

- [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877 (30): 3857-3864.
- [16] BADOU F, GRATA E, PERRENOUD L, et al. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry II: Confirmatory analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(25):4109-4119.
- [17] 宋子旺, 童萍, 郑丽辉, 等. 毛细管电泳安培法用于尿样中β-阻断剂类兴奋剂药物的研究[J]. 分析化学, 2008, 36 (12): 1624-1628.
- [18] BUSZEWSKI B, WELEROWICZ T, TEGOWSKA E, et al. Determination of selected beta-receptor antagonists in biological samples by solid-phase extraction with cholesterolic phase and LC/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393 (1): 263-272.
- [19] CHEN Z Y, YING S, LIU J H, et al. PRiME pass-through cleanup for the fast determination of aflatoxins in human serum by using LC-MS/MS[J]. Anal Methods, 2016, 8(7): 1457-1462.
- [20] 王智, 施宗伟, 郗存显, 等. PRiME HLB 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法快速检测牛肝中 18 种促生长剂类药物残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(10): 1219-1223.
- [21] Commission Regulation (EC). No. 657/2002, implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[S]. Official Journal of the European Union, 2002, L221: 8-36.
- [22] 祝伟霞, 张莉, 李睢, 等. 超高效液相色谱-多反应选择离子监测同步在线全扫描质谱技术测定保健品中的类安非他命和匹卡米隆[J]. 色谱, 2016, 34(7): 681-685.
- [23] 史娜, 郝杰, 姜洁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测动物源性食品中残留的 35 种 β-受体激动剂和 11 种 β-受体阻断剂[J]. 分析仪器, 2018(1): 20-31.
- [24] 杜珍妮, 苗宏健, 吴永宁. 含乳食品中 17 种塑化剂的检测[J]. 卫生研究, 2016, 45(3): 465-469.
- [25] 郝杰, 姜洁, 余建龙, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中多种兽药残留[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 266-272.

实验技术与方法

高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法测定富硒大蒜中硒形态

张珂, 张钦龙, 张蜀, 张曼玲, 高舸

(成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立大蒜中硒形态的高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱测定方法。方法 采用 ZORBAX SB-Aq 反相离子对色谱柱作为分析柱, 10.00 mmol/L 柠檬酸(铵)+5.00 mmol/L 己烷磺酸钠+2.00% 甲醇为流动相, 梯度洗脱, 可在 10.00 min 内完成对硒酸根(SeO_4^{2-})、亚硒酸根(SeO_3^{2-})、硒代胱氨酸(SeCys_2)、甲基-硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代蛋氨酸(SeMet)和硒代乙硫氨酸(SeEt)的分离分析。采用恒温振荡辅助酶提取法对大蒜进行提取。结果 SeO_4^{2-} 、 SeO_3^{2-} 、 SeCys_2 、 MeSeCys 、 SeMet 和 SeEt 的方法检出限分别为 0.40、0.40、0.44、0.47、0.35 和 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.00~100.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性相关系数(r)均>0.999, 线性关系良好。除 SeCys_2 , 加标回收率为 79.00%~104.00%, 相对标准偏差为 2.20%~5.00% ($n=7$)。结论 该方法稳定性好, 灵敏度和准确度高, 适用于大蒜中 5 种硒形态分析。

关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱; 富硒; 大蒜; 硒形态; 酶提取

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)05-0577-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.05.010

Determination of selenium species in Se-enriched garlic with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma tandem mass spectrometry

ZHANG Ke, ZHANG Qinlong, ZHANG Shu, ZHANG Manling, GAO Ge

(Chengdu Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of selenium species in Se-enriched garlic with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma tandem mass spectrometry (HPLC-ICP-MS/MS). **Methods** ZORBAX SB-Aq column was used as analytical column; 10 mmol/L citric acid (ammonium citrate), 5 mmol/L sodium

收稿日期: 2021-01-11

作者简介: 张珂 男 主管技师 研究方向为光谱和色谱分析 E-mail: 406400216@qq.com

通信作者: 高舸 女 主任技师 研究方向为光谱和色谱分析 E-mail: 1002348124@qq.com

hexane sulfonate and 2% methanol were used as mobile phase for gradient elution. Baseline separation of selenate (SeO_4^{2-}), selenite (SeO_3^{2-}), selenocysteine (SeCys_2), methylselenocysteine (MeSeCys), selenomethionine (SeMet) and Selenoethionine (SeEt) were completed in 10 min. Constant temperature oscillating assisted enzyme extraction was used to extract selenium species in garlic samples. **Results** The detection limits for SeO_4^{2-} , SeO_3^{2-} , SeCys_2 , MeSeCys , SeMet and SeEt were 0.40, 0.40, 0.44, 0.47, 0.35 and 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The linear correlation coefficients (r) were all above 0.999 in the range of 0-100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$. Except SeCys_2 , the recoveries were between 79.0%-104.0% and the relative standard deviations were within 2.2%-5.0%. **Conclusion** The result showed that the method had good stability with high sensitivity and accuracy, and was suitable for determination of five selenium species in garlic.

Key words: High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma tandem mass spectrometry; Se-enriched; garlic; selenium species; enzyme extraction

硒是人体必需微量元素之一,其分布具有地域性,我国西南很多地区都是缺硒地区^[1]。市面上有许多富硒食品用于补硒,如富硒大米、富硒鸡蛋、富硒大蒜等,但硒是一种双功效元素,过量也会对机体产生毒性,且毒性大小与其形态有关。研究发现,无机硒比有机硒毒性大,人体长期摄入过量硒会出现慢性毒性症状^[2]。富硒食品中硒形态多种多样,其应用价值与硒总量及其形态的分布有关。不同种类样品的硒形态提取效果差别较大,目前尚无一种通用的提取方法^[3-4],现行《食品安全国家标准 食品中硒的测定》(GB 5009.93—2017)^[5]分析的是总硒,对硒形态的分析仍处于研究阶段。元素形态分析需要色谱串联光谱/质谱进行分离分析,硒形态分析常见的研究方法有高效液相色谱-原子荧光光谱法^[6-7] (High performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry, HPLC-AFS)、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法^[8-10] (High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)等,前者灵敏度低,后者单杆质谱法(Mass spectrometry, MS)无法同时消除多原子离子和稀土元素双电荷的干扰。

本方法采用串联MS/MS的 O_2 反应模式可有效消除这些干扰,通过优化分离和提取条件,建立了恒温振荡辅助酶提取高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱(High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma tandem mass spectrometry, HPLC-ICP-MS/MS)测定富硒大蒜中硒形态的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1260 II HPLC-8900 ICP-MS/MS (Agilent); Milli-Q 超纯水系统 (Merck millipore); Avanti J-26S XP 高速离心机 (Beckman); CyberScan pH/Ion 510 酸度计

(EUTECH); KQ-500DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ZWY-100H 恒温培养振荡器 (ZHICHENG); BL310 电子天平 (Sartorius); JYL-C012 电动搅拌机 (Joyoung); AL204-IC 电子天平 (梅特勒)。

甲醇 (CH_3OH) 为色谱纯; 磷酸二氢铵 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)、柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)、乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)、己烷磺酸钠、氨水、硝酸均为优级纯。硒酸根 [SeO_4^{2-} , (41.5±1.3) $\mu\text{g}/\text{g}$, 以 Se 计, 下同]、亚硒酸根 [SeO_3^{2-} , (42.9±0.9) $\mu\text{g}/\text{g}$]、硒代胱氨酸 [SeCys_2 , (44.2±1.0) $\mu\text{g}/\text{g}$]、甲基-硒代半胱氨酸 [MeSeCys , (34.8±1.0) $\mu\text{g}/\text{g}$]、硒代蛋氨酸 [SeMet , (39.4±1.0) $\mu\text{g}/\text{g}$] 溶液标准物质均购于中国计量科学研究院; 硒代乙硫氨酸 (Seleno-D, L-ethionine, CAS No. 2578-27-0 纯度 98%) 购于 Toronto Research Chemicals; 生物成分标准物质大葱 [GBW10049 (GSB-27)]。

α -淀粉酶 (CAS No. 9000-90-2, ≥ 100 units/mg)、胃蛋白酶 (CAS No. 9001-75-6, ≥ 250 units/mg)、蛋白酶 K (CAS No. 39450-01-6, ≥ 30 units/mg)、蛋白酶 E (CAS No. 39445-21-6, ≥ 4 units/mg) 和蛋白酶 X IV (CAS No. 9036-06-0, 3.5 units/mg) 均购于 Sigma-Aldrich; 津腾 0.22 μm PES 聚醚砜滤头。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-Aq (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 反相离子对色谱柱; 流动相: 10.00 mmol/L 柠檬酸 + 5.00 mmol/L 己烷磺酸钠 (流动相 A 相)、甲醇 (流动相 B 相)、10.00 mmol/L 柠檬酸铵/柠檬酸 + 5.00 mmol/L 己烷磺酸钠 pH = 7.00 (流动相 C 相), 梯度洗脱见表 1。流速: 1.00 mL/min; 柱温: 25 $^\circ\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

1.2.2 ICP-MS/MS 参数

射频功率: 1 550 W; 玻璃同心雾化器; 蠕动泵速: 0.10/0.30 r/s, 辅助气流量: 0.19 L/min; 载气

表1 HPLC 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	A相/%	B相/%	C相/%
0.00	98.00	2.00	0.00
0.66	98.00	2.00	0.00
1.20	0.00	2.00	98.00
6.50	0.00	2.00	98.00
6.51	98.00	2.00	0.00
10.00	98.00	2.00	0.00

流量:0.95 L/min;反应气(O₂)流量:25%;雾化室温度:2℃;采样深度:8 mm;积分时间:0.50 s;采集时间:10 min;采集质量数:⁷⁸Se(Q1 78→Q2 94)。

1.3 溶液配制

硒单标储备液(25.00 mg/L):准确称取 SeO₄²⁻(1.204 8 g)、SeO₃²⁻(1.165 5 g)、SeCys2(1.131 2 g)、MeSeCys(1.436 8 g)和 SeMet(1.269 0 g),用纯水分别稀释至 2.000 0 g;准确称取 SeEt(0.025 0 g),用纯水定容至 1.00 L,4℃冷藏保存。

硒形态混合标准溶液(1.00 mg/L):分别准确吸取 400 μL 6种硒单标储备液于 10.00 mL 容量瓶中,用纯水稀释定容,临用现配。

硒形态混合标准溶液(标准曲线):分别准确吸取一定量的 1.00 mg/L 硒形态混合标准溶液,用纯水稀释成 0.00、1.00、5.00、10.00、25.00、50.00、100.00 μg/L 硒形态混合标准溶液,临用现配。

用纯水配制 4.00 mg/mL 的蛋白酶 E、蛋白酶 K 和蛋白酶 X IV 提取液,用 2.00% HCl 溶液配制 4.00 mg/mL 胃蛋白酶提取液,配制量根据样品数量而定,临用现配。

1.4 样品前处理

大蒜去皮搅拌粉碎后冷藏保存。称取大蒜 1 g 左右(精确到 0.0001 g)于 10.00 mL 离心管中,加入 5.00 mL 蛋白酶 X IV 提取液,充分混匀后放入 37℃ 恒温培养振荡器中(200 次/min)提取 2 h。然后 8 000 r/min(4℃)离心 5 min,取上清过 0.22 μm 滤膜后尽快测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

2.1.1 碰撞/反应模式选择

采用 Nogas(质量数 Q1 78、Q1 80)、O₂ 反应(质量数 Q1 78→Q2 94、Q1 80→Q2 96)和 He 碰撞(质量数 Q1 78→Q2 78、Q1 80→Q2 80)3 种模式测定标准物质大蒜中总 Se 含量[Gd 证书值为(155.00±34.00) μg/kg],结果见表 2,O₂ 反应模式具有较好的准确度,质量数选 Q1 78→Q2 94 时背景值最低。采用 He 碰撞模式可以有效降低 Nogas 模式受到的⁴⁰Ar³⁸Ar⁺、³⁹K³⁹K⁺、⁴¹K³⁷Cl⁺、⁴⁰Ca³⁸Ar⁺等多原子离

子的干扰,但是无法消除稀土元素¹⁵⁶Gd⁺⁺等双电荷的干扰,样品中含有稀土元素 Gd,测定结果偏高,而 O₂ 模式可以有效消除这些干扰,使得测定结果更准确可靠,因此选择 O₂ 反应模式作为分析模式。

表2 3种模式的准确度比较

Table 2 Accuracy comparison of the three models

反应模式	标样证书浓度 / (μg/kg)	Q178 测定 浓度 / (μg/kg)	Q180 测定 浓度 / (μg/kg)
Nogas 模式		82.96	*
O ₂ 反应模式	69.00±9.00	67.31	72.13
He 碰撞模式		76.01	78.87

注: * Nogas 模式 Q1 为 80 时⁴⁰Ar³⁸Ar⁺干扰大,标准系列线性差

2.1.2 O₂ 流量的优化

仪器自动调谐后,进行碰撞池气体流量优化设置,自动从最小值 0% 到 60%,分别吸取 1.00% HNO₃ 空白溶液和 10.00 μg/L 的标准溶液来绘制出空白背景和标准溶液的响应曲线,找出最优的 O₂ 流量。由图 1 可见,当 O₂ 流量为 25% 时,可以获得较高响应值和信噪比。因此,选择 25% 的 O₂ 流量作为反应气流量。

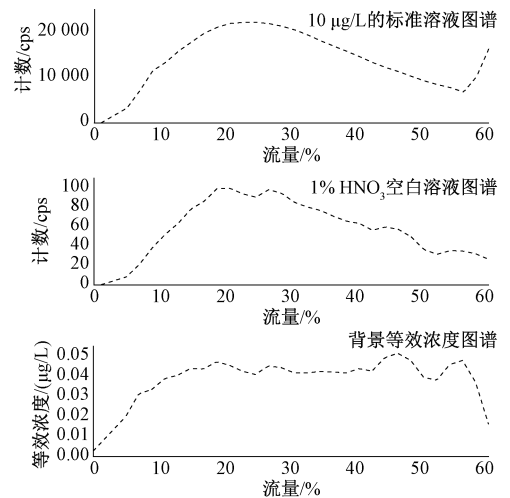


图1 反应气 O₂ 流量优化曲线

Figure 1 O₂ flow optimization curve

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱的选择

文献[11-13]中 Se 形态分析常用 Hamilton PRP-X100 阴离子交换色谱柱(4.1 mm×250 mm,10 μm)和 ZORBAX SB-Aq 反相离子对色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。陈绍占等^[14]采用 Hamilton PRP-X100 色谱柱分离了谷物中的硒形态,但因基质和酸度的影响,样品 SeCys2 与 MeSeCys 分离度不佳,且分析时间较长(16 min)。陆秋艳等^[15]采用 ZORBAX SB-Aq 反相离子对色谱柱快速分离了 7 种硒形态,但只做了水质分析,且 SeO₄²⁻ 和 SeO₃²⁻ 的分离度有待优化,考虑到食品基体和提取液酸度的影

响,需要对色谱条件进行再优化。综合对比了两种柱子对6种Se形态的分离度和分析时间,本文选择ZORBAX SB-Aq作为液相分析柱。

2.2.2 流动相条件优化

比较不同浓度和不同pH的柠檬酸铵、磷酸二氢铵、乙酸铵等对6种硒形态的分离效果,发现流动相pH是影响各形态分离的主要因素。在低pH(<3)的条件下 SeO_4^{2-} 和 SeO_3^{2-} 有较好的分离度,但4种有机硒保留时间延长,随着pH的升高(>4),4种有机硒保留时间缩短,但2种无机硒分离度变差。此外,以柠檬酸铵为流动相的分离效果优于磷酸二氢铵、乙酸铵,通过加入离子对试剂5.00 mmol/L己烷磺酸钠可提高分离效果。本文采用梯度洗脱方法,比较了不同浓度(5.00、10.00、20.00 mmol/L)的柠檬酸+5.00 mmol/L己烷磺酸钠溶液在低pH到pH=7.00的梯度洗脱效果,发现当柠檬酸浓度为10.00 mmol/L时即可使6种硒形态获得较好的响应值和分离效果,见图2。

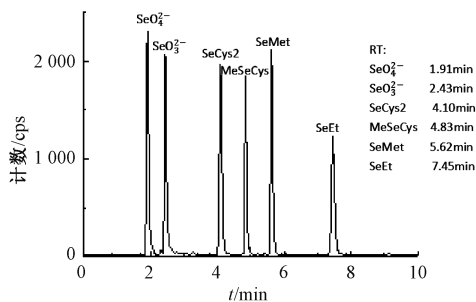


图2 6种硒形态色谱图(混合标准溶液浓度10.00 $\mu\text{g/L}$)

Figure 2 Standard chromatogram of 6 selenium species (10.00 $\mu\text{g/L}$)

2.2.3 甲醇对硒形态分析的影响

适量的甲醇可以提高有机硒的分离效果和各形态的灵敏度,考虑到有机相比例过高会影响到等离子体的稳定性,本文在梯度洗脱时分别考察了加入0.00%、1.00%、2.00%、4.00%和6.00%(V/V)甲醇。如图3所示,甲醇可以缩短有机硒的保留时间,低浓度的甲醇具增敏的作用,但当甲醇含量超过4.00%时,随着比例的增加,色谱峰峰形变差,响应值反而降低。综合考虑分析时间和响应值,本文选择2.00%甲醇比例。

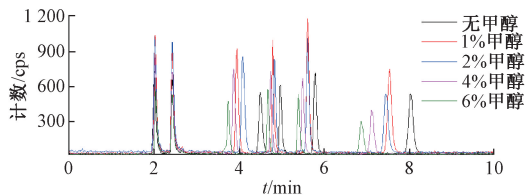


图3 甲醇比例对硒形态分离的影响

Figure 3 Effect of methanol ratio on the separation of selenium species

2.3 样品提取条件优化

文献中常见的食品中硒形态提取方法有酶提取、酸提取等。酸提取是采用HCl等低温下非氧化或还原型酸,对无机形态提取效果较好,对硒代氨基酸的提取效果不佳,且提取后样品的pH会影响到 SeO_4^{2-} 和 SeO_3^{2-} 的分离。用于形态提取的酶有淀粉酶、胃蛋白酶、蛋白酶K、蛋白酶E、蛋白酶XIV等。淀粉酶用于含淀粉较高的样品,如大米、小麦等;胃蛋白酶为内肽酶,不能将蛋白质分解成游离的氨基酸,其最佳活性pH为1.00~2.00,蛋白酶K、蛋白酶E、蛋白酶XIV的适宜pH为7.00±2.00,蛋白酶K适宜的温度为55℃~65℃,最佳温度为58℃,而胃蛋白酶、蛋白酶E、蛋白酶XIV为37℃。

2.3.1 提取液的选择

本文比较了恒温振摇5.00 mL的10.00 mmol/L柠檬酸+5.00 mmol/L己烷磺酸钠(流动相A相)、2.00% HCl溶液、胃蛋白酶(20.0 mg 37℃)、蛋白酶E(20.0 mg 37℃)、蛋白酶XIV(20.0 mg 37℃)和蛋白酶K(20.0 mg 58℃)对大蒜样品提取2 h的提取效果。实验结果表明,大蒜中能提取到的硒形态主要为硒代蛋氨酸,采用蛋白酶XIV所提取的硒形态总量最高,流动相A相、2.00% HCl溶液和胃蛋白酶的提取量较低,本文选择蛋白酶XIV提取法来进一步优化实验。

2.3.2 辅助方式的选择

超声辅助在样品提取中应用最多,但长时间超声会使样品沉积管底而降低与提取液的接触面,须在提取过程中频繁手动振摇;恒温振摇既可以保证温度恒定,也不会造成样品沉积。本文比较了超声和振摇方式辅助蛋白酶XIV对大蒜中硒形态的提取效果。实验结果显示,两种方式的提取效果相同,本实验选择更方便的恒温振摇方式。

2.3.3 提取时间的选择

本文比较了样品提取0.5、1、2、3、5、8 h的提取效果,如表3所示,0.5、1、2 h的提取量逐渐增加,但3 h的提取量基本与2 h的一致,5 h和8 h的提取量反而降低。因此,本文选择的提取时间为2 h。

值得注意的是,不同提取时间的加标样品中SeCys2基本完全损失,如图4所示。赵秋香等^[16]认为在酶溶性SeCys2的提取过程中,SeCys2易发生Se-Se键断裂,而在水浴振荡或超声下酶容易发生多肽链断裂或空间构型变化,断键的硒代半胱氨酸(SeCys)和酶分子中断裂出来的小分子结合形成新的存在形式。这一观点解释了SeCys2回收率低和色谱出现未知杂峰的问题,可是,未知峰的总面积

仍然相对偏低。本方法曾尝试对加标样品涡旋混匀后不经过恒温振摇直接过滤测定,SeCys2 回收率依旧较低,怀疑是 SeCys2 与溶液中 Ca、Mn 等离子或其他组分形成络合物或沉淀引起。对提取底物

进行消解测定,发现其内有一定量的 Se。目前,尚未找到大蒜中 SeCys2 的合适提取方法,有待进一步探讨。其他几种形态的加标回收率良好,表 3 中未检出或检出含量低可能是该样品含量较低。

表 3 不同提取时间 Se 的提取效果

Table 3 The extraction effect of Se at different extraction time

Se/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.5 h	1 h	2 h	3 h	5 h	8 h
SeO_4^{2-}	2.70	3.10	3.60	3.70	3.40	2.60
SeO_3^{2-}	ND	0.80	1.30	1.10	0.90	0.50
SeCys2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MeSeCys	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SeMet	22.40	28.60	31.10	31.60	28.40	24.80
SeEt	2.20	2.60	3.10	3.10	2.90	2.20
总 Se	60.50	60.50	60.50	60.50	60.50	60.50
提取率	45.10%	58.00%	64.60%	65.30%	58.80%	49.80%

注:ND 为未检出

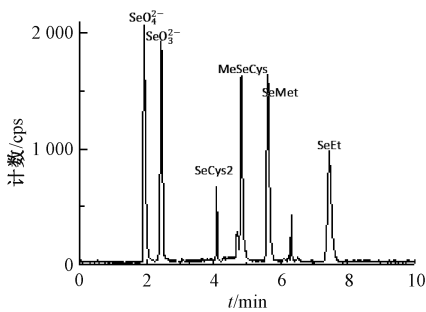


图 4 2 h 提取 6 种混标色谱图(加标浓度 10.00 $\mu\text{g}/\text{L}$)

Figure 4 The chromatogram of Se mixed standard with 2 h extracted ($10.00 \mu\text{g}/\text{L}$)

2.3.4 蛋白酶 X IV 浓度优化

有文献^[14]对蛋白酶 X IV 的用量进行优化,当取样量为 0.10~0.30 g 的干样谷类时,20.00 mg 的蛋白酶 X IV 具有最佳的提取效率。本方法样品量为 1.00 g 左右的湿样,以 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.00 mL 提取液提取 2 h,分别比较了 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mg/mL 的蛋白酶 X IV 提取液的提取效果,发现从 1.00 mg/mL 到 4.00 mg/mL,随着酶浓度的增加,提取效果逐渐增加,4.00 mg/mL 和 5.00 mg/mL 的提取效果相似。因此,本文选择 4.00 mg/mL 的酶提取液浓度。

2.4 方法学指标

2.4.1 线性及方法检出限

6 种 Se 形态按 1.3 配制的标准溶液系列进行测定,对混合标准溶液进行稀释测定,以 3 倍基线噪声 ($S/N = 3$) 对应的浓度表示检出限,以 10 倍基线噪声 ($S/N = 10$) 对应的浓度表示定量限,结果见表 4。

2.4.2 精密度

在样品中添加 3 种浓度混合标准溶液,使其加

表 4 方法检出限和定量限

Table 4 Detection limit and quantification limit of the method

	线性范围 /($\mu\text{g}/\text{L}$)	相关系数	检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SeO_4^{2-}	0~100	0.999 4	0.40	1.32
SeO_3^{2-}	0~100	0.999 1	0.40	1.32
SeCys2	0~100	0.999 5	0.44	1.46
MeSeCys	0~100	0.999 8	0.47	1.58
SeMet	0~100	0.999 9	0.35	1.17
SeEt	0~100	0.999 4	0.45	1.49

标浓度为 5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,每个浓度做 7 个平行样,结果见表 5,除 SeCys2 因提取率低而精密度差,其余形态的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) < 5%。

表 5 方法精密度 ($n = 7$)

Table 5 Detection precision of six Se species ($n = 7$)

	5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	10.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	20.00 $\mu\text{g}/\text{L}$
SeO_4^{2-}	5.00%	4.30%	3.60%
SeO_3^{2-}	4.70%	3.70%	2.20%
SeCys2	32.30%	30.00%	24.20%
MeSeCys	4.20%	4.00%	3.80%
SeMet	4.90%	4.10%	3.60%
SeEt	4.70%	4.30%	3.90%

2.4.3 准确度

在大蒜样品中分别加入低、中、高 3 种浓度的混合标准溶液,进行测定,计算加标回收率。如表 6 所示,除 SeCys2 回收率不足 10%,其余组分回收率在 79.00%~104.00%。

2.5 样品测定

随机购买数种富硒大蒜和普通大蒜,采用本方法分析其硒形态,并取样消解后按 GB 5009.93—2017 中 ICP-MS 法 (O_2 反应模式) 作总硒含量分析。实验发现,富硒大蒜中硒主要为 SeMet,其含量是

表 6 加标回收率 ($n=3, \mu\text{g/L}$)

Table 6 Detection recoveries of six Se species ($n=3, \mu\text{g/L}$)

	本底值 /($\mu\text{g/L}$)	添加量 /($\mu\text{g/L}$)	加标后测 得量/($\mu\text{g/L}$)	回收率 /%
SeO ₄ ²⁻	0.73	5.00	4.79	81.12
		10.00	9.53	88.00
		20.00	19.51	93.90
SeO ₃ ²⁻	0.26	5.00	4.52	85.20
		10.00	9.37	91.11
		20.00	19.72	97.30
SeCys2	ND	5.00	0.38	7.60
		10.00	0.59	5.90
		20.00	1.63	8.15
MeSeCys	ND	5.00	4.30	86.00
		10.00	9.55	95.50
		20.00	20.79	103.95
SeMet	6.13	5.00	10.42	85.80
		10.00	14.88	87.50
		20.00	24.59	92.30
SeEt	0.61	5.00	4.56	79.00
		10.00	9.21	86.00
		20.00	18.91	91.50

注:ND 表示未检出

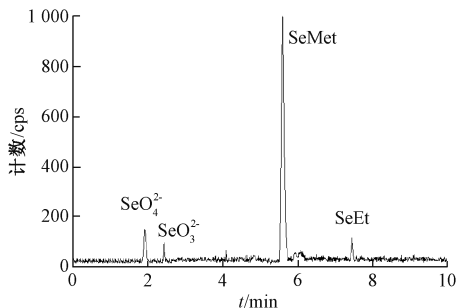


图 5 富硒大蒜中的硒形态含量色谱图

Figure 5 The chromatogram of Se species in Selenium-rich Garlic

普通大蒜的 10 倍以上,此外还含有少量的硒酸根、亚硒酸根及一些未知硒形态。

3 结论

本方法利用串联 MS/MS 的 O₂ 反应模式,降低了干扰,提高了元素检测的灵敏度和准确度,采用恒温振荡辅助蛋白酶 X IV 提取大蒜中的 Se 形态,方法简单、可靠。遗憾的是,样品中 SeCys2 因基质吸附而不能提取出来,其提取方法需进一步探讨。因此,本方法适用于大蒜中的 5 种 Se 形态分析。

参考文献

[1] 朱燕云, 吴文良, 赵桂慎, 等. 硒在动植物及微生物体中的转化规律研究进展[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(3): 189-198.

[2] 仲娜, 李新荣, 仲丽, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析几种富硒产品的硒总量及其形态[J]. 分析科学学报, 2013, 29(3): 435-438.

[3] 陆奕娜, 林文, 李冠斯, 等. 硒形态分析研究进展[J]. 分析试验室, 2018, 37(4): 480-487.

[4] 陈贵宇, 潘煜辰, 李清清, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法分析富硒茶叶中硒的形态[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 155-159.

[5] 中华人民共和国卫生部. 2017. GB 5009.93—2017 食品安全国家标准 食品中硒的测定[S]. 北京: 中国标准出版社.

[6] 唐沐岚, 鲍征宇, 范博伦, 等. 顺序提取分离-氢化物发生-原子荧光光谱法测定富硒土壤中 5 种形态硒的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(4): 408-412.

[7] 秦玉燕, 时鹏涛, 王运儒, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法测定富硒食品中 5 种形态硒的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(5): 566-572.

[8] 吕亚宁, 宋伟, 沈贵兰, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法同时测定果汁饮品中砷、硒与铬元素的无机形态[J]. 分析测试学报, 2018, 37(9): 1087-1091.

[9] 熊珺, 覃毅磊, 龚亮, 等. 超声辅助酶法提取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用分析食品中无机硒和硒氨基酸 6 种硒形态[J]. 食品科技, 2016, 41(12): 266-272.

[10] CHENG H Y, ZHANG W W, WANG Y C, et al. Graphene oxide as a stationary phase for speciation of inorganic and organic species of mercury, arsenic and selenium using HPLC with ICP-MS detection[J]. Microchimica Acta, 2018, 185(9): 1-8.

[11] 秦冲, 施畅, 万秋月, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用检测土壤中的无机硒形态[J]. 岩矿测试, 2018, 37(6): 664-670.

[12] 张春林, 王东, 王岩, 等. HPLC-ICPMS 联用法测定富硒酵母粉中砷和硒的形态分析[J]. 食品科技, 2019, 44(6): 326-331.

[13] 林晓娜, 戴骥, 何卫东, 等. 微波萃取结合高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱同步分析水中砷、硒和铬形态[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 328-334.

[14] 陈绍占, 唐德剑, 李晓玉, 等. 谷类食品中硒形态超声酶提取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定[J]. 中国公共卫生, 2020, 36(1): 130-136.

[15] 陆秋艳, 张文婷, 林秋莲, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用快速同时分析水中 5 种砷和 7 种硒[J]. 环境化学, 2018, 37(7): 1671-1674.

[16] 赵秋香, 冯超, 莫书伟, 等. 形态硒的研究过程中硒代胱氨酸的稳定性[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 2074-2078.