

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4723—2025

食用菌中硒代氨基酸的测定

Determination of Seleno-amino Acids in edible mushroom

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



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。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专业委员会归口。

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、南昌市疾病预防控制中心、赣州市综合检验检测院、江西省林业科学院、江西省农学会、江西省农业科学院农业应用微生物研究所、江西省农业科学院农产品加工研究所、绿城农科检测技术有限公司、于都县农业农村局、宁都县农业农村局。

本文件主要起草人：胡丽芳、周瑶敏、徐俊、金永久、周龙华、高伟、廖且根、张标金、谢敏、聂根新、邱素艳、李伟红、魏云辉、刘光宪、费丹、广业兰、沈思言、温志刚、王玫、章虎、张玉换、沈荣明、郭彩霞、张贤源。



食用菌中硒代氨基酸的测定

1 范围

本文件描述了食用菌中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的液相色谱-串联质谱和液相色谱-电感耦合等离子体质谱测定方法。

本文件适用于食用菌中硒代半胱氨酸、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 2763 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量

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。

方法一 液相色谱-串联质谱法

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,用蛋白酶和崩溃酶水解提取,经超滤管离心净化,液相色谱-串联质谱仪测定,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 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。

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

5.1.4 崩溃酶(CAS号:85186-71-6):BR,蛋白 $\geq 10\%$ (双缩脲法),纯度 $> 98\%$ 。

5.1.5 抗坏血酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$,CAS号:50-81-7)。

5.1.6 三羟甲基氨基甲烷($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$,CAS号:77-86-1)。

5.1.7 盐酸(HCl):12 mol/L。

5.2 试剂配制

5.2.1 20.0 mg/mL 蛋白酶溶液:称取蛋白酶(5.1.3)1.00 g,用水稀释定容至 50 mL,摇匀,现用现配。

5.2.2 0.2 mol/L 抗坏血酸溶液:称取抗坏血酸(5.1.5)3.52 g,用水稀释定容至 100 mL,摇匀,备用,现用现配。

5.2.3 10.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液:称取 0.606 g 三羟甲基氨基甲烷(5.1.6)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。

5.2.4 0.1%甲酸溶液:量取甲酸(5.1.2)0.1 mL,加水定容至 100 mL,摇匀。

5.3 标准品

5.3.1 硒代半胱氨酸($C_3H_7NO_2Se$, 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($C_4H_9NO_2Se$, 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。

5.3.3 硒代蛋氨酸($C_5H_{11}NO_2Se$, 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(1 000 mg/L,按 Se 计):称取硒代半胱氨酸(5.3.1)21.2 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用 0.5 mL 甲酸(5.1.2)溶解后,用水稀释并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

5.4.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备液(1 000 mg/L,按 Se 计):称取甲基硒代半胱氨酸(5.3.2)23.1 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

5.4.3 硒代蛋氨酸标准储备液(1 000 mg/L,按 Se 计):称取硒代蛋氨酸(5.3.3)24.8 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

5.4.4 混合标准中间液(1.0 mg/L):分别准确量取 0.10 mL 标准储备液(5.4.1、5.4.2、5.4.3)于 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,现用现配。

5.4.5 混合标准工作液(100.0 ng/mL):准确量取 1.00 mL 混合标准中间液(5.4.4)于 10 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,现用现配。

5.5 材料

5.5.1 针式滤膜:水系,0.22 μm 。

5.5.2 超滤离心管:5 mL/3 kD,配 15 mL 外管,或性能相当者。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g、0.000 1 g 和 0.01 g。

6.3 pH 计:精确至 0.1。

6.4 涡旋混合仪。

6.5 恒温振荡器。

6.6 高速匀浆机:转速不低于 15 000 r/min。

6.7 高速离心机:转速不低于 12 000 r/min。

6.8 网筛:孔径 425 μm 。

6.9 试样制备设备:匀浆机、高速粉碎机。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 鲜样

食用菌样品取样部位按 GB 2763 的规定执行,取不少于 1 000 g 样品放置于匀浆机中匀浆均匀,于 -18℃ 密封保存备用。

7.1.2 干样

取不少于 200 g 食用菌干样,放置于高速粉碎机中粉碎,过网筛(6.8),制成待测样,于常温密封保存备用。

7.2 试样提取与净化

称取试样(7.1.1)2 g(精确至 0.01 g)或试样(7.1.2)0.5 g(精确至 0.000 1 g)于 50 mL 离心管中,加入 0.2 mol/L 抗坏血酸溶液(5.2.2)0.5 mL 和 10.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(5.2.3)8.5 mL,15 000 r/min 高速匀浆 1 min,再加入 20.0 mg/mL 蛋白酶溶液(5.2.1)1.0 mL、崩溃酶(5.1.4)20 mg,涡旋混匀,于恒温振荡器上(37±0.5)℃振荡酶解 12 h,12 000 r/min 离心 10 min,提取液经 0.22 μm 针式,滤膜(5.5.1)过滤转移至 15 mL 离心管中。取 5.0 mL 过滤液转移至超滤离心管中(5.5.2),5 000 r/min 离心 10 min,取超滤液 0.1 mL 加入 0.1%甲酸溶液(5.2.4)0.9 mL,混匀待测。

7.3 标准曲线绘制

取空白试样,按 7.2 处理得到空白超滤液,准确量取 0.1 mL,分别准确量取适量混合标准工作液(5.4.5),用 0.1%甲酸溶液(5.2.4)稀释定容至 1.0 mL,配制成浓度分别为 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 和 20.0 ng/mL 基质匹配标准系列溶液,液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物特征离子质量色谱图峰面积为纵坐标、对应浓度为横坐标绘制标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈柱(100 mm×3.0 mm,粒径 1.8 μm),或性能相当者;
- b) 进样量:10.0 μL;
- c) 流速:0.2 mL/min;
- d) 柱温:35℃;
- e) 流动相:A 为 0.1%甲酸溶液(5.2.4);B 为甲醇(5.1.1),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	A,%	B,%
0.0	98	2
3.5	80	20
4.5	0	100
5.0	0	100
5.1	98	2
6.0	98	2

7.4.2 质谱参考条件

- a) 电离方式:电喷雾正离子模式;
- b) 扫描模式:多反应监测(MRM)模式;
- c) 干燥气温度:300℃;
- d) 干燥气流速:15 L/min;
- e) 鞘气温度:300℃;
- f) 鞘气流速:12 L/min;
- g) 定性定量离子和碰撞能量见表 2。

表 2 质谱分析参数

化合物	母离子, m/z	子离子, m/z	碰撞能量,eV
硒代半胱氨酸	168	74.1 *	15
		139.9	8
甲基硒代半胱氨酸	167	95 *	25
		55.2	18
硒代蛋氨酸	198	56.2 *	20
		180.8	8
* 为定量离子。			

7.4.3 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液与基质匹配标准工作液中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的保留时间相对偏差在±2.5%以内;且试样溶液与浓度接近的基质匹配标准工作液中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸的定性离子相对丰度进行比较,其允许偏差应符合表3要求。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度,%	允许相对偏差,%
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

7.4.4 定量测定

取试样溶液和相应的基质匹配标准溶液,作单点或多点校准,按峰面积定量,基质匹配标准溶液及试样溶液中待测物响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过30%。在上述色谱-质谱条件下,硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸特征离子质量色谱图见附录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)以质量分数表示,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半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V ——提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- f ——稀释倍数;
- m ——试样质量的数值,单位为克(g);
- 1000——换算系数

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%。

10 其他

本方法食用菌鲜品中硒代半胱氨酸定量限为0.06 mg/kg、甲基硒代半胱氨酸定量限为0.04 mg/kg、

硒代蛋氨酸定量限为 0.02 mg/kg;食用菌干品中硒代半胱氨酸和甲基硒代半胱氨酸定量限均为 0.10 mg/kg、硒代蛋氨酸定量限为 0.05 mg/kg。

方法二 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法

11 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和崩溃酶水解提取,离心净化后,经反相离子对液相色谱进行分离,电感耦合等离子质谱仪测定,外标法定量。

12 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。

12.1 试剂

12.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

12.1.2 一水合柠檬酸($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$):优级纯。

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

12.1.4 崩溃酶(CAS 号:85186-71-6):BR,蛋白 $\geq 10\%$ (双缩脲法),纯度 $>98\%$ 。

12.1.5 抗坏血酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$,CAS 号:50-81-7)。

12.1.6 三羟甲基氨基甲烷($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$,CAS 号:77-86-1)。

12.1.7 盐酸(HCl):12 mol/L。

12.1.8 庚烷磺酸钠($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}$,CAS 号:22767-50-6):色谱纯。

12.1.9 氨水(NH_4OH):色谱纯。

12.2 试剂配制

12.2.1 20.0 mg/mL 蛋白酶 XIV 溶液:称取蛋白酶(12.1.3)1.00 g,用水稀释定容至 50 mL,摇匀,现用现配。

12.2.2 0.2 mol/L 抗坏血酸溶液:称取抗坏血酸(12.1.5)3.52 g,用水稀释定容至 100 mL,摇匀,备用,现用现配。

12.2.3 10.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液:称取 0.606 g 三羟甲基氨基甲烷(12.1.6)溶于 450 mL 水中,用盐酸(12.1.7)调节 pH 至 7.5,加水稀释定容至 500 mL,摇匀。

12.2.4 流动相 A(0.5 mmol/L 柠檬酸 + 0.05 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液):分别称取一水合柠檬酸(12.1.2)0.105 g、庚烷磺酸钠(12.1.8)0.010 1 g,溶于水中,摇匀,用氨水(12.1.9)调节 pH 至 5.0,加水稀释定容至 1 000 mL,超声脱气 10 min。

12.3 标准品

12.3.1 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。

12.3.2 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。

12.3.3 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。

12.4 标准溶液配制

12.4.1 硒代半胱氨酸标准储备液(1 000 mg/L,按 Se 计):称取硒代半胱氨酸(12.3.1)21.2 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用 0.5 mL 流动相 A(12.2.4)溶解后,用水稀释并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

12.4.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备液(1 000 mg/L,按 Se 计):称取甲基硒代半胱氨酸(12.3.2)23.1 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

12.4.3 硒代蛋氨酸标准储备液(1 000 mg/L, 按 Se 计):称取硒代蛋氨酸(12.3.3)24.8 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度。于 0℃~4℃ 储存,有效期 1 个月。

12.4.4 混合标准工作液(1.0 mg/L):分别准确量取标准储备液(12.4.1、12.4.2、12.4.3)各 0.10 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,现用现配。

12.5 材料

针式滤膜:水系,0.22 μm。

13 仪器设备

13.1 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。

13.2 分析天平:感量 0.000 01 g、0.000 1 g 和 0.01 g。

13.3 pH 计:精确至 0.1。

13.4 涡旋混合仪。

13.5 恒温振荡器。

13.6 高速组织匀浆机:转速不低于 15 000 r/min。

13.7 高速离心机:转速不低于 12 000 r/min。

13.8 网筛:孔径 425 μm。

13.9 试样制备设备:匀浆机、高速粉碎机。

14 分析步骤

14.1 试样制备

同第一法。

14.2 试样提取

称取试样(7.1.1)2 g(精确至 0.01 g)或试样(7.1.2)(精确至 0.000 1 g)于 50 mL 离心管中,加入 0.2 mol/L 抗坏血酸溶液(12.2.2)0.5 mL 和 10.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(12.2.3)8.5 mL,15 000 r/min 高速匀浆 1 min,再加入 20.0 mg/mL 蛋白酶 XIV 溶液(12.2.1)1.0 mL、崩溃酶(12.1.4)20 mg,涡旋混匀,于恒温振荡器(13.5)(37±0.5)℃ 下振荡酶解 12 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1.0 mL 至 10 mL 刻度试管中,用流动相 A(12.2.4)定容至 10 mL,混匀,经 0.22 μm 水系滤膜过滤后待测。

14.3 标准系列溶液的制备

准确移取混合标准工作液(12.4.4)1.00 mL,用流动相 A(12.2.4)稀释定容至 10.0 mL,再配制成浓度为 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 混合标准系列溶液,现用现配。

14.4 仪器参考条件

14.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱:C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,粒径 5 μm),或性能相当者;
- 流动相:A(12.2.4),B(12.1.1),A:B 为 98:2(V/V),等度洗脱;
- 流动相流速:1.0 mL/min;
- 进样量:50 μL;
- 柱温:35℃。

14.4.2 电感耦合等离子质谱仪参考条件

- 雾化器:同心雾化器;
- 雾化室温度:2℃;
- 炬管内径:2.5 mm;

- d) 采样锥/截取锥(Ni 锥)孔径:1.0 mm/0.4 mm;
- e) 射频发射功率:1 550 W;
- f) 采样深度:8.0 mm;
- g) 冷却气流量:15 L/min;
- h) 载气流量:0.85 L/min;
- i) 补偿气流量:0.28 L/min;
- j) 氦气流速:4.2 mL/min;
- k) 蠕动泵转速:0.3 r/s;
- l) 采集质量数:78;
- m) 积分时间:1.0 s。

14.5 标准曲线

取混合标准系列溶液(14.3),按照浓度由低到高依次进样测定,以各硒形态色谱峰面积和浓度作图,绘制标准曲线。

14.6 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,否则应适当稀释待测液。3种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图见附录B。

15 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)以质量分数表示,按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

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半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V ——提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- f ——稀释倍数;
- m ——试样质量的数值,单位为克(g);

1000——换算系数

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。

16 精密度

16.1 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%。

16.2 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%。

17 其他

本方法食用菌鲜品中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸定量限均为0.02 mg/kg,食用菌干品中硒代半胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸定量限均为0.05 mg/kg。

附 录 A
(资料性)

3 种硒代氨基酸标准溶液特征离子质量色谱图

3 种硒代氨基酸标准溶液特征离子质量色谱图见图 A. 1、图 A. 2 和图 A. 3

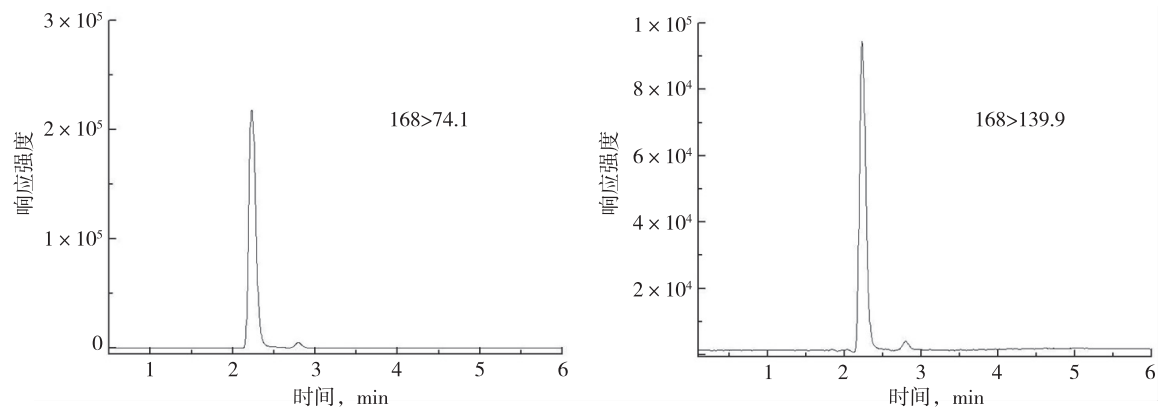


图 A. 1 硒代半胱氨酸标准溶液特征离子质量色谱图(20.0 ng/mL)

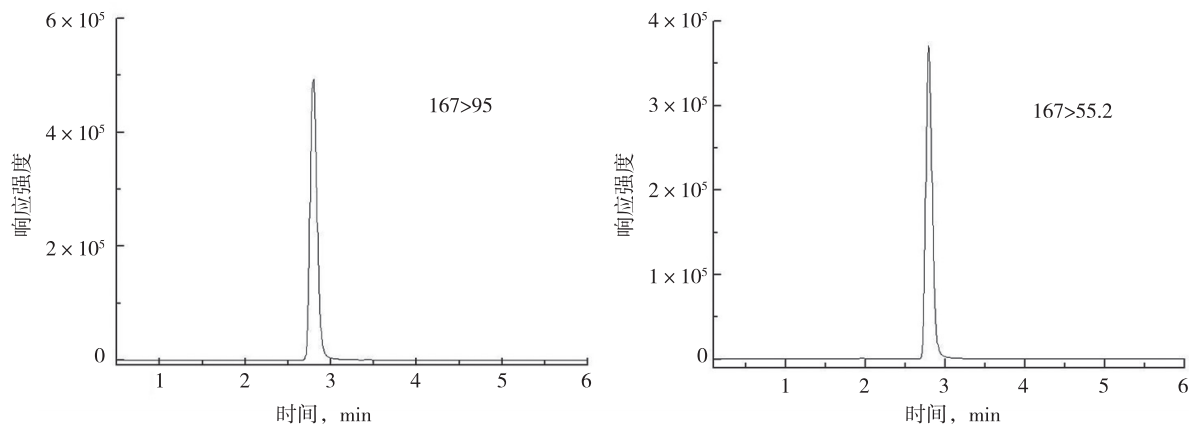


图 A. 2 甲基硒代半胱氨酸标准溶液特征离子质量色谱图(20.0 ng/mL)

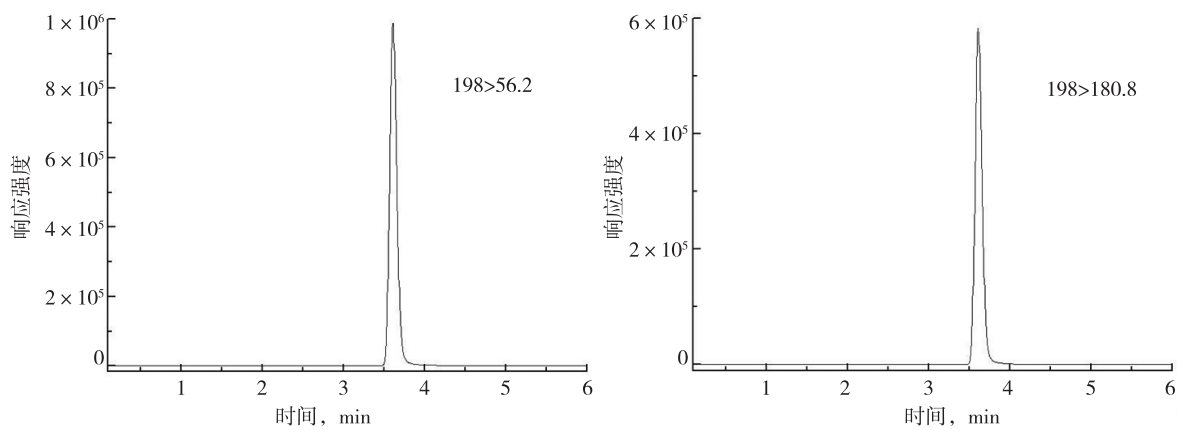


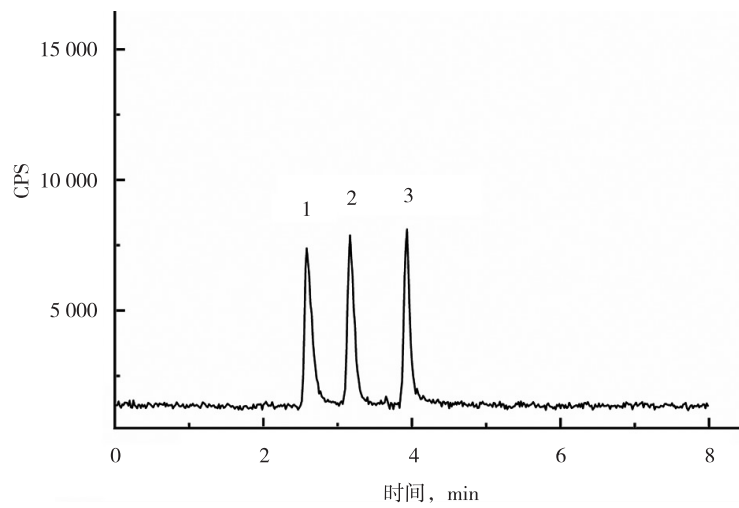
图 A. 3 硒代蛋氨酸标准溶液特征离子质量色谱图(20.0 ng/mL)

附 录 B

(资料性)

3 种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图

3 种硒代氨基酸混合标准溶液色谱见图 B. 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 B. 1 3 种硒代氨基酸混合标准溶液色谱图(2.0 ng/mL)