

团 体 标 准

T/CCAA xx—xxxx

植物性富硒产品中 6 种硒形态的测定 液相 色谱-电感耦合等离子体质谱法

Determination of six selenium species in plant-based selenium-enriched
products by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass
spectrometry

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

XXXXX 协会 发布

目次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂与材料	1
6 仪器与设备	3
7 测定步骤	3
8 结果计算	4
9 精密度和灵敏度	5
附录 A	6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由XXXXX协会提出并归口。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件起草单位：湖北省食品质量监督检验研究院（湖北食品、保健食品、化妆品质量安全检测中心）、中国农业科学院油料作物研究所、武汉轻工大学、湖北民族大学、恩施德源硒材料工程科技有限公司、湖北省硒产业协会。

本文件主要起草人：林津、耿雅雯、冯灏、刘杰、李涛、张莉、黄茜、万旭刚、周陶鸿、张涛、陈曦、顿小玲、陈振娜、匡列琼、刘卓、丛欣、刘海远、储震、姜俊、史锦花、王超。

植物性富硒产品中 6 种硒形态的测定 液相色谱-电感耦合等离子体 质谱法

1 范围

本文件描述了液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定方法测定植物源性富硒产品中 6 种硒元素形态的术语和定义、原理、试剂与耗材、仪器与设备、测定步骤、结果计算、精密度和灵敏度。

本文件适用于植物源性富硒产品中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒代乙硫氨酸含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

3.1 硒形态

指硒存在的特定化学形式。自然界中硒以四种价态存在：零价的原子态和正四价、正六价三种电荷态，按其化学结合形态大致又分为单质硒、纳米硒、无机硒和有机硒。

注：硒酸根和亚硒酸根是氧化态下的无机硒形态。硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒代乙硫氨酸等是具有代表性的有机硒形态。

4 原理

试样中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代乙硫氨酸，用蛋白酶水解提取，离心净化后，经高效液相色谱反相色谱柱分离，电感耦合等离子体质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.2 一水合柠檬酸（ $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，CAS号:5949-29-1）：优级纯。

5.1.3 己烷磺酸钠（ $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}$ ，CAS号:2832-45-3）：色谱纯。

5.1.4 链霉菌蛋白酶（CAS号:9036-06-0）：酶活力 ≥ 3.5 U/mg。

T/CCAA xx-xxxx

5.1.5 蛋白酶K(CAS号:39450-01-6): 酶活力 ≥ 30 U/mg。

5.1.6 三羟甲基氨基甲烷($C_4H_{11}NO_3$, CAS号:77-86-1)。

5.1.7 盐酸(HCL): 12 mol/L。

5.1.8 氨水($NH_3 \cdot H_2O$): 色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(70 mmol/L, pH 7.5): 称取 4.240 g 三羟甲基氨基甲烷溶于 450 mL 水中, 用盐酸(5.1.7)调节 pH 至 7.5, 加水稀释定容至 500 mL, 摇匀。

5.2.2 蛋白酶 K 溶液(3 mg/mL): 称取蛋白酶 K(5.1.5) 150 mg, 用 Tris-HCl 缓冲溶液(5.2.1)定容至 50 mL, 摇匀, 现配现用。

5.2.3 链霉蛋白酶溶液(3 mg/mL): 称取链霉蛋白酶(5.1.4) 150 mg, 用 Tris-HCl 缓冲溶液(5.2.1)定容至 50 mL, 摇匀, 现配现用。

5.2.4 流动相(15 mmol/L 柠檬酸+5 mmol/L 己烷磺酸钠+1%甲醇, pH 5.2): 分别称取一水合柠檬酸(5.1.2) 2.837 g、己烷磺酸钠(5.1.3) 0.846 g, 溶于水中, 摇匀, 用氨水(5.1.8)调节 pH 至 5.2, 加入 10 mL 甲醇(5.1.1), 加水稀释定容至 1000 mL, 超声脱气 10 min, 现配现用。

5.3 标准品

5.3.1 硒酸钠(Na_2SeO_4 , CAS 号:13410-01-0): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.3.2 亚硒酸钠(Na_2SeO_3 , CAS 号:10102-18-8): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.3.3 硒代胱氨酸($C_6H_{12}N_2O_4Se_2$, CAS 号:29621-88-3): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.3.4 甲基-硒代半胱氨酸($C_4H_9NO_2Se$, CAS 号:26046-90-2): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.3.5 硒代蛋氨酸($C_5H_{11}NO_2Se$, CAS 号:3211-76-5): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.3.6 硒代乙硫氨酸($C_6H_{13}NO_2Se$, CAS 号:2578-27-0): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准溶液。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 硒酸根标准贮备溶液(1000 mg/L, 以 Se 计): 准确称取硒酸(5.3.1) 23.9 mg(精确至 0.01 mg)置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存, 有效期 1 个月。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.2 亚硒酸根标准贮备溶液(1000 mg/L, 以 Se 计): 准确称取亚硒酸钠(5.3.2) 21.9 mg(精确至 0.01 mg)置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存, 有效期 1 个月。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.3 硒代胱氨酸标准贮备溶液(1000 mg/L, 以 Se 计): 准确称取硒代胱氨酸(5.3.3) 21.2 mg(精确至 0.01 mg)置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存, 有效期 1 个月。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.4 甲基-硒代半胱氨酸标准贮备溶液(1000 mg/L, 以 Se 计): 准确称甲基-硒代半胱氨酸(5.3.4) 23.1 mg(精确至 0.01 mg)置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存, 有效期 1 个月。或

经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.5 硒代蛋氨酸标准贮备溶液（1000 mg/L，以 Se 计）：准确称取硒代蛋氨酸（5.3.5）24.8 mg（精确至 0.01mg）置于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存，有效期 1 个月。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.6 硒代乙硫氨酸标准贮备溶液（1000 mg/L，以 Se 计）：准确称取硒代乙硫氨酸（5.3.6）26.6 mg（精确至 0.01 mg）置于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。于 0-4 °C 储存，有效期 1 个月。或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

5.4.7 混合标准工作液（1.0 mg/L，以 Se 计）：分别准确量取 0.1 mL 标准储备液(5.4.1、5.4.2、5.4.3、5.4.4、5.4.5、5.4.6)于 100 mL 容量瓶中，用水稀释并定容至刻度，现用现配。

5.4.8 混合标准系列溶液：准确移取 1.00 mL 混合标准工作液（5.4.7）于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，配制成 100 μg/L（以 Se 计）的中间标准溶液。临用前，分别准确移取该中间标准溶液 0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL 于一组 6 个 10 mL 容量瓶中，用流动相定容至刻度，摇匀，配制成浓度分别为 1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L（以 Se 计）的混合标准系列工作溶液。该系列溶液应现用现配。

5.5 材料

针系滤膜：水系，0.22 μm。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-电感耦合等离子质谱仪：四极杆质量分析器，配有碰撞反应池。

6.2 电子天平：感量分别为 0.00001 g 和 0.001 g。

6.3 涡旋混合仪。

6.4 高速离心机：转速 ≥ 8000 r/min。

6.5 恒温振荡器。

6.6 pH 计：精确至 0.1。

6.7 超声波清洗器。

6.8 移液器：量程为 10~100 μL 和 100~1000 μL。

6.9 网筛：孔径 425 μm。

6.10 试样制备设备：匀浆机、高速粉碎机。

7 测定步骤

7.1 试样制备

7.1.1 干样

取不低于 200 g（精确至 0.001 g）样品置于匀浆机（6.10）中粉碎、过网筛（6.9），制成待测样，于常温密封保存备用。

7.1.2 鲜样

取不低于 1000 g（精确至 0.001 g）样品置于匀浆机（6.10）中匀浆，制成待测样，于 -18 °C 密封保

存备用。

7.2 样品提取

7.2.1 称取干样（7.1.1）0.5 g（精确至 0.001 g）或鲜湿样（7.1.2）2 g（精确至 0.001 g），置于 50 mL 聚丙烯离心管中。分别加入 5 mL 蛋白酶 K 溶液（5.2.2）和链霉蛋白酶溶液（5.2.3），涡旋混匀，置于 37 °C、150 r/min 的恒温振荡培养箱中振荡提取 9 小时。提取完毕后，以 10000 r/min 离心 10 分钟，取上层清液 1.0 mL 至 10 mL 刻度试管中，用流动相定容至 5 mL，混匀，经 0.22 μm 滤膜过滤，待测。同时做空白试验。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：SB-Aq反相色谱分析柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)或相当者；
- b) 流动相组成：15 mmol/L柠檬酸+5 mmol/L己烷磺酸钠+1 %甲醇（pH 5.2）
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 进样体积：50 μL。

7.3.2 电感耦合等离子体质谱检测参考条件

- a) 射频功率：1200 W-1550 W；
- b) 载气：氩气（纯度≥99.99 %）
- c) 载气流量：0.85 L/min；
- d) 补偿气流量：0.15 L/min；
- e) 检测质荷比(m/z)：Se：78。

7.4 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液分别转移至液相进样小瓶中，按照浓度由低到高依次进样测定不同形态的离子计数，以标准系列工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，得到标准曲线回归方程。

7.5 定性定量测定

根据标准溶液的色谱保留时间定性。依次将空白溶液和试样溶液注入液相色谱-电感耦合等离子质谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代乙硫氨酸的响应值应在仪器线性响应范围内，否则应适当稀释待测液。6 种硒形态混合标准溶液色谱图见附录 A。

8 结果计算

试样中硒酸根，亚硒酸根，硒代胱氨酸，甲基硒代半胱氨酸，硒代蛋氨酸，硒代乙硫氨酸的含量（以 Se 计）以质量分数表示，按式（1）计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒代乙硫氨酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——样液中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒代乙硫氨酸的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_0 ——空白试液中硒酸根、亚硒酸根、硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒代乙硫氨酸的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

m ——试样溶液所代表试样的质量，单位为克（g）；

V ——试样溶液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

1000——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示。当含量 $\geq 1.00\text{mg/kg}$ 时，计算结果保留三位有效数字；当含量 $< 1.00\text{mg/kg}$ 时，计算结果保留两位有效数字。

9 精密度和灵敏度

9.1 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

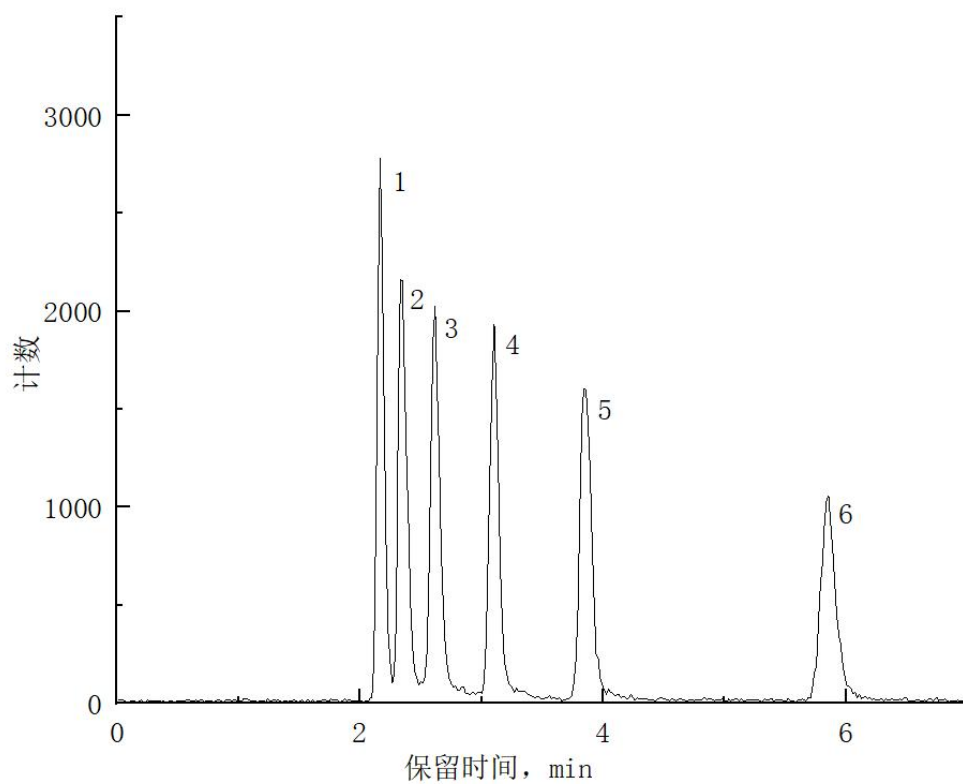
9.2 灵敏度

本方法硒酸根、亚硒酸根检出限为 0.01 mg/kg ，硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸检出限为 0.02 mg/kg ，硒代乙硫氨酸检出限为 0.03 mg/kg ；本方法硒酸根、亚硒酸根定量限为 0.04 mg/kg ，硒代胱氨酸、甲基-硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸定量限为 0.05 mg/kg ，硒代乙硫氨酸定量限为 0.08 mg/kg 。

附录 A

(资料性附录)

A 6 种硒形态混合标准溶液色谱图 (10 $\mu\text{g/L}$)



标引序号说明:

- 1——硒酸根;
- 2——亚硒酸根;
- 3——硒代胱氨酸;
- 4——甲基-硒代半胱氨酸;
- 5——硒代蛋氨酸;
- 6——硒代乙硫氨酸;