

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4353—2023

蔬菜中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋 氨酸和硒代半胱氨酸的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of methylselenocysteine, selenotmethionine and selenocysteine
in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2023-04-11 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家委员会归口。

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、江西省农学会、江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所。

本文件主要起草人：廖且根、张莉、向建军、万鹏、袁丽娟、沈思言、张大文、魏益华、罗林广、戴廷灿、邱素艳、熊艳。



蔬菜中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蔬菜中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸含量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于蔬菜中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸含量的测定。

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

试样中硒代氨基酸用蛋白酶水解提取,经超滤管离心净化,用液相色谱-串联质谱仪检测,基质匹配标准溶液校准,外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 试剂

5.2.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.2.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。

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

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

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

5.2.6 盐酸(HCl),浓度为 36%~38%。

5.3 试剂配制

5.3.1 蛋白酶溶液(5.0 mg/mL):称取蛋白酶(5.2.3)250 mg,用水稀释定容至 50 mL,摇匀,备用,现用现配。

5.3.2 抗坏血酸溶液(0.2 mol/L):称取抗坏血酸(5.2.4)3.52 g,用水稀释定容至 100 mL,摇匀,备用,现用现配。

5.3.3 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液(10.0 mmol/L,pH 7.5):称取 0.606 g 三羟甲基氨基甲烷(5.2.5)溶于 450 mL 水中,用盐酸(5.2.6)调节到 pH 7.5,加水稀释至 500 mL,摇匀,备用。

5.3.4 甲酸溶液(0.1%):量取甲酸(5.2.2)0.1 mL,用水稀释定容至 100 mL,摇匀,备用。

5.4 标准品

5.4.1 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。

5.4.2 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。

5.4.3 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。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 甲基硒代半胱氨酸标准储备溶液(1 000 mg/L,按 Se 计):取甲基硒代半胱氨酸(5.3.2)标准品 23.1 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容。于 0℃~4℃冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.5.2 硒代蛋氨酸标准储备溶液(1 000 mg/L,按 Se 计):取硒代蛋氨酸(5.4.2)标准品 24.8 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容。于 0℃~4℃冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.5.3 硒代半胱氨酸标准储备溶液(1 000 mg/L,按 Se 计):取硒代半胱氨酸标准品(5.4.3)21.2 mg(精确至 0.01 mg),置于 10 mL 容量瓶中,用 0.5 mL 甲酸(5.2.2)溶解后,用水溶解并定容。于 0℃~4℃冷藏保存,有效期为 1 个月。

5.5.4 混合标准工作溶液(1.0 mg/L,按 Se 计):分别量取 0.05 mL 标准储备溶液(5.5.1,5.5.2,5.5.3)于 50 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至 50 mL,现用现配。

5.6 材料

5.6.1 微孔滤膜:水相,0.22 μm 。

5.6.2 超滤离心管:15 mL/3 ku,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(ESI)。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 pH 计,精度 0.1。

6.4 涡旋混合仪。

6.5 恒温水浴振荡器。

6.6 高速离心机,转速不低于 12 000 r/min。

6.7 组织捣碎机。

7 试验步骤

7.1 试样的制备

将蔬菜样品可食部分经组织捣碎均分成 2 份,装入洁净容器内,作为试样密封并标明标记。

7.2 试样提取与净化

称取试样 2 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,依次加入蛋白酶溶液(5.3.1)2.0 mL、抗坏血酸溶液(5.3.2)0.25 mL 和 Tris-HCL 缓冲溶液(5.3.3)7.75 mL,涡旋混匀,于恒温水浴振荡器上 37℃条件下振荡提取 12 h,12 000 r/min 离心 10 min。提取液经 0.22 μm 滤膜过滤转移至 15 mL 离心管中,再将过滤后 5.0 mL 提取液转移至超滤离心管(5.6.2)中,4 000 r/min 离心 10 min,取 0.1 mL 超滤液加入 0.9 mL 甲酸溶液(5.3.4),混匀待测。

7.3 标准曲线绘制

取空白试样,按 7.2 处理得到超滤溶液,准确量取 0.1 mL,分别准确移取适量混合标准工作溶液(5.5.4),用甲酸溶液(5.3.4)稀释定容至 1.0 mL,配制成浓度为 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL 和 10.0 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, 3.0 mm×100 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 % 甲酸水溶液 (5.3.4); B 为甲醇 (5.2.1), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

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

7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测;
- d) 喷雾电压、离子源温度、脱溶剂温度和氮气流速等参数应优化至最优灵敏度;
- e) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物名称	定性离子对, 碰撞能量 (m/z , eV)	定量离子对, 碰撞能量 (m/z , eV)
甲基硒代半胱氨酸	166.9/95(25)	166.9/95(25)
	166.9/55.2(18)	
硒代蛋氨酸	198/180.8(8)	198/56.2(20)
	198/56.2(20)	
硒代半胱氨酸	168/139.9(8)	168/74.1(15)
	168/74.1(15)	

7.4.3 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的保留时间与基质匹配标准工作液中甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸的保留时间相对偏差在 ±2.5% 以内, 且检测到的离子的相对丰度, 其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许相对偏差

相对离子丰度, %	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差, %	±20	±25	±30	±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, 硒代氨基酸标准溶液特征离子质量色谱图见附录 A。

8 结果计算

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

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

式中:

w_i ——试样中被测组分含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_i ——由标准曲线或单点测得的试样溶液中被测组分质量浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——提取液体积的数值,单位为毫升(mL);

f_i ——提取液的稀释倍数;

m ——试样质量的数值,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

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 20%。

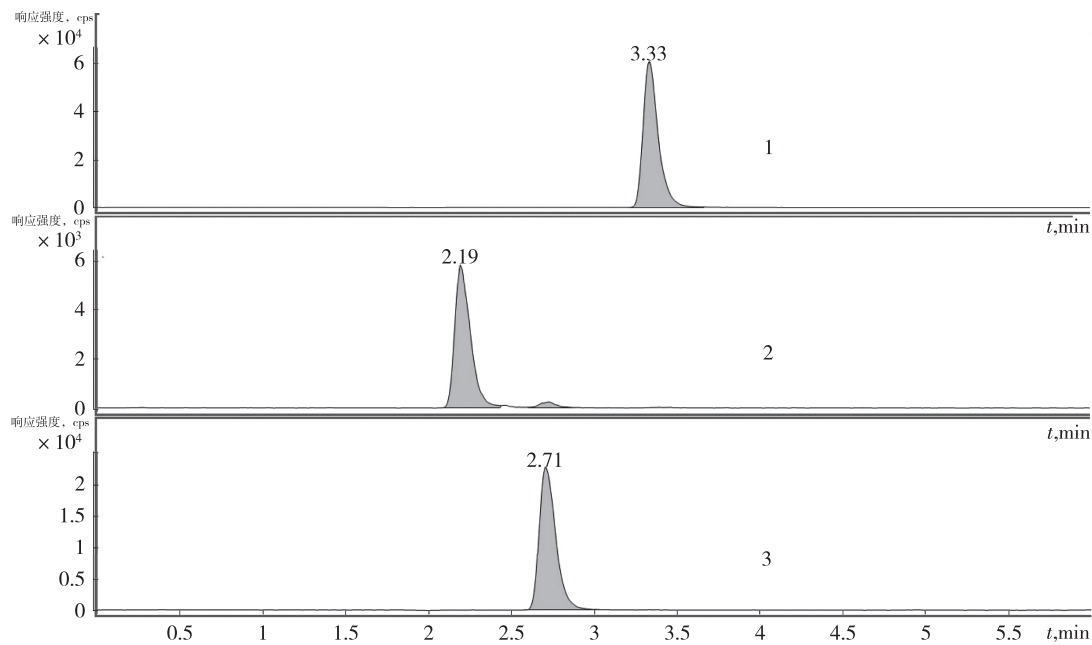
10 其他

方法中甲基硒代半胱氨酸和硒代半胱氨酸检出限均为 0.01 mg/kg,定量限均为 0.05 mg/kg;硒代蛋氨酸检出限为 0.005 mg/kg,定量限为 0.02 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



标引序号说明：
1——硒代蛋氨酸特征离子质量色谱图(198/56.2)；
2——硒代半胱氨酸特征离子质量色谱图(168/74.1)；
3——甲基硒代半胱氨酸特征离子质量色谱图(166.9/95)。

图 A. 1 3 种硒代氨基酸混合标准溶液(2.0 ng/mL)特征离子质量色谱图