

HPLC-ICP-MS 联用检测转基因大豆中的硒形态

杨修斌, 王丙涛, 俞坤, 颜治, 林起辉, 赵琼晖, 林燕奎, 王超

(深圳出入境检验检疫局, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 广东深圳 518045)

摘要: 本文研究建立了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱 (HPLC-ICP-MS) 联用检测转基因大豆中的硒酸盐 (SeVI)、亚硒酸盐 (SeIV)、硒代蛋氨酸 (selenomethionine, SeMet)、硒代胱氨酸 (selenocystine, SeCys₂) 和硒代乙硫氨酸 (selenoethionine, SeEt) 的方法。探讨了色谱柱、流动相及其酸度对分离效果的影响, 使用 10 mmol/L 的柠檬酸溶液 (pH 值 4.5) 作流动相, Hamilton PRP X-100 色谱柱分离, 碰撞反应池技术消除 ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ 和 ⁴⁰Ar²H²⁺ 等多原子离子干扰, ICP-MS 检测 ⁸²Se 同位素, 在 21 min 内可完全分离检测 5 种硒形态。探讨了不同提取方法的提取效果, 优化了提取条件, 采用蛋白酶提取, 针对美国进口的转基因大豆样品进行加标回收实验, 结果表明采用蛋白酶提取, SeIV 和 SeVI 的回收率在 100% 左右, SeMet 的回收率在 92.6%~109.3% 之间, SeCys₂ 和 SeEt 的回收率为 81.2%~95.9%。该方法可完全满足转基因大豆中的硒形态定量分析鉴定。

关键词: 转基因大豆; 硒形态; HPLC-ICP-MS

文章编号: 1673-9078(2015)2-280-284

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.044

Determination of Selenium Species in Genetically Modified Soybean by High-Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

YANG Xiu-bin, WANG Bing-tao, YU Kun, YAN Zhi, LIN Qi-hui, ZHAO Qiong-hui, LIN Yan-kui, WANG Chao
(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R&D on Food safety, Shenzhen 518045, China)

Abstract: An analytical method to detect selenium species such as selenate [Se(IV)], selenite [Se(VI)], selenomethionine (SeMet), selenocystine (SeCys₂), and selenoethionine (SeEt) in genetically modified soybean was established using high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The effects of the chromatographic column, mobile phase, and acidity on separation were evaluated. Hamilton PRP X-100 reversed phase anion exchange column with 10 mmol/L citric acid solution as the mobile phase was used for separation. Collision cell technology was adopted to eliminate the interference of polyatomic ions such as ⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺ and ⁴⁰Ar²H²⁺. Isotope ⁸²Se was detected by ICP-MS. The five species were completely separated within 21 min. The extraction procedure was discussed and optimized. A spiked recovery experiment was carried out with proteinase extraction, using genetically modified soybean imported from the USA. The result showed that the recoveries were around 100% for Se(IV) and Se(VI), was in the range 92.6%–109.3% for SeMet, and they were in the range 81.2%–95.9% for SeCys₂ and SeEt. This method can be used for the quantitative determination of selenium species in genetically modified soybeans.

Key words: genetically modified soybean; selenium species; high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry

大豆一直是国内老百姓的主要日常食品原料之一, 如豆浆、豆腐、腐竹、豆油等豆制品, 国内大豆消费量占居世界消费总量的五分之一以上。我国已经

收稿日期: 2014-06-30

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技项目 (SZ2008011)

作者简介: 杨修斌, (1986-), 男, 研究生, 助理工程师, 从事食品理化检测

通讯作者: 林起辉, (1989-), 男, 助理工程师, 从事食品理化检测

从世界上大豆生产大国变成大豆进口大国, 近年进口量更出现井喷式增长, 年进口量均在 5000 万 t 以上, 超过大豆需求总量的 90%, 并对国内相关产业造成致命冲击。进口的大豆基本都是转基因大豆, 转基因大豆自从 1996 年开始至今也才十几年的发展历史, 但发展规模空前, 而转基因产品的安全性一直备受争议^[1-2], 还有研究表明转基因作物中存在的元素形态可能会因基因转变和生态环境不同而发生变化^[3-6], 因此准

确定性定量分析转基因大豆中的元素化学形态对转基因大豆安全风险评估和维护食品安全具有重要的指导意义。

大豆中含有一定量的硒，统计数据表明，粮食谷物中的硒含量在 0.1~0.8 mg/kg，如果是富硒地区，含量可高达 8 mg/kg。硒是人体必需的 14 种微量元素之一，被誉为“生命火种”和“心脏的守护神”，具有抗氧化和防癌抗癌的作用。食品中硒存在的化学形态有很多种，主要分为无机硒和有机硒，国内外已有相关研究报道^[7-12]，无机硒吸收和利用不理想，而且毒性极大，中毒量与需要量之间范围很小，日本、美国等发达国家早已禁止在食品中添加亚硒酸钠等无机硒。有机硒毒性小，生物利用率高，目前已被用作硒强化剂广泛应用到各种富硒食品中。但国内外对转基因产品中硒形态的研究报道较少，国内相关研究主要集中在元素总量分析上^[13-15]。基因的改变可能会对转基因大豆的基质产生影响，因此本文采用高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用（HPLC-ICP-MS）技术研究建立了转基因大豆中硒酸盐、亚硒酸盐、硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸和硒代乙硫氨酸等形态同时分离检测的方法，分离效果和定量结果均令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂材料

仪器：高效液相色谱仪，Waters 2695；电感耦合等离子体质谱仪，X Series2, Thermofisher。

试剂：柠檬酸，分析纯；蛋白酶K, Sigma；硒酸根标准溶液（GBW10033）、亚硒酸根标准溶液（GBW10032），中国计量科学研究院；硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸，Acros organics公司；硒代乙硫氨酸，TRC公司。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件

Hamilton PRP X-100色谱柱，250 mm×4.6 mm，填料5 μm；流动相使用10 mmol/L柠檬酸溶液，pH 4.5（用氨水调节），流速1.0 mL/min，进样量50 μL。

1.2.2 ICP-MS 参数

功率：1400 W；冷却气流速：14.0 L/min；辅助气流速：0.9 L/min；雾化气流速：0.82 L/min；H₂/He混合气流速：5.0 mL/min；H₂/He混合气比例：3/97；脉冲电压：3450 V；模拟电压：1680 V。

1.3 样品前处理

将转基因大豆样品自然风干，用搅拌机打碎制成匀质样品，称取1.0 g匀质样品，加入20 mg蛋白酶K，再加入20 mL水，37 °C恒温水浴振荡5小时，4000 r/min离心，过0.45 μm滤膜，待测。同样方法做试剂空白。

2 结果与讨论

2.1 ICP-MS 检测条件的优化

Se有6种同位素，分别为⁷⁴Se、⁷⁶Se、⁷⁷Se、⁷⁸Se、⁸⁰Se和⁸²Se，其中⁸⁰Se的丰度最大，其次是⁷⁸Se和⁸²Se。ICP-MS所使用的气体为氩气，由Ar带来的多原子离子如³⁶Ar³⁸Ar⁺，³⁸Ar³⁸Ar⁺，³⁸Ar²H⁺，³⁸Ar⁴⁰Ar⁺，⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺和⁴⁰Ar²H²⁺等分别干扰⁷⁴Se⁺，⁷⁶Se⁺，⁷⁷Se⁺，⁷⁸Se⁺，⁸⁰Se⁺和⁸²Se⁺的测定。而且，⁴⁰Ar³⁷Cl⁺和⁷⁶SeH⁺也干扰质量数⁷⁷Se⁺，⁷⁷SeH⁺干扰⁷⁸Se⁺。自然丰度最高的同位素⁸⁰Se（49.6%）会受到来自⁴⁰Ar⁴⁰Ar⁺的严重干扰，且无法通过数学校正来消除，本研究采用碰撞池技术（CCT），使用H₂/He混合气作为碰撞反应气来去除干扰，通过调谐优化检测条件，使灵敏度满足测试要求同时通过碰撞反应基本消除了多原子离子的干扰。图1列出以⁷⁸Se（23.78%）、⁸⁰Se、⁸²Se分别作为检测同位素时ICP-MS的响应信号强度，由于多原子离子峰只干扰某个特定的同位素，各硒形态标准在不同同位素被检测时峰形保持一致，这表明在本研究的碰撞反应池条件下多原子离子的干扰可以忽略不计。本研究最终采用⁸²Se作为实际的检测同位素。

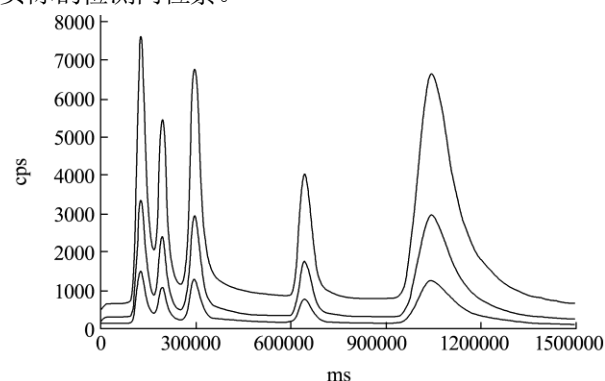


图1 Se不同同位素的形态分析色谱图，从上到下依次为⁸⁰Se、⁷⁸Se和⁸²Se

Fig.1 The chromatograms of Se-species for ⁸⁰Se、⁷⁸Se and ⁸²Se from the top down

2.2 色谱柱的选择

由于不同硒化合物在水溶液中可能表现出不同的离子状态，阴离子、阳离子或者两性离子，因此不同性质的分离柱对硒化合物的分离效果差别很大，而且如果是二甲基硒等易挥发的硒化合物，还需要用气相

色谱进行分离。因此,本实验在查阅大量资料的基础上,根据我们选定的硒化合物形态种类,分别选择常规的C18柱、Waters Symmetry Shield RP18反相柱和Hamilton PRP X-100阴离子交换色谱柱进行分离。实验结果发现采用常规的C18柱进行分离时,SeVI的出峰时间不稳定,并且随着流动相浓度和酸度的变化,出峰时间波动很大,无法达到理想效果。使用Symmetry Shield RP18反相柱,七氟丁酸和2%甲醇混合流动相进行分离,两种无机硒形态不能完全分开,而且使用到的全氟羧酸(如三氟乙酸、五氟丙酸、七氟丁酸等),该类试剂毒性大,配制时要特别注意,此外流动相还含有甲醇,浓度高达2%以上,不同文献报道采用的甲醇含量也不一样^[6],但如果不使用专用的有机进样系统接口,高浓度的甲醇会造成ICP炬焰熄灭,同时造成锥口积碳,对仪器灵敏度造成影响,操作起来比较繁琐。使用Hamilton PRP X-100色谱柱进行分离,选用柠檬酸单一物质溶液作为流动相,SeIV、SeVI、SeCys₂、SeMet、SeEt 5种硒形态可以达到良好分离,且流动相成分单一,配制简单、节约环保。因此本实验选择使用Hamilton PRP X-100色谱柱进行分离。

2.3 流动相的选择

硒化合物种类繁多,不同硒化合物的性质各异,特别是水溶性和极性相差较大,因此对流动相的要求就比较高,报道中常采用磷酸二氢铵+磷酸氢二铵的混合缓冲溶液或者三氟乙酸、七氟丁酸等剧毒试剂添加烷基磺酸钠、氢氧化四甲基铵等单一离子对试剂或者混合离子对试剂作为流动相成分,甚至再加入甲醇等有机成分来提高分离效果。流动相成分复杂必然会加大柱子的负荷,有机成分的加入还会对ICP-MS产生影响,容易引起熄火,或者需要专门的有机进样系统。考虑到待测目标硒化合物的理化性质,本实验选择了磷酸二氢铵和柠檬酸等弱酸盐溶液作为流动相分离。实验发现使用磷酸二氢铵作为流动相,5种硒形态可完全分离,但SeVI出峰时间在35 min左右,且SeMet的响应信号很低。我们试验了改变磷酸二氢铵溶液的浓度和酸度,两种无机硒的保留时间变化很大,甚至与硒代胱氨酸的峰发生重叠,而且重复性较差,无法达到最优分离条件,因此磷酸二氢铵溶液不是理想的流动相。采用柠檬酸溶液作为流动相,经过条件优化,SeVI出峰时间在10 min左右,SeEt出峰时间不变,基本维持在18分钟左右,5种硒形态在21分钟内可完全分离,实验发现检出限、重复性和线性相关系数均满足方法开发要求。因此,本实验选择仅使用柠檬酸溶液作为单一流动相成分进行分离。

2.4 流动相 pH 值的影响

不同硒化合物在溶液中表现出的离子状态不同,因此流动相的酸度直接影响到各化合物的离子存在状态,当流动相酸度变化时,离子状态会随之发生较大变化,呈现阳离子、阴离子或者两性离子^[6]。两种无机硒化合物硒酸(pK₂ 1.7)和亚硒酸(pK₁ 2.46, pK₂ 7.31)在水溶液中以阴离子形式存在,在pH<4时,一部分亚硒酸可能未发生离解。SeMet (pK₁ 2.19, pK₂ 9.05)和SeEt在低pH值的水溶液中以阳离子形式存在,在中等强度pH值的溶液中以两性离子存在,在高pH值的溶液中以阴离子形式存在。根据解离常数pK值的不同,水溶液中可能存在5种硒代胱氨酸(pK₁ 1.68, pK₂ 2.15, pK₃ 8.07, pK₄ 8.94),即随着pH的变化可能带两个正电荷、一个正电荷或以两性离子存在,甚至以带一个负电荷或两个负电荷的阴离子存在。因此流动相酸度的变化对几种形态的分离效果和出峰顺序影响很大。实验发现,不同酸度的流动相导致出峰顺序变化很大,主要是酸度对无机硒的保留时间影响太大,在高pH值条件下,SeVI在SeEt后出峰,而随着酸度的升高(pH值降低),硒酸盐的保留时间急剧减少,同时亚硒酸盐的保留时间也有所减少,而硒代氨基酸的保留时间则基本没有影响。图2显示了不同酸度条件下5种硒形态的分离效果,其中流动相浓度均为5 mmol/L柠檬酸溶液。

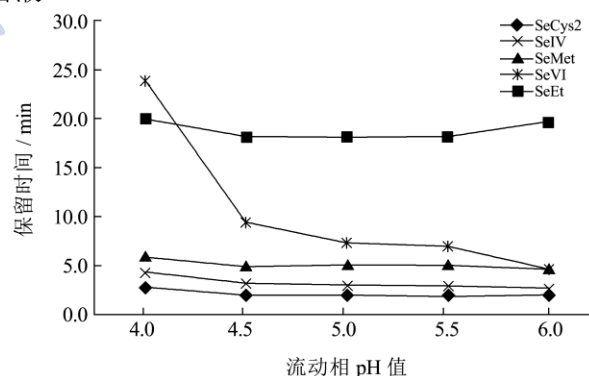


图2 不同酸度条件下的分离色谱图。

Fig.2 The chromatograms of the five Se-species with 5mmol/L citric acid as eluent at different acidity

2.5 硒化合物提取

基因的转变引起大豆基质发生变化,同时不同硒化合物的性质差别很大,有水溶性好的,有水溶性差的,根据待测化合物性质,我们分别采用热水提取、稀酸提取和酶水解提取几种方法,见图3。结果发现热水提取时,水溶性好的硒化合物的提取效果很好,加标回收实验显示SeIV和SeVI的回收率在95%左右,

SeMet的回收率也达到82%以上, 而SeEt和SeCys₂的回收率很差。采用5 mmol的柠檬酸溶液70℃恒温水浴浸提代替热水提取, 发现两种无机硒化合物的回收率达到100%左右, SeMet的回收率也提高到85%以上, SeEt和SeCys₂的回收率也明显改善, 但仍然无法满足方法需要。SeEt和SeCys₂水溶性稍差, 需要采用有机溶剂或者加入蛋白酶来彻底改善提取效果, 在提取时加入20 mg蛋白酶proteinase K进行水解提取, 结果发现SeCys₂的加标回收率提高到81%以上, SeEt的回收率也升至85%以上。因此, 为了准确测定转基因大豆样品中各种硒化合物的含量, 可采用蛋白酶水解提取, 实现对五种硒化合物的准确定量分析。

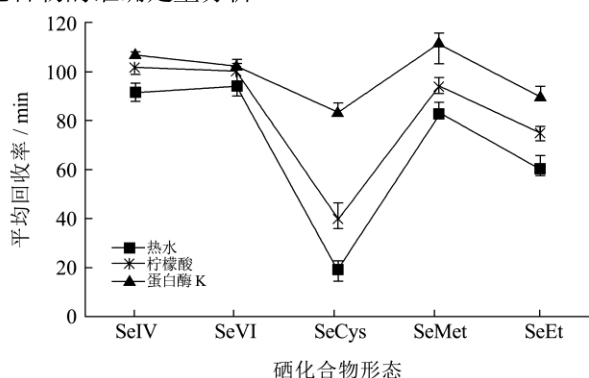


图3 不同溶剂提取的回收率

Fig3 The recoveries of species which extracted by different solutions

2.6 保留时间、标准曲线和检出限

按照上述条件优化后建立的方法进行检测, 5种硒化合物均获得了良好的分离, 各化合物出峰稳定, 见图4。方法检出限也达到了产品测定需要, 线性良好, 线性相关系数均大于0.9995, 各形态保留时间、线性方程、检出限见表1。

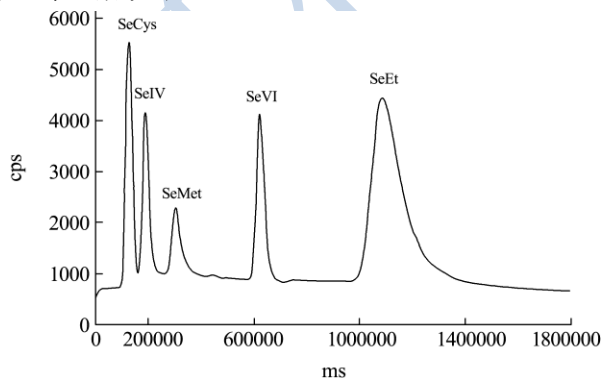


图4 硒形态标准溶液色谱图, SeIV, SeVI 和 SeCys₂ (50 μg/L), SeMet 和 SeEt (100 μg/L)

Fig4 Chromatograms of selenium species, SeIV SeVI and SeCys₂ (50 μg/L), SeMet 和 SeEt (100 μg/L)

表1 硒形态保留时间、线性方程和检出限

Table 1 The retention time, lines, correlation coefficient and limit detection (LOD) for the five Se-species by HPLC-ICP-MS

Se-species	Retention T /min	Lines	Coefficient (r ²)	LOD /(μg/L)
SeCys ₂	2.1	Y=1099.6x+3181.8	0.99991	1.0
SeIV	3.2	Y=1309.8x+1491.9	0.99997	0.3
SeMet	5.1	Y=1299.9x-72805.5	0.99985	3.6
SeVI	9.4	Y=1938.8x+2709.9	0.99999	0.3
SeEt	18.0	Y=969.8x-4846.7	0.99996	1.5

2.7 加标回收试验

选取深圳口岸进口的美国转基因大豆做样本, 按照本文建立的方法先测定各种硒化合物形态的本底含量, 再进行加标回收实验, 其中SeCys₂、SeMet和SeVI的本底含量分别为0.107 mg/kg、0.037 mg/kg和0.011 mg/kg, 此外还含有一定量的其它未知形态。分别进行三个水平的加标回收实验, 每个水平平行6次, 5种硒化合物的加标回收率在81.2%~109.3%范围内, 相对标准偏差均小于5%, 结果均令人满意, 见表2。

表2 美国进口转基因大豆加标回收实验结果

Table 2 Recoveries of Se-species for genetically modified soybean samples from American (n=6)

Se-species	Added conc. /(mg/kg)	Sample conc. /(mg/kg)	Recovery /%	RSD /%
SeCys ₂	0.5		84.1	1.9
	1	0.107	93.5	2.5
	2		91.4	1.4
SeIV	0.25		102.3	1.2
	0.5	ND	98.6	0.9
	1		99.5	1.1
SeMet	1		97.4	2.8
	2	0.037	94.8	1.5
	4		101.1	2.2
SeVI	0.25		100.7	1.8
	0.5	0.011	99.4	1.0
	1		101.3	1.2
SeEt	1		87.2	3.8
	2	ND	91.6	2.9
	4		98.4	4.1

注: ND表示未检测到。

3 结论

转基因农产品由于基因的转变可能会对其中存在

的元素化学形态产生影响,从而影响到产品的食用安全性,因此需要对转基因农产品中的元素形态种类和分布进行定性定量分析。本方法在检测转基因大豆中SeVI、SeIV、SeMet、SeCys₂和SeEt等五种形态时,样品前处理简便快捷,流动相成分单一、配制简单、无毒环保,21分钟内可将五种形态完全分离,方法重复性和准确性良好,可完全满足转基因大豆中无机硒和有机硒形态分析鉴定的需要。

参考文献

- [1] 高静.进口转基因大豆放行,中国大豆产业链恐再遭重创[N].中国商报,2013.06.25(3)
GAO Jing. Import genetically modified soybeans was released, chinese soybean industry chain may suffered another hit [N]. Chinese Daily, 2013, 06, 25(3)
- [2] Ellen V H, Adinda D S, Yann D, et al. The safety assessment of genetically modified crops for food and feed use, scientific institute of public health, 2003, 4
- [3] Pedrero Z, Elvira D, Cámara C, et al. Selenium transformation studies during broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS) [J]. Anal. Chim. Acta., 2007, 596(2): 251-256
- [4] Kahakachchi C, Boakye HT, Uden PC, et al. Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast [J]. J. Chromatogr A, 2004, 1054(1-2): 303-312
- [5] Bañuelos G, Terry N, Leduc D L, et al. Field trial of transgenic Indian mustard plants shows enhanced phytoremediation of selenium-contaminated sediment [J]. Environ. Sci. Technol., 2005, 39(6): 1771-1777
- [6] Meija J, Montes B M, Leduc D L, et al. Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from se accumulating plants (wild type and genetically modified) by GCMS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction [J]. Anal. Chem., 2002, 74(22): 5837-5844
- [7] 王丙涛,林燕奎,颜治等.HPLC-ICP-MS同时检测As和Se形态的方法研究[J].湘潭大学自然科学学报,2010,32(2): 88-92
WANG Bing-tao, LIN Yan-kui, YAN Zhi et al. Simultaneous arsenic and selenium speciation analysis using HPLC-ICP-MS [J]. Natural Science Journal of Xiangtan University, 2010, 32(2): 88-92
- [8] Zoyné P, Yolanda M. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 634: 135-152
- [9] Montes B M, Yanes EG, Ponce L C, et al. Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies [J]. Anal. Chem., 2002, 74(1): 107-113
- [10] Chan Q L, Scott E. A C. Selenium speciation profiles in selenite-enriched soybean (*Glycine Max*) by HPLC-ICP MS and ESI-ITMS [J]. Metallomics, 2010, 2(2): 147-153
- [11] Alessandra S, Gustavo H M, Marcos N E. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans [J]. J. Anal. At. Spectrom, 2007, 22(12): 1501-1506
- [12] Sandra M, Monika S, Juris M. Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea*-implications for Se-Hg antagonism [J]. J. Anal. At. Spectrom, 2006, 21(4): 404-412
- [13] 周勋波,李全起,吴魏等.不同基因型大豆生育特性与积硒关系研究[J].华北农学报,2006,21(2):398-402
ZHOU Xun-bo, LI Quan-qi, WU Wei, et al. Studies on the relation between growth character and se-accumulation different genotypic soybean [J]. Acta Agriculture Boreali-Sinica, 2006, 21(2): 398-402
- [14] Rui Yukui, Wang Wenya, Liu Pinghui. Distribution of mineral elements in dual-toxin transgenic (Bt+CpTI) cotton [J]. Plant Biosystem, 2009, 143(1): 137-139
- [15] 魏振林,申琳,芮玉奎等.应用ICP-MS检测转基因大豆油中22种元素含量[J].光谱学与光谱分析,2008,28(6): 1398-1399
WEI Zhen-Lin, SHEN Lin, RUI Yu-kui et al. Application of ICP-MS to the detection of 22 elements in transgenic soybean oil [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(6): 1398-1399
- [16] Minh K, Julian F T, Eric B, et al. High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 866: 51-63