

《富硒农产品中 5 种硒的测定 离子色谱-电感耦合等
离子体质谱法》

方法编制说明

2020 年 10 月

目 录

一、目的意义.....	1
二、编制工作简况.....	2
1.任务来源.....	2
2.编写经过.....	2
三、编写的原则.....	2
四、主要技术内容说明.....	2
1.仪器方法的建立.....	2
2.样品提取条件的确定.....	3
3.方法线性关系和检出限.....	4
4.方法准确度.....	4
5.方法精密度.....	4
6.结论.....	5
五、标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性.....	5
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	5
七、标准性质的建议和说明.....	5
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	5
九、废止现行相关标准的建议.....	5
十、其它应予说明的事项.....	5

一、目的意义

硒是一种人体必需的微量元素，在体内充当多种含硒酶如谷胱甘肽过氧化物酶的活性中心，发挥着抗氧化，保护细胞膜免受氧自由基氧化损伤的作用。此外还具有提高机体免疫力以及消除重金属积累和毒性等生理生化功能。人体缺硒可以导致克山氏病、大骨节病等一系列疾病，补硒可以预防相关疾病的发生。目前市场上出现了许多富硒农产品和保健品，如富硒水果、富硒蔬菜、富硒大米、富硒鸡蛋等。硒的生物功能与其化学形态和含量密切相关，仅测量体系中元素的总量已不能满足研究该元素在体系中的生理、毒理作用的需要，研究它们的含量及形态对其品质评价具有重要的意义。因此要全面研究硒的生物学意义，形态分析（确定样品中元素的一种或多种化学形态的定性和定量分析）十分必要。

我国是世界上缺硒最为严重的国家之一，富硒产品的社会需求巨大。但是，硒的有益剂量和毒性剂量之间范围极窄，特别是不同赋存形态功效差异大，对富硒产品进行科学规范生产和客观评价显得尤为重要。研究表明，硒的每日摄入量在 55-220 μg ，当日最低摄入量为 17 μg （以预防克山病发生为界限），而过量的硒会导致在硒慢性中毒。

此外，富硒农产品中硒的赋存形态决定了其品质优劣。但目前尚无测定食品中硒形态的国家标准，硒的检测国家标准主要有 GB 5009.93-2017《食品中硒的测定》、GB 1903.22-2016《食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉》。GB 5009.93-2017 方法是对食品中总硒的测定，不能对硒的形态进行分析，从而不能正确的了解和评价香菇中硒的形态分布，以及对人体健康的作用。GB 1903.22-2016 方法采用纯水磁力搅拌的方式提取，无法有效的将样品中多种形态的硒提取出来。本标准建立了以蛋白酶 E + 柠檬酸（5 mmol/L）为提取试剂，恒温水域振荡和超声波萃取法作为前处理，样品溶液经离子色谱(IC)分离后，用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定，方法简单快速，可以同时测定两种无机硒和三种有机硒。

本项目的实施将采用 IC-ICP-MS 技术，样品经酸提取液提取，离子色谱分离，ICP-MS 检测，最终实现植物产品中硒代半胱氨酸（SeCys）、甲基硒代半胱氨酸（MeSeCys）、硒代蛋氨酸（SeMet）、亚硒酸盐[Se(IV)]和硒酸盐[Se(VI)]的定性定量测定。项目从离子色谱和质谱检测条件优化，以及样品提取条件的确立等方面入手，对提高方法的准确度、灵敏度、精密度等方面有着重要的意义，该方法的建立也为企

业相关产品推广，政府食品安全监管提供了技术支持和标准依据。

二、编制工作简况

1. 任务来源

2017年大连市高层次人才创新支持计划，即科技之星支持计划。

2. 编写经过

(1) 根据2017年大连市高层次人才创新支持计划项目《富硒农产品中硒的形态研究及质量评价》的相关成果，课题组对现有相关国家标准进行论证，成立标准起草小组。

(2) 标准起草小组分别于2020年10月19日、10月27日日召开两次小组会，形成标准初稿。为确定方法的分析步骤、仪器测试条件及方法各项技术参数的评价，在本单位和相关协作实验室进行了大量的方法研究、验证和数据统计，在广泛的调查研究和必要的试验验证的工作基础上，根据GB/T 1.1《标准化工作导则第一部分：标准的结构和编写规则》及GB/T 20001.4《标准编写规则第4部分：化学分析方法》所规定的内容和格式编写完成了《富硒农产品中5种硒的测定 离子色谱-电感耦合等离子体质谱法》方法草案。

(3) 经过修改后进行了方法验证，形成了《富硒农产品中5种硒的测定 离子色谱-电感耦合等离子体质谱法》征求意见稿。

(4) 2021年1月初，向大连市标准化协会提交了团体标准申请。申请材料包括标准征求意见稿、编制说明等相关文件。

三、编写的原则

本标准按GB/T1.1-2020《标准化工作指导则 第1部分：标准的结构和编写规则》和GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定编写。编制原则是参考国内外其他行业最新的检测方法，同时考虑现有检测机构的检测能力和实际情况来制定完成的，以确保标准的科学性、先进性、可行性和操作性。

四、主要技术内容说明

1. 仪器方法的建立

磷酸盐体系和柠檬酸体系是元素形态分析常用的流动相体系，实验表明，采用磷酸盐体系由于受离子效应影响，灵敏度明显较柠檬酸体系灵敏度低，由于电感耦合等离子体质谱对硒的响应相对比较低，灵敏度对检测至关重要，柠檬酸为纯有机酸，在质谱上有明显的增敏效应，因此优先选择柠檬酸作为流动相。实验分别配制 5 mmol/L、10 mmol/L 和 20 mmol/L 三种浓度的柠檬酸溶液，充分溶解后用氨水调节 pH 值，每种梯度 pH 调节范围为 4~6 进行正交实验。实验表明，柠檬酸浓度和 pH 越高，分离度越差。当柠檬酸浓度为 5 mmol/L，pH 为 5.0 时分离度及峰型较好，pH 为 4.0 时六价硒[Se(VI)]在 20 min 无法看到，因此选择柠檬酸浓度为 5 mmol/L，pH 为 5.0 做为流动相，并加入 1%的甲醇起到进一步增加灵敏度和降低柱压的效果。

2. 样品提取条件的确定

目前硒形态分析的前处理提取方法较多，有水提取法、酸提取法、碱提取法、有机溶剂提取法和酶提取法，往往形态分析只有好的回收率是不够的，还要有好的提取率，很多人采用了水等作为提取试剂，虽然获得了较好的加标回收率，但对以蛋白形式结合的 SeCys₂、SeCys 提取效率低，总提取率不足 30%。本方法同时对比了纯水、硝酸溶液（1%）、盐酸（1%）、柠檬酸（5 mmol/L）作为提取试剂在不同温度下对硒形态的影响，超声时间 20 min。结果表明，5mmol/L 柠檬酸稳定性较好，五种硒形态的加标回收率均在 89%以上，其中无机硒的回收率达到了 94%以上，说明在超声过程中 5mmol/L 柠檬酸（pH=5）溶液常温下更有效的维持混合液中各硒形态的稳定性。在硝酸溶液（1%）和盐酸溶液（1%）中 SeCys₂ 的加标回收率远小于其他各组的加标回收率，说明在超声提取的过程中 pH 对 SeCys₂ 的稳定性影响较大。SeCys₂ 中含有较容易被破坏的 Se-Se 键，温度与超声过程中的外力作用共同作用下，会使其中部分 SeCys₂ 的 Se-Se 键发生断裂，从而改变了部分 SeCys₂ 的结构状态，因此硝酸溶液和盐酸溶液提取不适合于硒的形态分析。实验还发现，温度高于 60 °C 回收率会变差，温度不利于硒的提取。

由于含蛋白样品中硒主要以硒蛋白形式存在，仅使用 5 mmol/L 柠檬酸提取效率也并不高，因此本文采用了蛋白酶+柠檬酸的提取方式，改善了单一方式提取率较低的问题。在酶的使用上，同时考察中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、淀粉酶、蛋白酶K和蛋白酶E，实验表明，使用蛋白酶E在37°C下水浴振荡提取6小时，五种硒具有较好的回收率。

3. 方法线性关系和检出限

由于电感耦合等离子体质谱对硒的响应相对较低，因此检出限对方法至关重要，一般色谱的检出限是按照3~10倍的基线噪音来计算的，但往往这种检出限在实际样品检测中并不可靠。本文采用的添加法，是在对照空白样品中加入一定量硒标准溶液，通过检测具有数理统计意义后定为方法的检出限。各硒形态浓度与质谱响应值的线性关系良好，其相关系数均大于0.996。本方法中，若称样量为2 g，定容体积为25mL，各硒的检出限为0.005 mg/kg，定量限为0.015 mg/kg。

4. 方法准确度

准确度采用加标试验确定，方法的总体加标回收率为70.5%~104.3%，满足方法准确度要求。对樱桃、苹果、大米、香菇、芹菜、黄瓜等6种空白基质，分别进行了3个水平（0.01、0.05和0.1 mg/kg）的加标回收试验（ $n=5$ ），方法准确度满足相关技术要求。

表 1. 五种硒形态加标回收试验结果（ $n=5$ ）（%）

样品	添加水平 (mg/kg)	SeCys ₂	MeSeCys	Se (IV)	SeMet	Se (VI)
樱桃	0.015	85.3	90.2	84.2	90.8	86.5
	0.05	90.3	89.4	83.1	85.7	88.6
	0.1	92.3	95.7	86.9	88.6	89.4
苹果	0.015	78.6	80.3	80.6	82.7	89.6
	0.05	80.4	85.6	87.3	89.6	92.1
	0.1	91.5	92.3	90.8	95.6	104.3
大米	0.015	70.5	75.3	74.3	75.9	77.3
	0.05	78.5	74.8	75.6	79.4	80.2
	0.1	81.2	84.2	81.9	80.5	84.6
香菇	0.015	70.9	78.3	74.6	76.9	70.6
	0.05	74.2	80.3	76.5	77.9	75.6
	0.1	75.1	82.6	75.9	88.3	77.9
小白菜	0.015	80.3	85.6	81.3	84.6	82.4
	0.05	84.3	85.1	83.2	89.3	87.6
	0.1	90.3	91.2	94.3	92.5	100.3
黄瓜	0.015	81.2	84.3	83.5	87.3	83.6
	0.05	85.9	87.3	90.3	91.4	94.3
	0.1	90.2	94.5	91.6	90.1	93.5

5. 方法精密度

分别对加标样品进行重复测定 ($n=5$), 结果表明方法精密度较好, 各硒形态平行测定的 RSD 小于 10%。

6. 结论

本标准建立了离子色谱-电感耦合等离子质谱法同时测定富硒农产品中 5 种硒的形态的检测方法, 方法有较好回收率和提取率, 加标回收率大于 81%, 提取率在 72.6%~76.8%之间, 方法精密度小于 8%, 可以在 15min 内同时测定 5 种硒的形态。

目前我国尚无硒形态的检测技术标准, 本标准的建立, 能够满足富硒农产品硒形态检验需求。为富硒农产品中硒元素的来源、富集、转换和迁移的深入研究提供了方法依据, 对于正确评价富硒农产品中硒对人体的作用有着积极的意义,

五、标准体系中的位置, 与现行相关法律、法规、规章及相关标准, 特别是强制性标准的协调性

本标准技术指标符合我国现行相关法律、法规、规章及相关标准要求。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程和审定过程中未出现重大分歧意见。

七、标准性质的建议和说明

建议本标准以团体标准的形式发布和试运行, 经过1年的试用后推荐为相关行业标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准发布后立即实施。大连市标准化协会组织该项标准的宣贯工作。

九、废止现行相关标准的建议

该标准属首次起草, 无现行相关标准废止。

十、其它应予说明的事项

暂无。