

朱帅, 沈亚婷, 贾静, 等. 液相色谱-高分辨质谱法在中国东北地区农作物有机硒形态分析中的应用[J]. 岩矿测试, 2021, 40(2): 262-272.

ZHU Shuai, SHEN Ya-ting, JIA Jing, et al. Determination of Organic Selenium Compounds in Crops by Liquid Chromatography-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High-resolution Mass Spectrometry[J]. Rock and Mineral Analysis, 2021, 40(2): 262-272.

【DOI: 10.15898/j.cnki.11-2131/td.202005130070】

液相色谱-高分辨质谱法在中国东北地区农作物有机硒形态分析中的应用

朱帅¹, 沈亚婷¹, 贾静¹, 劳昌玲²

(1. 自然资源部生态地球化学重点实验室, 国家地质实验测试中心, 北京 100037;

2. 桂林理工大学地球科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 随着公众对富硒产品的关注, 对富硒农作物中硒含量的研究越来越受到人们的重视。针对现有方法测定农作物有机硒的基体效应和多原子离子质谱干扰问题, 本研究利用液相色谱与抗干扰能力强的四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱相结合, 建立了农产品中有机硒的形态分析方法。经优化以超声波辅助蛋白酶 XIV 提取农作物中有机硒, 用 Waters Symmetry RP18 液相色谱柱分离, 以纯水和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 采用正、负离子切换同时测定了硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸。三种有机硒在负离子模式下采用 Full MS/dd-MS² 扫描模式对目标物进行定性筛查和确证, 三种有机硒在 5~500 μg/L 的浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.997, 检出限为 1.0~4.7 μg/kg, 回收率为 76.4%~116.0%, 相对标准偏差 (RSD) ≤ 6.5%。与现有方法比较, 本方法线性范围宽, 适用于多种谷物和蔬菜类样品的分析。将建立的方法应用于测定中国粮食主产区黑龙江地区多种农作物的可食部分, 结果发现谷类中以硒代蛋氨酸为主, 蔬菜类以甲基硒代半胱氨酸为主, 并且该地区农作物的有机硒含量处于较低水平, 亟待强化补硒。

关键词: 有机硒; 农作物; 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法; 超声酶提取

要点:

- (1) 利用液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱法建立了农产品中硒形态高效、高灵敏的方法。
- (2) 该方法与现有方法有机硒的检出限和回收率相当, 但本方法线性范围更宽, 应用范围更广, 可用于多种蔬菜谷物等农作物的分析, 解决了现有方法只可应用于某种或某类样品分析的难题。
- (3) 黑龙江地区农作物可食部分中硒形态的组成, 谷类以硒代蛋氨酸为主, 蔬菜类以甲基硒代半胱氨酸为主, 并且该调查区的农作物硒含量处于缺硒水平。

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

硒 (Se) 是人类必需的营养元素, 也是植物的有益元素, 它以多种天然形式存在于人类、动植物甚至蓝细菌中^[1]。Rayman^[2]于 2012 年指出硒是有效的免疫刺激剂, 对机体免疫非常重要, 硒还具有降低氧化应激反应、延缓衰老, 以及促进细胞分化等作用^[3]。当人们硒摄入量不足时会导致多种疾病的

发生^[4], 例如当糖尿病患者每天 Se 的摄入量不足 20 μg 时会增加患癌症、阿兹海默氏症或帕金森氏症等其他疾病的风险^[5]。在食物链中, 植物硒的代谢优于动物硒, 植物是补充硒的重要来源^[6]。中国存在富硒土地^[7], 可用于种植富硒作物, 食用富硒农作物是预防硒缺乏症最有效的途径^[8]。因此, 对农

收稿日期: 2020-05-13; 修回日期: 2020-09-29; 接受日期: 2021-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21607033); 中国地质调查局中国地质科学院基本科研业务费项目 (CSJ201905)

作者简介: 朱帅, 硕士, 助理研究员, 主要从事有机污染物与环境行为研究。E-mail: zhu15131215153@126.com。

产品中硒研究具有现实意义。硒的代谢途径、生物利用度、生理功能和毒性不仅取决于摄入量,更取决于元素的化学形式^[9]。通常,硒在农作物中主要以有机硒的形式存在(占比40%~90%)。例如有机硒的形态有硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys₂)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代乙硫氨酸(SeEt)、硒脲(SeUr)、亚硒基全蛋氨酸等^[10]。与无机硒相比,有机硒具有更高的生物利用度,SeMet的生物利用度高达90%以上,而人体摄入过量的无机硒会引起中毒^[11-12]。人们普遍在土壤或者叶面施用含硒肥料用于生产富硒农产品,主要通过转运蛋白或磷酸盐转运蛋白的转运作用,外源无机硒被农作物根吸收,在芽和树叶中转化为有机硒,然后在叶绿体作用下进一步代谢合成硒代半胱氨酸(SeCys)、硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys₂)等有机硒^[13]。因此,在评估富硒农作物时,主要考虑这三种有机硒的含量与组成。

分离分析农产品中硒形态主要包括提取和分析。提取过程中需特别注意不能使农产品中硒形态发生变化,近些年酶提取法在硒的形态分析研究广泛应用^[14],超声微波结合酶提取法可以有效地缩短提取时间^[15]。硒在农产品中含量较低,因此对分析方法的灵敏度和准确度要求比较高。硒化物的分离技术主要有气相色谱法(GC)^[16]、电泳法^[17]和高效液相色谱法(HPLC)等。气相色谱具有分离速度快、检出限低等优点,但分析时间长,且不适用分离低聚肽的硒化合物。电泳法具有检出限低、分辨率高、保留样品的完整性等优点,但是接口技术的滞后阻碍了CE-ICP-MS在分析农作物硒形态上的应用。高效液相色谱技术广泛应用于分离植物体中各种硒形态^[18-19]。硒形态的检测器主要有电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)^[19-20]、原子吸收光谱(AAS)^[21-22]、原子荧光光谱(AFS)^[23-25]等。ICP-MS具有灵敏度高、检出限低、选择范围宽等优点,与阴离子交换色谱联合使用在农作物硒化物形态分析方面有广泛的应用,但氩的多原子离子会产生质谱干扰(如⁴⁰Ar和³⁶Ar⁺对⁷⁶Se,⁴⁰Ar和³⁷Ar⁺对⁷⁷Se,⁴⁰Ar和³⁸Ar⁺对⁷⁸Se等),基质干扰严重,现有的分析方法应用范围窄,不能同时适用于多种复杂基质样品的测定分析。同时Se属于难电离物质,电离不完全,影响测定的准确度^[26],此外,ICP-MS仅适用于拥有标准品的目标分析物的鉴定。因此,质谱干扰问题、电离不完全、不能同时测定多种复杂基质样品仍是分析工作面临的挑战。

静电场轨道离子阱(Orbitrap)具有较强的抗干扰能力、高精度和高通量等优点,可在很大程度上解决质谱干扰的问题^[27]。四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(Q-Exactive)是将四极杆与Orbitrap相结合,降低了复杂基质背景的干扰,测定准确,适用于复杂基质样品的测定分析。该质谱拥有高质量精度和高分辨率,从而能够识别未知物的结构信息^[28],在有机硒分析方面初见成效。Bierla等^[29]利用电喷雾Orbitrap MS³对葵花籽油中复杂的含Se化合物进行高质量精确度($<10^{-6}$)分子特异性检测。本文将超声辅助酶提法与液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱相结合,初次尝试同时测定中国粮食主产区东北黑龙江地区多种农产品中三种有机硒形态。对样品提取和仪器分析各参数进行优化,建立一种前处理过程快速简单、检出限低、准确度高和适合多种复杂基质农产品中硒形态分析方法。

1 实验部分

1.1 样品采集和保存

农作物样品(包括水稻13份、玉米13份、大豆9份、马铃薯2份、白菜2份、尖椒2份、白萝卜2份、茄3份)于2019年9月采自黑龙江地区(图1)。该地区主要为黑土,pH值为7.21~8.24,有机质含量18.9~26.2mg/g,氮含量95.8~137.4mg/kg,磷含量233.7~321.0mg/kg,钾含量183.1~211.7mg/kg,含水率3.2%~7.5%。样品在野外先用自来水冲洗去除表面灰尘和残留土壤,再用矿泉水润洗后用纱布包裹晾样。待样品运回实验室后离开取出,在室温下自然风干。风干的样品放在托盘中于55℃烘24h,将烘干的样品用万能粉碎机粉碎后储存于干燥器中,用于测定总硒和硒形态。

1.2 仪器和主要试剂

液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱系统(LC-Q Exactive Orbitrap MS,美国ThermoFisher公司);电子天平(德国Sartorius公司);离心机(日本Hitachi公司);B5510-E超声波清洗仪(美国Branson公司)。

硒代胱氨酸和硒代半胱氨酸(SeCys₂和MeSeCys,纯度98%,北京百灵威公司);硒代蛋氨酸(SeMet,纯度99%,美国Alfa公司);脂肪酶和淀粉酶(分析纯,北京索莱宝科技有限公司);蛋白酶K和蛋白酶XIV[天根生化科技(北京)有限公司];甲醇和乙腈(色谱纯,美国J. T. Baker公司);甲酸(色谱纯,德国Fluka公司);Milli-Q水:由Millipore纯水仪制备。

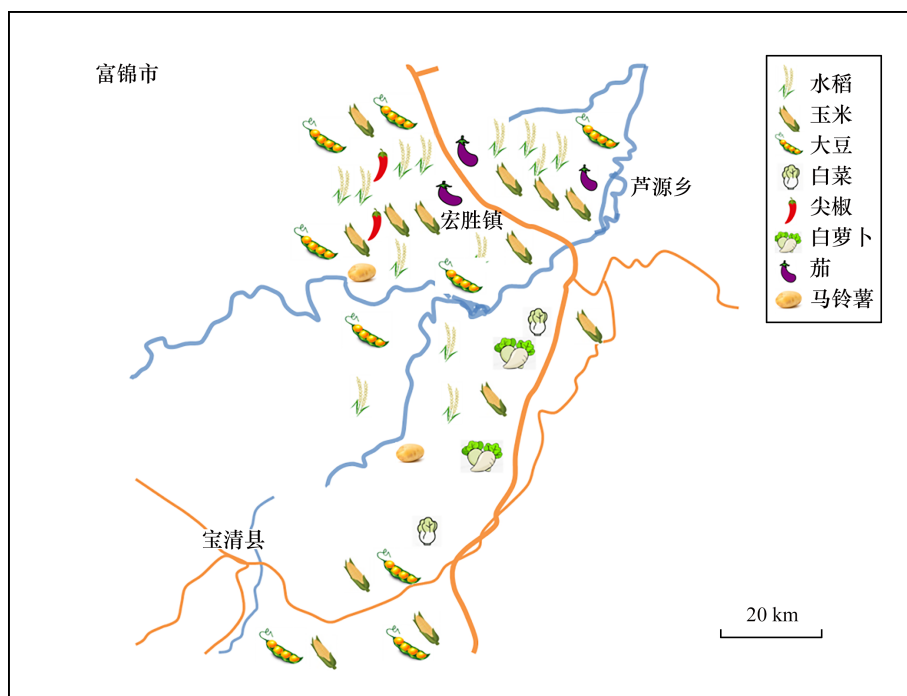


图1 采样点位图

Fig. 1 Locations of sampling sites

1.3 总硒和有机硒形态分析条件

总硒含量测定:用四位天平精确称取约 0.5g 样品置于消解罐中,同时做试剂空白。总硒含量参照国家标准《食品安全国家标准食品中硒的测定》(GB 5009.93—2017),用 ICP-MS 进行测定,以 ^{72}Ge 作为内标,同位素 ^{78}Se 和 ^{80}Se 进行测定。

有机硒形态含量测定:用四位天平精确称取 0.5g 样品置于离心管中(15mL),做试剂空白,加入 5mL 超纯水和 20mg 蛋白酶 XIV,涡旋 30s 混匀,在 37℃ 水浴中超声 1.5h,超声后移入离心机离心分离,离心机转速 6000r/min,时间 10min,静置后取上清液过 0.22 μm 滤膜,上机测定。Q-Exactive 气质的主要仪器参数见表 1。

高效液相色谱条件:Waters Symmetry RP₁₈ 液相色谱柱(3.9mm × 150mm, 5 μm);进样量 3 μL ;柱温 20℃;流动相:A 水,B 乙腈,流速 0.3mL/min,梯度洗脱程序如表 1 所示。质谱条件:加热电喷雾离子源(HESI);喷雾电压 3.0kV;毛细管温度 350℃;加热器温度 300℃;扫描模式为 Full MS/dd-MS²;质谱扫描范围 m/z 50~500;一级全扫描(Full MS)分辨率为 70000,C-trap 最大容量(AGC target)为 3×10^6 ,C-trap 最大注入时间为 200ms;数据依赖二级子离子扫描(dd-MS²)分辨率为

17500,C-trap 最大容量(AGC target)为 1×10^5 ,C-trap 最大注入时间为 50ms,二级质谱的碰撞能量(CE)为 30eV;鞘气压力 35arb;辅助气压力 10arb。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
初始	0.300	97.0	3.0
8.0	0.300	85.0	15.0
9.0	0.300	50.0	50.0
10.0	0.300	10.0	90.0
12.0	0.300	10.0	90.0
12.5	0.300	97.0	3.0
16.5	0.300	97.0	3.0

1.4 样品分析的质量控制与质量保证

样品提取、净化、分析过程中严格按照 1.3 节分析条件对样品进行质量控制。在样品分析时,每 7 个样品设置一个流程空白作为实验室背景干扰。实验过程中,有机硒在流程空白样品未检出,三种有机硒的方法检出限($S/N=3$)为 1.0~4.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 76.4%~116.0%,相对标准偏差(RSD) $\leq 6.5\%$,通过标准品测定证实实验过程不会造成有机硒的形态发生改变。

2 结果与讨论

2.1 液相参数的选择与优化

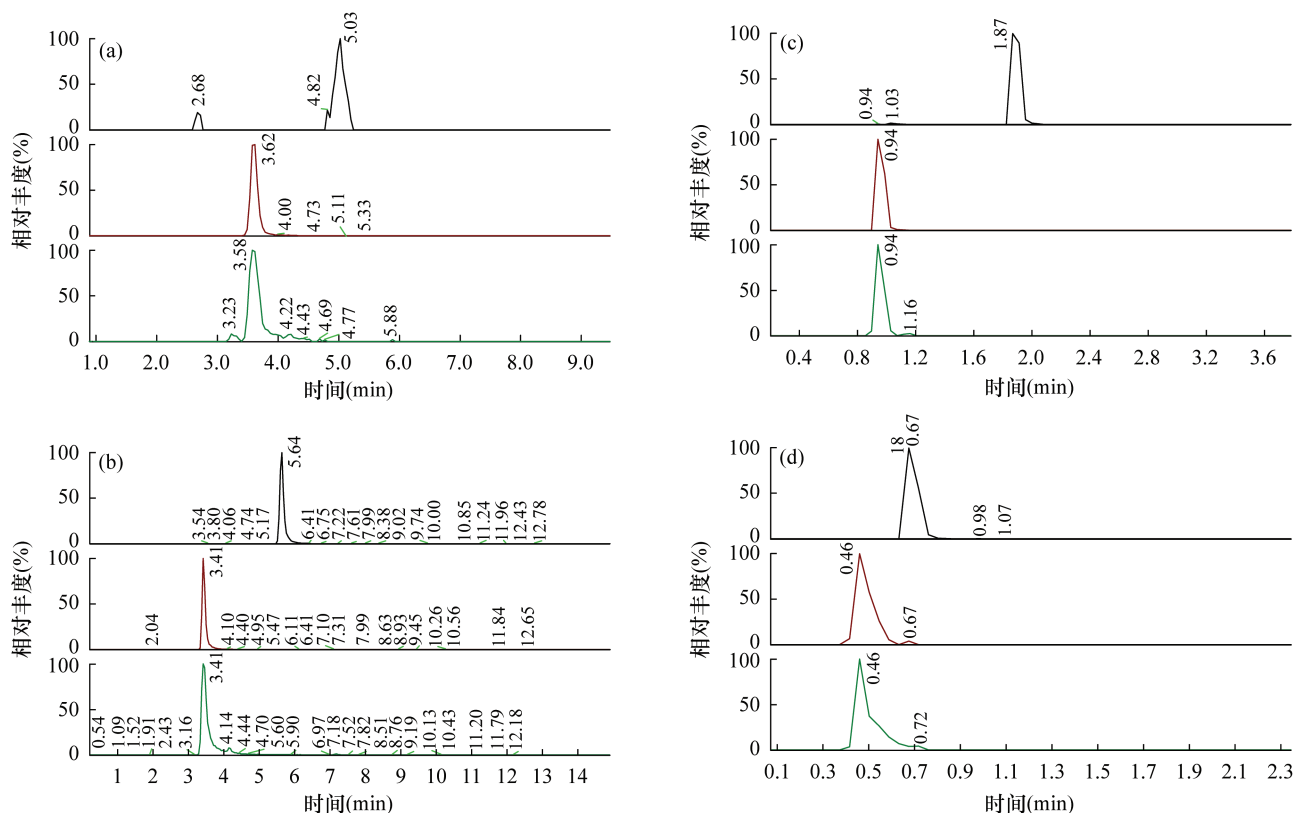
液相色谱柱的选择对分离至关重要,为获得更好的灵敏度和分离效果,本研究比较了 Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱(4.1mm × 250mm, 10 μ m)、Waters Symmetry RP₁₈液相色谱柱(3.9mm × 150mm, 5 μ m)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(RRHD, 2.1mm × 150mm, 18 μ m)、Waters BEH C₁₈液相色谱柱(2.1mm × 50mm, 1.7 μ m)来分离有机硒。如图2和图3a所示,三种有机硒在 Waters Symmetry RP₁₈液相色谱柱上的峰形最好,响应值最高,具有更好的保留特性,该色谱柱特有的极性基团嵌入技术使有机硒在该色谱柱上的峰形比其余的三个色谱柱的峰形更优。此外,该液相色谱柱可用于分离多种亲水化合物,对实际样品的检测适用性更好、更耐用,因此本实验选择 Waters Symmetry RP₁₈液相色谱柱。

依据优先选择简单和无毒试剂作为流动相的原则,本实验选择 A 水、B 乙腈和 A 水、B 甲醇作为流动相进行优化分析。如图3b所示,有机相采用乙腈

的信号强度优于甲醇相,当流动相水中加入 0.1% 的甲酸或 1% 的乙酸铵后,有机硒的信号强度骤减,故采用纯水和乙腈作为流动相。如图3c所示,柱温在 20 $^{\circ}$ C时,三种有机硒的响应值最高,优化后的色谱条件见 1.3 节所述,各有机硒组分在 10min 内获得较好的分离效果,目标物峰形对称性好、尖锐度和灵敏度高。

2.2 质谱条件的优化

本方法对三种目标物在负离子模式下采用 Full MS/dd-MS²扫描模式对目标物进行定性筛查和确证。对于复杂基质中痕量组分的定性,分辨率起到了非常关键的作用,本研究发现一级全扫描分辨率 $R = 70000$ 时,所有待测物可以与基质中的干扰物实现基线分离,响应值也明显提高,基质干扰大大降低。因此,考虑到定性和定量的准确性,一级质谱全扫描的分辨率设置为 70000,二级质谱扫描设置为 17500。进一步对二级质谱的碰撞能量(CE)进行优化。结果显示,CE 值为 30eV 时能够获得最佳的二级质谱定量离子响应。三种有机硒的保留时间、精

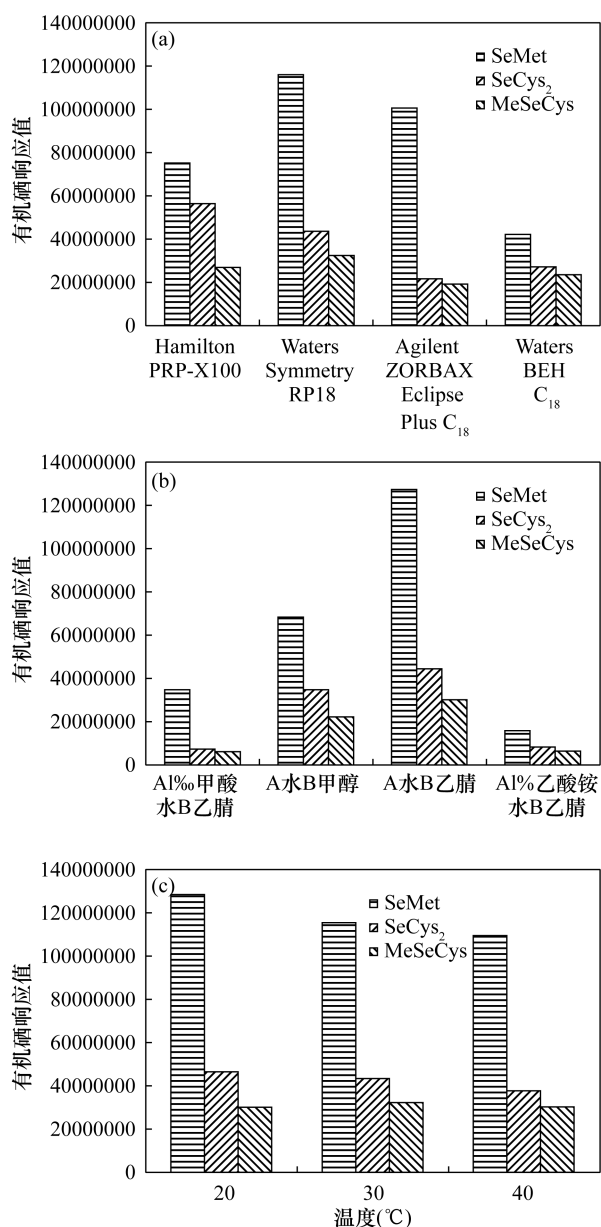


a—Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱(4.1mm × 250mm, 10 μ m); b—Waters Symmetry RP₁₈液相色谱柱(3.9mm × 150mm, 5 μ m);

c—Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈液相色谱柱(RRHD, 2.1mm × 150mm, 18 μ m); d—Waters BEH C₁₈液相色谱柱(2.1mm × 50mm, 1.7 μ m)。

图2 有机硒在不同液相色谱柱上的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of organic selenium on different liquid chromatography columns



a—有机硒在不同液相色谱柱上的响应值；b—不同流动相对硒形态的影响；c—不同温度对硒形态的影响。

图3 有机硒在不同仪器参数下的响应值

Fig. 3 Values of organic selenium under different instrument parameters

确质量数、相对质量偏差等信息见表2。由表中数据可知,三种有机硒精确质量数的相对质量偏差均低于 3×10^{-6} ,证明目标化合物的质量准确度均很好,满足定性需求。

2.3 提取剂的选择

选取硒含量较高的水稻籽粒样品进行提取优化实验,采用 37°C 水浴超声1.5h后,保持 37°C 水浴过夜的提取方法分别考察水、10%甲酸、脂肪酶、 α -淀粉酶、蛋白酶K、蛋白酶E和蛋白酶XIV对水

表2 三种有机硒的保留时间、精确质量数和相对质量偏差
Table 2 Retention times, accurate masses and relative deviations of three kinds of organic selenium

硒形态	保留时间	精确质量数	精确质量数	相对质量
	(min)	理论值(m/z)	测定值(m/z)	偏差(10^{-6})
SeMet	5.64	195.98822	195.98862	2.04
SeCys ₂	3.41	334.90547	334.90593	1.37
MeSeCys	3.41	167.95692	167.95669	1.37

稻籽粒样品中硒形态提取效果的影响。如图4a所示,水稻籽粒样品中主要的硒形态为硒代蛋氨酸,采用蛋白酶E和蛋白酶XIV的提取效果最佳,三种形态硒的响应值总和最高;水、10%甲酸、脂肪酶和 α -淀粉酶无法将SeCys₂从水稻籽粒中提取出来;蛋白酶K的提取效率仅为蛋白酶E或蛋白酶XIV的50%。蛋白酶E或蛋白酶XIV的提取效率相当,但是蛋白酶XIV对SeCys₂的提取效率比蛋白酶E的提取效率高(图4b)。本实验选择蛋白酶XIV作为提取剂考察其对硒形态提取效果的影响。

2.4 蛋白酶XIV用量的优化

水浴超声处理的温度为 37°C ,提取时间设为3h,分别考察10、20、30、40、50和60mg蛋白酶XIV对水稻籽粒样品中硒形态提取效果的影响。如图4c所示,当蛋白酶XIV用量为20mg时,提取效率最佳;当蛋白酶XIV用量大于20mg时,提取效率不再增加。随着蛋白酶XIV用量的增加,提取出的SeMet含量先升高后降低,当蛋白酶XIV用量为20mg时,提取出的SeMet含量最高。SeCys₂含量随蛋白酶XIV用量的增加而逐渐增加。MeSeCys含量随蛋白酶XIV用量增加先升高后下降。最终选择蛋白酶XIV用量为20mg。

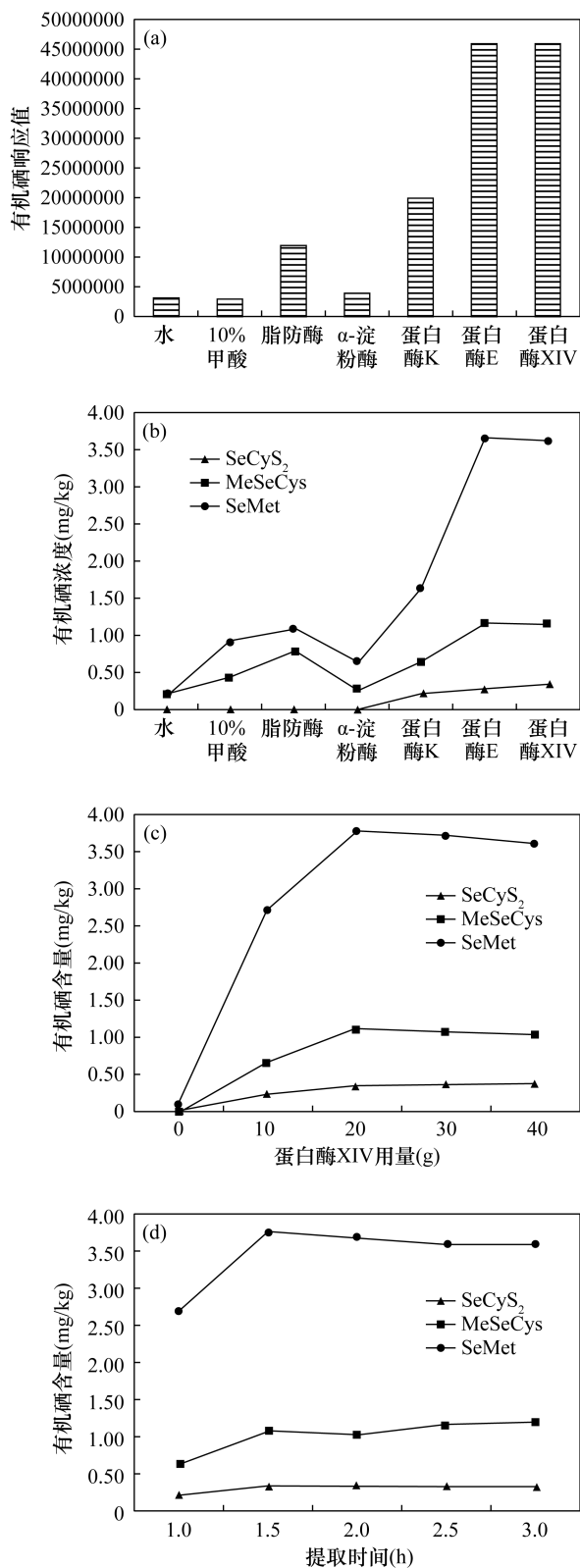
2.5 提取时间的优化

在水浴超声处理的温度为 37°C ,蛋白酶XIV用量为20mg的条件下,分别考察提取时间为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0h对水稻籽粒样品中硒形态提取效果的影响。如图4d所示,提取效率随提取时间增长而增加,当提取时间 ≥ 1.5 h时,提取效率基本保持一致;提取出的SeMet和SeCys₂含量随提取时间的增加而逐渐减少,这是由于这两种有机硒随着时间的增长逐渐酶解导致其含量降低,MeSeCys含量随时间增长变化不大,选择提取时间为1.5h最优。

2.6 方法技术评价

2.6.1 方法线性范围和检出限

分别配制5.0、10.0、50.0、100.0、200.0、500.0



a、b—不同提取剂对有机硒提取效率的影响;

c—蛋白酶 XIV 用量对有机硒提取效率的影响;

d—提取时间对有机硒提取效率的影响。

图 4 有机硒在不同前处理条件下的响应值

Fig. 4 Values of organic selenium under different instrument parameters

$\mu\text{g/L}$ 的 SeCys_2 、 MeSeCys 和 SeMet 混合标准溶液系列,以各浓度色谱峰面积(y)对应质量浓度(x)绘制标准曲线。在最佳实验条件下,在 $5.0 \sim 500.0 \mu\text{g/L}$ 浓度范围内,相关系数(r)均小于 0.997 ,线性关系良好。采用逐级稀释法,三倍的信噪比($S/N = 3$)确定该化合物的检出限, SeCys_2 、 MeSeCys 和 SeMet 方法检出限为 $1.0 \sim 4.7 \mu\text{g/kg}$ (表 3)。

表 3 三种硒的线性方程、相关系数和检出限

Table 3 Regression equations, correlation coefficients and detection limit of three selenium species

硒形态	线性方程	相关系数(r)	检出限($\mu\text{g/kg}$)					
			水稻籽粒	黄豆	玉米	白菜	马铃薯	白萝卜
SeMet	$y = 302208 + 45923.1x$	0.9997	1.0	1.7	1.2	1.3	1.8	1.4
SeCys_2	$y = -2987460 + 163256x$	0.9982	2.5	3.4	2.3	2.6	3.5	2.7
MeSeCys	$y = 1231460 + 63033.2x$	0.9970	3.3	4.7	3.5	3.1	3.7	3.3

2.6.2 方法准确度和重复性

分别选取一空白水稻籽粒样品,添加适量的有机硒标准溶液至浓度为 50 、 1000 和 $5000 \mu\text{g/kg}$ 三个水平的三种硒形态混合标准溶液,每个浓度水平做 7 个平行样,进行回收率实验。表 4 中的结果表明, SeMet 的加标回收率在 $89.2\% \sim 106.0\%$, SeCys_2 的加标回收率在 $81.2\% \sim 107.1\%$, MeSeCys 的加标回收率在 $87.2\% \sim 116.0\%$ 。在所选取的农作物样品中三种硒形态的相对标准偏差(RSD)均 $\leq 6.5\%$ (表 4),方法的重复性良好。

选取有机硒未检出的黄豆、玉米、白菜、马铃薯和白萝卜参考水稻籽粒样品进行回收率实验,黄豆、玉米、白菜、马铃薯和白萝卜中三种有机硒的加标回收率分别为 $76.4\% \sim 93.8\%$ 、 $86.9\% \sim 108.2\%$ 、 $81.0\% \sim 93.8\%$ 、 $79.9\% \sim 88.7\%$ 和 $80.9\% \sim 92.3\%$,表明该方法适用于不同类型的样品。

2.6.3 方法比较

表 5 将本研究建立的测定有机硒形态的方法与文献中报道的 $\text{HPLC} - \text{ICP} - \text{MS}$ 、 $\text{HPLC} - \text{HG} - \text{AFS}$ 等方法进行比较。可以看出,本方法测定的化合物检出限和回收率可与文献报道的方法相媲美。传统的测定硒形态的方法只适用于某种或某类样品的分析,本方法可降低基质干扰,线性范围更宽,应用范围更广,可用于多种蔬菜谷物等农作物的分析。因此, $\text{LC} - \text{Q} \text{ Exactive Orbitrap MS}$ 可作为 $\text{HPLC} - \text{ICP} - \text{MS}$ 的替代仪器来分析农作物的有机硒形态。

表4 水稻籽粒中三种有机硒的加标回收率和精密度

Table 4 Standard recovery rate and precision tests of three kinds of organic selenium in rice grain

硒形态	添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测量值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 (%)	RSD (%)
SeMet	50.0	42.7 ~ 51.3	89.2 ~ 102.6	5.1
	1000.0	937.2 ~ 1060.1	93.7 ~ 106.0	3.7
	5000.0	4930.0 ~ 5110.6	98.6 ~ 102.2	1.3
SeCys ₂	50.0	40.6 ~ 49.0	81.2 ~ 98.0	6.5
	1000.0	998.3 ~ 1070.8	99.8 ~ 107.1	3.1
	5000.0	4820.3 ~ 4960.5	96.4 ~ 99.2	0.9
MeSeCys	50.0	43.6 ~ 51.6	87.2 ~ 103.2	6.2
	1000.0	1020.7 ~ 1160.2	102.1 ~ 116.0	4.7
	5000.0	5070.6 ~ 5190.4	101.4 ~ 103.8	1.3

3 方法应用——蔬菜和谷类中硒形态测定

3.1 蔬菜和谷类中有机硒含量特征

采用优化好的前处理及检测方法对采集的农作物样品中硒形态进行分析。检出率为30.43%，表6列出了部分检出农作物可食用部分有机硒含量。SeCys₂、MeSeCys 和 SeMet 在黄豆、玉米样品中均有不同程度的检出。水稻籽粒样品中除 MeSeCys 外，其余两种有机硒化合物均有检出。SeCys₂ 在白菜、马铃薯和白萝卜这三种蔬菜中均未检出。在黄豆、玉米和水稻籽粒谷物类样品中 SeMet 占总有机硒含量的53.1% ~ 100.0%，占总硒含量的64.1% ~ 80.0%，说明谷类食品中的硒以硒代蛋氨酸为主，此结果与文献中报道的大米和小麦中硒以硒代蛋氨酸为主一致^[14,34]。与谷物类样品不同的是，蔬菜类样品中的硒以甲基硒代半胱氨酸为主，占总有机硒含量的58.8% ~ 100.0%，占总硒含量的35.7% ~ 37.4%。蔬菜中有机硒的含量与谷物产品相比较低，这可能是因为蔬菜中的硒主要通过土壤、根施硒肥或喷施叶面硒肥的方式获得的，在生长周期不足

表5 本方法与文献中相关分析方法的比较

Table 5 Comparison of performance with other methods in the references

硒形态	样品	样品提取方法	分析方法	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	回收率 (%)	检出限	来源文献
SeMet, SeCys ₂ , MeSeCys, Se(IV), Se(VI)	谷类食品	超声酶提取	HPLC-ICP-MS	0.5 ~ 200.0	60.5 ~ 120.8	2.5 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	[30]
SeMet, SeCys ₂ , MeSeCys, Se(IV), Se(VI)	水稻籽粒	超声酶提取	HPLC-HG-AFS	10.0 ~ 200.0	85.4 ~ 105.5	2.27 ~ 3.89 $\mu\text{g}/\text{L}$	[31]
SeMet	富硒面包	微波酶提取	HPLC-IDA-ICP-MS	20.0 ~ 100.0	68.0 ~ 84.0	0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$	[32]
SeMet, SeCys ₂ , MeSeCys, Se(IV), Se(VI)	白菜	超声提取	HPLC-ICP-MS	0.0 ~ 200.0	52.1 ~ 111.6	0.85 ~ 4.68 mg/mL	[33]
SeMet, SeCys ₂ , MeSeCys	蔬菜和谷物	超声酶提取	LC-Q Exactive Orbitrap MS	5.0 ~ 500.0	76.4 ~ 116.0	1.0 ~ 4.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$	本文

的情况下，没有得到很好的生物转化，大部分硒还是以无机硒的形式存在。部分检出有机硒的谷物和蔬菜样品对硒的转化率从强到弱依次为：玉米 > 黄豆 > 水稻籽粒 > 白菜 > 马铃薯 > 白萝卜。所检出谷物和蔬菜样品玉米对有机硒转化能力最强，硒转化率达72.73%。由此可见，谷物尤其是玉米可作为人体补充硒的重要来源。

表6 部分检出农作物可食用部分有机硒含量

Table 6 Organic selenium content in edible parts of some plants

样品	有机硒含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)				无机硒 总硒	无机硒 转化率 (%)	有机硒 检出率 (%)
	SeMet	SeCys ₂	MeSeCys	总有机硒			
水稻籽粒-1	92.0	12.7	ND	104.7	162.5	64.4	30.8
水稻籽粒-2	84.0	10.3	ND	94.4	135.2	69.8	
水稻籽粒-3	11.7	ND	ND	11.7	19.2	60.9	
水稻籽粒-4	109.3	27.8	17.3	154.4	195.6	78.9	
黄豆-1	43.4	27.3	11.1	81.8	112.7	72.6	44.4
黄豆-2	32.5	ND	ND	32.5	45.3	71.7	
黄豆-3	87.2	34.8	24.2	146.2	200.4	73.0	
黄豆-4	45.6	12.5	ND	58.1	85.7	67.8	
玉米-1	84.7	21.3	8.6	114.6	143.2	80.0	23.1
玉米-2	47.0	9.8	ND	57.3	89.4	64.1	
玉米-3	58.0	34.7	ND	93.1	125.7	74.1	
白菜	ND	ND	8.0	8.0	21.4	37.4	50.0
马铃薯	5.6	ND	10.3	15.9	43.7	36.4	50.0
白萝卜	6.3	ND	9.0	15.3	42.8	35.7	50.0

注：ND 表示未检出。

3.2 不同地区农作物硒含量比较

由于采集样品时蔬菜未完全成熟，本研究仅将谷物作物的硒含量与国内外研究作对比。本研究测定黑龙江水稻样品有机硒含量为0.0 ~ 154.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，整体上低于文献报道湖北恩施富硒地区富硒水稻的

有机硒含量 $80.0 \sim 1540.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[35],与陕西省安康市大米有机硒含量 $24.0 \sim 373.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 处于同一水平^[30]。黑龙江玉米样品有机硒含量为 $0.0 \sim 143.2 \mu\text{g}/\text{kg}$,远远低于陕西省安康市玉米有机硒含量 $3668.0 \sim 10738.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[30]。黑龙江大豆样品硒含量为 $0.0 \sim 200.4 \mu\text{g}/\text{kg}$,与西班牙东南部豆类硒含量 $17.9 \sim 268.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ 相当^[36],低于江苏省苏州大豆硒含量 $1.5 \sim 123.6 \text{mg}/\text{kg}$ ^[37]。通过对比发现调查区的谷物硒含量处于缺硒水平,植物体内的硒含量与形态种类除了受植物本身对硒的迁移转化机制和土壤硒含量的影响外,还受成土母质、土壤类型、土壤 pH 值和有机质含量等因素的影响。采集农作物样品的研究区域以黑土为主,还有少量的黑钙土,该区域土壤呈碱性,pH 值为 $7.21 \sim 8.24$,土壤有机质含量 ($18.9 \sim 26.2 \text{mg}/\text{g}$) 比较高,研究区域农作物硒含量较低,但该地区所采集的土壤硒总量 ($0.29 \sim 1.16 \text{mg}/\text{kg}$) 整体处于足硒甚至富硒水平。因此,有必要开展东北地区农作物的富硒机制研究,为农作物科学种植、合理补硒、改善及预防缺硒性地方病提供科学的理论依据。

4 结论

本研究建立了高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定多种农作物中有机硒形态的方法。该方法的线性范围广,可广泛应用于富硒和非富硒多种农作物有机硒的测定。此外,该方法的适用范围广,可用于多种蔬菜谷物等农作物的分析,解决了现有方法只可测定某种或某类样品的难题。

本研究对采集于东北黑龙江地区的水稻籽粒、玉米、大豆、马铃薯、白菜、尖椒和白萝卜等 46 份样品中的硒形态进行分析研究,发现谷类以硒代蛋氨酸为主,蔬菜类以甲基硒代半胱氨酸为主。研究区域的农作物中硒含量处于较低水平,有必要开展农作物的富硒机制研究,为提升该地区人民健康水平提供科学支撑。

5 参考文献

- [1] Germ M, Stibilj V. Selenium and plants[J]. Acta Agriculturae Slovenica, 2007, 89(1): 65-71.
- [2] Rayman M P. Selenium and human health [J]. The Lancet, 2012, 379: 1256-1268.
- [3] Wichman J, Winther K H, Bonnema S J, et al. Selenium supplementation significantly reduces thyroid auto - antibody levels in patients with chronic autoimmune thyroiditis: A systematic review and meta - analysis [J]. Thyroid, 2016, 26(12): 1681-1692.
- [4] Wei J, Zeng C, Gong Q Y, et al. The association between dietary selenium intake and diabetes: A cross - sectional study among middle - aged and older adults [J]. Nutrition Journal, 2015, 14(1): 18.
- [5] Labunskyy V M, Hatfield D L, Gladyshev V N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles [J]. Physiological Reviews, 2014, 94(3): 739-777.
- [6] Achibat H, Alomari N A, Messina F, et al. Organoselenium compounds as phytochemicals from the natural kingdom [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(11): 1885-1892.
- [7] Toan D Q, Cui Zewei C, Huang J H, et al. Selenium distribution in the Chinese environment and its relationship with human health: A review [J]. Environment International, 2018, 112: 294-309.
- [8] Turło J, Gutkowska B, Herold F, et al. Biological availability and preliminary selenium speciation in selenium - enriched mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.) [J]. Food Biotechnology, 2011, 25(1): 16-29.
- [9] Liu K, Zhao Y, Chen F, et al. Purification and identification of Se - containing antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of Se - enriched brown rice protein [J]. Food Chemistry, 2015, 187: 424-430.
- [10] Liu L, Yun Z, He B, et al. Efficient interface for online coupling of capillary electrophoresis with inductively coupled plasma - mass spectrometry and its application in simultaneous speciation analysis of arsenic and selenium [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(16): 8167-8175.
- [11] Foster L, Sumar S. Selenium in health and disease: A review [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1997, 37(3): 211-228.
- [12] Hadrup N, Ravn - Haren G. Acute human toxicity and mortality after selenium ingestion: A review [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2020, 58: 126435.
- [13] 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]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185: 109675.
- [14] Guzmán Mar J L, Reyes L H, Mizanur Rahman G M, et al. Simultaneous extraction of arsenic and selenium species from rice products by microwave - assisted enzymatic extraction and analysis by ion chromatography

- inductively coupled plasma – mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (8): 3005 – 3013.
- [15] Vale G, Pereira S, Mota A, et al. Enzymatic probe sonication as a tool for solid – liquid extraction for total selenium determination by electrothermal – atomic absorption spectrometry [J]. *Talanta*, 2007, 74 (2): 198 – 205.
- [16] Zhang X, Yang L, Mester Z. Determination of amino acids in selenium – enriched yeast by gas chromatography – mass spectrometry after microwave assisted hydrolysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 744: 54 – 59.
- [17] Kannamkumarath S S, Wrobel K, Wuilloud R G. Study – ing the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC – UV – ICP – MS and CE – ICP – MS [J]. *Talanta*, 2005, 66 (1): 153 – 159.
- [18] Khanam A, Platel K. Bioavailability and bioactivity of selenium from wheat (*Triticum aestivum*), maize (*Zea mays*), and pearl millet (*Pennisetum glaucum*), in selenium – deficient rats [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(22): 6366 – 6376.
- [19] do Nascimento da Silva E, Aureli F, D' Amato M, et al. Selenium bioaccessibility and speciation in selenium – enriched lettuce: Investigation of the selenocompounds liberated after in vitro simulated human digestion using two – dimensional HPLC – ICP – MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65 (14): 3031 – 3038.
- [20] Hildebrand J, Greiner A, Drexler H, et al. Determination of eleven small selenium species in human urine by chromatographic – coupled ICP – MS methods [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2020, 61: 126519.
- [21] Heinrichs H, Keltsch H. Determination of arsenic, bismuth, cadmium, selenium, and thallium by atomic absorption spectroscopy with a volatilization technique [J]. *Analytical Chemistry*, 1982, 54(7): 1211 – 1214.
- [22] Mohammed E, Mohammed T, Mohammed A. Optimization of instrument conditions for the analysis for mercury, arsenic, antimony and selenium by atomic absorption spectroscopy [J]. *Methods*, 2018, 5: 824 – 833.
- [23] Ma Y, Zeng K, Duan T. Fast and clean determination of total selenium in biological materials by an improved oxygen flask combustion method combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Microchemical Journal*, 2019, 148: 743 – 747.
- [24] Tsopelas F N, Ochsenkühn – Petropoulou M T, Mergias I G, et al. Comparison of ultra – violet and inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry for the on – line quantification of selenium species after their separation by reversed – phase liquid chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 539(1): 327 – 333.
- [25] Huang C, Li Q, Mo J, et al. Ultratrace determination of tin, germanium, and selenium by hydride generation coupled with a novel solution – cathode glow discharge – atomic emission spectrometry method [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11559 – 11567.
- [26] Klencsár B, Li S, Balcaen L, et al. High – performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma – mass spectrometry (HPLC – ICP – MS) for quantitative metabolite profiling of non – metal drugs [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 104: 118 – 134.
- [27] D' Amato R, Regni L, Falcinelli B, et al. Current knowledge on selenium biofortification to improve the nutraceutical profile of food: A comprehensive review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (14): 4075 – 4097.
- [28] 韩梅, 侯雪, 邱世婷, 等. 超高效液相色谱 – 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱测定蔬菜中的百草枯 [J]. *分析测试学报*, 2019, 38(9): 1126 – 1131.
- Han M, Hou X, Qiu S T, et al. Determination of paraquat in vegetables by ultra performance liquid chromatography – quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2019, 38(9): 1126 – 1131.
- [29] Bierla K, Flis – Borsuk A, Suchocki P, et al. Speciation of selenium in selenium – enriched sunflower oil by high – performance liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry/electrospray – orbitrap tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64 (24): 4975 – 4981.
- [30] 陈绍占, 唐德剑, 李晓玉, 等. 谷类食品中硒形态超声酶提取 – 高效液相色谱 – 电感耦合等离子体质谱法测定 [J]. *中国公共卫生*, 2020, 36(1): 130 – 136.
- Chen S Z, Tang D J, Li X Y, et al. Determination of selenium species in cereal food with ultrasonic enzyme extraction and high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *China Journal Public Health*, 2020, 36(1): 130 – 136.
- [31] 胡文彬, 贾彦博, 魏琴芳, 等. 应用液相色谱 – 原子荧光联用仪测定富硒大米中的 5 种硒形态 [J]. *分析仪器*, 2019(1): 120 – 124.
- Hu W B, Jia Y B, Wei Q F, et al. Determination of selenium form in selenium – rich rice by liquid

chromatography – hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Analytical Instrumentation*, 2019 (1): 120 – 124.

- [32] Sánchez – Martínez M, Pérez – Corona T, Cámara C, et al. Preparation and characterization of a laboratory scale selenomethionine – enriched bread. Selenium bioaccessibility [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1): 120 – 127.
- [33] Thosaikham W, Jitmanee K, Sittipout R, et al. Evaluation of selenium species in selenium – enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Justl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion – pair reversed phase HPLC – ICP – MS [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145: 736 – 742.
- [34] Cubadda F, Aureli F, Ciardullo S, et al. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (4):

2295 – 2301.

- [35] 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 P W, Lu G H, Zheng Y, 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.
- [36] Díaz – Alarcón J P, Navarro – Alarcón M, Serrana H G, et al. Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake [J]. *Science of the Total Environment*, 1996, 184(3): 183 – 189.
- [37] Lu X, He Z, Lin Z, et al. Effects of Chinese cooking methods on the content and speciation of selenium in selenium bio – fortified cereals and soybeans [J]. *Nutrients*, 2018, 10(3): 1 – 10.

Determination of Organic Selenium Compounds in Crops by Liquid Chromatography – Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High – resolution Mass Spectrometry

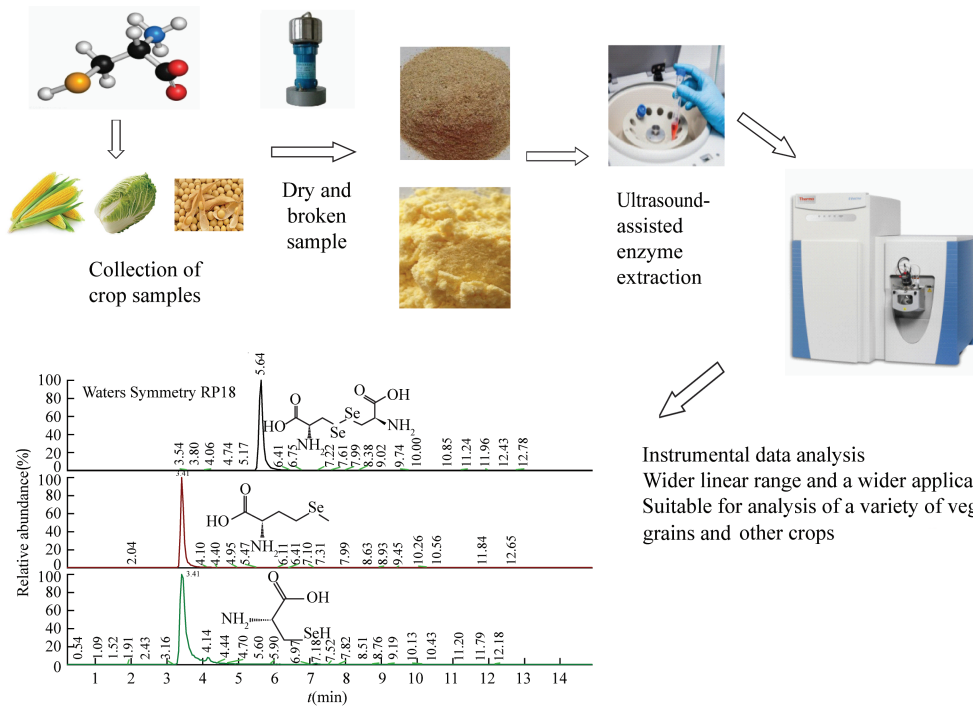
ZHU Shuai¹, SHEN Ya – ting¹, JIA Jing¹, LAO Chang – ling²

(1. Key Laboratory of Eco – Geochemistry, Ministry of Natural Resources, National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China;

2. College of Earth Science, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

HIGHLIGHTS

- (1) An efficient and high – sensitivity method for determination of selenium forms in agricultural products by liquid chromatography – quadrupole/electrostatic field orbitrap high – resolution mass spectrometry was established.
- (2) This method had the same detection limit and recovery rate compared to the existing determination method for organic selenium. However, the method established in this study had a wider linear range and application range. This method can be used for the analysis of a variety of vegetables, grains and other crops, and solves the problem that the existing methods can only measure a specific type of sample.
- (3) In crops of Heilongjiang area, the selenium species in cereals were mainly selenomethionine, and in vegetables were mainly methylselenocysteine. The selenium content of crops in the survey area was at a relatively low level.



Instrumental data analysis
Wider linear range and a wider application range
Suitable for analysis of a variety of vegetables,
grains and other crops

ABSTRACT

BACKGROUND: As more attention is paid to selenium – rich products, the research on the determination of selenium content in crops has become more and more significant. However, existing methods for determining organic selenium has interferences of the matrix effect and polyatomic ion, which affect the accuracy of the measurement.

OBJECTIVES: To establish a rapid method to determine selenium species of organic selenium in agricultural products by liquid chromatography – quadrupole/electrostatic field orbitrap high – resolution mass spectrometry (LC – Q Exactive Orbitrap MS).

METHODS: The selenium species were extracted using an ultrasonic extraction system with a mixture of protease XIV. The separation was carried out on a Waters Symmetry RP₁₈ column by gradient elution with water and acetonitrile as mobile phases. The selenomethionine, selenocystine and methylselenocysteine were simultaneously analyzed in switching positive and negative modes. The quantitative and qualitative analyses were carried out by high – resolution mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) source in negative ion acquisition mode under Full MS/dd – MS² mode.

RESULTS: Under the optimal conditions, good linearity was obtained in the respective concentration ranges. The limits of detection for three compounds were in the range of 1.0 – 4.7 μg/kg. The recoveries ranged from 76.4% to 116.0% with relative standard deviations less than 6.5%.

CONCLUSIONS: Compared with existing methods, this method has a wider linear range and is suitable for the analysis of a variety of grain and vegetable samples. The established method has been applied to the determination of the edible part of a variety of crops in Heilongjiang, which is the main grain production area in China. The results show that selenomethionine is the main ingredient in cereals, and methylselenocysteine is the main ingredient in vegetables, and that the organic selenium content of crops in this area is at a low level. Therefore, selenium supplementation is urgently needed.

KEY WORDS: organic selenium; crop; quadrupole/orbitrap high – resolution mass spectrometry; ultrasonic enzyme extraction