

《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》团体标准编制说明

一、工作简况

1.任务来源

在江西省科技厅（20232BBF60019、20232BCJ22059）等项目支撑下开展了本标准相关工作。

2.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等单位共同起草。

3.主要起草人

姓名	性别	职务/职称	工作单位	任务分工
魏益华	男	副研究员	江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所	负责人
张标金	男	副研究员	江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所	方案设计
黄正花	女	助理研究员	江西省农业科学院农产品质量安全与标准研究所	查找资料

			所	
张康康	男	助理研究员	江西省农业科学院农产 品质量安全与标准研究 所	标准起草
昌晓宇	女	助理研究员	江西省农业科学院农产 品质量安全与标准研究 所	实验实施
黄青青	女	副研究员	农业农村部环境保护科 研检测所	技术论证
靳丹丹	女	实习研究员	江西省农业科学院农产 品质量安全与标准研究 所	实验实施
黄书梅	女	农艺师	宁都县农产品和粮油检 验检测站	实验验证
曾瑶	女	农艺师	宁都县农产品和粮油检 验检测站	实验验证
谢启亮	男	农艺师	宁都县农产品和粮油检 验检测站	格式审查
张霖	男	农艺师	宁都县农产品和粮油检 验检测站	实验验证 施
张波	男	工程师	谱尼测试集团深圳有限 公司	格式审查

许太基	男	工程师	谱尼测试集团深圳有限公司	标准起草
徐丽	女	工程师	谱尼测试集团深圳有限公司	格式审查
徐相涛	男	工程师	北京吉天仪器有限公司	标准起草
于锋	男	工程师	北京吉天仪器有限公司	标准起草
冯婷	女	工程师	北京吉天仪器有限公司	格式审查

二、制定（修订）标准的必要性和意义

硒是人体必需的微量元素，其生物活性与硒的存在形态密切相关。有机硒化合物(如硒代氨基酸)具有较高的生物利用度和较低的毒性，是评价粮谷硒营养品质的重要指标。

目前，我国颁布了《粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法 NY/T 3556-2020》农业行业标准，该法是用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)对硒形态进行定量测定。但 ICP-MS 测硒存在较大的质谱干扰，对样品中硒形态进行准确测定还存在一定困难。由于 ICP-MS/MS 存在两个四极杆，故能非常好的克服硒的质谱干扰，即能更准确、更灵敏的测定硒形态含量。我们采用更为先进的液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱仪，建立一套准确、灵敏、简易的硒形态检测方法，适用于稻米、小麦、玉米、小米和高粱等常见粮谷中有机硒形态的定量分析。

本标准旨在建立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方法—液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法

(LC-ICP-MS/MS)，为上述硒代氨基酸的准确、灵敏、可靠检测提供统一的技术规范。通过明确试剂材料、仪器条件、分析步骤、结果计算与精密度要求，本方法致力于实现粮谷样品中不同形态硒代氨基酸的高效分离与准确定量，弥补现有标准在硒形态分析方面的不足，提升检测结果的可靠性与可比性，为粮谷硒营养品质评价与安全监管提供关键技术支撑。

本标准的制定与实施，对推动硒强化粮食作物的品质调控、营养评价与产业标准化具有重要意义。一方面，它有助于科学评估粮谷中硒的生物可利用形态，为富硒农产品开发、营养强化与膳食指导提供数据基础；另一方面，该方法可为粮食质量安全监测、硒形态风险评估及相关科研工作提供统一方法依据，促进硒资源在农业与食品领域的高值化利用。此外，作为团体标准，本文件也可为行业检测机构、企业及监管部门提供可操作的技术指南，助力乡村产业提质增效与硒健康产业发展。

三、主要起草过程

我们组织成立标准起草小组，并就该标准的起草工作进行了认真研究，制定了总体工作方案，启动了标准的起草工作。标准起草前期，起草组展开了充分调研，收集相关标准资料，开展相关试验，最终形成了《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》(标准草案)。

1、标准内容的确立

为确保本标准的科学性和实用性，起草小组根据科研项目需要与

基础，查新相关文献资料，为本标准的顺利开展确立提供了坚实的基础。经过反复讨论，起草小组明确了规程的编写提纲、核心内容、技术要求及关键指标，并确定了标准的适用范围、规范性引用文件、术语和定义等关键要素。在方案设计上，既注重准确性、灵敏性，又注重简便性，确保标准易于操作和实施，为粮谷中硒代氨基酸的准确、灵敏的测定提供了有力支撑。

2、标准的起草

基于前期研究成果，起草小组对标准内容进行了系统总结。标准的起草严格遵循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》的格式要求，确保文件结构规范、内容清晰。2025年11月，标准起草小组完成了《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》的征求意见稿。

3、标准的制定

2025年12月，起草小组将《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》征求意见稿函送至相关领域专家，广泛征集意见和建议。在充分吸收专家反馈的基础上，起草小组对意见进行了深入分析和研究，采纳了其中的合理建议，并对标准内容进行了进一步完善。整个编制过程严谨细致，以确保本标准的科学性和实用性。

四、制定（修订）标准的原则和依据，与现行法律、法规、标准的关系

1. 制定（修订）标准的原则

本标准依据《中华人民共和国标准化法》《地理标志产品保护规定》及 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》等法律法规和标准规范进行编制。编制过程中遵循：科学性、规范性、实用性，制定了本标准。

2. 制定标准主要内容依据

本标准制定过程力求各项要求科学合理，符合行业工作实际需要，并注重标准的可操作性。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3. 与现行法律、法规、标准的关系

目前，我国农业农村部制定了《NY/T 3556-2020 粮谷中硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的测定 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法》。与此标准方法相比，我们起草的方法与其存在明显区别，具体为：(1) 所用仪器不同，本方法所用仪器为液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱仪，而《NY/T 3556-2020》所用仪器为液相色谱-电感耦合等离子体质谱；(2)流动相不同，本方法所用流动相为柠檬酸盐，而《NY/T 3556-2020》所用流动相为乙酸铵和离子对试剂；(3) 色谱柱不同，本方法所用色谱柱为阴离子色谱柱，而《NY/T 3556-2020》所用流色谱柱为 C18 色谱柱；(4) 前处理不同，本方法的前处理更为简易、便捷，如将蛋白酶溶于缓冲液中，然后直接加含蛋白酶的缓冲液于样品中，而《NY/T 3556-2020》需对每个样品单独称 25mg 蛋白酶，即我们大大提高了前处理的便捷性。

经广泛调研和多方面征求意见建议，本标准有关技术要求、技术方法、性能指标等符合现行法律、法规、规章及有关强制性标准要求并具有一致性。

五、主要条款的说明

5.1 方法原理

本方法采用蛋白酶水解提取结合液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱 (LC-ICP-MS/MS) 技术。提取阶段：利用蛋白酶 X IV 在温和条件下 (pH 7.5, 50°C) 选择性酶解蛋白，释放结合态硒代氨基酸，避免强酸/强碱处理导致的形态转化或损失。净化阶段：采用 3 kDa 超滤管离心去除大分子杂质，降低基质干扰，提高色谱分离效果。检测阶段：通过阴离子交换色谱分离三种目标物，ICP-MS/MS 在动态反应池模式下以 79.92/79.92 Se 为监测离子，通过甲烷反应气消除硒元素的多原子干扰，最终实现了高灵敏度、高选择性检测。

5.2 实验部分说明

(1) 试剂与材料优化

缓冲体系选择：选用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5)，提供稳定的酶解环境，避免硒形态转化。

蛋白酶选择：采用蛋白酶 X IV ($\geq 2.5 \text{ U/mg}$)，其广谱水解活性可有效释放蛋白结合态硒代氨基酸。

还原烷基化试剂：加入碘乙酰胺，防止硒代半胱氨酸在提取过程中发生形态转化，提高了其回收率。

流动相的选择：采用 5 mmol/L 柠檬酸铵 (含 1% 甲醇, pH 5.0)，兼顾色谱分离效率与灵敏度。采用柠檬酸铵作为流动相的主要原因有：
1) 宽范围且稳定的 pH 缓冲能力：柠檬酸盐体系能在 pH 2.5-7.5 范围内提供良好缓冲，这对于保持硒元素形态的稳定性和色谱柱的寿命

至关重要；2) 相对良好的挥发性：进入等离子体后，能完全分解为 N₂、H₂O、CO₂等挥发性气体，相比其它非挥发性盐，大大减少了锥口沉积和基质效应。此外，我们还比较了以乙酸铵和离子对试剂为体系的流动相体系（采用普通 C18 色谱柱，150*4.6mm, 5 μm），见图 1。结果表明，虽然该体系灵敏度更高，但其存在两大缺陷，一是流动相平衡时间远远长于柠檬酸盐体系，受平衡时间和 pH 等影响，无机硒出峰时间变动较大，二是六价硒出峰时间较晚，故最终我们采用柠檬酸盐体系作为流动相。

(2) 仪器条件设定

色谱条件：我们考察了不同长度的色谱柱对 (250 mm × 4.1 mm, 5 μm) 5 种硒氨基酸的分离影响，见图 2。结果表明，150 mm 和 250 mm 色谱柱均能非常好的实现 3 种硒代氨基酸的分离，但 150mm 所需分析时间更短（硒代蛋氨酸出峰时间约早 2min），故我们最终采用 150 mm 的阴离子色谱柱来分离硒形态。

阴离子交换色谱柱(Hamilton PRP-X100, 150 mm × 4.1 mm, 5 μm) 可在等度洗脱下实现 3 种硒氨基酸的基线分离，见图 3。ICP-MS/MS 条件：采用 MS/MS 模式 (Q1/Q2 均设定为 79.92 amu)，结合甲烷反应气，有效消除 40Ar/40Ar 等质谱干扰。

优化射频功率、气体流速等仪器工作参数，确保硒信号稳定性和灵敏度。

(3) 样品前处理流程

酶解时间与温度：50℃振荡 16 h，保障酶解完全，同时避免过热

导致形态降解。与 37℃ 振荡相比，50℃ 的提取效果更为显著，提升幅度约为 20%。

净化方式：超滤离心（3 kDa）去除酶蛋白及其他大分子干扰物，即简化前处理步骤，又能减少有机物对 ICP-MS/MS 的污染。

(4) 标准溶液配制与校准

标准储备液以硒 (Se) 计浓度，便于统一量化不同硒氨基酸的硒含量。

混合标准系列覆盖 1.0 – 50.0 $\mu\text{g/L}$ ，涵盖粮谷中常见含量范围，并允许根据实际样品调整。

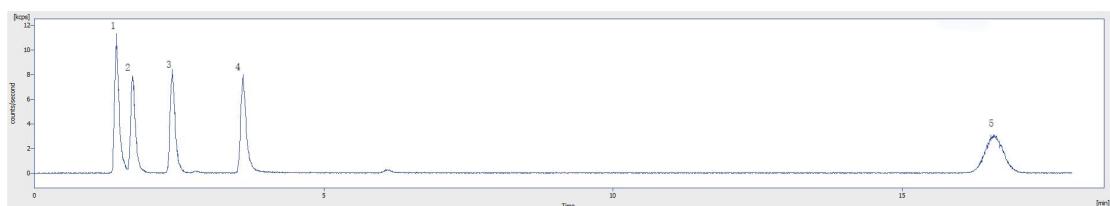


图1 乙酸铵和离子对试剂流动相体系下 5 种硒形态溶液色谱图 (1-硒代半胱氨酸, 2-甲基硒代半胱氨酸, 3-硒代蛋氨酸、4-亚硒酸根、5-硒酸根)

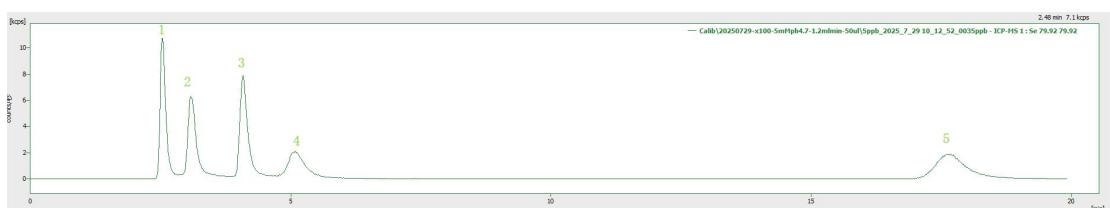


图2 阴离子色谱柱 (250 mm × 4.1 mm, 5 μm) 下 5 种硒形态溶液色谱图 (1-硒代半胱氨酸, 2-甲基硒代半胱氨酸, 3-亚硒酸根、4-硒

代蛋氨酸、5-硒酸根)

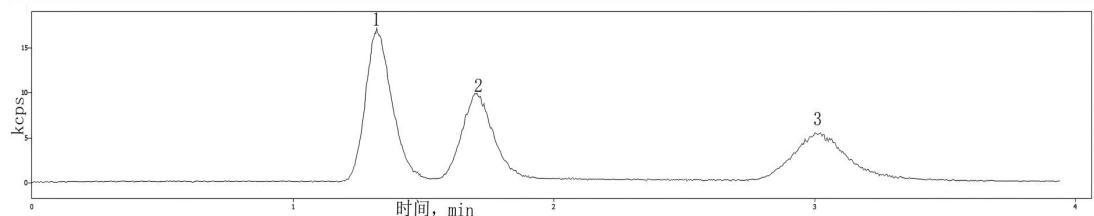


图3 3种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图(1-硒代半胱氨酸, 2-甲基硒代半胱氨酸, 3-硒代蛋氨酸)

六、方法验证说明

本方法在编制过程中找了3家实验单位进行了方法验证:

参数	验证方式	单位1	单位2	单位3
特异性	通过空白样品、添加其它硒形态(亚硒酸根、硒酸根)来验证是否与目标分析物存在干扰	目标分析物出峰位置无干扰峰	目标分析物出峰位置无干扰峰	目标分析物出峰位置无干扰峰
LOD(mg/kg)	向空白溶液添加目标分析物, 信噪比为3时的添加浓度作为估算检出限	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 分别为 0.0022、0.0036 和 0.0058 mg/kg	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 分别为 0.0034、0.0038 和 0.0058 mg/kg	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 分别为 0.0019、0.0030 和 0.0060 mg/kg
LOQ(mg/kg)	向空白样品中添加 0.020mg/kg 浓度的3种目标分析物, 按全流程处理测定, 使目标分析物信噪比约为 10	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 信噪比分别为 33.3、20.7	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 信噪比分别为 29.1、18.0	SeCys、MeSeCys 和 SeMet 信噪比分别为 36.9、21.6

		和 12.7	和 11.7	和 12.4
线性范围和相关系数	标准溶液浓度从 1-50 ug/L 配制 6 个点, 得到线性回归方程及相关系数	Y=16223.7*X, r=0.9999	Y=1336.9*X, r=0.9999	Y=15614.0*X, r=0.9995
		Y=12461.2*X, r=0.9999	Y=2445.0*X, r=0.9999	Y=16744.2*X, r=0.9998
		Y=12395.9*X, r=0.9998	Y=14719.7*X, r=0.9999	Y=15582.3*X, r=0.9997
正确度	往空白样品中添加 3 个浓度梯度 (LOQ、2LOQ、10LOQ, n=6) 的硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸, 计算其回收率	回收率 (LOQ) : 95.8%~103.3 %	回收率 (LOQ) : 97.0%~103.1%	回收率 (LOQ) : 84.3%~89.7 %
		回收率 (2LOQ) : 89.4%~100.6 %	回收率 (2LOQ) : 94.0%~100.0%	回收率 (2LOQ) : 83.2%~86.2%
		回收率 (10LOQ) : 103.0%~107.1%	回收率 (10LOQ) : 91.0%~97.2%	回收率 (10LOQ) : 82.5%~84.4%
重复性	往空白样品中添加 3 个浓度梯度 (LOQ、2LOQ、10LOQ, n=6) 的硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸, 计算其精密度	回收率 (LOQ) : 1.9~12.1%	回收率 (LOQ) : 1.9~7.2%	回收率 (LOQ) : 2.6~9.9%
		回收率 (2LOQ) : 3.2%~5.0%	回收率 (2LOQ) : 1.4%~3.5%	回收率 (2LOQ) : 2.8%~6.0%
		回收率 (10LOQ) : 3.6%~8.4%	回收率 (10LOQ) : 2.9%~6.2%	回收率 (10LOQ) : 2.0%~3.3%

六、重大意见分歧的处理依据和结果

无。

七、作为推荐性或强制性标准的建议及其理由

本标准制定了一套适用于粮谷中有机硒形态分析的 HPLC-ICP-MS/MS 方法, 具有前处理简便、方法准确、灵敏度高、重复性好等特点, 可为粮谷硒形态检测、营养评价及相关标准制定提供可靠技术依据, 故我们推荐其作为推荐性标准。

八、贯彻标准的措施建议

为有效贯彻《粮谷中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代氨酸的测定 液相色谱-电感耦合等离子体串联质谱法》团体标准，提升粮谷硒形态检测的规范性与准确性，提出以下措施建议：加强标准宣贯与培训。面向各级质检机构、科研单位及企业检测人员，组织开展专项技术培训，重点讲解前处理、仪器操作、结果计算等关键环节，确保检测人员熟练掌握标准方法；推动实验室能力建设。引导国家级、省部级等实验室配置或升级 LC-ICP-MS/MS 等必要设备，建立标准操作程序，完善质量体系，鼓励参与能力验证与比对实验，确保检测结果的可比性与可靠性；强化质量监控与应用衔接。建议将本标准纳入粮谷产品质量安全监测体系，特别是在富硒农产品认证与监督抽查中推广应用。建立数据共享机制，为硒营养评价与产品开发提供科学依据；持续开展技术优化与研究。跟踪国内外硒形态分析技术进展，结合实际应用反馈，适时修订标准内容，增强其适用性与先进性，提升我国粮谷硒形态检测的整体水平。

九、其他应说明的事项

本标准的制定，有助于推动富硒粮食产业实现规范、可持续发展，建议尽快发布施行，并在实践中不断修订完善。

在标准制定期间，工作组得到了众多专家、领导及相关同仁的悉心指导与大力支持，在此深表感谢。同时，由于经费、时间等客观条件限制，本标准难免存在不足之处，恳请各位专家和领导提出宝贵意见，以便后续改进。

《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》标准起草小组

2025 年 12 月 17 日