

实验技术与方法

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定
富硒食品中无机硒和有机硒的含量

张颖,杨清清,宋毅,闻胜,黄文耀

(湖北省疾病预防控制中心卫生检验检测研究所 应用毒理湖北省重点实验室,湖北 武汉 430079)

摘要:目的 建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP/MS)测定富硒食品中无机硒和有机硒含量的方法。方法 采用纯水提取富硒食品中的无机硒,通过透析作用分离小分子量的硒化合物与样品基体,利用阴离子交换色谱分离,采用Hamilton PRP-X100分析柱和预柱(250 mm×4 mm,10 μm),流动相为5 mmol/L柠檬酸铵中加2%甲醇,电感耦合等离子体质谱仪测定样品中无机硒的含量。根据总硒与无机硒的差值计算有机硒含量。结果 硒(IV)和硒(VI)检出限分别为6.67和9.95 μg/kg,二者回收率分别为70.2%~108.1%和73.2%~116.9%。结论 该方法可满足富硒食品中无机硒和有机硒含量的测定。

关键词:高效液相色谱法;电感耦合等离子体质谱法;硒;微量元素;形态;测定;食品;富硒食品

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0181-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.014

**Determination of inorganic and organic selenium in food by high performance
liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry**

ZHANG Ying, YANG Qing-qing, SONG Yi, WEN Sheng, HUANG Wen-yao

(Hubei Provincial Key Laboratory for Applied Toxicology, Institute of Health Inspection and Testing,
Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hubei Wuhan 430079, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of inorganic and organic selenium in food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC/ICP-MS). **Methods** Inorganic selenium was extracted by ultrapure water. Dialysis effect was used to remove sample matrix, inorganic selenium was separated and detected by anion exchange chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Results** The detection limit of Se (IV) and Se (VI) were 6.67 and 9.95 μg/kg, the recoveries were 70.2%-108.1% and 73.2%-116.9%. **Conclusion** This method could be used for the determination of inorganic selenium and organic selenium in selenium-enriched food.

Key words: High performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry; selenium; trace elements; species; determination; food; selenium-enriched foods

硒是人体必需的微量元素之一,在人体内有重要的生理作用。研究^[1]表明,硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、甲状腺素脱碘酶(IDI)、硒代磷酸盐合成酶(TrxR)等多种酶的组成成分,这些酶具有清除自由基、防止脂质过氧化、延缓衰老、抗肿瘤等作用。硒的生物功能与其化学形态和含量密切相关^[2],不同形态硒的吸收率、生物效应及其毒性相差甚远^[3]。硒主要分为无机硒和有机硒。

无机硒包括亚硒酸根、硒酸根和单质硒,单质硒不溶于水,无法从环境迁移到食品中,因此食品中的无机硒主要为亚硒酸根和硒酸根,其毒性较大,利用率不理想,生物有效性低,被严格限制使用量。日本、美国等发达国家早已禁止在食品中添加亚硒酸钠等无机硒^[4]。有机硒包括硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸等含硒小分子以及硒与碳、硫等原子相结合而形成的含硒生物大分子^[5]。硒代蛋氨酸是人类摄取硒元素的主要来源^[6]。目前市面上许多食品采用直接人为添加无机硒来获得“富硒”食品,而GB 5009.93—2010《食品安全国家标准 食品中硒的测定》^[7]只能测定总硒,不能对含硒产品的有效性和安全性进行正确评估,因此,开展富硒食品中的硒的形态分析,准确测定食品中无机硒

收稿日期:2017-01-05

作者简介:张颖 女 主管技师 研究方向为无机化学

E-mail:290921041@qq.com

通信作者:黄文耀 男 主任技师 研究方向为无机化学

E-mail:313234967@qq.com

的含量,对科学评价富硒产品,指导消费者科学补硒具有重要意义。

文献报道关于无机硒的测定方法主要为高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP/MS)^[2,4-6]、高效液相色谱-原子吸收光谱(HPLC-AAS)^[8-9]、高效液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱(HPLC-HG-AFS)^[10-14]等联用技术。其中,HPLC-AAS和HPLC-HG-AFS测定时需将硒(VI)转化为硒(IV),而在线联用时硒(VI)反应速度太慢导致灵敏度过低^[12],同时,将硒(VI)转化为硒(IV)的过程中,硒的有机态会部分转化成无机态,影响无机硒的准确测定。HPLC-ICP/MS由于具有灵敏度高、速度快、线性范围宽、可多元素同时分析等特点,是元素形态分析领域应用最为广泛的技术。本试验采用HPLC-ICP/MS法测定食品中的硒(VI)和硒(IV),选择合适的流动相和分离条件可直接分离无机硒和各种有机硒小分子,避免了硒(VI)转化为硒(IV)以及有机硒的转化。

目前,硒的形态分析前处理方法主要有酸消解^[15]、酶解^[12]和直接振荡提取^[14,16-17]等,其中酸消解方法在强酸处理过程中常易使硒发生形态转变,酶解法通常用于测定有机硒,选择温和的溶液直接振荡提取的方法可减少处理过程中有机硒转化为无机硒。本试验采用纯水直接振荡提取无机硒,同时由于样品基体复杂,干扰严重,使用透析袋去除基体,可提高方法的灵敏度。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

普通样品包括包菜、矿泉水、红茶、大米、猪肉、鸡蛋、玉米等购自武汉某大型超市,富硒样品包括富硒茶叶、绞股蓝、玉米粉、葛粉、富硒黄豆、富硒香菇、富硒大米、富硒西兰花、富硒鸡蛋等购自湖北省恩施地区,标注有“富硒”字样的食品。

1.1.2 主要仪器与试剂

YM-T2000CT恒温型多用途恒温超声提取机(上海豫明仪器有限公司)、820-MS等离子体质谱仪(德国耶拿)、Agilent-1200型高效液相色谱仪(美国Agilent)、Hamilton PRP-X100分析柱和预柱(250 mm×4 mm、10 μm,美国Hamilton)、AFS-9700双道原子荧光光度计(北京海光仪器)、MILESTONE ETHOS ONE微波消解仪、电子调温电热板、Milli-Q Advantage A10超纯水仪、电热恒温鼓风干燥箱、水浴恒温振荡器、旋转蒸发仪、透析袋。

硒单元素溶液标准物质[GBW(E)080215,

100 μg/ml,中国计量科学研究院];硒(IV)标准溶液(1 000 μg/ml)、硒(VI)标准溶液(878 μg/ml)均购自美国Inorganic Ventures;硒代胱氨酸(SeCys₂)、硒代蛋氨酸(SeMet)、L-硒-甲基硒代半胱氨酸(L-SeMc)均为高纯试剂,均购自J&K Scientific;柠檬酸、氨水、硝酸、盐酸、铁氰化钾、硼氢化钠、氢氧化钠为分析纯;试验用水为Milli-Q Advantage A10实验室水纯化系统(>18.2 MΩ·cm);有机微孔滤膜(0.45 μm)。

1.2 方 法

1.2.1 样品制备

样品烘干粉碎过筛后,准确称取5.0 g于离心管中,加入20 ml超纯水混匀后,于90℃条件下水浴振荡提取30 min,再经超声提取20 min,将提取液转移放入透析袋,浸入100 ml纯水中浸泡透析8 h,然后收集100 ml透析液,透析袋再次浸入100 ml纯水中浸泡8 h,收集合并两部分透析液,且混合均匀,用旋转蒸发仪浓缩后,用超纯水定容至10 ml,制成无机硒待测样液,检测前过0.45 μm滤膜后上机检测,同时做空白试验。

1.2.2 仪器条件

色谱条件:Hamilton PRP-X100分析柱和预柱(250 mm×4 mm,10 μm);流动相为5 mmol/L柠檬酸铵中加2%甲醇,柠檬酸和氨水准确调节pH=4.9,流速1 ml/min,进样量100 μl。

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)参考条件见表1。

表1 ICP-MS工作参数

质荷比 /(m/z)	射频功率 /W	等离子气流速 /(L/min)	雾化气流速 /(L/min)	辅助气流速 /(L/min)
78	1 400	18.0	0.98	1.8

2 结果与分析

2.1 流动相的选择及其酸度的影响

本试验流动相为5 mmol/L柠檬酸铵中加2%甲醇,达到一定的pH值时,不仅能够很好地分离硒酸根和亚硒酸根,同时还能够分离硒代胱氨酸、L-硒-甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸。在不同pH条件下,各种硒形态的离子存在形式不同^[18];因此,流动相的pH值对硒形态的分离效果影响很大。流动相使用柠檬酸和氨水调节pH值,不同的流动相pH值下各种硒形态的保留时间见图1。

当pH=3.0时,硒代胱氨酸、L-硒-甲基硒代半胱氨酸和硒(IV)三者峰形重合。pH值逐渐增大,硒代胱氨酸和L-硒-甲基硒代半胱氨酸逐渐分离,但L-硒-甲基硒代半胱氨酸和硒(IV)基线仍然不能完

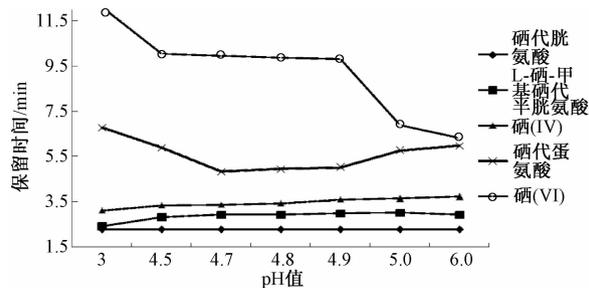


图1 流动相 pH 值对 5 种硒形态保留时间的影响

Figure 1 Effect of pH of mobile phase on the retention time of 5 selenium species

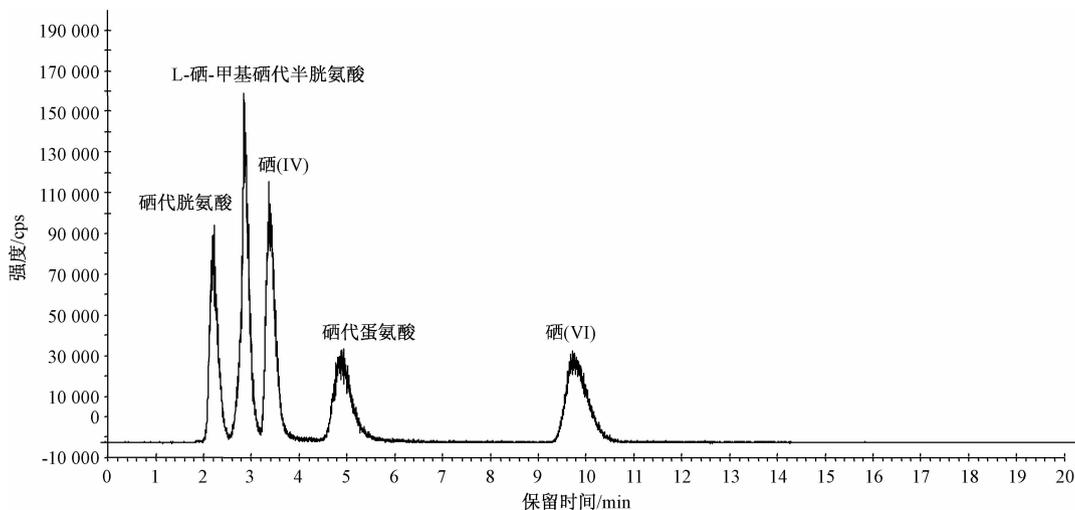


图2 5 种硒形态标准溶液色谱图

Figure 2 Chromatogram of 5 selenium species standard solutions

基酸,其中部分小分子硒代氨基酸也具有水溶性,因此无机硒应采取温和的提取方式,避免有机硒小分子转化为无机硒。无机硒的提取一般采用水^[13]、碱^[19]、酸^[20]等提取试剂,本研究比较了不同提取剂对无机硒提取效率的影响。

2.2.1 提取方式

选择市售的普通大米,按照 GB 5009.93—2010^[7]测定后总硒、硒(IV)和硒(VI)均未检出的大米为空白样品,研磨成粉末,分别加入纯水、0.1 mol/L 盐酸、0.1 mol/L 氢氧化钠,在 90 °C 水浴中振荡提取 30 min^[20],测定加标回收率,发现 0.1 mol/L 盐酸的回收率最低,水和 0.1 mol/L 氢氧化钠提取液提取的硒含量相当,回收率相近,考虑到流动相 pH 值要求严格,选择纯水作为无机硒的提取剂,见表 2。

2.2.2 透析条件

为降低样品基体的影响,使用透析袋分离基体,降低基体干扰,提高方法的灵敏度。比较不同截留分子量透析袋对透析效率的影响,使用不同截留分子量(200、500、1 000 D)透析袋(只透析一次),结果发现不同截留分子量的透析袋的回收率

全分离,当 pH = 4.9 时,5 种硒形态能够达到基线分离且峰形很好。但当 pH > 5.0,硒(VI)的保留时间急剧减少,与硒代蛋氨酸的峰形重合,基线不能完全分离。综合考虑分离度和保留时间,选择 pH = 4.9 的 5 mmol/L 柠檬酸铵溶液为流动相,流速 1 ml/min 获得 5 种不同硒形态混合标准溶液的色谱图,见图 2,5 种不同的硒形态均能有效分离。

2.2 前处理方法的确定

食品中无机硒的存在形态主要为可溶于水的硒酸根和亚硒酸根,有机硒主要是硒蛋白和硒代氨

表 2 不同提取液中无机硒的加标回收率

Table 2 Effect of different extraction agents on recoveries

硒形态	提取液	加标量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%
硒(IV)	0.1 mol/L 氢氧化钠	80.0	78.8	98.5
硒(VI)	0.1 mol/L 氢氧化钠	70.0	67.9	97.0
硒(IV)	0.1 mol/L 盐酸	80.0	59.1	73.9
硒(VI)	0.1 mol/L 盐酸	70.0	42.7	61.0
硒(IV)	水	80.0	80.8	101.0
硒(VI)	水	70.0	68.1	97.3

基本一致,见表 3。透析袋截留分子量对透析效率的影响很小,故本研究采用截留分子量为 200 D 的透析袋。

表 3 不同截留分子量对透析效率的影响

Table 3 Effect of different molecular weight cut-off recoveries

截留分子量/D	硒形态	加标量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%
200	硒(IV)	80.0	48.7	60.9
	硒(VI)	70.0	41.3	59.0
500	硒(IV)	80.0	47.9	59.9
	硒(VI)	70.0	42.8	61.1
1 000	硒(IV)	80.0	49.2	61.5
	硒(VI)	70.0	40.1	57.3

比较不同的透析时间(只透析一次)对透析效

率的影响,测定无机硒的加标回收率,结果见图3。从图中可以看出,透析时间达到8 h后,随着透析时间的增加,回收率保持稳定,为降低时间成本,选择透析时间8 h为确定的透析时间。

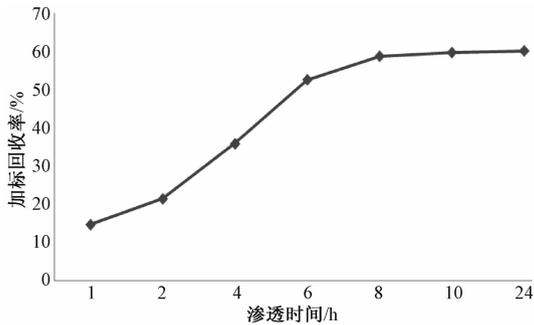


图3 不同渗透时间对回收率的影响

Figure 3 Effect of dialysis time on recoveries

2.3 标准曲线和检出限

配制硒(IV)和硒(VI)浓度各为20.0、40.0、80.0、120.0和200.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液,以各浓度色谱峰面积(y)对应质量浓度(x)绘制标准曲线,均具有良好的线性关系。根据信噪比 $S/N=3$ 计算检出限(LOD),结果见表4。

表4 硒(IV)和硒(VI)的线性方程、相关系数和检出限

Table 4 Linear equations, correlation coefficient and limits of detection of Se(IV) and Se(VI)

硒的形态	线性方程	相关系数 r	LOD/ $(\mu\text{g/kg})$
硒(IV)	$y = 134.5x + 290.4$	0.999	6.67
硒(VI)	$y = 212.5x - 2516$	0.998	9.95

2.4 样品加标回收试验

选择本底值较低的样品,按照GB 5009.93—2010^[7]测定后总硒、硒(IV)和硒(VI)含量均较低的样品为空白样品,采用标准加入法对方法的准确度和精密性进行验证。分别加入3种浓度水平的无机硒混合标准溶液,按样品制备过程处理后进行精密度和回收率试验,结果见表5,硒(IV)和硒(VI)的回收率范围为70.2%~116.9%,二者的相对标准

偏差(RSD)均小于15%。部分样品(如红茶和猪肉)存在加标回收率偏低的现象。其中茶叶类样品可能是由于茶叶具有网状结构,比表面积大,含有多种活性基团^[21],对加标物吸附作用严重。猪肉样品由于其脂肪含量较高,影响透析效果。对此类样品的测定可在后续的研究中进一步优化。

表5 硒形态的加标回收率($n=6$)

Table 5 Recoveries of selenium species

样品	硒(IV)			硒(VI)		
	加标量 / $(\mu\text{g/kg})$	回收率 /%	RSD /%	加标量 / $(\mu\text{g/kg})$	回收率 /%	RSD /%
包菜	10.0	88.2	13.1	10.0	75.1	12.6
	50.0	95.3	6.9	50.0	102.4	9.5
	200.0	108.1	7.3	200.0	98.4	4.6
矿泉水	10.0	107.3	6.3	10.0	105.8	6.3
	50.0	110.5	5.6	50.0	100.6	2.0
	200.0	103.8	3.0	200.0	103.9	1.8
红茶	10.0	70.2	11.0	10.0	81.2	11.5
	50.0	81.0	6.4	50.0	75.4	10.6
	200.0	81.1	5.5	200.0	73.2	4.0
大米	10.0	106.1	9.2	10.0	92.0	10.0
	50.0	80.6	12.1	50.0	111.2	11.2
	200.0	85.1	10.3	200.0	98.7	2.7
猪肉	10.0	88.7	14.2	10.0	92.7	10.4
	50.0	78.8	2.8	50.0	98.6	10.9
	200.0	72.9	2.5	200.0	97.5	6.2
鸡蛋	10.0	76.4	10.1	10.0	116.9	14.3
	50.0	105.4	6.2	50.0	86.6	13.9
	200.0	95.5	5.9	200.0	111.2	3.5
玉米	10.0	97.4	8.2	10.0	97.5	11.3
	50.0	103.3	3.0	50.0	107.7	5.6
	200.0	102.2	1.8	200.0	95.8	2.6

注:样品中硒(IV)和硒(VI)的本底值均为未检出。

2.5 样品的测定

本试验采用总硒含量减去无机硒含量来推测有机硒含量。对湖北省恩施地区市场上购买的富硒食品进行检测,结果见表6。其中总硒的含量为按照GB 5009.93—2010^[7]方法进行两次重复测定的均值,无机硒含量为本方法3次测定的均值。从表6可以看出天然富硒食品中硒的主要存在形式为有机硒。

表6 富硒食品检测结果

Table 6 Determination results of inorganic selenium in selenium-enriched food

样品	总硒 / $(\mu\text{g/kg})$	硒(IV) / $(\mu\text{g/kg})$	硒(VI) / $(\mu\text{g/kg})$	无机硒 / $(\mu\text{g/kg})$	有机硒 / $(\mu\text{g/kg})$	无机硒 /%
富硒茶叶	1 500.61	210.23	99.89	310.12	1 190.49	20.7
绞股蓝	1 729.62	313.10	122.82	435.92	1 293.70	25.2
玉米粉	504.36	68.61	26.26	94.87	409.49	18.8
葛粉	964.40	131.78	76.10	207.88	756.52	21.6
富硒黄豆	3 931.87	411.59	210.92	622.51	3 309.36	15.8
富硒香菇	642.21	60.75	39.69	100.44	541.77	15.6
富硒大米	1 712.75	158.97	57.94	216.91	1 495.84	12.7
富硒西兰花	2 163.88	268.67	135.91	404.58	1 759.30	18.7
富硒鸡蛋	315.27	48.75	21.85	70.60	244.67	22.4

3 小结

本试验建立的 HPLC-ICP/MS 联用法可将食品中 5 种硒形态有效分离,通过对硒(IV)和硒(VI)的定量分析测得食品中无机硒的含量,并通过总硒的测定进一步计算出富硒食品中有机硒的含量。本方法 LOD 低,硒(IV)和硒(VI)的 LOD 分别为 6.67 和 9.95 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率范围为 70.2% ~ 116.9%,RSD 均小于 15%,基本能够满足富硒食品中无机硒含量测定的需要,尤其为打击市场上人工添加无机硒提供技术手段。

本试验的方法可直接测定硒(VI)含量,避免了使用 HPLC-HG-AFS 测定无机硒需要解决转化硒(VI)效率低而引起的灵敏度低的问题,同时本方法通过透析作用降低大分子物质的干扰,提高了样品检测的灵敏度,为复杂基体的样品检测提供了一条新思路,但样品前处理所需时间较长,需要进一步改善研究。

参考文献

[1] 黄开勋,徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2009:145-228.

[2] 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]. 分析化学研究报告,2006,34(6):749-753.

[3] 牟维鹏,田园,朴建华,等. 亚硒酸钠和硒蛋氨酸的毒性比较[J]. 卫生研究,2004,33(6):700-703.

[4] 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联用检测食品中的五种硒形态[J]. 色谱,2011,29(3):223-227.

[5] 张涛,高愈希,李柏,等. 高效液相色谱-等离子质谱联用方法研究富硒大米中硒的形态[J]. 分析化学,2008,36(2):206-210.

[6] 王欣,幸宛娜,陈泽勇,等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法检测富硒食品中 6 种硒形态[J]. 分析化学,2013,41(11):1669-1674.

[7] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中硒的测定:GB 5009.93—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[8] KOZAK L, RUDNICKA M, NIEDZIELSKI P. Determination of

inorganic selenium species in dietary supplements by hyphenated analytical system HPLC-HG-AAS[J]. Food Analytical Methods, 2012,5(6):1237-1243.

[9] BERMEJO P, BARCIELA J, PENA E M, et al. Determination of selenium in infant formulas whey fractions by SEC HPLC-HG-ETAAS[J]. J Anal At Spectrom, 2001,16(2):188-193.

[10] WALLSCHLAEGER D, BLOOM N S. Determination of selenite, selenate and selenocyanate in waters by ion chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (IC-HG-AFS)[J]. J Anal At Spectrom, 2001,16(11):1322-1328.

[11] 尚德荣,秦德元,赵艳芳,等. 高效液相色谱-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[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(6):1847-1852.

[12] 肖志明,宋荣,贾铮,等. 液相色谱-氰化物发生原子荧光光谱法测定富硒酵母中硒的形态[J]. 分析化学,2014,42(9):1314-1319.

[13] 贺与平,李维香,何素芳,等. 氢化物发生原子荧光光谱法测定螺旋藻中无机硒和有机硒[J]. 光谱实验室,2009,26(6):1404-1408.

[14] 王世成,王颜红,刘艳辉,等. 氢化物发生-原子荧光法测定鸭蛋中无机硒和有机硒[J]. 食品科学,2013,34(4):183-185.

[15] 铁梅,方禹之,孙铁彪,等. HPLC-ICP-MS 联用技术在富硒金针菇硒的形态分析中的应用[J]. 高等学校化学学报,2007,28(4):635-639.

[16] 崔海容,陈建华,谷家越,等. 顺序注射 HG-AFS 法测定富硒农产品中无机硒和有机硒[J]. 分析科学学报,2005,21(5):545-548.

[17] 孙汉文,冯波. 悬浮进样-氢化物发生原子荧光法用于面粉和富硒盐中微量硒形态分析[J]. 食品科学,2010,31(16):225-228.

[18] ZHENG J, OHATA M, FURUTA N, et al. Speciation of selenium compounds with ion-pair reversed-phase liquid chromatography using inductively coupled plasma mass spectrometry as element-specific detection[J]. J Chromatogr A, 2000,874(1):55-64.

[19] 李晶,孔维恒,高峰,等. HPLC-ICP-MS 法分析测定富硒保健品中的硒形态[J]. 现代仪器,2012,18(3):36-39.

[20] 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.

[21] 田奇峰,孙杰. 茶叶对氟的吸附研究[J]. 化学与生物工程,2011,28(4):29-31.