

HPLC-ICP-MS 在植物有机硒形态 分析中的应用现状

米秀博^{1,2}, 邵树勋^{1,*}, 张 静^{2,3}, 龙胜桥^{1,2}

(1. 中国科学院地球化学研究所 矿床地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要:植物是人们摄取硒的主要来源,富硒植物中富含可开发利用的有机硒,我国湖北恩施高硒地区富硒植物资源丰富亟待开发利用。植物中硒的形态分析是研究开发富硒植物资源的基础,而高效液相色谱与电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)是目前硒形态分析使用最为广泛的技术,它在样品的前处理、分析灵敏度、准确性等方面均具有优势,可以实现富硒植物中含硒生物大分子、硒形态以及与氨基酸结合位点及机理的分析。因此作者综述了植物样品的预处理过程,介绍了HPLC-ICP-MS联用技术在测定植物硒形态及其应用方面的研究成果,为我国富硒植物、富硒产品中硒形态的分析测定、开发富硒植物资源提供指导。

关键词:富硒植物;有机硒;形态分析;HPLC-ICP-MS

中图分类号:O657 文献标识码:A 文章编号:1672-9250(2014)04-0574-08

硒是人体必需的微量元素,具有清除体内自由基、抗细胞膜过氧化、抗衰老、抗癌防癌、拮抗重金属毒性等生物学功能,缺硒会导致克山病、白肌病、地方性癌症等疾病的发病率增高^[1]。人们主要通过膳食中的植物来获取人体所需要的硒,然而科学、合理的硒摄入并非取决于食物总硒的含量,更为关键的是硒的形态,这直接决定了人体对硒的吸收效果^[2];因为不同形态硒的安全性、生物功能性存在较大差异,无机硒的吸收效果及安全性远不如有机硒, γ -谷氨酰-甲基硒代半胱氨酸(γ -glutamyl-MeSeCys)是非常有效的抗癌硒化合物^[3];因此植物中硒的形态分析研究对评估人们补硒是否健康合理至关重要。

我国湖北恩施发育大量富硒植物资源,亟待开发利用;植物中硒的形态分析研究是开发富硒植物资源的基础,作为硒形态研究的主要分析测试手段HPLC-ICP-MS联用技术^[4-6],将在我国富硒植物中有机硒化物形态分析方面有广泛的应用。为此,笔者对国内外利用HPLC-ICP-MS联用技术分析植物硒形态的研究现状进行了综述,分别介绍了植物样

品预处理技术、高效液相色谱三维分离方法、ICP-MS检测实验过程、以及国内外应用HPLC-ICP-MS联用技术研究富硒植物硒形态方面的进展,以便为分析我国富硒植物硒的赋存状态,开发富硒植物资源提供理论指导。

1 硒形态分析的植物样品预处理

由于植物样品基体复杂,含硒化合物形态多样,并且每种含硒化合物的硒含量非常低,因此预处理的方法既要考虑到较高的回收率,也要保持初始的生物化学形态。在植物硒形态的研究中,根据分析目的和要求的不同,采取的提取方法也不尽相同。

在研究含硒蛋白、含硒多糖、含硒脂肪等大分子硒化物的时候,通常是利用这些含硒化合物在不同溶剂中的溶解性差异将其提取之后,再进行硒含量测定^[7,8],李娟等^[9]在分析富硒花生中硒的赋存形态时利用适量水、70%乙醇溶液、0.1 mol/L氯化钠溶液、0.1 mol/L盐酸溶液和0.1 mol/L氢氧化钠溶液得到水溶蛋白提取液、醇溶蛋白提取液、盐溶蛋白

收稿日期:2013-04-08;改回日期:2014-01-13

基金项目:国家自然科学基金(40971287)。

第一作者简介:米秀博(1990-),男,硕士研究生,专业方向为环境地球化学。E-mail: mixiubol1@mails.ucas.ac.cn.

* 通讯作者:邵树勋(1965-),男,副研究员,主要从事环境地球化学研究。E-mail: shaoshuxun@vip.gyig.ac.cn.

提取液、酸溶蛋白提取液及碱溶蛋白提取液,进而测得这些蛋白中的硒含量用以表征蛋白质结合态的硒含量。

在分析小分子硒化物以及进入蛋白质结构的硒化物的时候,用到的提取方法有水提法,酸提取和酶提取的方法^[10-12]。水提法对一些水溶性的、非结合蛋白的硒化物具有很高的提取效率,例如硒-甲基硒半胱氨酸、 γ -谷氨酰基-硒甲基硒半胱氨酸;对于结合蛋白性质的硒化物,酸提取和酶提取均具有较好的回收率,但是酸提取会导致硒化物形态发生转化,而酶解法不但能够有效地释放束缚于蛋白质中的硒化物,而且温和的提取条件可以更小程度的减少硒化物形态的转化;同时在利用酶解法进行提取的时候以超声辅助消解,可以大大缩短消解时间^[13],避免由于消解时间过长而可能导致的形态转化,因此在分析植物组织样品中,酶解法是应用最广的。

Montes 等^[14]利用 3 种不同的提取方式提取用亚硒酸钠培养的芥菜样品,分别是 HCl 消解, Tris-HCl 缓冲液提取和蛋白酶 K 与蛋白酶 XIV 混合酶提取,经过对比发现提取效率最高的是酶解法,其提取率可以达到约 75%。程建中^[15]建立了 HPLC-ICP-MS 联用技术定量分析富硒竹笋中硒形态方法,在硒形态含量测定的前处理方法中采用超声辅助提取,并比较酶提取法(链霉菌蛋白酶 E)与水提取法的提取效率,结果显示酶提取法的提取效率更高。

2 硒形态的 HPLC-ICP-MS 联用分析技术

HPLC 是以各种不同的色谱分离柱完成不同种类分析物分离的高效分离技术,尤其适用于高沸点、大分子、强极性、热稳定性差化合物的分离分析。把 HPLC 与具有元素专一性、线性范围宽和检测限低等优点的 ICP-MS 联用,在灵敏度、准确度和分析速度等方面都有很大的改善,可用于研究植物、藻类、鱼类、人类等生物体内含 Hg、Se、As、Zn 等元素与多种氨基酸、多肽和蛋白质结合的机理以及定性定量分析。

2.1 硒形态的 HPLC 分离方法

植物体内的硒多以有机硒的形式存在,高效液相色谱技术被广泛应用于分离植物体中各种形态的硒化物;目前用于硒形态分析高效液相色谱法(HPLC)包括体积排阻色谱(SEC-HPLC),离子交换色谱(IEC-HPLC)和反相离子对色谱(RP-IP-

HPLC)^[16]。

2.1.1 体积排阻色谱

体积排阻色谱(Size Exclusion Chromatograph,简称 SEC)是 20 世纪 60 年代发展起来的一种色谱分离方法,又称为凝胶色谱法、分子排阻色谱法、分子筛色谱法和凝胶渗透色谱法等,是液相色谱的一种。主要用于大分子物质如多肽、蛋白质等的分离。固定相凝胶为化学惰性、具有多孔网状结构的物质,凝胶的每个颗粒的结构,犹如一个筛子,小的分子可以进入胶粒内部,而大的分子则排阻于胶粒之外,从而达到分离的目的。体积排阻色谱主要用于硒蛋白、硒多糖的检测以及硒与蛋白相互作用的研究,主要分离的化合物分子量为 10~1000 kDa。

SEC-ICP-MS 的主要优点是操作简单,流动相可以调节到最适应元素形态的酸度和离子强度,分离物与凝胶之间的干扰小,SEC 通常不会引起元素形态的丢失,适用于不稳定或与金属络合较弱的生物大分子;同时未知物的分子质量可以用校正的色谱系统来表征,从而可以大致确定分析物的分子量范围。缺点是容量有限,分离的效率较低,不能分辨多组分样品,仅能分离分子大小不同且不能吸附在柱上的分析物。因此 SEC 通常作为测定金属蛋白或与生物分子结合金属形态分离的第一步,在复杂基体中微量元素的形态分析中发挥了重要的作用;体积排阻色谱也可作为之后用离子交换和反相色谱分析小分子硒形态的预纯化步骤,为未知硒化物的鉴定提供基础。Mounicou 等^[17]利用体积排阻色谱分离了富硒酵母的水提取物,根据分子量的大小得到了三部分硒化物,分别是分子量 >20 kDa、介于 5~10 kDa、 <1.5 kDa,这个过程分离的硒化物占总硒含量的 $98.7 \pm 1.5\%$ 。

2.1.2 离子交换色谱

离子交换色谱(Ion Exchange Chromatograph,简称 IEC)是以离子交换剂作为固定相,是基于离子交换树脂上可电离的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子进行可逆交换,依据溶质离子与交换剂具有不同的亲和力而将它们分离。固定相基团带正电荷的时候,其可交换离子为阴离子,这种离子交换剂为阴离子交换剂;反之,则称为阳离子交换剂。IEC-HPLC 主要用来分离样品中带有电荷的化合物,根据各种物质在离子交换柱中的保留时间不同将它们分开。

植物中无机硒 Se(IV)和 Se(VI)带有负电荷,三甲基硒通常以阳离子形式存在,而各种硒代氨基酸的带电性更多取决于溶液的 pH 值,所以 IEC 经常应用于以共价键结合的硒氨基酸。离子交换色谱的分离效果依赖于淋洗液的 pH 值、离子强度和离子交换剂的性质,因此选择合适的淋洗液、适当调节溶液的 pH 值,目标化合物就可以在阴离子交换柱或阳离子交换柱上实现分离。此外淋洗液中如含有高浓度的盐类,会导致 ICP 进样系统的堵塞。Smrkolj 等^[18]利用离子交换色谱成功分离了富硒南瓜种子中的 Se(IV)、Se(VI)、SeMet、MeSeCys 和 SeCys₂;在阴离子交换的过程中使用 40 mmol/L 磷酸二氢铵作为流动相,同时为了检验结果准确性,在利用阳离子交换色谱验证的时候使用 10 mmol/L 吡啶作为流动相。合适的流动相的选择都将可能使分离效果更佳。

2.1.3 反相离子对色谱

反相离子对色谱 (Reversed Phase Ion Pair Chromatography),把离子对试剂加入到含水流动相中,被分析的组离子在流动相中与离子对试剂的反离子生成不带电荷的中性疏水型离子对化合物,从而增加溶质与非极性固定相的作用,使分配系数增加,改善分离效果。它能同时分离带有电荷和不带电荷的化合物,且具有非常高的结果重复性和较短的分离时间。反相离子对色谱法的出现解决了以往难以分离的混合物的分离问题,诸如酸、碱和离子、非离子混合物,特别是一些生化试样如核酸、核苷、生物碱以及药物等分离。

由于硒代氨基酸通常具有较强的亲水性,在一般的 C8 或 C18 反相柱上保留很弱而不能实现有效分离;而在反相离子对色谱分离模式中,通过加入目标化合物的对离子,形成离子对而增加目标化合物在反相柱上的保留从而实现分离。在选择离子对试剂时应尽量用溶于流动相的去质子的一价反离子,并对色谱柱和分析物不造成干扰损害。需要注意的是流动相的 pH 值和反离子的浓度会直接影响到峰型,甚至会出现拖尾和多峰,所以要用缓冲液来进行适当的调控。RP-IP-HPLC 的优点在于方法的灵活性和多样性增加了,可以为一种特定的要求来设计分离条件。但是由于额外使用有机溶剂和酸会影响到分析物的形态,离子对试剂更加重了这些问题,因此在实验的过程中必须考虑到这些因素。Ipolyi 等^[19]在反相离子对色谱中以 0.1 mol/L 的醋酸铵

缓冲液含体积比为 0.5% 的甲醇溶液和 0.1 mol/L 的 DDAB 为流动相,成功分离了 SeCys、SeMet、SeEt 和 Se(IV)。

在 HPLC 分离系统中,流动相的正确选择是分离成功的关键,流动相的 pH、流速、以及梯度洗脱的选择,都是决定保留时间的因素。在色谱条件的建立过程中,不同性质的色谱柱的联用使得形态分析更加准确:首先利用 SEC 分离不同分子量的硒化物,达到筛选小分子硒化物的作用,接着利用 IEC 分离具有不同电性的硒化物,最后分离得到的硒化物溶液,再次利用 PP-IP 进行极性分离,便可以更加全面的分析可能存在的未知硒化物;这就是现在国外比较流行的三维分离系统,同时也可以利用两种不同的分离系统进行结合,做到二维分离^[20,21]。需要指出的是,色谱分离系统稳定的条件式十分的苛刻,二维或者三维分离系统的建立就更加困难,目前国内已发表的文献中都是利用单一的分离系统进行分离检测,而国外利用多维分离系统不但进行了无标样的硒化物分析,而且还为可能出现的未知硒化物的定性分析建立了完善的分离纯化条件。

2.2 硒形态的 ICP-MS 检测

电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 在研究植物硒的各种化学形态时,最大优点是测定的灵敏度高、选择性好,又具有多元素和同位素的检测能力;虽然对于硒而言,由于其第一电离能较高 ($I_1 = 9.752$ eV),使得离子化效率相对较低,而且还存在多原子离子的干扰 (^{40}Ar 和 $^{36}\text{Ar}^+$ 对 ^{76}Se , ^{40}Ar 和 $^{37}\text{Ar}^+$ 对 ^{77}Se , ^{40}Ar 和 $^{38}\text{Ar}^+$ 对 ^{78}Se 等)^[15]。目前可以克服 ICP-MS 这种固有不足,提高分析结果准确度的方法之一是同时测定样品中硒的其它天然同位素,如 ^{78}Se 、 ^{82}Se ,避免与多原子离子的质量数重叠。另一种方法是利用碰撞反应池技术 (Collision Reaction Cell, 简称 CRC) 除去形成的多原子离子^[22]。

铁梅等^[23]在利用 ICP-MS 对样品中硒含量的测定时,选用 ^{82}Se (天然丰度为 9.2%) 为检测质量数,但由于其天然丰度较低,相对其它元素响应信号较小,按通常模式很难达到检测灵敏度的要求。因此他们采用延长采集时间来改善其计数值以提高检测灵敏度的方法进行痕量硒的测定。Larsen 等^[24]利用 HPLC 分离出酵母和藻类中 12 种硒化物,利用 ICP-CRC-MS 做检测器,由于 CRC 的使用,降低了氩多原子离子的干扰,便可以选择用丰度最高的 ^{80}Se ,研究结果显示硒检出限比常规 ICP-MS 采

用⁸²Se 减低了大约3倍。

ICP-MS 能够检测出样品中浓度很低的硒化合物,与具有高效分离特点的 HPLC 联用,通过分别测定已知标准物和样品中未知物的保留时间,即可依靠标准样品进行定性分析,因此首先要进行标准图谱的建立。目前国外已有23种硒化合物标准品,这就为采用 HPLC-ICP-MS 联用技术对植物中20多种硒化物进行确认提供了条件。Kotrebai 等^[25]利用 HPLC-ICP-MS 成功分离23种硒化物混合标样并做出了标准谱图,进而分析了多种富硒植物(紫云英、富硒洋葱和富硒酵母等)和自然植物(普通大蒜、普通酵母等)中硒的形态和含量;而在利用 ICP-MS 进行定量分析的时候,首先要用标准储备液建立标准曲线,再由得到的标准曲线求出待测溶液中硒的含量。Mazej 等^[26]通过硒酸钠培养菊苣,酶提取液经 HPLC 分离利用 ICP-MS 检测到 SeMet (4.2%~8.4%) 和 MeSeCys, Se 检测限为 2~10 ng/g,结果的相对标准偏差低于15%。

3 HPLC-ICP-MS 在植物有机硒形态分析中的具体应用

3.1 超富硒植物

超富硒植物就是能够超量吸收积累硒,硒浓度大于 1000 $\mu\text{g/g}$ (干重)的植物。紫云英(*Astragalus sinicus*)是豆科黄芪属的植物,在芽和嫩枝中硒的含量可高达 6500 $\mu\text{g/g}$,是植株干重的1%。鸡冠花(*Stanleya pinnata*)是鸡冠花属植物,在头状花序和种子中硒的含量为 3100 $\mu\text{g/g}$,是植株干重的0.1%,它们都是世界上著名的超富硒植物^[27]。

Freeman 等^[28]利用 LC-MS 以及微 X 射线吸收光谱法发现在超富硒植物紫云英中,硒主要是以有机硒的形式富集在幼叶的毛状体中(MeSeCys, 53%; γ -glutamyl-MeSeCys, 47%);在幼叶中,除了70%的 MeSeCys,其余的30%为无机硒(Se(IV)和 Se(VI));利用 LC-MS 在超富硒植物鸡冠花的幼叶的边缘发现 MeSeCys(88%)和丙氨酸丁氨酸硒醚(selenocystathionine, 12%)。微 X 射线吸收光谱法可以对植物组织制成的样品切片进行原位分析,这从根本上解决了由于提取过程而导致的形态转化和损失问题;这种方法在形态分析方面虽然能够很好的区分 C-Se-C 和无机硒,但是对于能谱结构极为相近的小分子硒化物,不能到达良好的分辨效果,所以还得借用 HPLC 的高效分离机理进行再次确定。

Kotrebai 等^[25]利用 HPLC-ICP-MS 分析了总硒含量为 517 $\mu\text{g/g}$ 的紫云英,发现主要的硒化物是丙氨酸丁氨酸硒醚(65%)和 MeSeCys(10%),而 Se(VI)、Se(IV)、SeMet 和 γ -glutamyl-MeSeCys 分别占总硒的 0.5%、3%、5%和 0.5%;这与 Freeman 的研究有一定的差异,可能的原因是由于选取不同生长期样品的差异。因为 Pickering^[29]曾指出紫云英幼叶积累了大量的 MeSeCys,然而在成熟的叶子中主要是 Se(VI),而且两者含量相差 1.7%~2.5%之多。

3.2 富硒葱属植物

葱属植物,能够积累过量硒并且可以把无机硒转化为对人体营养和健康非常有益的有机硒,使得它成为人工添加 Se(IV)和 Se(VI)来达到富硒效果最常用的植物。大量实验表明:以 Se(VI)培养的样品中,硒主要以 Se(VI)无机硒的形式存在;而以 Se(IV)培养的样品中,主要是以 MeSeCys 和 SeCys 等有机硒的形式存在。

Wrobel 等^[30]利用 Se(IV)和 Se(VI)培养洋葱,通过 NaOH 溶液提取硒化物,发现以 Se(IV)培养的洋葱叶子和鳞茎中的硒含量分别为 33%和 26%,而在以 Se(VI)培养的分别是 3%和 5%;在去除了无机硒的小分子量硒化物中,通过 IP(离子对)-HPLC-ICP-MS 检测到在洋葱叶子中主要硒化物是 MeSeCys,以 Se(IV)培养的占总硒的 4.0%,以 Se(VI)培养为 1.9%。这表明洋葱吸收积累 Se(IV)的能力要比 Se(VI)强,而且能够更加容易地转化为对人体有益的有机硒。Kapolna 等^[31]利用 Se(IV)、Se(VI)和 SeMet 培养细香葱,使用酶解法和酸解法两种不同的提取方法;利用 SEC 分离含硒蛋白质,IP-RP 分离含硒氨基酸。结果表明以 Se(VI)培养的样品中,硒主要以无机硒的形式存在,而以 Se(IV)和 SeMet 培养的样品中,主要是以 MeSeCys 和 SeCys 的有机硒存在。值得注意的是 SeMet 本身就是有机硒,通过与 Se(IV)的培养结果对比来看,并没有实质性的区别;考虑到富硒效果和实验成本等因素,在实际应用中亚硒酸盐(Se(IV))是进行硒处理的优先添加剂。

而 Shah 等^[32]用体积排阻色谱、反相离子对色谱(RP-IP)在线与 ICP-MS 联用分析了富硒洋葱中的硒形态,其中氢氧化钠提取物经 SEC-ICP-MS 得到大分子量(>12 kDa)和小分子量(0.36~2 kDa)的硒化物,同时利用蛋白酶提取与蛋白结合的硒氮

氨酸,以 $\text{pH} = 2.5, 0.1\%$ (v/v) 七氟丁酸、5% 甲醇为流动相经 RP-IP-HPLC 分离,结果发现存在的硒形态有 SeCys_2 、 MeSeCys 、 SeMet 以及无机硒化合物。在无标准样品的情况下用 ESI-ITMS 测定未知形态的硒化合物,通过 MS 获得分子量,根据 MS/MS 得到分子的结构;并以方法此证明了洋葱中 γ -glutamyl-MeSeCys 的存在。

通过对比,可以发现酶解法能够有效地释放可能束缚在蛋白质结构中的硒氨基酸;提取液经过二维分离系统的纯化之后,结合电喷雾离子阱二次质谱 (ESI-ITMS/MS) 进行检测,可以实现无标样分析并可能鉴定未知硒化物。

3.3 富硒酵母

富硒酵母就是在培养酵母的过程中加入硒元素,酵母生长时吸收利用了硒,使硒与酵母体内的蛋白质和多糖有机结合转化为生物硒,从而消除了化学硒(如亚硒酸钠)对人体的毒副作用和肠胃刺激,使硒能够更高效、更安全地被人体吸收利用。富硒酵母也是迄今为止已经广泛使用的高效、安全、营养均衡的补硒制剂。Huerta 等^[33]采用 EXC-HPLC-ICP-MS 分析酵母中的硒化合物,蛋白酶和脂肪酶水解后的提取物经阴离子交换色谱分离发现酵母中主要的硒形态为 SeMet ,占总硒浓度的 68%,同时也检测到 Se(IV) 和 Se(VI) 。蒲云霞等^[34]利用 RP-IP-ICP-MS 分析两种提取物中的小分子硒化物的种类,发现 SeMe 都是主要的含硒化合物;在水溶性的提取物中 SeMet 占总硒的 1.26%,而在酶解提取物中却占 65.26%;说明富硒酵母中 SeMet 是有机硒的主要成分。

对于样品中已经存在的硒化物进行确认,只是 HPLC-ICP-MS 应用的一部分,它的更重要的使用是作为未知化合物的发现以及结构鉴定的基础,通过 HPLC-ICP-MS 的分离纯化作用,得到可能的未知峰,进而与 ESI-MS 联用即可以进行结构分析,发现可能存在的未知硒化物以及含量。

Larsen 等^[24]通过离子交换色谱 HPLC 成功分离了 12 种硒代氨基酸、 SeH_3 离子以及无机硒的混合标样,利用 EXC-HPLC 与 ICP-MS 和 ESI-MS 联用发现了酵母中的 SeOMet ,并利用 ESI-MS 确定了它的存在,并指出这可能是由于 SeMet 被氧化的结果;同时也证明了 MeSeCys 的存在。Wrobel 等^[35]研究了富硒酵母中低分子量的硒化合物,为了尽可能的减小硒形态的转化,在预处理过程使新鲜硒酵

母均一化并进行了蛋白质沉淀,利用 IP-HPLC 与紫外检测器 (UV)、ICP-MS 联用检测到了硒代胱氨酸 (SeCys_2)、硒腺苷蛋氨酸 (AdoSeMet) 和硒腺苷半胱氨酸 (AdoSeHcy) 等,并且采用 ESI-MS 进一步确认了 AdoSeMet 和 AdoSeHcy 的结构,这个发现对进一步深入了解硒在生物甲基化过程中的作用具有重要意义。

3.4 富硒大米

大米是人们的主要膳食之一,含有蛋白质,脂肪,维生素 B1、A、E 及多种矿物质。如果能够使大米富硒,就能够很好的解决补硒问题。富硒大米的生产有两种方式:一种是在水稻抽穗至灌浆期,通过叶面喷施硒添加剂到达富硒效果,一般实验室就是利用这种方法;另外一种就是当地土壤含硒量丰富,生产出来的水稻自然比较富硒,这也是现在市场上富硒大米的生产方式。

吴永尧等^[36]以补硒栽培的水稻为材料制备水溶性蛋白,用高效液相色谱分离、检出硒代氨基酸,再用质谱法进一步确认水稻硒蛋白中 SeMet 和 SeCys_2 均存在。赵云强等^[37]使用毛细管电泳电感耦合等离子体质谱法在 18 min 内有效分离了 Se(VI) 、 Se(IV) 、 SeCys_2 和 SeMet 的混合标样;利用酶解法提取大米样品中的硒化物,结果表明富硒大米只包含一种硒 SeMet ,其 Se 浓度范围为 $0.136 \sim 0.143 \mu\text{g/g}$ 干重。

3.5 富硒虫草

富硒虫草,是富硒冬虫夏草的简称,因其有机硒的含量比普通虫草高而得名,由于冬虫夏草本身就是一种名贵药草,通过富硒可能会使其药用价值得到提升,但是形态分析也是必不可少的环节。铁梅等^[38]从富硒培养的虫草中提取可溶性蛋白质,经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析,采用 ICP-MS 对不同盐析组分中蛋白质及硒的分布进行测定,发现富硒蛹虫草的可溶性硒含量占总硒含量的 69.3% 以上;采用 SEC-HPLC-ICP-MS 联机技术对样品中的硒蛋白进行分离检测,发现其分子量分布在 114 kDa 和 1 kDa 之间,且含量各异。而 Dong 等^[39]利用 HPLC-ICP-MS 发现富硒蛹虫草的子实体中,主要的低分子量可溶性硒化合物为 SeMet ,以及束缚在蛋白质中的硒化合物为 SeMet 和 SeCys 。

4 小结

随着 HPLC-ICP-MS 联用技术的发展,近年来

硒的形态分析研究已取得了较大的进展。国内由于起步较晚以及其它原因,在利用 HPLC-ICP-MS 进行硒形态分析方面还处于初步阶段,普遍是利用单一 HPLC 分离系统和以 ICP-MS 作为高灵敏度检测器的联用方法,对样品结合标样进行检验分析。国外则是应用多种分离手段 (SEC, IEC, RP-IP-HPLC) 和平行检测技术 (ICP-MS, ICP-TOFMS, ESI-MS), 不但在生物体中发现了一些新的硒化合物,而且对有机硒的分析种类已从常见的 SeMet、SeCys、MeSeCys 和 γ -glutamyl-SeMeSeCys, 深入到

硒腺苷蛋氨酸 (AdoSeMet)、硒腺苷半胱氨酸 (AdoSeHcy) 和丙氨酸丁氨酸硒醚 (selenocystathionine) 等更为复杂的硒化物研究, 并进行了无标样的 ESI-ICP-MS 分析。目前, 植物中有机硒的研究仍是一个热点, 尤其是在具有抗癌特性的硒化物的提取、结构鉴定方面。同时随着市场上越来越多富硒产品的出现, 使得对于这些产品中硒形态分析的需求也与日俱增, 因此仪器标准化、检测方法实用化、检测过程简洁化是硒形态分析的一个可能发展方向。

参 考 文 献

- [1] Weeks B S, Hanna M S, Cooperstein D, *et al.* Dietary selenium and selenoprotein function[J]. *Medical Science Monitor*, 2012, 18(8): 127-132.
- [2] Fairweather-Tait S J. Bioavailability of selenium[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 51:820-823.
- [3] Medina D, Thompson H, Ganther H, *et al.* Se-methylselenocysteine; A new compound for chemoprevention of breast cancer[J]. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 2001, 40(1): 12-17.
- [4] Pyrzynska K. Selenium speciation in enriched vegetables[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(4): 1183-1191.
- [5] Ogra Y, Ishiwata K, Iwashita Y, *et al.* Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC-inductively coupled plasma-(octopole reaction system)-mass spectrometry and electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1093: 118-125.
- [6] Montes-Bayon M, Molet M J D, Gonzalez E B, *et al.* Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS[J]. *Talanta*, 2006, 68(4): 1287-1293.
- [7] 方建军, 祝华明, 方芳, 等. 富硒大米中硒形态分析[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(9): 146-150.
- [8] 高二东. 紫阳富硒茶中硒形态初步分析与富硒组分的提取[D]. 西安: 陕西科技大学硕士研究生学位论文, 2012.
- [9] 李娟, 史衍玺, 杜志勇, 等. 富硒花生中硒的赋存形态研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(22): 57-59.
- [10] Montes-Bayon M, Yanes E G, Deleon C P, *et al.* Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection; an approach for phytoremediation studies[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(1): 107-113.
- [11] 方勇, 罗佩竹, 胡勇, 等. 大蒜的生物富硒作用及其硒的形态分析[J]. *食品科学*, 2012, 33(17): 1.
- [12] 张涛, 高愈希, 李柏, 等. 高效液相色谱-等离子体质谱联用方法研究富硒大米中硒的形态[J]. *分析化学研究报告*, 2008, 36(20): 206-210.
- [13] Capelo J L, Ximenez-Embun P, Madrid-Albarran Y, *et al.* Enzymatic probe sonication: Enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(1): 233-237.
- [14] Mounicou S, Dernovics M, Bierla K, *et al.* A sequential extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic[J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1877-1882.
- [15] 程建中. 富硒雷竹笋和毛竹笋形态研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2012.
- [16] Far J, Preud'homme H, Lobinski R. Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection[J]. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 657(2): 175-190.
- [17] Mounicou S, McSheehy S, Szpunar J, *et al.* Analysis of selenized yeast for selenium speciation by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-CZE-ICP-MS)[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17(1): 15-20.
- [18] Smrkolj P, Stibilj V, Kreft I, *et al.* Selenium Species Determination in Selenium-Enriched Pumpkin (*Cucurbita pepo*

- L.) Seeds by HPLC-UV-HG-AFS[J]. Analytical sciences, 2005, 21(12): 1501—1504.
- [19] Ipolyi I, Stefanka Z, Fodor P, *et al.* Speciation of Se(IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography-direct hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 435: 1—6.
- [20] Dernovics M, Garcia-Barrera T, Bierla K, *et al.* Standardless identification of selenocystathionine and its gamma-glutamyl derivatives in monkeypot nuts by 3D liquid chromatography with ICP-MS detection followed by nanoHPLC-QTOF-MS/MS[J]. Analyst, 2007, 132(5): 439—449.
- [21] McSheehy S, Pohl P, Szpunar J, *et al.* Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2001, 16(1): 68—73.
- [22] 张涛, 吴刚, 陈春英, 等. 联用技术在植物硒形态分析中的应用[J]. 理化检验-化学分册, 2009, 45(6): 749—755.
- [23] 铁梅, 方禹之, 孙铁彪, 等. HPLC-ICP-MS联用技术在富硒金针菇硒的形态分析中的应用[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(4): 635—639.
- [24] Larsen E H, Hansen M, Fanb T, *et al.* Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae[J]. J Anal At Spectrom, 2001, 16: 1403—1408.
- [25] Kotrebai M, Birringer M, Tyson J F, *et al.* Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents[J]. Analyst, 1999, 125(1): 71—78.
- [26] Mazej D, Falnoga I, Veber M, *et al.* Determination of selenium species in plant leaves by HPLC-UV-HG-AFS[J]. Talanta, 2006, 68(3): 558—568.
- [27] Shrift A, Virupaksha Tk. Seleno-amino acids in selenium-accumulating plants[J]. Biochim Biophys Acta, 1965, 100: 65—75.
- [28] Freeman J L, Zhang L H, Marcus M A, *et al.* Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*[J]. Plant Physiology, 2006, 142(1): 124—134.
- [29] Pickering I J, Prince R C, Salt D E, *et al.* Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 10717—10722.
- [30] Wrobel K, Wrobel K, Kannamkumarath S S, *et al.* HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves a potential dietary source of Se-methylselenocysteine[J]. Food Chemistry, 2004, 86(4): 617—623.
- [31] Kápolina E, Shah M, Caruso J A, *et al.* Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1398—1406.
- [32] Shah M, Kannamkumarath S S, Wuilloud J C A, *et al.* Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004, 19(3): 381—386.
- [33] Huerta V D, Reyes L H, Marchante-Gayon J M, *et al.* Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 18(10): 1243—1247.
- [34] 蒲云霞. 富硒酵母中硒的种态分析[D]. 包头: 内蒙古科技大学包头医学院硕士研究生学位论文, 2008.
- [35] Wrobel K, Wrobel K, Caruso J A. Selenium speciation in low molecular weight fraction of Se-enriched yeasts by HPLC-ICP-MS; Detection of selenoadenosylmethionine[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17(9): 1048—1054.
- [36] 吴永尧, 罗泽民, 陈建英, 等. 水稻硒蛋白及其硒结合形态研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, 34(2): 223—225.
- [37] Zhao Y Q, Zheng J P, Yang M W, *et al.* Speciation analysis of selenium in rice samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Talanta, 2011, 84(3): 983—988.
- [38] 铁梅, 臧树良, 方禹之, 等. SE-HPLC-ICP-MS联用技术在富硒蛹虫草硒蛋白形态分析中的应用研究[J]. 高等化学学报, 2006, 27(7): 1232—1236.
- [39] Dong J Z, Ding J, Yu P Z, *et al.* Composition and distribution of the main active components in selenium-enriched fruit bodies of *Cordyceps militaris* link[J]. Food Chemistry, 2013, 137(1—4): 164—167.

An Application of HPLC-ICP-MS to Analyzing Selenium Species in Plants

MI Xiu-bo^{1,2}, SHAO Shu-xun¹, ZHANG Jing^{2,3}, LONG Sheng-qiao^{1,2}

(1. The State Key Laboratory of Ore Deposit Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 10049, China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: A plant is the main source of selenium which humans take in, and Se-enriched plants contain large amounts of organic Se which can be developed and applied for human health. There is an abundant seleniferous plant resource in the Enshi area, Hubei Province, China, which urgently needs development and utilization. Speciation analysis of selenium in plants is the basis for the development of Se-enriched plants. HPLC-ICP-MS is the most widely used technology of Se species analysis and has much more advantages in the sample pretreatment process, sensitivity, accuracy and so on. It can perform the analysis of the macromolecules containing selenium, and selenoamino acids binding sites and help to understand the mechanism of Se accumulation. This paper reviewed the study results of analysis of Se species in plants, particularly, and introduced the application of HPLC-ICP-MS in determination of Se speciation both at home and abroad. This could provide the guidance of Se species determination for the development of Se-enriched plant resources in China.

Key words: Se-enriched plant; organic Se; speciation analysis; HPLC-ICP-MS