

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T 1429—2023

农产品中五种硒元素形态的测定  
高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法

Determination of five kinds of selenium speciation in agricultural products—High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

行业标准信息服务平台

2023 - 09 - 13 发布

2024 - 03 - 01 实施

## 前 言

本文件依据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。

本文件由中华全国供销合作总社提出并归口。

本标准负责起草单位：中华全国供销合作总社北京商业机械研究所、南京恒宝田功能农业产业研究院有限公司、赣州市综合检验检测院、安徽科技学院、贵州硒谷生物科技有限公司、苏州硒谷科技有限公司、阳泉市农业农村局、广西大学、苏州科技大学、浙江省地质院（自然资源部平原区农用地生态评价与修复工程技术创新中心）、西交利物浦大学、安康市富硒产品研发中心、宜春市硒资源开发利用中心、樟树市农业农村局农业技术推广中心、南京大学（苏州）高新技术研究院、赣南科学院、苏州农业职业技术学院、安徽省质量和标准化研究院、农业农村部富硒产品开发与质量控制重点实验室、苏州尧智生态环保科技有限公司、苏州市相城检测股份有限公司、河北省粮食及食品产业技术研究院（河北省富硒小麦产业技术研究院）分院、安徽硒谷生物科技有限公司。

本标准主要起草人：尹雪斌、杨荣、张泽洲、臧佳、王张民、赵方慧、刘志奎、岳润庆、杨智明、王玫、沈乐丞、李孟奇、牛珊珊、宋佳平、谢永刚、聂小平、唐德剑、刘瑛、孙辰璐、陆晓奇、刘颖、李飞、袁林喜、刘广、韦燕燕、祁蒙、张建芳、庄起帆、张洪铭、张斐斐、郑庆、冯增锁。

行业标准信息服务平台

# 农产品中五种硒元素形态的测定

## 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法

### 1 范围

本文件规定了高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定农产品中五种硒元素形态的术语和定义、原理，规定了其试剂和材料、仪器和设备、样品制备、分析测定、结果计算与表述和精密度。

本文件适用于农产品中亚硒酸根离子、硒酸根离子、硒代胱氨酸、L-硒-甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸五种硒形态以硒计含量的测定。

本文件中亚硒酸根离子、硒酸根离子、硒代胱氨酸、L-硒-甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的方法定量限均为0.005 mg/kg。

### 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 5009.93 食品安全国家标准 食品中硒的测定

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**硒元素形态** Selenium speciation

指该硒元素在不同种类化合物中的表现或分布形式，包括电荷/氧化态、有机金属化合物（共价键）等。硒元素在自然界中以多种形态存在，包括无机形态和有机形态。

注1：硒酸根（ $\text{SeO}_4^{2-}$ ）和亚硒酸根（ $\text{SeO}_3^{2-}$ ）是氧化态下的无机硒形态。

注2：有机硒硒代胱氨酸（SeCysSeCys）、硒代蛋氨酸（SeMet）以及L-硒-甲基硒代半胱氨酸（MeSeCys）等是代表性有机硒化合物，主要存在于生物体内以及食物来源中。

#### 3.2

**硒元素形态分析** Selenium speciation analysis

对样品中硒元素的一个或多个元素形态的定性和定量分析活动。

### 4 原理

样品经蛋白酶和纤维素酶酶解后，将与蛋白质结合或多肽中的硒代氨基酸释放在酶提取上清液中，利用高效液相强阴离子交换色谱柱有效分离，再利用电感耦合等离子体质谱的检测获得各个硒形态的分离色谱图，根据归一化法测得各个硒形态所占总硒的百分比，并计算各硒形态含量（以硒计）。

### 5 试剂和材料

- 5.1 甲醇：色谱纯。
- 5.2 柠檬酸二铵（CAS 号：3012-65-5）：色谱纯。
- 5.3 蛋白酶 XIV：酶活力 $\geq 5.5$  U/mg。
- 5.4 二氯甲烷：色谱纯。
- 5.5 硒代胱氨酸（CAS 号：29621-88-3）： $>99.0\%$ 。
- 5.6 硒代蛋氨酸（CAS 号：3211-76-5）： $>98.0\%$ 。
- 5.7 L-硒-甲基硒代半胱氨酸（CAS 号：26046-90-2）： $>98.0\%$ 。
- 5.8 亚硒酸钠（CAS 号：10102-18-8）：色谱纯。
- 5.9 硒酸钠（CAS 号：13410-01-0）：色谱纯。
- 5.10 SELM-1 富硒酵母：硒代蛋氨酸（SeMet） $3190 \pm 260$  mg/kg。
- 5.11 纤维素酶：酶活力 $\geq 5.0$  U/mg。
- 5.12 Sep-Pak C18 固相萃取小柱。

## 6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪（HPLC-ICP-MS）。
- 6.2 天平。
- 6.3 pH 计：精度为 0.1。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 控温电热板。
- 6.6 数显恒温振荡器。
- 6.7 大容量离心机。
- 6.8 真空冷冻离心浓缩仪。
- 6.9 超纯水仪。

## 7 试剂配制与样品制备

### 7.1 试剂配制

流动相配制：称取 1.13 g 柠檬酸二铵（5.2）于流动相专用瓶，并向瓶中加入 980 mL 去离子水（ $18.2$  M $\Omega$ ·cm）和 20 mL 甲醇（5.1），使用 10% HCl 将 pH 调至 5.3 后经  $0.22$   $\mu$ m 滤膜对流动相进行抽滤，超声 15 min 脱气。

标准溶液配制：以去离子水（ $18.2$  M $\Omega$ ·cm）为溶剂，分别制备硒代胱氨酸（SeCysSeCys）（5.5）、硒代蛋氨酸（SeMet）（5.6）、L-硒-甲基硒代半胱氨酸（MeSeCys）（5.7）、亚硒酸根（Se<sup>4+</sup>）（5.8）以及硒酸根（Se<sup>6+</sup>）（5.9）五种硒形态标准样品 1000 mg/L（以硒计）储备液。配制后  $-20$  °C 保存，上机检测前配制五种硒形态等量混合标准溶液，并其逐级稀释至 100  $\mu$ g/L，且可依据样品中各硒形态质量浓度水平，适当调整标准系列中各硒形态质量浓度范围。

### 7.2 样品制备

样品经冷冻干燥后在液氮环境下粉碎或研磨至粉末状，过 100 目筛，样品制备后装袋，写明日期、样品信息、细度等，放入干燥器储存、备用。

称取 1 g（精确至 0.0001 g）制备后的样品于 40 mL 玻璃瓶中，向装有样品的玻璃瓶中加入 0.05 g 蛋白酶 XIV（5.3）和 0.05 g 纤维素酶（5.11），加入 15 mL 去离子水（ $18.2$  M $\Omega$ ·cm）以及 10 mL 甲醇，盖上

聚四氟乙烯盖子，振荡器上振荡摇匀后水浴超声酶解，37℃超声30 min（功率80 W，频率40 kHz），超声后震荡200 r/min，37℃恒温振荡器中振荡12 h。

### 7.3 样品提取、浓缩与除杂

向已充分酶解样品中加入10 mL二氯甲烷（5.4），震荡1 min后置入离心机，1500 r/min，离心10 min，将所有的上层甲醇-水相（25 mL）转移至50 mL锥形聚丙烯管中，从锥形聚丙烯管中准确吸取5.0 mL样品酶解上清液，转移至平底锥形瓶，待测总硒。

剩余20 mL上清液，置入真空冷冻离心浓缩机（6.8）中，冷阱温度设置为-105℃，直至完全干燥。取出干燥样品用2 mL去离子水（18.2 MΩ·cm）复溶，溶液过Sep-PakC18固相萃取小柱（5.12）纯化后，用3 mL甲醇洗脱，再经冷冻离心浓缩机去除多余甲醇，浓缩至小于2 mL后转移至进样瓶中，用去离子水定容至2 mL后，待测硒形态。

## 8 分析测定

### 8.1 仪器参考条件

仪器参考条件按附录A执行。

### 8.2 定性分析

样品中五种硒形态色谱峰保留时间与标准溶液一致（变化范围在±2.5%之内），则可判断样品中存在对应的待测硒形态。标准溶液色谱图参见附录B。

### 8.3 定量分析

采用归一化法对样品硒形态进行定量分析。其中，样品和样品酶解上清液总硒含量按照 GB 5009.93 的规定进行测定。

## 9 结果计算与表述

设样品中各个硒形态共有n种，样品中各个硒形态含量（以硒计）占总硒的比值为分别为 $\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_n$ ，按照公式（1）计算；样品中经过纤维素酶以及蛋白酶XIV水解后溶于25 mL溶剂中的总硒含量与样品总硒含量的比值为酶解液提取率R，按照公式（2）计算；各个硒形态以硒计含量为 $C_i$ ，按照公式（3）计算。

$$\omega_i = \frac{\int i A_i}{\sum_{i=1}^n \int i A_i} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$R = \frac{C_l \times V}{C_s \times m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$C_i = \omega_i \times R \times C_s \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$\omega_i$  ——样品第i种硒元素形态占酶解液中总硒含量的百分比；

- $f_i A_i$  ——样品第  $i$  种硒元素形态色谱图中的积分面积（未知硒形态也需求得积分面积）；
- $n$  ——样品中液相色谱强阴离子交换柱所保留的所有硒形态的个数；
- $R$  ——酶解液提取率；
- $C_t$  ——样品中经过纤维素酶以及蛋白酶 XIV 水解后溶于溶剂中以硒计的总硒质量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- $V$  ——样品酶解时定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；
- $C_s$  ——样品总硒含量，单位为毫克每千克（ $\text{mg/kg}$ ）；
- $m$  ——样品称样量，单位为克（ $\text{g}$ ）；
- $C_i$  ——样品中各个硒形态以硒计含量，单位为毫克每千克（ $\text{mg/kg}$ ）。

## 10 精密度

测样前检测五种硒形态标准溶液（ $100 \mu\text{g/L}$ ，以硒含量计），并对不同形态出峰面积进行积分后对比各形态峰面积，五种硒形态峰面积的相对标准偏差（RSD）应小于 1% 以确保归一化法的准确性。

使用 SELM-1 富硒酵母（5.10）作为硒代氨基酸形态标准物质，将 SELM-1 用去离子水（ $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）稀释 10 000 倍后，同批次进行硒形态检测分析，并对其回收率进行评估，硒代蛋氨酸回收率应在 80%-120% 范围内。样品在重复性条件下获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

行业标准信息服务平台

## 附录 A

(资料性)

## 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪参考工作条件

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪参考工作条件见表A.1。

表 A.1 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪参考工作条件

HPLC 工作参数	最佳条件设定值
色谱柱 (Column)	4.1 mm×250 mm×10 μm
流速 (Flow rate)	1.0 mL/min
进样量 (Injection volume)	100 μL
柱温 (Column temperature)	25 °C
ICP-MS 工作参数	最佳条件设定值
前级功率 (Forward power)	低于 1600 w
氩气流速 (Carrier gas flow)	1.02 L/min
氢氦混合碰撞池气体流速 (CCT gas flow)	0.72 mL/min
检测同位素 (Monitored isotopes)	<sup>78</sup> Se
驻留时间 (Dwell time)	100 ms

行业标准信息平台

附录 B

(资料性)

五种硒形态标准溶液色谱图

五种硒形态标准溶液色谱图见图B.1。

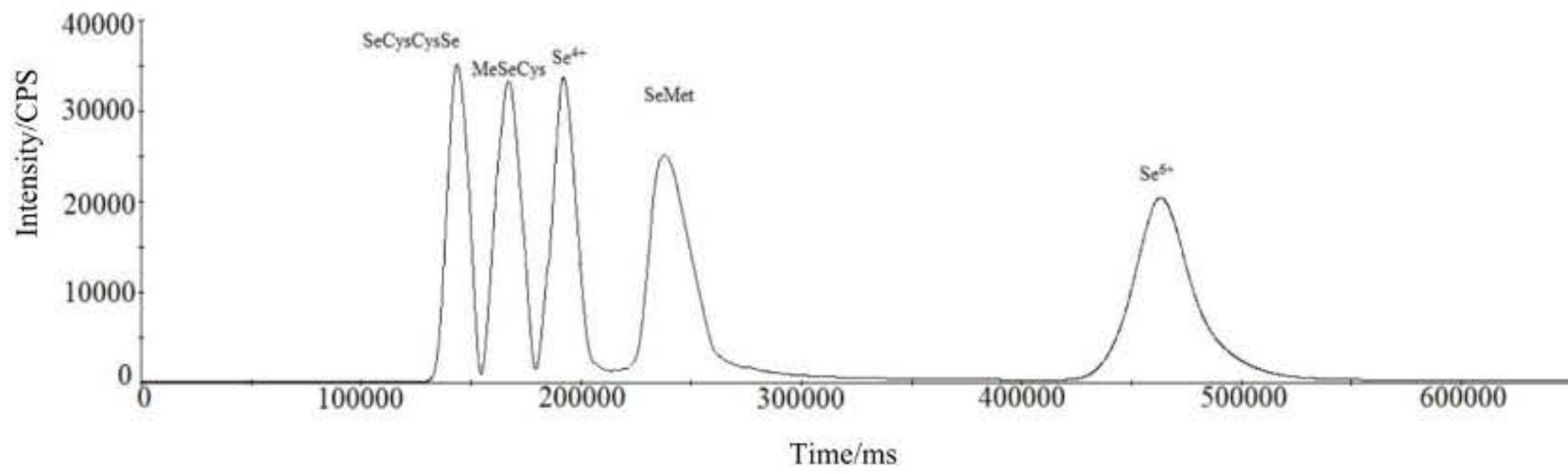


图 B.1 五种硒形态标准溶液色谱图

注：

- SeCysSeCys 硒代胱氨酸；
- MeSeCys L-硒-甲基硒代半胱氨酸；
- Se<sup>4+</sup> 亚硒酸根离子；
- SeMet 硒代蛋氨酸；
- Se<sup>6+</sup> 硒酸根离子。

行业标准信息平台