

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4845—2025

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

2025-12-09 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[国家饲料质量检验检测中心(北京)]、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：薛刚、肖志明、覃先武、张军民、汤超华、罗必英、陈敬帮、郑洪故、樊霞。



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联用(LC-ICP/MS)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 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:色谱纯。

4.2.3 乙酸。

4.2.4 盐酸:优级纯。

4.2.5 四甲基氢氧化铵:25%。

4.2.6 三羟甲基氨基甲烷。

4.2.7 乙酸铵: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℃条件下,1mg酶每分钟水解酪蛋白产生不少于3.5 μ mol酪氨酸)。

4.2.9 硒代蛋氨酸(CAS:3211-76-5):纯度 $\geq 98\%$ 。

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溶液(300 μ g/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℃ 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 硒代蛋氨酸标准储备液(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:感量为 0.1 mg 和 0.01 mg。

4.3.3 水浴摇床:振荡速率为 150 r/min,37℃±1℃。

4.3.4 离心机:转速不低于 10 000 r/min。

4.3.5 pH 计。

4.3.6 滤膜:水系,孔径为 0.45 μm

4.4 样品

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℃ 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℃ 150 r/min 酶解 3 h。取出,10 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至另一离心管中,4℃ 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 mL 缓冲液(4.2.11),涡旋混匀后置于水浴摇床中,在 37℃ 150 r/min 酶解 3 h。取出,10 000 r/min 离心 10 min,上清液合并。

用水定容至 25 mL,混匀、稀释、过膜后上机分析。

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℃。

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℃。

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 中的图 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。

$$\omega = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C ——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($\mu\text{g/L}$);

V ——合并后的上清液定容后的体积,单位为毫升(mL);

1000 ——换算系数;

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。

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20%。

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。

1% 2.29 硒代蛋氨酸标准工作溶液: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 其他: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 其他:同4.3。

5.4 样品

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 ,其他同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 L/min~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图 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±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 LC-HG-AFS 法硒代蛋氨酸标准溶液色谱图,见图 A.1。

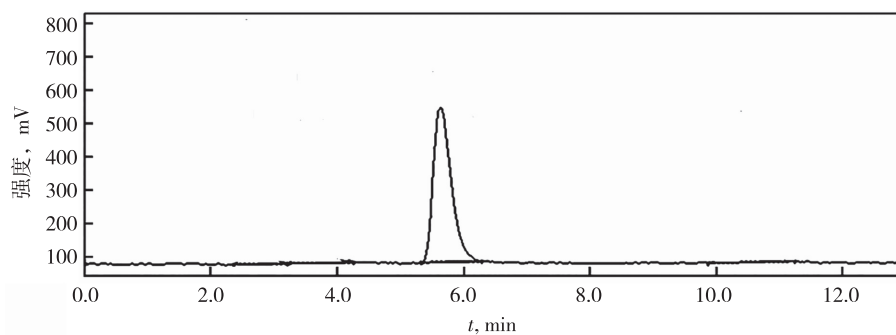


图 A.1 LC-HG-AFS 法硒代蛋氨酸标准溶液(300µg/L)色谱图

A.2 LC-ICP/MS 法硒代蛋氨酸的标准溶液色谱图,见图 A.2。

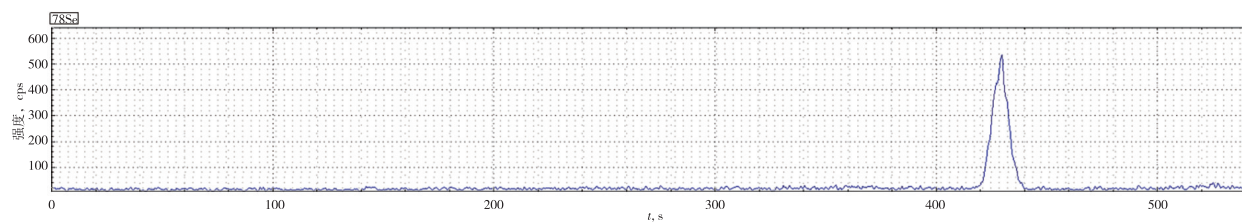


图 A.2 LC-ICP/MS 法硒代蛋氨酸的标准溶液(30 µg/L)色谱图