

电感耦合等离子体质谱法测定食品中的有机硒

Determination of Organic Selenium in Food by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

龚亮^{1,2} 熊珺¹ 余以刚²

GONG Liang^{1,2} XIONG Jun¹ YU Yi-gang²

(1. 广东省东莞市质量监督检测中心, 广东 东莞 523808; 2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(1. *Guangdong Dongguan Quality Supervision Testing Center, Dongguan, Guangdong 523808, China*; 2. *College of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China*)

摘要:建立食品中有机硒直接测定的方法。在 pH 值为 7.0 的水溶液中加入环己烷超声萃取有机硒, 萃取液经微波消解后进电感耦合等离子体质谱仪测定有机硒的含量。在最佳测试条件下, 方法检出限为 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 试样加标回收率为 93.5%~103.0%。该方法具有操作简便, 精密度高, 线性范围宽等优点, 适用于食品中有机硒含量的测定, 在实际检测中有广泛的应用前景。

关键词:电感耦合等离子体质谱; 超声萃取; 微波消解; 有机硒; 食品

Abstract: A method was established to direct determination of organic selenium in food. The organic selenium was extracted by adding cyclohexane in aqueous solution with pH value of 7.0, and the content of organic selenium was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave digestion. In the best test conditions, the limit of detection and quantification were 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recoveries ranged from 93.5% to 103.0%. The method has many advantages such as simple operation, high precision, wide linear range and so on, and can be used for accurate determination of selenium in food. So it has a wide application prospect in practical detection.

Keywords: Inductively coupled plasma mass; ultrasound extraction; microwave digestion; organic selenium; food

硒的形态主要分为无机硒和有机硒, 据研究^[1-3], 无机硒的毒性大并且生物活性低, 有机硒的毒性小, 被生物吸收和利用率高。因此, 有机硒食品的开发成为热点, 相应的检

测技术也愈来愈受到重视。

目前, 对食品中有机硒的测定主要是原子荧光光谱法^[4-6], 通过测定食品中总硒和无机硒含量, 然后利用差减法间接得出有机硒的含量。但该方法操作步骤多, 耗时长, 试剂消耗量大。基于此, 本试验拟通过摸索和条件优化, 旨在建立一种简单高效、环境友好的食品中有机硒总量的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

硒标准溶液: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 中国计量科学研究院;
硒胱氨酸 (SeCys₂, 有机硒标准品): 98%, 美国 Aldrich 公司;
甲基硒代半胱氨酸 (MeSeCys, 有机硒标准品): 95%, 美国 Sigma 公司;
锗标准溶液: 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 上海市计量测试技术研究院;
硝酸、盐酸: 优级纯, 德国 CNW 科技公司;
双氧水: 优级纯, 广州化学试剂厂;
环己烷、氢氧化钠: 分析纯, 广州化学试剂厂;
试验用水: 电阻率 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的超纯水, 由 Milli-Q 超纯水仪制备;
电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS): 7700x 型, 美国 Agilent 科技公司;
微波消解仪: Ethos, 配带智能控温赶酸器, 意大利 Milestone 公司;
研磨仪: A11, 意大利 IKA 公司;
超声仪: SY-1030F 型, 东莞市三源超声波设备有限公司;
pH 计: SG2-ELK 型, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司;
超纯水系统: Milli-Q, 美国 Millipore 公司;

基金项目:广东省质量技术监督局科技项目 (编号: 2013ZS01); 广东省科技计划项目 (编号: 2016B090918103)

作者简介: 龚亮, 男, 广东省东莞市质量监督检测中心工程师, 硕士。

通信作者: 余以刚 (1968—), 男, 华南理工大学教授, 博士。

E-mail: yuyigang@scut.edu.cn

收稿日期: 2017-01-03

所有玻璃器皿均用 20% HNO₃ 浸泡 24 h,并依次用蒸馏水和超纯水洗涤,晾干待用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 称取经研磨粉碎样品 1.0 g 于 100 mL 三角烧瓶中,加 30 mL 水充分混匀后,用 1 mol/L 盐酸溶液或 1.25 mol/L 氢氧化钠溶液调节样品溶液的 pH 值为 7.0,加入 10 mL 环己烷,放入超声仪中,在 1 500 W 功率下超声萃取 20 min,吸取上层有机相到微波消解罐中;同法再超声萃取一次,合并上层有机相至相同消解罐中;将盛有环己烷萃取液的消解罐置于智能控温赶酸器中 90 ℃ 挥至近干。放冷后于消解罐中加入过氧化氢 2.0 mL 和硝酸 6.0 mL 进行微波消解,微波消解条件参照表 1。消解完成,冷却后取出消解罐,开盖,在智能控温赶酸器上 160 ℃ 加热挥酸至剩余 1~2 mL,冷却后转移至 25.0 mL 容量瓶或比色管中,用去离子水少量多次冲洗消解罐,合并洗液,用超纯水定容至刻度,摇匀待测。每个试样称取 3 个平行,同时做试剂空白试验。

表 1 微波消解仪工作条件

Table 1 Parameters of microwave digestion				
步骤	功率/W	控制温度/℃	升温时间/min	恒温时间/min
1	1 500	120	10	5
2	1 500	160	10	10
3	1 500	190	10	15

1.2.2 标准系列的配制 ICP-MS 检测的是元素的总量,与被测物的形态和价态无关,因此使用总硒标准溶液即可满足本试验的需要。将 100 μg/mL 的硒标准溶液用 5% 硝酸溶液逐级稀释配制以下标准系列:硒浓度为 0.00,1.00,5.00,20.0,50.0,100.0 μg/L。内标溶液的配制:以锆元素作为内标,用 5% 硝酸溶液逐级稀释至使用浓度为 1.0 μg/mL。

1.2.3 仪器参数的优化 按仪器使用方法开机预热稳定后,用仪器专用质谱调谐液(Li、Mg、Co、Y、Ce、Tl,1.0 μg/L)对仪器进行最优化调谐,使仪器的分辨率、灵敏度、双电荷和氧化物等各项技术指标均符合测定要求。仪器工作参数:射频(RF)功率 1 600 W,等离子体气流量 15 L/min,载气流量 0.34 L/min,稀释气体流量 0.59 L/min,氦气流量 5.0 mL/min,雾化室温度 2 ℃,样品提升泵速率 0.5 r/s,样品分析泵速率 0.1 r/s;采用玻璃同心雾化器,镍锥截取锥,采样深度 10 mm;采集模式:质谱图,积分时间 3 s,每峰测定点数 3,重复次数 3;分析模式:[He]碰撞反应池。

1.2.4 定量测定 仪器参数设置和调谐完成后,打开方法编辑器设置好测定方法和数据处理方法,由三通进样管在线加入内标,观察内标的灵敏度和稳定性情况,符合要求后,将标准系列、试剂空白、样品消化液分别导入仪器。仪器自动绘制标准曲线,由回归方程分别计算出样液中硒元素的浓度。

1.2.5 单因素试验设计

(1) 提取液 pH 对有机硒测定的影响:试验添加有机硒标液并加水至 30 mL,调节提取液的 pH,加入环己烷 10 mL,超声萃取,微波消解后测定,考察提取液 pH 值(5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0)对有机硒加标回收率的影响。

(2) 萃取方法对有机硒测定的影响:称取同一鱼肉样品 1.0 g,加入水 30 mL,调节样品提取液的 pH 为 7.0,加入环己烷 10 mL,分别用分液漏斗萃取和超声萃取,经微波消解后测定,考察不同萃取方法对有机硒测定的影响。

(3) 萃取溶剂对有机硒测定的影响:称取同一鱼肉样品 1.0 g,加入水 30 mL,调节样品提取液的 pH 为 7.0,加入甲苯或环己烷 10 mL,超声萃取,经微波消解后测定,考察不同萃取溶剂对有机硒测定的影响。

(4) 消解方法对有机硒测定的影响:称取同一鱼肉样品 1.0 g,加入水 30 mL,调节样品提取液的 pH 为 7.0,加入环己烷 10 mL,超声萃取,分别使用干灰化法、湿消解和微波消解后测定,考察不同消解方法对有机硒测定的影响。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取液 pH 的影响 运用相似相溶原理,无机硒溶于水,有机硒溶于环己烷;溶液的酸碱度可以改变硒的有机化合物在水和环己烷中的分配系数;不同形态的硒对亚甲蓝的退色时间不同,亚甲蓝在有机硒作用下褪色时间为 5~10 min,而无机硒作用下则为 30~60 s^[7],根据退色时间不同来判断有机硒的提取效率,经反复试验后发现当溶液的 pH 值为 6.0~7.5 时,有机硒在环己烷中溶解最大,并且采用超声配合萃取,样品中的无机硒能够快速完全进入水相中,实现了有机硒和无机硒的完全分离,试验加标回收结果见图 1。本试验选择样品提取液的 pH 为 7.0。

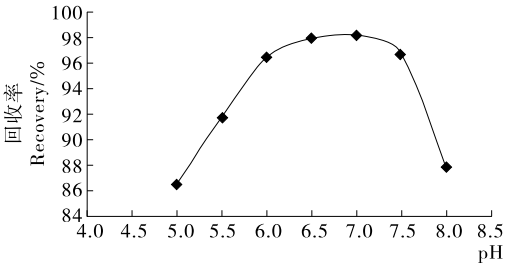


图 1 pH 值对有机硒加标回收率的影响
Figure 1 Effect of different pH on the recovery of organic selenium

2.1.2 萃取方法的选择 对于液液萃取,经典方法有分液漏斗萃取和超声萃取。试验考察了两种萃取方法对有机硒测定的影响,结果见表 2。由表 2 可知,超声萃取的测定结果比分液漏斗萃取的高,稳定性更好。并且相对于超声萃取,分液漏斗萃取方法操作更繁琐,用时更久。故本试验选取超声萃取作为萃取方法。

2.1.3 萃取溶剂的选择 有机硒能溶解于甲苯和环己烷中,甲苯极微溶于水,环己烷不溶于水,这两种溶剂都可用来提取有机硒。试验考察了两种萃取溶剂对有机硒测定的影响,结果见表 3。由表 3 可知,两种萃取溶剂对测定结果没有明显差别,但考虑到甲苯毒性较大,故选择环己烷作为萃取溶剂。

2.1.4 消解方法的确定 试验考察了干灰化法、湿消解和微波 3 种消解方法对有机硒测定的影响,结果见表 4。由表 4 可

表 2 不同萃取方法对有机硒测定结果的影响

Table 2 Effect of different extraction methods on the determination of organotin ($n=6$)

萃取方法	检测结果/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)			平均值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/ %
分液漏斗 萃取	0.289	0.277	0.269	0.272	5.4
	0.253	0.258	0.286		
超声萃取	0.283	0.294	0.284	0.286	2.8
	0.279	0.278	0.297		

表 3 不同萃取溶剂对有机硒结果的影响

Table 3 Effects of different solvents on organic selenium ($n=6$)

溶剂	检测结果/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)			平均值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/%
甲苯	0.287	0.274	0.295	0.283	3.0
	0.272	0.284	0.286		
环己烷	0.294	0.291	0.279	0.284	2.9
	0.272	0.281	0.285		

知,微波消解法的测试结果最高,平行性最好。干灰化法在高温下进行,有机硒损失最大。湿消解试剂用量大,消解时间长,操作步骤繁多,稳定性差。故本试验选择微波消解作为样品的消解方法。

2.2 精密度试验和方法的检出限

有机硒种类繁多,形态复杂,据报道^[8-11]在检出有机硒的食品中大多含有 SeCys₂ 和 MeSeCys。本试验以在实际样品中加入 SeCys₂ 和 MeSeCys 的方法考察精密度:在称好的

表 4 不同消解方法对有机硒结果的影响

Table 4 Effects of different digestion methods on organic selenium ($n=6$)

方法	检测结果/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)			平均值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/%
干灰化法	0.239	0.277	0.289	0.262	7.4
	0.252	0.267	0.246		
湿消解	0.283	0.271	0.288	0.272	4.3
	0.256	0.264	0.273		
微波消解	0.286	0.286	0.294	0.283	2.5
	0.273	0.282	0.279		

表 6 方法比对试验结果[†]

Table 6 Methods Comparison results($n=3$)

试样	总硒/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	无机硒/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	总硒-无机硒/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有机硒/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	比率/%
鱼肉	0.463	0.187	0.276	0.285	103.3
猪肉	0.241	0.098	0.143	0.144	100.7
茶叶	0.084	0.028	0.056	0.054	96.4
香菇	0.143	0.049	0.094	0.089	94.7

[†] 比率=有机硒/(总硒-无机硒)×100%。

样品中加入配制好的有机硒标准混合溶液,加入量 0.2 mg/kg,按本方法确定的条件进行重复性试验,由表 5 可知,其相对标准偏差 $\text{RSD} \leq 5\%$,方法加标回收率在 93.5%~103.0%。本方法用于测定食品中有机硒含量具有较好的精密度。

表 5 方法的精密度

Table 5 Precision test ($n=6$)

加标量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测定值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
0.200	0.187	93.5	3.2
	0.195	97.5	
	0.206	103.0	
	0.197	98.5	
	0.201	100.5	
	0.199	99.5	

依据 1.2.1 条称取 1.0 g 试样进行样品处理,定容至 25 mL,按照 1.2.2 条配制标准溶液进行测定,连续测定空白试样 11 次。计算响应值的标准偏差,以仪器响应值的 3 倍和 10 倍标准偏差除以工作曲线斜率,再以 1.0 g 取样量定容至 25 mL,计算出本方法的检出限和定量限,线性方程: $y=458.4x-0.547\ 9$,拟合系数:0.999 6,检出限:0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限:1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3 方法比对试验

分别用 GB 5009.93—2010《食品安全国家标准 食品中硒的测定》的方法测定总硒,DBS 42/002—2014《湖北省食品安全地方标准 富有机硒食品硒含量要求》的方法测定无机硒,本试验建立的方法测定有机硒,结果见表 6。由表 6 可知,本试验建立的方法测定结果与标准方法的比率在 94.7%~103.3%,说明该方法可行,结果可信。

2.4 实际样品的测定

将方法应用于市售 22 种常见食品中有机硒的测定,结果见表 7。由表 7 可知,家禽和水产动物类、藻类、菌类等均含有有机硒,相对而言,牛肝菌中有机硒含量最高,动物肝脏中的含量明显高于其肉 体,而饮用水、蔬菜、大米、水果、调味品等未检出有机硒。

3 结论

试验建立了直接测定食品中有机硒的方法,在 pH 值为 7.0 的水溶液中加入环己烷超声萃取有机硒,经微波消解萃取液后采用电感耦合等离子体质谱仪进行测定,方法灵敏度

表 7 样品中有机硒的测定[†]

Table 7 Determination of organic selenium in samples

试样	测定结果/ (mg·kg ⁻¹)	试样	测定结果/ (mg·kg ⁻¹)
鸡肉	0.079±0.007	纯净水	N.D.
猪肉	0.143±0.013	矿泉水	N.D.
鱼肉	0.284±0.010	丝苗米	N.D.
鹅肝	0.811±0.031	油粘米	N.D.
鱿鱼	0.278±0.015	菜心	N.D.
花螺	0.443±0.021	大白菜	N.D.
小球藻粉	0.208±0.009	苹果	N.D.
茶叶	0.054±0.005	雪梨	N.D.
牛肝菌	6.021±0.056	白醋	N.D.
鸡油菌	0.679±0.028	食用油	N.D.
香菇	0.107±0.008	酱油	N.D.

[†] “N.D.”表示未检出,定量限为 1.5 μg/kg。

高,线性范围广,操作简便,弥补了直接测定食品中有机硒的方法空缺,为客观评价食品的质量提供了科学方法。本试验方法只能够快速测定食品中有机硒总含量,但对有机硒价态的评定和种类的定性,还需要借助质谱联用等技术做进一步研究。

参考文献

[1] RAYMA M P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? [J]. Brit J Nutr, 2004, 92(4): 557-573.

[5] HAN S W, CHEE K M, CHO S J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein[J]. Food Chemistry, 2015,172(3): 766-769.

[6] 顾瑜萍,马理姣,黄娟,等. 米糠中蛋白质、植酸和膳食纤维的酶法增效及其活性评价[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 139-145.

[7] 王腾宇,周凤超,王玉,等. 米糠蛋白提取及其应用[J]. 粮油加工, 2010(8): 74-76.

[8] 吕飞,许宙,程云辉. 米糠蛋白提取及其应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 234-238.

[9] 李旋亮,吴长德,李建涛,等. 微生物发酵饲料的研究与应用[J]. 饲料博览, 2010(2): 27-28.

[10] 陈晓英. 微生物发酵饲料的研究与应用[J]. 中国畜禽种业, 2010(3): 77-78.

[11] 王子强. 微生物发酵饲料研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010(4): 34-36.

[12] 罗玲,韩奇鹏,曲湘勇. 微生物发酵饲料在动物生产上的应用研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2016(2): 45-50.

[13] 姚跃飞,曾柏全. 现代固态发酵技术在食品加工业中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 89-92.

[14] 刘金海. 黑曲霉菌在生物发酵饲料上的应用及其产品对动物抗

[2] MCKENZIE M J, HUNTER D A, PATHIRANA R, et al. Accumulation of an organic anticancer selenium compound in at-ransgenic Solanaceous species shows wider applicability of the selenocysteine methyltransferase transgene from selenium hyper-accumulators[J]. Transgenic Res, 2009, 18(3): 407-424.

[3] MIGUEL N A, CARMEN C V. Selenium in food and the human body: a review[J]. Sci Total Environ, 2008, 400(1): 115-141.

[4] 刘恒,马盼,王浩东,等. 氢化物发生—原子荧光光谱法测定富硒杂粮中的有机硒和无机硒[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 170-173.

[5] 张荣泉,吕方,王莲. 浅析硒化合物原料及硒测定方法的现行标准[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(8): 149-152.

[6] 鲁丹,俞 琰垒. 顺序注射—氢化物发生—原子荧光光谱法测定海产品中无机硒和有机硒[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(6): 639-642.

[7] 郝素娥,滕冰. 硒酵母中有机硒及硒代氨基酸含量的测定方法[J]. 分析测试学报, 1999, 18(3): 72-74.

[8] PEDRERO Z, MADRID Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review[J]. Analytica Chimica Acta, 2010(634): 135-152.

[9] SUSAN J F, RACHEL C. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011(91):1 484-1 491.

[10] SILVAE G. Speciation analysis of selenium in plank-ton,Brazil nut and human urine samples by HPLC — ICP — MS [J]. Talanta, 2013(110): 53-57.

[11] THIRY C, SCHNEIDER Y. Selenium bioaccessibility and bio-availability in se -enriched food supplements [J]. Biological Trace Element Research, 2013, 152(1): 152-160.

病力的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2012: 25-28.

[15] SCHMIDT C G, FURLONG E B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae* [J]. Bioresource Technology, 2012, 123: 36-41.

[16] 胡艳丽,王克然. 饲料中真蛋白的测定[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(10): 31-33.

[17] 汤江武,薛智勇,钱红,等. 酵母固体发酵对物料营养组分及生物活性的影响[J]. 浙江农业科学, 2003(5): 74-76.

[18] SILVEIRA C M D. Sperathe effects of solid-state fermentation in the functional properties of defatted rice bran and wheat bran [J]. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2009, 52(6): 1 555-1 562.

[19] OLIVEIRA M D S, FEDDERN V, KUPSKI L, et al. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8 335-8 338.

[20] KUPSKI L, CIPOLATTI E, ROCHA M D, et al. Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae* [J]. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2012, 55(6): 937-942.