
中华人民共和国农业行业标准

饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定

编制说明

(送审稿)

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

饲料添加剂 酵母硒中硒代蛋氨酸的测定

编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

依据《2018年农业行业标准制定和修订（农产品质量安全）项目申报目录》，将《酵母类饲料原料中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定》列入建议项目名单。

2018年6月，农业农村部下发了《农业农村部关于支付2018年农产品质量安全监管专项经费等项目资金的通知》（农财发[2018]46号），安琪酵母股份有限公司获批承担《酵母类饲料原料中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定》标准项目的制定工作，项目编号96。

(二) 标准制定的背景

硒代蛋氨酸（selenomethionine），别名：甲硒丁氨酸、硒代甲硫氨酸。

硒是一种人体的必需微量元素，其形态一般分为：单质硒、无机硒、有机硒。其中单质硒人体无法利用。无机硒包括硒化物（ Se^{2-} ）、硒酸盐（ SeO_4^{2-} ）、亚硒酸盐（ SeO_3^{2-} ）。有机硒包括硒代氨基酸、含硒小肽、硒蛋白、硒多糖、含硒核酸等。

研究发现硒具有清除细胞杂质，抗氧化、参与谷胱苷肽过氧化酶合成等特性，具有抗衰老、抗干细胞坏死、提高免疫力、抗癌变等功效，硒摄入量不足可引起心血管疾病、肿瘤、大骨节病、关节炎、胰腺纤维化、白内障等疾病；但摄入过多的硒也会对人体造成危害，推荐日均摄入量不大于400 $\mu\text{g}^{[1]}$ 。

酵母硒具有安全性高，毒副作用小，吸收利用率高的特点。世界范围内，酵母硒早已广泛的作为微量元素硒的补充来源。酵母硒作为我国饲料添加剂目录中允许使用的两种硒营养补充来源之一，已得到畜牧业人士的广泛认可。

国内酵母硒行业由最开始主要依靠进口，发展到现在主要以国内生产为主，国内涌现出了一大批酵母硒生产企业，包括安琪酵母股份有限公司、浙江东成生物科技股份有限公司等。国内酵母硒产品规格，以总硒含量计主要包括1000 mg/kg、2000 mg/kg和3000 mg/kg，且有机硒占总硒的比例均 $\geq 98\%$ 。目前，国内酵母硒的研发和生产能力已达到国际先进水平。国外主要的酵母硒供应商有Lallemand、Lesaffre和Alltech等。

安琪酵母股份有限公司作为中国最大的酵母硒生产企业，2022年酵母硒产销量超过3000吨，成为世界第一酵母硒供应商。酵母硒主要应用于猪饲料，以

100 克酵母硒/吨猪饲料添加量计算，2022 年中国猪饲料 13600 万吨，则酵母硒的市场容量可达 1.3 万吨，可以看出酵母硒未来广阔的市场前景。

随着业内人士对有机硒的认识加深，市场对酵母硒的需求逐渐加大，国内外酵母硒生产厂家竞争越来越激烈。为获得品质更高，且质量稳定的酵母硒产品，各生产厂家都会对自己的产品中总硒、有机硒和硒代蛋氨酸进行检测，并不断提升相应指标，掌握市场竞争优势。目前，国内外暂时没有检测饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的权威检测方法，各企业参照文献，自己研究测定方法，检测结果差异大，导致同一产品，不同企业检测出的结果大相径庭，造成了市场的混乱，所以就酵母硒产业健康发生而言，各厂家均希望出台一个标准，有效规范市场，营造一个良性市场氛围。

二、主要工作过程

（一）成立标准编制小组

安琪酵母股份有限公司接到制标任务后，对该标准的具体工作进行了研究，确定了总体工作方案，并组建了标准制定工作小组。

（二）查阅国内外相关标准和文献资料

本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定的指导思想。形成了开题报告，并制定了初步的实验方案。

（三）确定标准制定的技术路线

标准工作小组召开了标准开题讨论会，会上标准编制小组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

标准编制小组在进行技术调研、充分讨论并征求专家意见后，最终确定技术路线：酶解的前处理方法，二种仪器方法。二种仪器方法分别为：液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法（LC-HG-AFS）、液相色谱-电感耦合等离子体质谱法（LC-ICP/MS）。

酶解方法的主要思路：采用一种或多种酶酶解，在样品处理过程中，最大程度保护硒的形态不发生转化。

（四）进行论证实验，确定主要试验技术内容修订的合理性

在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，同时参照国际和国内外先进标准，结合目前的实际情况，初步确定了标准相应的试验方法，形成了标准草案。之后，工作组对标准草案进行了多次讨论研究，对标准中采用的试验方法进行了技术验证工作，积累了检验数据。经认真研究分析，完成了本标准

文本及编制说明的征求意见稿。

（五）第一次征求意见

2019年8月份，组织了对本标准第一次征求意见。

（六）进行试验方法验证

根据征求的反馈意见，对标准文本和编制说明进行了修改完善，2020年，邀请国家饲料质量监督检验中心（武汉）、湖北省产品质量监督检验研究院、三峡公共检验检测中心等三家单位对方法进行了验证。

（七）召开标准预审会

2021年5月，召开标准预审会，预审会专家组建议如下：

1. 标准名称改为《饲料添加剂 酵母硒中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定》。
2. 酶解后增加其他检测方法。
3. 增加硒代半胱氨酸的检测方法。
4. 按 GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.4-2015 的要求规范标准文本及完善编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改后再次征求意见。

（八）研究硒代半胱氨酸的检测方法

根据第一次预审会专家给出的意见，进行硒代蛋氨酸、硒代半胱氨酸的液相一原子荧光及液相一电感耦合等离子质谱法研究和试验方法验证。形成第二版征求意见稿。

（九）第二次征求意见

2022年5月，向专家发送函审意见表共40份。7月，收到回函29份，回函并有建议或意见的17个。

（十）完善的标准文本，开展方法验证

2022年8月，在收到专家函审意见后，对文本进行了修改，开展方法验证工作。

在方法验证过程中，发现硒代半胱氨酸在水溶液中不稳定，并且方法的准确性无法保证。

（十一）第二次预审

2023年11月，进行第2次预审，预审会专家组建议：标准名称修改为《饲

料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定》，其它内容做相应的修改。

（十二）网上公开征求意见

第二次预审会通过，起草组根据专家组意见对标准名称进行了修改，标准文本和编制说明进一步修改完善，形成了网上征求意见稿，提交全国饲料工业标准化技术委员会进行网上公开征求意见。

三、关于标准名称的说明

本标准任务名称下达时为《酵母类饲料原料中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定》，2021年5月，组织专家进行了标准预审，专家组建议项目名称改为《饲料添加剂 酵母硒中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定》，测定方法改为：液相色谱-原子荧光光谱法（LC-HG-AFS）和液相色谱-电感耦合等离子体质谱（HPLC-ICP/MS）方法，增加中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所为起草单位。

2023年11月第2次预审，专家组建议项目改为《饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定》并在编制说明中增加说明如下：

在该标准的研制过程中，起草组发现，硒代半胱氨酸在水溶液中不稳定，测定值不能真实反映硒代半胱氨酸的含量；同时，硒代半胱氨酸在酵母硒中含量很低，硒代半胱氨酸含量文献报道有2~4%，但实际检测中未检测到，因此研究酵母硒中的硒代半胱氨酸及其检测方法意义不大。

起草组对硒代半胱氨酸的研究报告详见附件1。

四、实验及验证分析

（一）仪器条件的确定

1 液相色谱条件的确定

参考 NY/T 3556-2020《谷物中硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸的测定》的液相条件，考虑到电感耦合等离子体质谱与原子荧光共用一个分离条件，液相色谱条件经实验后确定为：

色谱柱：C₁₈柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）。

柱温：35℃。

流动相（pH 5.5）：15 mmol/L 乙酸铵，0.2 mmol/L 四甲基氢氧化铵，5%甲醇。

流动相流速：1 mL/min。

2 氢化物发生器、原子荧光光谱仪条件的确定

氢化物发生器、原子荧光参考仪器厂家条件如下：

氢化物发生器条件：载液：10 % HCl，流速 6.0 mL/min；还原剂：2 %KBH₄ 溶液，含 0.5 % KOH；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。

原子荧光检测器条件：硒高性能空心阴极灯(北京有色金属研究院)；负高压：270V；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。

按照上述条件进行试验，见图 1。

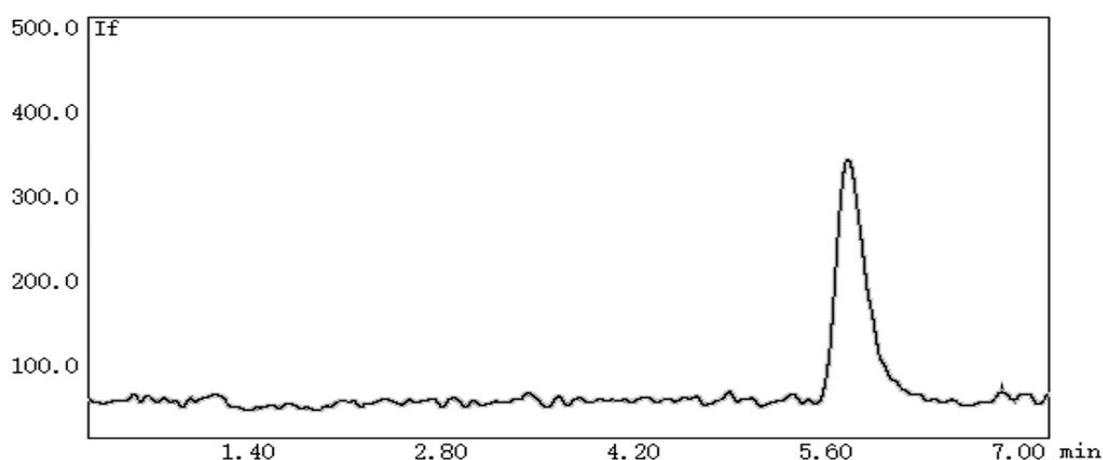


图 1 LC-HG-AFS 测定硒代蛋氨酸标准溶液图谱（120 μg/L）

3 电感耦合等离子体质谱仪器条件

电感耦合等离子体质谱条件如下：

同心雾化器；雾化室温度：2 °C；采样锥/截取锥：镍/铂；采样深度：5 mm
采样质量数：78；射频功率：1500 w；载气流量：0.8 L/min；辅助气流量：0.4 L/min；
采集模式：跳峰(Peak Hopping)；氦气气体流量：4~5 L/min；蠕动泵转速：40 r/min；
驻留时间：0.05 s。

依照以上仪器条件测定硒代蛋氨酸标准溶液，见图 2。

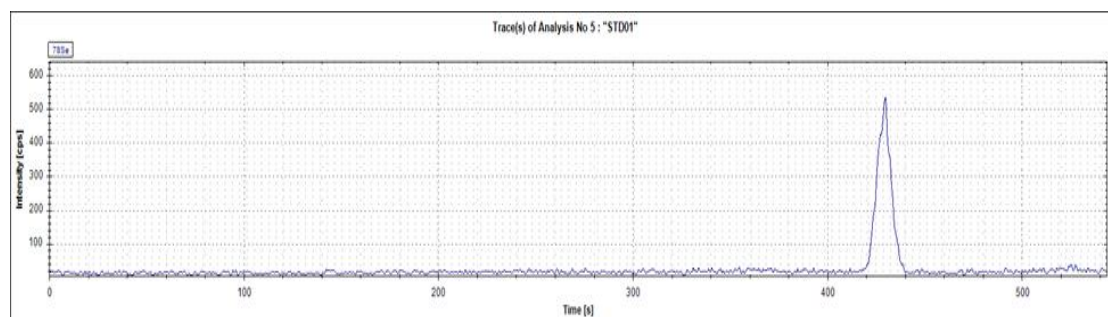


图 2 LC-ICP/MS 运行硒代蛋氨酸标准溶液图 (30 µg/L)

4 前处理条件的确定

4.1 水解方式的选择

硒代蛋氨酸在酵母硒中的存在形式, 主要以硒蛋白的形式存在。需要将硒代蛋氨酸从蛋白质中水解出来。通过查阅文献, 主要有 2 种方式: a 酸水解^[9]; b 蛋白酶水解^[10]。对以上方法进行了比对, 采用酶解法的硒代蛋氨酸的结果普遍较酸水解法的高, 本标准选择了酶解法。

4.2 酶的选择

在确定了采用酶法水解后, 又对酶的品种进行了选择。其中实验了胰蛋白酶、氨基肽酶、枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶 XIV、胶原蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶等。

依据上述酶的标称酶活值, 计算出 4 小时内完全酶解酵母硒样品中蛋白质需要酶的质量。

实验时, 称 10 倍质量的酶 (理论计算量), 并在各酶最适 pH 值、温度条件, 于 0.1 mol/L 的缓冲液中酶解 4 小时, 上机分析, 比较样品中硒代蛋氨酸的含量。

表 3 不同酶酶解对比实验数据

| 酶种类 | CAS 号 | 缓冲液 pH 值 | 酶解温度℃ | 时间 h | 含量 mg/kg |
|---------|------------|----------|-------|------|----------|
| 胰蛋白酶 | 9002-07-7 | 8.0 | 37 | 4 | 1129 |
| 氨基肽酶 | 9054-63-1 | 7.5 | 37 | 4 | 644 |
| 枯草杆菌蛋白酶 | 9014-01-1 | 8.5 | 50 | 4 | 1077 |
| 蛋白酶 XIV | 9036-06-0 | 7.5 | 37 | 4 | 1762 |
| 胶原蛋白酶 | 9001-12-1 | 7.0 | 37 | 4 | 198 |
| 蛋白酶 K | 39450-01-6 | 7.5 | 50 | 4 | 237 |
| 胃蛋白酶 | 9001-75-6 | 2.0 | 37 | 4 | 82 |

经过实验发现蛋白酶 XIV 效果最佳。该酶的证书和详细说明见附件 2。

4.3 缓冲液的选择

考虑到本方法采用了液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪, 磷酸缓冲液会影响仪器的稳定性, 所以选择了在质谱分析普遍使用的三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCL) 缓冲溶液。参考文献^{[8][10]}选择 0.1 mol/L Tris-HCL 缓冲液。

4.4 酶解温度、pH 值的确定

酶解温度采用蛋白酶 XIV 的最适温度 37 °C、最适 pH7.5, 见附录 1。

4.5 加酶量的确定

在确定酶品种后，依据酶的产品证书最低酶活 3.5 U/mg（在 pH7.5 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）估算，若称样量为 50 mg 时，60 分钟全部酶解样品为氨基酸，理论上需 3 mg 的酶。根此数据，为了彻底酶解释放出硒代蛋氨酸，确定加酶量为 10 mg。

4.6 酶解时间的确定

在选定了酶、酶解温度、缓冲液及其浓度后，需要确定酶反应的时间。设计以下实验：称取酵母硒样品 50 mg 于塑料离心试管内，加入 10 mg 蛋白酶 XIV，加入 5 mL 0.1 mol/L Tris-HCL 缓冲液，于 37 °C 150 r/min 水浴振荡器内反应。反应时间从 0~240 min，每 20 min 取出 1 个样品，10000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，余下沉淀测定总硒含量。通过未酶解的样品中硒含量来确定酶解程度，从而确定酶解时间。实验数据如图 3。

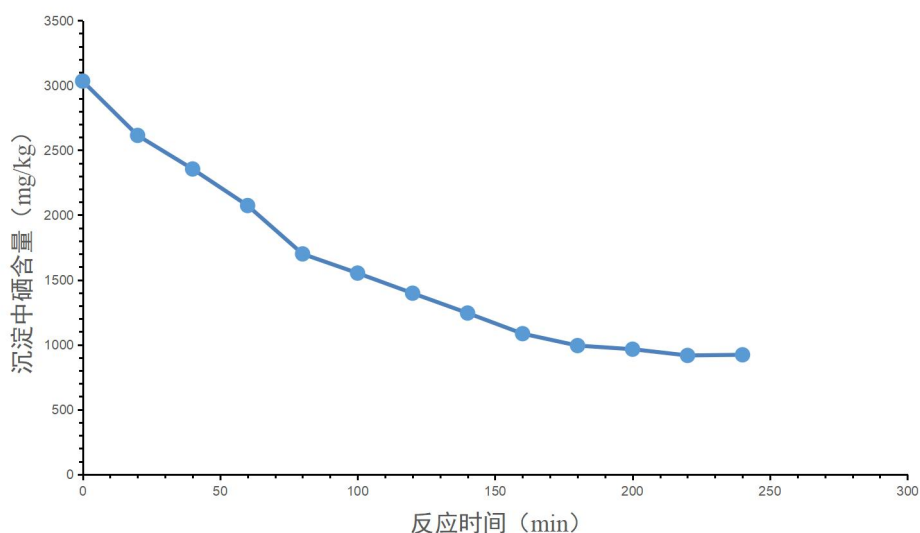


图 3 酶解时间与沉淀中硒含量关系图

注：沉淀中硒含量计算按式 1 计算。

$$\text{沉淀中硒含量} = \frac{\text{上机测定浓度} \times \text{定容体积} \times \text{稀释倍数}}{50 \text{ mg}} \#1$$

注：50 mg 为样品质量。

根据上图，选择酶解反应时为 3 小时。但仍有约 30 % 的硒存在于未被酶解的部分中，所以选择多次酶解的方案。

方案：取样品 12 份，分 3 组，每组 4 份。第 1 组酶解 3 小时，离心测定沉淀中的硒含量及上清液中的硒代蛋氨酸含量；第 2 组酶解 3 小时，离心，沉淀继续加入 10 mg 蛋白酶 XIV，再次酶解 3 小时，上清液合并测定硒代蛋氨酸，沉淀测定硒含量。第 3 组酶解 3 遍，上清液合并测硒代蛋氨酸，沉淀测硒。数据见图

4。

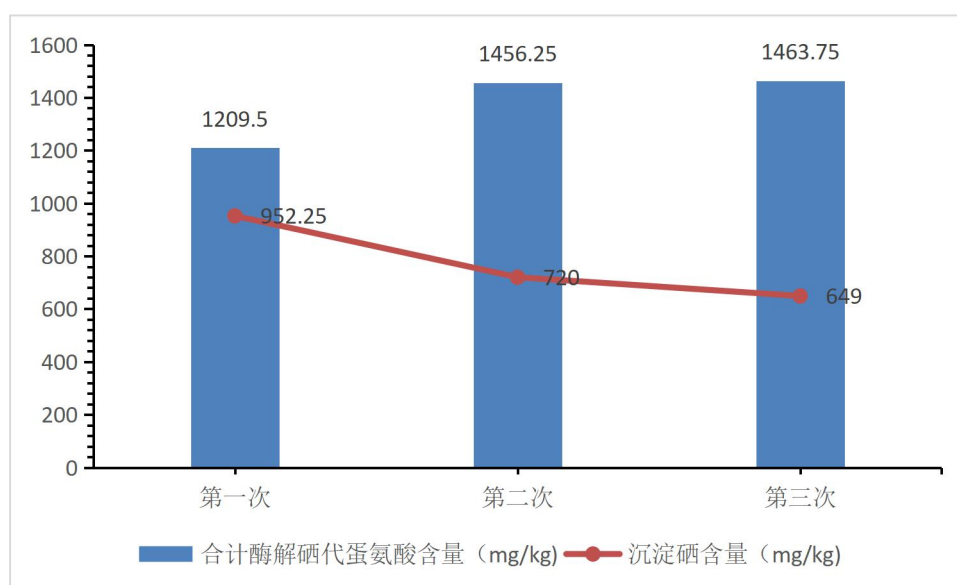


图 4 酶解条件的确定

从上图中可以得出，第 3 遍酶解后，硒代蛋氨酸含量未再有增加的趋势，沉淀中的硒下降不明显。为了保证酶解的完全，选择 3 遍酶解。

4.7 加温热烫过程的增加

在实验过程中，发现具有生物活性的酵母硒在酶解时产酸、产气，检测其硒代蛋氨酸含量，发现其下降很多，为此增加了一个处理过程，第 1 次酶解前，试样在 90 °C 的水浴中加热 10 min。同时做比较，此过程对样品中硒代蛋氨酸含量测定无显著影响。

表 4 热烫效果对比表（单位：mg/kg）

| 处理方式 | 未热烫 | 90 °C 热烫 |
|----------------|------|----------|
| 样品 1（有生物活性酵母硒） | 173 | 3589 |
| 样品 2（无生物活性酵母硒） | 3614 | 3677 |

从而确定前处理条件如下：

精确称取 50 mg（精确至 0.1 mg）样品于 50 mL 塑料离心管内，加入 5.0 mL 缓冲液，在 90 °C 的水浴中加热 10 min，迅速冷却至室温。加入 10 mg 蛋白酶，置于水浴振荡器中，在 37 °C，150 r/min 酶解 3 h。取出，10000 r/min 离心后，上清液转移至另一离心管中，4 °C 贮存。

离心后的留有残渣水解管中，加入 10 mg 蛋白酶，再加入 5.0 mL 缓冲液，置于水浴振荡器中，在 37 °C，150 r/min 酶解 3 h。取出，10000 r/min 离心后，上清液合并，4 °C 贮存。

重复第 2 次酶解步骤，合并 3 次上清液。稀释上机分析。

(二) 方法性能考察

1 线性范围

1.1 液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用法的线性范围

按标准文本配制硒代蛋氨酸标准工作溶液，按仪器参考条件运行见图 5。

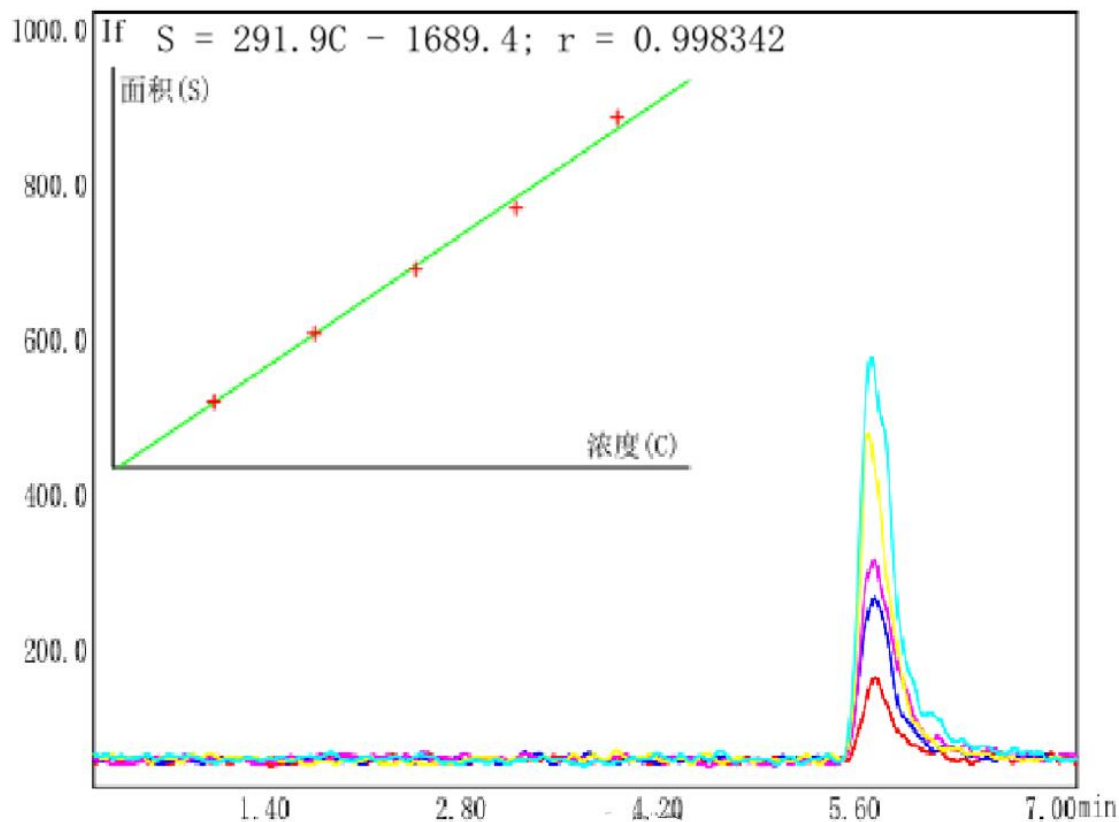


图 5 LC-HG-AFS 法测定硒代蛋氨酸标准系列

在 30~300 $\mu\text{g/L}$ 的范围内，硒代蛋氨酸标准系列溶液依 LC-HG-AFS 方法测定，其线性相关系数 ≥ 0.99 ，符合 GB/T 27404—2008 附录 F.2 标准要求。

1.2 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法的线性范围

配制硒代蛋氨酸标准工作溶液，上机分析，见图 6。


| No. | Time | Sample Type | Label | seMet [ppb] |
|--------------|---------------------|-------------|-------|---|
| 2 | 6/1/2022 1:49:48 PM | STD | | |
| 2 | 6/1/2022 1:49:48 PM | STD | std01 | 2.919 (3.000) |
| 3 | 6/1/2022 2:03:25 PM | STD | std2 | 6.994 (6.000) |
| 4 | 6/1/2022 2:14:38 PM | STD | std3 | 13.441 (15.000) |
| 5 | 6/1/2022 2:25:50 PM | STD | std4 | 32.325 (30.000) |
| 6 | 6/1/2022 2:37:02 PM | STD | std5 | 39.968 (45.000) |
| 7 | 6/1/2022 2:48:14 PM | STD | std6 | 62.906 (60.000) |
| Calibrations | | | |  |

图 6 硒代蛋氨酸标准工作溶液采集数据 (LC-ICP/MS)

对采集的数据作图。

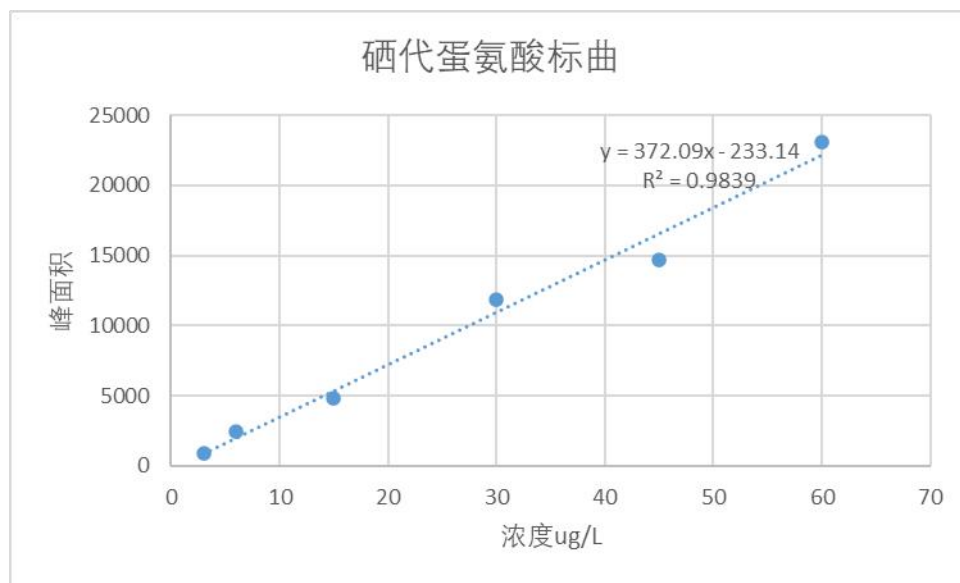


图 7 硒代蛋氨酸标准工作溶液线性回归图 (LC-ICP/MS)

在 3~60 $\mu\text{g/L}$ 的范围内，硒代蛋氨酸标准工作溶液依 LC-ICP/MS 方法测定，其线性相关系数 ≥ 0.99 。

2 检出限与定量限

2.1 液相色谱-氢化物原子-荧光联用法检出限、定量限

方法的检出限采用普通酵母作为空白样品进行前处理酶解，处理后的上清液加标来确定。由于 3 次上清液合并体积约为 15 mL，选择加标后定容体积 25 mL。当加标浓度 $S/N=3$ 时，确定检出限。当 $S/N=10$ 时，确定定量限。

当加标量为 $150\ \mu\text{L} \times 3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时，硒代蛋氨酸的测定图谱见图 8。确定硒代蛋氨酸的液相色谱-氢化物原子荧光法的检出限为 $9\ \text{mg}/\text{kg}$ (称样量以 $50\ \text{mg}$ 计)。对其取整，将硒代蛋氨酸的液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法的检出限定为 $10\ \text{mg}/\text{kg}$ 。

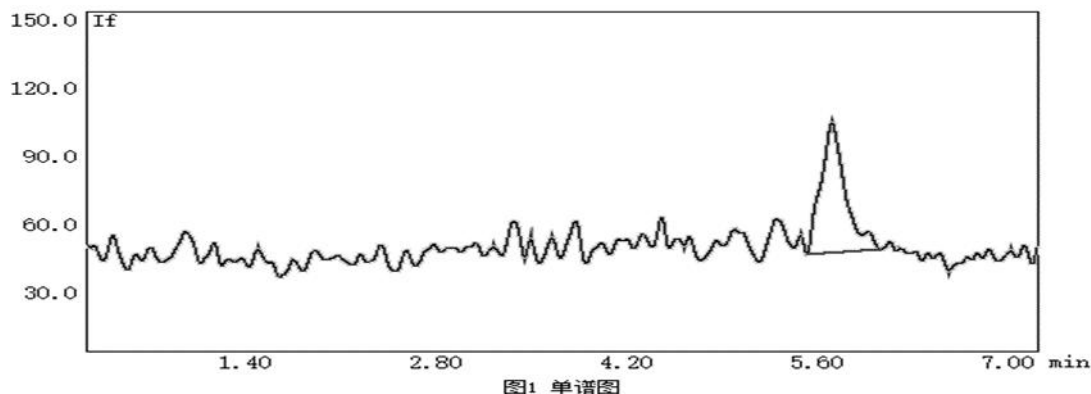


图 8 硒代蛋氨酸加标浓度为 $9\ \text{mg}/\text{kg}$ 时 LC-HG-AFS 谱图

采用相同的方法，硒代蛋氨酸的液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法的定量限为 $30\ \text{mg}/\text{kg}$ 。

2.2 液相色谱-电感耦合等离子体质谱法检出限、定量限

采用空白样品酶解处理后加标，当加标量为 $830\ \mu\text{L} \times 60\ \mu\text{g}/\text{L}$ 时，定容 $25\ \text{mL}$ 。硒代蛋氨酸的测定峰 $S/N \geq 3$ 。确定硒代蛋氨酸的液相色谱-电感耦合等离子体质谱法的检出限为 $1\ \text{mg}/\text{kg}$ (称样量以 $50\ \text{mg}$ 计)，见图 9。

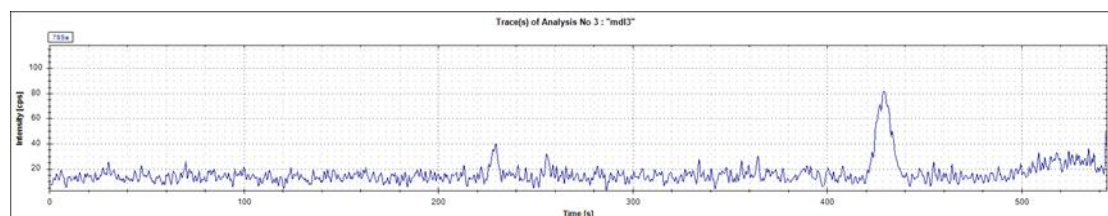


图 9 硒代蛋氨酸加标浓度为 $1\ \text{mg}/\text{kg}$ 时 LC-ICP/MS 谱图

采用相同的方法，硒代蛋氨酸的液相色谱-电感耦合等离子体质谱法的定量限为 $3\ \text{mg}/\text{kg}$ 。

3 定量限回收率

准确称取普通酵母（无硒） $50\ \text{mg}$ 样品于 $50\ \text{mL}$ 塑料离心管内，加入 $5.0\ \text{mL}$ 缓冲液，在沸水浴中加热 $10\ \text{min}$ ，迅速冷却至室温。加入硒代蛋氨酸标准品 $m_{\text{Se-met}}=1.5\ \mu\text{g}$ ，按照标准文本进行酶解前处理，定容 $25\ \text{mL}$ ，过膜，上 LC-HG-AFS 分析。同时运行标准系列工作溶液，然后计算回收率。

LC-ICP/MS 定量限回收率前处理相同，加标量为硒代蛋氨酸标准品

$m_{se-met}=0.15 \mu\text{g}$ ，定容 25 mL，过膜，上 LC-HG-AFS 分析。同时运行标准系列工作溶液，然后计算回收率。

定量限回收率数据见表：

表 5 定量限回收率(%)

| 日间 | | A日 | | | B日 | | | C日 | | |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 批次 | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 硒代蛋 | LC-AFS | 113.4 | 98.4 | 103.7 | 99.4 | 104.4 | 109.3 | 104.6 | 102.2 | 98.6 |
| 氨酸 | LC-ICP/MS | 117.4 | 101.2 | 92.9 | 102.7 | 94.2 | 103.8 | 97.4 | 97.5 | 92.7 |

4 样品加标回收率

选取 3 种规格的酵母硒，进行加标回收率实验。

表 6 样品加标回收率数据(%)

| 样品类型 | 目标物 | 仪器方法 | 平行 1 | 平行 2 | 均值 |
|--------------|-------|-----------|--------|--------|--------|
| 1000 mg/kg 型 | 硒代蛋氨酸 | LC-AFS | 101.11 | 102.02 | 101.56 |
| | | LC-ICP/MS | 107.60 | 93.10 | 100.35 |
| 2000 mg/kg 型 | 硒代蛋氨酸 | LC-AFS | 90.35 | 92.34 | 91.34 |
| | | LC-ICP/MS | 86.92 | 84.69 | 85.80 |
| 3000 mg/kg 型 | 硒代蛋氨酸 | LC-AFS | 90.28 | 84.67 | 87.47 |
| | | LC-ICP/MS | 86.10 | 85.39 | 85.74 |

对以上数据进行分析，硒代蛋氨酸的回收率在 84 %~108 %之间，方法的准确性（用回收率考察）无显著差异。

5 正确度

正确度采用有证标准物质进行评价。本实验采用硒代蛋氨酸含量为 $3202 \pm 261 \text{ mg/kg}$ 的酵母硒质控样作为正确度评价样品。

经过不同时间处理酵母硒质控样，采用不同仪器，测定结果见表 7。

表 7 有证标准物质测定结果

| 样品序号 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------|------|------|------|------|
| LC-HG-AFS 测定含量 mg/kg | 2999 | 3088 | 3219 | 3317 |
| LC-ICP/MS 测定含量 mg/kg | 3072 | 3250 | 3404 | 3432 |

测定结果均在给定范围内。

6 精密度

从市场收集的样品中随机抽取 1 个，称取 8 份平行样品进行样品前处理，然后分别采用 2 种不同的仪器方法测定硒代蛋氨酸含量。数据见表 8。

表 8 市场收集样品硒代蛋氨酸精密度测定结果

| 样品序号 | 硒代蛋氨酸含量 mg/kg | |
|-------|---------------|-----------|
| | LC-HG-AFS | LC-ICP/MS |
| 平行样 1 | 3627 | 3595 |
| 平行样 2 | 3645 | 3672 |
| 平行样 3 | 3730 | 3547 |
| 平行样 4 | 3745 | 3770 |
| 平行样 5 | 3785 | 3665 |
| 平行样 6 | 3870 | 3607 |
| 平行样 7 | 3822 | 3715 |
| 平行样 8 | 3846 | 3789 |
| 均值 | 3759 | 3670 |
| 极差 | 243 | 242 |
| RSD% | 2.4 | 2.3 |

预审稿中，精密度确定为 20%，预审会专家组根据以上实验数据，认为 20% 的精密度不符合实际情况，将其调回 10%，确定本标准的精密度为：“在重复性条件下，硒代蛋氨酸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%”。

7 硒代蛋氨酸标准溶液的稳定性

配制硒代蛋氨酸标准储备液（300 $\mu\text{g/mL}$ ），于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱分别保存 1 个月、半个月。取出，与现配的标准储备液一起，分别用水稀释至 60 $\mu\text{g/L}$ ，同时上机（LC-ICP/MS）测定 6 平行。数据见表 9。

表 9 硒代蛋氨酸标准溶液测定峰面积

| 序号 | 硒代蛋氨酸储备液 | | |
|----|----------|-------|-------|
| | 保存 1 个月 | 保存半个月 | 现配 |
| 1 | 28165 | 26741 | 27646 |
| 2 | 27546 | 27022 | 28799 |
| 3 | 26770 | 27111 | 28001 |
| 4 | 26313 | 28650 | 28655 |
| 5 | 25499 | 28707 | 27760 |
| 6 | 26018 | 27967 | 26014 |

| | | | |
|------|---------|----------|---------|
| 均值 | 26718.5 | 27699.67 | 27812.5 |
| RSD% | 3.39 | 2.84 | 3.28 |
| RSD% | | 2.20 | |

从表中 3 个不同储存时间的硒代蛋氨酸储备溶液的质谱响应平均值的数据进行处理，相对标准偏差为 2.20%，无显著差异。

本标准将硒代蛋氨酸酸储备液的有效期定为 1 个月。

8 方法的适应性

从市场上收集到的或从生产厂家得到的硒酵母 32 个样品（包括 8 个非富硒样品），用该标准方法进行测定，数据见表 10。

表 10 市场收集样品硒代蛋氨酸测定结果（单位：mg/kg）

| 样品类型 | 样品序号 | 硒代蛋氨酸测定含量 mg/kg | |
|-----------------------------|-------|-----------------|-----------|
| | | LC-HG-AFS | LC-ICP/MS |
| 普通酵母 | 样品 1 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 2 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 3 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 4 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 5 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 6 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 7 | ≤10 | ≤1 |
| | 样品 8 | ≤10 | ≤1 |
| 2000 mg/kg 型 颗粒状酵母 母硒 | 样品 9 | 3676 | 3595 |
| | 样品 10 | 3751 | 3672 |
| | 样品 11 | 3766 | 3547 |
| | 样品 12 | 3654 | 3770 |
| | 样品 13 | 3792 | 3665 |
| | 样品 14 | 3770 | 3607 |
| | 样品 15 | 3605 | 3715 |
| | 样品 16 | 3244 | 3789 |
| 2000 mg/kg 型 粉状酵母 硒 | 样品 17 | 3304 | 3349 |
| | 样品 18 | 3355 | 3404 |
| | 样品 19 | 3694 | 3555 |
| | 样品 20 | 3709 | 3657 |
| | 样品 21 | 3688 | 3479 |
| | 样品 22 | 3601 | 3596 |
| | 样品 23 | 3743 | 3668 |
| | 样品 24 | 3667 | 3711 |
| 3000 mg/kg 型 粉状酵母 | 样品 25 | 3645 | 4003 |
| | 样品 26 | 3681 | 3816 |
| | 样品 27 | 3777 | 3945 |

| | | | |
|---|-------|------|------|
| 硒 | 样品 28 | 3813 | 4113 |
| | 样品 29 | 3843 | 4132 |
| | 样品 30 | 3689 | 3977 |
| | 样品 31 | 3847 | 3896 |
| | 样品 32 | 3752 | 4073 |

从以上数据观察，本方法适用于市场上收集的所有酵母硒样品。

四、与国际标准、国内准的比较

(一) 国外相关标准

本项目是《饲料添加剂酵母硒中硒代蛋氨酸的测定》标准制定，经查阅，目前国际上关于酵母类富硒产品标准主要有欧盟的 3 个条例，见表 9。

表 9 国际上关于酵母类富硒产品标准

| 标准来源 | 标准名称/代号 | 指标要求 | 参考文献 |
|------|--|------------------------|---------------------|
| 欧盟 | COMMISSION REGULATION (EC) No 634/2007 | 硒代蛋氨酸形态硒 >总硒的 63 % | 参考文献 ^[4] |
| 欧盟 | COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 427/2013 (代替 (EC) No 634/2007) | 硒代蛋氨酸形态硒 >总硒的 70 % | 参考文献 ^[5] |
| 欧盟 | Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population | 硒代蛋氨酸占总硒 的 60~85 %; | 参考文献 ^[6] |

(二) 国内相关标准

查询富硒产品的国标和行标，有硒代蛋氨酸检测方法的标准如下：

表 10 富硒产品标准列表

| 标准代号 | 标准名称 |
|-----------------|----------------------|
| GB 1903.28-2018 | 食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒蛋白 |
| NY/T3556-2020 | 谷物中硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸的测定 |

| | |
|----------------|---|
| NY/T3870-2021 | 硒蛋白中硒代氨基酸的测定 液相原子荧光光谱法 |
| 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 |
| 本标准 | 饲料添加剂 酵母硒中硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸的测定 |

(三) 检测方法的比较

现将表 10 中所列标准与本方法，从不同方面进行比较。

表 11 检测方法比较

| 标准号 | GB 1903.28-2018 | NY/T3556-2020 | NY/T3870-2021 | NY/T 4353-2023 | 本标准 |
|--------------|--------------------|---------------|-------------------------------|-------------------|--|
| 适用范围 | 大豆蛋白 | 稻米、小麦、玉米、小米 | 硒蛋白 | 蔬菜 | 饲料添加剂 酵母硒 |
| 前处理方法 | 胰蛋白酶、蛋白酶 K、蛋白酶 XIV | 蛋白酶 XIV 酶解 | 样品加 6 mol/L 盐酸,微波水解仪中 150℃ 水解 | 蛋白酶 XIV 酶解 | 蛋白酶 XIV 酶解 |
| 仪器 | LC-ICP/MS | LC-ICP/MS | HPLC-AFS | HPLC-MS/MS | HPLC-AFS HPLC-ICP/MS |
| 线性范围 μg/L | 20~200 | 0.1~10 | / | 0.2~10 | 30~300 ^① 3~60 ^② |
| 检出限 mg/kg | / | / | / | 0.005 | 10 ^① 、1 ^② |
| 定量限 mg/kg | / | 0.005 | 0.14 | 0.02 | 30 ^① 、3 ^② |
| 精密度% | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 ^③ |

注：上标①代表液相色谱-原子荧光光度法、②代表液相色谱-电感耦合等离子体质谱法、③代表硒代蛋氨酸。

本方法的前处理方法、所用仪器、精密度与所列标准基本相同，但线性范围、检出限、定量限与所列标准比较有所不同。

分析可能的原因有：

线性范围：因为仪器型号不同，灵敏度差异所致。

检出限、定量限：检出限的计算方法不同所致。

五、与国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

未检索到国标标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

在标准的制订过程中，严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集调研了国内外相关信息资料，组织主要相关技术专家对标准内容进行了详细研讨，并达成统一制定方案。本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

八、涉及专利的有关说明

暂未搜索到相关专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等，因此建议将其作为推荐性标准颁布实施。

十、其他应予说明的事项

无。

附件 1

硒代半胱氨酸测定方法研究报告

一、硒代半胱氨酸标准品在水溶液中存在形态研究

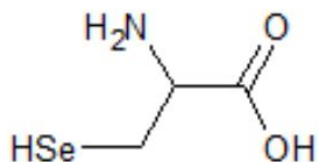
1. WATERS 公司对硒代半胱氨酸标准品在水溶液中存在形态研究

2018 年 11 月，安琪酵母股份有限公司委托 WATERS 公司，对硒代半胱氨酸的标准品在水溶液中存在形式进行鉴定。

1.1 样品信息

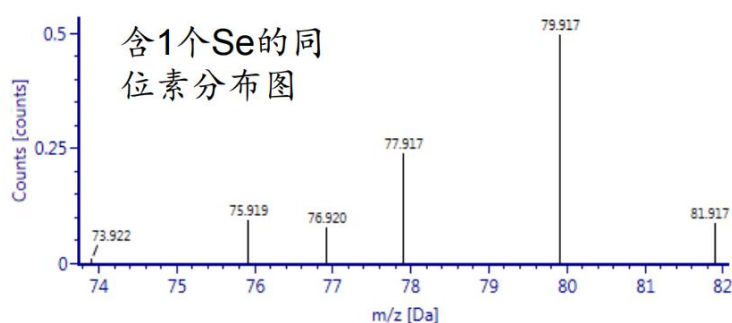
(1) 标准品：硒代半胱氨酸粉末

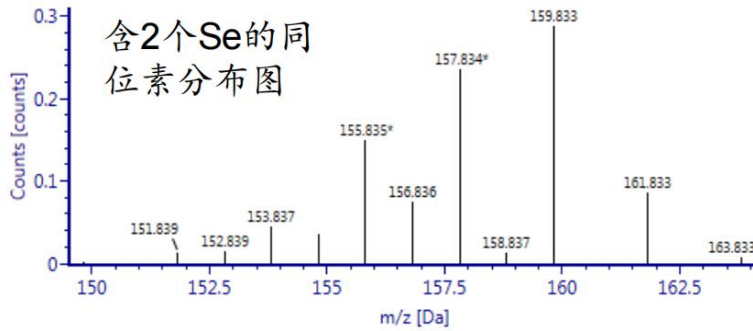
(2) 结构：硒代半胱氨酸分子式为 $C_3H_7NO_2Se$ ，结构如图：



(3) 样品制备：称取硒代半胱氨酸粉末 2 mg，用 20 ml 水溶解，获得 100 $\mu g/ml$ 的硒代半胱氨酸溶液，采用乙腈-水（75：25）稀释获得 25 $\mu g/ml$ 待测物溶液。

1.2 含 Se 化合物同位素分布规律





附图 1 含 Se 化合物同位素分布规律图

1.3 实验结果

结果表明在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硒代半胱氨酸水溶液中未检测到硒代半胱氨酸，其已经基本全部转化为其他成分。溶液中主要存在的三个可物质可能分别为 Selenocystathionine（硒代胱硫醚），selenocystine（硒代胱氨酸）和 3,3'-Selenobisalanine（硒双丙氨酸），其结构式如下。

| 化合物 | 分子式 | m/z | 质量偏差 (mDa) | 保留时间 (min) | 加合离子 | 结构 | 名称 |
|--------|--|----------|------------|------------|------|----|-----------------------|
| 硒代半胱氨酸 | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$ | 169.9715 | 未检测到该化合物 | | +H | | |
| 1 | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}$ | 271.0192 | 0 | 4.26 | +H | | Selenocystathionine |
| 2 | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}_2$ | 336.9203 | 0.3 | 4.79 | +H | | selenocystine |
| 3 | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}$ | 257.0037 | -0.1 | 5.18 | +H | | 3,3'-Selenobisalanine |

2. 安琪酵母股份有限公司对硒代半胱氨酸标准品的鉴定

半胱氨酸 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) 中的硫元素被硒取代形成硒代半胱氨酸 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$)，从而含有一个比硫醇基更易氧化的硒醇基，所以游离硒代半胱氨酸是否能稳定存在有争议。根据安琪现有条件采用液相色谱-三重四极杆质谱对所购硒代半胱氨酸标准品的水溶液进行鉴定。

2.1. 样品

2.1.1. 硒代半胱氨酸标准品: $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$ CAS:10236-58-5, 厂家: QCSR, 批号: 23547。

2.2. 试剂

2.2.1. 硒代半胱氨酸储备液 (300 $\mu\text{g/mL}$): 准确称取 15.00 mg 硒代半胱氨酸标准品 (2.1.1) 于 50 mL 容量瓶内, 加水溶解并定容。

2.2.2. 硒代半胱氨酸使用液 (500 $\mu\text{g/L}$): 吸取 1.65 mL 硒代半胱氨酸储备液于 1000 mL 容量瓶内, 加水混匀并定容。

2.3. 仪器

2.3.1. 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪: Waters H-class plus+Xevo TQS micro。

2.4 确定硒代半胱氨酸质谱条件

配制硒代半胱氨酸水溶液, 采用液相色谱-三重四极杆质谱确定其定量、定性离子对分别为: 167>125.9、167>94.9。

优化质谱条件如下:

离子源: 电喷雾离子源。

扫描方式: 正离子扫描。

检测方式: 多反应监测 (MRM)。

电离电压: 3.5 kV。

源温: 150°C。

雾化温度: 350°C。

雾化气流速: 800 L/h。

锥孔电压: 22 V。

碰撞电压: 10 V。

定量离子对: 167>125.9。

定性离子对: 167>94.9。

2.5 液相色谱条件

新配制的硒代半胱氨酸水溶液, 放置约 10 min 后, 上机测定, 仪器条件如下。

液相色谱条件:

色谱柱: C18 柱, 50 mm \times 2.1mm, 1.7 μm 。

柱温: 35°C。

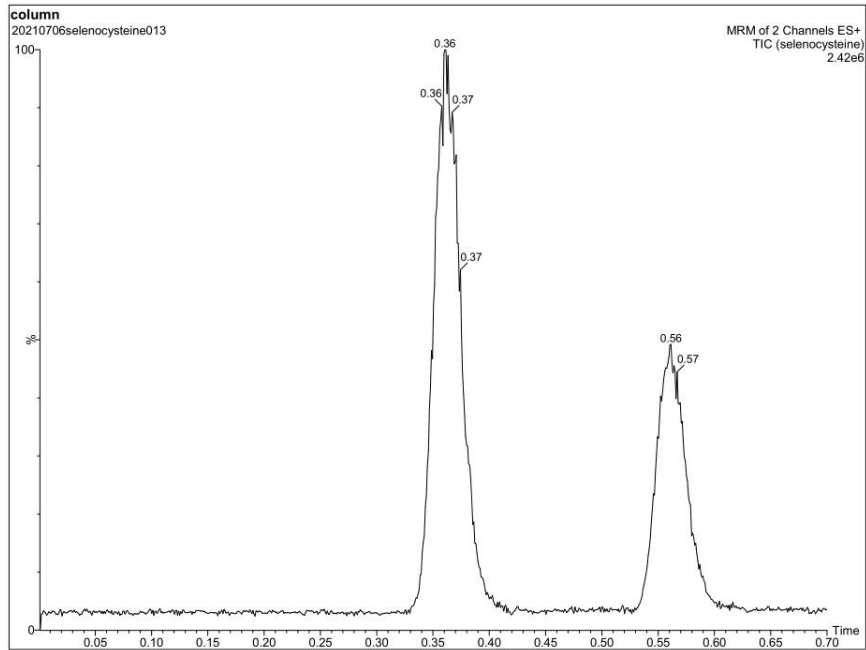
流动相：979 mL 水+1 mL 甲酸+20 mL 乙腈。

流动相流速：0.2 mL/min。

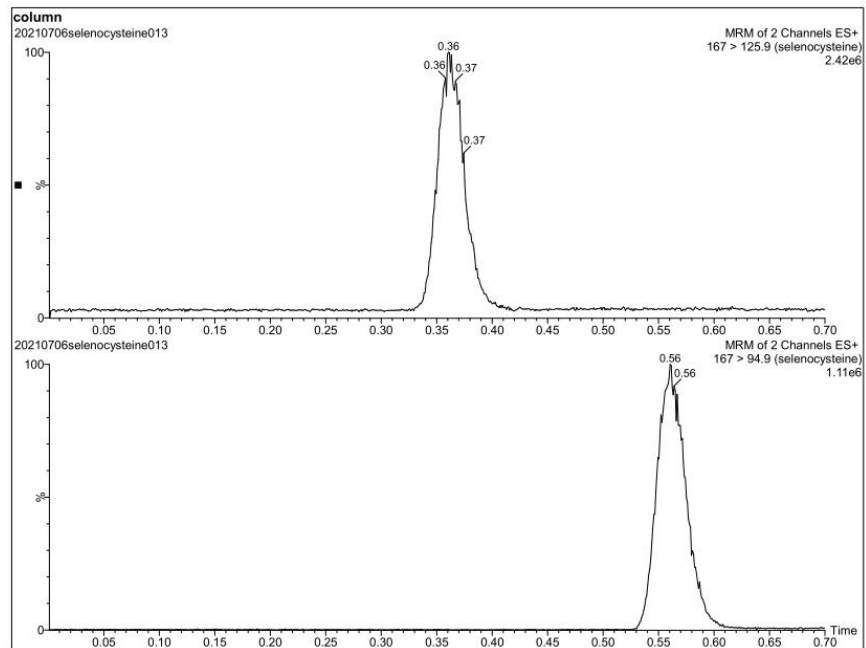
2.6 样品分析

过 0.22 μm 水系膜，上机分析。

2.6.1 LC-MS/MS 上机分析图谱



附图 2 硒代半胱氨酸标准溶液 (C=500 $\mu\text{g/L}$) 总离子流图



附图 3 硒代半胱氨酸标准溶液 (C=500 $\mu\text{g/L}$) 多反应监测图

根据以上图谱，硒代半胱氨酸标准品水溶液（放置时间约 10 min）的总离

子流图呈现 2 个峰（附图 2）可以推断：溶液中至少有 2 个化合物。硒代半胱氨酸标准品水溶液（放置时间约 10 min）内已不是单一化合物。

3. 关于硒代半胱氨酸溶液存在形式参考文献

有文献表明，硒代半胱氨酸不能自由形态存在，而以硒代甲基半胱氨酸形态存在。原文如下图。

SeMet is also present in free SeMet, especially in a selenium accumulator.⁷⁾ A methylated form of SeCys, Se-methyl selenocysteine (MeSeCys) is also present in selenium accumulators in the forms of free and γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine. This is because free selenol (-SeH) groups are more highly reactive than free mercapto (-SH) groups, and free SeCys is too reactive to be present in the free form. Instead, selenium accumulates in accumulators in the form of non-reactive amino acids and peptides (-SeCH₃ group rather than -SeH group) such as MeSeCys and SeMet, and γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine.⁷⁾

二、酵母硒中硒代蛋氨酸检测结果

美国 FDA 富硒酵母 GRAS (Generally Recognized as Safe) 评价材料中，所附检测报告，富硒酵母中未检出硒代半胱氨酸，检测结果如下：

| Selenium forms | Percentage |
|--|-------------|
| Selenomethionine | 84 |
| Selenite | 0.1 |
| γ -Glutamyl-Se-methyl-Se-cysteine | 0.5 |
| Se-adenosyl-Se-homocysteine | 0.5 |
| Se-lanthionine | nd/nr |
| Se-methyl-Se-cysteine | nd/nr |
| Se-cystathionine | nd/nr |
| Se-cystine | nd/nr |
| Se-cysteine | nd/nr |
| Selenomethionine-selenoxide (or its hydrate) | nd/nr |
| Methaneseleninic acid | nd/nr |
| Sum of Identified forms | 85.1 |

nd = not detected; nr = not reported

^a From Uden, et al., 2004 & Rayman, 2004.

三、结论

基于以上分析，我们得出如下结论：

1、硒代半胱氨酸在酵母硒中以蛋白质形态存在，检测其含量必须将蛋白质

酶解为单个氨基酸。由于硒代半胱氨酸极不稳定，水溶液中不能稳定地以单体的形式存在，需要在酶解生成硒代半胱氨酸时立即衍生，对其定量测定暂时有困难。

2、酵母硒中主要成分为硒代蛋氨酸，含量在 60-85%；硒代半胱氨酸含量文献报道有 2-4%，但实际检测中未检测到，因此研究酵母硒中硒代半胱氨酸及其检测方法意义不大。

附件 2

蛋白酶 XIV 证书



3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Name: **Certificate of Analysis**
Protease from *Streptomyces griseus* - Type XIV, ≥ 3.5 units/mg solid, powder

Product Number: P5147
Batch Number: SLCM3871
Brand: SIGMA
CAS Number: 9036-06-0
MDL Number: MFCD00132092
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 14 JAN 2022
Recommended Retest Date: JAN 2026

| Test | Specification | Result |
|---|---------------|--------|
| units Protease/mg Solid One unit will hydrolyze casein to produce color equivalent to 1.0 micromole (181 ug) of Tyrosine per minute at pH 7.5 at 37 deg C. (Color per folin-ciocalteu reagent) | ≥ 3.5 | 6.1 |



参考文献

- [1] WS/T 578.3-2017 《中国居民膳食营养素参考摄入量 第3部分：微量元素》。
- [2] GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》
- [3] GB/T 20001.4—2015 《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》
- [4] COMMISSION REGULATION (EC) No 634/2007
- [5] COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 427/2013(代替(EC) No 634/2007)
- [6] Esmacili S ,Khosravi-Darani K . Selenium-Enriched Yeast: As Selenium Source for Nutritional Purpose[J]. Current Nutrition & Food Science,2014,10(1).
- [7] 何梦洁,张双庆等 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中游离硒代蛋氨酸, 卫生研究 第54卷 第1期 P65-67
- [8] Lu Yang,Rllph E.Sturgeon,Shona Mcsheehy.Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethione in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry,Elsevier,Journal of chromatography A 1055(2004),177-184.
- [9] 董亚蕾,刘文婧,曹进,王钢力. 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法测定富硒食品中的硒代氨基酸. 食品安全质量检测学报, 第8卷, 第7期, P2401-2406
- [10] Kazuo T. Suzuki, Metabolomics of selenium: se metabolites Based on speciation studies, Journal of health science, 51(2)107-114(2005)
- [11] 铁梅,李宝瑞,邢志强等.富硒大豆中蛋白提取工艺优化及 HPLC-MS 联用测定硒代蛋氨酸[J].食品科学,2015,36(08):6-11.
- [12] 谢倩,李建洪,黄文耀等.HPLC-ICP-MS 测定硒蛋白中硒代氨基酸的方法[J].中国卫生检验杂志,2015,25(05):636-638+641.
- [13] 肖志明,宋荣,贾铮等.液相色谱-氢化物发生原子荧光光谱法测定富硒酵母中硒的形态[J].分析化学,2014,42(09):1314-1319.
- [14] 吴雅颖,桂仁意,汤鋈等.HPLC-ICP-MS 联用技术测定竹笋中六种硒形态[J].营

养学报,2014,36(05):494-498.DOI:10.13325/j.cnki.acta.nutr.sin.2014.05.018.

[15]冯金素,曹玉嫔,莫桂春等.g-C₃N₄富集结合毛细管电泳与电感耦合等离子体质谱联用分析西瓜中硒形态[J].色谱,2020,38(10):1224-1231.

[16]郭金喜,范田丽,郭武军等.高效液相色谱-原子荧光光谱法分析新疆(南疆)冻干驴乳粉中硒形态含量[J].中国乳品工业,2021,49(05):42-47.DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2021.05.009.