

手性色谱法测定 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的研究

黄晓婉¹, 王杉², 揭琴丰², 邱伟华², 何悦铭¹, 邓泽元¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047) (2. 江西省疾病预防控制中心, 江西南昌 330029)

摘要: L-硒-甲基硒代半胱氨酸是一种新型硒源类的食品营养强化剂, 而 D-硒-甲基硒代半胱氨酸的安全性尚没有相关研究, 目前对于 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的测定方法多集中在测定硒-甲基硒代半胱氨酸含量, 无法检测到其中 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的含量。本文建立了通过手性色谱柱分离、标准曲线法测定 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的高效液相色谱法(HPLC)。实验使用 EC250/4 NUCLEOSIL Chiral-1 手性色谱柱(4 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 0.4 mmol/L CuSO₄·5H₂O 水溶液, 柱温为 35 °C, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL, 检测波长为 240 nm; 在该条件下 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的检测线性范围为 0.541~1.352 mg/ml, 线性相关系数 R 达 0.9999, 在线性范围内精密度和稳定性良好, 平均回收率为 97.73%。该方法操作简单, 结果准确, 可用于 L-硒-甲基硒代半胱氨酸产品及其制品质量的监控。

关键词: L-硒-甲基硒代半胱氨酸; 手性色谱法, 测定

文章编号: 1673-9078(2015)9-309-313

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.050

Determination of L-Se-methylselenocysteine Content by Chiral Chromatography

HUANG Xiao-wan¹, WANG Shan², JIE Qin-feng², QIU Wei-hua², HE Yue-ming¹, DENG Ze-yuan¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

(2.Center for Disease Control and Prevention of Jiangxi Province, Nanchang 330029, China)

Abstract: L-Se-methylselenocysteine is a new selenium-containing food supplement; however, no studies regarding the safety of D-Se-methylselenocysteine have been reported. Current methods for the determination of L-Se-methylselenocysteine content mainly focus on the measurement of total Se-methylselenocysteine content and cannot differentiate it from the content of L-Se-methylselenocysteine. High-pressure liquid chromatography (HPLC) was used in this study to estimate L-Se-methylselenocysteine content using chiral separation, and a standard curve was established. Reliable chromatographic separation was achieved on an EC250/4 NUCLEOSIL Chiral-1 column (4 mm × 250 mm, 5 μm) when the mobile phase was 0.4 mmol/L CuSO₄·5H₂O, column temperature was 35 °C, flow rate was 1.0 mL/min, sample size was 20 μL, and detection wavelength was 240 nm. Under these conditions, the calibration curves established showed good linearity across the concentration range of 0.541~1.352 mg/ml, with a correlation coefficient of 0.9999 and an average recovery of 97.73%. The method is simple, accurate, and can be used to monitor the quality of L-Se-methylselenocysteine and its related products.

Key words: L-Se-methylselenocysteine; chiral chromatography; measurement

硒是人体必需的微量元素之一, 与机体的抗氧化能力、免疫功能、抗癌作用等有重要的关系^[1-4]。硒元素在生物样品中主要是硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸、硒代腺氨酸、硒蛋白等有机形式存在^[5]。L-硒-甲基硒代半胱氨酸是比硒蛋氨酸和亚硒酸钠具有更高生物活性一种小分子有机含硒化合物^[6-7]。L-硒-甲基硒代半胱氨酸作为新型食品营养强化剂, 1960 年被美国科学家

收稿日期: 2014-11-22

基金项目: 食品安全国家标准制定项目 (spaq-2013-30); 江西省博士后科研项目 (2013KY04)

作者简介: 黄晓婉 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 营养与食品卫生学

通讯作者: 邓泽元 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 营养与功能食品

首次发现, 2002 年被美国 FDA 认定为最新一代硒的源类饮食补充剂, 已于 2009 年被卫生部批准为新型营养强化剂, 可广泛应用于食品和保健品等方面, 所以对 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的检测具有重要研究意义。

天然 L-硒-甲基硒代半胱氨酸主要来源于富硒的大蒜、洋葱等植物, 利用微生物、植物、动物转化等方法可以将无机硒转化为有机硒。然而无论是天然产物中, 还是各种转化方法中, L-硒-甲基硒代半胱氨酸的含量和纯度都相对较低, 为进一步提高 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的纯度和产率, 根据 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的化学结构进行人工合成^[8], 而这种人工合成的 L-硒-甲基硒代半胱氨酸产品中, 多含有少量的 D-硒-

甲基硒代半胱氨酸,而对于D型异构体的安全性尚没有相关的研究。现阶段对L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的检测方法多为高效液相色谱法和液相色谱串联质谱法^[9-11],此类方法可以测定硒甲基硒代半胱氨酸的含量,无法检测其中的L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量。针对这一问题,大多研究利用衍生化反应对手性化合物进行拆分,实验过程较为繁琐;因此近年已有许多研究利用手性固定相将对映体进行直接拆分,刘冬梅应用了高效液相色谱法和手性分离柱Chirex 3126(D)-penicillami对泡菜中L-乳酸和D-乳酸的手性分离与测定^[12],李文娟主要用配基交换型流动相法、冠醚手性固定相法和多糖类手性固定相法对苯丙氨酸衍生物对映体进行分离研究^[13]。刘建群应用手性柱高效液相色谱初步研究了硒代半胱氨酸异构体的拆分方法^[14]。

本文应用手性色谱法进行D-和L-硒-甲基硒代半胱氨酸的分离,并研究了测定其含量的方法。选用NUCLEOSIL Chiral-1配位交换手性柱,将被测手性样品与色谱柱官能团中的金属阳离子(Cu^{2+})产生三重混合配位交换,产生的不对称中心导致了对样品的手性色谱拆分,样品中有两个合适空间位置的极性基团,能够与铜离子产生整合作用,因此该色谱柱可有效的分离氨基酸的对映异构体,希望为L-硒-甲基硒代半胱氨酸的测定提供操作简单又能准确测定含量的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品来自Sigma公司,L-硒-甲基硒代半胱氨酸样品和D,L-硒-甲基硒代半胱氨酸样品来自江西川奇药业有限公司,五水硫酸铜(分析纯),新制去离子水。

高效液相色谱仪为Agilent 1100(美国Agilent公司),手性色谱柱为EC250/4 NUCLEOSIL Chiral-1 (4mm×250 mm, 5 μm, Macherey-Nagel公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

Macherey-Nagel(EC250/4 NUCLEOSIL Chiral-1)色谱柱,流动相为0.4 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,柱温为35 °C,流速为1.0 mL/min,进样量为20 μL,应用VWD和DAD检测器,检测波长为240 nm。

1.2.2 结果计算

根据标准溶液色谱峰面积和试样溶液色谱峰面积计算L-硒-甲基硒代半胱氨酸的质量分数W,数值以%表示,按下式计算:

$$w = \frac{m_s \times A_1}{m_1 \times A_s} \times 100\%$$

式中: m_s -标准溶液中L-硒-甲基硒代半胱氨酸的质量,单位为毫克(mg); m_1 -试样溶液中试样的质量,单位为毫克(mg); A_1 -试样溶液色谱图中L-硒-甲基硒代半胱氨酸的峰面积值; A_s -标准溶液色谱图中L-硒-甲基硒代半胱氨酸的峰面积值。

1.2.3 标准曲线的绘制

精密称取L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品0.06760 g,置于50 mL容量瓶中,用流动相定容至刻度,超声溶解。精密量取上述溶液0.2、0.4、0.8、1.5、3.0 mL至5 mL容量瓶中,用流动相溶解至刻度,超声溶解。用0.45 μm微孔滤膜过滤,分别进样20 μL,记录色谱图。以L-硒-甲基硒代半胱氨酸的峰面积为纵坐标Y,进样量(μg)为横坐标X,得标准曲线。

1.2.4 专属性检测

精密称取DL-硒-甲基硒代半胱氨酸消旋品0.03400 g于25 mL容量瓶中,用流动相定容,超声溶解,得到D,L-硒-甲基硒代半胱氨酸消旋品,进样并记录色谱图,确定分离度。

1.2.5 定量限与检测限

取浓度为0.66 mg/mL的标准品溶液,用流动相成比例稀释后进样。以信噪比 $S/N \geq 10$ 时,测得为此色谱条件下的定量限浓度;信噪比 $S/N \geq 3$ 时测得为检测线浓度。

1.2.6 精密度检测

取线性关系下0.6 mg/mL的标准品溶液,重复进样6次,以L-硒-甲基硒代半胱氨酸百分含量计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.7 稳定性检测

取线性关系下0.6 mg/mL的标准品溶液,分别测量在0、2、4、8、12和24 h时样品中L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量,以样品L-硒-甲基硒代半胱氨酸百分含量计算相对标准偏差(RSD)。

1.2.8 回收率检测

配制样品回收率溶液,分别加入高、中、低量的L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品。标准品加入量(1)低剂量为6 μg;(2)中剂量为8 μg;(3)高剂量为10 μg,每个浓度测定三次,由峰面积根据线性方程计算出测得量,从而得出回收率。

1.2.9 统计分析

结果以平均值±标准差表示。使用SAS 8.2统计分析软件方法进行数据分析。

2 实验结果

2.1 色谱条件的优化结果

初始色谱条件选用流动相 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.20、0.40、0.80 mmol/L, 进样量为 8、12、20 μg , 柱温为 25、35、45 $^\circ\text{C}$ 进行优化实验。通过紫外全波长扫描得到 L-硒-甲基硒代半胱氨酸在 240 nm 处有最大吸收波长。实验最终选用色谱条件为流动相为 0.4 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 检测波长为 240 nm, 进样量为 20 μg , 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 测定效果最好(结果略)。

2.2 标准曲线的绘制

按照 1.2.3 配制标准曲线检测溶液, 分别进样 20 μL , 记录下色谱图, 以 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的峰面积为纵坐标 Y, 进样量(μg)为横坐标 X, 得标准曲线(图 1), L-硒-甲基硒代半胱氨酸峰面积的线性回归方程为 $Y=728.48X-68.62$, $R=0.9999$, 线性范围为 0.541~1.352 mg/mL。在此范围内, 线性关系良好。

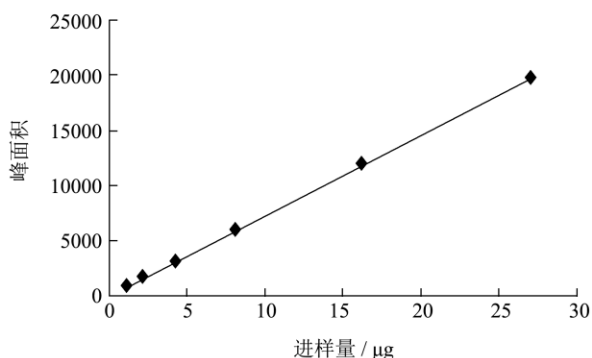


图 1 L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of L-Se-methylselenocysteine

2.3 专属性检测

取 D,L-硒-甲基硒代半胱氨酸样品溶液进样并记录色谱图, 确定分离度。由图 2(A)得, L-硒-甲基硒代

半胱氨酸保留时间为 9.592 min, 因此图 2(B)所示, D-硒-甲基硒代半胱氨酸保留时间为 12.467 min。D, L-硒-甲基硒代半胱氨酸峰分离度为 4.87(不小于 1.5), 表明 D-硒-甲基硒代半胱氨酸和 L-硒-甲基硒代半胱氨酸分离效果良好。

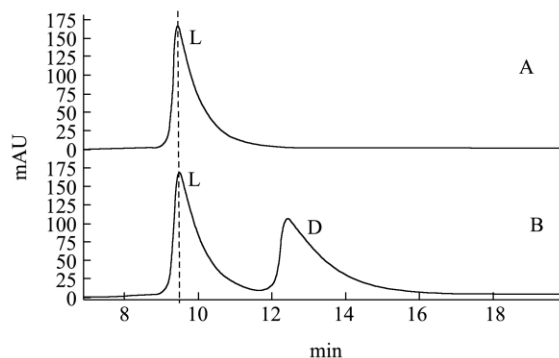


图 2 L-硒-甲基硒代半胱氨酸专属性检测图谱

Fig.2 Chromatograms to determine the specificity for L-Se-methylselenocysteine

注: A: L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品色谱图; B: D,L-硒-甲基硒代半胱氨酸样品拆分数谱图。

2.4 定量限与检测线

L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品配制成低浓度的溶液进样, 以信噪比 $S/N \geq 3$ 为检测限, 信噪比 $S/N \geq 10$ 为定量限, 测得 L-硒-甲基硒代半胱氨酸的检测限和定量限分别为 0.0528 μg 和 0.132 μg 。

2.5 精密度检测

按照 1.2.6 配制三组精密度检测溶液, 每组进样 6 次, 以 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量计算, 得到相对标准偏差(RSD)为 0.44%。RSD 值低于 5%, 说明精密度良好。

表 1 L-硒-甲基硒代半胱氨酸精密度实验结果

Table 1 Precision test results for L-Se-methylselenocysteine

	1	2	3	平均值	RSD/%
L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量/%	97.11 \pm 0.21	96.31 \pm 0.14	96.9 \pm 0.17	96.77 \pm 0.17	0.44

表 2 L-硒-甲基硒代半胱氨酸稳定性实验结果

Table 2 Stability test results for L-Se-methylselenocysteine

放置时间	0	2	4	8	12	24	平均值	RSD/%
L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量/%	96.7 \pm 0.13	96.57 \pm 0.07	96.24 \pm 0.11	96.74 \pm 0.21	96.99 \pm 0.12	97.17 \pm 0.15	96.78 \pm 0.13	0.35

2.6 稳定性检测

按照 1.2.7 配制三组稳定性检测溶液, 分别测量在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 时样品中 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量, 以样品 L-硒-甲基硒代半胱氨酸

含量计算相对标准偏差(RSD)为 0.35%。RSD 值低于 5%, 说明稳定性良好。

2.7 回收率检测

配制样品回收率溶液, 分别加入高、中、低量的

L-硒-甲基硒代半胱氨酸标准品,由峰面积根据线性方程计算出测得量,从而得出回收率。回收率测定结果

见表 2。平均回收率为 97.73%,在 80.0%~120.0%,表明其回收率高。

表 3 L-硒-甲基硒代半胱氨酸回收率实验结果

Table 3 Recovery test results for L-Se-methylselenocysteine

	原样品量/ μg	加入量/ μg	测定值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
检测溶液(1)	8.00	6	13.79 \pm 0.05	96.50 \pm 0.35		
检测溶液(2)	8.00	8	15.92 \pm 0.11	99.00 \pm 1.76	97.73 \pm 1.24	1.25
检测溶液(3)	8.00	10	17.77 \pm 0.09	97.70 \pm 1.62		

2.8 样品 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量测定

应用上述测定方法,检测三个批次样品中L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量。分别称取适量的三个批次样品,超声溶解,通过色谱检测和计算得出,三个批次样品中L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量分别为97.23%、96.78%、97.18%,其中没有检测到D-硒-甲基硒代半胱氨酸存在。

3 结论

手性色谱法可以检测手性物质不同手性异构体的含量,本文应用此方法测定 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量。检测条件为 EC250/4 NUCLEOSIL Chiral-1 手性色谱柱,应用 VWD 和 DAD 检测器,通过紫外全波长扫描得到 L-硒-甲基硒代半胱氨酸在 240 nm 处有最大吸收波长,所以检测波长为 240 nm,流动相为 0.4 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,柱温为 35 $^\circ\text{C}$,流速为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL 。方法学验证结果表明,L-硒-甲基硒代半胱氨酸的线性范围为 0.541~1.352 mg/mL,相关系数打到 0.9999,精密度实验中 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量 RSD 为 0.44%,D, L-硒-甲基硒代半胱氨酸峰分离度为 4.87,检测限和定量限分别为 0.0528 μg 和 0.132 μg ; L-硒-甲基硒代半胱氨酸溶液放置 48 h 内测定,L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量 RSD 仅为 0.35%,平均回收率为 97.73%。实验结果表明手性色谱法测定 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的方法具有分离度高,检测限与定量限低,精密度高,稳定性好,回收率高的优点,可以广泛应用于食品与保健品中 L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量测定和产品品质管理中。

参考文献

[1] 左钱飞,沈香琴,万仁玲.微量元素硒与人体健康[J].科学之友,2010,3: 96-97
ZUO Qian-fei, SHEN Xiang-qin, WAN Ren-ling. Selenium and Human Health [J] Friend of Science Amateurs, 2010, 3: 96-97

[2] 吴茂江.硒与人体健康[J].微量元素与健康研究,2007,24(1): 63-64
WU Mao-jiang. Element Selenium and Human Health [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2007, 24(1): 63-64

[3] 史丽英.人体必需微量元素-硒[J].微量元素与健康研究,2004,22(4): 61-63
SHI Ling-ying. Essential Trace Element Selenium for Human [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2004, 22(4): 61-63

[4] Susana Cuello, Sonia Ramos, Raquel Mateos, et al. Selenium methylselenocysteine protects human hepatoma HepG2 cells against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(7-8): 2167-2178

[5] 墨淑敏,梁立娜,蔡亚岐,等.生物和环境样品中硒元素的形态分析研究[J].分析测试学报,2007,26(3):438-444
MO Shu-min, LIANG Li-na, CAI Ya-qi, et al. Speciation Analysis of Selenium in Biological and Environmental Samples [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2007, 26(3): 438-444

[6] Ho-Sang Shin, Woo-Jung Yang, Eun-Mi Choi. Se-methylselenocysteine modulates antioxidant response of rat spleen to ionizing radiation [J]. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2013, 5: 145-154

[7] 刘琼,姜亮,田静,等.硒蛋白的分子生物学及与疾病的关系[J].化学进展,2009,21(5): 819-829
LIU Qiong, JIANG Liang, TIAN Jing, et al. The Molecular Biology of Selenoproteins and Their Effects on Diseases [J]. Progress in Chemistry, 2009,21(5): 819-829

[8] 姚昭,张小平,邓泽元,等.L-硒甲基硒代半胱氨酸的化学合成方法代谢途径及其生物活性的研究进展[J].农产品加工学刊,2012,11:122-125
YAO Zhao, ZHANG Xiao-ping, DENG Ze-yuan, et al. Advances in the Chemical Synthesis Methods, Metabolic Pathways and Main Bioactivities of L-Se-methylselenocysteine [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012, 11: 122-125

[9] 刘建群,刘芳,张锐,等.高效液相色谱法测定硒-甲基硒代半

- 胱氨酸[J].萍乡高等专科学校学报,2009,26(3):59-62
- LIU Jiang-qun, LIU Fang, ZHANG Rui, et al. Determination of Se-methylselenocysteine by HPLC [J]. Journal of Pingxiang College, 2009, 26(3): 59-62
- [10] 张明,杜业刚,林少彬,等.液相色谱串联质谱法定量检测青花菜中 L-硒甲基硒代半胱氨酸[J].分析化学研究简报, 2007,35(2): 244-246
- ZHANG Ming, DU Ye-gang, LIN Shao-bin, et al. Quantitation of Methylselenocysteine in Broccoli Powder with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(2): 244-246
- [11] 刘建群,赵元,舒积成,等.HPLC-MS/MS 法测定奶粉中的 L-硒-甲基硒代半胱氨酸[J].分析实验室,2011,30(10):42-45
- LIU Jian-qun, ZHAO Yuan, SHU Ji-cheng, et al. Determination of L-Se-methylselenocysteine in milk powder by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2011, 30(10): 42-45
- [12] 刘冬梅,吴晖,余以刚,等.高效液相色谱法对泡菜中 L-乳酸和 D-乳酸的手性分离和测定[J].现代食品科技, 2007, 389(7-8): 2167-2178
- LIU Dong-mei, WU Hui, YU Yi-gang, et al. Chiral Separation and Determination of L-and D-lactic Acid in Pickles by High-performance Liquid Chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 389(7-8): 2167-2178
- [13] 李文娟.苯丙氨酸衍生物的手性拆分[D].杭州:浙江理工大学,2013
- LI Wen-qun. Chiral Separation of Phenylalanine Derivatives [D]. Hangzhou Zhejiang Institute of Technology, 2013
- [14] 刘建群,王亚莉,张小平.手性柱高效液相色谱拆分测定营养强化剂硒-甲基硒代半胱氨酸对映体[J].中国食品添加剂, 2014,2:229-233
- LIU Jian-qun, WANG Ya-li, ZHANG Xiao-ping. Chiral ligand-exchange HPLC analysis of nutrient supplement Se-methylselenocysteine [J]. China Food Additives, 2014, 2: 229-233