

陆秋艳, 张小鸿, 张文婷, 等. 富硒葛粉中硒形态分析及其对脂多糖诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响[J]. 环境化学, 2023, 42(10): 3603-3607.

LU Qiuyan, ZHANG Xiaohong, ZHANG Wenting, et al. Determination of selenium species in Se-enriched puerarin powder and its effect on oxidative damage of AML12 cells induced by Lipopolysaccharide[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(10): 3603-3607.

## 富硒葛粉中硒形态分析及其对脂多糖诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响\*

陆秋艳\*\* 张小鸿 张文婷 李丽林

(福建省疾病预防控制中心, 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福州 350012)

**摘要** 建立了富硒葛粉中硒酸根 [Se(VI)]、亚硒酸根 [Se(IV)]、硒代胱氨酸 (SeCys<sub>2</sub>)、甲基硒代半胱氨酸 (MeSeCys)、硒代蛋氨酸 (SeMet)、硒代乙硫氨酸 (SeEt) 等 6 种硒形态的检测方法并分析了主要硒形态的抗氧化损伤功能。0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液在 90 °C 下提取样品 30 min, 加入蛋白酶 XIV、脂肪酶、淀粉酶, 37 °C 水浴酶解 18 h, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用 (HPLC-ICP-MS) 快速分离测定 6 种硒形态。分析主要硒形态对脂多糖 (LPS) 诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响。结果表明, 6 种硒形态的检出限为 0.017—0.053 mg·kg<sup>-1</sup>, 标准曲线的相关系数均在 0.9998 以上。该前处理方法样品的加标回收率在 71.2%—117.3%, 相对标准偏差均在 10% 以内。与模型组相比, 1 μmol·L<sup>-1</sup> 硒代蛋氨酸处理组脂多糖诱导的 AML12 细胞活力显著上升 ( $P < 0.01$ ), 丙二醛 (MDA) 含量下降 30.1% ( $P < 0.01$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性增加 43.9% ( $P < 0.01$ ), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSHx) 活性增加 44.7% ( $P < 0.01$ )。硒代蛋氨酸对 LPS 诱导的 AML12 细胞氧化损伤具有保护作用, 可增强植物的抗氧化损伤能力。

**关键词** 硒, 形态分析, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用, 抗氧化损伤。

## Determination of selenium species in Se-enriched puerarin powder and its effect on oxidative damage of AML12 cells induced by Lipopolysaccharide

LU Qiuyan\*\* ZHANG Xiaohong ZHANG Wenting LI Lilin

(Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis, Fuzhou, 350012, China)

**Abstract** The objective of this study was to establish a method for the detection of six selenium species in Se-enriched puerarin powder, including Se(VI), Se(IV), SeCys<sub>2</sub>, MeSeCys, SeMet and SeEt. Also this study was to analyze the antioxidant damage of the main selenium species. The sample was extracted with 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH solution at 90 °C for 30 min, then protease XIV, lipase and amylase were added. And enzymolysis was performed at 37 °C for 18 h in water bath. Six selenium species were rapidly detected by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The effect of main selenium species on the oxidative damage of AML12 cells induced by Lipopolysaccharide (LPS) was measured. The results showed that the detection limits for the six selenium species were 0.017—0.053 mg·kg<sup>-1</sup>, and the correlation coefficients of the standard curves were all above 0.9998. The spiked recoveries of the samples

\* 福建省卫生健康科研人才培养项目医学创新课题 (2019-CXB-14) 资助。

Supported by Medical Innovation Project of Fujian Provincial Health Research Talent Training (2019-CXB-14).

\*\* 通信联系人 Corresponding author, E-mail: 34844650@qq.com

determined by this pretreatment method were all between 71.2%—117.3%, and the relative standard deviations were all within 10%. Compared to the model group, the activity of AML12 cells induced by LPS increased significantly ( $P<0.01$ ) after being applied to SeMet at a concentration of  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the content of Malondialdehyde (MDA) decreased by 30.1% ( $P<0.01$ ), the activity of Superoxide Dismutase (SOD) increased by 43.9% ( $P<0.01$ ), and the activity of Glutathione Peroxidase (GSHx) increased by 44.7% ( $P<0.01$ ). The results suggest that SeMet has a protective effect on LPS induced oxidative damage in AML12 cells. So it can enhance the ability of plants on antioxidant damage.

**Keywords** selenium, speciation analysis, high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, antioxidant damage.

硒是人体必不可缺的微量元素之一,具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等作用<sup>[1-4]</sup>。目前,硒元素的补充途径主要包括天然膳食,营养添加剂等,而富硒类植物作为天然膳食最直接便捷的主要来源,研究其中的硒形态及其抗氧化损伤功能对评估营养学价值,保护人体健康,探究科学补硒有着重大意义。硒存在的形态有很多种,比较常见的有硒酸根( $\text{Se(VI)}$ )、亚硒酸根( $\text{Se(IV)}$ )、硒代胱氨酸( $\text{SeCys}_2$ )、甲基-硒代半胱氨酸( $\text{MeSeCys}$ )、硒代蛋氨酸( $\text{SeMet}$ )等。葛粉具有降血脂、抗癌、消癌肿、抗氧化等特殊功效,而硒作为人体必需微量元素,可以清除自由基而表现出抗氧化、抗癌、抗炎<sup>[5-6]</sup>的能力。因此研究葛粉中硒形态及其抗氧化损伤功能研究具有重要意义。

本工作以葛粉为研究对象,建立高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定葛粉中  $\text{Se(VI)}$ 、 $\text{Se(IV)}$ 、 $\text{SeMet}$ 、 $\text{SeCys}_2$ 、 $\text{SeEt}$ 、 $\text{MeSeCys}$  共 6 种硒形态的方法,并对葛粉中主要硒形态进行脂多糖诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响研究,初步探索了 3 种硒形态的抗氧化活性,以期为进一步研究富硒产品的功能和硒的生物有效性奠定基础,为科学补硒及评价富硒产品营养价值提供理论依据。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 7900 型电感耦合等离子体质谱仪、Agilent 1260 型高效液相色谱仪、LabTech EH20A plus 微控数显电热板、MileStone ETHOS A 微波消解系统、THERMO GENPURE 纯水机、日本 Nikon TS100 倒置显微镜、德国 Innova CO-170  $\text{CO}_2$  培养箱、高速离心机、水浴温控摇床、漩涡振荡仪等。

$\text{Se(VI)}$ [GBW 10033, ( $41.5\pm 1.3$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]、 $\text{Se(IV)}$ [GBW 10032, ( $42.9\pm 0.9$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]、 $\text{SeCys}_2$ [GBW 10087, ( $44.2\pm 1.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]、 $\text{MeSeCys}$ [GBW 10088, ( $34.8\pm 1.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]、 $\text{SeMet}$ [GBW 10034, ( $39.4\pm 1.0$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]、 $\text{Se}$ [GBW(E)080215,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] 标准溶液(均以 Se 计),均购自中国计量科学研究院;  $\text{SeEt}$  标准品的纯度为 98%,购自加拿大 TRC 公司;蛋白酶 XIV(P5147-1G)、脂肪酶(L3126-25G)、蛋白酶 K(P6556-100MG)购自日本 Sigma 公司;木瓜蛋白酶(P164463)、胃蛋白酶(P128678)购自北京百灵威科技有限公司;柠檬酸、己烷磺酸钠、氨水、乙酸、氢氧化钠均为优级;实验用水由 THERMO GENPURE 纯水机制得( $>18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ )。标准储备液及标准品置于  $4^\circ\text{C}$  冷藏,混合标准溶液系列均由标准储备液及标准品以超纯水逐级稀释配制,所有工作溶液均当天配制。色谱进样前所有样品经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤。

丙二醛(MDA)试剂盒(A003-1)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(A001-3)、谷胱甘肽(GSHx)试剂盒(A005-1)均购自南京建成科技有限公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(C0009s)购自南通碧云天生物技术有限公司;小鼠肝实质细胞 AML12 购自中科院上海细胞库(SCSP-550);脂多糖(L6143-1MG)购自 Sigma 公司。

### 1.2 仪器工作条件

微波消解条件 消解功率 1500 W,升温程序:由室温升至  $120^\circ\text{C}$ ,升温时间 3 min,恒温 3 min;  $120^\circ\text{C}$  升至  $190^\circ\text{C}$ ,升温时间 5 min,恒温 40 min。

色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-Aq( $4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ),流动相:  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸,  $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  己烷磺酸钠( $\text{pH}=4.4$ , 甲醇加入量 1%),等度洗脱,流速:  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量:  $20 \mu\text{L}$ 。

ICP-MS 条件 射频功率 1550 W,蠕动泵速率  $0.4 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,雾化室温度  $2.0^\circ\text{C}$ ,载气流量  $1.09 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,等离子体气流量  $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,采样深度: 8.0 mm,积分时间 0.5 s,高氮碰撞反应池模式,流量  $6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 总硒测定的前处理

称取 0.5000 g 样品于消解罐内,加入 6 mL 硝酸和 2 mL 过氧化氢溶液进行微波消解。按照 1.2 条件微波消解。消解结束后,冷却,打开消解罐,电热板上赶酸至近干,用超纯水洗涤消解罐 3 次,合并洗涤液,再用超纯水定容至 25 mL,摇匀。直接用 ICP-MS 测定硒总量。同样方法做试剂空白试验。

#### 1.3.2 硒形态测定的前处理

(1)碱提取 称取 0.1000 g 样品于 15 mL 离心管内,加入 10 mL  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液,放入超声波清洗器中  $90^\circ\text{C}$  恒温超声 30 min,冷却,在  $15000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的条件下离心 15 min 后,调至  $\text{pH} 6.5$ ,取两份 3 mL 样品溶液转移至 A、B 离

心管. A 管经  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后, 上清液经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤, 测定  $\text{Se(VI)}$ 、 $\text{Se(IV)}$ 、 $\text{SeCys}_2$ .

(2) 酶提取 将碱提取后的 B 离心管加入 10 mL 水、10 mg 蛋白酶 XIV、10 mg 脂肪酶、10 mg 淀粉酶, 涡旋 3 min 后置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温控摇床中, 在  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下振荡 18 h,  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后, 上清液经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤, 得到待测液 B, 测定  $\text{MeSeCys}$ 、 $\text{SeMet}$ 、 $\text{SeEt}$ .

### 1.3.3 抗氧化损伤研究

(1) 分组与处置: 以  $(0(\text{正常组})、0.01、0.1、1、10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$  的硒代蛋氨酸、硒酸根、亚硒酸根 (均以 Se 计) 处理脂多糖诱导的 AML12 细胞 48 h, MTT 实验测定细胞活力. 将 AML12 细胞随机分为 5 组: 正常组 (不加任何药物刺激)、模型组 (加  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 刺激), 硒代蛋氨酸低浓度组、硒代蛋氨酸中浓度组、硒代蛋氨酸高浓度组, 每组细胞培养 48 h. 实验重复 3 次.

(2) 细胞活力测定: 按照上述分组与处置将细胞培养 48 h 后, 加入  $200 \mu\text{L}$  二甲亚砜孵育 4 h, 后加入  $20 \mu\text{L}$  的 MTT 溶液, 在酶标仪  $620 \text{ nm}$  处测定细胞吸光值 (DO 值), DO 值即为细胞活力.

(3) 细胞上清液中 SOD、GSHx 活性及 MDA 含量: 按照上述分组与处置将细胞培养 48 h 后, 收集上清液, 并分别严格按照试剂盒说明书检测 SOD、GSHx 活性及 MDA 含量.

### 1.4 统计学分析

结果采用 SPSS 20 软件进行统计分析, 计量资料结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析、组间两两比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  说明差异具有统计学意义.

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 碰撞池气体流量优化

以  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硒标准溶液进行碰撞池气体流量优化, 随着 He 流量增加,  $^{78}\text{Se}$  的灵敏度出现先升高后下降的趋势, 在氦气流量达到  $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  时  $^{78}\text{Se}$  灵敏度最高, 最终确定碰撞池气体氦气的最佳流量为  $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 2.2 色谱参数优化

本实验室前期研究已确定硒形态分离的相关色谱参数, 具体研究已发表<sup>[7]</sup>. 优化后色谱柱选用 Agilent ZORBAX SB-Aq ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸和  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  己烷磺酸钠 ( $\text{pH} = 4.4$ , 甲醇加入量 1%), 等度洗脱, 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 进样量  $20 \mu\text{L}$ . 分离色谱图见图 1.

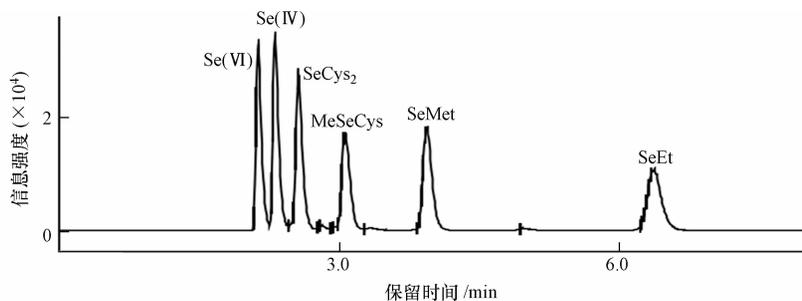


图 1 6 种硒形态标准溶液分离色谱图

Fig.1 Separation Chromatograms of standard solutions for six selenium species

### 2.3 硒形态提取方法研究

#### 2.3.1 提取试剂的选择

结合硒形态分析相关文献<sup>[8-13]</sup>, 以富硒葛粉为样品, 考察水提法、醇提法、酸提法和碱提法提取硒形态效果, 其中水提法只对  $\text{Se(IV)}$  的提取效果较明显, 其他形态提取效率低; 醇提法和水提法的提取效率相近; 酸提法与前二者相比,  $\text{Se(VI)}$  的提取效率反而下降且基线波动大, 提取效果极差; 碱提法对一些水溶性硒蛋白中硒形态具有较高的提取效率, 如  $\text{Se(IV)}$ . 考察木瓜蛋白酶、蛋白酶 XIV、胃蛋白酶、蛋白酶 K 对样品中硒形态提取效果的影响. 蛋白酶 XIV 提取  $\text{Se(IV)}$ 、 $\text{SeMet}$  效率更高, 因此蛋白酶 XIV 是较优选择. 综上, 本研究拟定碱提取和酶提取相结合的提取方法. 但由于蛋白酶 XIV 在中性条件下活性最强. 因此, 硒形态提取分两步进行, 先碱提取, 提取液中和后, 采用蛋白酶 XIV 伴以水浴摇床辅助提取.

#### 2.3.2 碱提取温度优化

考察不同温度对提取效果的影响, 分别进行室温 ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ )、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $90 \text{ }^\circ\text{C}$  超声提取提取 30 min,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  提取 30 min, 结果显示  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  超声时  $\text{Se(IV)}$  的提取量是室温条件下的 1.5 倍; 升高温度到  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{Se(IV)}$  的提取效率显著提高, 约为  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  提取量的一倍,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  时硒形态之间发生转化. 因此选择  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , 超声 30 min 为碱提取条件.

#### 2.3.3 酶提取时间优化

酶在高温条件下结构易被破坏, 活性降低或失活, 其最佳提取温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 提取率高且不会破坏活性. 且酶解时间的长短会对提取效果造成影响, 时间过少会导致硒形态不能完全提取, 时间过长又会导致硒形态之间发生一定的转变. 为考察酶解时间对葛粉中硒形态提取效果的影响, 分别进行  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴酶解 4 h、6 h、8 h 和 18 h, 酶解时间为 4 h、

6 h、8 h 时,有机硒形态中仅有 SeMet 检出,而酶解时间 18 h 时不仅检出 SeMet,还检出大量的 SeEt.许多植物为避免硒中毒,会通过甲基化的方式转变硒的储存形式<sup>[14]</sup>,因此存在 SeEt. SeEt 为 SeMet 的衍生物.结果与已有研究结果一致<sup>[15]</sup>.前期在探讨无机硒提取效果时,采取醇提法时,也同时出现了 SeMet、SeEt.葛粉中检出 SeEt,这与富硒大蒜、富硒西兰花的检出结果一致<sup>[14,16]</sup>.有研究表明<sup>[17-18]</sup>,植物基质中含有丰富的酚类物质,Se(IV)与植物中黄酮类、酚酸类或鞣质类等酚类化合物发生相互作用含量逐渐下降,而 SeMet、SeCys<sub>2</sub>、SeMeSeCys 以及 Se(VI))等则是稳定的.本研究将采用先提取无机硒,后提取有机硒的两步法,既保证了无机硒形态和有机硒形态的提取率,又可以避免长时间酶解导致 Se(IV)含量逐渐下降.考虑到葛粉中含有少量淀粉及脂肪,本实验选择蛋白酶 XIV、脂肪酶、淀粉酶各 10 mg 混合加入,37 °C 水浴提取 18 h 为酶提取条件.

### 2.3.4 标准曲线与检出限

使用超纯水将 6 种硒形态的混合标准液逐级稀释,配制成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100、200、500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合标准液系列,以各浓度色谱峰面积对应质量浓度绘制标准工作曲线,相关系数均大于 0.9998.以色谱峰信噪比 S/N 为 3 : 1 时所对应的浓度计算检出限,得出 Se(VI)、Se(IV)、SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet、SeEt 的检出限 0.017—0.053  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

### 2.3.5 方法的回收率与精密度

对富硒葛粉中 6 种硒形态进行加标回收试验,Se(VI)、SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 的加标浓度分别为 0.1、0.5、2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,Se(IV)、SeMet、SeEt 的加标浓度分别为 0.5、2.5、10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .6 种硒形态的加标回收率均在 71.2%—117.3% 之间,相对标准偏差( $n=6$ )均在 10% 以下.

### 2.3.6 样品中硒形态分析

将本研究建立方法用于测定市面上销售的富硒葛粉,并用国家标准 GB/T 5009.93-2017 电感耦合等离子体质谱法测定总硒含量.结果显示总硒含量为 2.26  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,对富硒葛粉进行硒形态分析,最终测出富硒葛粉中主要成分为:Se(IV)占 30.8%,SeMet(以 SeMet 和 SeEt 之和计)占 40.1%,SeCys<sub>2</sub>占 3.39%,MeSeCys 占 2.64%.6 种硒形态的总提取率为 76.9%.由于分析过程中出现多个未知硒形态峰,以当前已有的硒形态标准物质无法对其进行定性定量分析,计划在今后实验中运用 HPLC-MS-MS 对未知硒形态深入研究.富硒葛粉中主要成分为 Se(IV)、SeMet,因此在研究硒形态的抗氧化功能时,选取常见无机硒形态 Se(IV)、Se(VI)以及有机硒形态 SeMet,考察三种硒形态对脂多糖诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响.

## 2.4 硒形态抗氧化损伤研究

### 2.4.1 SeMet、Se(VI)、Se(IV)对 AML12 细胞活力影响

采用 0、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SeMet 处理脂多糖(LPS)诱导的 AML12 细胞 48 h 后,0.01、0.1、1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SeMet 均能提高 AML12 细胞活力,且 0.1、1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SeMet 具有显著性( $P<0.05$ ),而 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SeMet 显著降低 AML12 细胞活力( $P<0.01$ ).0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Se(VI)、Se(IV)均显著降低 AML12 细胞活力( $P<0.01$ ).因此,本研究选择 0.01、0.1、1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SeMet 作为后续研究剂量.

### 2.4.2 SeMet 对 LPS 诱导的 AML12 细胞中 SOD、GSHx 活性及 MDA 含量的影响

如表 1 所示,与正常组比较,模型组中 MDA 含量上升( $P<0.01$ ),SOD 及 GSHx 活性皆显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,硒代蛋氨酸 3 个剂量实验组中 MDA 含量显著降低( $P<0.01$ ),SOD 及 GSHx 活性都显著提高( $P<0.01$ ).

表 1 硒代蛋氨酸对 LPS 诱导的 AML12 细胞中 SOD、GSHx 活性及 MDA 含量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Effects of SeMet on SOD, the activity of GSHx, and the content of MDA in LPS induced AML12 cells( $\bar{x}\pm s$ )

组别	MDA/( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	SOD/( $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ )	GSHx/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
正常组	5.23±0.54	132.83±11.26	54.28±5.25
模型组	9.41±0.92**	75.32±7.68**	34.47±3.48**
硒代蛋氨酸低浓度组	8.35±0.83##	86.57±8.62##	40.49±3.83##
硒代蛋氨酸中浓度组	7.14±0.72##	98.34±7.83##	45.06±4.12##
硒代蛋氨酸高浓度组	6.58±0.64##	108.36±10.85##	49.87±3.94##

(与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ )

## 3 结论(Conclusion)

使用 Agilent ZORBAX SB-Aq 反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相体系为 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的柠檬酸和 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的己烷磺酸钠,0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液在 90 °C 下提取样品 30 min,加入蛋白酶 XIV、脂肪酶、淀粉酶,37 °C 水浴酶解 18 h,运用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS)快速分离六种硒形态.6 种硒形态的检出限为 0.017—0.053  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,标准曲线的相关系数均在 0.9998 以上.该前处理方法测定样品的加标回收率均在 71.2%—117.3% 之间,相对标准偏差均在 10% 以内.

分析富硒葛粉中主要硒形态对脂多糖(LPS)诱导的 AML12 细胞氧化损伤的影响,与模型组相比,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硒代蛋氨酸处理组脂多糖诱导的 AML12 细胞活力显著上升,丙二醛(MDA)含量显著下降,超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSHx)活性显著增加.结果提示,硒代蛋氨酸对 LPS 诱导的 AML12 细胞氧化损伤具有保护作用.

用,可增强植物的抗氧化损伤能力.

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] KÁPOLNA E, FODOR P. Speciation analysis of selenium enriched green Onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS[J]. *Microchemical Journal*, 2006, 84(1/2): 56-62.
- [ 2 ] UDEN P C, BOAKYE H T, KAHAKACHCHI C, et al. Selective detection and identification of Se containing compounds—Review and recent developments[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1050(1): 85-93.
- [ 3 ] KLEIN E A, THOMPSON I M, LIPPMAN S M, et al. SELECT: The selenium and vitamin E cancer prevention trial[J]. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2003, 21(1): 59-65.
- [ 4 ] DUMONT E, VANHAECKE F, CORNELIS R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(7): 1304-1323.
- [ 5 ] DERBENEVA S, BOGDANOV A, POGOZHEVA A V, et al. Effect of diet enriched with selenium on the psycho-emotional and adaptive capacity of patients with cardiovascular diseases and obesity[J]. *Vopr Pitan*, 2012, 81(4): 35-41.
- [ 6 ] 朱磊, 胡婷, 刘德明, 等. 叶面喷施硒对萝卜硒吸收及抗氧化能力的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(3): 127-131.
- [ 7 ] 陆秋艳, 张文婷, 林秋莲, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用快速同时分析水中 5 种砷和 7 种硒 [J]. *环境化学*, 2018, 37(7): 1671-1674.
- [ 8 ] 秦冲, 施畅, 万秋月, 等. HPLC-ICP-MS 法测定富硒小麦中硒的形态 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(2): 140-144.
- [ 9 ] 曾凤泽, 姚宇泽. 微波辅助酶萃取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定灵芝中 6 种硒形态 [J]. *理化检验-化学分册*, 2020, 56(11): 1152-1157.
- [ 10 ] 黄韬睿, 王鑫, 王小平. 反向离子对高效液相色谱-电感耦合等离子质谱联用分析富硒食品中硒的形态 [J]. *中国调味品*, 2020, 45(11): 140-144.
- [ 11 ] 冯洪燕, 杨从发, 钱亮亮, 等. 市售富硒食品中硒形态及含量的分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12): 5059-5065.
- [ 12 ] 林樾, 陈尚卫, 虞锐鹏, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定富硒碎米芥中的硒形态 [J]. *分析科学学报*, 2021, 37(5): 637-642.
- [ 13 ] 孟莉, 许亚丽, 夏曾润, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定谷类食品中的 4 种硒形态 [J]. *分析科学学报*, 2021, 37(6): 843-846.
- [ 14 ] 刘为, 尹金晶, 吴慕慈, 等. 富硒农产品中硒代氨基酸形态及其在不同蛋白组分中的分布 [J]. *食品与机械*, 2022, 38(6): 45-51, 190.
- [ 15 ] 吴雅颖. 不同外源硒在雷竹笋的富集分布及抗氧化性研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- [ 16 ] 张珂, 张钦龙, 张蜀, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法测定富硒大蒜中硒形态 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(5): 577-582.
- [ 17 ] CUDERMAN P, STIBILJ V. Stability of Se species in plant extracts rich in phenolic substances[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(4): 1433-1439.
- [ 18 ] 叶梅. 典型富硒植物中含硒化合物的形态分析与结构鉴定 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.