

硒在苹果叶片中的赋存形式

宁婵娟^{1,2,3}, 朱超^{1,3}, 王孟熙⁴, 冀爱青^{2,6}, 杨燕君^{1,3}, 刘晓华^{1,3}, 张燕⁵, 吴国良^{1,3,*}

¹河南农业大学园艺学院, 郑州450002; ²山西农业大学园艺学院, 山西太谷030801; ³河南省果树瓜类生物学重点实验室, 郑州450002; ⁴邓庄镇人民政府, 山西襄汾041599; ⁵信阳农业高等专科学校, 河南信阳464000; ⁶晋中学院生命科学与技术学院, 山西榆次030600

摘要: 通过筛选‘红富士’苹果适宜的叶面施硒浓度, 研究了营养元素硒在苹果叶片中的赋存形式、分布及含硒大分子的提取分离技术。结果表明, (1) ‘红富士’苹果最佳叶面施硒浓度为100 mg·L⁻¹, 此处理的叶片总硒含量为2.7283 mg·kg⁻¹ (FW), 其中有机硒含量为2.3384 mg·kg⁻¹ (FW), 有机化程度达85.71%。(2) 无论在对照组还是处理组, 叶片中的有机硒均主要以蛋白质结合态存在, 平均占有有机硒的77.09%。(3) 蛋白质、多糖和核酸3种有机物在100 mg·L⁻¹最优处理组的叶片中结合硒的量分别占有有机硒含量的77.42%、18.46%和0.54%。(4) 在100 mg·L⁻¹处理组的蛋白质组分中, 又以盐溶性蛋白质结合硒的量最多, 占蛋白质结合态硒含量的46.27%。

关键词: 硒; 赋存形式; 苹果叶片

Combined Forms of Selenium in Apple Leaves

NING Chan-Juan^{1,2,3}, ZHU Chao^{1,3}, WANG Meng-Xi⁴, JI Ai-Qing^{2,6}, YANG Yan-Jun^{1,3}, LIU Xiao-Hua^{1,3}, ZHANG Yan⁵, WU Guo-Liang^{1,3,*}

¹College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; ³Henan Key Laboratory of Fruit and Cucurbit Biology, Zhengzhou 450002, China; ⁴Government of Dengzhuang Town, Xiangfen, Shanxi 041599, China; ⁵Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000, China; ⁶Faculty of Biology Science and Technology, Jinzhong University, Yuci, Shanxi 030600, China

Abstract: Combined forms, distribution of selenium in apple leaves, extraction and separation technologies of macromolecule containing selenium were studied through the selecting of best concentration of selenium for foliar application on ‘Red Fuji’ apple. The results showed that: (1) Selenium of 100 mg·L⁻¹ was the optimal choice for ‘Red Fuji’ apple trees. Treated with this concentration, the total selenium content in apple leaves was 2.7283 mg·kg⁻¹ (FW), including organic selenium 2.3384 mg·kg⁻¹ (FW). Organic degree was 85.71%. (2) Organic selenium mainly existed as protein combined form, which accounted for 77.09% of total organic selenium, both in control group and treatment groups. (3) The combined percentages of selenium with protein, polysaccharide and nucleic acid were 77.42%, 18.46% and 0.54% respectively in apple leaves of optimum treatment 100 mg·L⁻¹. Therefore, Se protein was the main combined form of selenium in apple leaves. (4) Among the protein components, salt-solubility protein combined the most selenium, accounting for protein selenium content 46.27% in optimum treatment 100 mg·L⁻¹.

Key words: selenium; combined forms; apple leaves

硒(Se)是一个典型的双功能元素, 其生物功能不仅取决于其量的多少, 而且与其存在形态密切相关(Navarro-Alarcon和Cabrera-Vique 2008)。与无机硒相比, 有机硒化物具有很高的生物学活性, 且吸收率高、毒性低。植物是将无机硒转化为有机硒的天然化工厂, 也是人和动物摄入硒的直接来源。硒被植物吸收以后, 特异或非特异性地与生物大分子结合, 但进一步转化生成何种含硒物质? 发挥什么样的生理功能? 是近20年来硒的研究热点。

近年来, 关于硒在生物体内的赋存形式已在多种生物中见诸报道(Kapolna等2009; 武芸2008; 张弛等2004, 2007a, b, 2008; 钟鸣和王丽贺2008; Stadlober等2001; Ferri等2007; 刘信平等2006; 左银

收稿 2011-12-12 修定 2012-02-14

资助 国家自然科学基金(31171943)和河南省重大科技攻关项目(92101110600)。

* 通讯作者(E-mail: wugood2002@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63558798)。

虎2008; Wrobel等2004; Kapolna等2007; Chen等2006)。杜明等(2007)从富硒灵芝中得到一种含硒蛋白(Se-GL-P), 并对其进行了生化性质分析; 李乐农等(2000)已从富硒钝顶螺旋藻中提取纯化到含硒藻蓝蛋白, 并应用悬滴气相扩散法得到了该蛋白的两种结晶型。在果树上, 前人的工作仅限于调查硒对果树生理功能的影响和果实中的富硒规律(张玲玲等1995; 呼世斌等1998; 吴国良等2004; 张海英等2010), 而少见有在木本植物体内的吸收和转化规律研究报道。本试验以苹果为试材, 筛选了适宜的叶面施硒浓度, 着重从叶片中提取并分离了不同的含硒组分, 并研究了其中硒的形态、含量及分布, 以期为阐释硒在木本植物体内代谢途径以及为有机硒的开发利用提供理论依据。

材料与amp;方法

1 试验材料

试验于2010~2011年在河南农业大学园艺实验站进行, 以苹果‘红富士’(*Malus domestica* Borkh. cv. ‘Red Fuji’) (砧木为山定子)为试材树, 树龄6年生, 树势中庸, 结果正常, 管理水平一般。试验于5月、6月、7月中旬分别喷施浓度为25、50、100、150、200 mg·L⁻¹ 5个浓度的亚硒酸钠溶液, 以叶面均匀布满雾状水滴为宜。8月中旬于树冠外围的东、南、西、北4个方位中部取新梢中部功能叶用冰壶带回实验室, 自来水冲洗处理后, 滤纸吸干水分, 液氮研磨呈糊状, -70 °C保存备用。试验以未施硒(喷水)的苹果树为对照, 采样树均为3次重复。以处理树和对照树的数据进行对比分析(*t*测验)。

2 试验方法

2.1 总可溶性蛋白硒的提取

准确称取待试苹果叶片粉末15.0 g于三角瓶中, 加入50 mL丙酮, 振荡脱脂3 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后弃上清, 沉淀重复脱脂2次, 挥干丙酮。沉淀中加入pH 8.5 KH₂PO₄-Na₂HPO₄缓冲液50 mL, 振荡提取3 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后取上清液。在残渣中加入30 mL缓冲液重复提取2次, 合并3次所得提取液。上清液加(NH)₂SO₄至饱和, 4 °C静置过夜。离心, 弃上清, 取沉淀透析至用

BaCl₂检测透析水中SO₄²⁻呈阴性为止。将蛋白质转出并定容至50 mL。在残渣中加入pH为6.0的KH₂PO₄-Na₂HPO₄搅拌提取, 步骤同上。

2.2 水溶性蛋白硒的提取

准确称取待试苹果叶片粉末15.0 g, 加入50 mL丙酮, 振荡脱脂3 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后弃上清, 沉淀重复脱脂2次, 挥干丙酮。沉淀加双蒸水50 mL, 搅拌提取3 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后取上清液。在残渣中加入30 mL水重复提取2次, 合并3次所得提取液, 加(NH)₂SO₄至饱和, 4 °C静置过夜。离心, 弃上清, 取沉淀透析至用BaCl₂检测透析水中SO₄²⁻呈阴性为止。将蛋白质转出并定容至50 mL。

2.3 盐溶性蛋白硒的提取

在提取水溶性蛋白后的残渣中加0.5 mol·L⁻¹ NaCl溶液50 mL, 搅拌提取; 其余步骤参照上节步骤(2.2节); 蛋白质溶液定容于50 mL。

2.4 醇溶性蛋白硒的提取

在提取盐溶性蛋白后的残渣中加入70%乙醇50 mL, 搅拌提取; 其余步骤参照2.2节; 蛋白质溶液定容于50 mL。

2.5 碱溶性蛋白硒的提取

在提取醇溶性蛋白后的残渣中加0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液50 mL, 搅拌提取; 其余步骤参照2.2节; 蛋白质溶液定容于50 mL。

2.6 多糖硒的提取

准确称取待试苹果叶片15.0 g, 加入50 mL丙酮, 振荡脱脂3 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后弃上清, 沉淀重复脱脂2次, 挥干丙酮。沉淀加入双蒸水50 mL, 80 °C水浴提取2 h, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min后取上清, 重复提取2次, 合并上清液。上清液加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)剧烈振荡脱蛋白, 静置, 取水相。加入4倍体积95%乙醇, 4 °C静置过夜。次日8 000 r·min⁻¹离心25 min弃上清。沉淀用85%乙醇洗涤3次, 双蒸水溶解定容到100 mL。

2.7 核酸硒的提取

准确称取待试苹果叶片粉末3.0 g, 加入2 mol·L⁻¹ NaCl溶液, 65 °C水浴30 min, 8 000 r·min⁻¹冷冻离心30 min, 取上清。重复提取1次, 合并上清。加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)剧烈振荡脱蛋白, 静置, 取水相。用6 mol·L⁻¹ HCl调pH至2.5。4 °C静置过夜。次日8 000 r·min⁻¹离心25 min弃上清。沉淀用

95%乙醇淋洗3次,用水溶解定容至25 mL。

2.8 无机硒的提取

准确称取待试苹果叶片粉末1.0 g,研磨至糊状,加水30 mL,95 °C水浴加热近沸,保持10 min,冷却定容至50 mL,过滤。滤液加入等体积环己烷摇晃萃取,静置,取水相待测。

2.9 样品硒含量测定

取适量待测样品,置于消化管中,加5 mL消化液(硝酸:高氯酸=4:1),加盖浸泡过夜。次日于60~80 °C加热消化2 h至棕色烟雾冒尽,升温至140 °C继续加热消化至溶液体积约为1 mL。冷却后加入5 mL 6 mol·L⁻¹的盐酸溶液,于70~140 °C加热至溶液清亮透明。冷却后定容至50 mL,过滤。原子荧光分光光度法测定硒含量。

2.10 其他物质含量测定

蛋白质含量用考马斯亮蓝G-250法测定;可溶性糖用硫酸-蒽酮法测定。

实验结果

1 硒在苹果叶片中的赋存形式

为研究叶面施硒后对苹果叶片中硒含量及硒赋存形式的影响,分别测定了对照组和处理组叶片的总硒含量和无机硒含量,有机硒含量=总硒含量-无机硒含量。由图1可见,对照组苹果叶片中的总硒含量为0.2930 mg·kg⁻¹(FW),其中无机硒为0.0863 mg·kg⁻¹(FW),计算出有机硒含量为0.2067 mg·kg⁻¹(FW)。有机化程度为70.55%。叶面喷硒以100 mg·L⁻¹的处理效果最佳,此处理下苹果叶片中的总硒含量为2.7283 mg·kg⁻¹(FW),其中无机硒为0.3899 mg·kg⁻¹(FW),有机硒含量为2.3384 mg·kg⁻¹(FW),有机化程度达85.71%。150和200 mg·L⁻¹的

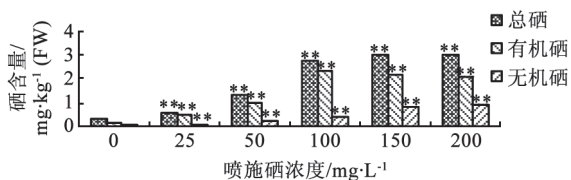


图1 不同硒处理对苹果叶片中硒含量及形态的影响
Fig.1 Effects of different Se treatment on selenium contents and forms in apple leaves

各个富硒处理组与其对照组之间的显著性检验,**代表1%差异显著水平。

处理中,虽然总硒含量仍然略有上升,但有机硒比率开始呈下降趋势。200 mg·L⁻¹处理的叶片出现药斑,显现过量毒害作用。各个处理与其对照组间硒含量差异均达极显著水平,说明苹果树对硒有较好的富集作用,且富集后硒的有机化程度提高。

2 苹果叶片中有机硒形态分布

苹果叶片中有机硒的形态分布结果(图2)显示,硒主要与蛋白质和多糖相结合,最优处理组(100 mg·L⁻¹)中,蛋白硒、多糖硒和核酸硒结合的硒含量分别为1.8104、0.4317和0.0127 mg·kg⁻¹(FW)。在对照组与处理组中,有机态硒的含量分布均较为一致。蛋白质结合态硒为有机硒存在的主要形式,平均占有有机硒77.09%,其次为多糖,平均结合了18.31%的有机硒。核酸也能与硒共价结合,但含量很少,只占有有机硒的0.53%。其他的硒可能与别的组分相结合,如一些有机含硒生物小分子、挥发态硒等,平均占有有机硒的4.07%,各处理组与对照组之间差异均不显著。

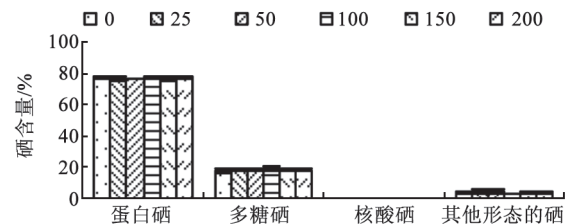


图2 苹果叶片有机硒各组分中硒的分布情况
Fig.2 Distribution of selenium in organic selenium components
各处理浓度单位为mg·L⁻¹。

3 最优富硒处理组叶片蛋白质组分中硒的分布

试验选取最优富硒处理组(100 mg·L⁻¹)叶片为试材,利用蛋白质在不同溶剂中的溶解性将总可溶性蛋白质分为水溶性蛋白、盐溶性蛋白、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白这4组,进一步测定了硒在总蛋白质组分中的分布情况。测定显示,这4种蛋白组分中的含硒量分别为0.1439、0.8376、0.1003和0.7286 mg·kg⁻¹(FW),分布情况见图3。如图3所示,在蛋白硒中,绝大部分硒共价结合于盐溶性蛋白和碱溶性蛋白,分别占蛋白硒的46.27%和39.37%。水溶性和醇溶性蛋白结合的硒分别占7.95%和5.54%。另外0.88%的硒可能是其他溶解性的蛋白,

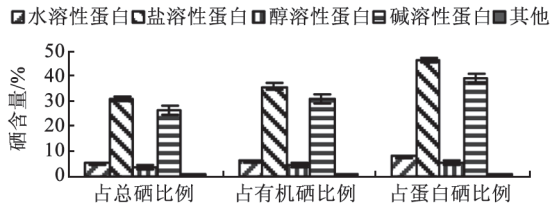


图3 100 mg·L⁻¹Se处理苹果叶片内蛋白质组分中硒的分布情况
Fig.3 Selenium distribution in protein components in apple leaves of treatment of 100 mg·L⁻¹ Se

如酸溶性蛋白, 或者是由于提取过程中的损耗和提取不完全造成的。

4 最优富硒处理组主要含硒大分子物质含量与其含硒量对比

富硒叶片中提取出的主要有机组分分别测定蛋白质含量和多糖含量。对比其物质含量及含硒量, 结果见图4、5。15 g苹果叶片中提取出的总蛋白含量为3.68 mg·g⁻¹ (FW), 占有有机物含量的27.73%, 含硒量占有有机硒的77.42%。而多糖含量虽然多达6.05 mg·g⁻¹ (FW), 占有有机物含量将近一半, 但含硒

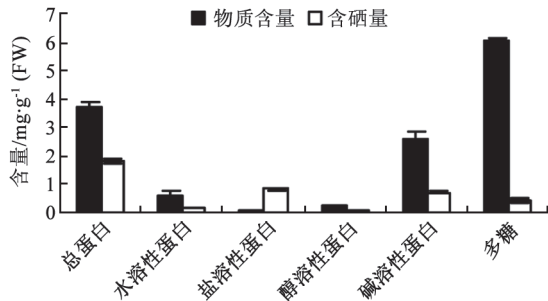


图4 100 mg·L⁻¹富硒组主要有机物质含量与其含硒量对比
Fig.4 Contrast between matter content and selenium content of main organics in Se-riched group of 100 mg·L⁻¹

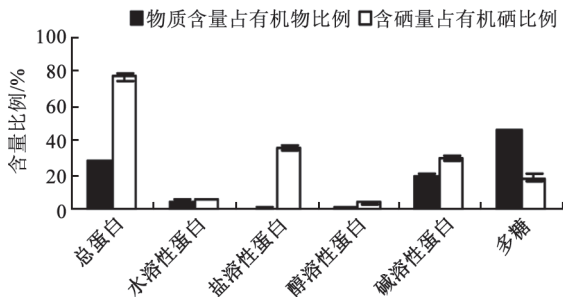


图5 100 mg·L⁻¹富硒组有机物各组分物质含量及硒含量分布
Fig.5 Distribution of matter content and selenium content in organics of Se-riched group of 100 mg·L⁻¹

量却只占有有机硒的18.46%。这说明在苹果叶片内硒主要与蛋白质结合, 蛋白硒是硒的主要赋存形式。

图4、5还显示, 在蛋白硒的各组分子里, 碱溶性蛋白占主要部分, 含量为2.62 mg·g⁻¹ (FW), 占总蛋白含量的71.2%, 含硒量占有有机硒的比例为30.48%。值得注意的是, 盐溶性蛋白的含量为0.09 mg·g⁻¹ (FW), 只占有有机物含量很小的比例, 但其含硒量却高达35.82%, 甚至超过了碱溶性蛋白。这个结果提示我们, 每分子盐溶性蛋白结合的硒最多或者其中含硒蛋白所占比例最高, 在这部分蛋白里最容易进一步纯化分离出高纯度, 甚至单一的含硒蛋白。

讨 论

硒对机体的抗氧化作用引人注目, 这与含硒生物大分子的活性息息相关。按其性质可分为含硒抗氧化酶、非酶含硒蛋白、硒多糖和其他含硒化合物。近年来, 很多人研究了有机硒在生物体内的赋存形式和分布规律, 在果树多个树种上的试验主要集中于对树的吸收规律及果实富集硒的能力方面, 有关硒在木本植物中的赋存形式研究还未见有报道。

目前, 由已报道的研究结果可知, 在富硒绿茶(Du等2007)、玉米(张弛等2007a)、谷类(Stadlober等2001)和油菜(张弛等2004)等作物中, 蛋白硒是有机硒的主要赋存形式; 在蛹虫草子实体中, 有机硒主要与蛋白质、多糖、核酸等生物大分子结合(钟鸣和王丽贺2008); 黑木耳(武芸2008)、南瓜(刘信平等2006)、荸荠(张弛等2007b)和萝卜叶(张弛等2008)中的含硒组分主要有蛋白硒和多糖硒; 但在魔芋中, 多糖硒为硒的主要赋存形式。本试验的结果表明, 苹果叶片能较好的吸收富集微量元素硒。无机硒被吸收以后主要转化为有机形态, 有机化程度在叶片中最高为85.71%。在对照组和处理组的叶片中, 有机硒均主要以蛋白质结合态存在, 平均占有有机态硒的77.09%。这说明硒元素在苹果树体中的吸收和有机化存在稳定的途径, 它不随外界施硒浓度的变化而变化。蛋白质、多糖和核酸都能结合一定量的硒, 3种有机物在最优处理组(100 mg·L⁻¹)中结合硒的量分别占有有机硒含

量的77.42%、18.46%和0.54%。在蛋白质组分中,又以盐溶性蛋白质结合硒的量最多,占蛋白结合态硒含量的46.27%。因此可以说,蛋白硒是硒在苹果叶片内的主要结合形态。

在对蛋白硒的深入研究中又发现,黑木耳、萝卜叶和玉米的蛋白质的组分中,水溶性蛋白质结合硒量最多;富硒绿茶和南瓜中,硒主要与碱溶性蛋白质结合;黑木耳中以70%~80%硫酸铵饱和度盐析的蛋白中硒含量最高;但在蛹虫草和油菜中,又以盐溶性蛋白质结合硒量最多。Ferri等(2007)在马铃薯中的试验结果表明,马铃薯蛋白质中的有机硒含量与硒处理浓度并无相关性。由此可见,不同植物对硒的吸收和积累特性也不同。

基于硫和硒在化学和物理性质上的相似性,人们认为硒是沿着硫的代谢途径进入生物体内(马友华等2001),即 Se^{6+} 的代谢按照与 SO_4^{2-} 相同的途径进行,形成硒的半胱氨酸和氨基酸类似物,硒代半胱氨酸再通过各种代谢途径形成其他含硒有机化合物。但笔者认为在木本植物中硒的吸收代谢途径更为复杂,需要进一步深入探讨。本试验的结果表明,水溶性蛋白、盐溶性蛋白、醇溶性蛋白和碱溶性蛋白均结合了一部分硒,硒含量高低情况为:盐溶性蛋白>碱溶性蛋白>水溶性蛋白>醇溶性蛋白。在对比了主要有机物组分的物质含量及其硒含量之后发现,盐溶性蛋白虽然含量很少,只占有有机物的0.68%,却结合了35.82%的有机硒。这说明盐溶性蛋白里的相对硒含量最高,每分子蛋白结合的硒原子最多。这为含硒蛋白质的进一步分离纯化和表征,甚至得到单一蛋白,并研究其生化特性奠定了基础,从而为探讨硒的代谢机理、生物活性及毒理分析提供了一定的理论依据。

我们最新的研究(刘群龙等2011)显示:梨树施硒具有明显的抗逆作用。但果树的收获器官是果实,其中硒的赋存形式关系到其营养价值的高低和可利用程度。因此,同时开展对苹果叶片和果实中硒的含量及形态研究,对阐明硒的营养学机理更有意义。但是基于大多数果实材料物质构成的限制,其中有机物的进一步分离纯化难度较大。虽然我们已有一些工作基础(吴国良2004),但尚没有系统地对硒在叶片中的吸收量以及转运至果实中的影响因素(诸如许多内在因素及环境条

件,如苹果的品种类型、硒喷洒时期、强度及气候条件等)进行综合研究,相关问题正是本研究正在进行的后续工作。

参考文献

- 杜明,胡小松,王聪,赵广华(2007).富硒灵芝硒蛋白(Se-GL-P)生化性质的初步分析.生物化学与生物物理进展,34(3):299~305
- 呼世斌,冯贵颖,赵晓农,李嘉瑞,薛澄泽(1998).苹果对硒的吸收及其积聚特征研究.西北植物学报,18(1):110~115
- 李乐农,张季平,江涛,郭宝江,常文瑞,梁栋材(2000).富硒螺旋藻中含硒藻蓝蛋白的纯化、结晶及初步晶体学研究.中国科学(C辑),30(5):449~455
- 刘群龙,王荣,吴国良,郝国伟,郝燕燕,孙胜(2011).硒对酥梨叶片衰老及抗氧化酶系统的影响.园艺学报,38(11):2059~2066
- 刘信平,张弛,周大寨,毛良伟(2006).营养元素硒在南瓜中赋存形态及分布研究.食品科学,27(10):61~64
- 马友华,丁瑞兴,张继榛,竺伟民(2001).植物体内硒和硫的相互作用.植物生理学通讯,37(2):161~166
- 吴国良,刘和,刘群龙,阎和健,季兰,王丽萍,王勇(2004).树体自动滴灌微肥对果树生理和果实品质的影响.应用与环境生物学报,10(2):154~157
- 武芸(2008).富硒黑木耳中硒的分布规律及赋存形态的初探.食用菌,5(5):5~6
- 张弛,刘信平,周大寨,贵国强,朱玉昌(2007a).营养元素硒在富硒玉米中的赋存形态及分布研究.食品研究与开发,28(9):25~27
- 张弛,刘信平,周大寨,唐巧玉,朱玉昌,陈金益(2008).富硒萝卜叶中的硒的赋存形态及分布研究.食品科学,29(8):100~102
- 张弛,刘信平,周大寨,唐巧玉,朱玉昌,孙甜华(2007b).荸荠中硒的赋存形态及分布研究.食品科学,28(10):93~96
- 张弛,吴永尧,彭振坤(2004).油菜中硒含量分布和赋存形态研究.湖北农业科学,(2):40~42
- 张海英,韩涛,田磊,王有年,贾海静(2010).桃、枣和草莓对硒的吸收及富集特性研究.果树学报,27(5):802~806
- 张玲玲,张培禄,黄国善,施品忠,倪竹如,陈俊伟(1995).温州蜜柑追施硒肥对果实含硒量的影响.浙江农业科学,(2):70~72
- 钟鸣,王丽贺(2008).蛹虫草中硒的赋存形态及蛋白硒分析.广东微量元素科学,15(3):35~40
- 左银虎(2008).富硒枸杞中硒形态分析.中国食物与营养,(7):55~56
- Chen TF, Wong YS, Zheng WJ (2006). Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. Phytochemistry, 67: 2424~2430
- Du M, Zhao L, Li CR, Zhao GH, Hu XS (2007). Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. Eur Food Res Technol, 224: 659~665

- Ferri T, Favero G, Frasconi M (2007). Selenium speciation in food: preliminary results on potatoes. *Microchem J*, 85: 222~227
- Kapolna E, Hillestrom PR, Laursenb KH, Husted S, Larsen EH (2009). Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem*, 115: 1357~1363
- Kapolna E, Shah M, Caruso JA, Fodor P (2007). Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chem*, 101: 1398~1406
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*, 400: 115~141
- Stadlober M, Sager N, Irgolic KJ (2001). Effects of selenate supplemented fertilization on the selenium level of cereals—identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chem*, 73: 357~366
- Wrobel K, Wobel K, Kannamkumarath SS, Caruso JA, Wysocka IA, Bulska E, Świąjtek J, Wierzbicka M (2004). HPLC-ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves—a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chem*, 86: 617~623