

# 富硒食品中无机硒的测定 固相萃取-原子荧光光谱法编制说明

## 一、工作简况

### 1.1 任务来源

湖北省卫生计生委 2013 年 7 月下达的《富硒食品中无机硒的测定》食品安全地方标准项目（鄂卫通〔2013〕275 号）。

### 1.2 起草单位、起草人

本标准起草单位：湖北省疾病预防控制中心

本标准起草人：黄文耀、张颖、王华明、宋毅、史廷明、闻胜、唐琳、吴梦溪、杨清清、杨涵、陈颖。

### 1.3 标准起草过程

#### 1.3.1 项目背景及来源

自硒被发现以来，科学家们通过科学实验和临床资料证明，硒在人体组织内含量虽然很少，但它对人类健康的巨大作用却是其他物质所无法替代的。硒在地壳里的含量是亿分之一，在人体内是千万分之一，但它却决定了生命的存在。缺硒会直接导致机体免疫力下降，临床医学证实，威胁人类健康和生命的 40 多种疾病都与缺硒有关，如癌症、心血管病、肝病、白内障、胰脏疾病、糖尿病、生殖系统疾病、儿童发育不良和营养阻滞等<sup>[1]</sup>。

硒最主要的功能作为各种酶（谷胱甘肽过氧化酶 GPX、甲状

腺素脱碘酶 IDI、硒代磷酸盐合成酶 TrxR 等<sup>[2]</sup>) 的组成成分, 进而影响其酵素活性或功能。这些酶具有清除自由基, 防止脂质过氧化, 延缓衰老<sup>[2]</sup>, 抗肿瘤等作用<sup>[3]</sup>。但是摄入过量会引起硒中毒, 关于硒的中毒剂量问题, 各家意见尚不一致。不同形态的硒的吸收率、生物效应及其毒性相差甚远<sup>[4]</sup>。无机硒(亚硒酸根、硒酸根)毒性较大, 吸收和利用不理想, 过量会对人体造成伤害<sup>[5]</sup>, 日本、美国等发达国家早已禁止在食品中添加亚硒酸钠等无机硒<sup>[6]</sup>。有机硒毒性较低, 生物利用率高, 按硒的代谢形式分类, 主要以含硒蛋白和硒蛋白形式存在<sup>[2]</sup>。

全世界目前 40 多个国家和地区缺硒。我国有 72% 以上地区、约 7 亿人处于贫硒和低硒区。而上世纪 60 年代, 湖北省恩施市沙地、双河、新塘等地发现硒。1980 年前后, 地质部门证实恩施市含硒碳质页岩出露面积 850 平方公里, 硒矿储量达 50 多亿吨, 新塘乡双河渔塘坝(前坪背斜与太山庙背斜之间双河向斜南西段)拥有世界上唯一的独立硒矿床, 已探明储量 64 万吨, 纯硒平均含量 3637.5mg/kg, 改写了“硒不能形成独立矿床”的传统结论。以硒矿床为中心的高硒区, 占全市总面积的 73%<sup>[7]</sup>。这些珍贵的硒矿资源为湖北省恩施地区的经济腾飞提供了坚实的基础。

目前市面上许多富硒食品采用了人为添加无机硒, 例如喷洒式添加无机硒。而国家标准只有测定总硒的方法, 不利于对补硒产品的有效性和安全性进行正确评估, 不能鉴别天然富硒食品与人为添加无机硒的食品, 也不利于天然富硒产品的原产地保护, 因而研制食品中无机硒的测定方法非常必要。湖北省制订的 DBS42/002-2014

《富有机食品硒含量要求》附录 A《无机硒含量的测定》尚有待完善。

《富硒食品中无机硒的测定》能准确测定食品中无机硒含量，能鉴定打击人为添加无机硒的行为，为恩施地区的富硒食品的全面开发保驾护航。食品中的硒含量一般在数十微克每千克至五毫克每千克范围内，经过预处理后，待测样液的硒含量为几个微克每升至几十个微克每升，所以要求其检测方法灵敏度较高。目前文献报道的硒的测定方法主要有：荧光分光光度法，氢化物发生原子吸收光谱法、氢化物发生原子荧光光谱法、HPLC-AFS（高效液相色谱-原子荧光分光光度计联用仪）法、HPLC-ICP/MS（高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪）法<sup>[8][9]</sup>，前两种方法灵敏度较低，无法满足食品中无机硒的测定，HPLC-AFS法和HPLC-ICP/MS法操作复杂，对仪器和技术要求较高，不适宜普遍推广应用，同时其灵敏度也无法满足食品中无机硒的测定。氢化物原子荧光光谱法具有灵敏度高、选择性强、稳定性好、成本低廉、通用性强等优点，选择合适的前处理条件，排除有机硒和样品基底的干扰，将实现无机硒形态分析的可能性。

食品中无机硒的存在形态主要为可溶于水的硒酸根和亚硒酸根，有机硒主要是硒蛋白和硒代氨基酸，其中部分小分子硒代氨基酸也能够溶于水，所以无机硒的测定需要排除水溶性有机硒小分子的干扰。目前，硒的形态分析前处理方法主要有酸消解<sup>[10]</sup>、酶解<sup>[11]</sup>和直接振荡提取<sup>[12~14]</sup>等，其中酸消解方法由于强酸在处理过程中常易使硒发生形态转变，酶解法通常是测定有机硒，选择温和的溶液直接

振荡提取的方法可减少处理过程中有机硒转化为无机硒。现今无机硒的提取富集方法主要有萃取法<sup>[13~19]</sup>和共沉淀法<sup>[12]</sup>，而萃取法主要包括溶剂萃取法<sup>[13~15]</sup>和固相萃取法<sup>[16~19]</sup>。共沉淀法多采用无机盐沉淀蛋白，此法不能保证有机硒代小分子的完全沉淀。而溶剂萃取法多为使用有机溶剂直接萃取有机硒，验证实验表明，采用有机溶剂（正辛醇、环己烷）萃取有机硒纯水溶液后，按照 GB 5009.93《食品安全国家标准 食品中硒的测定》第一法处理其水相溶液部分，采用原子荧光测定，结果表明水相部分含有有机硒，说明有机溶剂不能完全萃取有机硒，在水相中仍然残留有机硒小分子。固相萃取作为一种近年来常用的微量元素预浓缩技术，具有富集效率高，重现性好，操作快速，样品和溶剂用量少等优点，SAX（强阴离子交换）固相萃取小柱可特异性吸附硒酸根和亚硒酸根，去除有机硒小分子和样品基底的干扰。

为保证样品在提取处理的过程中硒形态不发生转变，且能满足食品中较低含量无机硒检测的要求，《富硒食品中无机硒的测定》采用固相萃取-原子荧光光谱法。本标准在制定前，查阅了大量的国内外报道的硒形态检测方法，依据无机硒（四价硒、六价硒）、有机硒（硒蛋白、含硒蛋白等）的理化性质，针对提取以及检测条件等两个方面内容，制定了食品中无机硒的检测方法标准。本标准的实施将有效保障富硒食品安全风险评估、营养补充评价、打击非法添加、保护天然富硒食品市场的健康发展，为富硒食品的监管提供技术支撑。

该项目经湖北省卫生和计划生育委员会批准，由湖北省疾病预

防控制中心起草。

### 1.3.2 标准制定的主要过程

2013年02月至2013年05月，编写《富硒食品中无机硒的测定》的标准提出申请。

2013年7月18号，湖北省卫生厅发文(鄂卫通〔2013〕275号)批准湖北省疾病预防控制中心制定《富硒食品中无机硒的测定》地方标准。

2013年8月至2013年09月查阅硒的分析方法的资料，在文献资料调研的基础上确定了本标准制定拟采用的原则、方法和技术依据。

2013年9月至2015年10月在文献资料调研的基础上验证上文所提方法，根据实验结果对方法进行调整、修改。分别制定了提取无机硒、HPLC-ICP/MS分析以及检测条件等三个方面的分析方法，确定地方标准富硒食品中无机硒的测定方法为高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法。

2015年11月对湖北省食品安全标准审评委员会秘书处收悉的实验室专家审查意见进行答复，关于高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法的灵敏度低无法解决实际样品测定的问题，需要探索更优化的方法。

2015年11月至2016年07月，在文献调研的基础上探索固相萃取对无机硒的分离提取效率，优化条件，制定富硒食品中无机硒的测定-固相萃取-原子荧光光谱法。

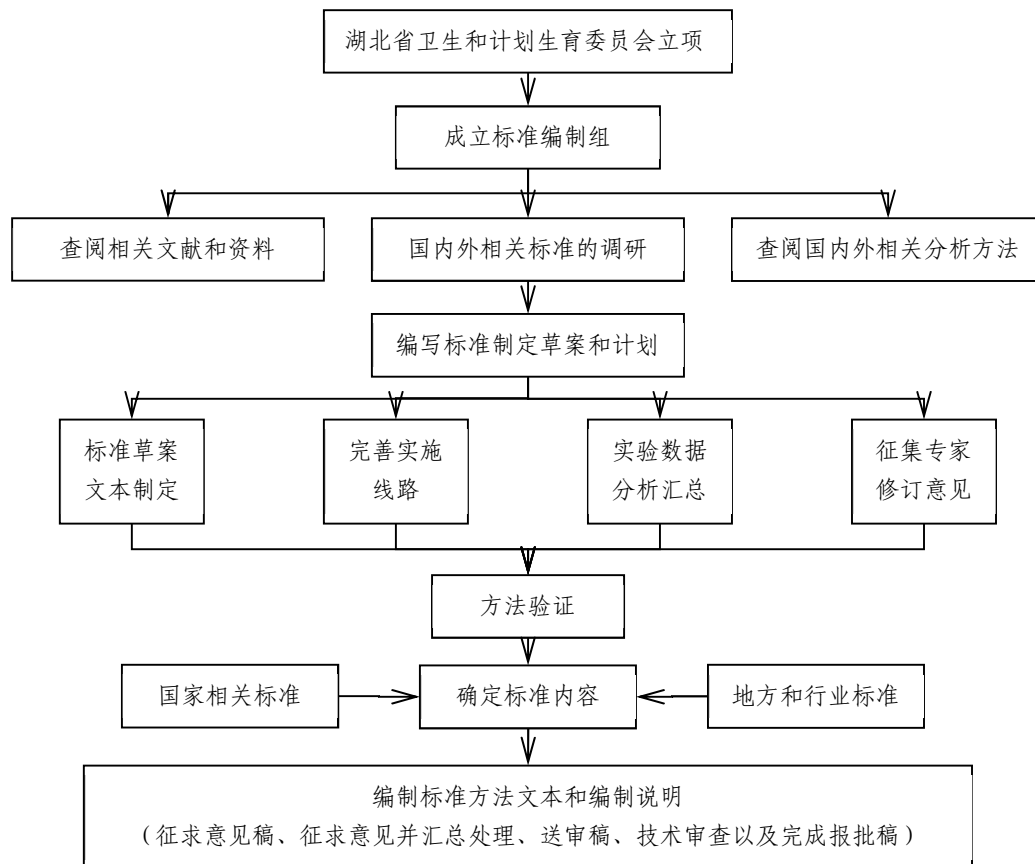
2016年07月-2017年05月，编写《富硒食品中无机硒的测定固相萃取-原子荧光光谱法》的标准征求意见稿和编制说明。

### 1.3.3 方法验证

2016年08月至2017年5月，组织了三家有资质的实验室进行方法验证，三家实验室都具备了检测无机硒的仪器设备和相应的前处理设备，统一派发了2种硒标准溶液（四价硒、六价硒标准溶液）和待测样品。于2017年5月收回全部的验证报告，2017年5月，进行了数据的汇总和数据的数理的分析工作，并编写完成了《富硒食品中无机硒的测定固相萃取-原子荧光光谱法》方法验证报告。

### 1.3.4 技术路线

本标准制订的技术路线图，见下图。



## 二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

标准文本中引用的相关标准如下。

凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 5009.93 食品安全国家标准 食品中硒的测定

## 三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

现行有效的与硒测定相关的国际标准：

序号	标准号	标准名称	测定目标物
1	DIN EN 14627-2005	食品 痕量元素测定. 压力溶解后用氢化原子吸收光谱法 (HGAAS) 测定砷和硒的总量	总硒
2	BS EN 14627-2005	食品 痕量元素的测定. 压力分解后用氢化法原子吸收光谱测定法测定硒和砷的总含量	总硒
3	NF V03-095-2005	食品 痕量元素的测定. 压力分解后用氢化法原子吸收光谱测定法测定硒和砷的总含量	总硒
4	ASTMD3859-2015	水中硒含量的测试方法	总硒
5	JISK0400-67-20-1998	水质. 硒的测定. 原子吸收光度计方法 (氢化物技术)	总硒
6	BS6068-2.45-1993	水质. 第 2 部分: 物理、化学和生物化学方法. 第 45 节: 硒含量原子吸收光谱法	总硒
7	ISO 20649-2015	婴幼儿配方奶粉和成人营养品铬、硒、钼的测定 电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS)	总硒

排除土壤、钢铁、矿物燃料等标准外，与硒检测技术相关的食品、水质和婴幼儿食品国际标准均以测定总硒为目标物，没有采用原子荧光光谱法测定食品中无机硒的方法。

#### 四、标准的制（修）订原则

标准编制遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的原则，依据《中华人民共和国标准化法》、《中华人民共和国标准化法实施条例》、《湖北省标准化管理办法》的要求，通过查阅大量国内外文献，组织专家论证，拟定实验方案，开展实验，编制标准草案，通过标准验证试验，完成标准征求意见稿经过大量实验验证后编制而成，参照国家标准的格式严格按 GB/T 1.1 的要求进行编写。

(1) 本方法能够满足富硒食品中无机硒检测的特性指标的要求；

(2) 本方法的准确度、精密度和灵敏度达到国内、外同类方法的同等水平；

(3) 建立的标准分析方法基本符合我省目前检测设备仪器和试剂、材料的供应条件；

(4) 建立的标准分析方法符合监测行业人员的技术水平。

#### 五、确定各项技术内容的依据

##### 5.1 原理

样品经水浴振荡和超声提取后，提取出无机硒和有机硒小分子。在弱酸性 pH 范围内，采用强阴离子交换（SAX）固相萃取柱（SPE）吸附硒酸根（ $\text{SeO}_4^{2-}$ ）和亚硒酸根（ $\text{SeO}_3^{2-}$ ），去除有机硒小分子和样品基体的干扰。盐酸溶液洗脱  $\text{SeO}_4^{2-}$  和  $\text{SeO}_3^{2-}$ ，洗脱液经 6 mol/L 盐酸加热使试样中的  $\text{SeO}_4^{2-}$  还原成  $\text{SeO}_3^{2-}$ ，用硼氢化钠或硼氢化钾使还原成硒化氢（ $\text{H}_2\text{Se}$ ），由载气（氩气）带入原子化器中进行原子化，在硒空心阴极灯的发射光激发下产生原子荧光，其荧光强度在固定条件下与被测液中的硒浓度成正比，与标准系列比较定量。



## 5.2 试剂和材料

除非另有说明，本标准中所使用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的二级水。

### 5.2.1 试剂

5.2.1.1 硝酸 ( $\text{HNO}_3$ ): 优级纯。

5.2.1.2 盐酸 ( $\text{HCl}$ ): 优级纯。

5.2.1.3 高氯酸 ( $\text{HClO}_4$ ): 优级纯。

5.2.1.4 氢氧化钠 ( $\text{NaOH}$ ): 优级纯。

5.2.1.5 硼氢化钾 ( $\text{KBH}_4$ ): 优级纯。

5.2.1.6 铁氰化钾 [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]。

### 5.2.2 试剂配制

5.2.2.1 硝酸-高氯酸混合酸 (9+1): 将 900 mL 硝酸与 100 mL 高氯酸混匀。

5.2.2.2 氢氧化钠溶液 (5 g/L): 称取 5 g 氢氧化钠，加入适量水溶解，冷却后定容至 1000 mL，混匀。

5.2.2.3 硼氢化钾碱溶液 (8 g/L): 称取 0.8 g 硼氢化钾，溶于氢氧化钠溶液 (5 g/L) 中，混匀。现配现用。

5.2.2.4 铁氰化钾溶液 (100 g/L): 称取 10.0 g 铁氰化钾，溶于 100 mL 水中，混匀。

5.2.2.5 盐酸溶液 (6 mol/L): 量取 50 mL 盐酸缓慢加入 40 mL 水中，冷却后定容至 100 mL，混匀。

5.2.2.6 盐酸溶液 (3 mol/L): 量取 25 mL 盐酸缓慢加入适量水中，冷却后定容至 100 mL，混匀。

5.2.2.7 盐酸溶液(5+95): 量取 25 mL 盐酸, 缓慢加入 475 mL 水中, 混匀。

### 5.2.3 标准品

硒标准溶液: 1000 mg/L, 或经国家认证并授予标准物质证书的一定浓度的硒标准溶液。

### 5.2.4 标准溶液的制备

5.2.4.1 硒标准中间液 (10 mg/L), 准确吸取1.00 mL硒标准溶液 (1000 mg/L) 于100 mL容量瓶中, 加盐酸溶液 (5+95) 定容至刻度, 混匀, 制得10 mg/L硒标准中间液。

5.2.4.2 硒标准使用液 (100  $\mu$ g/L): 准确吸取1.00 mL硒标准中间液 (10 mg/L) 于100 mL容量瓶中, 加盐酸溶液 (5+95) 定容至刻度, 混匀, 制得100  $\mu$ g/L硒标准使用液。

5.2.4.3 硒标准系列溶液: 分别准确吸取0.00 mL, 0.050 mL, 0.10 mL, 0.20 mL, 0.30 mL, 0.50 mL和1.0 mL 标准使用液 (100  $\mu$ g/L) 于10 mL 容量瓶中, 加入铁氰化钾 (100 g/L) 1.0 mL, 用盐酸溶液 (5+95) 定容至刻度, 混匀, 配制成质量浓度分别为0  $\mu$ g/L、0.50  $\mu$ g/L、1.00  $\mu$ g/L、2.00  $\mu$ g/L、3.00  $\mu$ g/L、5.00  $\mu$ g/L和10.0  $\mu$ g/L的标准系列溶液。

注: 可根据仪器的灵敏度及样品中硒的实际含量确定标准系列溶液中硒元素的质量浓度。

### 5.3 仪器和设备

注: 玻璃器皿需以硝酸溶液 (1+4) 浸泡过夜, 用自来水反复冲洗, 最后用实验用水冲洗干净。

5.3.1 原子荧光光度计，带硒元素空心阴极灯。

5.3.2 电热板。

5.3.3 天平：感量为 1 mg。

5.3.4 粉碎机。

5.3.5 烘箱。

5.3.6 超声波清洗器。

5.3.7 低温高速离心机：配有 50 mL 与 10mL 离心管适配器，温度小于 4℃，最大转速大于 8000 r/min。

5.3.8 水浴恒温振荡器。

5.3.9 SAX 强阴离子交换柱：1000 mg/6 mL 或以上。

## 5.4 分析步骤

### 5.4.1 试样制备

注：在采样和制备过程中，应避免试样污染。

5.4.1.1 粮食、豆类等样品去杂物后粉碎均匀，装入洁净塑料瓶内，密封保存备用。

5.4.1.2 蔬菜、水果、鱼类、肉类及蛋类等新鲜样品，洗净晾干，取可食部分匀浆，装入洁净塑料瓶内中，密封，于 4℃ 冰箱冷藏备用。

5.4.1.3 饮料、酒、醋、酱油、食用植物油、液态乳等液体样品，将样品摇匀，备用。

### 5.4.2 试样提取

#### 5.4.2.1 固体样品

准确称取试样 0.2 g ~ 1.0 g (精确至 0.001 g)，置于 50 mL 塑

料离心管中，准确加入 20 mL 纯水，涡旋混匀，超声 10 min 后，于 80~90℃ 水浴振荡提取 1 h，其间每隔 20 min 取出上下颠倒，使样品充分混匀。水浴结束后，再使用超声提取 20 min，确保样品中无机硒被充分提取。提取完毕，冷却至室温，以 8000 r/min 离心 15 min。取上层清液，用氢氧化钠溶液（5 g/L）调节 pH 至 4~7 后，经 0.45 μm 针头式有机滤膜过滤，准确吸取 10 mL 滤液，待用。同时做空白试验。对魔芋、黑木耳等易溶胀的样品可减少称样量，增大提取液体积。

#### 5.4.2.2 液体样品（水、饮料、酒、醋、酱油、液体乳等）

准确移取试样 30.00 mL（精确到 0.01 mL）于 100 mL 小烧杯中，加热浓缩至 5 mL 以下，转移至 10 mL 离心管中，纯水定容至 10 mL，涡旋混匀，超声 10 min 后，于 80~90℃ 水浴振荡提取 1 h，其间每隔 20 min 取出上下颠倒，使样品充分混匀，水浴结束后，再使用超声提取 20 min。提取完毕，冷却至室温，以 8000 r/min 离心 15 min。取上层清液，用氢氧化钠溶液（5 g/L）调节 pH 至 4~7 后，经 0.45 μm 针头式有机滤膜过滤，准确吸取 5 mL 滤液，待用。同时做空白试验。

#### 5.4.2.3 植物油

准确称取试样 10.0 g（精确到 0.001 g）于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 纯水，涡旋混匀，超声 10 min 后，于 80~90℃ 水浴振荡提取 1 h，其间每隔 20 min 取出上下颠倒，水浴结束后，再使用超声提取 20 min。提取完毕，冷却至室温，以 8000 r/min 离心 15 min。取下层水溶液，用氢氧化钠溶液（5 g/L）调节 pH 至 4~7 后，

经 0.45  $\mu\text{m}$  针头式有机滤膜过滤，准确吸取 5 mL 滤液，待用。同时做空白试验。

#### 5.4.3 试样净化

将上述提取液移入经 10 mL 盐酸 (3 mol/L)，20 mL 纯水处理过的 SAX 柱上，待液体以  $< 3 \text{ mL/min}$  的速度流出后，用 10 mL 盐酸 (3 mol/L) 洗脱液以 1 mL/min 洗脱吸附在柱上的无机硒，收集洗脱液，待用。

#### 5.4.4 试样消解

5.4.3 所得洗脱液按照 GB 5009.93 第一法处理。即：洗脱液置于锥形瓶中，加 10.0 mL 硝酸-高氯酸混合酸 (9+1) 及几粒玻璃珠，盖上表面皿冷消化过夜。次日于电热板上加热，并及时补加硝酸。当溶液变为清亮无色并伴有白烟时，再继续加热至剩余体积 2 mL 左右，切不可蒸干。冷却，再加 5.0 mL 盐酸溶液 (6 mol/L)，继续加热至溶液变为清亮无色并伴有白烟出现，将六价硒还原成四价硒。冷却，转移至 10 mL 容量瓶中，加入 2.5 mL 铁氰化钾溶液 (100 g/L)，用水定容，混匀待测。

#### 5.4.5 测定

##### 5.4.5.1 仪器参考条件

根据各自仪器性能调至最佳状态。参考条件为：负高压 300 V；灯电流 80 mA；炉高 8 mm；载气流速 400 mL/min；屏蔽气流速 1000 mL/min；测量方式标准曲线法；读数方式峰面积。

##### 5.4.5.2 标准曲线的制作

以盐酸溶液 (5+95) 为载流，硼氢化钾碱溶液 (8 g/L) 为还原

剂，连续用标准系列的零管进样，待读数稳定之后，将标硒标准系列溶液按质量浓度由低到高的顺序分别导入仪器，测定其荧光强度，以质量浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标，制作标准曲线。

#### 5.4.5.3 试样测定

在与测定标准系列溶液相同的实验条件下，将空白溶液和试样溶液分别导入仪器，测其荧光值强度，与标准系列比较定量。

#### 5.5 分析结果的表述

按式（1）计算试样中无机硒的含量：

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times 2}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X$  ——试样中无机硒的含量，单位为毫克每千克或毫克每升（mg/kg或 mg/L）；

$C$  ——试样溶液中无机硒的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu$ g/L）；

$C_0$  ——空白溶液中无机硒的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu$ g/L）；

$m$  ——试样称样量或移取体积，单位为克或毫升（g 或 mL）；

$V$  ——试样消化液总体积，单位为毫升（mL）；

2 ——试样稀释倍数；

1000 ——换算系数。

当无机硒含量  $\geq 1.00$  mg/kg（或 mg/L）时，计算结果保留三位有效数字，当无机硒含量  $< 1.00$  mg/kg（或 mg/L）时，计算结果保

留两位有效数字。

## 5.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

## 5.7 其他

本方法检出限：当称样量为 1 g（或 1 mL），定容体积为 10 mL 时，方法检出限为 0.003 mg/kg（或 0.003 mg/L），方法定量限为 0.006 mg/kg（或 0.006 mg/L）。

GB 5009.93 中总硒含量的单位是 mg/kg 或 mg/L，DBS 42/002-2014 中总硒、有机硒含量单位为  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  或  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ，二者的换算关系为  $1\ \mu\text{g}/100\text{ g (mL)} = 0.01\ \text{mg/kg (L)}$ 。

因强阴离子交换（SAX）固相萃取柱为非选择性吸附阴离子，故使用时，对硒含量较高的样品注意减少上样量，扩大柱容量，防止样品过载。

## 5.8 实验条件的选择和方法验证

### 5.8.1 实验条件的选择

#### 5.8.1.1 不同提取液对无机硒的提取效果

选择市售的普通大米，研磨成粉末后，称取 0.5 g，分别以纯水、0.1 mol/L 盐酸、0.1mol/L 氢氧化钠作为提取剂，水浴中振荡超声提取，按照确定的方法处理后，测定加标回收率，发现 0.1 mol/L 盐酸的回收率最低，水和 0.1mol/L 氢氧化钠提取液提取的硒含量相当，回收率相近，考虑到氢氧化钠会导致硒代氨基酸水解，选择纯水作为无机硒的提取剂。

表 1 不同提取液中无机硒的加标回收率

硒形态	提取液	加标量 / ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定值 / ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 / %
硒 (IV)	0.1 mol/L 氢氧化钠	80.0	78.8	98.5
硒 (VI)	0.1 mol/L 氢氧化钠	70.0	67.9	97.0
硒 (IV)	0.1 mol/L 盐酸	80.0	59.1	73.9
硒 (VI)	0.1 mol/L 盐酸	70.0	42.7	61.0
硒 (IV)	水	80.0	80.8	101.0
硒 (VI)	水	70.0	68.1	97.3

#### 5.8.1.2 提取条件的优化

考察不同的水浴温度、水浴时间和超声条件对样品中无机硒的提取的影响。在不同的水浴温度条件下,测定不同的水浴时间 0.5h, 1h, 1.5h, 2h 条件下样品的加标回收率,当水浴温度  $\leq 70^{\circ}\text{C}$  时,水浴时间所需时间较长,当水浴温度  $\geq 80^{\circ}\text{C}$  时,水浴时间为 1h 时,样品加标回收率可达到最大值,所以,水浴条件最终选择为  $80\sim 90^{\circ}\text{C}$  水浴振荡提取 1 h。

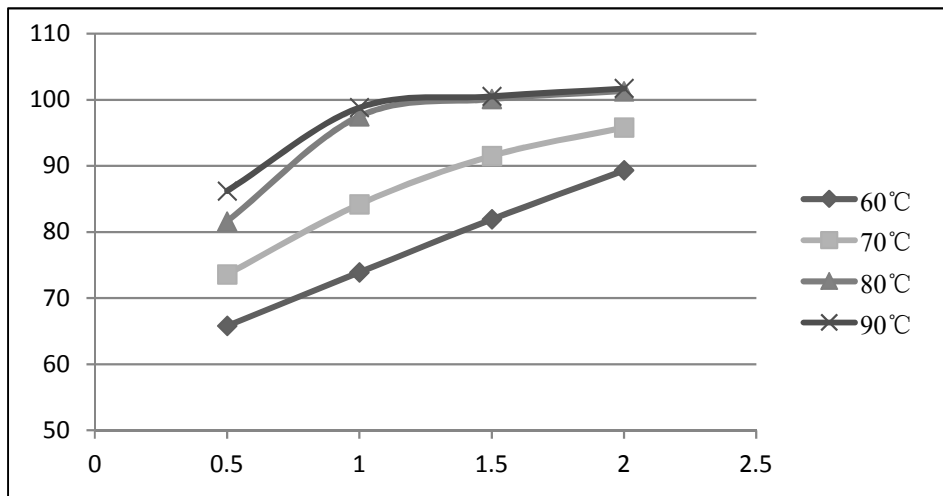


图 1 不同水浴条件对无机硒提取的影响



考察超声提取对样品中无机硒提取效果的影响，比较不超声、水浴前后是否超声对样品加标回收率的影响，结果见图 2。图 2 表明，不超声的条件下，无机硒的回收率相对较低，水浴前后同时超声无机硒的回收率最好，对无机硒的提取效率最高。

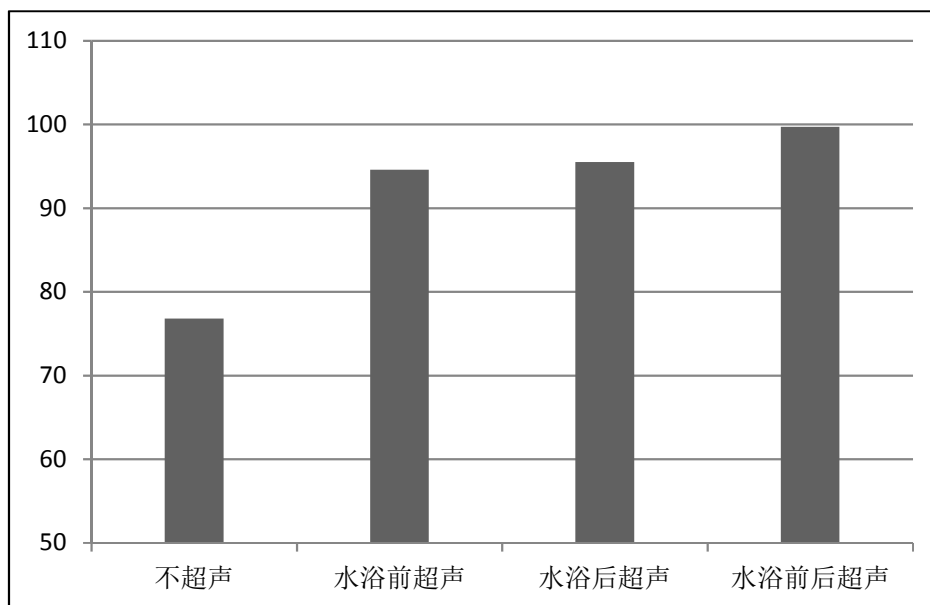


图 2 不同超声条件对无机硒提取的影响

### 5.8.1.3 pH 对回收率的影响

SAX 固相萃取柱经 10 mL 3M HCl 活化，20mL 纯水平衡后，考察不同 pH (3~10) 对无机硒（硒酸根和亚硒酸根）加标水溶液和有机硒小分子（硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸）保留的影响，将不同 pH 的加标水溶液的洗脱液消化后采用原子荧光测定硒含量，结果见图 3。图 3 表明当 pH 为 4~10 时，无机硒的回收率基本保持不变，但当 pH >7 后，硒代氨基酸的回收率逐渐增大，表明 pH 范围为 4~7 时，无机硒的分离效果最好。

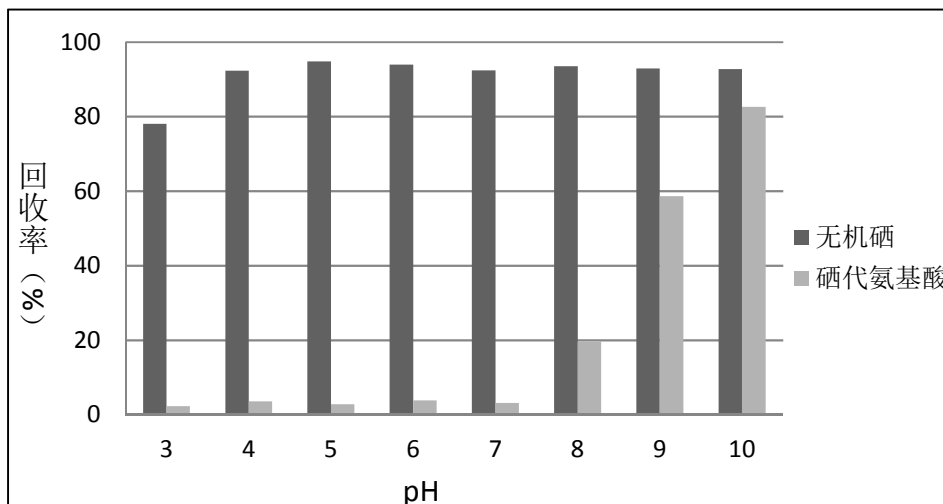


图3 不同 pH 对 SAX 柱吸附无机硒和硒代氨基酸的影响

#### 5.8.1.4 洗脱液体积的确定

探讨洗脱液体积对回收率的影响。收集 10~50 mL 洗脱液，消化还原后采用原子荧光测定，不同体积洗脱液回收率分别为 93.7%，94.1%，94.1%，94.0%，93.9%，从结果可以看出洗脱液体积在 10 mL 时即可获得良好的回收率，无需进一步增大洗脱液体积。

#### 5.8.2 方法检出限

按照方法建立的样品分析的全部步骤，连续测定空白样品 11 次，计算测定结果的标准偏差，按照公式 (1) 计算方法检出限，并以  $t(n-1, 0.99)$  倍方法检出限作为方法的测定下限。

$$MDL = t_{(n-1, 0.99)} \times S \dots\dots\dots (1)$$

式中：

MDL 为方法检出限；

n 为样品平行测定的次数；

t 为自由度为 n-1，置信度为 99% 时的 t 分布（单侧）；

S 为 n 次平行测定的标准偏差。

其中，当自由度为  $n-1$ ，置信度为 99% 时的  $t$  值可参考下表取值。

**t 值表**

平行测定次数 (n)	自由度 (n-1)	$T_{(n-1, 0.99)}$
7	6	3.143
8	7	2.998
9	8	2.998
10	9	2.821
11	10	2.764
16	15	2.602

连续测定空白样品 11 次结果见下表：

平行测定	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	标准偏差 SD
测定结果 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1.3	2.0	1.6	2.8	3.5	3.0	1.4	2.6	3.6	3.3	1.5	0.885

样品测定 11 次，取  $t$  值为 2.764，计算其方法检出限为  $3\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $8\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 5.8.3 基底样品筛选

在市场上购买蔬菜食品、粮食类食品（如大米、挂面等）、肉类食品、液体食品（如矿泉水、、豆浆等）、蛋类食品、茶叶及相关制品等样品 14 种，分别按照标准 GB 5009.93《食品安全国家标准 食品中硒的测定》第一法中的方法进行消解、测定样品中的总硒含量，按照标准草案中提供的方法进行提取、测定样品中的无机硒含量，结果如下：

样 品	总 硒 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			无机硒 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	平行 1	平行 2	平均值	平行 1	平行 2	平均值
红 茶	55.0	49.2	52.1	未检出	未检出	未检出
绿 茶	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
大米 1	372.0	389.8	380.9	31.6	32.2	31.9
大米 2	38.9	40.4	39.6	3.9	3.7	3.8
挂 面	9.7	9.2	9.4	未检出	未检出	未检出
鸡 肉	81.9	89.6	85.8	未检出	未检出	未检出
猪 肉	102.4	108.4	105.4	未检出	未检出	未检出
鸡蛋 1	216.7	203.2	209.9	23.6	21.7	22.6
鸡蛋 2	181.5	164.8	173.2	17.3	16.8	17.0
鸡蛋 3	48.6	45.8	47.2	未检出	未检出	未检出
蔬菜 1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蔬菜 2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
豆 浆	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
矿泉水	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

注：总硒检出限为  $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ，无机硒检出限  $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

以样品种类为基础，选择无机硒阴性样品或含量低的样品，如绿茶、大米 2、猪肉、鸡蛋 3、蔬菜 1、矿泉水等，以这些样品为基底进行加标回收实验和精密度实验。

#### 5.8.4 加标回收率及精密度的测定

根据国标 GB/T27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》附录 F 的规定，精密度实验应在方法测定低限、常见限量指标、选一适合点，三个水平进行。取 4.8.4 确定的样品进行加标回收实验和精密度实验，无机硒加标浓度为  $10.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $150\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ，按照标准草案方法的分析步骤进行分析测定，样品重复测定 6 次，计算其标准偏差和相对标准偏差。结果见下表。

样品	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平行测定回收率结果 (%)						平均值 (%)	标准 偏差 SD	相对 标准 偏差 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
大米	10	70.1	110.5	92.5	100.0	99.7	69.2	90.3	17.0	18.8
	150	88.4	80.5	99.6	108.2	102.8	109.6	98.2	11.5	11.7
	300	94.1	93.8	100.6	80.8	94.8	109.6	95.6	9.5	9.9
猪肉	10	118.6	89.9	66.6	79.0	101.8	90.6	91.1	18.0	19.7
	150	82.9	88.5	97.9	103.1	84.4	103.8	93.4	9.4	10.0
	300	85.1	95.5	108.4	95.7	103.2	84.9	95.5	9.5	9.9
蔬菜	10	114.1	85.2	102.4	66.8	90.2	73.9	88.8	17.6	19.8
	150	106.9	96.8	96.3	88.4	95.6	80.1	94.0	9.0	9.6
	300	117.1	94.7	102.7	98.7	93.5	113.3	103.3	9.8	9.5
鸡蛋	10	83.5	67.6	67.0	71.3	78.2	93.5	76.9	10.4	13.5
	150	88.9	92.1	85.9	81.8	83.7	89.3	86.9	3.9	4.5
	300	89.0	87.7	98.3	93.2	88.3	87.1	90.6	4.4	5.7
绿茶	10	73.7	67.3	59.1	68.8	81.9	72.7	70.6	7.6	10.8
	150	84.1	89.6	83.1	82.8	94.7	94.6	88.2	5.6	6.4
	300	97.0	88.8	81.4	94.7	84.3	81.5	88.0	6.7	7.6
豆浆	10	70.0	61.9	52.4	76.5	86.8	98.6	74.4	16.8	22.5
	150	90.1	91.5	109.6	87.0	101.8	89.5	94.9	8.8	9.3
	300	80.6	81.8	96.1	101.8	87.4	102.5	91.7	9.8	10.7
矿泉水	10	91.3	116.4	100.5	110.7	97.2	96.1	102.0	9.6	9.4
	150	106.9	99.7	101.9	103.2	91.6	108.7	102.0	6.1	6.0
	300	103.8	100.8	92.2	103.7	94.2	96.3	98.5	5.0	5.0

### 5.8.5 样品适应性

在市场上随机采集各类食品（含富硒食品）15种样品，按照 GB 5009.93《食品安全国家标准食品中硒的测定》第一法中的方法测定样品中的总硒含量，按照标准草案中提供的方法测定样品中的无机硒含量，测定结果如下。

样 品	总 硒 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	无机硒 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
面 粉	409.4	25.7
黄 豆	1931.9	218.6
香 菇	231.8	16.5
大 蒜	78.1	10.9
猪 肉	110.2	未检出
土 豆	118.5	24.4
鸡 蛋	315.3	76.6
黑木耳	78.6	10.1
包 菜	73.3	16.0
大 米	1112.8	115.1
西兰花	25.1	未检出
茶 叶	193.4	40.8
社 蒿	426.6	18.5
玉 米	214.4	18.2
蜂 蜜	38.4	3.2

注：总硒检出限为  $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ，无机硒检出限  $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 5.9 方法验证

### 5.9.1 方法验证过程

通过筛选确定方法验证单位。按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。实验室编号分别为 1 中国疾病预防控制中心营养与健康所，2 武汉市疾病预防控制中心，3 恩施土家族苗族自治州疾病预防控制中心，实验室具体验证结果见附件 1、附件 2、附件 3。

## 5.9.2 方法验证数据汇总

### 5.9.2.1 方法检出限、测定下限汇总

按照标准草案《富硒食品中无机硒的测定》中样品分析的全部步骤，进行 11 次平行测定。计算 1 次平行测定的标准偏差，计算方法检出限，当自由度为 10，置信度为 99%时，t 值为 2.764。在 3 家国家认可实验室对方法检出限和定量限进行了验证，方法检出限和测定下限的汇总情况，见表 1。

表 1 方法检出限、测定下限数据汇总表

实验室号	无机硒	
	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	2.8	9.3
2	2.1	7.1
3	2.7	9.1
平均值	2.5	8.5
相对偏差	0.4	1.2
相对标准偏差	14.9%	14.3%

### 5.9.2.2 实验室间的方法精密度

在 3 家国家认可实验室进行了方法精密度的验证工作。根据国标 GB/T27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》附录 F 的规定，在不同样品基底中分三个水平加入无机硒标准溶液后，按照标准草案提供的样品分析的方法，进行分析测定，数据汇总见表 2。

表 2 实验室间方法精密度验证数据汇总表

实验室号	加标水平 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD (%)
1	10	12.1 ~ 20.0
	150	7.9 ~ 12.6
	300	5.9 ~ 11.5

实验室号	加标水平 (μg/kg)	RSD (%)
2	10	10.3 ~ 20.4
	150	6.7 ~ 10.0
	300	5.0 ~ 10.3
3	10	9.5 ~ 20.0
	150	7.2 ~ 11.7
	300	3.9 ~ 11.0

### 5.9.2.3 实验室间方法回收率汇总

在 3 家国家认可实验室进行了方法准确度的验证工作，其数据汇总见表 3。

表 3 实验室间方法回收率验证数据汇总表

实验室号	加标水平	回收率 (%)
1	10	71.5 ~ 102.3
	150	88.4 ~ 97.2
	300	88.0 ~ 102.2
2	10	73.4 ~ 96.1
	150	86.5 ~ 105.6
	300	88.6 ~ 105.5
3	10	72.1 ~ 97.3
	150	89.5 ~ 100.1
	300	89.3 ~ 100.4

### 5.9.3 方法验证结论

按照标准草案《富硒食品中无机硒的测定》提供的方法进行测定，方法的检出限、精密度和准确度是评价方法水平的主要技术指标，方法验证的结果如下：

(1) 共 3 家单位参加了方法验证工作，所得数据均能满足方法要求，没有异常情况。



(2) 方法检出限和测定下限：无机硒的方法检出限为  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，测定下限  $9 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

(3) 方法精密度：精密度通常采用标准偏差或相对标准偏差来表示，无机硒测定的相对标准偏差  $\leq 20.4\%$ 。

(4) 方法准确度：本方法中无机硒在各浓度水平下回收率在  $71.5\% \sim 105.6\%$  范围内。

## 六、征求意见的采纳情况

标准征求意见稿发送至国家食品安全风险评估中心、北京市疾病预防控制中心、武汉市疾病预防控制中心三家单位的专家征求意见。发出邮件 3 份，收回 3 份，共征集修改意见 23 条。其中原理相关意见 3 条，有效数字相关意见 2 条，格式规范相关意见 6 条，表达叙述相关意见 11 条。所征集意见采纳 22 条，未采纳 1 条，详见附件 4 征求意见表。根据所采纳意见，将标准名称由《富硒食品中无机硒的测定》修改为《富硒食品中无机硒的测定 固相萃取-原子荧光光谱法》，并对固相萃取过程中的上样 pH 及流速进行了详细优化。未采纳意见提出应将原理中硒化氢( $\text{H}_2\text{Se}$ )化学式修改为( $\text{H}_4\text{Se}$ )。经资料查阅，Se 的价态有 -2, +4, +6 三种，当其形成氢化物时，其价态为 -2 价，硒化氢化学式为  $\text{H}_2\text{Se}$ 。故未采纳该条意见。

## 七、标准实施建议

本标准提出了基于固相萃取-原子荧光光谱法用于富硒食品中无机硒含量的测定的方法。方法灵敏度高、准确性好、操作简便、易于推广。有效弥补了现行国家标准只能进行总硒含量测定，地方标准无机硒和有机硒分离不完全的问题。为富硒食品安全风险评估、

营养补充评价体系提供了技术支撑；为打击非法添加，保护天然富硒食品市场提供了有力依据。推荐用本标准替代现行地方标准《富有机硒食品硒含量要求》(DBS42/002-2014)附录A中无机硒含量的测定方法。

## 八、其他需要说明的事项

暂无

## 九、标委会审查意见及处理情况

根据《湖北省食品安全地方标准管理办法》，2017年7月19日，湖北省食品安全标准审评委员会专业委员会听取并审议了湖北省食品安全地方标准《富硒食品中无机硒的测定方法 固相萃取-原子荧光法》研制情况报告，现对专业委员会意见对照修改后如下：

**(一) 标准名称、适用范围及文本表述应一致，如，“硒”和“无机硒”的表述应统一**

已按照审评委员会专业委员意见重新梳理标准的名称、适用范围及文本，保证对应表述保持一致。

**(二) 建议标准中结果单位及有效位数与食品安全国家标准及食品安全地方标准相一致**

按照食品安全国家标准《GB 5009.93-2017 第一法 氢化物原子荧光光谱法》的结果表述及有效位数的保留修改，食品安全地方标准中硒含量的单位 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 或 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ，与食品安全国家标准GB 5009.93-2017不一致，已在文本“8 其他”中备注二者的公式换算。

**(三) 试样制备建议补充油及油脂类样品的取样制样方法规定**

已按照审评委员会专业委员意见修改，具体表述可见标准文本中“5.2 试样提取”部分。

#### **(四)完善 6.2 试样提取中“水浴振荡时间”、“水浴温度”、“超声提取”等关键词的验证数据及说明**

已补充相关实验的验证数据，具体可见编制说明“5.8.1.2 提取条件的优化”部分。

#### **(五)建议与恩施州农科院《富硒食品中无机硒测定方法 原子荧光形态分析法》相互验证**

按照审评委员会专业委员意见，由恩施州农科院提供样品，按照标准方法测定，具体结果见附件 1《富硒食品中无机硒的测定验证结果》。

#### **(六)参照食品安全标准格式完善标准文本**

已参照《GB 5009.93-2017 食品安全国家标准 食品中硒的测定》和湖北省食品安全地方标准工作规范中湖北省食品安全地方标准文本格式修改标准文本。

## 富硒食品中无机硒的测定验证结果

根据《湖北省食品安全地方标准管理办法》，2017年7月19日，湖北省食品安全标准审评委员会专业委员会听取并审议了湖北省食品安全地方标准《富硒食品中无机硒的测定方法 固相萃取-原子荧光法》研制情况报告，根据专业委员会意见，与恩施州农科院《富硒食品中无机硒测定方法 原子荧光形态分析法》进行相互验证，具体验证结果如下：

选用了燕麦、银耳、茶叶、酱油、菜油、硒蛋白片、鸡肝脏等7个样品，采用固相萃取-原子荧光法测定样品中的无机硒，每个样品重复测定2次，结果如下：

样品名称	无机硒 (mg/kg 或 mg/L)			总硒 (mg/kg 或 mg/L)
	平行样 1	平行样 2	平均值	
燕麦 (杂粮)	0.76	0.68	0.72	6.48
银耳 (菌类)	3.75	3.49	3.62	16.9
花枝茶 (饮品)	0.027	0.031	0.029	1.71
富硒酱油 (调味品)	未检出	未检出	未检出	1.46
菜油 (植物油)	0.17	0.19	0.18	2.81
硒萃 (保健品)	7.98	7.52	7.75	80.8
鸡肝 (禽肉)	0.45	0.41	0.43	2.74