

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.81239

快速溶剂萃取—高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定富硒食用油中 8 种硒形态

梁志森^{1,2} 张书迪³ 凌 逍^{1,2} 陈玉珍^{1,2}

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447; 2. 国家加工食品质量检验检测中心(广东), 广东 广州 511447; 3. 厦门医学院, 福建 厦门 361023)

摘要: [目的] 针对富硒食用油中硒形态检测的现有方法局限性, 如硒形态相互转化、酶解时间长和可检测硒形态种类较少等问题, 提出一种优化策略。 [方法] 采用快速溶剂萃取法辅助蛋白酶 K 进行酶解, 并建立高效液相色谱—电感耦合等离子体串联质谱法(HPLC-ICP-MS)。 [结果] 40 °C 下, 当蛋白酶 K 用量为 35 mg、静态萃取时间为 5 min 时, 硒形态提取率最高可达(83.65±2.36)%。 8 种硒形态目标物在 20 min 内可被有效分离, 在 2~100 μg/L 范围内线性良好($R^2 \geq 0.999$), 检出限为 0.20~0.60 μg/kg, 定量限为 0.60~1.80 μg/kg, 加标回收率为 82.3%~112.3%, 相对标准偏差 ≤ 5.60%。 [结论] 该方法提升了硒形态分析的效率 and 准确性。

关键词: 硒形态; 电感耦合等离子体质谱法; 混合模式色谱; 动态反应池; 有机进样; 快速溶剂

Determination of eight selenium species in selenium-enriched edible oil with accelerated solvent extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

LIANG Zhisen^{1,2} ZHANG Shudi³ LING Xiao^{1,2} CHEN Yuzhen^{1,2}

(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Company Limited, Guangzhou, Guangdong 511447, China; 2. National Quality Inspection and Testing Center for Processed Foods (Guangdong), Guangzhou, Guangdong 511447, China; 3. Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361023, China)

Abstract: [Objective] In this study, an optimized strategy was proposed to address the limitations of current methods for detecting selenium species in selenium-enriched edible oils, such as the transformation between selenium species, long enzymatic hydrolysis time, and the limited number of detectable selenium species. [Methods] Protease K-assisted hydrolysis was performed using accelerated solvent extraction, and a high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) method was established. [Results] At 40 °C, with a proteinase K dosage of 35 mg and a static extraction time of 5 min, the extraction rate of selenium species could reach a maximum of (83.65±2.36)%. Eight target selenium species could be effectively separated within 20 min, with good linearity in the range of 2~100 μg/L ($R^2 \geq 0.999$), detection limits of 0.20~0.60 μg/kg, quantification limits of 0.60~1.80 μg/kg, spiked recovery rates between 82.3% and 112.3%, and relative standard deviations ≤ 5.60%. [Conclusion] This method improves the efficiency and accuracy of selenium speciation analysis.

Keywords: selenium species; inductively coupled plasma mass spectrometry; mixed-mode chromatography; dynamic reaction cell; organic sampling; accelerated solvent

富硒食用油具有很高的营养价值和健康功效, 是日常硒摄入的关键来源之一^[1]。硒形态分为无机硒和有机

基金项目: 福建省自然科学基金(编号: 2022J05321); 广东省市场监督管理局科技项目(编号: 2023CZ07)

通信作者: 梁志森(1989—), 男, 广州检验检测认证集团有限公司高级工程师, 博士。E-mail: 522794556@qq.com

张书迪(1991—), 男, 厦门医学院副教授, 博士。E-mail: zsd@xmmc.edu.cn

收稿日期: 2024-12-03 改回日期: 2025-02-10

硒,无机硒的适宜补充浓度已接近其毒性浓度^[2],而有机硒在生物体中的毒性较小,生物利用度更高^[3]。因此,定性定量检测多种硒形态对科学评估富硒食用油的安全性和功能活性至关重要。硒代氨基酸是植物体内主要的有机硒形式,不同硒形态的功能活性存在显著差异^[4]。硒代氨基酸在植物中的存在形式一般分为硒代胱氨酸(SeCys₂)、L-硒甲基硒代半胱氨酸(SeMC)和硒代蛋氨酸(SeMet)^[5]。此外,碎米苳等富硒油料作物中还会积累硒代羊毛硫氨酸(SeLan),而SeLan具有良好的抑癌、抗菌等作用^[6-7];且SeMC、甲基亚硒酸(MSA)和硒代乙硫氨酸(SeEt)等物质具有抗癌效果^[8-9]。目前,GB 5009.93—2017仅能测定总硒含量,而GB/T 5750.6—2023仅能同时分析5种常见硒形态,未能满足市场对多种硒形态同时定量检测的需求。

硒形态的前处理方法主要有液相萃取法、酶解提取法以及辅助提取法^[10]。液相萃取法所需温度较高、萃取时间较长且萃取剂可能影响硒形态稳定性。Gergely等^[11]在50℃下使用碱提取香菇中的3种硒形态,但因SeMet的氧化导致结果偏差较大。酶解提取法条件温和、提取效率高,但酶解时间通常长达10 h以上,不适用于大批量样品的常规检测^[10, 12]。Wu等^[13]研究表明,超声辅助提取碎米苳中硒代氨基酸的效率更高;梁志森等^[14]通过优化微波条件辅助胰蛋白酶酶解,使得植物性富硒食品中7种硒形态的回收率均达90%以上。然而,酶解过程中某些食品基质仍出现部分硒形态转化或氧化的情况,导致定量结果不准确。此外,由于流动相中甲醇含量较低,难以分离更多的硒形态。而快速溶剂萃取法(ASE)能同时处理大批量样品,通过注入氮气、调节萃取温度能避免硒形态的转化、氧化^[15]。

目前,高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)具有更高的灵敏度和精确度^[16-17],已被广泛应用于食品中硒形态的分离与检测。而色谱柱和流动相的选择对于硒形态的可分析种类的增加至关重要,如杨芬等^[18]、刘文政等^[19]使用了阴离子交换柱对山茶油中硒形态进行了分析,仅检出3~5种硒形态;韦淑毅等^[20]使用C₁₈柱检测了富硒酵母中的SeMet,但需离子对试剂和衍生剂,操作繁琐,且会缩短色谱柱寿命。目前,硒形态检测的研究尚未见采用混合模式色谱柱的分离方式。此外,为充分发挥混合模式色谱柱的分离性能^[21-22],需引入一定浓度的有机相,但过高浓度的有机相会导致ICP-MS中短管熄火,限制了可同时分离检测的硒形态种类。在前期研究^[14]的基础上,研究拟采用ASE法作为前处理手段,以改善硒形态转化、氧化的情况并缩短酶解时间。通过提高流动相中有机相浓度、引入有机进样系统以消除锥口中积碳,建立一种与混合模式色谱柱兼容的ICP-MS法,以提高对不同硒形态的分离能力,扩展可检

测的硒形态种类数量,并分析L-硒甲基硒代半胱氨酸、L-硒代蛋氨酸和硒代乙硫氨酸3种主要硒形态的稳定性和转化规律,以期为富硒食用油中硒形态的高通量筛查和分辨技术的开发提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

- 富硒油、富硒调和植物油:市售;
高纯甲烷、高纯氧气:纯度99.999%,广州市广气气体有限公司;
高纯氧气:纯度99.99%,广州市广气气体有限公司;
硒酸根[Se(VI)]标准溶液、亚硒酸根[Se(IV)]标准溶液:质量浓度1 000 mg/L,美国Inorganic Ventures公司;
硒代胱氨酸(SeCys₂)标准溶液、L-硒甲基硒代半胱氨酸(SeMC)标准溶液、L-硒代蛋氨酸(SeMet)标准溶液:浓度分别为0.560, 0.433, 0.499 μmol/g,中国计量科学研究院;
硒代乙硫氨酸(SeEt):纯度>98%,加拿大TRC公司;
甲基亚硒酸(MSA):纯度>98%,美国Sigma-Aldrich公司;
硒羊毛硫氨酸(SeLan):纯度>98%,广州佳途科技公司;
氨水、柠檬酸氢二铵、甲酸、过氧化氢(质量分数30%):分析纯,广州化学试剂厂;
甲醇:色谱纯,美国默克公司;
蛋白酶K:30 U/mg,上海源叶生物科技有限公司;
试验用水由超纯水系统制备。
- ### 1.2 仪器与设备
- 超纯水系统:A2S-05-C型,美国艾科浦公司;
电子天平:BCE224-1CCN型,德国赛多利斯公司;
高效液相色谱仪:NexSAR型,美国珀金埃尔默公司;
电感耦合等离子体质谱仪:NexION 1000型,美国珀金埃尔默公司;
快速溶剂萃取仪:ASE 350型,美国Dionex公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制

(1) 单标储备液:称取8种标准品适量,分别置于100 mL容量瓶中,用水定容,配制成为100 mg/L的单标储备液,于4℃下保存。

(2) 混合标准系列溶液:分别吸取适量的各组分单标储备液,用水稀释至0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 μg/L,现配现用。

1.3.2 色谱条件优化

(1) 分析柱:分别考察Trinity P1(150 mm×3.0 mm, 3 μm)、Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1(250 mm×

4.6 mm, 5 μ m) 和 SIELC Newcrom AH(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 3 种混合模式色谱柱对 8 种硒形态的分离效果。进样量 10 μ L; 流速 0.8 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相为 1.0 mmol/L 柠檬酸氢二铵+10% 甲醇(φ)+4% 甲酸(φ), 等度洗脱; pH 2.2。

(2) 柱温: 分析柱为 SIELC Newcrom AH(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 保护柱为 Newcrom AH(50 mm \times 4.6 mm); 进样量 10 μ L; 流速 0.8 mL/min; 考察柱温(25, 28, 30, 32, 35 $^{\circ}$ C) 对 8 种硒形态分离效果的影响; 流动相为 1.0 mmol/L 柠檬酸氢二铵+10% 甲醇(φ)+4% 甲酸(φ), 等度洗脱; pH 2.2。

(3) 流动相: 分析柱为 SIELC Newcrom AH(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 保护柱为 Newcrom AH(50 mm \times 4.6 mm); 进样量 10 μ L; 流速 0.8 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 采取等度洗脱法, 固定 4% 甲酸(φ), 分别比较流动相中不同浓度柠檬酸氢二铵(0.5, 1.0, 2.0 mmol/L) 与不同体积分数甲醇(5%, 10%, 15%) 对 8 种硒形态分离效果的影响。

(4) pH: 分析柱为 SIELC Newcrom AH(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 保护柱为 Newcrom AH(50 mm \times 4.6 mm); 进样量 10 μ L; 流速 0.8 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相为 1.0 mmol/L 柠檬酸氢二铵+10% 甲醇(φ)+4% 甲酸(φ), 等度洗脱; 考察 pH(1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 3.2) 对 8 种硒形态分离效果的影响。

1.3.3 质谱条件优化

(1) 甲烷流速: 射频功率 1 600 W; 雾化器流速 0.78 L/min; 等离子体流速 17 L/min; 辅助气体流速 1.2 L/min; 采集时间 900 ms; PFA 同心雾化器; 采样锥和截取锥为铂锥; 监测质量数为 ^{80}Se 。选择 Ge 作为内标元素进行校正。氧气流速 0.06 L/min; 选择以高纯甲烷为反应气的动态反应池模式, 考察高纯甲烷流速(0.00, 0.20, 0.30, 0.50, 0.60 mL/min) 对背景等效浓度(BEC) 的影响; 带阻参数 $q(\text{RP}q)$ 为 0.55。

(2) $\text{RP}q$: 甲烷流速 0.30 mL/min; 氧气流速 0.06 L/min; 考察 $\text{RP}q$ (0.25, 0.35, 0.45, 0.55, 0.65, 0.75) 对 BEC 的影响。

(3) 氧气流速: 保持上述最优质谱条件, 考察氧气流速(0.04, 0.05, 0.06 L/min) 对 BEC 的影响。

1.3.4 样品前处理优化 以 8 种硒形态含量之和占样品总硒含量的比值(以硒计) 来代表各目标硒形态的提取率。

(1) 蛋白酶用量: 分别称取约 0.2 g(精确至 0.000 1 g) 样品于萃取池, 加入 10 mL 水作为提取剂, 放入快速溶剂萃取仪中, 分别加入不同蛋白酶 K, 考察其用量(25, 30, 35, 40, 45 mg) 对硒形态提取率的影响。仪器采用 45 $^{\circ}$ C、10 MPa 压力及 60% 置换率萃取, 依次加热 5 min、静态萃

取 5 min, 循环 2 次, 氮气吹扫 100 s, 冲洗体积为 100%。ASE 萃取完后, 将收集瓶下层清液转移至超滤管过滤, 滤液供 HPLC-ICP-MS 上样测定, 同时做空白试验。

(2) 萃取温度: 分别称取约 0.2 g(精确至 0.000 1 g) 样品和 0.035 g(精确至 0.000 1 g) 蛋白酶 K 于萃取池, 加入 10 mL 水作为提取剂, 放入快速溶剂萃取仪中, 考察萃取温度(40, 45, 50, 55, 60 $^{\circ}$ C) 对硒形态提取率的影响。

(3) 静态萃取时间: 仪器采用 40 $^{\circ}$ C、10 MPa 压力及 60% 置换率萃取, 固定加热时间 5 min, 考察静态萃取时间(5, 10, 15 min) 对硒形态提取率的影响。

1.3.5 总硒含量测定 按 GB 5009.93—2017 执行。

1.3.6 硒形态转化过程分洗 分别取 10 mL 质量浓度为 50 μ g/L 的 SeMC、SeMet 和 SeEt 溶液于 15 mL 离心管中, 加入 100 μ L H_2O_2 以控制氧化起点。分别按 1.3.2、1.3.3 中的最优条件进行测试, 考察目标物随氧化时间延长的变化情况。

1.3.7 实际样品测定 分别称取约 0.2 g(精确至 0.000 1 g) 样品和 0.035 g(精确至 0.000 1 g) 蛋白酶 K 于萃取池, 加入 10 mL 水作为提取剂, 放入快速溶剂萃取仪中。仪器采用 40 $^{\circ}$ C、10 MPa 及 60% 置换率萃取, 依次加热 5 min、静态萃取 5 min, 循环 2 次, 氮气吹扫 100 s, 冲洗体积为 100%。ASE 萃取完后, 将收集瓶下层清液转移至超滤管过滤, 滤液供 HPLC-ICP-MS 测定, 同时做空白试验。

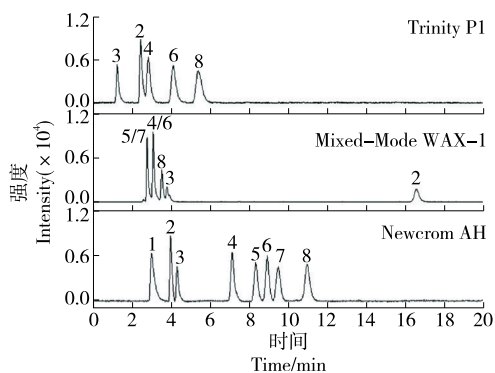
1.3.8 数据处理 各试验重复 3 次, 采用 Origin 9.0 软件进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 色谱柱 由图 1 可知, Se(VI)、SeLan 和 SeCys₂ 在 Trinity P1 柱中无法出峰; SeLan 和 SeCys₂、SeMC 和 SeMet 在 Mixed-Mode WAX-1 柱中完全重合、无法分离, 且 Se(VI) 无法出峰。Newcrom AH 柱能同时分离 8 种硒形态, 在色谱条件优化后能达到基线分离效果。Trinity P1 和 Mixed-Mode WAX-1 色谱柱无法实现所有硒形态的有效分离, 而 Newcrom AH 色谱柱则表现出色, 可能是因为 Newcrom AH 色谱柱的固定相具有更好的选择性和稳定性。因此, 采用 Newcrom AH 柱。

2.1.2 流动相有机相及其体积分数 试验表明, 当加入乙腈时, Se(IV) 和 MSA, SeLan、SeMet 和 SeCys₂ 均出现部分重叠, 这是由于乙腈的洗脱能力较强, 导致目标物在色谱柱中保留时间不足; 甲醇的洗脱能力较乙腈的弱, 当甲醇体积分数为 5% 时, SeLan 和 SeMet 完全重叠, 不能区分; 当甲醇体积分数为 15% 时, Se(IV) 和 MSA 发生重叠, 不能满足分析需求; 当甲醇体积分数为 10% 时, 8 种目标物基本分开, 但 Se(IV) 和 MSA、SeLan、SeMet 和 SeCys₂ 未能实现基线分离, 仍需进一步优化其他色谱条件。

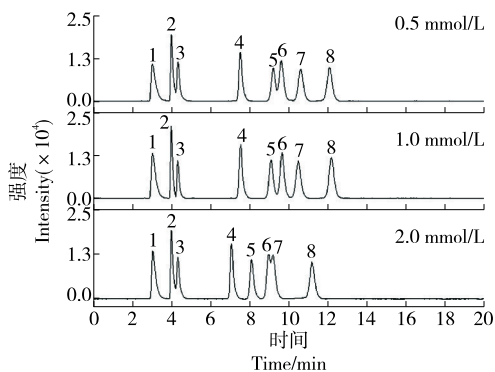


1. Se(VI) 2. Se(IV) 3. MSA 4. SeMC 5. SeLan 6. SeMet
7. SeCys₂ 8. SeEt

图1 甲烷气体DRC模式下不同色谱柱分离8种硒形态的色谱图

Figure 1 Chromatogram of the separation of eight selenium species using different chromatographic columns under DRC mode with methane gas

2.1.3 流动相离子强度 由图2可知,当柠檬酸氢二铵浓度为0.5 mmol/L时,SeLan和SeMet部分重叠;当柠檬酸氢二铵浓度为2.0 mmol/L时,色谱峰保留时间稍有缩短,SeMet和SeCys₂几乎完全重叠。这是因为随着离子强度的增加,溶液中离子与待测物竞争固定相中的电荷位点,减少了带电荷待测物与固定相的相互作用,缩短了保留时间。当柠檬酸氢二铵浓度为1.0 mmol/L时,8种目标物可以同时分离。因此,选择柠檬酸氢二铵浓度为1.0 mmol/L。



1. Se(VI) 2. Se(IV) 3. MSA 4. SeMC 5. SeLan 6. SeMet
7. SeCys₂ 8. SeEt

图2 柠檬酸氢二铵不同浓度下8种硒形态的色谱图

Figure 2 Chromatogram of eight selenium species at different concentrations of ammonium citrate dihydrate

2.1.4 流动相pH 试验表明,当流动相pH<2.2时,降低pH值会小幅度缩短色谱峰的保留时间,对分离效果无明显影响;当流动相pH>2.2时,提高pH值会大幅度缩短色

谱峰的保留时间,分离效果变差;当流动相pH为2.2时,8种硒形态均能实现基线分离。这可能是因为8种硒形态在pH为2.2的酸性环境下主要以阳离子形式存在,调节合适的pH有助于混合色谱柱固定相对不同硒形态的高效分离。

2.1.5 柱温 试验表明,当柱温<30℃时,目标物分离度稍差;当柱温为30℃时,各目标物的分离度最佳;当柱温>30℃时,目标物分离度未见明显变化;故选择30℃为试验条件。

2.2 质谱条件优化

由表1可知,固定RP_q为0.25,当甲烷流速为0.30 mL/min时,BEC和RSD均为最小值。固定甲烷流速为0.30 mL/min,当RP_q为0.55时,BEC和RSD均为最小值。DRC模式将BEC从1 906.12 ng/L降至102.48 ng/L,RSD从7.70%降至1.32%,表明与未使用DRC模式相比,通过调整DRC模式中甲烷流速可有效校正质谱干扰,显著降低背景等效质量浓度(BEC)并提高检测灵敏度。

表1 DRC参数优化

Table 1 Optimum parameters of DRC

低质量截取 (RP _q)	甲烷气流速/(mL·min ⁻¹)	背景等效质量浓度/(ng·L ⁻¹)	相对标准偏差(RSD)/%
0.25	0.00	1 906.12	7.70
0.25	0.20	200.34	2.47
0.25	0.30	127.51	1.40
0.25	0.50	221.15	1.74
0.25	0.60	437.81	2.34
0.35	0.30	137.27	2.30
0.45	0.30	145.45	1.58
0.55	0.30	102.48	1.32
0.65	0.30	136.32	1.69
0.75	0.30	142.19	4.73

在等离子体气中引入氧气,将有机物完全燃烧成二氧化碳,可避免炬管熄火的同时改善锥口的积碳现象。当氧气流速为0.05 L/min时,空白背景响应最低,且灵敏度最高,这验证了有机进样方式条件设置的有效性。而增大或减少氧气流速,⁸⁰Se的信号强度均下降,是由于氧气流量过小无法将有机物完全燃烧,氧气流量过大则会加重炬管的负载,影响灵敏度。因此,选择最佳氧气流速为0.05 L/min。

2.3 前处理方法优化

2.3.1 蛋白酶K用量与酶解温度 前期研究中,对胰蛋白酶、中性蛋白酶、蛋白酶XIV以及蛋白酶K的酶解效果进行了比较。样品经蛋白酶K酶解后,目标物提取率最

高;且蛋白酶 K 能在较宽的 pH 范围(4~12)和温度区间(20~50 °C)内保持活性。因此,使用蛋白酶 K 作为酶解酶,与 Cao 等^[23]的研究结论一致。

由图 3 可知,当酶用量 < 35 mg 时,标准差偏大,可能是蛋白酶用量较低时,蛋白质水解不完全;酶用量不足时,试验条件波动对结果的影响更敏感,导致结果的变异性增加,从而使提取率随着酶用量的增加而明显升高;当酶用量 ≥ 35 mg 时,提取率趋向稳定。因此,酶用量选择 35 mg,此时提取率为 (83.65 ± 2.36)%。保持酶用量为 35 mg,当酶解温度为 40~50 °C 时,提取率为 82.50%~

83.59%;当酶解温度为 55~60 °C 时,提取率随温度升高呈明显下降趋势,最低至 67.56%。这可能是由于蛋白酶 K 在 40~50 °C 范围内可保持高活性,能够有效分解样品中的蛋白质,释放出更多硒形态,但温度过高会导致蛋白酶 K 逐渐失活,导致酶解不充分,提取率下降,且酶解产物的稳定性也可能受到酶解温度的影响,导致标准差偏大。因此,选择最佳酶解温度为 40 °C。

2.3.2 静态萃取时间 试验表明,静态萃取时间对硒形态的提取率无显著影响,因此,选择最短时间 5 min 进行后续试验。

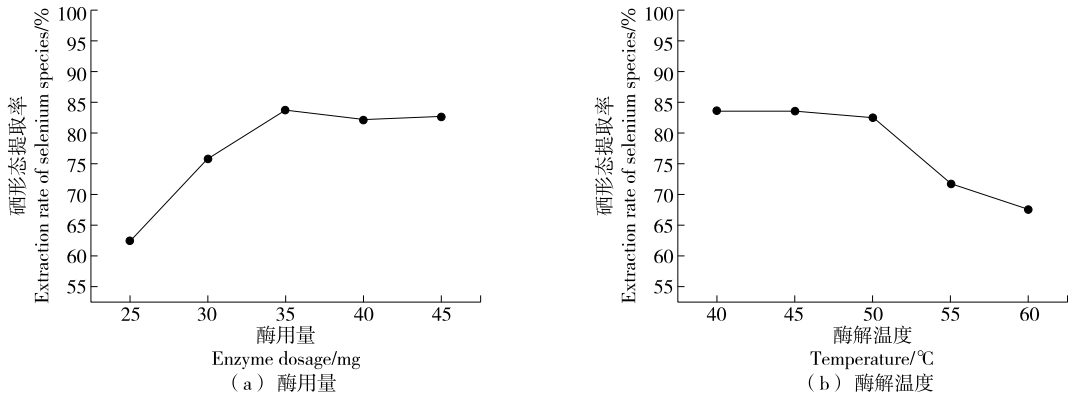


图 3 酶用量、温度对硒形态提取率(以硒计)的影响

Figure 3 Effect of enzyme dosage and temperature on the extraction rate of selenium species (calculated as selenium)

2.4 方法学考察

2.4.1 硒形态的稳定性 由图 4 可知,未氧化时,SeMC 在 7.10 min 附近出峰;氧化 10 min 后,SeMC 峰强度显著下降并分裂出一个单峰(保留时间为 7.44 min),推测为二甲基二硒化物^[24]。随着氧化时间的延长,SeMC 及其氧化产物均迅速转化为 MSA(保留时间为 4.32 min);氧化 480 min 后,SeMC 几乎完全转化为 MSA,说明 MSA 为 SeMC 氧化的最终产物;SeMet 在氧化过程中具有良好的稳定性,未氧化前 SeMet 在 8.90 min 附近出峰,氧化 480 min 后才有少量氧化产物 MSA 被检测出,SeMet 仍保持稳定。这是由于 SeMet 与 H₂O₂ 的氧化需先形成稳定的中间体——蛋氨酸二羟基硒化物,而该反应的反应速率常数较低^[25]。未氧化前,SeEt 的保留时间为 10.93 min,氧化 9.52 min 后出现了明显的单峰,该峰与 SeCys₂ 的保留时间一致。故推测 SeCys₂ 可能是 SeEt 氧化过程的中间产物,但具体的氧化机理有待进一步研究。此外,在不同氧化时间段,SeEt 均出现一个宽肩峰,可能是因为 SeEt 的官能团转化为环状物^[26-27]。相比于 SeMC 和 SeEt,SeMet 最为稳定,不易受到食品加工和贮藏条件的影响。

2.4.2 线性范围、检出限和定量限 由表 2 可知,8 种硒形态在 2~100 μg/L 质量浓度范围内的相关系数均 > 0.999 3,线性关系良好。采用逐级稀释法测定方法检出限和定量

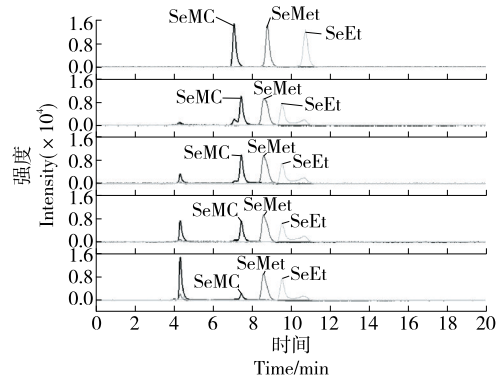


图 4 SeMC、SeMet 和 SeEt 在不同氧化时间的色谱图
Figure 4 Chromatograms of SeMC, SeMet, and SeEt after oxidation for different durations

限,以 3 倍信噪比(S/N)对应的质量浓度为检出限,10 倍 S/N 对应的质量浓度为定量限,测得 LOD 为 0.20~0.60 μg/kg, LOQ 为 0.60~1.80 μg/kg,表明该方法的灵敏度较高,能适用于实际样品的测定。

2.4.3 回收率和相对标准偏差 由表 3 可知,食用油基质中 8 种硒形态的平均加标回收率均为 82.28%~112.29%,RSD 均 < 5.60%。表明目标物在提取过程中形态稳定,未出现转化现象,验证了试验方法对 8 种硒形态较高的准确度和精密度。

表2 保留时间、标准曲线方程、相关系数、方法检出限和方法定量限

Table 2 Retention times, standard equations, correlation coefficients (R^2), limits of detection (LODs), and limits of quantitation (LOQs) of this method

目标物	保留时间/min	标准曲线	相关系数 R^2	LOD/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
Se(VI)	2.97	$y=1\ 769.01x+2\ 138.75$	0.999 8	0.60	1.80
Se(IV)	3.93	$y=1\ 622.67x-256.41$	0.999 7	0.20	0.60
MSA	4.34	$y=1\ 236.14x+1\ 067.70$	0.999 5	0.40	1.20
SeMC	7.12	$y=1\ 631.23x+2\ 608.94$	0.999 4	0.30	0.90
SeLan	8.31	$y=1\ 282.46x+1\ 025.05$	0.999 4	0.30	0.90
SeMet	8.93	$y=1\ 629.74x+122.42$	0.999 3	0.30	0.90
SeCys ₂	9.50	$y=1\ 714.15x+1\ 827.65$	0.999 3	0.60	1.80
SeEt	10.96	$y=1\ 763.17x+2\ 801.51$	0.999 6	0.40	1.20

表3 富硒食用油样品中8种硒形态的加标回收率和相对标准偏差

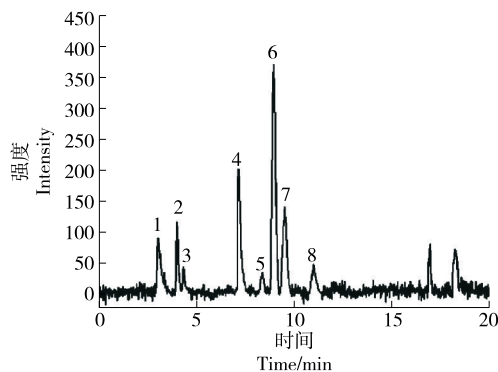
Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of eight selenium species in real selenium-enriched edible oil samples

样品	加标量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Se(VI)		Se(IV)		MSA		SeMC		SeLan		SeMet		SeCys ₂		SeEt	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
食用调和油	5.0	92.87	2.19	95.05	1.89	91.29	2.62	90.14	2.81	107.43	4.19	102.29	4.31	92.02	4.98	82.28	1.25
	10.0	98.33	1.71	92.90	1.96	90.89	3.28	91.41	2.72	102.68	2.18	104.87	1.71	95.65	1.34	86.76	3.09
	50.0	108.21	3.33	89.71	1.82	87.90	3.37	88.21	2.05	101.13	4.43	91.49	5.12	97.39	1.64	87.76	2.15
山茶油	5.0	82.45	4.19	97.55	1.52	85.29	1.62	97.14	3.86	110.83	2.79	112.29	4.61	112.02	5.12	92.98	4.65
	10.0	82.32	3.71	96.00	2.26	83.39	1.48	89.41	2.22	108.94	3.18	104.87	5.51	105.65	3.95	96.06	2.09
	50.0	88.22	3.33	94.71	0.53	82.90	1.37	92.21	4.05	110.61	3.00	105.49	4.33	107.39	5.02	97.70	1.55

2.5 实际样品测定

由表4可知,试验测定的富硒食用调和油中,有机硒占总硒百分比为60.0%~63.8%,其中硒形态主要以SeMet形态为主。富硒调和油一般选用大豆油、菜籽油等为主要原料,而SeMet为豆类中有机硒的主要赋存形态^[28],也是菜籽油中最主要的硒形态^[29]。此外,MSA、SeLan和SeEt在各类食用调和油中并未被检出。除SeMet外,山茶油的有机硒类中还检出较多的SeMC和SeCys₂,以及少量的SeLan、SeEt和MSA。山茶树中富含硒代半胱氨酸甲基转移酶,在酶的催化下SeMet均会被进一步转化为SeMC,而SeMC通常为富硒地带下植物体中的主要硒化合物^[30]。SeLan通常会在具有超常吸收与富集硒能力的植物种类中被检出^[7],SeEt在植物体中一般也为非主要的硒形态^[31]。MSA的检出可能与氨基酸的氧化降解有关^[32]。因此,该测定结果较符合实际情况。此外,由图5可知,硒山茶油样品在16~18 min出现了2处未知峰,而根据硒形态的提取率最高达(83.65±2.36)%,可知样品中仍有其他未定量的硒形态,表明酶解产物中可能存在未知的硒代氨基酸,有待深入探究。

由表5可知,试验方法能在更短时间内有效地提取和



1. Se(VI) 2. Se(IV) 3. MSA 4. SeMC 5. SeLan 6. SeMet
7. SeCys₂ 8. SeEt

图5 典型富硒山茶油样品中硒形态色谱图

Figure 5 Chromatograms of selenium species in typical *Camellia* oil sample

检测出更多种类的硒形态。同时,该方法的检测限(LOD)和定量限(LOQ)更为优异或至少相当,相对标准偏差(RSD)保持相等或更低水平,显示出更高的可靠性和精确度,从而证明了其明显的竞争优势。

表 4 富硒食用油样品中 8 种硒形态的测定结果

Table 4 Analytical results of eight selenium species in real selenium-enriched edible oil samples

样品	总硒含量			Se(VI)		Se(IV)		MSA		SeMC	
	标注值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/ %	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/ %	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/ %	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/ %	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/ %
食用调和油-1	100	47.3	3.4	5.3	6.8	6.1	7.8	≤ 1.2	/	3.7	8.6
食用调和油-2	100	67.2	4.6	6.4	6.2	7.2	7.2	≤ 1.2	/	15.4	7.3
食用调和油-3	100	67.4	4.2	12.3	7.4	9.6	8.9	≤ 1.2	/	16.8	7.5
山茶油-1	150	117.4	1.6	14.7	7.5	15.7	6.9	≤ 1.2	/	49.1	3.8
山茶油-2	200	183.7	1.1	28.7	4.5	27.3	5.2	5.0	8.7	62.4	2.1
山茶油-3	200	179.9	1.2	29.4	4.5	20.5	5.2	5.4	8.9	70.7	2.5

样品	SeLan		SeMet		SeCys ₂		SeEt		有机硒占总硒 百分比(以 硒计)/%
	硒代化合物 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/%	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/%	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/%	硒代化合 物含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/%	
食用调和油-1	≤ 0.9	/	64.1	2.5	4.2	6.9	≤ 1.2	/	62.9
食用调和油-2	≤ 0.9	/	75.3	2.8	5.9	7.2	≤ 1.2	/	60.0
食用调和油-3	≤ 0.9	/	79.4	3.2	6.7	7.1	≤ 1.2	/	63.8
山茶油-1	≤ 0.9	/	113.8	1.1	21.4	3.2	3.8	8.4	67.9
山茶油-2	5.6	6.4	138.3	1.8	55.8	2.3	11.5	5.0	65.3
山茶油-3	4.1	7.8	141.2	0.9	50.3	4.9	9.2	8.0	67.2

表 5 试验方法与其他方法的比较[†]

Table 5 Comparison of the suggested experimental method with other reported ones

方法	样品	提取时 间/min	硒形态 数量	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD/%	文献
ASE-HPLC-ICP-MS	食用油	20	8	2~100	0.20~0.60	0.60~1.80	≤ 5.6	
MAE-HPLC-ICP-MS	食用菌、大米、茶叶和豆乳粉	40	7	0.5~100.0	0.10~0.30	0.30~0.90	≤ 9.0	[14]
MAE-HPLC-ICP-MS	山茶油	50	5	5~100	0.16~1.15	/	≤ 5.0	[19]
ASE-HPLC-ICP-MS	淀粉类农作物	25	4	0.05~100.00	0.05~0.10	/	≤ 11.0	[33]
UAE-ICP-MS	小麦、玉米	180	4	1~200	4.8~7.0	/	≤ 5.5	[34]

[†] MAE为微波辅助酶解,UAE为超声辅助酶解。

3 结论

通过有机进样系统与动态反应池技术,实现了混合模式色谱与电感耦合等离子体质谱的联用,成功开发了一种快速、高效和灵敏可同时测定富硒食用油中 8 种关键硒形态的分析方法。相较于微波辅助酶解方法,试验方法采用的快速溶剂萃取法显著提高了样品前处理效率,使酶解时间从 40 min 缩短为 20 min,更适合大批量样品同时进行前处理。同时,各类硒形态在提取过程中稳定,未出现转化现象,硒形态提取率最高可达(83.65±2.36)%。在优化后的仪器条件下,试验方法的检出限和定量限低,分别为 0.20~0.60, 0.60~1.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$,灵敏度高、重复性好,能用于实际样品的测定。此外,在 30% H_2O_2 氧

化下,*L*-硒甲基硒代半胱氨酸会最终转化为甲基亚硒酸,而硒代乙硫氨酸会向硒代胱氨酸发生一定程度的转化,相比于*L*-硒甲基硒代半胱氨酸和硒代乙硫氨酸,*L*-硒代蛋氨酸最为稳定,不易被氧化。

参考文献

[1] 冯灏, 苏莹, 耿雅雯, 等. HPLC-ICP-MS 同时测定富硒食品中砷形态和硒形态[J]. 食品与机械, 2024, 40(7): 43-52.
FENG H, SU Y, GENG Y W, et al. Study on simultaneous determination of arsenic speciation and selenium speciation in selenium-rich foods by HPLC-ICP-MS[J]. Food & Machinery, 2024, 40(7): 43-52.
[2] LV Q Z, LIANG X M, NONG K Y, et al. Advances in research

- on the toxicological effects of selenium[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2021, 106(5): 715-726.
- [3] NIE X L, YANG X R, HE J Y, et al. Bioconversion of inorganic selenium to less toxic selenium forms by microbes: a review[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1167123.
- [4] 刘为, 尹金晶, 吴慕慈, 等. 富硒农产品中硒代氨基酸形态及其在不同蛋白组分中的分布[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 45-51, 190.
LIU W, YI J J, WU M C, et al. Selenium amino acids speciation in selenium-enriched agricultural products and their distribution in different protein components[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 45-51, 190.
- [5] BUCHNER P, TAKAHASHI H, HAWKESFORD M J. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(404): 1 765-1 773.
- [6] OUERDANE L, BOTH E B, XIANG J Q, et al. Water soluble selenometabolome of *Cardamine violifolia*[J]. Metallomics, 2020, 12(12): 2 032-2 048.
- [7] BOTH E B, SHAO S X, XIANG J Q, et al. Selenolanthionine is the major water-soluble selenium compound in the selenium tolerant plant *Cardamine violifolia*[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects, 2018, 1 862(11): 2 354-2 362.
- [8] ABDULAH R, MIYAZAKI K, NAKAZAWA M, et al. Chemical forms of selenium for cancer prevention[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 19(2/3): 141-150.
- [9] CAI J, SUN W, HWANG J, et al. Changes in S-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance[J]. Hepatology, 1996, 24(5): 1 090-1 097.
- [10] XIONG Y Y, HUANG Y T, LI L, et al. A review of plant selenium-enriched proteins/peptides: extraction, detection, bioavailability, and effects of processing[J]. Molecules, 2023, 28(3): 1 223.
- [11] GERGELY V, KUBACHKA K M, MOUNICOU S, et al. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1 101(1/2): 94-102.
- [12] 陈冰冰, 杨奕, 李嘉颐, 等. 富硒辣木籽蛋白降压肽的酶法制备、硒含量及稳定性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(8): 213-221.
CHEN B B, YANG Y, LI J Y, et al. Preparation, selenium content and stability of antihypertensive peptides from selenium-enriched *Moringa oleifera* seed protein by enzymatic hydrolysis[J]. Food & Machinery, 2022, 38(8): 213-221.
- [13] WU M L, ZHU Z Z, LI S Y, et al. Green recovery of Se-rich protein and antioxidant peptides from *Cardamine violifolia*: composition and bioactivity[J]. Food Bioscience, 2020, 38: 100743.
- [14] 梁志森, 陈玉珍, 李建华, 等. 高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法同时测定植物性富硒食品中7种硒元素形态含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 142-150.
LIANG Z S, CHEN Y Z, LI J H, et al. Simultaneously determination of the content of 7 kinds of selenium species in plant-based selenium-enriched food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(9): 142-150.
- [15] 王禹衡, 卢思佳, 张婧文, 等. 快速溶剂萃取—离子色谱—质谱法同时测定爆炸尘土中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 分析试验室, 2023, 42(4): 474-479.
WANG Y H, LU S J, ZHANG Q W, et al. Simultaneous determination of chlorate and perchlorate in explosion dust by accelerated solvent extraction-ion chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2023, 42(4): 474-479.
- [16] TIE M, LI B R, SUN T B, et al. HPLC-ICP-MS speciation of selenium in Se-cultivated *Flammulina velutipes*[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(1): 416-422.
- [17] CHEN B B, HU B, HE M, et al. Speciation of selenium in cells by HPLC-ICP-MS after (on-chip) magnetic solid phase extraction[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2013, 28(3): 334-343.
- [18] 杨芬, 谢邵文, 韦朝阳, 等. HPLC-ICP-MS联用技术研究甲醇对砷形态分析结果的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(6): 1 884.
YANG F, XIE S W, WEI C Y, et al. Effects of methanol addition on arsenic speciation analysis with HPLC-ICP-MS[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(6): 1884.
- [19] 刘文政, 贾亚琪, 周贻兵, 等. 超声提取结合 HPLC-ICP-MS 联用测定富硒山茶油中的硒形态[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(9): 197-203.
LIU W Z, JIA Y Q, ZHOU Y B, et al. Determination of selenium species in selenium enriched *Camellia* oil by ultrasonic extraction combined with HPLC-ICP-MS[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(9): 197-203.
- [20] 韦淑毅, 钟其顶, 高红波, 等. 高效液相色谱法检测富硒酵母中的硒代蛋氨酸[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 164-168.
WEI S Y, ZHONG Q D, GAO H B, et al. Determination of selenomethionine in selenium-enriched yeast by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Food Research and Development, 2012, 33(8): 164-168.
- [21] 丁健桦, 徐文平, 朱玉玲. 混合模式固相萃取—高效液相色谱法测定牛奶中4种非甾体抗炎药残留[J]. 分析化学, 2023, 51(6): 1 013-1 023.

- DING J H, XU W P, ZHU Y L. Mixed-mode solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in *Bovine* milk[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2023, 51(6): 1 013-1 023.
- [22] 王纪, 廖海明, 范慧红. 混合模式色谱-CAD-LTQ Orbitrap MS 联用分析甲硫氨酸中的杂质[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(22): 1 824-1 828.
- WANG J, LIAO H M, FAN H H. Analysis of impurity in methionine by mixed-mode chromatography-CAD-LTQ orbitrap MS[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(22): 1 824-1 828.
- [23] CAO J P, CHENG Y Z, XU B C, et al. Determination of different selenium species in selenium-enriched polysaccharide by HPLC-ICP-MS[J]. Food Analytical Methods, 2021, 14(11): 2 420-2 429.
- [24] KOTREBAI M, TYSON J F, BLOCK E, et al. High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 866(1): 51-63.
- [25] ZAINAL H A, LACROIX D E, WOLF W R. Utilization of chromatographic and spectroscopic techniques to study the oxidation kinetics of selenomethionine[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1996, 356(5): 311-314.
- [26] DIEMER V, OLLIVIER N, LECLERCQ B, et al. A cysteine selenosulfide redox switch for protein chemical synthesis[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 2 558.
- [27] PEHLIVAN Ö, WOJTKOWIAK K, JEZIEŃSKA A, et al. Photochemical transformations of peptides containing the N-(2-selenoethyl)glycine moiety[J]. ACS Omega, 2024, 9(14): 16 775-16 791.
- [28] 赵小红, 何慧, 贾蕾, 等. 生物强化硒和锌的豆芽制备、分布及形态研究[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 70-78.
- ZHAO X H, HE H, JIA L, et al. Study on preparation, distribution and morphology of bean sprouts biologically fortified with selenium and zinc[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 70-78.
- [29] 何潇潇, 周健, 马懿, 等. 加工方式对富硒菜籽油中硒含量及形态变化的影响[J]. 现代食品, 2023, 29(17): 200-206.
- HE X X, ZHOU J, MA Y, et al. Effects of processing methods on selenium content and form changes in selenium-enriched rapeseed oil[J]. Modern Food, 2023, 29(17): 200-206.
- [30] DUMONT E, VANHAECKE F, CORNELIS R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 385(7): 1 304-1 323.
- [31] 吴雅颖, 桂仁意, 汤黎, 等. HPLC-ICP-MS 联用技术测定竹笋中六种硒形态[J]. 营养学报, 2014, 36(5): 494-498.
- WU Y Y, GUI R Y, TANG J, et al. Analysis of six selenium species in bamboo shoot by high performance liquid chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2014, 36(5): 494-498.
- [32] 倪策, 曹天红, 陈敏, 等. 核桃粕源抗氧化活性肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 51-61.
- NI C, CAO T H, CHEN M, et al. Enzymatic hydrolysis preparation and activity analysis of antioxidant peptides derived from walnut dregs[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 51-61.
- [33] 季海冰, 章佳, 刘莉. 快速溶剂萃取—高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法快速测定淀粉类农作物中 4 种形态硒[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(9): 979-983.
- JI H B, ZHANG J, LIU L. HPLC-ICP-MS rapid determination of 4 species of selenium in starchy crops with accelerated solvent extraction[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2020, 56(9): 979-983.
- [34] 孟莉, 许亚丽, 夏曾润, 等. 高效液相色谱—电感耦合等离子体质谱法测定谷类食品中的 4 种硒形态[J]. 分析科学学报, 2021, 37(6): 843-846.
- MENG L, XU Y L, XIA Z R, et al. Determination of selenium species in cereals by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2021, 37(6): 843-846.