

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX
代替 XX/T

饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定

Determination of Selenomethionine in Feed additive Yeast Selenium

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(送审稿)

(本草案完成时间：2024年2月)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：安琪酵母股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：

饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定

1 范围

本文件描述了饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的液相色谱-原子荧光光谱联用（LC-HG-AFS）和液相色谱-电感耦合等离子体质谱（LC-ICP/MS）联用的测定方法。

本文件适用于饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定。

本文件液相色谱-原子荧光光谱联用法硒代蛋氨酸的检出限为10 mg/kg，定量限为30 mg/kg；液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法硒代蛋氨酸的检出限为1 mg/kg，定量限为3 mg/kg。

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
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 液相色谱-原子荧光光谱联用法（LC-HG-AFS）

4.1 原理

试样以蛋白酶酶解，采用液相色谱-原子荧光光谱联用仪检测，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯。

- 4.2.1 水：GB/T 6682，一级。
- 4.2.2 甲醇（CH₃O）：色谱纯。
- 4.2.3 乙酸（C₂H₄O₂）。
- 4.2.4 盐酸（HCl）：优级纯。
- 4.2.5 四甲基氢氧化铵（C₄H₂₃NO₆）：25%（V/V）。
- 4.2.6 三羟甲基氨基甲烷[NH₂C(CH₂OH)₃]。
- 4.2.7 乙酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯。
- 4.2.8 蛋白酶（protease XIV 型，CAS:9036-06-0）：酶活力≥3.5 U/mg（在 pH 7.5 和 37 °C 条件下，每分钟水解酪蛋白产生不少于 3.5 μmol 酪氨酸）。
- 4.2.9 硒代蛋氨酸（C₃H₁₁NO₂Se，CAS:3211-76-5）：纯度≥98%。
- 4.2.10 盐酸溶液（6 mol/L）：量取 100 mL 盐酸（4.2.4）缓慢加入 100 mL 水中，混匀，冷却后使用。
- 4.2.11 三羟甲基氨基甲烷-盐酸（Tris-HCl）缓冲溶液（0.1 mol/L，pH 7.5）：准确称取 12.11 g 三羟甲基氨基甲烷（4.2.6），用 900 mL 水溶解，用盐酸溶液（4.2.10）调节 pH 值至 7.5，定容至 1 L。
- 4.2.12 流动相：称取 1.156 g 乙酸铵（4.2.7）溶于 900 mL 水中，加入 0.15 mL 四甲基氢氧化铵（4.2.5），用乙酸（4.2.3）调节 pH 至 5.5，加入 50 mL 甲醇（4.2.2），加水定容至 1 L。
- 4.2.13 硒代蛋氨酸标准储备液（300 μg/mL）：称取 15.00 mg 硒代蛋氨酸标准品（4.2.9），精确至 0.01 mg，于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容。此溶液置于 0~4 °C 冰箱保存，有效期为 1 个月。

4.2.14 硒代蛋氨酸中间溶液（3 μg/mL）：吸取 1.0 mL 硒代蛋氨酸标准贮备液（4.2.13）于 100 mL 容量瓶内，用水定容，此溶液临用现配。

4.2.15 硒代蛋氨酸标准工作溶液：吸取硒代蛋氨酸中间溶液（4.2.14）0 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 于 50 mL 容量瓶内，用水定容，得到浓度分别为 0 μg/L、60 μg/L、120 μg/L、240 μg/L、360 μg/L、480 μg/L、600 μg/L 的标准工作溶液。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-原子荧光光谱联用仪：配备硒空心阴极灯。

4.3.2 电子天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

4.3.3 水浴摇床：振荡速率 150 r/min，37 °C±1 °C。

4.3.4 离心机：转速不低于 10000 r/min。

4.3.5 滤膜：水系，孔径为 0.45 μm。

4.4 试样制备

按GB/T 20195制备试样，至少200 g，粉碎使其全部过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取50 mg（精确至0.1 mg）试样于50 mL塑料离心管内，加入5 mL缓冲液（4.2.11），在90 °C水浴中加热10 min，迅速冷却至室温。加入10 mg蛋白酶（4.2.8），置于水浴摇床中，在37 °C，150 r/min酶解3 h。取出，10000 r/min离心10 min，上清液转移至另一离心管中，4 °C暂存。

在离心后留有残渣的水解管中，加入10 mg蛋白酶（4.2.8），再加入5.0 mL缓冲液（4.2.11），涡旋混匀后置于水浴摇床中，在37 °C，150 r/min酶解3 h。取出，10000 r/min离心10 min，上清液合并。

重复第2次酶解步骤1次。

用水定容至25 mL，混匀、稀释、过膜后上机分析。

同时做空白。

4.5.2 测定

4.5.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，长度250 mm，内径4.6 mm，粒径5.0 μm，或性能相当者。

柱温：35 °C。

流速：1.0 mL/min。

进样量：100 μL。

4.5.2.2 氢化物发生器参考条件

载液：10 % HCl，流速6.0 mL/min。

还原剂：2 % NaBH₄溶液，含0.5 % NaOH，流速4.0 mL/min。

载气、屏蔽气均为氩气，载气流速300 mL/min，屏蔽气流速600 mL/min。

4.5.2.3 原子荧光光谱参考条件

负高压：270 V。

炉温：200 °C。

主灯电流：120 mA。

辅灯电流：120 mA。

原子化器高度：9.0 mm。

4.5.2.4 标准工作溶液和试样溶液测定

分别取标准系列工作溶液（4.2.15）和试样溶液（4.5.1）上机（4.3.1）测定。在上述色谱条件下，硒代蛋氨酸标准溶液色谱图见附录A.1。

4.5.2.5 定性

在相同测试条件下，以保留时间定性，试样溶液与标准工作溶液中硒代蛋氨酸的保留时间相对偏差应在±2.5%以内。

4.5.2.6 定量

以硒代蛋氨酸的浓度为横坐标，以其色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液中硒代蛋氨酸的响应值应在标准曲线测定的线性范围内。

4.6 试验数据处理

试样中硒代蛋氨酸的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。按公式（1）计算：

$$\omega = \frac{(C_i - C_0) \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n \quad (1)$$

式中：

C_i ——从标准曲线查得的试样溶液硒代蛋氨酸的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_0 ——从标准曲线查得的空白试样溶液硒代蛋氨酸的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——合并后的上清液定容后的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数。

测定结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留3位有效数字，数据处理按GB/T 8170进行修约。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

5 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法（LC-ICP/MS）

5.1 原理

试样以蛋白酶酶解，采用液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪检测，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除另有规定外，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 硒代蛋氨酸标准系列工作溶液：分别吸取硒代蛋氨酸中间溶液（4.2.14）0.0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL于100 mL容量瓶内，定容，得到浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、15 $\mu\text{g/L}$ 、30 $\mu\text{g/L}$ 、45 $\mu\text{g/L}$ 、60 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。

5.2.2 滤膜：水系，孔径为0.22 μm 。

5.2.3 其它：同4.2。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-电感耦合等离子质谱联用仪：配碰撞池。

5.3.2 其它：同4.3。

5.4 试样制备

按GB/T 20195制备试样，至少200 g，粉碎使其全部通过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

同4.5.1。

5.5.2 测定

5.5.2.1 液相色谱参考条件

进样量：20 μL ，其它同4.5.2.1。

5.5.2.2 质谱参考条件

雾化器：同心雾化器。

采样质量数：78。

采集模式：跳峰（Peak Hopping）。

氦气气体流量：4~5 L/min。

5.5.2.3 标准工作溶液和试样溶液测定

分别取硒代蛋氨酸标准工作溶液（5.2.1）和试样溶液（5.5.1）上机（5.3.1）测定。硒代蛋氨酸标准溶液色谱图见附录A.2。

5.5.2.4 定性

在相同测试条件下，以保留时间定性，试样溶液与标准工作溶液中硒代蛋氨酸的保留时间相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 以内。

5.5.2.5 定量

以硒代蛋氨酸的浓度为横坐标，以其色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液中硒代蛋氨酸的响应值应在标准曲线测定的线性范围内。

5.6 试验数据处理

同4.6。

5.7 精密度

同4.7。

附录 A
(资料性)
硒代蛋氨酸标准溶液色谱图

A.1 硒代蛋氨酸标准溶液色谱图

见图A.1。

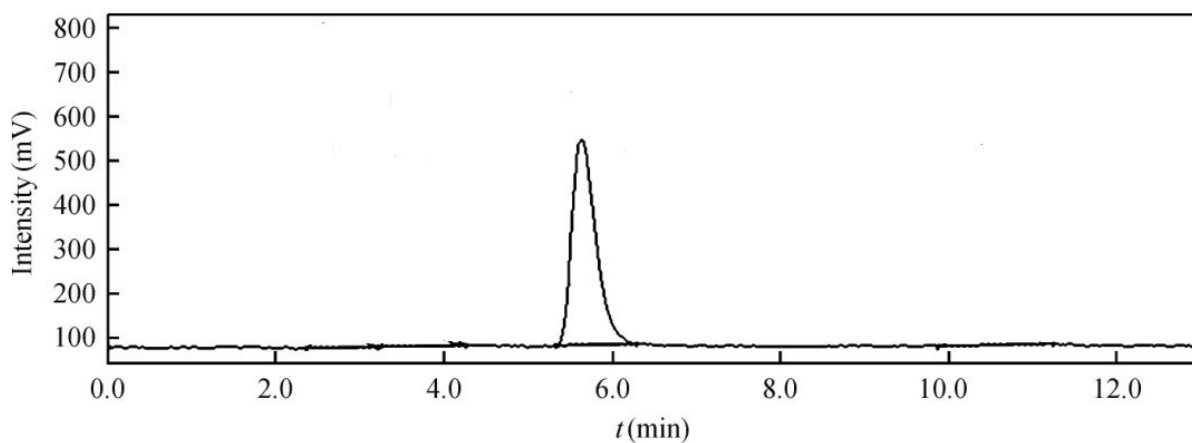


图 A.1 硒代蛋氨酸标准溶液 LC-HG-AFS 色谱图^{注 a}

^a 硒代蛋氨酸标准溶液浓度 $C=300 \mu\text{g/L}$ 。

A.2 硒代蛋氨酸标准溶液色谱图

见图A.2。

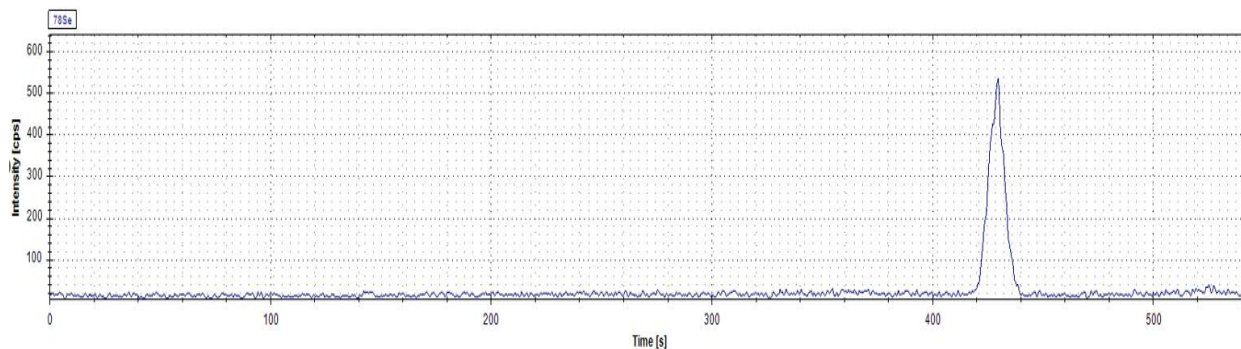


图 A.2 硒代蛋氨酸的标准溶液 LC-ICP/MS 色谱图^{注 b}

^b 硒代蛋氨酸标准溶液浓度 $C=30 \mu\text{g/L}$ 。