

运用 RPLC-ICP-MS 对富硒酵母中硒形态分析

刘 扬¹, 张 涛¹, 杨 静¹, 高愈希^{*2}, 吴 刚^{*1}, 陈春英²

(1. 包头医学院 基础学院, 内蒙古 包头 014060; 2. 中国科学院 高能物理研究所 核分析技术重点实验室, 北京 100049)

摘要: 分析了硒酵母片中硒的存在形态。采用蛋白酶解法水解酵母片中的蛋白质部分,并提取出构成酵母蛋白质的各种氨基酸成分,利用反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用方法对其中的含硒氨基酸进行测定,确定含硒氨基酸种类。通过与含硒标准化合物在色谱柱上的保留时间比较,确定蛋白酶解液中主要的含硒氨基酸为硒代蛋氨酸。蛋白酶解提取手段和反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用的检测技术,适合于酵母中的硒形态分析。

关键词: 富硒酵母;反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用技术;硒代蛋氨酸

中图分类号: TQ 926.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1261—05

Analysis of Selenium Speciation in the Selenized Yeasts by RPLC-ICP-MS

LIU Yang¹, ZHANG Tao¹, YANG Jing¹, GAO Yu-xi^{*2}, WU Gang^{*1}, CHEN Chun-ying²

(1. Department of Basic Medicine, Baotou Medical college, Baotou 014060, China; 2. Laboratory for Biological Effects of Nanomaterials and Nanosafety and Laboratory of Nuclear Analytical Techniques, Institute of High Energy Physics, Beijing 100049, China)

Abstract: The aim of this study is to detect the selenium speciation in the selenized yeasts. For this, to hydrolyze the proteins in the selenized yeasts through enzymatic digestion and to extract various amino acids composed the proteins in the yeasts, the selenized amino acids were mensurated by reverse phase ion pair liquid chromatography and inductively coupled plasma and mass spectrometer (RPLC-ICP-MS), then the species of the selenized amino acids were confirmed. It was found that Selenomethionine was confirmed primary speciation of selenized amino acids in the solutions of proteins hydrolyzed by enzyme through comparing the retention time of the amino acids with standard selenized compounds in the chromatography column. Conclusion: The method to extract the amino acids from proteins hydrolyzed by the enzyme and determination technology of RPLC-ICP-MS were suitable for analysis of selenium speciation in the selenized yeasts.

Keywords: selenized yeast, RPLC-ICP-MS, selenomethionine

收稿日期: 2013-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(10490180); 国家 973 计划项目(2006CB705600)。

作者简介: 刘 扬(1980—), 女, 内蒙古包头人, 理学硕士, 讲师, 主要从事化学生物学研究。E-mail: liuyang_bt@163.com

* 通信作者: 吴 刚(1962—), 男, 内蒙古包头人, 理学硕士, 教授, 主要从事生物化学研究。E-mail: wugang0525@163.com

高愈希(1964—), 男, 山西忻州人, 理学博士, 研究员, 主要从事重金属及人造纳米颗粒毒理学研究。E-mail: gaoyx@mail.ihep.ac.cn

食用一些具有富硒功能的食品如富硒酵母可以稳定体内的硒浓度,是一种理想的补硒方法^[1]。富硒酵母与富硒植物相比它能够更加有效地吸收外界环境中的无机硒,在酵母的生长过程中,将吸收的无机硒纳入到菌体中使其成为蛋白质的一部分,从而将无机硒转化成为安全有活性的有机硒形式^[2]。临床实验证明,食用富硒酵母可以明显提高人体血浆中的硒水平,能够显著降低癌症的发生率和死亡率^[3]。对于富硒酵母中具有抗癌活性成分,研究认为,富硒酵母的抗癌活性主要来自于硒代蛋氨酸^[4]。因此,富硒酵母中硒的形态分析以及所含有的硒代蛋氨酸浓度的高低,对于评价富硒酵母营养价值有着重要的意义^[5]。

通常,富硒酵母中的硒主要存在于大多数可溶性蛋白质中,且主要是以含硒氨基酸如硒代蛋氨酸形式存在^[6]。作者为了研究硒维尔牌富硒酵母片中硒与蛋白质结合的方式,采用蛋白酶解法水解酵母片中的蛋白质部分,并提取出构成酵母蛋白质的各种氨基酸成分,然后利用反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用方法对其中的含硒氨基酸进行测定,通过与标准含硒化合物比较保留时间,确定含硒氨基酸的种类。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 高效液相色谱仪,Water 公司制;色谱系统采用 Waters 公司 626 型非金属流路四元梯度泵,并配有 Waters 600S 控制器;色谱柱为 Waters 5 μm Symmetry Shield RP18 反相柱 (3.9 mm $\times$ 150 mm) 并联有 5 μm Symmetry Shield RP18 保护柱(3.9 mm $\times$ 20 mm)。Thermo X7 电感耦合等离子质谱仪,美国 Thermo 公司制;VCX105 型 100 W Autotune 系列高强度超声波细胞破碎仪,美国进口产品。

1.1.2 试剂 硒维尔酵母片(0.2 g/片),牡丹江灵泰药业股份有限公司产品;胰蛋白酶,德国 Serva 公司产品;蛋白酶 K,德国 Merck 公司产品;链霉蛋白酶,德国 Merck 公司产品;七氟丁酸、甲醇为色谱纯试剂,Tris-base、SDS(十二烷基磺酸钠)、DTT(二巯苏糖醇),均购自于北京新经科试剂公司;硝酸、盐酸为优级纯试剂;样品处理及溶液配制全部使用经 Mini Q 纯净水机处理的去离子水。

1.2 质谱与色谱的测量条件

本实验采用反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用技术对富硒酵母中存在的主要含硒化合物进行分析测量,色谱与质谱的测量条件见表 1。

表 1 RPLC-ICP-MS 的工作条件

Table 1 Work conditions of RPLC-ICP-MS

反相离子对色谱(RPLC)	
物理量	量值与单位
体积流量	1.0 mL/min
进样量	50 μL
柱温	28 $^{\circ}\text{C}$

电感耦合等离子质谱联用质谱(ICP-MS)	
物理量	量值与单位
射频功率	1 200 W
冷却气流速	13.0 L/min
辅助氦气流速	0.8 L/min
雾化载气流速	0.8 L/min
采样深度	100 mm
驻留时间	500 ms
测量同位素	^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se
分析时间	1 800 s

CCT 模式(CCT mode)	
成分与量	量值与单位
氦氢混合气组成	体积分数 7.28 % H_2
氦氢混合气流量	7.5 mL/min

1.3 样品处理方法

首先将酵母片磨碎成粉,过 150 目筛。称取 0.2 g 酵母粉,溶解在 3 mL Tris-HCl(30 mmol/L pH 7.2)中,溶液中各加入 1.5 mg SDS 和 2.4 mg DTT,其中加入 SDS 是为了使蛋白质变性,能够更彻底地水解酵母中的蛋白质,DTT 是断开硒代胱氨酸中 Se-Se 键,使酶解过程中生成的硒代胱氨酸还原回硒代半胱氨酸。将配制好的溶液在超声破碎仪中超声破碎 5 min,制成富硒酵母溶液。之后每隔 12 h 依次加入胰蛋白酶(15 mg)、蛋白酶 K(10 mg)及链霉蛋白酶(15 mg);37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡酶解(摇速为 100~120 r/min)共计 36 h。酶解结束后,以 4 000 r/min 离心分离酶解溶液 10 min;上清液用截留相对分子质量为 3 kD 的超滤管超滤离心,以除去其中的蛋白酶及大分子物质,最后利用反相离子对色谱和电感耦合等离子质谱联用方法,分析含硒氨基酸种类。共重复 3 组

样品。

另外,称取 0.2 g 酵母粉,采用硝酸消解法消化酵母粉,将消解后的样品利用电感耦合等离子质谱,测量酵母粉中的总硒含量。

1.4 电感耦合等离子质谱测量条件

用 ICP-MS 测量消化后蛋白质提取液和米粉中的硒含量。辅助氩气体积流量 0.8 L/min;测量天然丰度最高的硒同位素 ^{80}Se ,因 $^{40}\text{Ar}^{2+}$ 对其信号有干扰,为消除聚合多离子对 ^{80}Se 的干扰,采用了 CCT 测定模式,碰撞气采用氢氦混合气(体积分数 7.28% 氢气),体积流量为 7.5 mL/min。

1.5 标准曲线

使用 ICP-MS 测量蛋白质中硒元素的含量,由于使用 Ar_2 作为等离子体产生的辅助气体,测量过程中不可避免会产生多原子离子 $^{40}\text{Ar}^{2+}$,测量时对天然丰度最高的同位素 ^{80}Se (天然丰度为 49.6%)产生干扰,降低测量灵敏度。

为了消除这种干扰,在样品测定过程中采用了碰撞池技术(CCT)。CCT 的基本模式是将产生干扰的多原子离子引入到反应池中与反应池中的气体发生相互碰撞,使多原子离子解离或是降低它们的能量,使之不被检测到,从而提高硒元素的响应值,降低检出限。图 1 是在采取 CCT 模式下得到的线性范围为 $1 \times 10^{-9} \sim 100 \times 10^{-9}$ 不同质量分数硒标准溶液中 ^{80}Se 的标准曲线。从标准曲线可以看出 ^{80}Se 在此线性范围内线性关系良好,线性相关系数 $R=0.999$ 。

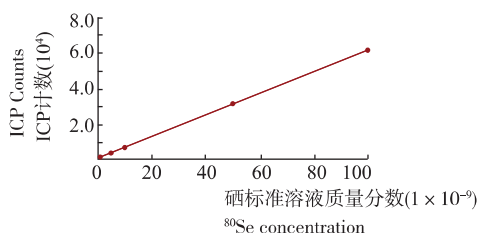


图 1 ICP-MS(CCT 模式)测 Se 含量标准曲线

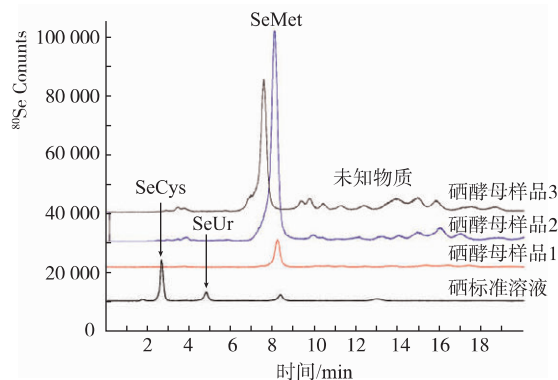
Fig. 1 Calibration curve for Se quantification with ICP-MS(CCT)

2 结果

2.1 富硒酵母片水解液中含硒氨基酸分析

将酵母片蛋白酶水解液进行反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱测量分析,得到结果见图 2。通过与含硒标准化合物比较在色谱柱上的保留时间,可以确定蛋白酶解液中主要的含硒氨基酸为硒

代蛋氨酸。另外,在保留时间 9.5~17 min 之内出现了一些小峰,由于未有标准硒化合物与其保留时间相匹配,因此不能对这些物质进行准确鉴定和定量分析。



SeCys: 硒代半胱氨酸 SeUr: 硒代尿素 SeMet: 硒代蛋氨酸

图 2 酵母蛋白酶解色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the yeast proteins hydrolyzed by the enzyme

2.2 酵母片中硒代蛋氨酸的定量分析

根据不同浓度的硒标准化合物色谱图(如图 3),测量质量分数分别为 1×10^{-9} 、 5×10^{-9} 、 10×10^{-9} 和 50×10^{-9} 的含硒标准液中硒代蛋氨酸峰的峰面积,以峰面积为应变量 Y ,质量分数为自变量 X ,得出峰面积与质量分数关系的标准方程为 $Y=24.4X+376$,回归系数为 0.999 5。

利用峰面积与质量分数之间的标准方程,可以计算出酵母片蛋白酶解液色谱中硒代蛋氨酸的质量,结果见表 2。

2.3 硒维尔酵母片中硒代蛋氨酸占总硒的比例

通过电感耦合等离子质谱测量每片酵母片(0.2 μg)中总硒量为 49.8 μg ,由此可以计算出在每片酵母片中硒代蛋氨酸占总硒的比例,结果见表 2。

表 2 酵母片样品中硒代蛋氨酸的质量及占总硒的质量分数
Table 2 Content of selenomethionine and percent of selenomethionine in total Se in samples of the yeasts

酵母样品	硒代蛋氨酸质量/ μg	总硒质量/ μg	硒代蛋氨酸占总硒的质量分数/%
Sample 1	22.8	49.8	46.0
Sample 2	21.2	49.8	42.5
Sample 3	24.0	49.8	48.1
平均值	22.7	49.8	45.5

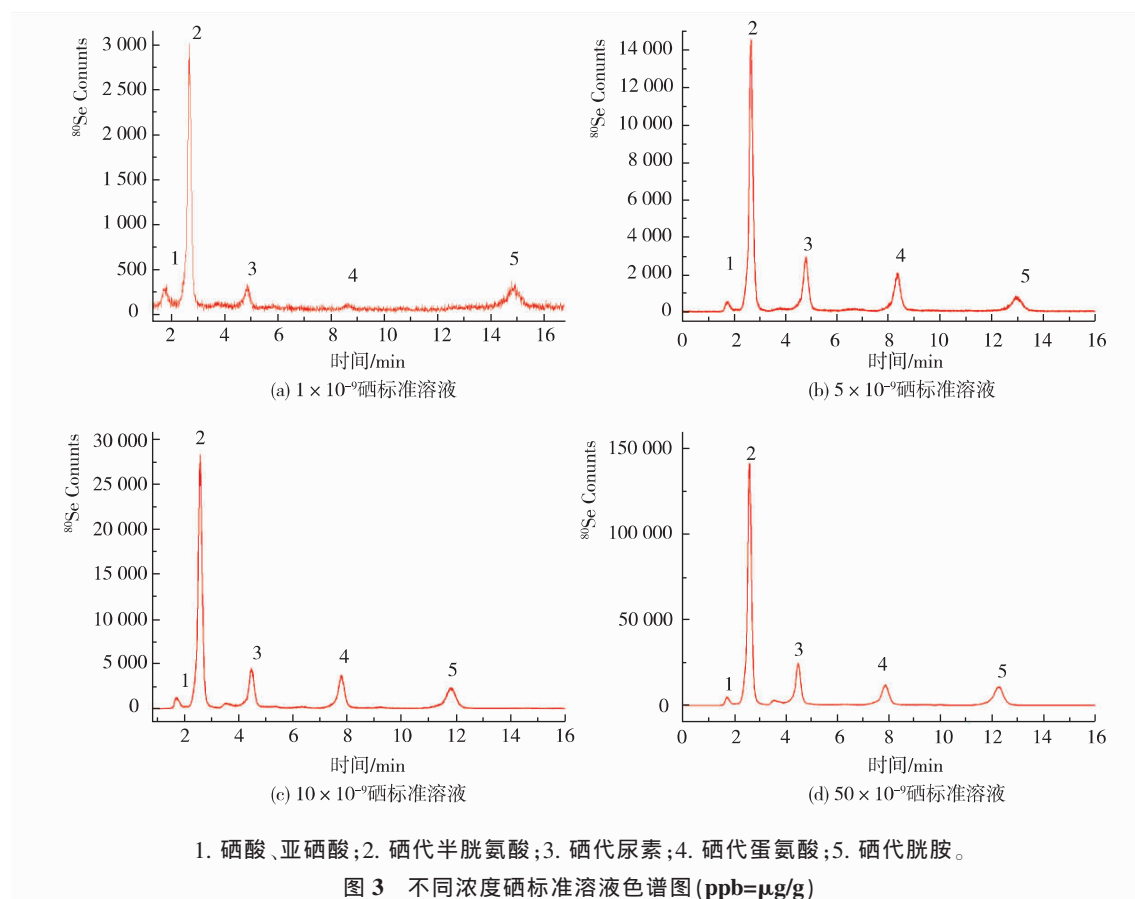


Fig. 3 Chromatogram of Se standard solutions with different concentrations

3 结 语

从获得的色谱图中可以看出,在硒维尔酵母片中与水溶性蛋白质相结合的硒主要是硒代蛋氨酸。从本研究最终得到的结果还不能准确判定硒代半胱氨酸是否发生氧化。从图谱中可以看出,从 10~18 min 期间出现的小峰,可能是硒代半胱氨酸的氧化形式。在酶解液中未发现有硒代半胱氨酸存在,

其原因可能是由于在酵母的基因组中不存在遗传密码 UGA,而硒代半胱氨酸是通过 tRNA 依靠遗传密码 UGA 与蛋白质发生结合^[7]。通过对硒代蛋氨酸进行定量分析得出,本实验中酵母片的硒代蛋氨酸占总硒质量的质量分数为 45.5%,表明蛋白酶解提取手段和反相离子对色谱与电感耦合等离子质谱联用的检测技术,适合于酵母中的硒形态分析。

参考文献:

- [1] 王俊,黄明,徐幸莲,等. 硒及富硒功能食品研究进展[J]. 江苏农业科学,2003(2):53-56.
WANG Jun,HUANG Ming,XU Xin-lian,et al. Selenium and selenium enriched in functional food research [J]. **Jiangsu Agricultural Science**,2003(2):53-56.(in Chinese)
- [2] Aleksandra Polatajko,Magdalena Sliwka-Kaszynska,Mihaly Dernovics,et al. A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast[J]. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**,2004,19:114-120.
- [3] Clark L C,Combs G F,Turnbull B W,et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin[J]. **Am Med Association**,1996,276:1957-1985.
- [4] Uden P C,Boakye H T,Kahakachchi Chethaka,et al. Element selective characterization of stability and reactivity of selenium

- species in selenized yeast[J]. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 2004, 19:65-73.
- [5] Lobinski R, Edmonds J S, Suzuki K T, et al. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials[J]. **Pure Appl Chem**, 2000, 72(3):447-461.
- [6] Korhola M, Vainio A, Edelmann K. Selenium yeast[J]. **Ann Clin Res**, 1986, 18(1):65-68.
- [7] Jorge Ruiz Encinar, Magdalena Sliwka-kaszynska, Aleksandra Polatajko, et al. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2003, 500:171-183.

科技信息

欧盟食品安全局批准 4 种食品接触材料

欧盟食品安全局食品接触材料组在 9 月会议中,批准两种氧气吸收剂,一种添加剂,一种塑化剂。物质如下:铁(0)改性膨润土,铁(0)改性高岭土,用于吸收食品接触环境中的氧气;2,2,4,4-四甲基-1,3-环定二醇(CAS No 3010-96-6),在聚酯生产过程中用做单体;聚甘油(CAS No 25618-55-7),用于塑化剂,要求脂肪族芳香聚酯共聚物中聚甘油不超过 6.5%(W/W)。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 欧盟食品安全局批准 4 种食品接触材料[EB/OL]. (2013-11-12). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=43766>.

美国 FDA 拟取消加工食品中的“部分氢化油”使用许可证

因部分氢化油(PHOs)中含有反式脂肪酸,美国 FDA 拟取消加工食品中的“部分氢化油”使用许可证。

FDA 已经在《联邦纪事》公告:为确保消费者身心健康,“部分氢化油”(PHOs)“将不再属于”安全使用物质“(GRAS)。这种情况下,食品中如果继续使用 PHOs,相关食品将被认为掺假食品而禁止销售。换句话说,(含有反式脂肪酸的)氢化油将彻底不能使用在食品中。

使用 PHOs 而含有反式脂肪酸食品有:饼干、甜饼、蛋糕、冷冻蛋糕、及其他焙烤食品;各种零食(如微波爆米花);冷冻皮萨;植物起酥油和人造奶油;咖啡伴侣;冰冻面团;食品表面增霜剂。

出于保护消费者健康原因考虑,早在 1999 年 FDA 要求食品营养成分表中标注反式脂肪酸含量内容,该规定遂于 2006 年正式生效。但事实上,仍有许多加工食品中继续使用“部分氢化油”(PHOs)-这种油就是食品中反式脂肪酸的主要来源。反式脂肪酸会增加人体血液的黏稠度和凝聚力,容易导致血栓的形成,对于血管壁脆弱的老年人来说,危害尤为严重。

[信息来源]食品伙伴网. 美国 FDA 拟取消加工食品中的“部分氢化油”使用许可证 [EB/OL]. (2013-11-8). <http://news.foodmate.net/2013/11/248049.html>.