

# 反相高效液相色谱法测定富硒脱水菜心中的硒代氨基酸

潘红阳<sup>1</sup>, 王树英<sup>1</sup>, 莫海珍<sup>2</sup>

1(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122) 2(江南大学 食品学院, 江苏 无锡, 214122)

**摘 要** 建立了柱前衍生反相高效液相色谱-紫外检测富硒脱水菜心中硒代胱氨酸(SeCys)、硒甲基半胱氨酸(SeMeCys)和硒代蛋氨酸(SeMet)的方法, 优化了样品预处理方法, 并评价其定量分析的线性、准确性、重复性和检出限, 结果显示: 以 0.1 mol/L HCl 为提取溶剂, 超声处理 8h, 提取效果最佳; 3 种硒代氨基酸的平均加标回收率为 95.7%~112.9%; 在各硒代氨基酸的线性范围内, 线性关系良好( $R>0.999$ ); 保留时间和峰面积重复性的相对标准偏差(RSD)均分别低于 2.0%和 5.0%; 酸性条件下的检出限为 0.004~0.009 mg/L。

**关键词** 富硒脱水菜心, 反相高效液相色谱, 硒代氨基酸

硒是人类、动物和某些微生物必需的微量元素, 是人类和动物谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)的重要组成成分, 该酶能将脂质氢过氧化物还原成无害的醇类或水, 从而保护细胞和细胞膜免遭氧化损害的作用, 因此, 适量摄入硒, 有助于增强机体免疫力<sup>[1,2]</sup>。硒在生物体内主要以有机硒化合物的形式存在, 而硒代氨基酸则是人们日常膳食中获取硒的最主要的来源<sup>[1]</sup>。硒代氨基酸常见的有硒代胱氨酸(SeCys)、硒甲基半胱氨酸(SeMeCys)和硒代蛋氨酸(SeMet)。

富硒蔬菜是农产品领域的热点研究话题, 相应的对其所含功能性成分硒代氨基酸的定性、定量检测也日益受人们关注<sup>[3]</sup>。目前, 常见的硒代氨基酸的检测方法主要有毛细管电泳法(CE)和色谱法, 其中以高效液相色谱(HPLC)法最为常见, 但针对不同样品不同研究者所采用的预处理方法、使用的衍生试剂、流动相和色谱条件等有很大差异<sup>[4~8]</sup>。本文采用邻苯二甲醛(OPA)柱前自动衍生、梯度洗脱及紫外检测建立了富硒脱水菜心中硒代胱氨酸、硒甲基半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定方法, 并对其精确度、回收率等进行了评价。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统, 包括在线脱气装置(G1322A)、四元泵(G1311A)、自动进样器(G1313A)和 VWD 检测器(G1314A); 涡流混合器; 0.45  $\mu$ m 针头微孔滤膜过滤器。甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购于美

国 TEDIA 公司, 四氢呋喃、三乙胺、盐酸、结晶乙酸钠、三氯乙酸均为分析纯, 水为超纯水。

硒代胱氨酸(selenocystine, SeCys), 硒甲基半胱氨酸(selenomethylcysteine, SeMeCys), 硒代蛋氨酸(selenomethionine, SeMet)标准品及邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)均购于 Sigma 公司。

### 1.2 标准溶液及流动相的配置

标准品储备液: 以 0.1 mol/L HCl 溶液配制硒代氨基酸标准品浓度为 100 mg/L (以硒代氨基酸单体计), 并于 4℃ 冰箱中储存。分别取以上标样液, 用 0.1 mol/L HCl 配制终浓度分别为 0.01、0.05、0.25、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0 mg/L 标准品工作液, 于 4℃ 冰箱中储存。

衍生试剂: 精确称取 100 mg OPA 于 10 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 乙腈、130  $\mu$ L 2-巯基乙醇, 再用浓度为 0.4 mol/L 硼酸缓冲溶液(pH=10.2)定容并混匀, 于冰箱中冷冻保存。

流动相 A(pH=7.2): 27.6 mmol/L 醋酸钠-三乙胺-四氢呋喃(体积比为 500:0.11:2.5)。

流动相 B(pH=7.2): 80.9 mmol/L 醋酸钠-甲醇-乙腈(体积比为 1:2:2)

### 1.3 色谱条件

HP Hypersil ODS 柱(125 mm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu$ m), 采用梯度洗脱, 洗脱程序为: 0 min, 8% B; 17 min, 50% B; 20.1 min, 100% B; 24.0 min, 0% B。流动相流速为 1.0 mL/min。

### 1.4 富硒脱水菜心来源

干燥脱水的富硒菜心(含水量 $\leq 8\%$ )由江南大学食品学院提供。菜心在菜薹形成期间以亚硒酸钠溶液进行喷施, 以达到富硒的效果。采摘后的菜心采用如下工

第一作者: 硕士, 工程师。

收稿日期: 2008-04-27, 改回日期: 2008-09-12

艺制成品:原料调理→切断→清洗→选别→烫漂→冷却→离心脱水→加调料→静置→烘干→成品<sup>[3]</sup>。

1.5 富硒脱水菜心中硒代氨基酸的提取

水(或酸法)提取:取样品 1.0 g,加入 10 mL 超纯水(或 0.1 mol/L HCl)混匀,并在 50℃ 水浴下分别震荡 2、4、8、16h。取出混合液,7 000 g 离心 15min,移取上清液,并在 0℃ 下储存、备用<sup>[9]</sup>。

超声波法提取:取样品 1.0 g,加入 10 mL 不同溶剂(超纯水或 0.1 mol/L HCl)溶解样品,混匀并在 50℃ 水浴下以超声波分别处理 2、4、8、16 h。取出混合液,于 7 000 g 离心 15 min,移取上清液,并在 0℃ 下储存、备用<sup>[10]</sup>。

将水提取液(或酸提取液)用 0.45 μm 醋酸纤维薄膜过滤,滤液用 RP-HPLC 分析。以保留时间及相对保留时间的比较定性,峰高增量法确认,标准曲线法定量。利用常规氨基酸的分析方法对 3 种硒代氨基酸进行分析,且各项参数不变,分析的各项性能参数仅针对 3 种硒代氨基酸进行。

2 结果与讨论

经紫外扫描,确定检测波长为 338nm。在考察

柱前衍生反相高效液相色谱法测定富硒脱水菜心中硒代氨基酸含量可靠性时,首先优化了硒代氨基酸的提取方法,并通过研究峰面积与其相应浓度的线性、RP-HPLC 仪器的重复性、前处理过程的重复性、分析的回收率及游离氨基酸对硒代氨基酸测定的干扰情况来考察方法的可靠性。

2.1 样品处理方法的选择

选择常用的提取溶剂(50℃ 下的纯水或 0.1 mol/L HCl)提取硒代氨基酸,比较 2 种提取溶剂的有效性,同时考察不同时间下的提取效果。通过分析比较,发现 0.1 mol/L HCl 的提取效果要优于纯水,而且超声波处理能提高提取效率,因此,最终采用 HCl 提取并超声波处理提取样品中的硒代氨基酸。比较 3 种硒代氨基酸,超声波处理对 SeMet 提取效率的提高最明显,在提取时间为 4、8、16 h 时,SeMet 的含量分别提高了 22%、21%、22%。通常提取时间越长,硒代氨基酸的测定值越高(SeCys 在水提及酸提下除外),但是,相比于 8 h 的提取,16 h 提取后的硒代氨基酸的含量并没有明显的提高,因此,最终采用的提取时间为 8 h。

表 1 不同提取条件下 SeCys、SeMeCys 及 SeMet 的测定值

提取时间/h	提取方法	SeCys 含量/mg · L <sup>-1</sup>	SeMeCys 含量/mg · L <sup>-1</sup>	SeMet 含量/mg · L <sup>-1</sup>
2	水 提	1.30 ± 0.05	2.18 ± 0.14	5.49 ± 0.78
	酸 提	3.10 ± 0.13	2.96 ± 0.10	8.07 ± 0.33
	水提并超声处理	1.33 ± 0.06	2.27 ± 0.11	5.21 ± 0.50
	酸提并超声处理	3.07 ± 0.08	3.12 ± 0.08	8.41 ± 0.46
4	水 提	1.56 ± 0.09	2.33 ± 0.32	7.67 ± 0.44
	酸 提	3.33 ± 0.28	3.20 ± 0.17	10.98 ± 0.30
	水提并超声处理	1.68 ± 0.12	2.82 ± 0.16	7.33 ± 0.31
	酸提并超声处理	3.28 ± 0.05	3.40 ± 0.21	13.42 ± 0.58
8	水 提	1.55 ± 0.08	2.29 ± 0.30	9.65 ± 0.27
	酸 提	3.60 ± 0.14	3.50 ± 0.20	11.51 ± 0.93
	水提并超声处理	1.73 ± 0.24	2.86 ± 0.19	8.99 ± 0.33
	酸提并超声处理	3.61 ± 0.15	3.27 ± 0.44	13.98 ± 0.98
16	水 提	1.57 ± 0.09	2.36 ± 0.22	9.76 ± 0.25
	酸 提	3.38 ± 0.08	3.36 ± 0.22	11.80 ± 0.15
	水提并超声处理	1.76 ± 0.10	3.01 ± 0.18	9.69 ± 0.13
	酸提并超声处理	3.50 ± 0.20	3.58 ± 0.09	14.34 ± 0.69

2.2 标准曲线和线性

表 2 HPLC 法检测硒代氨基酸的回归方程、相关系数及检出限

组分	保留时间 /min	RSD (n=3)/%	线性范围 /mg · L <sup>-1</sup>	回归方程	R	检测限/mg · L <sup>-1</sup>	
						0.02 mol/L HCl	纯水
SeCys	8.58 ± 0.01	0.12	0.01~10	Y = 0.515 9X + 1.782 5	0.999 1	0.009	0.01
SeMeCys	14.74 ± 0.07	0.47	0.1~100	Y = 0.467 X + 1.403 1	0.999 9	0.005	0.15
SeMet	18.09 ± 0.04	0.22	0.01~10	Y = 0.454 5X + 1.517 4	0.999 7	0.004	0.01

用 0.1 mol/LHCl 配制 0.01~100 mg/L 的 Se-Cys、SeMeCys、SeMet 混合标准溶液,分别进行检测,色谱分析结果如图 1 所示。重复 3 次,考察峰面积和浓度的线性关系,结果见表 2。从图 1 可以看出,3 种硒代氨基酸能够在 20 min 以前全部洗脱出来,并且分离度良好。对不同的硒代氨基酸,其线性范围有所不同,SeCys 和 SeMet 的线性范围都为 0.01~10 mg/L,而 SeMeCys 的线性范围为 0.1~100 mg/L,3 种硒代氨基酸在其线性范围内峰面积与其浓度呈现良好的线性关系( $R>0.999$ )。

以信噪比(S/N)为 3 作为判断标准,得出如表 2 所示的酸性和纯水条件下各硒代氨基酸的检测限。可以看出,检测限与组分本身的特性及溶剂有关,酸性条件的检测限更低,从而更有利于检测,尤其在含量很低时更是如此,其中 SeMeCys、SeMet 在酸性条件下的检测限仅为纯水条件下的 1/30 和 1/25。3 种硒代氨基酸在酸性和纯水条件下的灵敏度存在明显的差异,产生的原因主要有两方面:OPA 对各硒代氨基酸衍生的选择性具有差异性;各硒代氨基酸与 OPA 形成的衍生物的最大吸收波长存在不同。通过

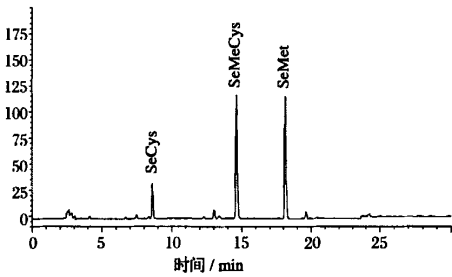


图 1 硒代氨基酸混合标样的色谱图

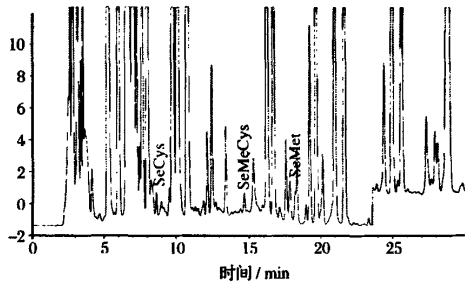


图 2 富硒脱水菜心中硒代氨基酸的色谱图

保留时间定性得出的富硒脱水菜心中硒代氨基酸的色谱图如图 2 所示。

2.3 重复性试验

对 HPLC 仪器和样品前处理过程重复性分别进行测定。在仪器的重复性试验中,以 50mg/L 混合标样试验 10 次,保持每次试验条件一致,得出此浓度下各种硒代氨基酸峰面积的平均值、标准偏差(SD)及相对标准偏差(RSD),结果如表 3 所示。各硒代氨基酸 RSD 均 $>5\%$ ,表明仪器具有良好的重现性,这是由于在自动衍生化程序条件下,各硒代氨基酸可与衍生试剂快速反应并检测,有效降低了由于硒代氨基酸衍生化后稳定性差带来的检测结果上的误差。

在前处理重复性试验中,对同一样品用 0.1mol/L HCl、超声波提取及 1.5 的处理方法分别处理 10 次,在同一条件下以 RP-HPLC 检测。计算峰面积平均值、标准偏差(SD)及相对标准偏差(RSD),如表 3 所示。对于痕量分析而言,重复试验的  $RSD\leq 10\%$  即可认为该方法是可以接受的,该分析方法中,各硒代氨基酸的  $RSD\leq 5\%$ ,说明前处理程序重现性良好。

表 3 仪器及分析方法重现性

硒代氨基酸	仪器重现性			前处理过程重现性		
	峰面积/ $\mu V \cdot s$	SD	RSD/%(n=10)	峰面积/ $\mu V \cdot s$	SD	RSD/%(n=10)
SeCys	31.99	1.30	0.04	1.59	0.07	0.04
SeMeCys	22.77	0.67	0.03	3.35	0.33	0.10
SeMet	46.17	0.59	0.01	25.52	1.22	0.05

2.4 回收试验

表 4 3 种硒代氨基酸回收率测定

硒代氨基酸	样品分析					RSD/% (n=9)
	未加标样	加标样 2.5 /mg · L <sup>-1</sup>	加标样 5.0 /mg · L <sup>-1</sup>	加标样 10.0 /mg · L <sup>-1</sup>	平均回收率/% (n=9)	
SeCys	3.61±0.15	5.92±0.26	8.37±0.58	13.57±0.29	95.7	4.49
SeMeCys	3.27±0.44	6.05±0.13	8.31±0.67	13.54±0.61	104.9	4.90
SeMet	13.98±0.98	17.4±0.78	19.10±0.49	23.94±0.44	112.9	2.96

样品通过添加不同浓度(2.5、5.0、10.0 mg/L)3种硒代氨基酸混标进行回收试验,基质及各加标水平样品平行测定3份,以外标法定量,并计算3个加标水平下的平均回收率和相对标准偏差,结果如表4所示。3种硒代氨基酸的平均回收率为95.7%~112.9%,相对标准偏差为2.96%~4.90%。这说明该方法准确度高、重现性好,方法可靠。

## 2.5 干扰试验

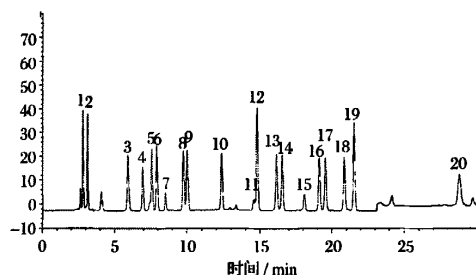


图3 17种常规氨基酸与硒代氨基酸混合标样的色谱图

1. 天冬氨酸 (aspartate, Asp); 2. 谷氨酸 (glutamate, Glu);
3. 丝氨酸 (serine, Ser); 4. 组氨酸 (histidine, His); 5. 甘氨酸 (glycine, Gly); 6. 苏氨酸 (threonine, Thr); 7. 硒代胱氨酸 (selenocystine, SeCys); 8. 精氨酸 (arginine, Arg); 9. 丙氨酸 (alanine, Ala); 10. 酪氨酸 (tyrosine, Tyr); 11. 硒甲基半胱氨酸 (selenomethylcysteine, SeMeCys); 12. 半胱氨酸 (cysteine, Cys); 13. 缬氨酸 (valine, Val); 14. 蛋氨酸 (methionine, Met); 15. 硒代蛋氨酸 (selenomethionine, SeMet); 16. 苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe); 17. 异亮氨酸 (isoleucine, Ile); 18. 亮氨酸 (leucine, Leu); 19. 赖氨酸 (lysine, Lys); 20. 脯氨酸 (proline, Pro)

富硒脱水菜心的抽提物中,影响分析最主要的干扰物质是各种游离状态的氨基酸,它们也会与OPA反应形成VWD可以检测到的衍生物。因此,在探讨富硒脱水菜心提取液中游离氨基酸对硒代氨基酸测定的影响时,分别取天门冬氨酸、组氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、精氨酸、酪氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸与3种硒代氨基酸的混合标准溶液进行柱前衍生反相高效液相色谱分析,得出谱图3,由图3可以看出,游离氨基酸对硒代氨基酸(除硒甲基半胱氨酸外)的干扰较小,不影响定量,这进一步说明该法

在检测富硒脱水菜心中硒代氨基酸的优越性。

## 参考文献

- 1 Kim Y Y, Mahan D C. Prolonged feeding of high dietary levels of organic and inorganic selenium to gilts from 25 kg body weight through one parity[J]. J Anim Sci, 2001, 79 (4): 942~948
- 2 徐芳,邱德仁,杨芃原,等. 硒的化学与生物形态分析综述[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(2): 331~340
- 3 Zhang M, Li C, Cao P. Effects of processing conditions of the green-leafy vegetable juice enriched with selenium on its quality stability[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62(4): 393~398
- 4 Cavalli S, Cardellicchio N. Direct determination of seleno-amino acids in biological tissues by anion-exchange separation and electrochemical detection[J]. J Chromatogr A, 1995, 706(1~2): 429~436
- 5 Olivas R, Donard O F X, Gilon N, et al. Speciation of organic selenium compounds by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry in natural samples[J]. J Anal At Spectrom., 1996, 11(12): 1171~1176
- 6 Liang L, Mo S, Cai Y, et al. Direct amino acid analysis method for speciation of selenoamino acids using high-performance anion-exchange chromatography coupled with integrated pulsed amperometric detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1118(1): 134~138
- 7 Grant T D, Montes-Bayon M, LeDuc D, et al. Identification and characterization of Se-methyl selenomethionine in Brassica juncea roots[J]. J Chromatogr A, 2004, 1026(1~2): 159~166
- 8 Chatterjee A, Tao H, Shibata Y, et al. Determination of selenium compounds in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 997(49): 249~257
- 9 Bird S M, Ge H, Uden P C, et al. High-performance liquid chromatography of selenoamino acids and organo selenium compounds: speciation by inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 1997, 789(1~2): 349~359
- 10 高建忠,黄克和,秦顺义. 气相色谱-质谱法测定富硒酵母中的硒蛋氨酸[J]. 色谱, 2006, 42(3): 235~238

(下转第148页)

- acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk[J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2004, 37(2): 247~253
- 6 莫海涛, 杜玉兰, 黎庆涛, 等. 反相高效液相色谱法测定发酵饮料中有机酸和维生素 C 的含量[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(2): 230~232.
- 7 沈国惠, 王荣民. 直接进样——高压液相色谱法测定葡萄酒的有机酸[J]. *食品与发酵工业*, 1984, (6): 14~20
- 8 Usenik V, Fabčić J., Štampar F. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107: 185~192

## Study on Determination of Kinds and Contents of Organic Acids in Cherry Peach Wine by HPLC

Gao Weiwei<sup>1</sup>, Du Jinhua<sup>2</sup>, Yu Ling<sup>1</sup>, Li Lanxiao<sup>2</sup>, Geng Yun<sup>2</sup>, Ma Ming<sup>2</sup>

1(College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)2(

**ABSTRACT** A method for determination of organic acids in cherry (*Cerasus*) wine by reverse phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was developed. The results showed that the optimum operating conditions were: Atlantis dC<sub>18</sub> column (4.6×250 mm, 5 μm) at 30℃, 0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> phosphoric acid buffer solution (pH 2.80) at a flow rate of 0.7 mL/min and UV detection at 210 nm. The recoveries were 96%~105%. The coefficients of correlation were higher than 0.9990 and the RSD was 0.11%~4.48%. The detection limit of organic acids was lower than 8.0×10<sup>-3</sup> mg/mL. Under the optimum conditions, the organic acids that were detected in cherry wine included *L*-malic acid, citric acid, lactic acid, succinic acid, tartaric acid and oxalic acid. It was indicated that the RP-HPLC method used in this paper was simple, rapid and accurate.

**Key words** High Performance Liquid Chromatography, Cherry wine, organic acids.

(上接第 144 页)

## Determination of Seleno-amino Acids in Enriched-selenium Dehydrated Brassica Chinensis by RHPLC

Pan Hongyang<sup>1</sup>, Wang Shuying<sup>1</sup>, Mo Haizhen<sup>2</sup>

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

2(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** A reversed phase high performance liquid chromatography/variable wavelength detector with precolumn derivatization was developed for the simultaneous determination of selenocystine(SeCys), selenomethylcysteine(SeMeCys) and selenomethionine(SeMet). This method was validated for linearity, accuracy, repeatability and limits of detection (LOD). The results showed that average recoveries of seleno-amino acids standards ranged from 95.7% to 112.9%, linearity was good ( $R^2 > 0.999$ ); the relative standard deviations of repeatability for retention time and peak area were less than 2.0% and 5.0%, respectively; LOD was 0.004~0.009 mg/L in acid condition. The method is simple, accurate, and sensitive and reliable for quality control of enriched-selenium dehydrated *Brassica Chinensis*.

**Key words** enriched-selenium dehydrated *Brassica Chinensis*, reversed-phase high performance liquid chromatography, seleno-amino acids