

实验技术与方法

应用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术分析研究
畜肉中硒形态李乾玉^{1,2}, 刘丽萍^{1,2}, 陈绍占², 刘洋², 郭巧珍², 王一鸣^{1,2}(1. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 2. 北京市疾病预防控制中心,
食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

摘要:目的 应用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP/MS)分析研究畜肉中 Se(VI)、Se(IV)、SeCys、MeSeCys 和 SeMet 5 种硒形态。方法 采用超声辅助蛋白酶 XIV 和胰脂肪酶酶解提取畜肉中硒形态, 以 C18 反相色谱柱为分析柱, 10 mmol/L 柠檬酸和 5 mmol/L 己烷磺酸钠(pH=4.0, 含 1% 甲醇)为流动相, 等度洗脱, HPLC-ICP/MS 分析。结果 5 种硒形态可在 7 min 内有效分离, 在线性范围内相关系数均>0.999, 线性良好; Se(VI)、SeCys、MeSeCys 和 SeMet 4 种硒形态检出限为 0.000 3~0.002 mg/kg, 不同浓度水平的加标回收率为 80.0%~103.3%, 相对标准偏差均小于 6.8%, 有证标准物质 ERM[®] BC210a 测定值在标准值范围内。结论 该方法适用畜肉中 Se(VI)、SeCys、MeSeCys 和 SeMet 的分析测定。畜肉中的硒形态主要为 SeMet, 同时含有少量的 MeSeCys 和 SeCys。

关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱; 畜肉; 酶解法; 硒形态

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2024)03-0284-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.03.008

Determination of selenium species in livestock meat using HPLC-ICP/MSLI Qianyu^{1,2}, LIU Liping^{1,2}, CHEN Shaozhan², LIU Yang², GUO Qiaozhen², WANG Yiming^{1,2}(1. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To apply high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP/MS) to the analysis of five forms of selenium [Se(VI), Se(IV), SeCys, MeSeCys, and SeMet] in livestock meat. **Methods** The selenium species were extracted using the ultrasonic-assisted enzyme method, with C18 reversed-phase column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) as the analytical column, 10 mmol/L citric acid and 5 mmol/L sodium hexane sulfonate (pH=4.0, containing 1% methanol) as the mobile phase, and an injection volume of 20 μL. **Results** Four selenium forms were separated in 7 min, with correlation coefficients greater than 0.999, indicating good linearity. The detection limits of Se(VI), SeCys, MeSeCys, and SeMet ranged from 0.000 3-0.002 mg/kg. The spiked recoveries of selenium-enriched pork at three concentrations (low, medium, and high) ranged from 80.0% to 103.3%, with a relative standard deviation of less than 6.8%. Certified Reference Material ERM[®] BC210 revealed values within the standard range. **Conclusion** The developed method was suitable for determining Se(VI), SeCys, MeSeCys, and SeMet in livestock meat. The meat was found to mainly contain SeMet and small amounts of MeSeCys and SeCys.

Key words: HPLC-ICP/MS; livestock meat; enzyme digestion; Selenium species

硒是人体必需的微量元素, 具有抗氧化作用, 对人体维持正常免疫和调节甲状腺激素代谢水平发挥重要作用^[1]。摄入不足可能引起心肌坏死、免

疫缺陷以及癌症^[2]。WHO/FAO 规定的硒推荐摄入量标准为 26~34 μg/d/成人, 我国 39%~61% 的居民存在硒摄入不足的情况, 只有 17% 的人群膳食硒的摄入量达到 WHO/FAO 适宜摄入量标准(55~400 μg/d/成人)^[3], 硒摄入不足的情况严重影响着我国居民的营养健康, 但同时硒过量对健康也存在危害。

硒的生物学功能不仅取决于含量的多少, 还与它的存在形式密切相关。硒分为无机硒和有机硒, 无机硒包括亚硒酸根[Se(IV)]、硒酸根[Se(VI)]和

收稿日期: 2023-06-25

作者简介: 李乾玉 女 在读研究生 研究方向为营养相关的元素分析 E-mail: liqianyu0429@163.com

通信作者: 刘丽萍 女 教授 研究方向为健康相关的有害物质及营养成分分析研究 E-mail: llp9312@163.com

单质硒,有机硒包括硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys₂)、硒代半胱氨酸(SeCys)和甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)等小分子含硒化合物以及硒蛋白、硒多糖等大分子含硒化合物。硒在生物体内的不同存在形态其生理毒性和生物利用率各不相同,无机硒易溶于水,有一定的生物利用度,但同时也具有一定的毒性,需控制其使用量^[4],有机硒的生物利用度高于无机硒,有机硒形态在机体内更易转化为生理活性物质,为人体吸收利用^[5-6]。文献报道SeMet^[7]生物利用率较高是补硒的最佳形式,SeCys在清除自由基方面发挥着重要作用^[8],具有抵抗细胞膜脂质氧化等功能;MeSeCys在植物体内具有抗肿瘤作用^[9]。因此为了更好地评估食品中硒对人体健康的影响,对食品中硒含量及硒形态同时进行分析研究非常必要。

目前硒形态的分析方法主要有高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP/MS)^[10-11]、液相色谱-原子荧光光谱法(LC-AFS)^[12]、电喷雾四极杆飞行时间质谱(ESI-Q-TOF-MS)^[13]等。相比于LC-AFS,HPLC-ICP/MS的灵敏度高、分析效果好,ESI-Q-TOF-MS虽然可以通过物质结构进行定性定量分析,但成本较高,且灵敏度低于HPLC-ICP/MS。ZHANG^[10]对饲喂不同硒补充剂的猪肉中SeCys₂等7种硒形态进行分析,但各硒形态分离效果有待进一步改善。魏益华等^[12]应用LC-AFS对畜肉鲜样中SeCys₂等5种硒形态进行分析,但灵敏度较低。BIERLA等^[14-16]通过将SeCys₂标准品和母乳、肉类等生物样品还原、烷基化后分析烷基化SeCys,前处理繁琐,且合成的烷基化SeCys需经液相色谱-质谱定性,再采用HPLC-ICP/MS定量分析,分析成本高。本文选择蛋白酶酶解后采用HPLC-ICP/MS对畜肉中SeCys₂、SeCys等硒形态进行分析研究。

1 材料与方 法

1.1 仪器与主要试剂

1260型高效液相色谱仪及7700x型电感耦合等离子体质谱仪(美国Agilent公司产品);Milliplus IQ7015超纯水处理系统(美国Millipore公司产品);超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司产品)。

超纯水(电阻率18.2 MΩ·cm,由超纯水处理系统制备);柠檬酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司产品);己烷磺酸钠(优级纯,国药集团化学试剂有限公司产品);甲醇(HPLC级,美国Sigma公司产品);氨水(优级纯,国药集团化学试剂有限公司产品);蛋白酶XIV(≥3.5 U,美国Sigma公司产品);

胰脂肪酶(8 U,美国Sigma公司产品);三羟基甲基氨基甲烷盐酸盐(99.0%,美国Sigma公司产品);2-碘乙酰胺(>99.0%,美国Sigma公司产品);Bondesil吸附剂PSA(40 μm,100 gm,美国Agilent公司产品);亚硒酸根离子溶液(GBW10032)、硒酸根离子溶液(GBW10033)、甲基硒代半胱氨酸(GBW10088)、硒代蛋氨酸(GBW10034)、硒代胱氨酸(GBW10087)购于中国计量科学研究院;硒代半胱氨酸(≥95%,中国麦克林公司);欧盟有证标准物质富硒小麦粉(ERM[®]-BC210a,LGC标准品公司)。实验样品为富硒猪肉(猪背最长肌)及市场采购的畜肉(猪背肌、牛里脊、羊里脊)共9份。实验中硒形态含量均以硒计。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:安捷伦ZORBAX SB-Aq C18(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:10 mmol/L柠檬酸及5 mmol/L己烷磺酸钠(含1%甲醇,pH=4.0);流速0.8 mL/min;进样量20 μL。

1.2.2 质谱条件

RF功率1550 W;载气:高纯氦气;载气流速0.65 L/min;补偿气流速0.45 L/min;冷却气流速15 L/min;采样锥、截取锥:镍锥;射频电压1.80 V;采样深度8.0 mm;泵速0.3 r/s;检测同位素:⁷⁸Se。

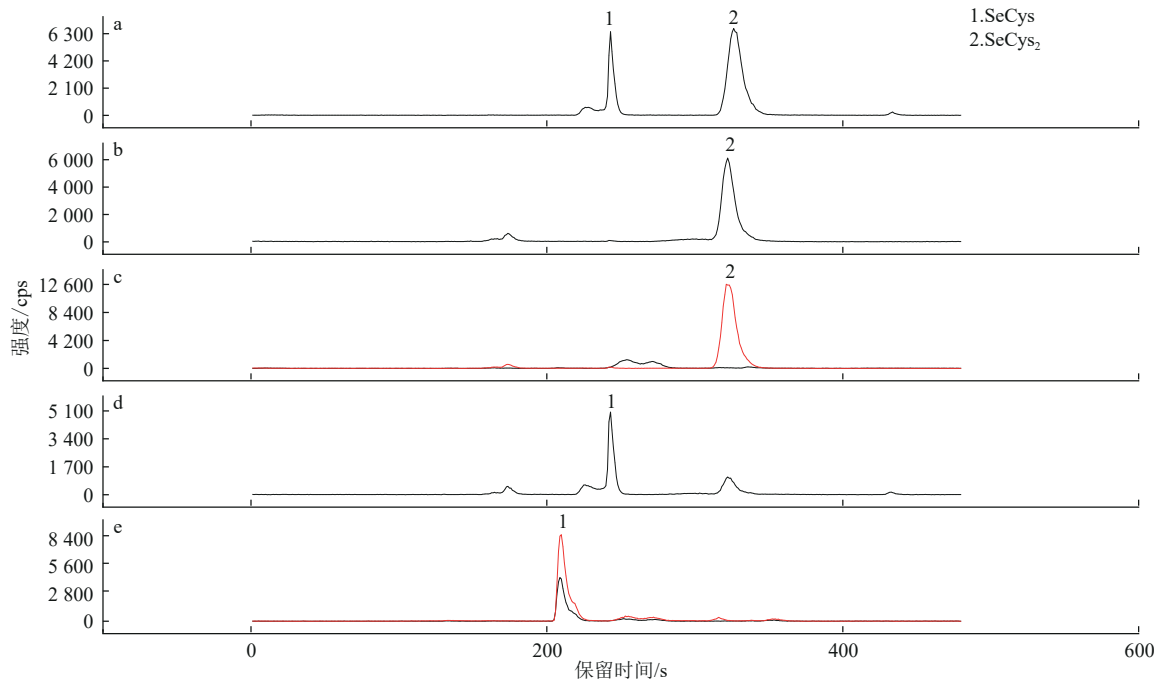
1.3 样品前处理

取1.5~2.0 g匀浆状鲜肉(精确至0.000 1 g)样品于15 mL离心管中,加入0.2 g PSA粉末、60 mg蛋白酶XIV、40 mg胰脂肪酶和10 mL超纯水,涡旋混匀后于55℃水浴超声提取3 h,再于4℃10 000 r/min离心10 min,上清液经0.22 μm滤膜过滤上机测定,同时做空白对照。

2 结 果

2.1 硒代半胱氨酸与硒代胱氨酸

本研究参考PENG等^[17]对SeCys₂和SeCys分离的色谱条件,以Agilent Zorbax SB-Aq C18为分析柱,以20 mmol/L柠檬酸和5 mmol/L己烷磺酸钠(含0.1%七氟丁酸,pH=2.3)为流动相,采用HPLC-ICP/MS对分别经超声、酶解后的50 μg/L的SeCys和SeCys₂的标准溶液进行分析。结果表明超声处理不影响SeCys₂和SeCys标准溶液的稳定性(见图1b和d),但经蛋白酶XIV处理后50 μg/L的SeCys₂色谱峰消失,造成了样品中加入蛋白酶提取硒形态过程中SeCys₂加标回收率<50%,与SeCys₂不同,50 μg/L的SeCys经蛋白酶XIV处理后出峰正常,因此,本研究随后对畜肉中Se(IV)、Se(VI)、SeCys、SeMet和



注: a. 50 μg/L SeCys, SeCys₂ 混合标准溶液; b. 50 μg/L SeCys₂ 经超声处理; c. 50 μg/L SeCys₂ 经超声辅助酶解(黑线), 50 μg/L SeCys₂ 经超声辅助酶解后加入 50 μg/L SeCys(红线); d. 50 μg/L SeCys 超声后; e. 50 μg/L SeCys 超声辅助酶解后(黑线), 50 μg/L SeCys 超声辅助酶解后加入 50 μg/L SeCys(红线)

图1 硒代胱氨酸和硒代半胱氨酸的稳定性

Figure 1 Stability of selenocystine and selenocysteine

MeSeCys 5 种硒形态进行分析研究。

2.2 色谱条件的优化

目前硒形态的分离主要采用 C18 反相色谱柱和 HamiltonPRP-X100 阴离子交换色谱柱, 由于后者分析时间长, 本研究以 C18 色谱柱为分析柱, 对流动相、流速、进样量等条件进行优化。参考 PENG^[17]、NY/T 3556—2020 行业标准及姚晓慧等^[18] 色谱条件, 选择柠檬酸和离子对试剂(己烷磺酸钠、庚烷磺酸钠)为流动相, 实验表明庚烷磺酸钠和己烷磺酸钠效果一致, 因此选择己烷磺酸钠为离子对试剂进一步对色谱条件进行优化。

2.2.1 流动相 pH 的优化

实验结果表明 SeCys 的出峰情况受 pH 值的影响较大, 当 pH 为 2.0 时出现 2~3 个峰, 随着 pH 值增大, 出峰情况得到改善。将流动相 pH 从 2.6 逐渐增加到 5.4, 观察 5 种硒形态的出峰情况, 如图 2 所示, pH 值对 SeCys 和 SeMet 的保留时间影响较大, pH 为 2.6 时, SeCys 出现两个峰, SeMet 在 20 min 内未出峰, 随着 pH 值增大, SeCys 的两个出峰逐渐融合, SeMet 出峰时间前移。在 pH 值为 3.9~4.1 时, SeCys 峰形较好; 随着 pH 值继续增大, MeSeCys 会出现衍生峰, pH 为 4.0 时 5 种硒形态可以在较短时间内实现有效分离, 且峰形良好, 因此本研究选择 pH 值为 4.0, 之后对流速和进样量进行进一步优化。本文选择的色谱条件中各硒形态分离效果

均优于 ZHANG^[10]。

2.2.2 流速和进样量的优化

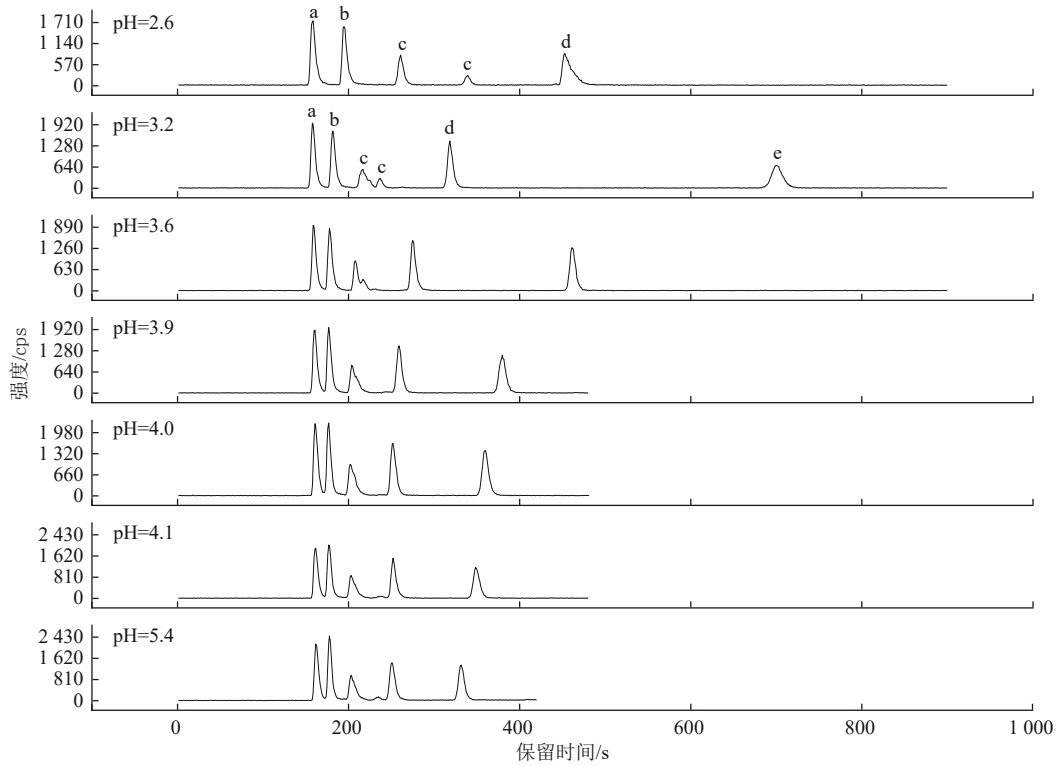
在相同 pH 值下, 改变流动相流速(0.7、0.8、0.9、1.0 mL/min)和进样量(20、50 μL)考察了对出峰情况的影响。

如图 3 所示, 流速从 0.7 mL/min 增加到 1.0 mL/min, 出峰时间缩短, 但两个无机硒的分离度变差, 流速对 SeCys 的峰形影响小, 考虑到分析时间以及无机硒的分离度, 本研究选择流速为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.3 样品前处理条件优化

2.3.1 蛋白酶种类和用量的选择

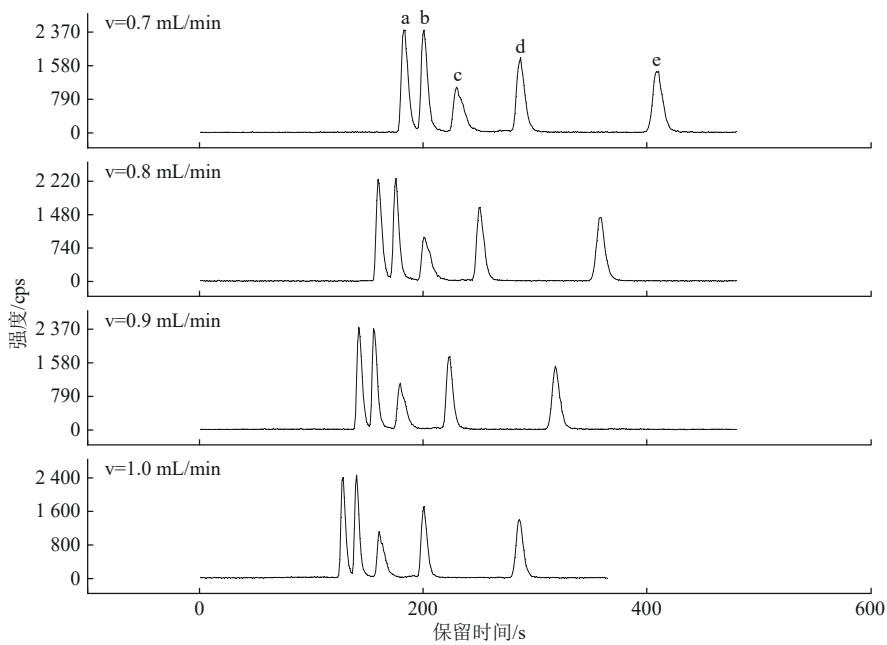
选取一个富硒猪肉样品(硒含量为 0.314 mg/kg)参考魏益华等^[12] 酶解的方法进行提取方法的优化。考察了以水为提取液, 不加和加入不同种类酶, 对富硒猪肉样品中硒形态提取效果的影响, 共设 9 个处理组, 加入等量的不同种类的酶(40 mg), 并设置两组混合酶(分别添加 40 mg), 结果见图 4。实验表明蛋白酶 XIV 和胰脂肪酶共同提取的效果最佳($P < 0.05$), 其次为蛋白酶 XIV、蛋白酶 E 水提和胰蛋白酶提取效果最差。本实验选择蛋白酶 XIV 和胰脂肪酶进行提取。之后保持胰脂肪酶的量不变, 进一步对蛋白酶 XIV 的用量进行优化, 共设 6 个处理组, 如图 5 所示, 相同条件下, 猪肉中加入 60 mg 蛋白酶 XIV 提取效果最好($P < 0.05$)。因此本研究最终选择 60 mg



注:(a.Se(VI), b.Se(IV), c.SeCys, d.MeSeCys, e.SeMet)

图2 不同pH值下混合标准溶液色谱图

Figure 2 Chromatogram of mixed standard solutions at different pH



注:(a.Se(VI), b.Se(IV), c.SeCys, d.MeSeCys, e.SeMet)

图3 不同流速下混合标准溶液色谱图

Figure 3 Chromatogram of mixed standard solutions at different flow rates

蛋白酶 XIV 和 40 mg 胰脂肪酶进行提取。

2.3.2 提取试剂的选择

为保证样品酶解过程中硒形态的稳定性,同时提高提取效率,文献中常加入 Tris-HCl 缓冲液^[10]、磷酸氢二铵缓冲液^[12]等提取试剂。本研究比较超纯水、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=7.5)和 0.03 mol/L

磷酸氢二铵(pH=8.0)的提取效果,考察了提取后 1 h、3 h、5 h 各硒形态的稳定性及各硒形态标准的稳定性。结果如图 6 所示,在其他条件一致的情况下提取效率没有显著性差异($P>0.05$),3 种提取试剂中 4 种硒形态的加标回收率均在 90.8%~120% 范围内,且 5 h 内检测结果显示各硒形态的含量无明显

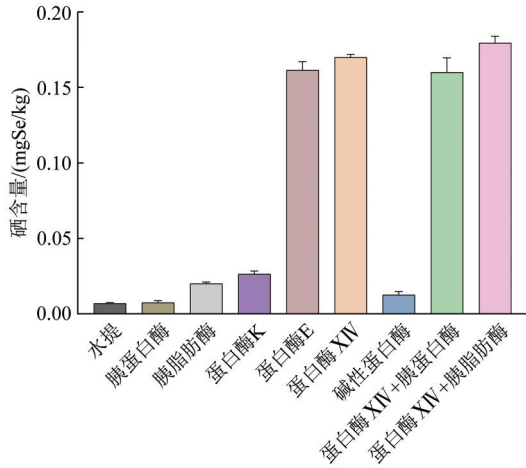
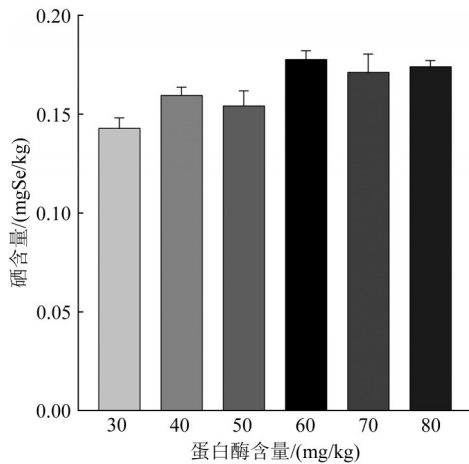
图4 不同酶对样品硒形态提取效果的影响($n=3$)Figure 4 Effects of different enzymes on the samples ($n=3$)

图5 不同蛋白酶用量对猪肉提取效果的影响

Figure 5 Effects of different dosage of proteases XIV on the samples

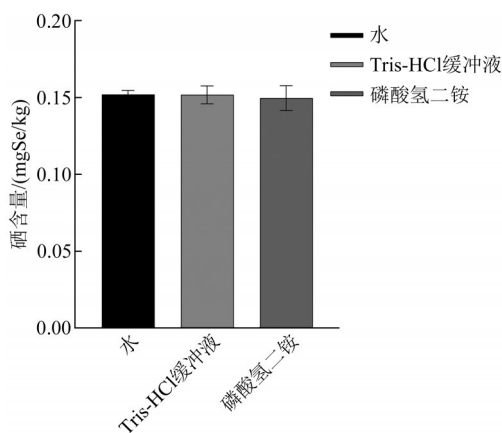


图6 提取试剂种类对猪肉提取效率的影响

Figure 6 Influences of extraction rates of selenium speciation in samples with different extracting solution

变化,因此选择超纯水作为提取试剂。

2.3.3 提取温度的优化

为实现最佳的酶解效率,考察在不同温度(37℃、45℃、55℃)下超声处理的提取效果。由图7可知,55℃时提取效果最好。

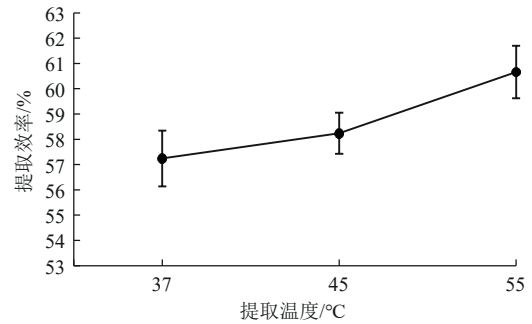


图7 提取温度对猪肉提取效率的影响

Figure 7 Influences of extraction rates of selenium speciation in samples with different extraction temperature

2.3.4 提取方式的选择

由于酶解时间长,为了提高分析效率可通过超声^[10,18]、振荡^[12,19]、微波萃取^[20-22]辅助酶解。本研究比较了水浴超声、烘箱、空气振荡对提取效果的影响。空气振荡提取条件为55℃振荡器200 r/min提取24 h,55℃水浴超声3 h(频率为20 kHz),烘箱55℃24 h(前6个小时每半个小时震荡一次)。结果显示,3种提取方式的提取效率依次为(64.4±13.0)%、(67.0±3.4)%和(60.4±3.4)%,水浴超声提取效果最好,且空气振荡提取方式中平行样之间提取效果相差大。综上所述,最终选择的提取方式为55℃超声3 h。

2.3.5 样品净化剂的选择

样品经酶水解后,样品提取溶液颜色较深,含有的水溶性蛋白等影响色谱柱的使用寿命^[12],本研究考察了加入C18粉末和PSA粉末前后的变化,即提取前往样品中加入0.2 g净化剂,其余操作步骤相同。实验表明,加入净化剂后样品提取溶液的颜色无明显改变,但加入PSA粉末提高了硒形态的稳定性,同时魏益华等^[12]研究显示PSA粉末净化提取溶液的能力强于C18粉末,因此本实验选择PSA粉末作为样品净化剂。

2.4 方法学指标考察

2.4.1 方法线性范围和检出限

分别配制0.0、0.5、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0和100.0 μg/L的Se(VI)、SeCys、MeSeCys和SeMet共4种硒形态混合标准系列,在优化好的实验条件下进行线性范围实验,实验结果表明在线性范围内4种硒形态线性相关系数(r)均大于0.999,线性关系良好。采用逐级稀释法测定检出限,以3倍基线信噪比($S/N=3$)时的质量浓度为检出限,结果见表1,10 μg/L混合标准溶液的色谱图见图8。当畜肉样品称样量为1.5 g,加入提取试剂为10 mL时计算方法检出限,结果见下表。

2.4.2 方法准确性和重复性

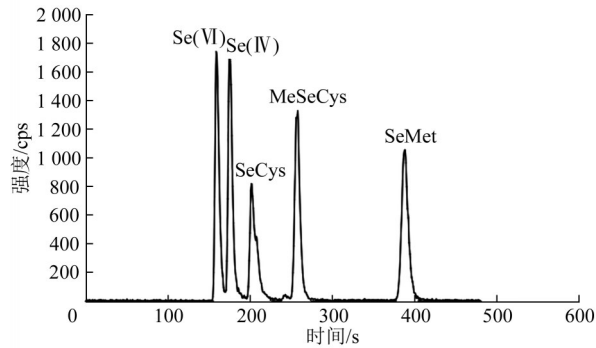
随机选取一份富硒猪肉样品,分别添加低、中、

表1 4种硒形态的线性关系及检出限

Table 1 Liner relationships and detection limits of four selenium species

| 硒形态 | 线性范围/($\mu\text{g/L}$) | 线性方程 | 线性相关系数(r) | IDL/($\mu\text{g/L}$) | MDL/(mg/kg) |
|---------|--------------------------|---------------------|---------------|-------------------------|------------------------|
| Se(VI) | 0.15~100 | $y=222.9x+211.2$ | 1.000 0 | 0.05 | 0.000 3 |
| SeCys | 0.75~100 | $y=1\ 543.2x+230.1$ | 0.999 9 | 0.25 | 0.002 |
| MeSeCys | 0.6~100 | $y=2\ 124.9x+112.8$ | 1.000 0 | 0.2 | 0.001 |
| SeMet | 0.6~100 | $y=2\ 256.2x-253.1$ | 1.000 0 | 0.2 | 0.001 |

注:IDL为质量浓度检出限,MDL为计算方法检出限

图8 10 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液色谱图Figure 8 The chromatograms of 10 $\mu\text{g/L}$ mixed standard solution

高3个浓度水平的5种硒形态混合标准溶液,进行加标回收和精密度实验,考察方法的准确性和重复性,结果见表2。3个加标水平下除Se(IV)外,4种硒形态的回收率为80.0%~103.3%,除Se(IV)外4种硒形态的RSD($n=6$)均小于6.8%。由于无肉基质的有证标准物质,选用欧盟有证标准物质小麦粉(ERM[®]BC210a,SeMet的标准值为 $11.03\pm 1.05\text{ mg/kg}$,以Se计),采用本研究建立的方法对ERM[®]BC210a中SeMet进行测定,SeMet的测定值为 $10.36\pm 0.06\text{ mg/kg}$ (以Se计),测定值在标准值范围内。

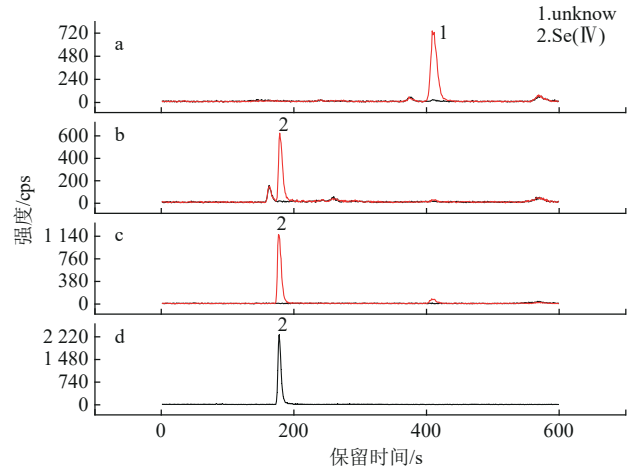
表2 富硒猪肉中硒形态的加标回收率与相对标准偏差($n=6$)Table 2 Recoveries and relative standard deviations of five selenium speciations in pork ($n=6$)

| 成分 | 基质/(mg/kg) | 加标/(mg/kg) | 回收率范围/% | RSD/% |
|---------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------|
| Se(VI) | ND | 0.005 | 92.5~102.7 | 3.7 |
| | | 0.2 | 81.3~83.0 | 1.1 |
| | | 0.4 | 82.5~84.6 | 0.9 |
| SeCys | 0.001 | 0.025 | 95.8~100.1 | 6.8 |
| | | 0.2 | 80.0~81.1 | 0.5 |
| | | 0.4 | 80.2~80.9 | 0.4 |
| MeSeCys | 0.004 | 0.005 | 95.9~98.3 | 1.9 |
| | | 0.2 | 112.8~94.7 | 0.9 |
| | | 0.4 | 92.7~95.8 | 1.1 |
| SeMet | 0.092 | 0.025 | 82.6~95.7 | 6.2 |
| | | 0.2 | 83.4~91.7 | 4.7 |
| | | 0.4 | 101.8~103.3 | 0.6 |

2.5 Se(IV)加标回收率的探究实验

在加标回收实验时发现,Se(IV)的加标回收率低于10%,针对这一现象进行了探究。参考魏益华等^[12]对于无机硒的提取方法,应用磷酸氢二铵/水

加入碘乙酰胺的方式提取猪肉中无机硒,进行了10 $\mu\text{g/L}$ 的Se(IV)加标实验。结果显示,Se(IV)在猪肉和碘乙酰胺的作用下形成了一个未知物(在400 s出峰),用相邻的SeMet对此未知物进行定量,其浓度为 $>9\ \mu\text{g/L}$,且5 d后仍稳定存在。为进一步对该物质进行探究,对富硒猪肉、西兰花冷冻干燥粉和大米粉应用碘乙酰胺进行无机硒的提取以及Se(IV)的加标实验,仅在猪肉的加标样品中存在此物质,结果见图9。根据亚硒酸根在人体的代谢过程^[23-24],推测是亚硒酸根与生物组织某些物质反应导致Se(IV)加标回收效果较差,在碘乙酰胺的作用下形成未知物1。后续可通过对该未知物进行结构分析,进一步对生物样品硒形态酶解法中Se(IV)加标回收率低的原因进行探究。



注:(a.猪背最长肌,b.西兰花,c.大米粉,d.10 $\mu\text{g/L}$ Se(IV)标准溶液;黑线是本底值,红线是Se(IV)加标结果,1.产生的未知化合物-unknown;2.Se(IV))

图9 应用碘乙酰胺提取时不同样品基质Se(IV)加标回收效果加标回收率

Figure 9 Spiked recovery of Se(IV) in the presence of different sample matrices and iodoacetamide

2.6 实际样品测定

应用所建方法对富硒猪肉及市售畜肉中硒形态进行分析,样品编号1~3为市售畜肉样品,4~10为富硒猪肉样品,测定结果见表3,样品色谱图见图10。畜肉中的硒形态主要为SeMet,其次是SeCys和MeSeCys。

表3 畜肉样品中硒形态($n=3$, mg/kg)
Table 3 Selenium species in livestock meat($n=3$, mg/kg)

| 样品编号 | 样品名称 | Se(VI) | SeCys | MeSeCys | SeMet | 总硒形态 | 总硒含量* |
|----------------|------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 猪肉-1 | ND | 0.036±0.006 | 0.019±0.001 | 0.105±0.005 | 0.161±0.012 | 0.221±0.006 |
| 2 | 牛肉 | ND | 0.034±0.002 | 0.017±0.001 | 0.044±0.001 | 0.095±0.003 | 0.155±0.007 |
| 3 | 羊肉 | ND | 0.038±0.001 | 0.015±0.002 | 0.043±0.002 | 0.096±0.004 | 0.135±0.009 |
| 4 | 猪肉-2 | ND | 0.001±0.001 | 0.004±0.002 | 0.092±0.017 | 0.098±0.019 | 0.133±0.006 |
| 5 | 猪肉-3 | ND | 0.011±0.001 | 0.008±0.001 | 0.028±0.004 | 0.047±0.006 | 0.088±0.005 |
| 6 | 猪肉-4 | ND | 0.015±0.004 | 0.015±0.001 | 0.038±0.004 | 0.068±0.008 | 0.125±0.002 |
| 7 | 猪肉-5 | ND | 0.007±0.001 | 0.009±0.000 | 0.037±0.005 | 0.052±0.000 | 0.110±0.007 |
| 8 | 猪肉-6 | ND | 0.012±0.000 | 0.011±0.001 | 0.157±0.005 | 0.181±0.007 | 0.335±0.011 |
| 9 ^a | 猪肉7 | ND | 0.011±0.002 | 0.007±0.000 | 0.190±0.014 | 0.207±0.015 | 0.346±0.002 |

注:ND表示未检出;*:总硒含量采用电感耦合等离子体质谱法检测(ICP-MS)

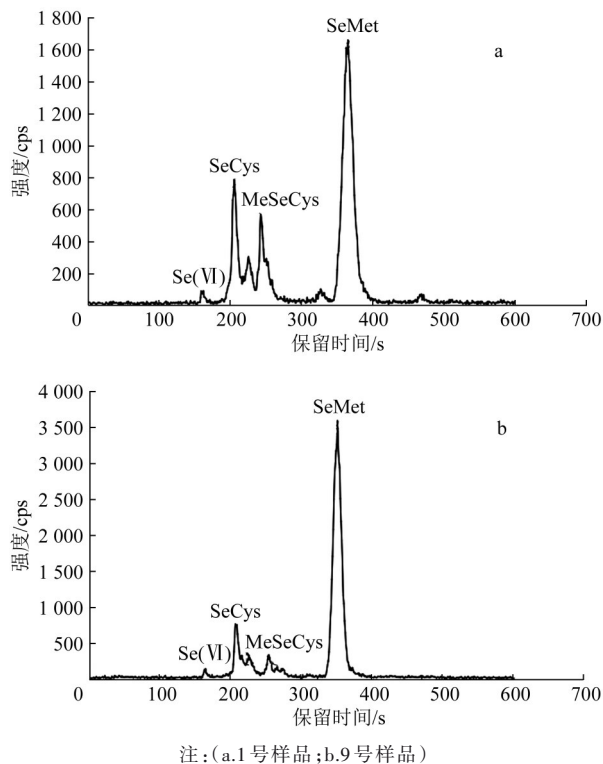


图10 样品色谱图

Figure 10 the chromatograms of sample

3 结论

本研究通过比较蛋白酶 XIV、胰脂肪酶、碱性蛋白酶等不同种类酶,优化了酶的用量及样品提取方式,选择蛋白酶 XIV 和胰脂肪酶对样品中硒形态进行超声辅助提取,采用 C18 反相色谱柱分离,ICP-MS 联用技术测定畜肉中硒形态。经研究表明,分析方法灵敏、可靠,操作简便,适用于畜肉中 Se(VI)、SeCys、MeSeCys 和 SeMet 4 种硒形态的分析测定,但方法的提取效率还有待进一步提高。通过对畜肉中硒形态研究发现,硒含量高的畜肉中主要硒形态为 SeMet,同时含有少量的 SeCys 和 MeSeCys。本研究对硒代半胱氨酸和硒代胱氨酸经超声、酶解后的转化情况以及生物样品中 Se(VI)加标回收率低的情况进行了探究,为今后相关研究提供参考。

参考文献

- [1] RAYMAN M P. Selenium intake, status, and health: A complex relationship[J]. *Hormones*, 2020, 19(1): 9-14.
- [2] BIRINGER M, PILAWA S, FIOHE L. Trends in selenium biochemistry[J]. *Natural product reports*, 2002, 19(6): 693-718.
- [3] 张泽洲. 典型农作物中硒形态分析及其硒-镉相互作用研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2019.
ZHANG Z Z. Selenium speciation and selenium-cadmium interaction in staple crops[D]. Wuhan: China university of Geosciences, 2019.
- [4] MEHDI Y, HORNICK J, ISTASSE L, et al. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions[J]. *Molecules*, 2013, 18(3): 3292-3311.
- [5] SHIH T T, HSU I H, WU J F, et al. Development of chip-based photocatalyst-assisted reduction device to couple high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry for determination of inorganic selenium species[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1304: 101-108.
- [6] TSAI Y, LIN C, HSU I, et al. Sequential photocatalyst-assisted digestion and vapor generation device coupled with anion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation analysis of selenium species in biological samples[J]. *Analytica chimica acta*, 2014, 806: 165-171.
- [7] RAYMAN P M, INFANTE G H SARGENT M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation[J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(2): 238-253.
- [8] HUANG Z, ROSE A H, HOFFMAN P R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Antioxidants redox signaling*, 2012, 16(7): 705-43.
- [9] STABNIKOVA O, IVANOV V, LARIONOVALI, et al. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, 41(5): 890-895.
- [10] ZHANG K, GUO X, ZHAO Q, et al. Development and application of a HPLC-ICP-MS method to determine selenium speciation in muscle of pigs treated with different selenium supplements[J]. *Food chemistry*, 2020, 302: 125371.
- [11] OLIVEIRA A F, LANDERO J, KUBACHKA K, et al. Development and application of a selenium speciation method in cattle feed and beef samples using HPLC-ICP-MS: evaluating the selenium metabolic process in cattle[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, 31(4): 1034-1040.
- [12] 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 Y H, HUANG Q Q, ZHANG J Y, et al. Determination of 5 kinds of selenium species in livestock and poultry meat with ion pair reversed phase liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(12):3822-3827.
- [13] ANAN Y, NAKAJIMA G, OGRA Y. Complementary Use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for Selenium Speciation [J]. Analytical Sciences, 2015, 31(6): 561-564.
- [14] BIERLA K, SZPUNAR J, LOBINAKI R. Specific determination of selenoaminoacids in whole milk by 2D size-exclusion-ion-pairing reversed phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP MS)[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 624(2): 195-202.
- [15] BIERLA K, DERNOVICS M, VACCHINA V, et al. Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 390: 1789-1798..
- [16] LIPIEC E, SIARA G, BIERLA K, et al. Determination of selenomethionine, selenocysteine, and inorganic selenium in eggs by HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397: 731-741.
- [17] PENG J J, LIU Y, YU F T, et al. A reliable method of high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for determining selenoamino acids in selenoproteins from *Lactococcus lactis* [J]. Journal of Chromatography A, 2022, 1685: 463590.
- [18] 姚晓慧, 陈绍占, 刘丽萍等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析人血清中的硒形态[J]. 质谱学报, 2022, 43(03): 381-388.
- YAO X X, CHEN S Z, LIU L L, et al. Analysis of selenium species in human serum by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2022, 43(03): 381-388.
- [19] BAKIRDERE S, VOLKAN M, ATAMAN O Y. Selenium speciation in chicken breast samples from inorganic and organic selenium fed chickens using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 71: 28-35.
- [20] 田宗旺, 李想, 刘彦威. 外源硒对冬虫夏草耳型菌核的硒含量及硒形态的影响[J]. 食用菌, 2022, 44(02): 58-61.
- TIAN Z W, LI X, LIU Y W. Effect of exogenous selenium on selenium content and selenium forms in auricula sclerotium of *cordyceps sinensis*[J]. Edible Fungi, 2022, 44(02): 58-61.
- [21] 曾凤泽, 姚宇泽. 微波辅助酶萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定灵芝中6种硒形态[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(11): 1152-1157.
- ZENG F Z, YAO Y Z. Determination of six selenium species in *ganoderma lucidum* by HPLC-ICP-MS after microwave-assisted extraction with enzyme [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2020, 56(11): 1152-1157.
- [22] 秦冲, 施畅, 万秋月, 等. HPLC-ICP/MS法测定富硒小麦中硒的形态[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(02): 140-144.
- QIN C, SHI C, WAN Q Y, et al. Speciation analysis of selenium in selenium-enriched wheat by HPLC-ICP/MS [J]. Food Research and Development, 2019, 40(02): 140-144.
- [23] HARATAKE M, HONGO M, MIYAUCHI M, et al. Albumin-mediated selenium transfer by a selenotrisulfide relay mechanism [J]. Inorganic chemistry, 2008, 47(14): 6273-6280.
- [24] HARATAKE M, FUJIMOTO K, ONO M, et al. Selenium binding to human hemoglobin via selenotrisulfide [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, 1723(1-3): 215-220.