

doi: 10.19969/j.fxcxb.21091002

富硒堇叶碎米荠中硒化合物的形态分析与鉴定

叶梅¹, 虞锐鹏¹, 丛欣², 陈尚卫¹, 朱松^{1*}

(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. 恩施德源健康科技发展有限公司, 湖北 恩施 445000)

摘要: 该文以富硒堇叶碎米荠为研究对象, 通过酶解法提取其中的硒化合物, 采用高效液相色谱-电感耦合等离子质谱(HPLC-ICP-MS)定量分析已知的硒化合物; 对于未知的硒化合物, 将酶解液经3 kDa超滤离心管浓缩除杂、冻干后, 用初始流动相复溶, 选取Kinetex F5超高效液相五氟苯基柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm), 以0.1%(体积分数)甲酸-水溶液和0.1%(体积分数)甲酸-乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱, 通过超高效液相色谱-电喷雾电离源高分辨串联质谱(UPLC-ESI-Triple TOF MS), 利用硒独特的同位素模式、一级质谱(TOF MS)和二级质谱(TOF MS/MS)进行筛选与鉴定。结果表明: HPLC-ICP-MS定量分析了堇叶碎米荠中的5种硒化合物, 分别为硒代胱氨酸(SeCys₂)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代蛋氨酸(SeMet)、四价硒[Se(IV)]、六价硒[Se(VI)]; UPLC-ESI-Triple TOF MS鉴定了其他15种硒化合物, 包括7种已报道和8种未报道的硒化合物, 并提出了C₄H₇NO₂Se、C₅H₈O₂Se和C₇H₉NO₂Se 3种未报道硒化合物的结构。

关键词: 富硒堇叶碎米荠; 硒化合物; HPLC-ICP-MS; UPLC-ESI-Triple TOF MS; 鉴定

中图分类号: O657.63; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)01-0100-08

Detection and Identification of Selenium Compounds in Selenium-enriched *Cardamine Violifolia*

YE Mei¹, YU Rui-peng¹, CONG Xin², CHEN Shang-wei¹, ZHU Song^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Enshi Se-Run Health Tech Development Co., Ltd., Enshi 445000, China)

Abstract: In this article, selenium(Se) compounds were extracted from Se-enriched *Cardamine Violifolia* (*C. Violifolia*) by enzymolysis method, and the known Se species were determined by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). As for the identification of unknown Se compounds, the enzymatic hydrolysate was firstly concentrated by removing impurities with a 3 kDa ultrafiltration centrifuge tube, then freeze-dried, and finally suspended in the initial mobile phase. A Kinetex F5 column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) was selected for gradient elution. Mobile phases A and B were water and acetonitrile both prepared with 0.1% (volume fraction) formic acid. The unknown Se compounds were screened and identified by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization high resolution tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-Triple TOF MS) using unique isotope patterns, TOF MS and TOF MS/MS. The results showed that five Se species in *C. Violifolia* were determined by HPLC-ICP-MS, namely selenocysteine (SeCys₂), methylselenocysteine (MeSeCys), selenomethionine (SeMet), selenite [Se(IV)] and selenate [Se(VI)]. 15 other Se compounds, including 7 reported and 8 unreported Se compounds, were identified by UPLC-ESI-Triple TOF MS. The structural formula of three unreported Se compounds, C₄H₇NO₂Se, C₅H₈O₂Se and C₇H₉NO₂Se were proposed.

Key words: selenium-enriched *Cardamine Violifolia*; selenium compounds; HPLC-ICP-MS; UPLC-ESI-Triple TOF MS; identification

收稿日期: 2021-09-10; 修回日期: 2021-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172197); 食品科学与技术国家重点实验室自主科研课题(SKLF-ZZA-202106)

* 通讯作者: 朱松, 博士, 研究员, 研究方向: 食品分析, E-mail: zhusong@jiangnan.edu.cn

硒是一种人体必需的微量元素,参与机体许多重要的代谢过程,适量的硒能起到抗氧化防御、维持氧化还原平衡作用,有效改善免疫系统功能^[1-2],降低患癌风险^[3];然而其不能在人体内自主合成,须通过外界摄入维持正常水平。硒在自然界中分为有机硒和无机硒:无机硒主要为Se(IV)和Se(VI),对机体的安全阈值较低;有机硒包括硒蛋白、硒肽、硒代氨基酸等经代谢产生的一系列含硒化合物,对机体的安全阈值较高,生物利用度好^[4]。因此,对于72%国土面积有不同程度缺硒的中国,科学安全高效地利用有机硒尤为重要^[5]。

堇叶碎米荠是一种典型的富硒植物,能通过自身代谢途径将无机硒高效地转化为有机硒^[6-7],2020年国家卫生健康委员会已将堇叶碎米荠列为新食品原料。然而,目前对有机硒化合物的检测手段大多是通过高效液相色谱-电感耦合等离子质谱(HPLC-ICP-MS)^[8-9]和高效液相色谱-氢化物原子荧光光谱(HPLC-HG-AFS)分析几种常见的硒代氨基酸^[10-11],这主要是受限于硒化合物标准品的数量与种类^[12]。除此之外的未知硒化合物,必须采用液相色谱-高分辨质谱联用方法进行结构鉴定^[13-14]。

液相色谱-高分辨质谱联用时常用的离子源为电喷雾电离(ESI)源,不受多原子干扰,可用于硒的特异性检测,且高分辨质谱能很好地解决ICP-MS受色谱分辨率限制而产生的共洗脱问题^[13]。但随着分辨率的提高,由于许多伴生的易电离物质产生干扰,使得硒化合物的信号受到强烈抑制,而背景值逐渐升高(相较于ICP-MS高2个数量级),导致灵敏度下降。这就需要通过多维色谱分离纯化、冻干浓缩等步骤获得较高浓度和纯度的含硒化合物^[15]。常用的高分辨质谱分析器主要包括飞行时间质谱(TOF MS)、轨道离子阱质谱(Orbitrap MS)和傅里叶变换质谱(FT-ICR-MS),其中Orbitrap MS有利于对大分子量(500~1 000 Da)化合物的分析,但鉴定的硒化合物不够全面^[16-17]。FT-ICR-MS虽然具有极高的同位素保真度,但与液相色谱的兼容程度需进一步改善^[13]。TOF MS在色谱模式下的高数据采集速度使其能与超高效液相色谱(UPLC)耦合,从而在相对复杂的样品中检测大量的含硒化合物,一定程度上弥补了ESI离子源的不足,是有利于鉴定低分子量硒化合物的质谱仪器^[13, 18-19]。如Ward等^[20]将不同富硒酵母的硒化合物,经超滤膜过滤截取、冻干复溶后,直接进高效液相色谱-电喷雾电离源高分辨串联质谱(HPLC-ESI Q-TOF MS),测定了超过100种含硒化合物。目前运用液相色谱-高分辨质谱联用鉴定的富硒样品绝大多数是蛋白含量较高,研究较为透彻的富硒酵母,对富硒植物中硒化合物的研究较少。本文以富硒堇叶碎米荠为研究对象,在HPLC-ICP-MS定量分析常见硒化合物的基础上,通过3 kDa超滤离心管去除大分子杂质、冻干浓缩等方法,采用超高效液相色谱-电喷雾电离源高分辨串联质谱(UPLC-ESI-Triple TOF MS)实现了对富硒堇叶碎米荠中未知硒化合物的鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

U3000 高效液相色谱仪、iCAP TQ 三重四极杆电感耦合等离子质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);SCIEX ExionLC™ AC 超高效液相色谱、X500R Triple TOF MS 高分辨质谱(美国 AB SCIEX 公司);恒温金属浴磁力搅拌器(德国 IKA 公司);5804R 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Mars6 微波消解仪(美国 CEM 公司);LE204E 分析天平、FiveEasy Plus pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);3 kDa 超滤离心管(15 mL, 美国 Millipore 公司);冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);TechMate C₁₈-ST 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 日本 Shiseido 公司);Kinetex F5 超高效液相五氟苯基柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm, 美国 Phenomenex 公司)。

标准溶液:硒代胱氨酸(SeCys₂)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代蛋氨酸(SeMet)、Se(VI)、Se(IV)(中国计量科学院国家标准物质研究中心);富硒堇叶碎米荠干粉(恩施德源健康科技发展有限公司);碱性蛋白酶(诺维信生物技术有限公司);胰蛋白酶、蛋白酶K(合肥博美生物科技有限责任公司);磷酸氢二铵、10%四丁基氢氧化铵水溶液(国药集团化学试剂有限公司);硝酸、甲醇、乙腈、甲酸(均为色谱纯,美国 Tedia 公司)。实验所用超纯水由 Milli-Q 系统(电阻率为 18.2 MΩ·cm, 美国 Millipore 公司)制备。

1.2 实验方法

1.2.1 ICP-MS 测定总硒 取 0.15 g 富硒堇叶碎米荠干粉于微波消解管中,加 3 mL 硝酸,冷消化过夜后加入 5 mL 水,于微波消解仪中消解 2 h。将消解后的溶液用水定容至相应体积,充分摇匀。取约

15 mL, 过0.22 μm 尼龙膜, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。样品平行实验3次, 同时做试剂空白。

1.2.2 HPLC-ICP-MS 测定硒形态 混合硒标准溶液的配制: 分别准确吸取466.5 μL Se(IV)、482.0 μL Se(VI)、575.0 μL MeSeCys、452.5 μL SeCys₂、507.5 μL SeMet溶液, 用水定容于10 mL容量瓶中, 得质量浓度为2.0 mg/L的硒化合物储备液(以硒计)。混合配制成200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液(以硒计), 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

样品前处理: 称取0.1 g富硒藁叶碎米荠干粉, 经5%碱性蛋白酶-胰蛋白酶-蛋白酶K酶解后, 400 r/min 磁力搅拌4 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 下以4 000 r/min 离心30 min, 上清液经0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样。

HPLC 条件: 色谱柱为TechMate C₁₈-ST反相色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相为30 mmol/L 磷酸氢二铵、0.5 mmol/L 四丁基氢氧化铵、3% 甲醇, 以10% 甲酸调流动相pH为6.0。柱温为30 $^{\circ}\text{C}$, 流速为1.0 mL/min。进样量为10 μL , 分析时间为10 min。

ICP-MS 条件: 射频功率为1 550 W, 冷却气流量为14 L/min, 辅助气流量为0.8 L/min, 雾化气流量为1.025 L/min, O₂ 流量为0.326 mL/min, 泵转速为40 r/min, 测定模式为TQ-O₂模式, Q₁ 设置分析质量数为 $m/z = 80$, Q₃ 设置质量数为 $m/z = 96$ 。

1.2.3 UPLC-ESI-Triple TOF MS 测定未知硒化合物 样品前处理: 将0.5 g富硒藁叶碎米荠干粉经酶解后, 离心取上清液过15 mL 3 kDa 超滤离心管, 4 000 r/min 离心2 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥后, 以1 mL 初始流动相复溶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以14 000 r/min 高速离心5 min, 取上清液待检测。

UPLC 条件: Kinetex F5 超高效液相五氟苯基柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6 μm), 柱温为40 $^{\circ}\text{C}$, 进样盘温度为4 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相: A为0.1%(体积分数, 下同)甲酸-水溶液, B为0.1%甲酸-乙腈溶液。梯度洗脱程序: 0~1 min, 3% B; 1~15 min, 3%~95% B; 15~18 min, 95% B; 18.1~20 min, 95%~3% B。流速为0.3 mL/min, 进样量为10 μL 。

ESI-Triple TOF MS 条件: 电喷雾(ESI)正离子源, 气帘气(CUR)为241 kPa; 雾化气(GS1)为379 kPa; 辅助气(GS2)为379 kPa; 喷雾电压(ISVF)为5 500 V; 离子源温度(TEM)为550 $^{\circ}\text{C}$, IDA 模式下设置去簇电压(DP)为60 V, 碰撞电压(CE)为35 V, 碰撞电压差(CES)为15 V。

2 结果与讨论

2.1 富硒藁叶碎米荠中总硒及已知硒形态的含量

采用ICP-MS测得富硒藁叶碎米荠的总硒含量为2 853.5 mg/kg; 经复合蛋白酶酶解后, 采用HPLC-ICP-MS进行形态分析, 外标法定量计算该藁叶碎米荠中5种硒形态SeCys₂、MeSeCys、Se(IV)、SeMet、Se(VI)的含量分别为2 154.1、18.5、225.8、4.5、52.3 mg/kg。结果表明, 该藁叶碎米荠中主要硒形态为有机硒(以SeCys₂为主), 有机硒含量达到总硒含量的76.3%。混标和富硒藁叶碎米荠的HPLC-ICP-MS图如图1所示, 可见该藁叶碎米荠中存在多种微量的未知硒化合物, 需进一步采用高分辨质谱分析鉴定。

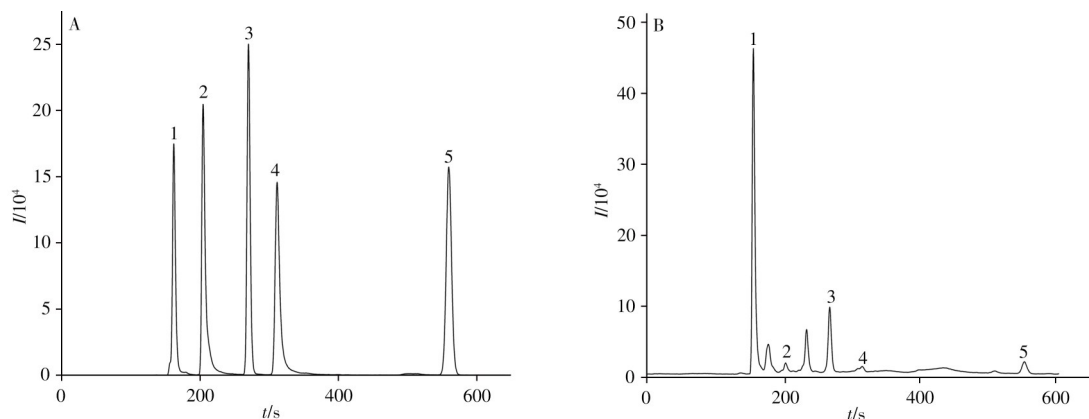


图1 200 $\mu\text{g/L}$ 混标(以硒计)(A)和富硒藁叶碎米荠(B)的HPLC-ICP-MS图

Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatograms of 200 $\mu\text{g/L}$ (as Se) mixed standard solution(A) and Se-enriched *C. Violifolia*(B)

peak: 1. SeCys₂; 2. MeSeCys; 3. Se(IV); 4. SeMet; 5. Se(VI)

2.2 富硒堇叶碎米荠中未知硒化合物的鉴定

2.2.1 数据依赖型扫描和动态背景扣除

Triple TOF 高分辨系统的采集速度高达 100 Hz, 采用数据依赖型扫描(IDA)^[21]和动态背景扣除(DBS)的数据采集模式, 能够使浓缩复溶后的堇叶碎米荠样品经一次进样后同时获得高质量的全扫描 TOF MS 谱图和全面的 TOF MS/MS 谱图。其中 TOF MS 谱图的扫描范围为 m/z 100 ~ 1 000; IDA 模式选择获得 15 个产物离子的 TOF MS/MS 谱图, 扫描范围为 m/z 50 ~ 1 000。DBS 可以过滤干扰杂质, 在通过高分辨和精确质量数全扫描发现主要化学成分的同时, 保证目标物得到高质量的 TOF MS/MS 谱图, 这些高分辨率和精确质量数谱图可用于对目标物的主要化学成分进行结构阐明与确证。

2.2.2 同位素过滤和质量亏损过滤

硒是一种同位素分布特征明显的元素。本实验结果显示, 硒有 6 个同位素峰, ^{74}Se 同位素峰的丰度非常小, 仅占最高丰度 ^{80}Se 的 1.79%。而 ^{76}Se 、 ^{77}Se 、 ^{78}Se 、 ^{80}Se 、 ^{82}Se 同位素的丰度比约为 19 : 15 : 48 : 100 : 18, 可利用该特征通过同位素过滤方法挖掘数据, 找到符合硒同位素分布的质谱图, 进而找到可能的含硒有机物。对于可能含有 2 ~ 3 个硒的有机小分子物质, 则须先通过元素组成计算工具 Mass Calculators 得到不同的硒同位素分布情况, 再进行同位素过滤。需要注意的是, 由于有时谱图干涉或同位素强度比缺乏保真度, 须通过人工处理进行再次确认^[13]。

另外, 硒的质量亏损约为 921 mDa, 与常见元素有一定差异, 因此也可利用特征质量亏损过滤进行含硒有机物的确认^[18]。

2.2.3 硒化合物分子式的确认及结构鉴定

依据上述步骤, 除 HPLC-ICP-MS 形态分析的 5 种硒化合物外, 本实验通过 UPLC-ESI-Triple TOF MS 鉴定^[22]出 15 种硒化合物, 其中有 7 种已被报道(如表 1)。在 8 种未报道的硒化合物中, 提出了 3 种硒化合物的结构式, 分别为 $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}^+([\text{M} + \text{H}]^+)$ 的 m/z 为 181.971 5)、 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}^+([\text{M} + \text{H}]^+)$ 的 m/z 为 180.976 2)、 $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2\text{Se}^+([\text{M} + \text{H}]^+)$ 的 m/z 为 219.987 4), 详细的质谱和结构特征信息见表 2。以下是 3 种硒化合物结构的鉴定过程。

表1 富硒堇叶碎米荠中鉴定的 15 种硒化合物
Table 1 Se compounds identified in Se-enriched *C. Violifolia*

Precursor mass(m/z)	Retention time(min)	Molecular formula $[\text{M} + \text{H}]^+$	Name	Reference
180.976 2	1.24	$\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2\text{Se}^+$	—	—
181.971 5	3.05	$\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}_2\text{Se}^+$	—	—
219.987 4	3.79	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Se}^+$	—	—
244.877 9	1.70	$\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{Se}_2^+$	1,2-Diselenolane-4-carboxylic acid (1,2-二硒戊烯-4-羧酸)	[23]
255.953 4	1.62	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{Se}^+$	—	—
269.112 7	3.90	$\text{C}_{10}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{OSe}^+$	—	—
277.919 3	3.00	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{Se}_2^+$	—	—
313.029 7	3.43	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{Se}^+$	γ -Glutamyl-Se-methylselenocysteine/ N-acetyl-selenocystathionine(γ -谷酰基-硒- 甲基硒代半胱氨酸/N-乙酰-胱硒醚)	[15, 17-18, 20, 24]
320.159 9	4.23	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{Se}^+$	—	—
345.001 8		$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{SSe}^+$	N-Acetyl-cysteine-selenohomocysteine (N-乙酰-半胱氨酸-硒同型半胱氨酸)	[20]
392.946 2	1.65	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{Se}_2^+$	N-Acetyl-selenocysteine-selenohomocysteine (N-乙酰-硒代半胱氨酸-硒同型半胱氨酸)	[20]
402.023 3	3.33	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{SSe}^+$	Methylthio-selenoglutathione (甲硫基-硒谷胱甘肽)	[17, 20, 25]
439.141 4	0.78	$\text{C}_{11}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_7\text{Se}^+$	—	—
444.868 7	2.33	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}_3^+$	Se-selenohomocysteinyldiseleno-homocysteine (硒高半胱氨酸-二硒同型半胱氨酸)	[18, 26]
489.055 3	2.63	$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_8\text{SSe}^+$	Glutathione-selenohomocysteine (谷胱甘肽-硒同型半胱氨酸)	[20]

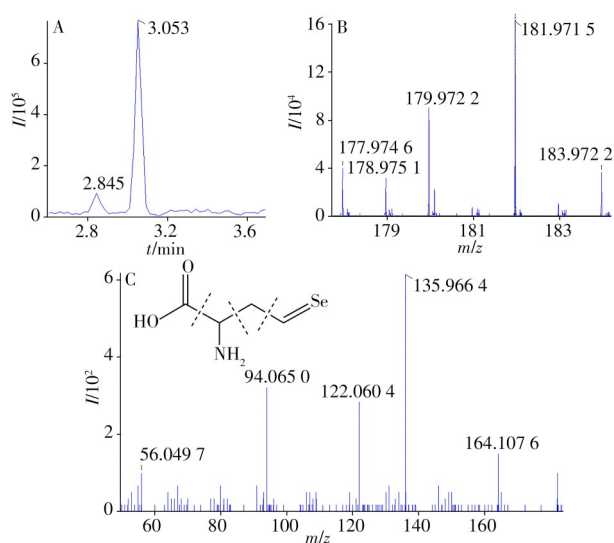
表2 富硒藜叶碎米荠中鉴定出的硒化合物的一级和二级质谱信息

Table 2 MS and MS/MS informations of Se compounds identified in Se-enriched *C. Violifolia*

Retention time (min)	Experimental mass (<i>m/z</i>)	Theoretical mass (<i>m/z</i>)	Mass error (ppm)	Molecular formula [M + H] ⁺	Fragment ions (formula)	Fragment ions (rounded mass)
1. 24	180. 976 2	180. 97 62	- 0. 2	C ₅ H ₉ O ₂ Se ⁺	C ₄ H ₇ C ₄ H ₉ O C ₄ H ₅ O ₂ C ₄ H ₇ O ₂ CH ₃ Se C ₂ H ₃ Se C ₄ H ₇ Se	55. 054 4 73. 065 3 85. 085 3 87. 045 4 94. 939 3 108. 955 0 134. 971 9
3. 05	181. 971 5	181. 971 5	0. 1	C ₄ H ₈ NO ₂ Se ⁺	C ₃ H ₆ N CHSe C ₂ H ₅ Se C ₃ H ₆ NSe	56. 049 7 92. 924 3 108. 954 6 135. 966 4
3. 79	219. 987 4	219. 987 1	1. 2	C ₇ H ₁₀ NO ₂ Se ⁺	C ₄ H ₃ CHSe C ₂ H ₃ Se C ₃ H ₇ Se C ₄ H ₅ Se C ₆ H ₈ NSe C ₆ H ₉ NSe	53. 038 6 92. 924 0 106. 939 5 122. 971 4 132. 955 5 173. 981 7 174. 990 0

2. 2. 3. 1 C₄H₇NO₂Se 通过同位素过滤和质量亏损过滤, 在保留时间 3.05 min 位置, 找到 *m/z* 为 181. 971 5 的化合物加氢母离子, 其同位素分布和质量亏损符合硒化合物的特征, 提取离子流 (XIC) 图和 TOF MS 谱图分别见图 2A、B。为进一步确认该化合物的元素组成, 将其 TOF MS 谱图与 Formular Finder 的 MS Details 相链接, 基于其精确质量去除大量元素组成, 设置最大元素组成为 C₅₀H₂₀₀N₁₀S₅Se₅ 以过滤最大和最小的潜在原子数量和原子类型, 留下可能的元素组成形成元素组成列表。根据 MS Rank 和 Δppm (化合物母离子的精确质量数和理论质量数的偏差) 对所有可能的结果进行排序, Δppm 越小, 表明提出的 *m/z* 与精确的单同位素质量越接近, 元素组成的可信度越高。另外, 还需考虑元素组成的不饱和度 (RDB 值) 是否符合组成化合物的规律。结果表明, 该化合物的分子式仅有 1 种元素组成为 C₄H₇NO₂Se, Δppm 为 0.1 ppm, RDB 值为 3, 可信度较高, 又由于该化合物的 *m/z* 值相对较低, 分子组成简单, 其元素组成可以确定。根据 Far 等^[15] 的报道, 该化合物的 M + H 峰在富硒酵母中被鉴定为某些化合物的裂解产物, 对应于硒同型半胱氨酸 (SeHCys) 的源内片段, 如图 2C 的结构图所示。TOF MS/MS 谱图 (图 2C) 通过 Formular Finder 拟合得到的分子组成与一级质谱完全一致, MS Rank 和 MS/MS Rank 均为 1 时, 其一级质谱 Δppm 为 0.6 ppm, RDB 值为 3, 二级质谱 Δppm 为 3.8 ppm。TOF MS/MS 谱图中响应值最高的 *m/z* 135. 966 4 峰对应的裂解片段为 C₃H₆NSe, 为母离子失去羧基 (—COOH) 后形成碳碳双键 (C=C) 所得, 与 Far^[15] 和 Ouerdane^[16] 的报道一致。且二级质谱拟合出的其他可能的碎片 CHSe、C₂H₃Se 等也证实了该结构的合理性。

2. 2. 3. 2 C₅H₈O₂Se *m/z* 为 180. 976 2 的峰经同位素过滤和质量亏损过滤后, 通过人工验证确认为硒化

图2 硒化合物 C₄H₇NO₂Se 的 XIC 图 (A)、MS 图 (B)、MS/MS 图和结构式 (C)Fig. 2 Extracted ion chromatogram (XIC, A), MS spectrum (B), MS/MS spectrum and putative chemical structural formula (C) of Se compound C₄H₇NO₂Se

合物, 其保留时间为1.24 min, XIC图和相应TOF MS谱图如图3A、B所示。通过Formular Finder模式, 发现该峰为某含硒化合物的M+H峰, 基于该M+H峰的精确质量数和最大元素组成拟合形成其所有可能的元素组成列表。根据MS Rank和 Δppm 对所有可能的元素组成进行排序, 当元素组成为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2^{80}\text{Se}$ 时, 其MS Rank为1, Δppm 为 -0.2 ppm , RDB值为3; 当元素组成为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2^{78}\text{Se}$ 时, 其MS Rank为1, Δppm 为 0.5 ppm 。该化合物的母离子在同位素 ^{80}Se 和 ^{78}Se 的精确质量数与理论质量数偏差均小于 5 ppm , 同位素丰度之比为 $100:45.3$, 与理论离子比例偏差小于 10% , 表明该化合物的元素组成很可能为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}$, 但由于其元素组成列表还有其他可信度较高的可能性, 最终分子式须通过TOF MS/MS谱图进一步确证。

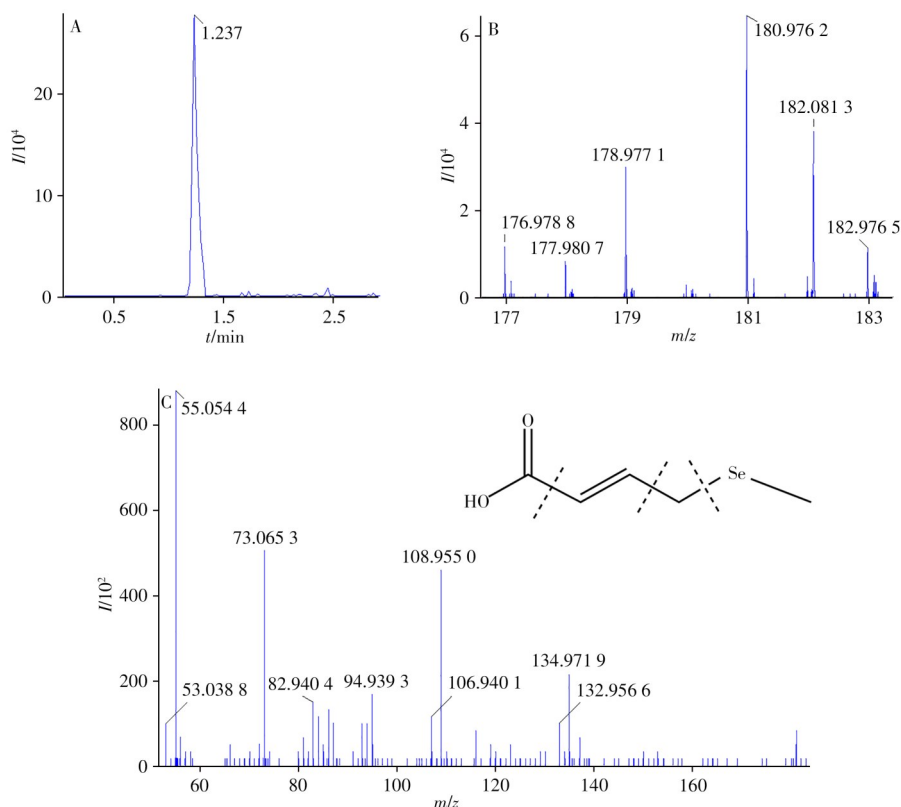


图3 硒化合物 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}$ 的XIC图(A)、MS图(B)、MS/MS图和结构式(C)

Fig. 3 Extracted ion chromatogram(A), MS spectrum(B), MS/MS spectrum and putative chemical structural formula(C) of Se compound $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}$

该前体离子(m/z 为180.9762)相应的TOF MS/MS谱图如图3C所示, 其多数碎片离子符合硒同位素分布模式, 为含硒裂解碎片。将TOF MS/MS谱图与Formula Finder的MS/MS Details相链接, 基于二级质谱拟合出可能的母离子分子式和碎片分子式。结果表明, MS Rank和MS/MS Rank均为1时, 其一级质谱 Δppm 为 -0.2 ppm , RDB值为3, 二级质谱 Δppm 为 5.5 ppm , 分子式与一级质谱拟合出的分子式完全一致, 可以推测该化合物的分子式极有可能为 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}$ 。

该化合物的前体母离子进一步裂解后可能产生的碎片离子如表2所示, 根据Ward等^[20]的报道和SeMet标样的二级谱图, 相似的裂解碎片 CH_3Se 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{Se}$ 、 $\text{C}_4\text{H}_7\text{Se}$ 表明该化合物很可能为SeMet的前体离子($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{Se}^+$)失去 NH_4^+ 后的产物。其次, 裂解碎片 $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$ 为Ouerdane等^[24]报道的2种甲基硒碳水化合物M+H峰的前体母离子 $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Se}^+$ 、 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Se}^+$ 的裂解碎片, 推测该硒化合物的母离子 $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2\text{Se}^+$ 为甲基硒碳水化合物的母离子 $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Se}^+$ 中性丢失 H_2O 分子, 产生的一种新的甲基硒碳水化合物(Methylseleno carbohydrate), 进一步验证了该化合物的结构。将该化合物的结构式导入ChemDraw, 通过Show Analysis Window分析可能的裂解碎片与TOF MS/MS谱图是否一致, 结果表明该结构式满足该化合物的多数裂解碎片, 如 CH_3Se 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{Se}$ 、 $\text{C}_4\text{H}_7\text{Se}$ 、 $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2$ 、 $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$, 最后通过Check Structure功能验证了该化合物结构式的合理性。该甲基硒碳水化合物可能的化学结构式及裂解过程如图3C所示。

2.2.3.3 $C_7H_9NO_2Se$ MS质谱图中, 在 m/z 为219.987 4处, 发现符合硒同位素分布特征的硒化合物母离子, 在总离子流(TIC)图中, 其保留时间为3.79 min。该硒化合物母离子在 m/z 219.987 4处的同位素分布XIC图及相应TOF MS谱图见图4A、B。经Formula Finder进行分子拟合后, 结果表明元素组成为 $C_7H_9NO_2Se$ 时, 其MS Rank为1, Δppm 为1.2 ppm, RDB值为5, 符合基本的化合物元素组成规律。该母离子经二级裂解后产生的TOF MS/MS谱图如图4C所示。基于TOF MS/MS进行Formula Finder分子拟合, 拟合出的分子式中, MS Rank为1, MS/MS Rank为1的元素组成与TOF MS谱图拟合结果一致, 其一级质谱 Δppm 为1.2 ppm, 二级质谱 Δppm 为1.6 ppm, RDB值为5, 是一个多不饱和硒化合物。

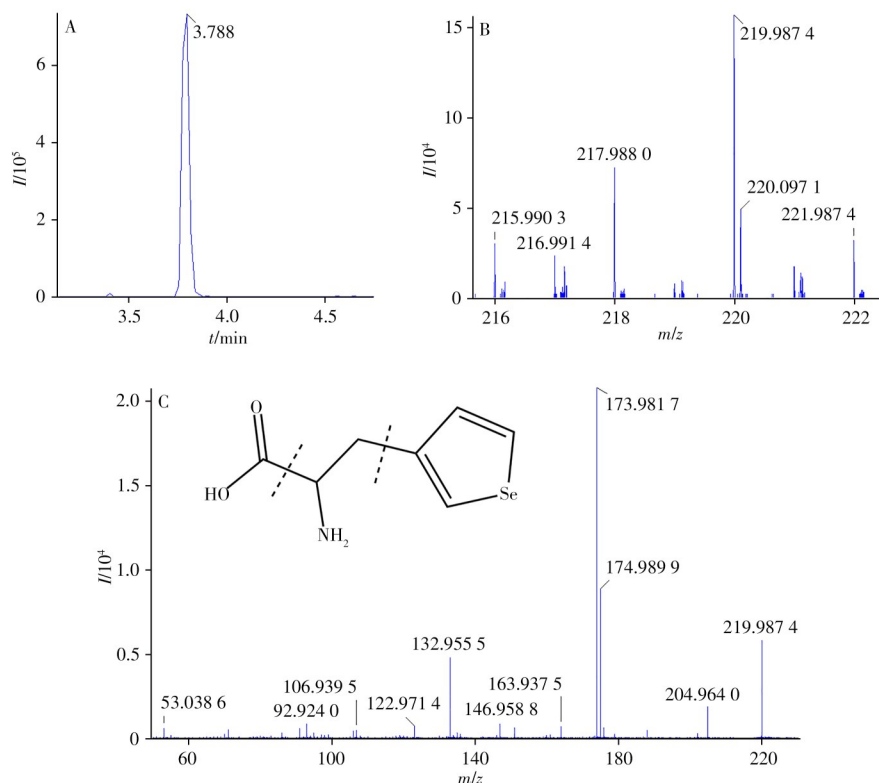


图4 硒化合物 $C_7H_9NO_2Se$ 的XIC图(A)、MS图(B)、MS/MS图和结构式(C)

Fig. 4 Extracted ion chromatogram(A), MS spectrum(B), MS/MS spectrum and putative chemical formula(C) of Se compound $C_7H_9NO_2Se$

在TOF MS/MS谱图中, m/z 173.981 7为响应强度最高的碎片, 其响应强度达到 2×10^4 , 符合硒的质量亏损特征, 表明该硒化合物经二级裂解最可能形成 m/z 173.981 7的含硒裂解碎片离子, 其拟合出的分子式为 C_6H_8NSe , 与硒化合物 $C_7H_9NO_2Se$ 相比, 质量数减少了46 Da, 表明该化合物很可能含有1个羧基($-COOH$), 通过中性丢失失去1个CO和1个 H_2O , 由于该化合物的不饱和度较高(RDB值为5), 存在 C_6H_9NSe 、 C_4H_5Se 、 C_3H_7Se 等裂解碎片, 表明该硒化合物存在1个环状结构且含有2个 $C=C$ 键; 其次, 许多裂解碎片的 m/z 值较大, 表明该硒化合物的硒存在于环状结构中。据此, 通过ChemSpider找出最可能的硒化合物为硒代苯基丙氨酸(Seleno-phenyl-alanine), 导入ChemDraw, 尝试断裂可能的键, 通过Show Analysis Window得到可能的碎片并与TOF MS/MS谱图拟合出的碎片相匹配, 推测硒代苯基丙氨酸可能的结构及裂解途径如图4C所示。

3 结 论

本文采用HPLC-ICP-MS对富硒藁叶碎米荠酶解液中的5种硒形态进行了定量分析; 将酶解液通过3 kDa超滤管去除大分子物质和纯化后, 冷冻干燥浓缩样品中的硒化合物, 避免了复杂的多维色谱纯化过程; 结合UPLC-ESI-Triple TOF MS高分辨质谱鉴定出富硒藁叶碎米荠中15种未知硒化合物,

包括7种已报道和8种未报道的硒化合物,提出了3种未报道硒化合物的可能结构式。鉴定策略为:通过硒的同位素分布和质量亏损特征发现含硒化合物后,利用含硒化合物的MS、MS/MS谱图和Formula Finder拟合出可能的含硒化合物分子式,再通过ChemSpider及文献搜索,找到可能的含硒化合物结构式,最后根据硒化合物的MS、MS/MS谱图和裂解碎片采用ChemDraw验证硒化合物结构式的可靠性。本研究为富硒植物中硒形态分析及未知硒化合物鉴定提供了思路。

参考文献:

- [1] Weekley C M, Harris H H. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(23): 8870–8894.
- [2] Kieliszek M, Błażej S. *Molecules*, **2016**, 21(5): 609.
- [3] Vinceti M, Filippini T, Del Giovane C, Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, Zeegers M P A, Horneber M, D'Amico R, Crespi C M. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2018**, 1(1): CD005195.
- [4] Gupta M, Gupta S. *Front Plant Sci.*, **2016**, 7: 2074.
- [5] Tan J A. *Earth Environment and Health*. Beijing: Chemical Industry Press(谭见安. 地球环境与健康. 北京: 化学工业出版社), **2004**.
- [6] White P J. *Ann. Bot.*, **2016**, 117(2): 217–235.
- [7] Natasha, Shahid M, Niazi N K, Khalid S, Murtaza B, Bibi I, Rashid M I. *Environ. Pollut.*, **2018**, 234: 915–934.
- [8] Liu Y, Chen S Z, Chen Z, Yao X H, Zhou T H, Liu L P. *J. Instrum. Anal.* (刘源, 陈绍占, 陈镇, 姚晓慧, 周天慧, 刘丽萍. 分析测试学报), **2020**, 39(2): 273–277.
- [9] Lü Y N, Song W, Shen G L, Jin Y J. *J. Instrum. Anal.* (吕亚宁, 宋伟, 沈贵兰, 金玉娟. 分析测试学报), **2018**, 37(9): 1087–1091.
- [10] Pyrzynska K, Sentkowska A. *TRAC – Trends Anal. Chem.*, **2019**, 111: 128–138.
- [11] Pyrzynska K, Sentkowska A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2021**, 61(8): 1340–1352.
- [12] Mi X B, Shao S X, Zhang J, Long S Q. *Earth Environ.* (米秀博, 邵树勋, 张静, 龙胜桥. 地球与环境), **2014**, 42(4): 574–581.
- [13] Bierla K, Godin S, Lobinski R, Szpunar J. *TRAC – Trends Anal. Chem.*, **2018**, 104: 87–94.
- [14] Ruszczyńska A, Konopka A, Kurek E, Elguera J C T, Bulska E. *Spectroc. Acta B*, **2017**, 130: 7–16.
- [15] Far J, Preud'homme H, Lobinski R. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 657(2): 175–190.
- [16] Arnaudguilhem C, Bierla K, Ouerdane L, Preud'homme H, Yiannikouris A. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 757: 26–38.
- [17] Preud'homme H, Far J, Gil–Casal S, Lobinski R. *Metallomics*, **2012**, 4(5): 422–432.
- [18] Ouerdane L, Both E B, Xiang J Q, Yin H Q, Kang Y, Shao S X, Kiszalák K, Jókai Z, Dernovics M. *Metallomics*, **2020**, 12(12): 2032–2048.
- [19] Gilbert–López B, Dernovics M, Moreno–González D, Molina–Díaz A. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1060: 84–90.
- [20] Ward P, Chadha M, Connolly C, Stalcup A, Murphy R. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2019**, 439: 42–52.
- [21] Zhu X C, Chen Y P, Subramanian R. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(2): 1202–1209.
- [22] De Vijlder T, Valkenburg D, Lemièrre F, Romijn E P, Laukens K, Cuyckens F. *Mass Spectrom. Rev.*, **2018**, 37(5): 607–629.
- [23] Sato R, Kimura T. *Sci. Synth.*, **2008**, 39: 1101.
- [24] Ouerdane L, Aureli F, Flis P, Bierla K, Preud'homme H, Cubadda F, Szpunar J. *Metallomics*, **2013**, 5(9): 1294–1304.
- [25] Casal S G, Far J, Bierla K, Ouerdane L, Szpunar J. *Metallomics*, **2010**, 2(8): 535–548.
- [26] Németh A, García Reyes J F, Kosúry J, Dernovics M. *Metallomics*, **2013**, 5(12): 1663–1673.

(责任编辑: 丁 岩)