

陈铭学研究员主持“稻米质量安全与品质评价”特约专栏文章之三

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.06.003

曹赵云, 李洪艳, 柴爽爽, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定稻米中 5 种硒形态[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(6): 20-27.
CAO Z Y, LI H Y, CHAI S S, et al. Determination of five selenium species in rice by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(6): 20-27.

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定稻米中 5 种硒形态

曹赵云¹, 李洪艳², 柴爽爽¹, 许萍¹, 陈铭学¹✉

(1. 中国水稻研究所 农业农村部稻米及制品质量监督检验测试中心, 浙江 杭州 310006;
2. 贵州省联大检测技术有限公司, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 利用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术建立了富硒大米中 5 种硒形态的检测方法。采用反向 C18 色谱柱, 对流动相离子对浓度、洗脱盐浓度、pH 值进行了优化, 最终确定流动相组成为 15 mmol/L 乙酸铵溶液, pH5.5 和 0.2 mmol/L 四丁基氢氧化铵 (TBAH), 硒-甲基硒代半胱氨酸 (SeMeCys)、硒代半胱氨酸 (SeCys)、硒代蛋氨酸 (SeMet)、四价硒 Se(VI) 和六价硒 Se(IV) 5 种硒形态获得基线分离。大米样品用酶提法提取, 通过对酶的种类、酶的用量及酶解时间等对提取效率的研究, 确定样品与蛋白酶 (protease) XIV 酶量为 20:1 为最佳, 且最佳酶解时间为 20 h。结果表明本方法分离效率高, 方法线性良好, 灵敏度高, 回收率为 77.1%~107.3%, 硒-甲基硒代半胱氨酸 (SeMeCys)、硒代半胱氨酸 (SeCys)、硒代蛋氨酸 (SeMet) 的检出限和定量限分别为 0.0015 mg/kg 和 0.005 mg/kg, 四价硒 Se(VI) 和六价硒 Se(IV) 检出限和定量限分别为 0.002 5 mg/kg 和 0.009 mg/kg。为全面评价富硒大米质量和后续开展富硒大米膳食暴露评估提供技术支持。

关键词: RP-HPLC-ICP MS/MS; 富硒大米; 硒形态; 酶提法

中图分类号: TS201.4; S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)06-0020-08

网络首发时间: 2023-11-14 14:10:00

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20231114.1146.001>

Determination of Five Selenium Species in Rice by High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

CAO Zhao-yun¹, LI Hong-yan², CHAI Shuang-shuang¹, XU Ping¹, CHEN Ming-xue¹✉

(1. Rice Product Quality Supervision and Inspection Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China National Rice Research Institute, Hangzhou, Zhejiang 310006, China;
2. Guizhou Lianda Testing Technology Co., LTD, Guiyang, Guizhou 550025, China)

收稿日期: 2023-06-30

基金项目: 国家水稻产业技术体系 (CARS-01-47); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (CPSIBRF-CNRR-202207)

Supported by: The Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No. CARS-01-47); Fundamental Research Funds of the Central Research Institutes (No. CPSIBRF-CNRR-202207)

作者简介: 曹赵云, 男, 1981 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为稻米营养品质和质量安全检测技术。E-mail: zhaoyun-605@163.com

通讯作者: 陈铭学, 男, 1972 年出生, 博士, 研究员, 研究方向为稻米质量安全与风险评估。E-mail: cmingxue@126.com

Abstract: A detection method for five selenium species in Se-enriched rice was established using HPLC-ICP MS/MS. The ion pair concentration of mobile phase, elution salt concentration, pH value were optimized by using a reverse C18 chromatographic column, and the final mobile phase composition was determined to consist of 15 mmol/L ammonium acetate solution, pH 5.5 and 0.2 mmol/L TBAH, the baseline separation of SeMeCys, SeCys, SeMet, Se(VI) and Se(IV) was obtained. Selenium species in rice were extracted by enzyme extraction method. The effects of enzyme selection, enzyme dosage and extraction time on extraction efficiency were investigated. The optimal ratio of sample to protein XIV enzyme content was determined to be 20 : 1, and the optimal enzymatic hydrolysis time was 20 h. The method has high separation efficiency, good linearity, good precision, and high sensitivity, and the recovery was 77.1%~107.3%. The limits of detection and the limits of quantitation of SeMeCys (methylselenocysteine), SeCys (selenocystine), and SeMet (selenomethionine) were 0.001 5 mg/kg and 0.005 mg/kg, respectively, while the limits of detection and the limits of quantitation of Se(VI) and Se(IV) were 0.002 5 mg/kg and 0.009 mg/kg. The method provide technical support for objective and comprehensive evaluation of the quality of Se-enriched rice and subsequent assessment of dietary exposure to Se-enriched rice.

Key words: RP-HPLC-ICP MS/MS; Selenium-enriched rice; Se speciation; enzyme extraction method

硒是人和动物必需的微量元素，为多种含硒酶（如合成谷胱甘肽酶、硫氧还蛋白还原酶）的活性中心，在相关酶的合成过程中其重要作用，具有防癌抗癌，清除体内自由基，抗衰老和拮抗重金属毒性等生物功能，人体的多种疾病，如克山病、大骨节病、糖尿病、艾滋病等均与缺硒有关^[1-2]。为此，世界卫生组织于 1973 将硒定位为已知的 14 种必需的生物微量元素之一。2011 年，我国卫生部取消了食品中硒的限量标准。此外，微量元素硒得到更多国际组织和营养学家的重视，同时建议在膳食中添加富硒营养补充剂以预防硒缺乏症。

然而，硒的有益剂量和毒性剂量之间范围极窄，特别是不同赋存形态功效差异大，对富硒相关产品进行客观评价显得尤为关键。研究表明，硒的每日摄入量在 55~220 μg ，最低摄入量为 17 μg （以预防克山病发生为界限），而过量的硒会导致在硒慢性中毒^[3]。此外，硒的赋存形态决定了富硒农产品的品质优劣。硒形态包括有机硒和无机硒。若人体吸收过多的无机硒，主要为亚硒酸盐（Se(VI)）和硒酸盐（Se(IV)），则会出现一些副反应，因此部分发达国家选择不用简单的无机盐形态为硒的营养补充。相对而言，植物体中硒元素主要以大分子硒和硒代氨基酸及其衍生物形

式存在；其小分子硒化合物主要包括硒-甲基硒代半胱氨酸（SeMeCys）、硒代半胱氨酸（SeCys）、硒代蛋氨酸（SeMet），这些硒形态能充分被人体吸收利用，且对人体安全无副作用，是人日常膳食中获取硒的主要来源^[4]。研究表明硒代蛋氨酸具有生物利用率较高的特点，是补硒的最佳形态^[5]；硒代半胱氨酸固定结合于 GPx 活性位点中，在清除自由基的系统中发挥重要作用，具有抵抗细胞膜脂质氧化等功能^[6]；SeMeCys 与其运输载体被认为是植物体内具有抗肿瘤作用的含硒化合物^[7]。因此，科学的评价硒形态尤为重要。

酶的种类、酶解时间及酶的加入量是影响硒形态提取效率的重要因素。硒形态提取过程中常用到的酶有蛋白酶 XIV、蛋白酶 K、胃蛋白酶和胰蛋白酶等^[8]；Moreda-Pineiro 等采用除去灯笼果样品中的脂质和水分后再用蛋白酶 XIV 进行酶解的前处理方法提取不同种类的硒形态^[9]。Ruszczynska 等的研究表明利用脂肪酶和蛋白酶 XIV 可以实现同时提取大蒜和小萝卜等的硒化合物^[10]。

目前主要采用色谱与光谱或质谱等联用技术进行硒形态分析，如液相色谱-原子荧光/吸收光谱法（HPLC-AFS）^[11]，液相色谱-电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICP-MS）^[12]，毛细管电泳-电感

耦合等离子体质谱法 (CE-ICP-MS)^[13], 液相色谱-质谱法 (LC-MS)^[14], 气相色谱-质谱联用等^[15]。尽管毛细管电泳法是形态分析中极具潜力的分离技术, 但分离过程对基质依赖程度大, 通用性较差; 气相色谱法须对有机硒分子中的羧酸和氨基分别进行酯化和酰基化, 使其转化为可挥发性的物质, 步骤相对繁琐, 其实际操作难度大; 近年来, HPLC 技术在有机硒形态分析中得到广泛使用, 但多以离子交换色谱法为主, 其缺点是灵敏度较低。

本实验样品经蛋白酶水解提取, 提取液经反相离子对色谱分离后采用 ICP-MS/MS 技术检测, 实现稻米中硒-甲基硒代半胱氨酸 (SeMeCys)、硒代半胱氨酸 (SeCys)、硒代蛋氨酸 (SeMet)、四价硒 Se(VI)和六价硒 Se(IV)5 种硒形态的高灵敏度分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

硒代半胱氨酸: 重庆张邦医药科技有限责任公司; 硒酸根标准溶液、亚硒酸根标准溶液、甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸: 上海安谱实验科技股份有限公司; 脂肪酶、蛋白酶 XIV、乙酸铵: 美国西格玛技术有限公司; 四丁基氢氧化铵 (TBAH, 1 mol/L): 百灵威科技有限公司; 甲醇 (色谱纯): 德国默克有限公司; 过氧化氢 (分析纯): 国药集团化学试剂有限公司; 硝酸 (BV-III 级): 北京化学试剂研究所; 超纯水: Milli-Q 超纯水机制备。

电感耦合等离子体质谱仪 (8800 型)、高效液相色谱仪 (1100 型)、ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱: 美国安捷伦有限公司; Tube-Mill control 控制型试管研磨机: 德国 IKA 公司; Milli-Q Advantage A10 超纯水仪: 美国 Millipore 公司; 水相膜 (13 mm, 0.22 μm): 上海安谱实验科技股份有限公司; ZYW-110X30 往复式恒温水浴摇床: 上海智诚分析仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 硒形态酶解提取方法

称取匀质米粉 1.0 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL

离心管中, 加入 10 mL Tris-HCl 缓冲液, 室温下于超声水浴中超声 30 min。取出, 加入 25 mg 蛋白酶 XIV, 充分混匀后在 37 °C 恒温振荡器上以 300 r/min 的速率振荡酶解 20 h, 取出后于 5 000 r/min 的条件下离心 10 min。吸取 2 mL 上清液于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀后过 0.22 μm 滤膜, 待测。

1.2.2 硒形态仪器检测方法

ICP-MS/MS 仪器主要工作参数表 1。仪器采用氢气碰撞反应模式, 调节反应气氢气的流量以消除质谱检测过程中多原子离子 ⁴⁰Ar³⁸Ar⁺对 ⁷⁸Se 的干扰。高效液相色谱主要工作参数: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×250 mm, 5 μm)、流动相为 15 mmol/L 乙酸铵 (含 0.2 mmol/L 四丁基氢氧化铵、5%甲醇, pH5.5)、流速为 1 L/min、进样量为 50 μL。

表 1 ICP-MS/MS 仪器条件
Table 1 Instrumental condition of ICP-MS/MS

参数名称	参数
RF 功率/V	1 550
载气流量/(L/min)	0.85
碰撞模式	H ₂
补偿气/(L/min)	0.3
氢气流量/(mL/min)	3.5
等离子体气流量/(L/min)	15
同位素	⁷⁸ Se
积分时间/s	0.1
雾化室温度/°C	2

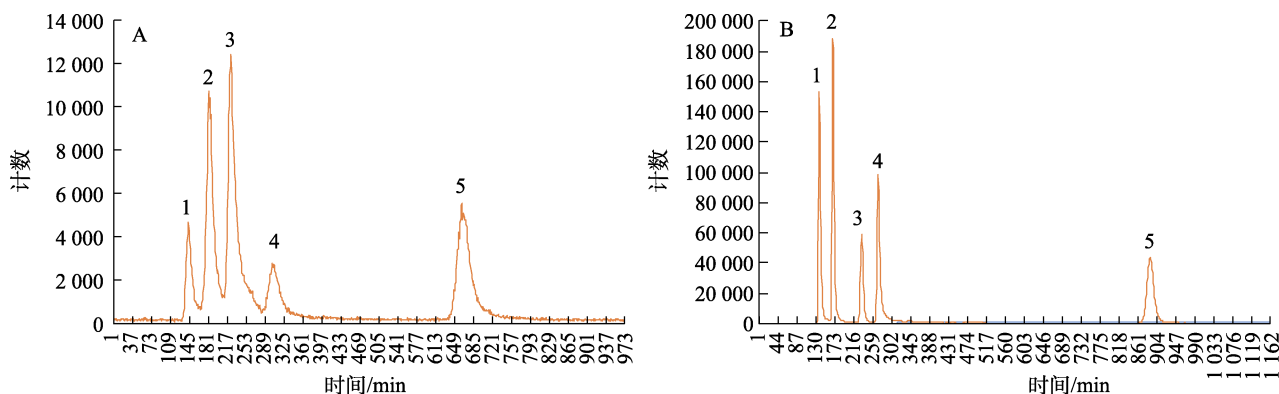
2 结果与分析

2.1 色谱分离模式的选择

针对硒形态的分离, 目前国内外主要以阴离子交换色谱法^[11]和反相离子对色谱法为主^[16-17], 实验对这两种分离系统进行了比较和优化。针对阴离子交换色谱法, 实验选用文献报道最多的 Hamilton PRP X-100 (4.1 mm×250 mm, 10 μm) 色谱柱, 并对其缓冲盐体系进行了优化。结果发现, 若采用 10 mmol/L 柠檬酸缓冲盐 (pH=5.0), 尽管可获得一定的分离, 但可能由于柱子的吸附作用, 使得各分析物在低浓度端 (小于 10 μg/L) 与质谱响应间线性关系较差。若使用 40 mmol/L 的 NH₄H₂PO₄ 缓冲体系 (pH=6.0), 虽获得与柠檬酸

缓冲体系极为类似的分离度和分析灵敏度（见图 1A），且方法线性也较好，但始终未实现 3 种分析物的基线分离。

在反相离子对色谱分离系统中，实验选用常规的反相 C18 色谱柱（ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm×250 mm, 5 μm），在最佳的分离条件下，



注：1：SeCys，2：SeMeCys，3：SeMet，4：Se(IV)，5：Se(VI)。

图 1 阴离子交换色谱柱 Hamilton PRP X-100 (A) 和反相 C18 色谱柱 (B) 的 5 种硒形态色谱图

Fig.1 Chromatogram of five Se species for anion exchange column Hamilton PRP X-100(A) and reversed phase C18 column (B)

2.2 反向离子对色谱流动相优化

2.2.1 离子对浓度优化

由于 5 种分析物均可带负电荷，尤其是四价硒 Se(IV)和六价硒 Se(VI)，它们都可与碱性离子对结合，使之与有机硒形态得到有效分离。四丁基氢氧化铵（TBAH）作为常见的离子对试剂，一直被广泛用于酸性物质的反相色谱分离^[17]。

实验设置 15 mmol 乙酸铵溶液（含 5%乙醇，pH 为 5.5）中含不同四丁基氢氧化铵浓度（0、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L）对 5 种硒形态出峰情况的影响。由图 2 可以看出，当流动相中不含 TBAH 时，5 种硒形态的出峰时间集中在 2.3~3.1 min，特别是 SeMeCys、SeMet、Se(IV)和 Se(VI)均未获得有效分离。随着流动相中 TBAH 浓度的增加，各分析物的保留时间均呈不同程度的增加，分离度随之增大。其中以 Se(VI)增加程度最为明显，如当 TBAH 浓度从 0 增加至 0.2 mmol/L 再到 1 mmol/L 时，其保留时间则从 3.1 min 增加到 18.4 min，直至超过 30 min，洗脱难度明显增加；相对而言，Se(IV)的增幅趋势可分为两段，即当 TBAH 浓度在 0.2 mmol/L 内时变化较为缓慢，之

即流动相中含 0.2 mmol/L 离子对、15 mmol/L 乙酸铵（pH 约为 5.5）及 5%甲醇时，对各种分析物的分离效果最好，实现了 3 种有机硒及无机硒形态的基线分离（见图 1B），且各分析物的响应值较上述离子交换色谱的约高 3 倍以上。为此，实验选择反相离子对色谱法为硒形态的分离模式。

后增幅明显加剧；3 种有机硒的保留时间变化最小，当 TBAH 大于 0.1 mmol/L 时，其保留时间基本趋于稳定。与保留时间变化趋势基本一致，各分析物间分离度也随着 TBAH 浓度的增大而增大，但唯有流动相中的 TBAH 浓度为 0.2 mmol/L 及以上时，各相邻分析物的分离度（R）为 2.42~18.4，即所有分析物均达到基线分离（ $R \geq 1.5$ ）。综合考虑分离和分析效率，实验选择 0.2 mmol/L 为最佳离子对浓度。

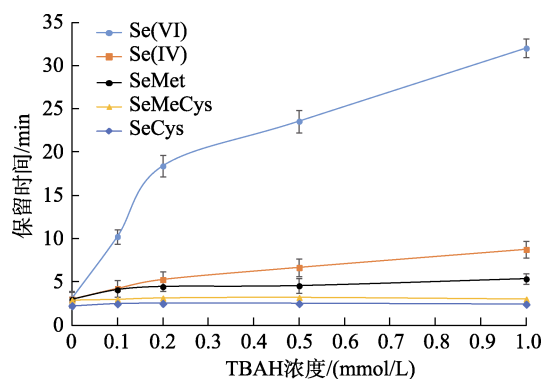


图 2 TBAH 浓度对硒形态分离效果的影响
Fig.2 Effect of TBAH concentrations on the separation effect of Se species

2.2.2 洗脱盐浓度优化

流动相中洗脱盐浓度对各分析物的分离产生重要影响。通过对不同缓冲盐及其浓度优化发现,当流动相中含有 15 mmol/L 乙酸铵时,各分析物间均可达到基线分离,且可获得较为适宜的分析时间。

实验设置含不同乙酸铵浓度(0、5、10、15、20 mmol/L, pH 为 5.5)的流动相,各流动相中均含 0.2 mmol/L 的 TBAH 和 5% 甲醇。由图 3 可以看出,随着乙酸铵浓度的增加,其中无机硒 Se(IV) 和 Se(VI) 的保留时间呈明显的下降趋势,而 3 种有机硒则无明显变化。尽管当乙酸铵浓度在 0~15 mmol/L 之间时,相邻分析物色谱峰均可获得基线分离,但乙酸铵浓度小于 15 mmol/L 时分析时间明显加长,影响了方法的分析效率。此外,若继续增加乙酸铵浓度(如 20 mmol/L),则导致 SeMet 和 Se(IV) 不能被有效分离。因此,方法选择 15 mmol/L 为最佳的乙酸铵浓度。

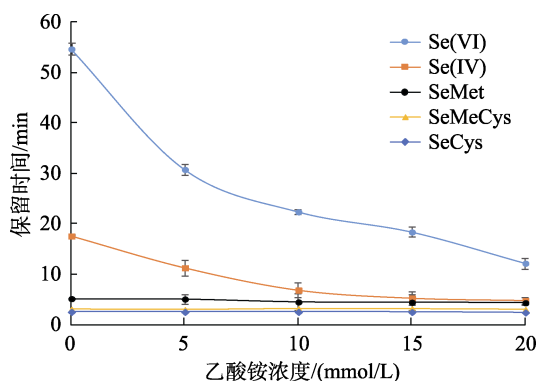


图 3 缓冲盐浓度对硒形态分离效果的影响

Fig.3 Effect of ammonium acetate concentrations on theseparation effect of Se species

2.2.3 pH 值对色谱分离和分析灵敏度的影响

基于流动相中最佳离子对试剂浓度和乙酸铵浓度,实验用乙酸分别调整其 pH 为 4.0、4.5、5.0~6.0 和 7.0。实验结果表明,随着流动相 pH 的升高,SeCys、SeMeCys 和 SeMet 的保留时间略有不同程度的增加,Se(IV) 和 Se(VI) 反而逐渐减小。由于本方法中,SeCys 和 SeMeCys、SeMet 和 Se(IV) 分离难度较大,是整个分离中的主要考量因素。结果表明,当流动相 pH 为 5.2~5.8 时,两对色谱峰均能达到基线分离,考虑到方法的统一性,选

择 pH5.5 为最佳 pH 条件。

2.3 样品提取条件优化

2.3.1 水解酶的选择

由于 SeCys、SeMet 主要结合在多肽链中形成硒蛋白。因此,要将这些硒代氨基酸从多肽链中完全释放出来,选择合适的酶就极为关键。目前,已报道的水解酶主要有蛋白酶 XIV(protease XIV)、蛋白酶 K (proteinase K) 和胰蛋白酶 (trypsin) 等^[17,18-19]。实验选取实际大米样品,分别用 trypsin、proteinase K 和 protease XIV 进行酶解,各种酶均为 50 mg,测定结果以各分析物的峰面积计 (n=3)。由图 4 可以明显看出,使用 protease XIV 时,各分析物的提取效率均高于 trypsin 和 proteinase K。因此,采用 protease XIV 的酶解效率最高。

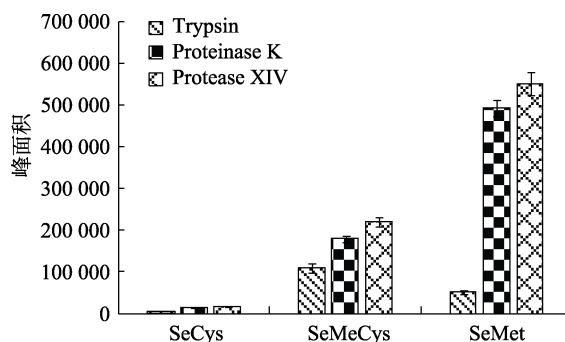


图 4 不同种类的酶对硒化合物提取效果的作用

Fig.4 Effect of the different types of enzymes on the extraction of Se species

2.3.2 酶量的优化

样品和酶量比例对目标物的提取效率有重要影响。选取含硒较高的稻米样品,设置样品酶量比分别为 40 : 1、20 : 1、10 : 1 和 5 : 1 (n=3),考察不同酶量比下 5 种硒形态的提取效果。由图 5 可以看出,随着样品酶量比的增大,不同分析物的提取量变化趋势略有不同。其中,SeMeCys 和 SeMet 随着样品酶量比的增大,各自提取量总体呈下降趋势,如当样品酶量比从 5 : 1 增加到 40 : 1 时,上述 4 种分析物的提取量占样品酶量比 5 : 1 的 84% 以下。然而,过量的酶(如样品酶量比 5 : 1)会导致 SeMeCys 提取量下降,原因可能是过量的酶降低了 SeMeCys 的雾化效率所

致；而过低的酶量（如样品酶量比 40 : 1）又酶解不彻底，因而样品酶量比 20 : 1 时，提取量最高，SeMeCys 和 SeMet 的提取量均达到样品酶量比为 5 : 1 时的 92% 以上。综合考虑，最终选择样品酶量比为 20 : 1 作为最佳酶量。

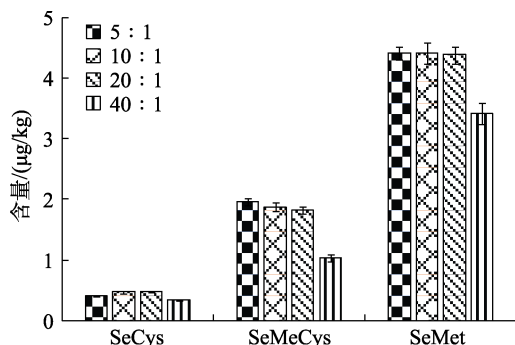


图 5 不同酶量比对硒形态提取效果的作用
 Fig.5 Effect of the different enzyme ratios on the extraction of Se species

2.3.3 提取时间优化

为保证样品被提取完全，实验对提取时间也进行了考察。实验采用实际样品与基质加标相结合方式，考察了提取时间对提取效果的影响。由图 6 可以看出，随着提取时间的延长，各分析物的提取量均呈增大趋势。其中，SeCys 的提取量在酶解 6 h 后急剧上升，较 2 h 时增加超过 2 倍；而后则缓慢上升，直至酶解 20 h 提取量基本达到最大，若进一步延长酶解时间至 24 h 时，其提取量则较 20 h 仅增加了 2.6%。SeMeCys 在酶解 12 h 内，其提取量一直呈明显增加趋势，当酶解 12 h 时其提取量已达 97.0%，之后则缓慢上升，直至酶解 20 h 提取量达到最大；若在延长酶解时间，

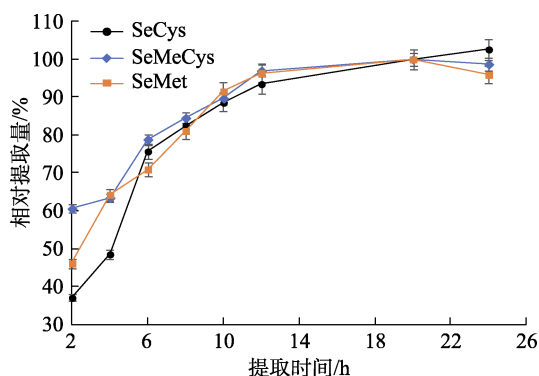


图 6 提取时间对硒形态提取效率的影响
 Fig.6 Effect of the extraction time on the extraction of Se species

则提取量基本不变。SeMet 的提取量随酶解时间变化趋势与 SeMeCys 情况相似，即当酶解进行 12 h 时达到提取量的 96.3%，之后也趋于稳定。因此，本方法酶解时间设为 20 h。

3 方法验证

3.1 方法准确度与精密度

方法准确度采用空白样品加标实验确定。选择一个稻米样品，分别进行了 3 个水平（SeCys、SeMeCys 和 SeMet 为 0.10、0.50 和 2.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，Se(VI)和 Se(IV)为 0.20、0.80 和 2.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）的加标回收实验（ $n=6$ ）。从表 2 可以看出，各分析物的总体加标回收率为 77.1%~107.3%。6 个平行的相对标准偏差为 2.3%~7.5%。因此，方法准确度和精密度均良好，可以满足稻谷中硒形态定量分析的相关技术要求。

表 2 五种硒形态加标回收率与精密度
 Table 2 Recoveries and precision of five Se species in rice samples

硒形态	添标水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	RSD/% ($n=6$)
SeCys	0.10	78.5	4.5
	0.5	87.3	3.7
	2.5	85.5	2.4
SeMeCys	0.10	77.1	6.2
	0.5	82.5	3.6
	2.5	90.2	5.4
SeMet	0.10	78.6	7.5
	0.5	102.9	6.4
	2.5	107.3	6.8
Se(IV)	0.20	96.0	2.5
	0.80	101.9	4.2
	2.00	105.0	2.3
Se(VI)	0.20	87.0	4.3
	0.80	86.4	4.7
	2.00	96.7	3.5

3.2 方法线性关系和检出限

本方法为外标法定量。SeCys、SeMeCys、SeMet 的线性范围为配制成 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，Se(IV)、Se(VI)的线性范围为 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。以各分析物浓度为横坐标，各分析物的色谱峰面积为纵坐标做工作曲线。结果表明，5 种硒形态线性关系良好，

其线性相关系数均大于 0.999 (见表 3)。对于方法检出限和方法定量限, 则采用空白样品结合空白加标方式确定, 其中方法检出限以大于 3 倍信噪比计, 方法定量限以大于 10 倍信噪比计。结果表明, 若取样量为 1.0 g, 提取液体积为 10 mL, 再经稀释 5 倍后进样测定, 则 SeCys、SeMeCys 和 SeMet 的方法检出限为 0.001 5 mg/kg, 定量限为 0.005 mg/kg; Se(IV)、Se(VI)的方法检出限为 0.002 5 mg/kg, 定量限为 0.009 mg/kg。

3.3 实际样品分析

利用本方法对在线下超市及网络购物平台购买的 10 个品牌的富硒大米样品进行 5 种硒形态的

测定, 结果见表 4。10 个品牌富硒大米中检测到不同含量的 SeMet, 其他 4 种硒形态含量均低于检出限。因此 SeMet 为本实验中富硒大米的主要硒形态。

表 3 5 种硒形态的线性关系和检出限
Table 3 The linear equation and limit of detection of five Se species

硒形态	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数 r
SeCys	0.1~50	$y = 41\,465.1x - 205.2$	0.999 9
SeMeCys	0.1~50	$y = 51\,044.1x - 174.3$	0.999 9
SeMet	0.1~50	$y = 50\,541.4x - 354.3$	0.999 8
Se(IV)	0.2~50	$y = 62\,432.8x - 6\,449.4$	0.999 9
Se(VI)	0.2~50	$y = 60\,920.5x - 4\,192.3$	0.999 8

表 4 富硒大米样品中的 5 种硒形态
Table 4 Five Se species in Se-enriched rice

硒形态	SeCys	SeMeCys	SeMet	Se(IV)	Se(VI)
样品 1	<LOD	<LOD	0.038	<LOD	<LOD
样品 2	<LOD	<LOD	0.027	<LOD	<LOD
样品 3	<LOD	<LOD	0.202	<LOD	<LOD
样品 4	<LOD	<LOD	0.051	<LOD	<LOD
样品 5	<LOD	<LOD	0.099	<LOD	<LOD
样品 6	<LOD	<LOD	0.022	<LOD	<LOD
样品 7	<LOD	<LOD	0.025	<LOD	<LOD
样品 8	<LOD	<LOD	0.062	<LOD	<LOD
样品 9	<LOD	<LOD	0.297	<LOD	<LOD
样品 10	<LOD	<LOD	0.415	<LOD	<LOD

4 结论

利用高效液相色谱-电感耦合等离子体联用技术建立了富硒稻米中 5 种硒形态的检测方法。采用 Eclipse Plus C18 色谱柱, 对流动相离子对浓度、洗脱盐浓度、pH 值进行了优化, 最终确定流动相为 15 mmol/L 乙酸铵溶液, 最佳 pH 为 5.5, TBAH 浓度为 0.2 mmol/L。在此条件下各分析物间均可达到基线分离, 且可获得较为适宜的分析时间。优化了 5 种硒形态的酶种类、酶量及酶解时间, 确定了最佳酶解条件为样品酶量比值为 20 : 1 的蛋白酶 XIV 提取 20 h, 本方法分离度、方法线性和精密度良好, 回收率为 77.1%~107.3%, SeMeCys、SeCys 和 SeMet 的检出限和定量限分别为 0.001 5 mg/kg 和 0.005 mg/kg, Se(VI)和 Se(IV)

检出限和定量限分别为 0.002 5 mg/kg 和 0.009 mg/kg, 表明本方法可满足富硒稻米中硒形态定量分析的需要, 为全面客观评价富硒稻米质量提供切实可行的方法。

参考文献:

- [1] ROBINSON M F. 1988 McCollum award lecture. The New Zealand selenium experience[J]. Am J Clin Nutr, 1988, 48(3): 521-534.
- [2] BECK M A. Selenium as an antiviral agent. In: Hatfield D L, editor. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health[J]. Boston, MA: Springer US, 2001, 235-245.
- [3] GOLDHABER S B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2003, 38(2): 232-242.
- [4] PYRZYNSKA K. Selenium speciation in enriched vegetables[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1183-1191.
- [5] RAYMAN M P, INFANTE H G, SARGENT M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation[J]. British

- Journal of Nutrition, 2008, 100(2): 238.
- [6] HUANG Z, ROSE A H, HOFFMANN P R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(7): 705-743.
- [7] STABNIKOVA O, IVANOV V, LARIONOVA I, et al. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(5): 890-895.
- [8] PYRZYNSKA K. Selenium speciation in enriched vegetables[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(4): 1183-1191.
- [9] MOREDA P J, SFINCHEZ P J, MAFIANA L A, et al. Selenium species determination in foods harvested in seleniferous soils by HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 621-630.
- [10] RUSZCZYFISKA A, KONOPKA A, KUREK E, et al. Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods[J]. *Spectrochimica Acta*, 2017, 130: 7-16.
- [11] HU T, LIU L, CHEN S, et al. Determination of selenium species in cordyceps militaris by high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Analytical Letters*, 2018: 1-15.
- [12] 王丙涛, 谢丽琪, 林燕奎. 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.
- WANG B T, XIE L Q, LIN Y K. Determination of selenium species in food by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(3): 223-227.
- [13] HSIEH M W, LIU C L, CHEN J H, et al. Speciation analysis of arsenic and selenium compounds by CE-dynamic reaction cell-ICP-MS[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(13): 2272-2278.
- [14] TIE M, LI B, ZHUANG X, et al. Selenium speciation in soybean by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)[J]. *Microchemical Journal*, 2015, 123: 70-75.
- [15] MEIJA J, MONTES-BAYÓN M, Le DUC D L, et al. Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from Se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(22): 5837-5844.
- [16] GAO H H, CHEN M X, HU X Q, et al. Separation of selenium species and their sensitive determination in rice samples by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography with inductively coupled plasma tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(2): 432-439.
- [17] OLIVEIRA A F, LANDERO J, KUBACHKA K, et al. Development and application of a selenium speciation method in cattle feed and beef samples using HPLC-ICP-MS: evaluating the selenium metabolic process in cattle[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, 31(4): 1034-1040.
- [18] LI H F, LOMBI E, STROUD J L, et al. Selenium speciation in soil and rice: influence of water management and Se fertilization [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(22): 11837-11843.
- [19] RUSZCZYNSKA A, KONOPKA A, KUREK E, et al. Investigation

of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods[J]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2017, 130: 7-16. 完

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。