

形态硒的研究过程中硒代胱氨酸的稳定性

赵秋香^① 冯超 莫书伟 黄小欧^a

(广东省物料实验检测中心 广州市东风东路 751 号 510080)

^a(广州开发区环境监测站 广州开发区友谊路 105 号 510730)

摘要 运用高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱法(HPLC-ICP-MS)研究了硒代胱氨酸(SeCys₂)在目前广泛应用的水浴振荡提取和方便快速的超声提取过程中的稳定性。在水溶性 SeCys₂ 的提取过程中,不管是 37℃ 水浴振荡过程还是超声提取过程对 SeCys₂ 的稳定性影响都不大。在酶溶性 SeCys₂ 的提取过程中,由于 SeCys₂ 分子很容易在 Se-Se 间断裂,而在水浴振荡或超声作用下酶容易发生多肽链断裂或空间构型变化,游离出来的硒代半胱氨酸(SeCys)和酶分子中断裂出来的小分子结合形成新的存在形式,从而导致了 SeCys₂ 在 C18 柱的洗脱时间发生迁移。

关键词 硒胱氨酸; 水提取; 酶解; 稳定性

中图分类号: O657.7⁺2; O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)04-2074-05

1 引言

1817 年瑞典科学家 Berzelius 发现元素硒,20 世纪 70 年代我国学者证实硒能有效防治地方性克山病,人们逐步发现硒与人和动物的几十种疾病相关^[1,2],硒具有抗癌、防衰老、保护人体免疫功能等作用,硒作为微量元素,量虽小,但在人体生理进程中对某些酶活性起重要作用。中国营养学会推荐正常人体每日硒摄入量为 20—200 μg ^[3]。据中国营养学会调查,目前我国居民硒摄入量普遍较低,适量的硒有助于防止肝坏死,并能促使人和动物的生长^[4]。硒在生物体内主要以有机硒化合物的形式存在,主要有两类:一类是含硒氨基酸,另一类是含硒蛋白质。硒代氨基酸最主要的是硒代胱氨酸(SeCys₂)和硒代蛋氨酸(SeMet),对于高等动物来说主要是硒代胱氨酸。

要研究和探讨硒胱氨酸在生物体中的作用机理及其代谢过程,必须把生物体中的硒胱氨酸先游离出来,然后进行分离,测定。目前,有关形态硒的分析研究主要采用水提取和酶解两种方式,将其从有机体中游离出来,然后采用色谱分离与 ICP-MS, AFS 等检测方法的联用来完成的^[5-10]。现在国内外有大量文献报道硒胱氨酸的研究,但尚未见到提取过程中硒胱氨酸的稳定性研究,为此,本文运用高相液相色谱-电感耦合等离子体-质谱(HPLC-ICP-MS)系统研究了硒胱氨酸在水提取过程以及酶解过程中的稳定性。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

NBS 水浴振荡器(美国 New Brunswick Scientific 公司);2695 高效液相色谱(美国 Waters 公

^① 联系人,电话:(020)87771501; E-mail:zhaoqiuxiang@tom.com

作者简介:赵秋香(1976—),女,湖南省衡阳市人,工程师,博士,主要从事环境分析工作。

收稿日期:2011-02-18;接受日期:2011-03-31

司, 2996 PDA/UV 检测器); DRE-e 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); MANOpure Diamond 高纯水器(美国 Barnstead 公司); R-200 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); 120 温控高速离心机(美国 Thermo Electron 公司); 0.2 μ m PVDF 注射器过滤膜(美国 Whatman 公司); 47mm i. d., 0.2 μ m 尼龙过滤膜(美国 Gelman Sciences 公司)。

硒代胱氨酸(纯度大于 99.5%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); Na₂SeO₃(1000mg/L 标准溶液, 美国 Fisher 公司); 酶: 链霉蛋白酶, 来源于链球菌(日本 Sigma 公司); 醋酸铵(色谱纯, > 99.9%, 美国 Fisher 公司); 七氟丁酸(> 99.5%, 美国 Fisher 公司)。实验用水为超纯水。所用试剂均于 4℃ 的冰箱中储存。

2.2 实验方法

2.2.1 样品准备

2.2.1.1 水浴振荡提取

在标号为 1 和 3 的两个聚四氟乙烯提取管中, 分别准确配制 2.0mL 4.0 μ mol/L (Se 浓度) SeCys₂ 溶液, 1 号管基体溶液为水, 3 号管基体溶液为 10mmol/L 的醋酸铵缓冲溶液(pH=6.8), 在 3 号管中加入 0.020g 链霉蛋白酶(Pronase E)。盖上盖子, 放入水浴振荡器中提取 24h, 水浴振荡器的水温设定为 37℃, 振荡频率设定为 180r/min。提取完毕后, 在 4℃ 下以 15000r/min 的速度离心 30min, 沉淀用水洗涤 3 次, 每次用 0.5mL 水, 然后在同样的条件下离心, 将清液和洗液合并。

2.2.1.2 超声提取

在标号为 2 和 4 的两个聚四氟乙烯提取管中, 分别准确配制 2.0mL 4.0 μ mol/L (Se 浓度) SeCys₂ 溶液, 2 号管基体溶液为水, 4 号管基体溶液为 10mmol/L 的醋酸铵缓冲溶液(pH=6.8), 在 4 号管中加入 0.020g 链霉蛋白酶(Pronase E)。盖上盖子, 超声提取 30min(用 37℃ 的流动水控制超声波仪中水的温度以此控制样品的提取温度)。提取完毕后, 提取液在 4℃ 下以 15000r/min 的速度离心 30min, 沉淀用水洗涤 3 次, 每次用 0.5mL 水, 然后在同样的条件下离心, 将清液和洗液合并。

将上述合并液在用旋转蒸发仪浓缩 5 倍, 仪器设定温度为 37℃, 用孔径为 0.2 μ m 的聚偏二氟乙烯(PVDF)注射器滤膜过滤, 所得滤液分别标识为: 样品 S1, S2, S3 和 S4。

2.2.2 稳定性实验设计

本研究采用高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱(HPLC-ICP-MS)系统来实现 SeCys₂ 的分离与测定。准确配制一份 20 μ mol/L (Se 浓度) SeCys₂ 水溶液, 过滤后, 准确移取 20 μ L 该滤液用 HPLC-ICP-MS 系统进行分离、测定, 然后用同样的操作过程对样品 S1, S2, S3 和 S4 进行处理。

3 结果与讨论

3.1 硒胱氨酸储备液的长期稳定性

由于 SeCys₂ 在水中的溶解度不大, 所以 200mg/L 的 SeCys₂ 标准水溶液被准确配制好, 将其放入 4℃ 的冰箱中储存, 然后用这个储备液在不同的时间(1, 30, 60, 90d 和 120d)准确配制一份 20 μ mol/L (Se 浓度) SeCys₂ 水溶液, 过滤后, 用 HPLC-ICP-MS 对它们进行分离测定。

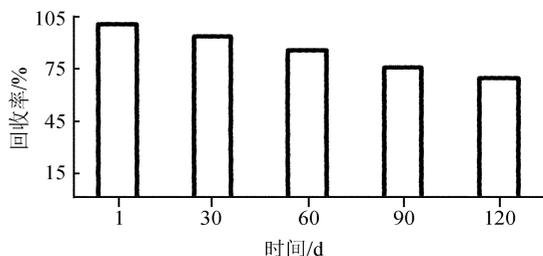


图 1 硒代胱氨酸标准储备溶液的长期稳定性

谱峰积分求得硒的回收率, 将其对溶液放置时间作图, 结果如图 1 所示, 实验结果表明, SeCys_2 在水溶液中不能长期稳定存在, 这可能与 SeCys_2 中存在易断裂的 $\text{Se}-\text{Se}$ 键有关, 但是从结果来看, 200mg/L SeCys_2 储备液在 4°C 的冰箱中放置 30d 后, 95% SeCys_2 依然稳定存在, 所以这个储备液可稳定放置 1 个月。

3.2 水浴提取过程中硒胱氨酸稳定性

标准 SeCys_2 在 240—300s 之间被洗脱出来, 经过水浴提取和超声提取后的 SeCys_2 也是在同样的时间范围出峰, 洗脱时间不变, 而且等浓度的 SeCys_2 经水浴提取和超声提取后, 峰面积基本保持不变。将样品 S1 和 S3 的色谱图中 SeCys_2 的色谱峰峰面积分别对水浴提取时间和超声提取时间作图, 所得结果如图 2 所示。

经水浴提取和超声提取过程后, SeCys_2 的洗脱峰面积并不随着提取时间的不同而有明显的变化, 由此说明, 两种提取过程对 SeCys_2 的存在状态不会产生影响, 所以这两种提取过程用于生物体中水溶性的 SeCys_2 的提取测定研究是可靠的。

3.3 酶解过程中硒胱氨酸的稳定性

由于硒胱氨酸在生物体内主要与蛋白质结合, 以含硒蛋白质形式存在, 要对这样的硒胱氨酸进行分析研究, 首先必须将硒胱氨酸从蛋白质大分子中游离出来, 然后进行分析研究。而酶解是目前被用来完成这一过程的最好的方法, 链霉蛋白酶(Pronase E) 和水浴振荡提取过程被研究者普遍用于有机硒的研究^[11], 但是为了节省时间, 也有一些研究者弃用传统的水浴振荡提取, 而采用快速

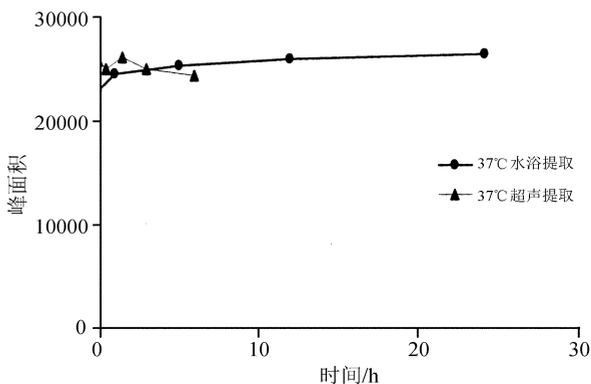


图 2 水浴提取过程中 SeCys_2 的稳定性

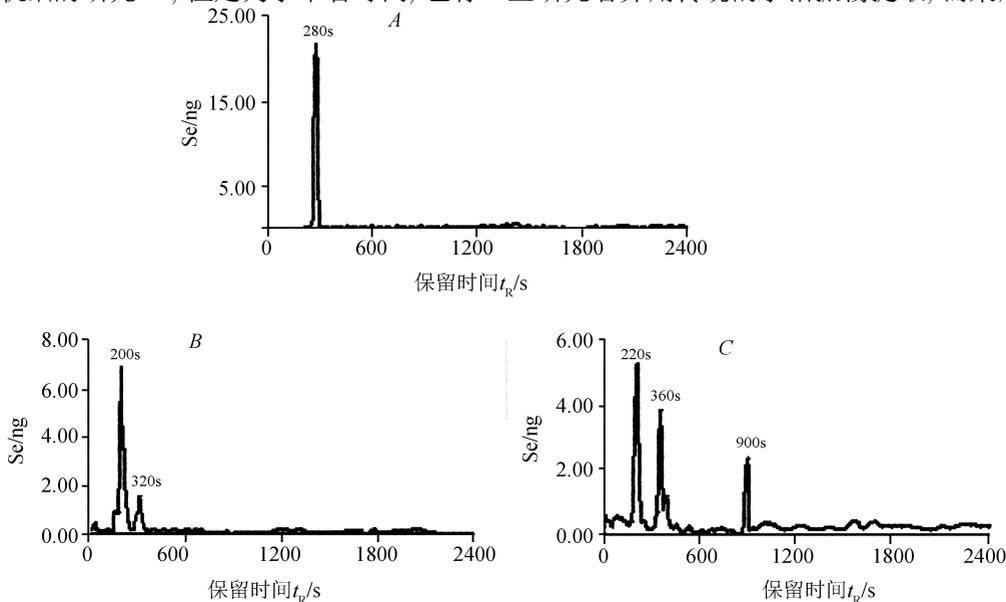


图 3 硒胱氨酸的色谱图

A——标准物质; B——经水浴酶解; C——经超声酶解。

方便的超声提取^[12]。本研究对这两个不同的提取过程中 SeCys₂ 的稳定性进行了分析研究。将标准 SeCys₂ 溶液, S2 和 S4 经 HPLC-ICP-MS 分离、测定后, 所得色谱图如图 3A, 3B 和 3C 所示。

经过水浴振荡和超声酶解后的 SeCys₂ 在 C18 柱上的主峰出峰时间分别从标准的 240—300s (图 3A) 前移到 160—240s (图 3B) 和 180—260s (图 3C), 经不同提取过程后, 二者出峰位置基本一致。但是水浴酶解后的 SeCys₂ 色谱图上在 280—360s 的位置出现了一个新峰 (图 3B), 而超声酶解后的 SeCys₂ 色谱图上除了在几乎相同的位置 (340—420s) 出现一个新峰外, 还在 860—920s 的地方出现另外一个新峰。这可能是由于 SeCys₂ 的 Se—Se 键在外力 (水浴振荡和超声) 作用下容易发生断裂, 同样 Pronase E 分子可能发生结构变化或者肽键断裂, 游离态的 SeCys 与由酶裂产生的小分子相遇并结合, 从而改变了 SeCys₂ 的存在状态而改变了主峰出峰时间, 和次峰的出现。但是水浴振荡和超声过程对酶的作用不同, 酶的断裂情况就会不同, 这就是超声酶解后的 SeCys₂ 次峰比水浴酶解复杂的原因。所以超声过程相对于水浴振荡过程来说对酶的结构具有更大的破坏性。

由于本研究中体系相对单纯, 其中只有 SeCys₂ 和 Pronase E 存在, 所以过程并不复杂, 出峰也相对简单, 但实际样品中情况会复杂得多, Pronase E 对蛋白质中肽键的断裂能力很强, 它在将 SeCys₂ 游离出来的同时, 也会将其他带有氨基和羧基的有机分子游离出来, 这样 SeCys₂ 遇到其他分子并结合的可能性增大, 情况也更复杂。所以在对机体中酶溶性 SeCys₂ 的研究过程, 本文不能只是简单的将 SeCys₂ 的标准色谱图和提取液的色谱图进行简单的对照而得出结论, 这样的结论往往是错的。

4 结论

本研究运用高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱法 (HPLC-ICP-MS) 比较了硒代胱氨酸 (SeCys₂) 在水浴振荡提取和超声提取过程中的稳定性。结果表明: 不管是水浴振荡过程还是超声提取过程对 SeCys₂ 的稳定性影响都不大。但是, 在外力作用下, SeCys₂ 分子很容易在 Se—Se 间断裂, 水浴振荡作用力相对较弱, 而超声作用力相对较强, 酶在两种作用力下都容易发生多肽链断裂或空间构型变化, 且后者甚于前者。游离出来的硒代半胱氨酸 (SeCys) 和酶分子中断裂出来的小分子结合形成新的存在形式, 从而导致了 SeCys₂ 在 C18 柱的洗脱时间发生迁移。

参考文献

- [1] Schomburg L, Schweizer U, Kohrle J. Selenium and Selenoproteins in Man: Extraordinary, Essential, Enigmatic [J]. *CM LS. Cell-Mol. Life Sci.*, 2004, **61**: 1988—1993.
- [2] Li Y, Peng T, Yang Y *et al.* High Prevalence of Enteroviral Genomic Sequences in Myocardium from Cases of Endemic Cardiomyopathy (Keshan Disease) in China [J]. *Heart*, 2000, **83**: 696—701.
- [3] 关玉梅. 硒与缺硒对机体的影响 [J]. *微量元素与健康研究*, 2002, **19**(4): 82—83.
- [4] 周云, 刘忠荣. 硒与人体健康 [J]. *微量元素与健康研究*, 2002, **19**(4): 79—80.
- [5] Angeles Q M, Moreno P, Maria G A *et al.* Selenium Speciation in Animal Tissues After Enzymatic Digestion by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry [J]. *J. Mass Spectrometry*, 2000, **35**: 878—884.
- [6] Ipolyi I, Corns W, Stockwell P *et al.* Speciation of Inorganic Selenium and Selenoamino Acid by an HPLC-ICP-MS [J]. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, 2001, **23**(6): 167—172.
- [7] Zheng J, Ohata M, Furuta N. Reversed-Phase Liquid Chromatography with Mixed Ion-Pair Reagents Coupled with ICP-MS for the Direct Speciation Analysis of Selenium Compounds in Human Urine [J]. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**: 730—735.
- [8] Daun C, Lundh T, Onning G *et al.* Separation of Soluble Selenium Compounds in Muscle from Seven Animal Species Using Size Exclusion Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry [J]. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**: 129—134.
- [9] Siwek M, Galunsky B, Niemey B. Isolation of Selenium Organic Species from Antarctic Krill After Enzymatic Hydrolysis [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**: 737—741.

- [10] Bierla K, Szpunar J, Lobinski R. Specific Determination of Selenoaminoacids in Whole Milk by 2D Size-Exclusion-Ion-Pairing Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS)[J]. *Analytic Chimica Acta*, 2008, **624**: 195—202.
- [11] Capelo J L, Ximenez-Embun P, Madrid-Albarran Y *et al.* Enzymatic Probe Sonication: Enhancement of Protease-Catalyzed Hydrolysis of Selenium Bound to Proteins in Yeast[J]. *Anal. Chem.*, 2004, **76**: 233—237.
- [12] Cabanero A I, Madrid Y, Camara C. Enzymatic Probe Sonication Extraction of Se in Animal-Based Food Samples: A New Perspective on Sample Preparation for Total and Se Speciation Analysis[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**: 373—379.

Stability of Selenocystine During the Research on Process of Selenium Species

ZHAO Qiu-Xiang FENG Chao MO Shu-Wei HUANG Xiao-Ou^a

(Guangdong Province Material Testing Center, Guangzhou 510080, P. R. China)

(*a*) (Environmental Monitoring Station of Guangzhou Development, Guangzhou 510730, P. R. China)

Abstract The stability of selenocystine(SeCys₂) in the most widely used extraction procedures of Se species (traditional water bath shaking and fast ultrasonic extraction) was studied by high performance liquid chromatography (HPLC)-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The results showed that SeCys₂ was stable by both water bath (37°C) shaking and ultrasonic extraction for water leaching of Se species. During the enzymatic hydrolysis, the Se-Se bond of SeCys₂ fractured easily, SeCys was free from SeCys₂, and rupture of polypeptide chain or space configuration changes of pronase E caused by external forces (water bath shaking or sonication). The effects of water bath shaking and ultrasonic extraction to the enzyme were different, and SeCys were easily combined with the fragments of enzyme, which caused the transfer of retention time of SeCys₂ on C18 column.

Key words Selenocystine; Water Leaching; Enzymatic Hydrolysis; Stability

作者联系人不得是“挂名”的，其地址不得省略

作者联系人及其地址不得是“挂名”的、“摆设”的，因为这不仅有作假之嫌，而且容易造成错误和邮件丢失。联系人地址必须正确、真实、详细地写在论文中相应位置，写在论文外无效。

某作者联系人只告诉了编辑部他单位所在的城市，未告知街道名称和门牌号数。确实，他单位是该城市鼎鼎有名的大单位，所以编辑部发给他的信每次都能收到，但是后来给他寄样刊时，印刷品却被退回，邮局在上盖了个戳：地址不详，退！可见，虽然你单位大名鼎鼎，但还并不是邮局人人皆知。“退”！还是一个好运。因为你遇上一个邮局负责任的人，他毕竟还要花费人力物力来“退”！也好让人清楚“退”的缘故。若碰上一个不负责任的，将邮件丢进了垃圾箱。没有收到邮件，作者就质问编辑部，我们冤不冤？

有的作者联系人地址只写上他单位的大名，好像他在单位是大名鼎鼎、人人皆知的。这种邮件，单位的收发室，也通常予以退回，甚至丢进垃圾箱或集中卖废纸。所以，请作者联系人勿将你单位的详细地址（县、区、街道名称，门牌号）和你自己的详细地址（院、部、系、室、组）省略——举手之劳，何乐不为？

以上意见也是邮局对我们的要求。

《光谱实验室》编辑部