

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00223

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

王丙涛, 谢丽琪, 林燕奎*, 颜 治, 王楼明

(深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518035)

摘要: 建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)联用检测硒酸盐(SeVI)、亚硒酸盐(SeIV)、硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys₂)和硒代乙硫氨酸(SeEt)的方法。采用Hamilton PRP X-100色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),使用5 mmol/L的柠檬酸溶液(pH 4.5)作为流动相,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)检测,在21 min内可以完全分离5种硒形态。各形态硒的线性相关系数均大于0.999 5,SeVI、SeIV、SeMet、SeCys₂、SeEt的检出限分别为0.4、0.4、5.6、0.9、1.2 μg/L。探讨了不同提取方法的提取效果,鲜蘑菇和猪肉样品加标回收实验表明,对水溶性良好的无机硒和硒代蛋氨酸而言,采用柠檬酸溶液提取的效果非常好,SeIV和SeVI的回收率均在100%左右,SeMet的回收率为85.0%~95.3%;用蛋白酶水解提取,SeCys₂和SeEt的回收率为79.9%~91.5%。该方法可完全满足食品中这5种硒形态的准确定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱; 硒化合物

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)03-0223-05

Determination of selenium species in food by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry

WANG Bingtao, XIE Liqi, LIN Yankui*, YAN Zhi, WANG Louming

(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518035, China)

Abstract: An analytical method for selenium species of selenate (SeVI), selenite (SeIV), selenomethionine (SeMet), selenocystine (SeCys₂) and selenoethionine (SeEt) was established using high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). A Hamilton PRP X-100 reversed-phase anion exchange column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a 5 mmol/L citric acid buffer solution (pH 4.5, adjusted with 20% (v/v) ammonia) as mobile phase was used for separation and ICP-MS was used for detection. The five species were completely separated within 21 min. All the linear correlation coefficients of the five selenium species were greater than 0.999 5, and the detection limits of SeVI, SeIV, SeMet, SeCys₂, SeEt were 0.4, 0.4, 5.6, 0.9 and 1.2 μg/L, respectively. The extraction procedure was studied for fresh mushroom and pork samples. For water-soluble selenium compounds, citric acid was a good extraction solution, and the recoveries were around 100% for inorganic selenium and in the range of 85.0%–95.3% for SeMet; but worse for SeCys₂ and SeEt. As for the proteinase K, the recoveries of SeCys₂ and SeEt were raised to the range of 79.9%–91.5%. The method has the advantages of simple operation and good accuracy, and can be used for the quantitative determination of the five selenium species in food.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); selenium compounds

* 通讯联系人: 林燕奎, 副主任技师, 从事食品理化检测。Tel: (0755) 26881671, E-mail: linyankui@tom.com.

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科研项目(课题编号: 2006SZK11)。

收稿日期: 2010-10-12

硒是人体必需的 14 种微量元素之一,具有保护心脏、抗肝坏死、解毒、提高免疫力、延缓衰老等多种药理作用,被誉为“生命火种”、“心脏的守护神”和“抗癌之王”。但硒也是典型的双功能元素^[1],无机硒含硒量高、价格低廉,但吸收和利用不很理想,最重要的是毒性大,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。有机硒含硒量低、价格高,生物利用率高,目前已被用作硒强化剂广泛应用到各种富硒食品中。但食品中存在的硒形态可能会因生态环境或生产加工过程不同而发生变化,因此准确地定性定量分析食品中的硒形态对食品安全具有重要的指导意义。

食品中硒的形态有很多种^[2],常见的化学形态有硒酸盐(SeVI)、亚硒酸盐(SeIV)、硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys_2)、硒代乙硫氨酸(SeEt)、三甲基硒(TMSe)、硒脲(SeUr)等。国外在硒形态研究方面已有一些报道^[3-7],但由于硒形态种类多,分离和提取难度大,目前国内多见综述性报道^[8-10],对硒形态的实验研究报道较少。喻宏伟等^[11]采用反相离子对色谱,使用含七氟丁酸和甲醇的溶液做流动相分离了生物样品中的 SeIV 、 SeVI 、 SeCys 、 SeMet 、 SeUr 、 TMSe 和硒代胱氨酸(SeCM),王振华等^[12]研究分离了尿样中的 4 种硒形态和 SeCys 、 SeMet 和 SeIV 等 3 种硒形态。本文采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)联用技术研究测定了食品中硒酸盐、亚硒酸盐、硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸和硒代乙硫氨酸 5 种形态,分离效果和定量结果均令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪,美国; X Series 2 电感耦合等离子体质谱仪, Thermofisher, 德国。柠檬酸,分析纯; 蛋白酶 K, Sigma; 硒酸根标准溶液(GBW10033)、亚硒酸根标准溶液(GBW10032),中国计量科学研究院; 硒代蛋氨酸(纯度 > 99%) 和硒代胱氨酸(纯度 98%), Acros Organics 公司; 硒代乙硫氨酸(纯度 98%), TRC 公司。 SeMet 用去离子水溶解配制成 100 mg/L 的标准储备液; SeCys_2 和 SeEt 用去离子水(加入 1~2 滴稀盐酸)分别配制成 100 mg/L 的标准储备液; 然后配制成 SeIV 、 SeVI 、 SeCys_2 50 $\mu\text{g/L}$, SeMet 和 SeEt 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 Hamilton PRP X-100 色谱柱

(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 5 mmol/L 柠檬酸溶液(pH 4.5, 20% 氨水调节), 流速 1.2 mL/min, 进样量 100 μL 。

1.2.2 ICP-MS 参数 功率: 1 400 W; 冷却气流速: 14.0 L/min; 辅助气流速: 0.8 L/min; 雾化气流速: 0.85 L/min; H_2/He 混合气流速: 5.8 mL/min; H_2/He 混合气比例: 3:97。

1.3 样品前处理

1.3.1 酸提取 样品购自市内超市,猪肉洗净后取精肉部分粉碎,鲜蘑菇洗净后直接粉碎。称取 1.0 g 匀质样品,加入 5 mmol/L 的柠檬酸溶液 20 mL, 70 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡过夜, 3 000 r/min 离心, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。同样方法做试剂空白。

1.3.2 酶水解提取 同上将样品粉碎后, 称取 1.0 g 匀质样品, 加入 20 mg 蛋白酶 K, 再加入 20 mL 水, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴振荡 4 h, 3 000 r/min 离心, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。同样方法做试剂空白。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

在硒的形态分析中常用到三氟乙酸、五氟丙酸和七氟丁酸等全氟羧酸^[2,11],或者添加烷基磺酸钠、氢氧化四甲基铵等离子对试剂作为流动相成分^[6],也有加入少量甲醇等有机溶剂来提高有机硒的分离效果^[11]。考虑到应尽量采用简单和无毒试剂作为流动相,并结合各种硒形态在水溶液中的离子化状态,本实验选择了乙酸铵、磷酸二氢铵、柠檬酸等弱酸盐溶液作为流动相进行分离。实验发现使用乙酸铵溶液无法将几种形态硒进行良好分离,5 种硒形态只检测到 3 个色谱峰;使用磷酸二氢铵溶液作为流动相,5 种硒形态可完全分离,但 SeVI 出峰时间在 35 min 左右,且硒代蛋氨酸的响应信号很低(与文献[3]的报道相符)。为了提高检测效率,缩短出峰时间,我们试验了改变磷酸二氢铵溶液的浓度和酸度,两种无机硒的保留时间变化很大,甚至与硒代氨基酸的峰发生重叠,但是在优化的分离条件下,不仅硒代蛋氨酸的检出限没有降低,而且重复性较差,因此磷酸二氢铵溶液不是理想的流动相。使用柠檬酸溶液作为流动相,在优化的条件下, SeVI 出峰时间在 10 min 左右, SeEt 出峰时间不变,基本维持在 18 min 左右,5 种硒形态在 21 min 内即可完全分离,重复性和线性相关系数都很好。因此,本实验选择使用柠檬酸溶液作为流动相进行分离。

2.1.1 流动相浓度的影响

随着流动相浓度的升高, SeVI 的保留时间缩

短,当流动相浓度达到 15 mmol/L 时,SeVI 的峰与 SeMet 的峰基本重叠;而流动相浓度为 5 mmol/L 时,分离效果令人满意(见图 1)。因此本实验选择流动相浓度为 5 mmol/L,5 种形态硒可在 21 min 内良好分离。

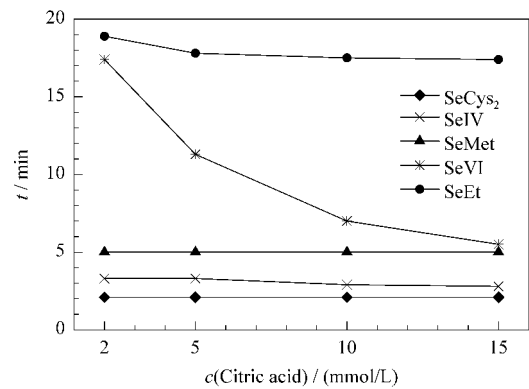


图 1 柠檬酸浓度对 5 种形态硒保留时间的影响
Fig. 1 Effect of concentration of citric acid on the retention time of 5 selenium species
pH of citric acid solution: 4.5.

2.1.2 流动相酸度的影响

酸度变化时,不同硒形态在水溶液中表现出不同的离子状态:阳离子、阴离子或者两性离子^[6]。因此流动相酸度的变化对几种形态的分离效果和出峰顺序影响很大。随着酸度的降低,SeVI 的保留时间急剧减少。图 2 显示了不同酸度流动相的影响。本实验最终选择 pH 4.5 的柠檬酸溶液作为流动相。

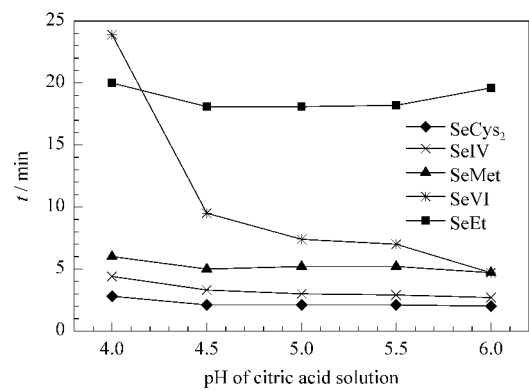


图 2 流动相 pH 对 5 种形态硒保留时间的影响
Fig. 2 Effect of the pH of citric acid on the retention time of 5 selenium species
Concentration of citric acid: 5 mmol/L.

2.2 硒形态提取

不同形态硒的性质差别很大,根据文献调研情况,我们分别采用热水提取、稀酸提取和酶水解几种方法。实验采用的样品为市售猪肉,取精肉部分粉碎混匀后制成匀质样品。结果发现 70 ℃ 热水提取时,两种无机硒形态和 SeMet 的提取效果很好,加标

回收实验表明 SeIV 和 SeVI 的回收率在 90% 以上,SeMet 的回收率也达到 80% 以上,而 SeEt 的回收率在 60% 左右,SeCys₂ 的回收率很差,低于 20%。我们采用柠檬酸 70 ℃ 恒温水浴浸提代替热水来考察硒形态的提取效果,发现 SeIV 和 SeVI 的回收率提高至 100% 左右,SeMet 的回收率达到 90% 以上,SeEt 的回收率也升至 70% 以上,SeCys₂ 的回收率也明显改善,可以达到 40% 左右。

为了从根本上改善 SeCys₂ 和 SeEt 的提取效果,我们采用蛋白酶 K 水解提取,即在纯水提取液中加入一定量的蛋白酶 K,37 ℃ 恒温水浴振荡 4 h,结果发现 SeCys₂ 的加标回收率提高到 80% 以上,SeEt 的回收率也升至 76% 以上。因此,为了准确测定样品中 SeCys₂ 和 SeEt 的含量,可以采用蛋白酶水解提取,实现对 SeCys₂ 和 SeEt 的准确定量分析。

2.3 标准曲线和检出限

采用本文建立的方法进行检测,各种硒形态均获得了良好的线性。按照试剂空白连续测定 11 次的 3δ 计算检出限。各形态硒的线性范围、线性方程和检出限见表 1。按照优化条件进行分离的硒形态标准溶液的色谱图见图 3。

表 1 5 种硒形态的线性范围、线性方程、相关系数和检出限
Table 1 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r) and limits of detection (LOD) for the five selenium species

Species	Linear range/ (μg/L)	Linear equation	r	LOD/ (μg/L)
SeCys ₂	10 - 1000	y = 1099.6x + 3181.8	0.99997	0.9
SeIV	5.0 - 500	y = 1309.8x + 1491.9	0.99995	0.4
SeMet	20 - 2000	y = 1299.9x - 72805.5	0.99989	5.6
SeVI	5.0 - 500	y = 1938.8x + 2709.9	0.99999	0.4
SeEt	20 - 2000	y = 969.8x - 4846.7	1.00000	1.2

y: peak area; x: mass concentration, μg/L.

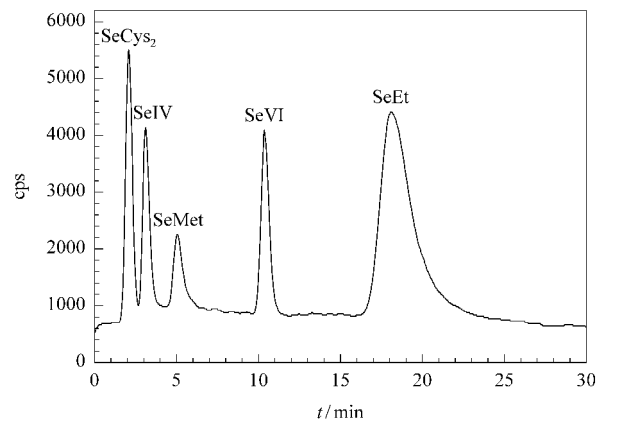


图 3 5 种硒形态标准溶液的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of a standard solution of the five selenium species
SeIV, SeVI and SeCys₂: 50 μg/L; SeMet and SeEt: 100 μg/L.

2.4 加标回收试验

分别采用稀酸提取和酶水解提取考察了方法的加标回收实验效果,其中 SeVI、SeIV 和 SeMet 以稀酸提取计算回收率,SeCys₂ 和 SeEt 是以酶水解提取计算回收率。所选取的样品为鲜蘑菇和猪肉,其中

鲜蘑菇中 SeCys₂、SeIV 和 SeMet 含量分别为 0.107 mg/kg、0.151 mg/kg 和 0.073 mg/kg,猪肉中 SeCys₂ 含量为 0.686 mg/kg,其他形态均未检出。6 次平行测定的加标回收实验结果见表 2。图 4 和图 5 分别是鲜蘑菇和猪肉样品加标的色谱图。

表 2 鲜蘑菇和猪肉样品中 5 种形态硒的加标回收率 (n=6)
Table 2 Recoveries of the five selenium species spiked in fresh mushroom and pork samples (n=6)

Species	Added/ (mg/kg)	Fresh mushroom			Pork		
		Background/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%	Background/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%
SeCys ₂	0.5	0.107	83.4	2.9	0.686	86.1	2.7
	1		87.6	1.5		88.9	3.2
	2		89.9	1.1		91.5	2.5
SeIV	0.25	0.151	101.5	1.2	ND*	101.9	1.6
	0.5		100.9	0.7		101.1	0.7
	1		102.0	1.1		102.3	0.8
SeMet	1	0.073	86.3	2.6	ND	85.0	2.4
	2		89.9	1.5		92.1	2.2
	4		94.3	1.2		95.3	1.9
SeVI	0.25	ND	100.9	1.8	ND	100.5	1.1
	0.5		102.1	1.2		101.6	0.8
	1		103.0	1.2		101.8	1.0
SeEt	1	ND	79.9	2.8	ND	80.3	2.6
	2		85.3	2.9		84.3	2.4
	4		87.4	2.4		89.0	1.7

* ND: not detected.

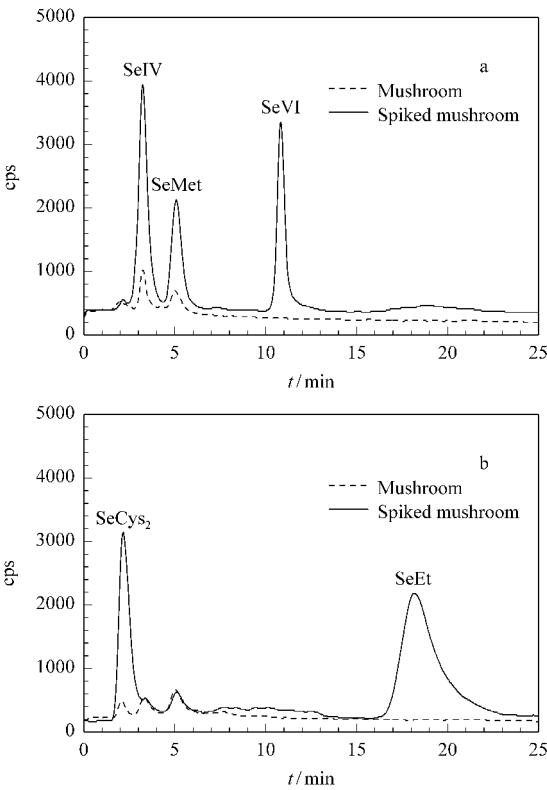


图 4 蘑菇样品及其加标样品的色谱图
Fig. 4 Chromatograms of a mushroom sample and a spiked sample

a. extracted with citric acid solution; b. extracted with proteinase K.

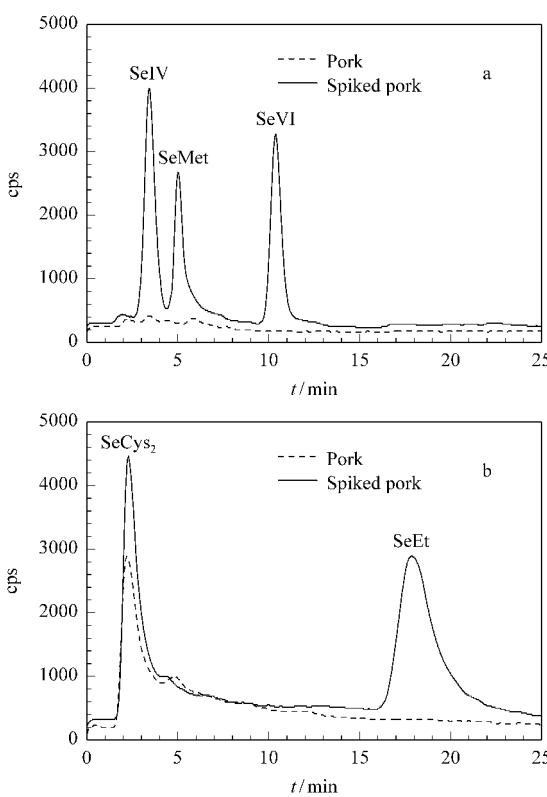


图 5 猪肉样品及其加标样品的色谱图
Fig. 5 Chromatograms of a pork sample and a spiked sample

a. extracted with citric acid solution; b. extracted with proteinase K.

3 结论

本文建立的 HPLC-电感耦合等离子体质谱联用法在检测食品中 SeVI、SeIV、SeMet、SeCys₂ 和 SeEt 等 5 种形态时,采用稀酸提取测定 SeVI、SeIV 和 SeMet,采用酶水解提取测定 SeCys₂ 和 SeEt,样品前处理简便快捷,流动相成分单一、配制简单,21 min 内可将 5 种硒形态完全分离,定量结果准确可靠,方法重复性和精确度良好,可完全满足食品中无机硒和有机硒形态分析的需要,为食品中硒元素的准确定量和形态鉴定提供了切实可行的方法。

参考文献:

- [1] Qiu J H, Wang Q Q, Huang B L. Spectroscopy and Spectral Analysis (邱建华,王秋泉,黄本立. 光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1692
- [2] Kotrebai M, Tyson J F, Block E, et al. J Chromatogr A, 2000, 866: 51
- [3] Mazej D, Fálnoga I, Veber M, et al. Talanta, 2006, 68: 558
- [4] Gammelgaard B, Bendahl L. J Anal At Spectrom, 2004, 19: 135
- [5] Kapolna E, Shah M, Caruso J A, et al. Food Chem, 2007, 101: 1415
- [6] Zheng J, Ohata M, Furuta N, et al. J Chromatogr A, 2000, 874: 55
- [7] Pedrero Z, Madrid Y. Anal Chim Acta, 2009, 634: 135
- [8] Huang Z Y, Wu X H, Hu G L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (黄志勇,吴熙鸿,胡广林,等. 分析化学), 2002, 30(11): 1387
- [9] Zhou Y, Ye L, Zhu X P. Progress of Chemistry (周瑛,叶丽,竹鑫平. 化学进展), 2007, 19(6): 982
- [10] Wang J, Liu C Q, Wang Y Y. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (王军,刘丛强,王莹莹. 质谱学报), 2008, 29(5): 311
- [11] Yu H W, Chen C Y, Gao Y X, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (喻宏伟,陈春英,高愈希,等. 分析化学), 2006, 34(6): 749
- [12] Wang Z H, He B, Shi J B, et al. Chinese Journal of Chromatography (王振华,何滨,史建波,等. 色谱), 2009, 27(5): 711