

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019081504

邵鹏威, 路国慧, 郑宇, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定大米粉中的硒形态[J]. 环境化学, 2020, 39(5): 1434-1441.

SHAO Pengwei, LU Guohui, ZHENG Yu, et al. Determination of selenium species in rice flour using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(5): 1434-1441.

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱 测定大米粉中的硒形态*

邵鹏威^{1,2} 路国慧² 郑宇^{1,2} 胡俊栋² 赵全升¹ 杨永亮² 刘 崑^{2**}

(1. 青岛大学环境科学与工程学院, 青岛, 266071; 2. 国家地质实验测试中心, 北京, 100037)

摘要 建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)测定大米粉中硒代胱氨酸(SeCys₂)、甲基-硒代半胱氨酸(MeSeCys)、亚硒酸根(Se(IV))、硒代蛋氨酸(SeMet)、硒酸根(Se(VI))等5种硒形态的分析方法。采用Hamilton PRP-X100分析柱,以pH 4和pH 6的20 mmol·L⁻¹的柠檬酸溶液辅以少量甲醇为流动相,在梯度洗脱条件下,9 min内可实现5种硒形态完全分离。SeCys₂、MeSeCys、Se(IV)、SeMet、Se(VI)的检出限分别为0.88、0.69、1.00、0.90、0.82 μg·L⁻¹。利用富硒小麦粉标准物质RM8436探讨了不同提取方式的提取效果。最终确定75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5)添加XIV蛋白酶和Driselase酶作为提取剂,在37℃振荡提取3h为大米样品前处理方法。利用该方法分析了富硒地区大米粉中的硒形态,结果表明,大米粉中的硒主要以有机硒形态为主,其中SeMet是最主要的硒形态,占总硒的90%左右。

关键词 硒, 形态分析, 大米粉, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱。

Determination of selenium species in rice flour using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

SHAO Pengwei^{1,2} LU Guohui² ZHENG Yu^{1,2} HU Jundong² ZHAO Quansheng¹
YANG Yongliang² LIU Wei^{2**}

(1. College of Environmental Sciences and Engineering, Qingdao University, Qingdao, 266071, China;

2. National Research Center for Geo-Analysis (NRCA), Beijing, 100037, China)

Abstract: An analytical method for the determination of five selenium species in rice flour samples was developed using high performance liquid chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). Seleno-Cystine (SeCys₂), (Methyl) Seleno-Cysteine (MeSeCys), Selenite (Se(IV)), Selenate (Se(VI)) and Selenomethionine (SeMet) were completely separated on a Hamilton PRP-X100 anion exchange column using 20 mmol·L⁻¹ citric acid solution (pH 4.0), 20 mmol·L⁻¹ citric acid solution (pH 6.0) and methyl alcohol as the mobile phase under gradient elution within 9 minutes. The detection limits of SeCys₂, MeSeCys, Se(IV), SeMet and Se(VI) were 0.88, 0.69, 1.00, 0.90, 0.82 μg·L⁻¹, respectively. 75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5) with XIV protease and Driselase was eventually selected as extractant. Different sample preparation methods had been compared and oscillation method with 3 h

2019年8月15日收稿(Received: August 15, 2019).

* 中国科学院基本科研业务费项目(YYWF201620)和中国地质大调查项目(DD20190589)资助。

Supported by the Research Fund of Chinese Academy of Geological Sciences (YYWF201620) and the Geological Survey Project of China (DD20190589).

** 通讯联系人, Tel: 13810725282, E-mail: hattieliu@126.com

Corresponding author, Tel: 13810725282, E-mail: hattieliu@126.com

at 37 °C was chosen finally. This method was applied to measure selenium species in rice flour samples from selenium-enriched areas. The results indicated that SeMet was the main species in rice flour, accounting for about 90% of the total amount of selenium.

Keywords: selenium, speciation analysis, rice flour, high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS).

硒是与人类和动物健康密切相关的必需微量营养元素^[1-3],在体内代谢过程中发挥着重要作用.人体硒的生理需求量为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[4],而不足的硒摄入量与有害的硒摄入量之间的范围比较狭窄^[5],为 $17\text{—}400 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[4].人体缺硒会引起克山病和大骨节病等疾病,而过量的硒摄入将会造成细胞膜和大分子氧化等不良反应^[6].人体中硒的主要来源是膳食摄入,因此植物在人体硒补充中发挥着重要作用.目前,对于总硒的研究非常广泛,并且市售的富硒植物及衍生产品(豆、米、面粉等)通常也只标注总硒含量,但是硒的总量不足以作为判断营养价值和安全性依据.不同形态硒的生物有效性及对环境影响由硒的赋存形态和浓度决定^[2,7-8].过量的无机硒会导致生物体的中毒反应^[9],而有机硒具有较高的生物利用度^[10].目前硒在食品和膳食补充剂中的重要性越来越大,因此建立一套准确、高效的硒形态分析方法具有重要意义.

目前在食物中已经被证实的硒化合物有 20 多种,主要为硒酸根($\text{Se}(\text{VI})$)、亚硒酸根($\text{Se}(\text{IV})$)、硒代胱氨酸(SeCys_2)、甲基-硒代半胱氨酸(MeSeCys)和硒代蛋氨酸(SeMet)等^[11].硒的形态分析可采用多种分析方法,如液相色谱-原子荧光光谱法^[12],反相离子对色谱-电感耦合等离子体质谱法^[13]和电化学法^[14]等.而高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)因其具有高效的分离能力、较低的检出限、宽泛的线性范围和良好的分析精密度等优点成为硒形态检测的主流技术^[13,15-16].

本文采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)建立了大米粉中 5 种硒形态($\text{Se}(\text{VI})$ 、 $\text{Se}(\text{IV})$ 、 SeCys_2 、 MeSeCys 、 SeMet)的高效分离测定方法,并对色谱分离条件及样品前处理条件进行优化,确定了最佳实验方案.利用建立的方法对恩施富硒地区大米粉硒赋存状态进行了分析研究,发现其硒主要以有机硒形态存在,并且 90%的硒形态为 SeMet .

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);7500a 型电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司);3K15 型高速离心机(德国 Sigma 公司);Ecotron 台式振荡培养箱(瑞士 Infors 公司).

硒代胱氨酸溶液(SeCys_2 , GBW10087, $44.2 \pm 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,以 Se 计)、甲基-硒代半胱氨酸溶液(MeSeCys , GBW10088, $34.8 \pm 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,以 Se 计)、亚硒酸根溶液($\text{Se}(\text{IV})$, GBW10032, $42.9 \pm 0.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,以 Se 计)、硒酸根溶液($\text{Se}(\text{VI})$, GBW10033, $41.5 \pm 1.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,以 Se 计)、硒代蛋氨酸(SeMet , GBW10034, $39.4 \pm 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,以 Se 计)(中国计量科学研究院);胃蛋白酶、胰酶(优级纯,北京鸿润宝顺科技有限公司);XIV 蛋白酶、Driselase 酶(优级纯,德国 sigma 公司);Reference Material 8436 (RM8436, Durum Wheat Flour, 美国国家标准与技术研究院);柠檬酸(纯度 99.995%,上海 aladdin 公司);Tris-Base(纯度 99.9%,广州赛国生物科技有限公司);氨水(HPLC 级,德国 Merck 公司);盐酸、硝酸(优级纯,德国 Fischer 公司);实验用水为 Milli-Q 水($\geq 18.25 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

1.2 仪器工作参数

采用调谐溶液将 ICP-MS 进行优化,具体仪器工作参数见表 1 所示.选用 Hamilton PRP-X100 色谱分离柱进行 5 种硒形态的分离,分离条件见表 1.

1.3 样品预处理

用去离子水对所采集水稻穗进行清洗,除去表面灰尘后用滤纸擦干表面水分.将水稻穗样品在室温下自然阴干.将阴干后的水稻穗进行脱粒处理,得到水稻籽粒.用碎样机将水稻籽粒粉碎研磨成大米粉后放入样品袋中备用.

表 1 HPLC-ICP-MS 工作条件参数

Table 1 Instrumental operating parameters of HPLC-ICP-MS

仪器 Instrument	参数名称 Name	参数 Parameters			
	色谱柱 Separation column	Hamilton PRP-X100 (250 mm × 4.1 mm, 10 μm)			
	流动相 Mobile phase	A: 20 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸 Citric acid (pH 4) B: 20 mmol·L ⁻¹ 柠檬酸 Citric acid (pH 6) C: 甲醇 Methanol			
HPLC	洗脱梯度 Gradient elute	Time/min	A	B	C
		0—2.5	99%	0	1%
		2.5—3.5	99%→0	0→98%	1%→2%
		3.5—6	0	98%	2%
		6—7	0→99%	98%→0	0
		7—9	99%	2%→1%	1%
	流速 Flow rate	1 mL·min ⁻¹			
	进样体积 Injection volume	50 μL			
	射频功率 RF power	1480 W			
	射频电压 RF voltage	1.56 V			
	采样深度 Sampling depth	6.5 mm			
ICP-MS	载气流速 Carrier gas flow	1.10 L·min ⁻¹			
	雾化器 Nebulizer	Babinton			
	采集模式 Acquisition mode	时间分辨 Time resolution			
	检测元素 Detecting element	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se			

1.4 总硒提取方法

准确称取 0.2000 g 样品于聚四氟乙烯内胆中,加入 3 mL 浓硝酸预消解过夜.次日将其置于 80—130 °C 电热板逐渐升温加热,直至近干状,加入 1.5—2.0 mL 浓硝酸,盖上盖,装入密封消解罐中,将溶样器放入烘箱中于 160 °C 条件下加热 10 h.待消解罐彻底冷却后取出内胆于 130 °C 电热板赶酸至近干,加入硝酸(1:1)4 mL 后盖上盖,置于 110 °C 电热板加热约 40 min.冷却后用水定容至 40 mL.摇匀过滤后上机测定.

标准曲线由 6 个不同浓度的标准溶液来确定,浓度梯度为 1、5、10、20、50、100 μg·L⁻¹.线性拟合度系数 R^2 为 0.9998.选取小麦粉标准物质 RM8436 和蒜粉标准物质 GSB-13 为质控样品,测定结果如表 2 所示.从表 2 可以看出,该方法所测得的硒含量值分别与 RM8436 标准物质和 GSB-13 标准物质的硒含量推荐值一致,并在允许的误差范围之内,因此该方法可满足本研究中大米粉总硒含量的测定要求.

表 2 RM8436 硬质小麦粉标准物质和 GSB-13 蒜粉标准物质的测定结果

Table 2 The results of selenium content in RM8436 and GSB-13

标准物质 Reference material	参考值 Reference value/(μg·g ⁻¹)	测定值 Measured value/(μg·g ⁻¹)
RM8436	1.23±0.09	1.18±0.05
GSB-13	0.39±0.07	0.35±0.02

1.5 硒形态提取方法

准确称取 0.2000 g 样品粉末于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 提取液(pH 7.5,含 20 mg XIV 蛋白酶和 10 mg Driselase 酶),于台式振荡培养箱中 37 °C 恒温振荡 3 h,随后在 5000 r·min⁻¹ 转速下离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 水系滤膜后待测,每个样品同时做两次平行,同时做空白实验.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 流动相组成的选择

在硒形态的分析中,不同的流动相对硒形态的分离影响非常大,柠檬酸溶液和磷酸盐等溶液是目前

常用的流动相种类^[17-18].改性剂的种类对分离效果也有显著影响,三氟乙酸^[19]和七氟丁酸^[20]等全氟羧酸,烷基磺酸钠^[21]等离子对试剂常用作流动相成分以改善分离效果.林立等^[22]采用柠檬酸-乙酸铵,并加入 TFA 离子对作为稳定剂的流动相体系,实现了 4 种硒形态良好分离.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,本实验考察了磷酸二氢钠和柠檬酸两种溶液作为流动相进行硒形态分离的分离效果.实验发现使用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液作为流动相,在 pH 7 时 5 种硒形态基本可完全分离,但 Se(VI) 出峰时间在 25 min 左右,保留时间过长且各硒形态的响应值较低.而使用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸溶液作为流动相,在 pH 4 时所有峰的出现时间均提前,5 种硒形态 11 min 内即可完全分离,且响应值大大改善.因此,本实验选择柠檬酸溶液作为流动相,以实现更短的分析时间并获取更好的峰形.

2.2 流动相 pH 的选择

由于不同的硒形态在不同 pH 条件下会以阴阳离子或两性离子形式存在^[23],其电离平衡依赖于 pH 的变化,因此流动相 pH 的改变对硒形态的分离效果和保留时间有很大影响.本实验考察了 pH 值在 4—6.5 范围内 5 种硒形态的分离和保留效果.以 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸为流动相,氨水调节 pH 4、4.5、5、5.5、6、6.5.实验结果发现,在 pH 4—6 范围内 Se(VI) 的保留时间随着 pH 值增大逐渐缩短,这与目前一些已报道的研究结果^[16-17]一致,如图 1 所示.当 pH 4 时,5 种硒形态可以在 11 min 内完全分离,而 pH 4.5—6.5 时,Se(IV) 与 MeSeCys 无法实现基线分离.根据各硒形态的保留时间随 pH 变化的规律,先以 pH 4 的柠檬酸溶液作为流动相洗脱液,保证 MeSeCys 与 Se(IV) 的分离,继而以 pH 6 的柠檬酸溶液作为流动相洗脱液,缩短 Se(VI) 的保留时间.在流动相中加入 1% 的甲醇后,5 种硒形态的响应值有所提高,并且可以缩短 Se(VI) 的洗脱时间.调整后中段甲醇加入量进一步优化 SeMet 与 Se(VI) 的响应值和峰形.最终选用 pH 4 柠檬酸(1% 甲醇)与 pH 6 柠檬酸(2% 甲醇)作为流动相进行梯度洗脱,5 种硒形态在 9 min 内完全分离,如图 2 所示.

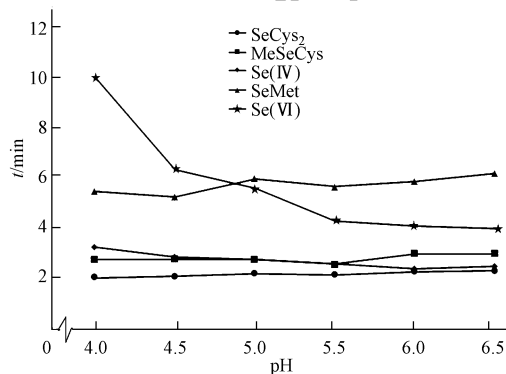


图 1 流动相不同 pH 值对 5 种硒形态保留时间的影响

Fig.1 Effects of different pH of mobile phase on the retention time for 5 selenium species

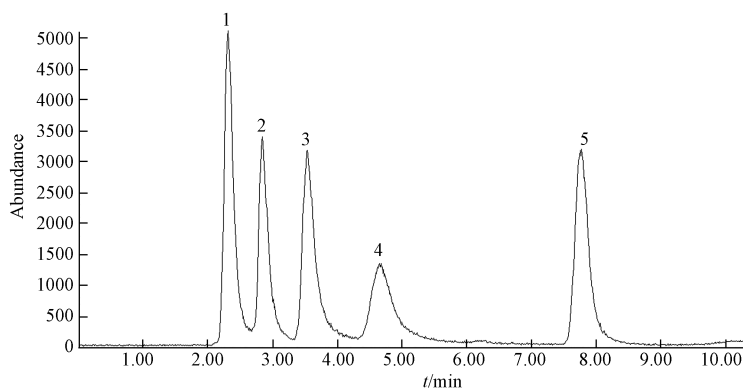


图 2 梯度洗脱条件下 5 种硒形态的色谱图

1. $103 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SeCys₂, 2. $114 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MeSeCys, 3. $115 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Se(IV), 4. $97.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SeMet, 5. $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Se(VI)

Fig.2 Chromatogram of 5 selenium species under gradient elution conditions

2.3 方法检出限、线性关系及重复性

配制不同浓度水平的 5 种硒形态系列混合标准溶液,按已确定的仪器条件上机测定.以不同浓度硒形态峰面积为纵坐标,硒形态浓度为横坐标进行线性回归分析,结果显示 5 种硒形态的峰面积与浓度呈良好的线性关系.硒各形态的工作曲线线性系数 R^2 均大于 0.999.5 种硒形态中 SeCys_2 与 SeMet 的线性范围为 5—200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MeSeCys 、 Se(IV) 与 Se(VI) 的线性范围为 2—200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.对 5 种形态硒的混合标准溶液进行逐级稀释并上机测定,以 3 倍信噪比计算出方法检出限, SeCys_2 、 MeSeCys 、 Se(IV) 、 SeMet 和 Se(VI) 的检出限分别为 0.88、0.69、0.85、1.00、0.82 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.对 SeCys_2 、 MeSeCys 、 Se(IV) 、 SeMet 和 Se(VI) 浓度分别为 103、114、115、97.8、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液重复测定 7 次,其 RSD 均小于 5%.

2.4 大米粉样品前处理方法的优化

提取大米粉中的硒形态,需要破坏蛋白质的肽键,使硒代氨基酸或其衍生物处于游离态,并保证化合物的完整性,因此提取效果的关键在于提取方法的选择^[24].目前硒形态分析主要的前处理方法有水和稀酸等不同溶剂的浸提方法^[25]、酶水解方法^[26]等.本研究考察了水、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸和酶解方法对小麦粉 RM8436 中硒形态的提取效果.

结果表明,分别以水和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 为提取剂辅以振荡或超声提取方法对 RM8436 进行硒形态提取,均未提取到硒形态,硒提取率为零.酶解提取法不仅作用条件温和,而且被认为是效率高、提取效果好、不易发生形态转化的提取方法.常用的酶主要有 XIV 蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶等.本实验采用胰酶和胃蛋白酶的水溶液作为提取剂均无法将 RM8436 标准物质中的硒形态提取出来.采用 XIV 蛋白酶的水溶液做为提取剂辅以振荡提取方法对 RM8436 进行硒形态提取,主要提取出 SeMet ,提取出的硒形态含量占总硒量的 55%.Tris 缓冲液作为一种核酸和蛋白质的溶剂,以盐酸调节到适宜的 pH 制成的 Tris-HCl 缓冲溶液被用作硒形态的提取剂具有较好的效果.实验过程中发现,以含有胰酶的 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 溶液作为提取剂,对 RM8436 标准物质进行硒形态提取,硒形态的提取率为 80%,而以含有 XIV 蛋白酶的 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 溶液作为提取剂时,硒形态的提取率达到 90% 以上.加标回收实验中 5 种硒形态均可以保持稳定.此外,实验还发现少量 Driselase 酶的加入可以提高 XIV 蛋白酶对硒形态的提取效率和稳定性.因此最终选取含有 XIV 蛋白酶与 Driselase 酶的 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 溶液作为硒形态的提取剂.

2.5 酶加入量的优化

分别实验了 3 mL 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中含 10、15、20、30、40 mg XIV 蛋白酶的提取液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡条件下对 RM8436 标准物质中硒形态的提取效果.实验结果显示,不同酶含量提取液提取到 RM8436 标准物质中的硒形态主要为 SeMet ,其对应含量分别为 0.62、0.73、1.08、1.09、1.09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.因此,当 XIV 蛋白酶加入量为 20 mg 后, SeMet 的提取量不再随 XIV 蛋白酶加入量的增大而增大,此时 RM8436 标准物质中硒形态的提取率为 92%.在该实验基础上,又实验了提取液中同时添加 10 mg Driselase 酶对 RM8436 小麦粉标准物质中硒形态的提取效果.实验结果显示,当提取液中加入 10 mg Driselase 酶后, RM8436 标准物质中的硒形态提取率可达到 97% 且 5 次不同批次实验测定结果的 RSD < 5%.因此,本实验最终选择 3 mL 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 中含 20 mg XIV 蛋白酶和 10 mg Driselase 酶的溶液作为提取剂.

2.6 提取时间的优化

选取 XIV 蛋白酶与 Driselase 酶的最适水解温度(37 $^{\circ}\text{C}$)作为大米粉硒形态的提取温度, RM8436 小麦粉标准物质为实验样品,分别考察了 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,振荡提取 1、2、3、5、7、9、11、13 h 时的提取效果.不同提取时间条件下均只检测到 SeMet ,其含量分别为 0.95、1.00、1.20、1.20、1.20、1.20、1.21、1.20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.从实验结果可知,振荡提取 3 h 后,提取效率基本达到稳定.考虑到提取效率与硒形态稳定性,最终实验选择 3 h 为提取时间.

2.7 加标回收实验

为了验证方法的可靠性和可重复性,分别进行了流程空白和 RM8436 小麦粉标准物质的加标回收实验,向流程空白和小麦粉标准物质样品中加入 SeCys_2 、 MeSeCys 、 Se(IV) 、 SeMet 、 Se(VI) 混合标准溶液,按确定的方法进行样品前处理后上 HPLC-ICP-MS 进行定量分析.空白加标实验重复 5 次,小麦粉标

准物质加标实验重复 3 次,结果如表 3 所示,结果表明空白加标回收实验和小麦粉标准物质加标回收实验中 MeSeCys、Se(VI)、SeMet、Se(IV) 的加标回收率均在 96.9%—107% 之间, RSD 均小于 5%, 但是小麦粉标准物质加标回收实验中 SeCys₂ 加标回收率明显降低, 而其他硒形态的加标回收率并没有增加, 色谱图如图 3 所示, 说明 SeCys₂ 可能转化为除 MeSeCys、Se(IV)、SeMet、Se(VI) 以外的其他硒形态而未能检测到, 此外还可能与 SeCys₂ 易与小麦粉中的蛋白质吸附共沉淀有关, 另外 SeCys₂ 中 Se—Se 键极不稳定也是其回收率低的原因^[22]。经文献调研大米粉中硒主要以 SeMet 形态存在, SeCys₂ 在本分析过程中形态不稳定并不影响本研究工作的分析测定要求, 因此, 该方法可满足本研究大米粉硒形态的分析测试要求。

表 3 流程空白和小麦粉标准物质 RM8436 中 5 种硒形态加标回收率

Table 3 Recoveries of selenium speciation in Blank and RM8436

	SeCys ₂	MeSeCys	Se(IV)	SeMet	Se(VI)
空白 Blank/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
添加浓度 Added concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	103	114	115	97.8	100
测定浓度 Detected concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	102±1.06	118±0.98	112±1.30	97.8±1.17	97.2±2.78
回收率 Recovery/%	98.9	104	97.9	99.9	97.1
RM8436/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	<MDL	<MDL	<MDL	1.18±0.05	<MDL
添加浓度 Added concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0.103	0.114	0.115	0.098	0.100
测定浓度 Detected concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0.018±0.001	0.122±0.005	0.112±0.002	1.275±0.003	0.097±0.001
回收率 Recovery/%	17.5	107	97.4	96.9	97.0

注: MDL 为方法检出限。Note: MDL is the method detection limit.

2.8 恩施富硒地区大米粉样品中总硒与硒形态分析

将湖北恩施富硒地区所采集的 10 件水稻穗样品经样品前处理研磨成大米粉样品, 利用建立的方法对其中的硒含量及赋存状态进行了分析研究, 实验结果如表 4 所示, 其中样品 S-9E 的色谱图如图 3。所采集的大米粉样品中总硒浓度含量为 0.09—1.84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 所有大米样品中只检出 SeMet 一种硒形态, 未检出无机硒形态, 提取率在 82.6%—106% 之间, 与已有报道^[12, 27] 相符。根据我国颁布的 GB/T 22499—2008《富硒稻谷》标准中的规定富硒大米的硒含量值为 0.04—0.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 GB 2762—2012《食品中污染物限量》中取消了硒的限量指标, 所采集的大米粉均属于富硒大米, 80% 大米粉中的硒含量超过 0.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 因此当地居民需根据人体每日硒需求量合理食用富硒产品, 若长期食用此富硒地区大米其所带来的健康风险仍不可忽视。

表 4 大米粉实际样品分析结果

Table 4 Analytical results of the rice samples

编号 Label	SeCys ₂ / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	MeSeCys/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Se(IV)/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SeMet/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Se(VI)/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	总硒(ICP-MS) Total selenium/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	提取率 Recovery/%
S-1E	<MDL	<MDL	<MDL	0.54	<MDL	0.62	87.7
S-2E	<MDL	<MDL	<MDL	0.08	<MDL	0.09	86.0
S-3E	<MDL	<MDL	<MDL	0.35	<MDL	0.39	88.8
S-4E	<MDL	<MDL	<MDL	0.13	<MDL	0.12	106
S-5E	<MDL	<MDL	<MDL	1.54	<MDL	1.84	83.7
S-6E	<MDL	<MDL	<MDL	1.28	<MDL	1.55	82.6
S-7E	<MDL	<MDL	<MDL	0.39	<MDL	0.41	95.8
S-8E	<MDL	<MDL	<MDL	0.59	<MDL	0.56	106
S-9E	<MDL	<MDL	<MDL	0.29	<MDL	0.33	86.4
S-10E	<MDL	<MDL	<MDL	0.89	<MDL	0.93	96.2

注: MDL 为方法检出限。Note: MDL is the method detection limit.

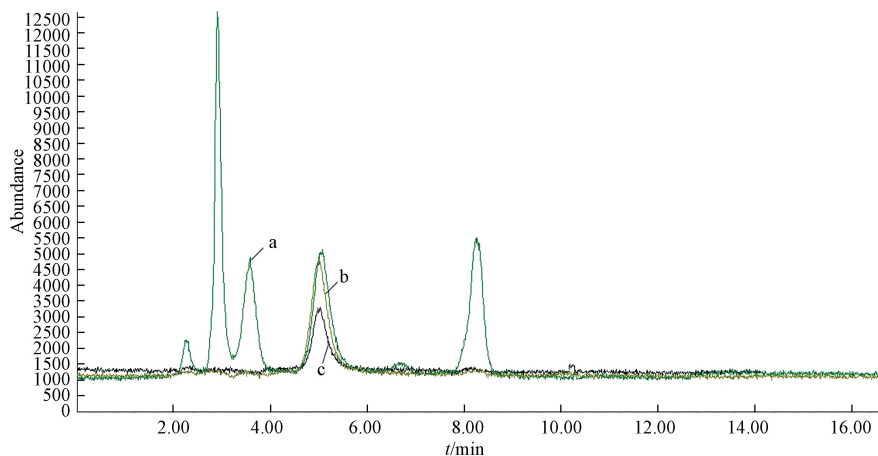


图3 RM8436、RM8436 加标及某一实际样品的硒形态色谱图

a. RM8436 加标 ($103 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{SeCys}_2$, $114 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{MeSeCys}$, $115 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Se(IV)}$, $97.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{SeMet}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Se(VI)}$),
b. S-9E, c. RM8436

Fig.3 Chromatograms of RM8436, spiked RM8436 and a rice sample by HPLC-ICP-MS

(a. spiked RM8436, b. S-9E, c. RM8436)

3 结论 (Conclusion)

本研究建立了 HPLC-ICP-MS 测定大米粉中硒代胱氨酸 (SeCys_2)、甲基-硒代半胱氨酸 (MeSeCys)、亚硒酸根 (Se(IV))、硒代蛋氨酸 (SeMet)、硒酸根 (Se(VI)) 5 种硒形态的分析方法, 确定了 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 添加 XIV 蛋白酶和 Driselase 酶作为提取剂进行大米粉硒形态分析样品前处理的条件, 利用该方法对恩施富硒地区所采集的大米粉样品中的硒含量及形态进行了分析研究. 发现该地区大米粉均属于富硒大米粉, 大米粉中的硒主要以 SeMet 形态存在, 未检出无机硒形态. 根据我国人体推荐的每日硒摄入量及不足硒摄入量与有害硒摄入量范围, 长期食用该富硒大米粉对人体健康会存在一定的风险, 因此需合理食用富硒产品.

参考文献 (References)

- [1] MATOS R P, LIMA V M P, WINDMOLLER C C, et al. Correlation between the natural levels of selenium and soil physicochemical characteristics from the Jequitinhonha Valley (MG), Brazil[J]. J Geochem Explor, 2017, 172: 195-202.
- [2] 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.
- [3] 董亚蕾, 刘文婧, 曹进, 等. 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定富硒食品中的硒代氨基酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2401-2406.
DONG Y L, LIU W J, CAO J, et al. Determination of selenoaminoacid in selenium enriched foods by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality 2017, 8(7): 2401-2406 (in Chinese).
- [4] 汪敏, 庄海铃. 关于人体补硒标准的研究[J]. 数理医药学杂志, 2007, 20(4): 549-550.
WANG M, ZHUANG H L. Research on human body selenium supplementation standards[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2007, 20(4): 549-550 (in Chinese).
- [5] PYRZYNSKA K. Determination of selenium species in environmental samples[J]. Microchimica Acta, 2002, 140(1-2): 55-62.
- [6] MISRA S, BOYLAN M, SELVAM A, et al. Redox-active selenium compounds--from toxicity and cell death to cancer treatment[J]. Nutrients, 2015, 7(5): 3536-3556.
- [7] HAWRYLAK-NOWAK B, MATRASZEK R, POGORZELEC M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants[J]. Acta Physiol Plant, 2015, 37(2): 41-54.
- [8] YIN H, QI Z, LI M, et al. Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in *Oryza sativa* L[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 169: 911-917.
- [9] 邵秀清, 秦文友, 张梦, 等. 高效液相色谱串联质谱法检测蚯蚓体内硒代氨基酸[J]. 环境化学, 2019, 38(5): 1057-1064.
SHAO X Q, QIN W Y, ZHANG M, et al. Determination of seleno amino acids in earthworms by high performance liquid chromatography-

- electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *Environmental Chemistry*, 2019, 38(5): 1057-1064 (in Chinese).
- [10] ZHOU F, DINH Q T, YANG W, et al. Assessment of speciation and in vitro bioaccessibility of selenium in Se-enriched *Pleurotus ostreatus* and potential health risks[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 185: 109675-109684.
- [11] 王欣, 幸苑娜, 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.
- WANG X, XING Y N, CHEN Z Y, et al. Determination of 6 selenium species in selenium-enriched food by hyphenated technique of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(11): 1669-1674 (in Chinese).
- [12] 王铁良, 张会芳, 魏亮亮, 等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱联用技术测定富硒大米中的 5 种硒形态[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6): 2185-2190.
- WANG T L, ZHANG H F, WEI L L, et al. Determination of 5 kinds of selenium species in rice by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality* 2017, 8(6): 2185-2190 (in Chinese).
- [13] 季海冰, 方敏, 林洋, 等. 反相离子对色谱联合电感耦合等离子体质谱法测定环境水样中 5 种形态硒[J]. *分析仪器*, 2019, 223(2): 156-160.
- JI H B, FANG M, LIN Y, et al. Determination of five selenium species in environmental water by ionpair reversed phase liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Analytical Instrumentation*, 2019, 223(2): 156-160 (in Chinese).
- [14] 杨培慧, 郑志雯, 冯德雄, 等. 硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸电化学检测的比较[J]. *分析化学*, 2003, 31(2): 194-197.
- YANG P H, ZHENG Z W, FENG D X, et al. A comparison of electrochemical behavior between selenocystine and selenomethionine with cyclic voltammetry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2003, 31(2): 194-197 (in Chinese).
- [15] 倪张林, 汤富彬, 张玮, 等. HPLC-DRC-ICP-MS 测定富硒蔬菜中的硒形态[J]. *分析实验室*, 2013, 32(2): 39-43.
- YI Z L, TANG F B, ZHANG W, et al. Determination of selenium species in Se-enriched vegetables by HPLC-DRC-ICP-MS[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* 2012, 32(2): 39-43 (in Chinese).
- [16] 姚真真, 马智宏, 王北洪, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法检测富硒苹果中 5 种硒形态[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(3): 475-480.
- YAO Z Z, HA X J, MA Z H, et al. Determination of 5 kinds of selenium species in selenium-enriched apples by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality* 2018, 9(3): 475-480 (in Chinese).
- [17] 曹玉娉, 闫丽珍, 黄红丽, 等. 超声辅助提取结合高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定牛蒡和三七中硒形态[J]. *分析化学*, 2015, 43(9): 1329-1334.
- CAO Y P, YAN L Z, HUANG H L, et al. Determination of selenium species in burdock and panax notoginseng using ultrasonic assistant extraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(9): 1329-1334 (in Chinese).
- [18] 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]. *理化检测-化学分册*, 2018, 54(5): 566-572.
- QIN Y T, SHI P T, WANG Y, et al. HPLC-HG-AFS determination of 5 species of selenium in foodstuffs rich in selenium[J]. *PTCA (Part B: Chem Anal)*, 2018, 54(5): 556-572 (in Chinese).
- [19] GOSETTI F, FRASCAROLO P, POLATI S, et al. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC-MS/MS methods[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4): 1738-1747.
- [20] 张明, 杜业刚, 林少彬, 等. 液相色谱串联质谱法定量检测青花菜中 L-硒甲基硒代半胱氨酸[J]. *分析化学*, 2007, 35(2): 244-264.
- ZHANG M, DU Y G, LIN S B. Quantitation of methylselenocysteine in broccoli powder with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 35(2): 244-264 (in Chinese).
- [21] THOSAIKHAM W, JITMANEE K, SITTIPOUT R, et al. Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Just var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC-ICP-MS[J]. *Food Chem*, 2014, 145: 736-742.
- [22] 林立, 孙海波, 孙继红. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱法测定奶粉中的硒形态[J]. *理化检验(化学分册)*, 2015, 51(9): 907-911.
- LIN L, SUN H B, SUN J H. Determination of selenium species in milk powder by IC-ICP-MS[J]. *PTCA (Part B: Chem Anal)*, 2015, 51(9): 907-911 (in Chinese).
- [23] 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]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 874(1): 55-64.
- [24] JAGTAP R, MAHER W. Determination of selenium species in biota with an emphasis on animal tissues by HPLC-ICP-MS[J]. *Microchemical Journal*, 2016, 124: 422-529.
- [25] TIE M, LI B, LIU Y, et al. HPLC-ICP-MS analysis of selenium speciation in selenium-enriched *Cordyceps militaris*[J]. *RSC Adv*, 2014, 4(107): 62071-62075.
- [26] FUNES-COLLADO V, MORELL-GARCIA A, RUBIO R, et al. Selenium uptake by edible plants from enriched peat[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 164(164): 428-433.
- [27] GALINHA C, SANCHEZ-MARTINEZ M, PACHECO A M, et al. Characterization of selenium-enriched wheat by agronomic biofortification[J]. *Food Sci Technol*, 2015, 52(7): 4236-4245.