 3 次计算标准偏差, 结果如图 3 所示。由于微波加热具有均匀性并能实现迅速的热传导、减少热损失, 因此适当的微波加热温度可以缩短酶解反应的时间, 但过高的温度可能导致酶失活, 影响酶解效果。当温度为

37℃时, 7 中目标物的回收率最高, 标准偏差较小, 因此选择该温度为实验温度。

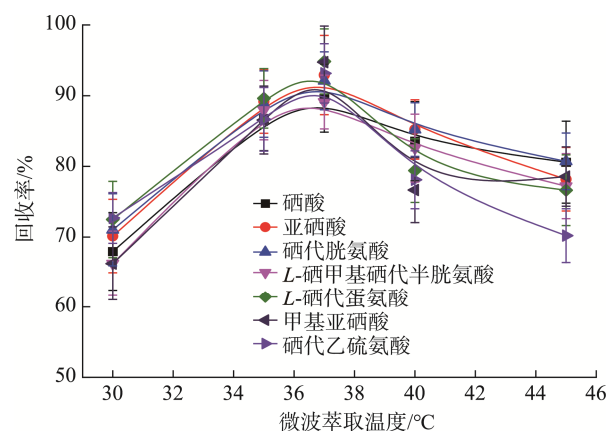


图3 微波加热温度与7种目标物回收率的关系

Fig.3 Relationship between the temperature of microwave heating and recoveries of 7 kinds of analytes

2.1.4 微波提取时间的选择

考察不同微波提取时间对 7 种目标物回收率的影响。保持其他条件不变, 分别设置微波提取时间为 20、30、40、50 和 60 min, 实验重复 3 次计算标准偏差, 结果如图 4 所示。适当的微波加热时间可以维持或提高酶活性, 但微波加热时间过长可能会导致酶的热变性, 从而降低酶的活性。当微波提取时间为 40 min 时, 目标物的回收率最优, 故选择该时间为实验优化条件。

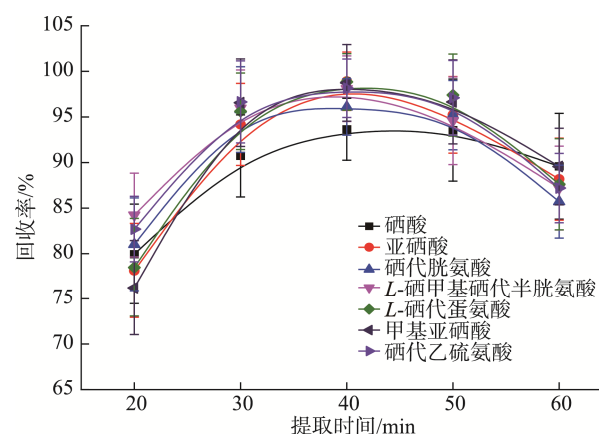


图4 微波提取时间与7种目标物回收率的关系

Fig.4 Relationship between the microwave extraction time and recoveries of 7 kinds of analytes

2.2 仪器条件的优化

2.2.1 质谱条件的优化

由于食品基质较复杂, ICP-MS 测定硒元素时会受到双电荷以及多原子离子的干扰, 详见表 1, 使用碰撞模式仍无法消除质谱干扰^[32], 从而影响测定结果的准确性和灵

敏度。由于 ^{80}Se 的相对丰度最高, 用其作为待测元素可提高方法的灵敏度。本研究使用 DRC 模式分别引入如氧气、甲烷等反应气体, 与待测元素发生质量转移反应, 消除质谱干扰、提高方法灵敏度, 从而实现 $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$ 或 ^{80}Se 的检测。甲烷作为反应气体则基线平整, 基线响应较低, 详见图 5A。使用氧气作为反应气体检测空白溶液, 基线响应较大, 当流动相 B 进行洗脱时基线响应明显升高, 表现出 $^{96}\text{Mo}^{+}/^{96}\text{Zr}^{+}$ 的强烈干扰, 推测可能是由于色谱系统高压泵析出引起的, 详见图 5C。分别以甲烷和氧气作反应气, 考察质量浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ 的 7 种目标物混合标准溶液, 详见图

5B 和 5D, 结果表明甲烷作为反应气体时质谱信号响应比氧气作为反应气体时高 3~4 倍, 故综合选择甲烷作为反应气体。内标元素选择电离能和质量数与 Se 相接近的 Ge。

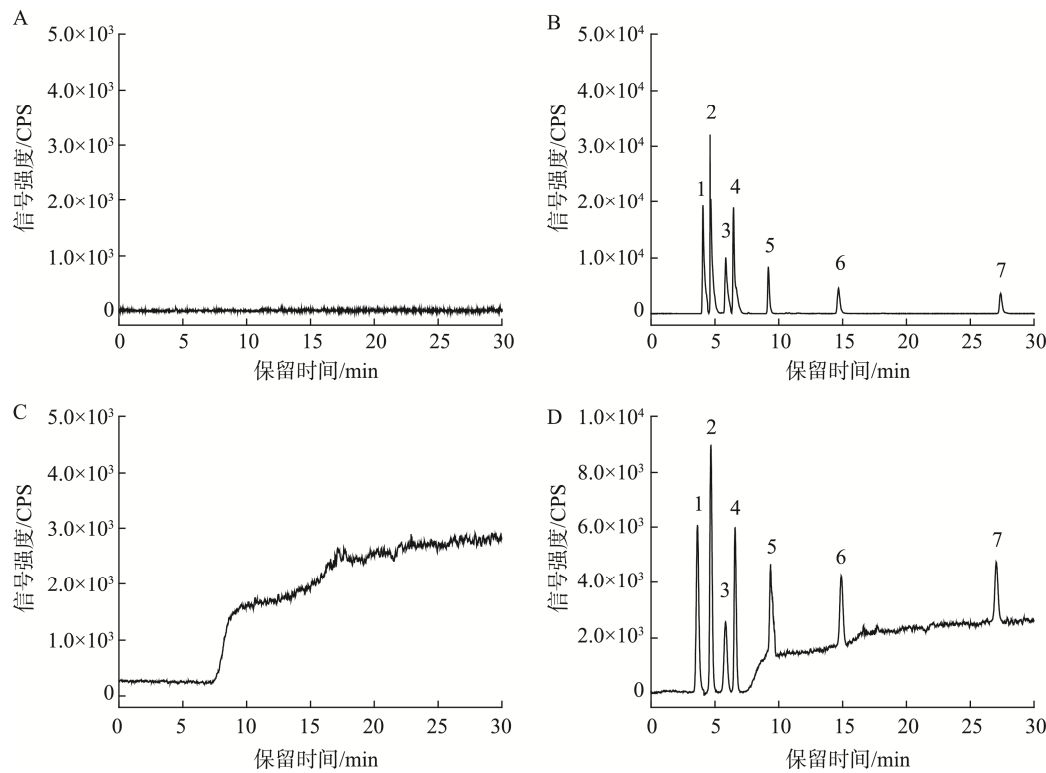
2.2.2 色谱条件的优化

(1) 色谱柱的选择

分别采用 HSS T3 色谱柱、Mixed-Mode WAX-1 色谱柱、以及 SuperLu C₁₈-AQ 色谱柱对硒元素形态进行分离。实验表明, HSS T3 色谱柱能有效分离 7 种硒元素形态, 见图 6A 和 6B; 其他色谱柱均出现色谱峰重叠, 见图 6C 和 6D, 无法达到基线分离的情况。因此本研究采用 HSS T3 柱。

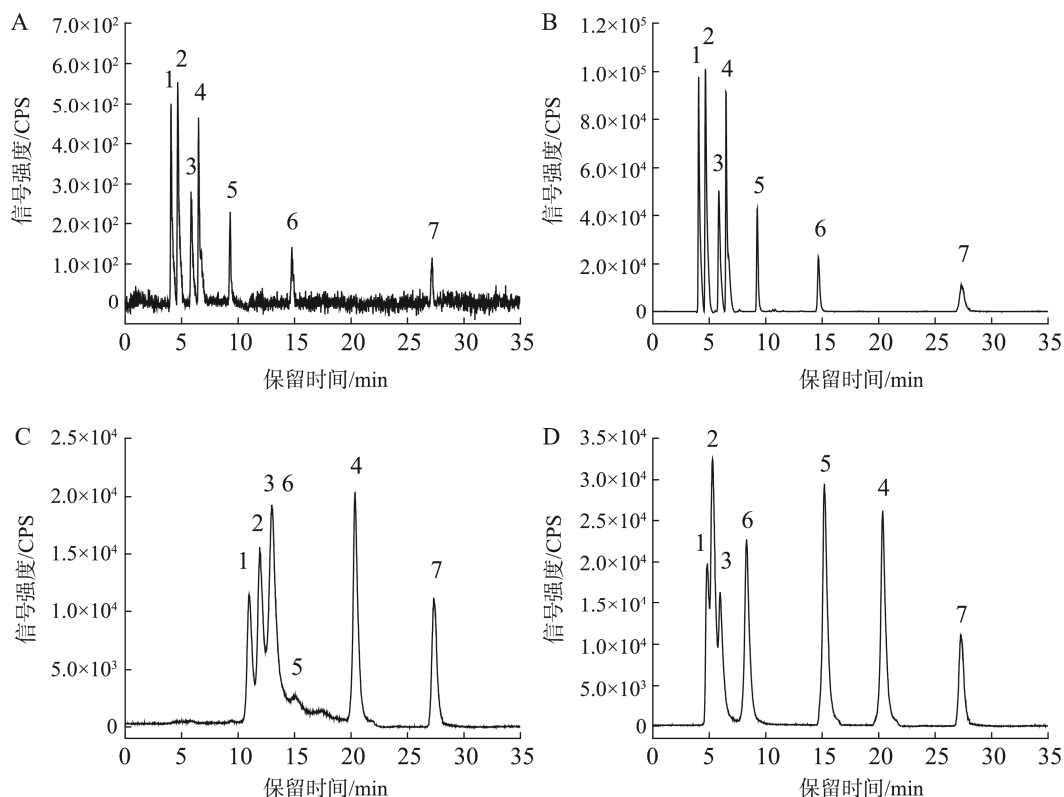
表 1 硒稳定同位素的相对丰度比和主要的质谱干扰物

Table 1 Relative abundance ratios of selenium stable isotopes and their major mass spectrometry interferences		
硒稳定同位素	相对丰度比/%	主要的质谱干扰物
^{74}Se	0.87	$^{37}\text{Cl}_2^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^{+}$
^{76}Se	9.02	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^{+}$, $^{38}\text{Ar}_2^{+}$, $^{44}\text{Ca}^{32}\text{S}^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^{+}$, $^{39}\text{K}^{37}\text{Cl}^{+}$, $^{42}\text{Ca}^{34}\text{S}^{+}$, $^{44}\text{Ca}^{32}\text{S}^{+}$
^{77}Se	7.58	$^{38}\text{Ar}^{39}\text{K}^{+}$, $^{36}\text{Ar}^{41}\text{K}^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^{1}\text{H}^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^{+}$, $^{40}\text{Ca}^{37}\text{Cl}^{+}$
^{78}Se	23.52	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^{+}$, $^{41}\text{K}^{37}\text{Cl}^{+}$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^{+}$, $^{44}\text{Ca}^{34}\text{S}^{+}$,
^{80}Se	49.82	$^{40}\text{Ar}_2^{+}$, $^{36}\text{Ar}^{44}\text{Ca}^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^{+}$, $^{160}\text{Gd}^{2+}$, $^{160}\text{Dy}^{2+}$, $^{79}\text{Br}^{1}\text{H}^{+}$
^{82}Se	9.19	$^{81}\text{Br}^{1}\text{H}^{+}$, $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}^{+}$, $^{38}\text{Ar}^{44}\text{Ca}^{+}$



注: 1: 硒酸; 2: 亚硒酸; 3: 甲基亚硒酸; 4: 硒代胱氨酸; 5: L-硒甲基硒代半胱氨酸; 6: L-硒代蛋氨酸; 7: 硒代乙硫氨酸; A: 甲烷作为反应气时的空白响应; B: 甲烷作为反应气时目标物质量浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ 的标准溶液响应; C: 氧气作为反应气时的空白响应; D: 氧气作为反应气时目标物质量浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ 的标准溶液响应。

图5 DRC模式下的色谱图
Fig.5 Chromatograms in DRC mode



注: 1: 硒酸; 2: 亚硒酸; 3: 甲基亚硒酸; 4: 硒代胱氨酸; 5: *L*-硒甲基硒代半胱氨酸; 6: *L*-硒代蛋氨酸; 7: 硒代乙硫氨酸; A: 目标物质量浓度为0.5 µg/L, 使用HSS T3柱进行分析; B: 目标物质量浓度为100 µg/L, 使用HSS T3柱进行分析; C: 目标物质量浓度为100 µg/L, 使用WAX-1柱进行分析; D: 目标物质量浓度为100 µg/L, 使用AQ柱进行分析。

图6 甲烷气体DRC模式下不同浓度7种待测物的色谱图

Fig.6 Chromatograms of 7 kinds of analytes at different concentration using DRC mode with methane gas

(2)流动相离子强度的优化

分别采用 1、2、4 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=3.2)作为流动相 A 相, 65 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=3.2)作为流动相 B, 对硒元素形态进行分离。1 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=3.2)作为 A 相能基本实现 Se(VI)、Se(IV)、MSA 和 SeCys₂ 等 4 种目标物的分离, 流动相 B 能实现 SeMC、SeMet 和 SeEt 等 3 种目标物分离。提高 A 相的离子强度会导致色谱峰提早出峰, 导致部分色谱峰发生重叠, 而使用较高离子浓度的 B 相能确保色谱峰实现基线分离同时减少检测时间。因此, 最终采用 1 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=3.2)作为 A 相, 65 mmol/L 柠檬酸氢二铵+1 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=3.2)作为流动相 B。

(3)流动相 pH 的优化

保持其他分析条件不变, 考察流动相的 pH 分别为 2.0、3.0、3.2、4.2、4.5、5.0 对 7 种硒元素形态进行分离。实验表明, 当流动相 pH 均为 2.0 和 3.0 时 MSA 与 SeCys₂ 未能完全分离; 当流动相 pH 均为 3.2 时 7 种目标物均实现基线分离; 当流动相 pH 均为 4.5、5.0 时 SeEt 峰型展宽, 分

离度降低; 故采用 4.2 为流动相 pH。

(4)柱温的选择

保持其他实验条件不变, 考察 20、22、25、28 和 30℃ 等柱温对 7 种硒元素形态分离情况的影响。结果表明, 柱温的变化对硒元素化学形态分离度影响不明显, 故选择室温 25℃ 为实验条件。

(5)流动相中甲醇体积分数的优化

保持其他实验条件不变, 考察甲醇体积分数分别为 1%、2%、4% 和 5% 对 7 种硒元素形态分离情况的影响。结果表明, 甲醇体积分数为 1% 时 SeMet 和 SeEt 均发生峰型展宽; 体积分数为 4% 和 5% 时 Se(IV)、MSA 和 SeCys₂ 部分重叠, 无法实现基线分离; 而甲醇体积分数为 2% 时能实现 7 种目标物的基线分离, 故选择 2% 甲醇体积分数为实验条件。

2.3 方法的验证

2.3.1 线性范围、检出限、定量限、加标回收率和精密度

本方法 7 种目标物的保留时间、标准曲线、相关系数、检出限和定量限的测试结果见表 2。为验证方法的准确度,

对空白样品基质进行三水平加标回收实验, 进行 6 平行测定, 计算日内和日间相对标准偏差, 结果见表 3。7 种目标物的回收率在 91.45%~102.75%之间, 日内精密度均小于 5%, 日间精密度均小于 9%, 均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》要求, 说明该检测方法具有良好的准确度和精密度。

2.3.2 实际样品的检测

应用所建立的方法对富硒食用菌、富硒茶叶、富硒大米、富硒豆乳粉等 4 类共 40 个样品进行测定, 结果如表 4 所示。4 类植物性富硒食品基质中硒元素形态差异大,

对于富硒食用菌和富硒豆乳粉, SeCys₂、SeMC、SeMet 等硒元素形态含量较高, SeMet 含量为主; 对于富硒茶叶, SeCys₂、Se(IV)含量较高, 并以 SeCys₂ 为主; 对于富硒大米, SeCys₂、SeMet 含量较高, 并以 SeCys₂ 为主。部分富硒食用菌、富硒茶叶等样品, 所检出的有机硒含量较低, 低于标签明示的含量。上述结果说明, 植物性富硒食品中硒的形态和含量是有明显差异的, 而标签明示值不准确可能是由于生产工艺导致硒形态发生转化或检测方法不准确而导致的, 因此对富硒食品进行硒形态分析具有重要意义。

表 2 0.5~100.0 μg/L 浓度范围内方法的标准曲线、保留时间、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Stand curves, retention times, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of the method at the concentration range of 0.5–100.0 μg/L

序号	物质	保留时间/min	标准曲线	r	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
1	Se(VI)	4.038	Y=1298.2153X+2005.0070	0.9999	0.30	0.90
2	Se(IV)	4.656	Y=13207.7553X+1995.2844	0.9999	0.30	0.90
3	SeCys ₂	6.494	Y=11393.3496X-880.7068	0.9999	0.15	0.45
4	SeMC	9.266	Y=4132.8836X+324.7508	0.9999	0.30	0.90
5	SeMet	14.600	Y=3259.7440X+1426.4662	0.9998	0.12	0.36
6	MSA	5.861	Y=7295.5211X-1074.7629	0.9998	0.10	0.30
7	SeEt	27.370	Y=6110.6423X+2079.0913	0.9998	0.15	0.45

表 3 7 种待测物的回收率、日内和日间精密度(n=6)
Table 3 Recoveries, intra- and inter-day precision for 7 kinds of analytes (n=6)

物质	回收率/%			日内精密度/%			日间精密度/%		
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3
Se(VI)	95.15	96.20	100.76	3.02	3.50	2.85	5.60	8.42	6.74
Se(IV)	100.20	97.08	100.35	4.21	3.89	2.50	6.34	7.65	7.05
SeCys ₂	98.65	95.35	98.10	3.36	3.50	2.76	8.65	8.24	6.80
SeMC	92.00	91.45	102.75	2.80	2.67	2.09	8.87	8.05	7.15
SeMet	100.65	96.86	95.56	2.10	2.06	1.89	7.64	7.40	6.68
MSA	98.25	94.45	97.86	3.52	3.82	3.65	6.65	5.68	5.89
SeEt	101.00	100.36	97.75	4.91	3.65	4.50	8.69	7.67	7.05

注: 水平 1、2、3 分别为目标元素的 5 倍定量限、10 倍定量限及 50 倍定量限。

表 4 不同植物性富硒食品中待测物的含量
Table 4 Concentration levels of analytes in different plant-based selenium-enriched food samples

基质	物质	浓度范围/(mg/kg)	基质	物质	浓度范围/(mg/kg)
富硒食用菌	Se(VI)	0.25~2.12	富硒大米	Se(VI)	ND~3.52
	Se(IV)	2.52~5.62		Se(IV)	ND~8.63
	SeCys ₂	10.62~22.20		SeCys ₂	20.62~54.23
	SeMC	18.80~35.60		SeMC	ND~10.64
	SeMet	8.27~52.62		SeMet	15.22~28.65
	MSA	ND~2.24		MSA	ND
	SeEt	0.25~1.06		SeEt	ND
富硒茶叶	Se(VI)	1.05~5.62	富硒豆乳粉	Se(VI)	ND~12.52
	Se(IV)	5.24~14.58		Se(IV)	ND~5.48
	SeCys ₂	8.62~42.58		SeCys ₂	15.62~30.23
	SeMC	2.82~5.65		SeMC	10.37~15.24
	SeMet	ND~1.24		SeMet	5.62~36.82
	MSA	ND~0.62		MSA	ND
	SeEt	ND~0.51		SeEt	ND

注: ND 为未检出。

3 讨论与结论

本研究使用微波辅助提取缩短酶解时间,对比了蛋白酶、中性蛋白酶、链霉菌蛋白酶 XIV 等3种酶的提取效果,使用甲烷作为反应气体,基于动态反应池建立了 HPLC-ICP-MS,可同时检测食品中7种硒元素形态。实验结果表明在微波辅助提取下,使用胰蛋白酶进行酶解,提取效率最优。在优化后的仪器条件下,结合 HPLC-ICPMS 直接检测 ^{80}Se 的信号响应,本方法的检出限为 0.10~0.30 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.30~0.90 $\mu\text{g/kg}$,灵敏度高,重复性好,线性范围宽,7种目标物均有良好的分离度。与相关文献报道对比^[22-23,26-28],本方法的消除了质谱干扰,检出限、定量限均降低了1~2个数量级,酶解时间缩短为40 min。本研究所实验的食品基质种类有限,针对不同食品基质,酶的种类对酶解效果可能存在明显差异,在特定条件下硒元素形态之间亦可能发生转化。后续研究将探索其他类型的酶或提取剂,以降低使用成本,并利用同位素稀释法结合 ICP-MS 对硒元素形态进行测定,以获取硒元素形态之间的转化率数据。本研究所建立的方法为食品中硒元素形态的检测提供技术支撑,为食品中硒元素形态标准化工作累积实验数据。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, OGRA Y. Identification of the biliary selenium metabolite and the biological significance of selenium enterohepatic circulation [J]. *Metallomics*, 2020, 12(2): 241–248.
- [2] DONG Z, XIAO Y, WU H. Selenium accumulation, speciation, and its effect on nutritive value of *Flammulina velutipes* (golden needle mushroom) [J]. *Food Chem*, 2021, 350: 128667.
- [3] 王雪梅,曹进,王钢力. 食品中硒的有机形态分析研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 7875–7881.
WANG XM, CAO J, WANG GL. Research progress of organic selenium speciation analysis in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(23): 7875–7881.
- [4] PYRZYNSKA K, SENTKOWSKA A. Selenium in plant foods: Speciation analysis, bioavailability, and factors affecting composition [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(8): 1340–1352.
- [5] 赵彤,周慧敏,江洁. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱法测定香菇中5种硒形态[J]. 理化检验: 化学分册, 2020, 56(10): 1113–1117.
ZHAO T, ZHOU HM, GANG J. Determination of five selenium speciation in *Lentinus edodes* by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *PTCA (Part B: Chem Anal)*, 2020, 56(10): 1113–1117.
- [6] 何彩梅,吴桂容,陈春岚,等. 食品中硒与硒形态分析方法研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(9): 218–222.
HE CM, WU GR, CHEN CL, et al. Research progress in determination method and speciation analysis of selenium in food [J]. *Food Ind*, 2017, 38(9): 218–222.
- [7] ZHANG J, ZHOU H, LI H, et al. Research progress on separation of selenoproteins/Se-enriched peptides and their physiological activities [J]. *Food Funct*, 2021, 12(4): 1390–1401.
- [8] HILDEBRAND J, GREINER A, DREXLER H, et al. Determination of eleven small selenium species in human urine by chromatographic-coupled ICP-MS methods [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 61: 126519–126526.
- [9] SHAHID R, KAZI TG, AFRIDI HI, et al. Deep-eutectic-solvent-based dispersive and emulsification liquid-liquid microextraction methods for the speciation of selenium in water and determining its total content levels in milk formula and cereals [J]. *Anal Methods*, 2020, 12(43): 5186–5194.
- [10] TAKAHASHI K, SUZUKI N, OGRA Y. Effect of gut microflora on nutritional availability of selenium [J]. *Food Chem*, 2020, 319: 126537.
- [11] BREUNINGER ES, TOLU J, BOUCHET S, et al. Sensitive analysis of selenium speciation in natural seawater by isotope-dilution and large volume injection using PTV-GC-ICP-MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1279: 341833.
- [12] KREMER D, ILGEN G, FELDMANN J. GC-ICP-MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of ^{77}Se -enriched selenite: monitoring of *in-vivo* methylation of selenium [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 509–515.
- [13] 魏益华,黄青青,张金艳,等. 离子对反相液相色谱-原子荧光光谱法测定畜禽肉中5种硒形态含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(12): 3822–3827.
WEI YH, HUANG QQ, ZHANG JY, et al. Dertermination of 5 kinds of selenium species in livestock and poultry meat with ion pair reversed phase liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Spectrosc Spectr Anal*, 2021, 41(12): 3822–3827.
- [14] 刘笑笑,金秋,张振都,等. 超声辅助酶法提取-液相色谱-原子荧光光谱法测定富硒黑木耳中硒形态[J]. 中国无机分析化学, 2022, 12(1): 163–170.
LIU XX, JIN Q, ZHANG ZD, et al. Determination of selenium speciation in Se-enriched *Auricularia auricula* by atomic fluorescence spectropy with ultrasonic-assisted enzymatic extraction [J]. *Chin J Inorg Anal Chem*, 2022, 12(1): 163–170.
- [15] 周晓华,王铁良,魏亮亮,等. 高效液相色谱-原子荧光光谱联用技术测定富硒鸡蛋中的硒形态[J]. 中国无机分析化学, 2023, 13(12): 1451–1458.
ZHOU XH, WANG TL, WEI LL, et al. Determination of selenium species in Se-enriched eggs by high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Inorg Anal Chem*, 2023, 13(12): 1451–1458.
- [16] 黄韬睿,王鑫,王小平. 反向离子对高效液相色谱-电感耦合等离子质谱联用分析富硒食品中硒的形态[J]. 中国调味品, 2020, 45(11): 140–144.
HUANG TR, WANG X, WANG XP. Speciation analysis of selenium in selenium-rich food by RP-HPLC-ICP-MS [J]. *Chin Cond*, 2020, 45(11): 140–144.
- [17] 黄韬睿,王小平,王鑫. 食品中硒的含量检测及形态分析[J]. 食品工业, 2021, 42(2): 311–315.
WANG TR, WANG XP, WANG X. Content detection and speciation analysis of selenium in foods [J]. *Food Ind*, 2021, 42(2): 311–315.
- [18] 季海冰,章佳,刘莉. 快速溶剂萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法快速测定淀粉类农作物中4种形态硒[J]. 理化检验: 化学分册, 2020, 56(9): 979–983.

- JI HB, ZHANG J, LIU L. HPLC-ICP-MS rapid determination of 4 species of selenium in starhy crops with accelerated solvent extraction [J]. PTCA (Part B: Chem Anal), 2020, 56(9): 979–983.
- [19] 成立, 胡良, 刘瑜, 等. 硒的形态分析方法综述[J]. 广州化工, 2021, 49(19): 14–16.
- CHENG L, HU L, LIU Y, *et al.* Review of analytical methods for selenium speciation [J]. Guangzhou Chem Ind, 2021, 49(19): 14–16.
- [20] 何潇潇, 周健, 马懿, 等. 富硒食品的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2023(17): 157–163.
- HE XX, ZHOU J, MA Y, *et al.* Research progress on selenium-enriched food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2023(17): 157–163.
- [21] 陈绍占, 张妮娜, 刘丽萍. 液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术分析水中 5 种硒形态[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(9): 1048–1051.
- CHEN SZ, ZHANG NN, LIU LP. Analysis of 5 selenium forms in water by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Chin J Health Inspect, 2021, 31(9): 1048–1051.
- [22] 孟莉, 许亚丽, 夏曾润, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定谷类食品中的 4 种硒形态[J]. 分析科学学报, 2021, 37(6): 843–846.
- MENG L, XU YL, XIA ZR, *et al.* Determination of selenium species in cereals by high prformance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2021, 37(6): 843–846.
- [23] 陆奕娜, 张林田, 魏建华, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定食品中 7 种硒形态[J]. 分析科学学报, 2021, 37(1): 69–74.
- LU YN, ZHANG LT, WEI JH, *et al.* Simultaneous determination of seven selenium species in food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2021, 37(1): 69–74.
- [24] ZEMBRZUSKA J, MATUSIEWICZ H, POLKOWSKA-MOTRENKO H, *et al.* Simultaneous quantitation and identification of organic and inorganic selenium in diet supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2014, 142: 178–187.
- [25] 张俊杰, 于晓晴, 魏学红, 等. 富硒木耳中的硒元素形态分析[J]. 分析实验室, 2020, 39(3): 360–363.
- ZHANG JJ, YU XQ, WEI XH, *et al.* Specation analysis of selenium in selenium-enriched fungus [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(3): 360–363.
- [26] 魏琴芳, 贾彦博, 胡文彬, 等. 液相色谱-电感耦合等离子质谱联用法测定大豆中的 5 种硒形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(8): 2456–2461.
- WEI QF, JIA YB, HU WB, *et al.* Determination of 5 kinds of selenium species in soybean by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(8): 2456–2461.
- [27] 林槌, 陈尚卫, 虞锐鹏, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定富硒碎米芥中的硒形态[J]. 分析科学学报, 2021, 37(5): 637–642.
- LIN Y, CHEN SW, YU RP, *et al.* Determination of selenium speciations in selenium-enriched *Cardamine violifolia* by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2021, 37(5): 637–642.
- [28] 胡银川, 谭欣, 钟洋, 等. 食品中硒形态的 HPLC-ICP/MS 测定方法[J]. 食品工业, 2023, 44(9): 293–296.
- HU YC, TAN X, ZHONG Y, *et al.* The determination method of selenium speciation in food by HPLC-ICP/MS [J]. Food Ind, 2023, 44(9): 293–296.
- [29] CLOUGH R, HARRINGTON CF, HILL SJ, *et al.* Atomic spectrometry update: Review of advances in elemental speciation [J]. J Anal At Spectrom, 2021, 36(7): 1326–1373.
- [30] 刘金巍, 刘雪松, 边超, 等. 甲烷动态反应电感耦合等离子体质谱法测定地下水土壤中痕量硒[J]. 岩矿测试, 2019, 38(1): 85–91.
- LIU JW, LIU XS, BIAN C, *et al.* Determination of trace selenium in groundwater by DRC-ICP-MS [J]. Rock Miner Anal, 2019, 38(1): 85–91.
- [31] 王立, 卢艳艳, 潘胜东. 碰撞/反应池技术-电感耦合等离子体质谱法测定人发中硒含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(1): 15–18.
- WANG L, LU YY, PAN SD. Determination of selenium in human hair by DRC-ICP-MS method [J]. Chin J Health Inspect, 2022, 32(1): 15–18.
- [32] 赵晨曦, 高佳, 付志斌, 等. 电感耦合等离子体质谱法测定食品中硒元素的条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1682–1687.
- ZHAO CX, GAO J, FU ZB, *et al.* Optimization of determination conditions of selenium in food by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(5): 1682–1687.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



梁志森, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与分析检测技术。
E-mail: 522794556@qq.com