

ICS 65.060

CCS B 20

T/JXXCCY

江西乡村产业振兴协会团体标准

T/JXXCCY 00X —2025

粮谷中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和
硒代蛋氨酸的测定 液相色谱—电感耦合
等离子体串联质谱法

Determination of selenocysteine, methylselenocysteine and
selenomethionine in grains by liquid chromatography-inductively
coupled plasma tandem mass spectrometry

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

江西省乡村产业振兴协会 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 试剂和材料 1

6 仪器设备 3

7 分析步骤 3

8 结果计算4

9 精密度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。

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专利的责任。

本文件由江西省乡村产业振兴协会提出并归口。

本文件起草单位：江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所、农业农村部环境保护科研检测所、宁都县农产品和粮油检验检测站、谱尼测试集团深圳有限公司、北京吉天仪器有限公司。

本文件主要起草人：魏益华、张标金、黄正花、张康康、昌晓宇、黄青青、靳丹丹、黄书梅、曾瑶、谢启亮、张霖、张波、许太基、徐丽、徐相涛、于锋、冯婷。

粮谷中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法

1 范围

本文件规定了粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定法的原理,规定了其试剂和材料、仪器和设备、试样制备、分析步骤、结果计算和精密度。

本文件适用于稻米、小麦、玉米、小米、高粱中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的测定。

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸,用蛋白酶水解提取,经超滤管离心净化,液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法测定,外标法定量。

5 试剂和材料

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

5.1 试剂

5.1.1 三羟甲基氨基甲烷($C_6H_8O_6$, CAS 号: 77-86-1)。

5.1.2 盐酸(HCl, CAS 号: 7647-01-0): 纯度为 36.0~38.0%。

5.1.3 蛋白酶(protease XIV, CAS 号: 9036-06-0): 酶活力 ≥ 3.5 U/mg。

5.1.4 碘乙酰胺(C_2H_4INO , CAS 号: 144-48-9)。

5.1.5 柠檬酸铵($C_6H_{17}N_3O_7$, CAS 号: 3458-72-8)。

5.1.6 甲醇 (CH_3OH) : 色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 盐酸溶液 (10.0 %) : 量取20.0 mL盐酸 (5.1.2),加水稀释定容至200 mL,摇匀。

5.2.2 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液 (10.0 mmol/L) : 称取0.242 g三羟甲基氨基甲烷(5.1.1)溶于约180 mL水中,用盐酸 (5.2.1) 调节pH至7.5,加水稀释定容至200 mL,摇匀。

5.2.3 蛋白酶提取液 (2.0 mg/mL) : 称取0.40 g蛋白酶 (5.1.3),加入至 200 mL Tris-HCl缓冲液 (5.2.2) 中,摇匀,现用现配。

5.2.4 碘乙酰胺溶液 (10.0 mmol/L) : 称取0.088 g碘乙酰胺 (5.1.4) 溶于水中,加水稀释定容至50 mL,摇匀。

5.2.5 流动相 (5.0 mmol/L 柠檬酸铵, 1%甲醇, pH5.0) : 称取1.216 g柠檬酸铵 (5.1.5) 溶于950 mL水中,加入10.0 mL甲醇 (5.1.6),用盐酸 (5.2.1) 调节pH至5.0,用水稀释定容至1000 mL,超声脱气30 min。

5.3 标准品

5.3.1 硒代半胱氨酸 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$, CAS 号: 10236-58-5) : 纯度 $\geq 95\%$,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 甲基硒代半胱氨酸 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{Se}$, 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。

5.3.3 硒代蛋氨酸 ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$, CAS 号: 1464-42-2) : 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。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 硒代半胱氨酸标准储备液 (1000 mg/L, 以 Se 计) : 取硒代半胱氨酸 (4.3.1) 约 21.2 mg (精确至 0.1 mg),用适量盐酸溶液 (5.2.1)溶解,转入 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.4.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备液 (1000 mg/L, 以 Se 计) : 取甲基硒代半胱氨酸 (4.3.2) 约 23.1 mg (精确至 0.1 mg),用水溶解,转入 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.4.3 硒代蛋氨酸标准储备液 (1000 mg/L, 以 Se 计) : 取硒代蛋氨酸 (4.3.3) 约 24.8 mg (精确至 0.1 mg),用水溶解,转入 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.4.4 混合标准中间液 (10.0 mg/L, 以 Se 计) : 分别准确吸取 0.10 mL 硒代半胱氨酸标准储备液 (5.4.1)、甲基硒代半胱氨酸标准储备液 (5.4.2)、硒代蛋氨酸标准储备液 (5.4.3) 于 10 mL 容量瓶中,用水稀释定容至刻度。于 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏保存,有效期为 7 d。

5.4.5 3种硒代氨基酸混合标准使用液 (100 $\mu\text{g/L}$, 以 Se 计) : 准确量取 2.50 mL 混合标准中间液 (5.4.4) 于 25.0 mL 容量瓶中,用流动相稀释定容至刻度,临用现配。

5.4.6 3种硒代氨基酸混合标准系列溶液: 分别准确量取混合标准使用液 (5.4.5),用流动相稀释配制质量浓度为1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、25.0 $\mu\text{g/L}$ 和50.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液,临用现配。

注：可根据样品中硒代氨基酸含量适当调整标准系列溶液的质量浓度。

5.5 材料

5.5.1 针式滤膜：水系，0.22 μm 。

5.5.2 离心超滤管：3 KDa 截留分子量，4 mL样品体积，或性能相当者。

6 仪器设备

6.1 液相色谱－电感耦合等离子体串联质谱仪（LC-ICP-MS/MS）：由液相色谱仪与原子荧光光谱仪组成。

6.2 分析天平：感量 0.0001 g 和 0.01 g。

6.3 pH 计，精度 0.01 级。

6.4 涡旋混合仪。

6.5 恒温水浴振荡器。

6.6 离心机：转速 $\geq 5\,000$ r/min。

6.7 试样制样设备：高速粉碎机。

6.8 筛网：粒径 $\leq 250\ \mu\text{m}$ （筛孔 ≥ 60 目）。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取谷物可食部分，用高速粉碎机（6.7）粉碎，过筛网（6.8），试样需粉碎至粒径达 250 μm 以下。

7.2 试样提取与净化

称取试样约 0.5 g（精确至 0.001 g），置于 15 mL 离心管中，依次加入 9.9 mL 蛋白酶提取液（5.2.3）和 0.10 mL 碘乙酰胺溶液（5.2.4），涡旋混匀，于恒温水浴振荡器（6.5）上 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡酶解 16 h，5000 r/min 离心 10 min，取 4.0 mL 上清液至离心超滤管（5.2.5）中，4000 r/min 离心 10 min，经 0.22 μm 滤膜（5.5.1）过滤，待测。同时做空白试验。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：阴离子交换色谱柱（150 mm \times 4.1 mm，5 μm ），或性能相当者；
- b) 进样量：50.0 μL ；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 流动相（5.2.5）。

7.3.2 电感耦合等离子体串联质谱参考条件

- a) 射频发射功率：1600 W；
- b) 等离子体气流量：16 L/min；
- c) 雾化气流量：1.00 L/min；
- d) 辅助气流量：1.2 L/min；
- e) 反应气种类与流速：甲烷、0.70 L/min；
- f) 四极杆质量分辨率参数（Rpq）：0.45；
- g) 四级杆模式（Quad Mode）：MS/MS（Q1 质量数：79.92 amu；Q2 质量数：79.92 amu）；
- h) 驻留时间：250.0 ms。
- i) 雾化器：同心雾化器。
- j) 矩管内径：2.0 mm。
- k) 采样锥/截取锥/超截取锥孔径：1.0 mm/0.9 mm/1.0 mm。

注：根据各自实验室仪器设备情况适当调整流动相及pH，以保证分离度及灵敏度满足试验要求。

7.4 定性定量测定

根据标准溶液的色谱保留时间定性。将试样溶液注入液相色谱—电感耦合等离子体串联质谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的浓度。待测液中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的响应值应在仪器线性响应范围内，否则应适当用流动相（5.2.5）稀释待测液，3种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图见附录A。

8 结果计算

试样中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的含量（以Se计）以质量分数 w 计，按公式（1）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w_i ——试样中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸含量的数值，单位为毫克每千克

(mg/kg);

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中硒代氨基酸的质量浓度，单位为纳克每毫升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——提取液的体积，单位为毫升（mL）；

f ——稀释倍数； f

m ——试样质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

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 15%。

9.2 再现性

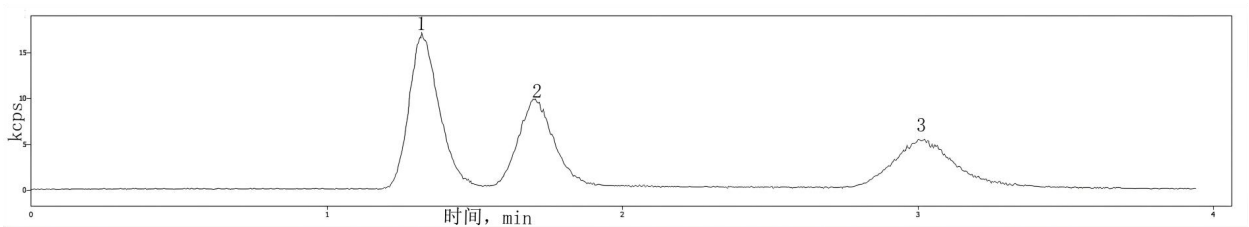
在再现性条件下获得的 2 次独立的测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

9.3 其他

本方法硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸定量限均为 0.02 mg/kg。

附录 A
(资料性附录)

3种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图见图A. 1



- 标引序号说明：
- 1-硒代半胱氨酸
 - 2-甲基硒代半胱氨酸
 - 3-硒代蛋氨酸

图A.1 硒代氨基酸标准溶液（5.0 μg/L）色谱图