

论著

LC - MS - MS 同时定量检测硒蛋氨酸和硒胱氨酸

杨文婕¹ 张明² 陈竞¹ 李卫东¹ 林少彬²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100021)

摘要:目的 建立同时测定硒蛋氨酸(SeMet)和硒胱氨酸(SeCys)含量的液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)。方法 色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ (150 mm ×3.9 mm, 5 μm);流动相:甲醇+0.1%七氟丁酸水溶液(35+65),流速为500 μl/min;以氮气为碰撞气,利用多反应离子监测方式测定 SeMet (MRM m/z 198.1 181.0, 198.1 152.0)和 SeCys (MRM m/z 337.0 248.0, 337.0 88.2)信号。结果 SeCys 和 SeMet 检出限分别为 2.0 ng/ml 和 0.5 ng/ml;以 198.1 181.0 为定量分析离子对, SeMet 的线性回归方程为: $y = 707x + 990$, $r = 0.9993$;以 337.0 248.0 为定量分析离子对, SeCys 的线性回归方程为: $y = 64.3x + 695$, $r = 0.9999$ 。结论 该方法能够使 2 种含硒化合物在一次进样中实现完全分离和在线测定,能够满足快速准确检测 SeCys 和 SeMet 含量要求。

关键词: 硒化合物; 色谱法; 高压液相; 光谱法; 质量; 电喷雾电离

Determination of Selenocystine and Selenomethionine by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

YANG Wen-jie, ZHANG Ming, CHEN Jing, LI Wei-dong, LIN Shao-bin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish the method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) in order to determine selenocystine (SeCys) and selenomethionine (SeMet). **Method** The chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ (150 mm ×3.9 mm, diameter 5 μm). The mobile phase was methanol + 0.1% heptafluorobutyric acid (35 + 65) at a flow rate of 500 μl/min. SeMet and SeCys were detected by monitoring the ion transition of m/z 198.1 181.0, 198.1 152.0 and 337.0 248.0, 337.0 88.2, with nitrogen as collision gas and using multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The determination limits of SeCys and SeMet were 2.0 and 0.5 ng/ml, respectively. The linear regression equations of SeMet and SeCys were $y = 707x + 990$, $r = 0.9993$ and $y = 64.3x + 695$, $r = 0.9999$, respectively. **Conclusion** SeMet and SeCys could be completely separated and determined for on-line in one injection by this method. The method could meet requirements of fast and accurate determination of SeMet and SeCys.

Key word: Selenium Compounds; Chromatography, High Pressure Liquid; Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization

硒是人体必需微量营养元素,由于毒性剂量低,膳食硒的安全性备受关注。近年研究表明,硒的安全性与摄入硒的化学形态密切相关^[1],而生物硒具有多态性^[2],因此,膳食总硒测定结果已经不能满足硒安全性评价要求。可食生物中含硒化合物的结构鉴定和定量检测成为硒研究领域的热点问题之一^[3]。硒蛋氨酸(SeMet)和硒胱氨酸(SeCys)是可食生物材料中两种代表性含硒化合物,本研究建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)测定 SeMet 和 SeCys 含量的方法,为定量检测膳食材料中主要含硒化合物提供准确快速的检测技术。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 硒胱氨酸(SeCys)和硒蛋氨酸(SeMet)购自 Sigma 公司;丙酮、甲醇、乙腈和乙酸乙酯均为色谱纯,购自 Fisher 公司;七氟丁酸(含量 > 99%)购自美国 Lancaster 公司。

1.1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦公司);API 4000 三级四极串联质谱仪(美国应用生物系统公司),配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst software 工作站,Harvard 流动注射泵。

1.2 方法

1.2.1 储备液的配制 准确称取 21.00 mg 的 SeCys 和 16.25 mg SeMet 标准品于 25 ml 容量瓶中,用纯水溶解、定容至刻度,得浓度分别为 SeCys 0.84 mg/ml 和 SeMet 0.65 mg/ml 的标准储备液,保存于 4 °C 冰箱

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30471454, 30170800)

作者简介:杨文婕 女 研究员

里。

1.2.2 单个标准溶液的配制及测定 储备液用纯水稀释至 100 μg/ml 作为中间应用液,中间液用纯水稀释至 1 μg/ml,用于质谱条件和色谱条件选择实验。

将中间应用液用纯水准确稀释成 0、5、25、50、100、500、1 000 ng/ml 浓度系列,分别测定各标准溶液的色谱峰,以峰面积对相应的浓度作图,得到校正曲线,并求出回归方程。

1.2.3 混合标准溶液的配制 根据单个标准溶液的线性回归方程,以各斜率的反比作为混合标准溶液中单个化合物的浓度比。按照比例分别取两种含

硒化合物中间应用液加入到 10 ml 容量瓶中,用纯水稀释配制浓度为 SeCys 50 μg/ml 和 SeMet 10 μg/ml 的混合标准应用液,摇匀,将混标溶液于 0~4 保存。

2 结果

2.1 母离子的选择 用纯水将 SeMet 和 SeCys 储备液分别稀释成 1 μg/ml 的溶液,用流动注射泵直接进样分析,进行母离子扫描,通过分析化合物的结构特征,选择阳离子扫描,选择 $[M+H]^+$ m/z 198.1 为 SeMet 的母离子,选择 $[M+H]^+$ m/z 337.0 为 SeCys 母离子。得到各目标化合物的母离子质谱图,见图 1。

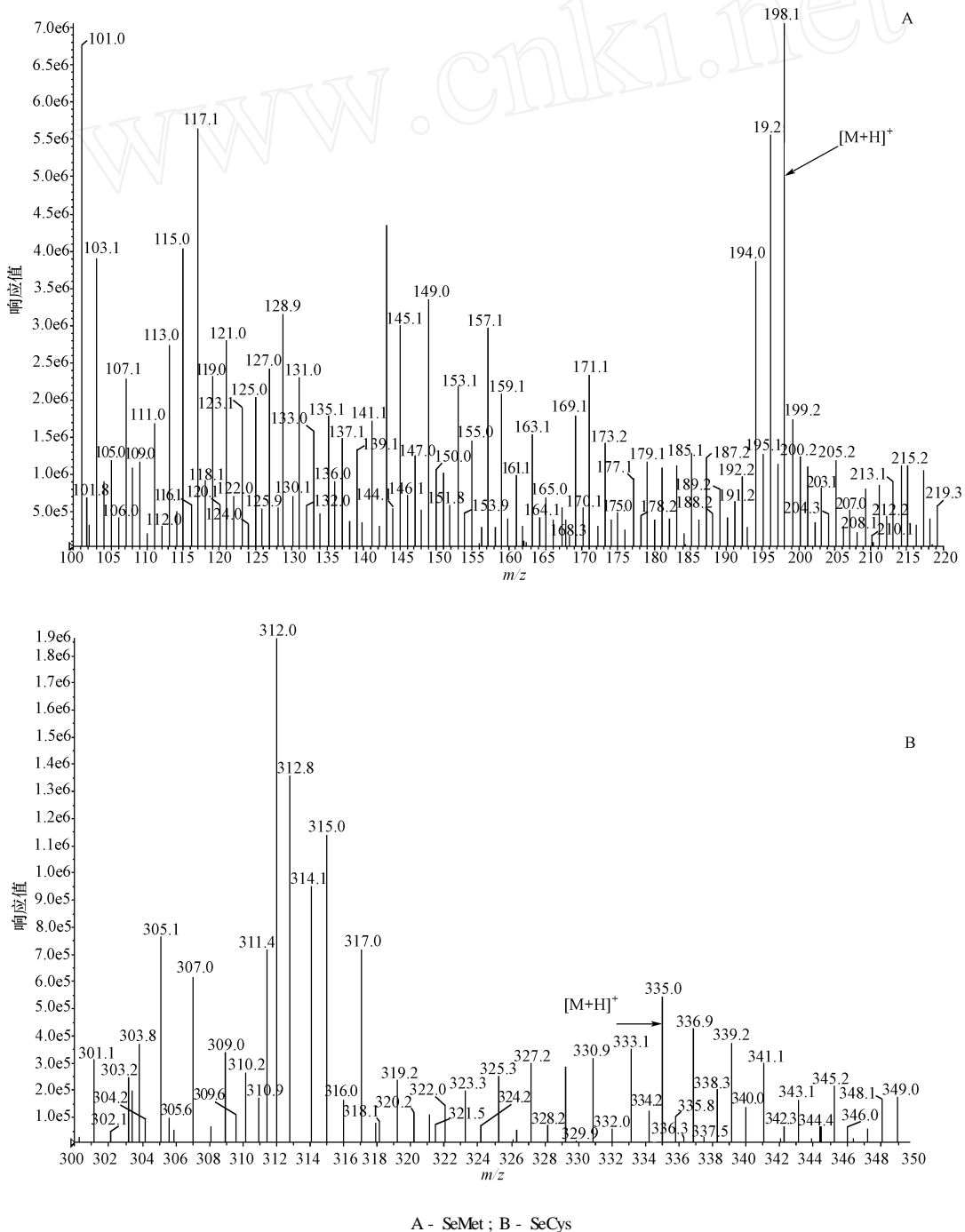


图 1 SeMet 和 SeCys 的母离子扫描图

2.2 子离子的选择 对 2 种目标化合物的母离子进行子离子扫描,得出子离子质谱图,见图 2。

根据质谱图选择离子对,MRM m/z 198.1 181.0,198.1 152.0 (SeMet) 和 MRM m/z 337.0 248.0,337.0 88.2 (SeCys)。对仪器参数进行优化,优化后结果为:电离电压 5 500 V;雾化气:高纯氮气,离子源温度(TEM):450 ;碰撞活化(CAD)参数为 6,气帘气(CUR)参数为 20 psig,雾化气(GS1)参数为 35 psig,辅助气(GS2)参数为 40 psig。

2.3 色谱柱的选择 分别用 5 种不同型号的色谱柱,取适量混合标准溶液进样分析,结果表明,应用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB - C₈ (150 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Supelco Discovery C₁₈ (150 mm ×2.1 mm, 5 μm) 和 Thermo HYPERCARB (100 mm ×2.1 mm, 5 μm) 色谱柱分离,LC-MS-MS 色谱图有 SeCys 和 SeMet 保留时间不固定、峰型不好、响应高度不一致等现象。应用 Waters Symmetry C₁₈ (150 mm ×3.9 mm, 5 μm) 和

Waters Symmetry Shield RP₁₈ (150 mm ×3.9 mm, 5 μm) 色谱柱分析,SeCys 和 SeMet 峰型好、保留时间稳定、响应一致和重现性好,结合柱成本因素考虑,优选 Waters Symmetry C₁₈ (150 mm ×3.9 mm, 5 μm) 色谱柱。
2.4 流动相的选择 由于 SeMet 和 SeCys 均溶于水、乙腈和甲醇。因此试选择水和乙腈、水和甲醇作为流动相。乙腈 + 水各种比例进样时峰形较差,拖尾很严重。仅仅使用甲醇和水作为流动相的配比,峰形也不理想。

应用不同比例的甲醇和 0.1% 七氟丁酸水溶液作为流动相分析进样,35% 的甲醇和 65% 的 0.1% 七氟丁酸水溶液作为流动相时,峰形较好,保留时间稳定,同时响应较高,确定选择甲醇 + 0.1% 七氟丁酸水溶液 (35% + 65%, 体积分数) 作为流动相。

检测限的测定 按信噪比 $S/N = 10$ 为定量检出限 (LOQ) 的判断标准,SeCys 和 SeMet 检出限分别为 2.0 ng/ml 和 0.5 ng/ml,见图 3。

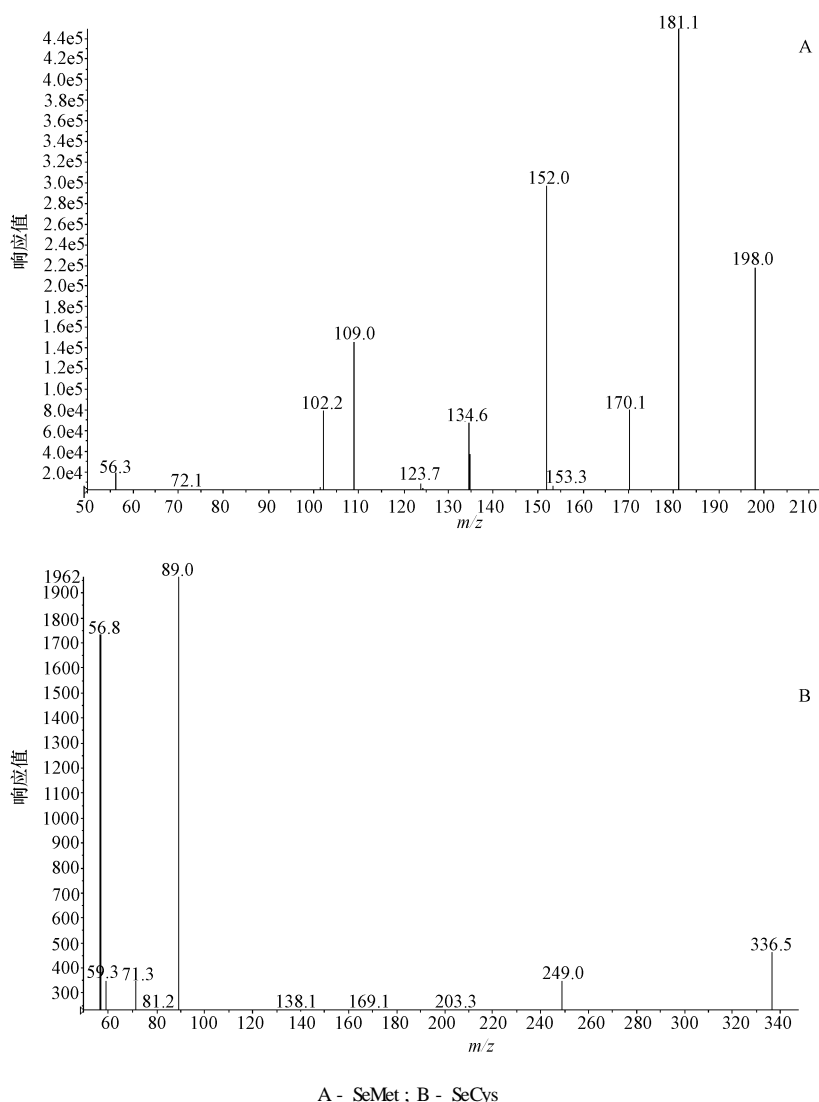


图 2 SeMet 和 SeCys 的子离子 (product ion) 扫描图

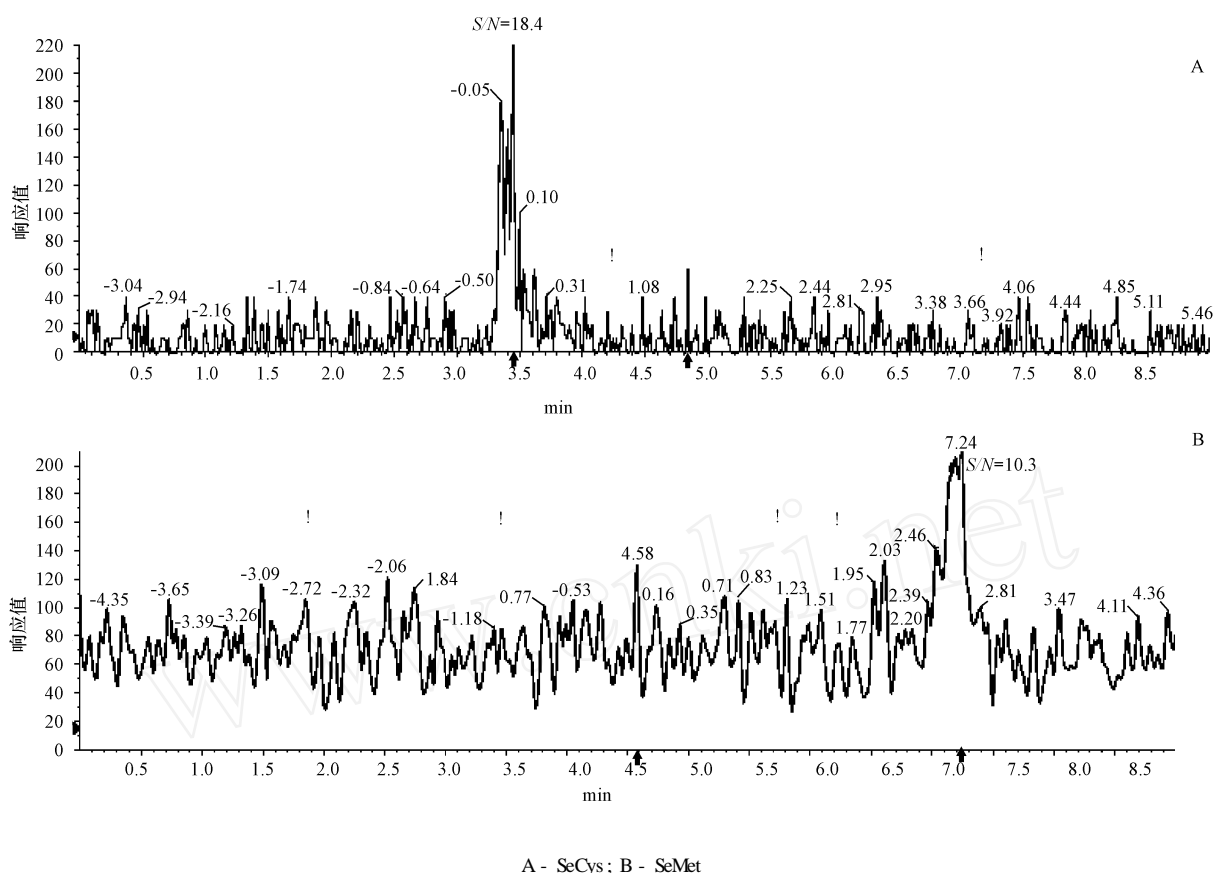


图3 SeCys和SeMet定量检出限测定

2.6 线性关系 把混合标准溶液用纯水逐渐稀释,分别测定标准溶液的色谱峰,以试样的浓度(x , ng/ml)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标(外标法),根据离子对响应强度,分别选择 SeMet 198.1 181.0、SeCys 337.0 248.0 作为定量分析的离子对,获得校正曲线回归方程($n=7$): SeMet: $y=707x+990$, $r=0.9993$; SeCys: $y=64.3x+695$, $r=0.9999$ 。

3 讨论

国内对生物样品中硒的分析大都局限于总硒和有机硒总量测定^[4],很少对其中有机硒化合物的化学形态进行精确鉴定和定量。国际上通常应用高压液相-电感耦合等离子质谱(HPLC-ICP-MS)方法分析生物材料中的硒形态,该方法具有高灵敏度和元素专一选择性检出等优点,缺点是不能提供化合物的结构信息^[5]。

本实验通过 SeCys 和 SeMet 离子对、色谱条件和质谱条件选择以及检测限和线性关系考察实验,建立了定量检测 SeCys 和 SeMet 的液相色谱-串联质谱分析方法。该方法中 MS-MS 联用可以把化合物的分子量精确到 ± 1 Da,能够给出可靠的硒同位素

丰度光谱图及其分子量信息,进行准确定量分析^[5]。结合 LC 的分离,使 MS-MS 可以分析具有大量杂质的混合物中的待测物,通过离子对的选择,进一步去除干扰,使得分析具有高度专一性和高灵敏度。该方法能够使两种含硒化合物在一次进样中实现完全分离和在线测定,能够达到快速准确检测 SeCys 和 SeMet 含量的目的。

参考文献

- [1] 杨文婕,陈竞,李卫东,等. 4种富硒植物预防 MNG 诱发大鼠胃癌效果研究:二、不同源硒预防大鼠胃癌的安全性对比研究[J]. 卫生研究,2008,37(1):90-92.
- [2] 张明,杜业刚,李卫东,等. LC-MS-MS 快速筛查富硒植物四种有机硒方法应用研究[J]. 科学技术与工程,2006,6(8):1052-1054.
- [3] UDEN P C, BOAKYE H T, KAHAKACHCHI C, et al. Selective detection and identification of Se containing compounds—review and recent developments[J]. J Chromatogr A. 2004, 1050(1):85-93.
- [4] 郝素娥,滕冰. 硒酵母中硒含量测定方法的研究[J]. 理化检验-化学分册,1999,35(4):151-153.
- [5] 陈晓滨,林少彬,杨文婕. 环境和生物体有机含硒化合物形态测定的研究进展[J]. 卫生研究,2005,31(4):252-255.

[收稿日期:2007-09-13]