湖北省卫生健康委员会

公　　告

2018年第1号

关于发布《湖北省食品安全地方标准 富硒食品中无机硒的测定方法》的公告

根据《中华人民共和国食品安全法》《湖北省食品安全地方标准制定工作规范》的规定，经湖北省食品安全标准审评委员会审查通过，现发布《湖北省食品安全地方标准 富硒食品中无机硒的测定方法》（DBS42/010-2018）。

特此公告。

附件：食品安全地方标准《富硒食品中无机硒的测定方法》

湖北省卫生健康委员会

2018年12月7日

（政务公开形式：主动公开）

附件

DBS 42

湖北省食品安全地方标准

DBS42/010—2018

食品安全地方标准

富硒食品中无机硒的测定方法

2018-12-07 发布

2018-12-07 实施

湖北省卫生健康委员会 发布

前　言

第一法：

由恩施土家族苗族自治州农业科学院和国家富硒产品质量监督检验中心联合提出

标准主要起草人：陈永波　李卫东　黄光昱　胡百顺　刘淑琴　向极钎
薛　华　廖美林　秦　邦　陈　娥　李红英　殷红清
朱云芬　熊　倩　周　灵　陈　卉　朱发厅　马作江
吴　蓉

第二法：

由湖北省疾病预防控制中心提出

标准主要起草人：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

本标准由湖北省卫生健康委员会归口

食品安全地方标准

富硒食品中无机硒的测定方法

第一法　原子荧光形态分析法

1．范围

本标准规定了用原子荧光形态分析仪测定富硒食品中无机硒[四价硒 Se（IV）、六价硒 Se（VI）]的方法。

本标准适用于富硒食品中无机硒的测定。

2．原理

试样中的无机硒及有机硒小分经磷酸二氢钾一硫酸铜溶液浸提后，用 0.45μm 滤膜过滤，制成样品溶液，溶液进样后经高效液相色谱柱分离，在固定的色谱条件下，Se（IV）和 Se（VI）与有机硒小分子完全分开，无机硒不受其它成分的干扰；单一含硒组分随流动相导入形态分析预处理装置，在酸性环境中氧化剂（碘化钾）、还原剂（硼氢化钾）的作用下转化成硒化氢（H_2Se），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溶液中的硒浓度成正比，与标准样品比较，以保留时间定性，外标法定量。

3．试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为去离子水或相当纯度的水，符合 GB/T6682 的规定。

3.1 试剂

3.1.1 磷酸二氢钾

3.1.2 磷酸氢二铵

3.1.3 硫酸铜

3.1.4 四丁基溴化铵

3.1.5 碘化钾

3.1.6 氢氧化钾

3.1.7 硼氢化钾

3.1.8 甲酸

3.1.9 盐酸：优级纯

3.1.10 甲醇：色谱纯

3.2 试剂配制

3.2.1 浸提液

0.1mol/L磷酸二氢钾溶液＋1.56mmol/L的硫酸铜溶液：准确称取13.61g磷酸二氢钾，用少量水溶解后，再加入65mg五水硫酸铜（$CuSO_4.5H_2O$），溶解后定容至1000mL（如发现有硫酸铜结晶析出，需摇动使其溶解后使用）。

3.2.2 流动相

2%甲醇＋25mmol/L磷酸氢二铵＋0.5mmol/L四丁基溴化铵溶液（pH＝6.0）：称取3.302g磷酸氢二铵、0.161g四丁基溴化铵，溶于水中，加入20mL甲醇，用水定容至1000mL，用甲酸调节pH＝6.0，0.45μm滤膜（水相）过滤，超声脱气2min～3min。

流动相如过夜后使用需重新调节pH值。

3.2.3 氧化剂

1%碘化钾＋0.5%氢氧化钾溶液：称取 10g 碘化钾，5g 氢氧化钾，用水溶解并定容至 1000mL。

3.2.4 还原剂

2%硼氢化钾＋0.5%氢氧化钾溶液：称取 20g 硼氢化钾，5g 氢氧化钾，用水溶解并定容至 1000mL。

3.2.5 载流

7%盐酸溶液：量取 70mL 盐酸，用水定容至 1000mL。

以上溶液3.2.3～3.2.5需在使用前配制。

3.3 标准品

3.3.1 Se（IV）标准溶液：

亚硒酸根标准溶液（GBW10032），浓度为42.86μg/mL（以硒计）

3.3.2 Se（VI）标准溶液：

硒酸根标准溶液（GBW10033）：浓度为41.5μg/mL（以硒计）

3.4 标准溶液配制

3.4.1 混合标准使用液：

将Se（IV）标准溶液（3.3.1）2.0mL和Se（VI）标准溶液（3.3.2）2.0mL一同转入10mL容量瓶中，用水定容至10mL，配制成标准使用溶液，此溶液浓度Se(IV)为8.58μg/mL，Se（VI）为8.30μg/mL。

3.4.2 混合标准工作液：

吸取混合标准使用液（3.4.1）1.2mL于10mL容量瓶中，用浸提液（3.2.1）定容至刻度，配制成混合标准工作液，此溶液浓度Se（IV）为1.030μg/mL，Se（VI）为0.996μg/mL。

4. 仪器和设备

实验中所用玻璃仪器均需以硝酸（1+4）浸泡过夜，用自来水反复冲洗，最后用去离子水冲洗干净。

4.1 原子荧光形态分析仪：

含形态分析预处理装置（带C_{18}色谱柱或相当者）和原子荧光光谱仪（带硒空芯阴极灯）。形态分析预处理装置的进样系统也可采用高效液相色谱仪代替，连接成高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪。

4.2 分析天平：感量0.1mg、0.01g

4.3 超级恒温混匀仪

4.4 离心机

4.5 针筒式过滤器，含0.45μm滤膜

5. 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 固体样品（保健食品、粮食、肉类等）

准确称取富硒保健食品、硒食品添加剂、富硒叶菜类样品 0.3g～0.5g（精确到 0.0001g）或粮食类、肉类、禽蛋类样品 1g～2g（精确到 0.01g）于 10mL 离心管中，加入浸提液（3.2.1），充分湿润后定容至 10mL，在超级恒温混匀仪上 70℃、1500r/min 条件下振荡浸提 30min，3000r/min 离心 10min，用 0.45μm 滤膜过滤，收集滤液待测。浸提液体积按 10mL 计算。

5.1.2 液体样品（水、酒、饮料、酱油、醋等）

准确吸取试样 30mL（精确到 0.01mL）于 100mL 小烧杯中，加热浓缩至 1mL 以下，转入 10mL 离心管中，用浸提液（3.2.1）定容至 5mL，在超级恒温混匀仪上 70℃、1500r/min 条件下振荡浸提 30min，3000r/min 离心 10min，用 0.45μm 滤膜过滤，收集滤液待测。浸提液体积按 5mL 计算。

5.1.3 植物油

准确称取试样 6g（精确到 0.01g）于 10mL 离心管中，用浸提液（3.2.1）定容至 10mL，在超级恒温混匀仪上 70℃、1500r/min 条件下振荡浸提 30min，3000r/min 离心 10min，取下层水溶液，用 0.45μm 滤膜过滤后，收集滤液待测。浸提液体积按 4mL 计算。

以上各类样品溶液如不能在24h内测定，应于4℃冰箱内保存。同时做空白试验。

5.2 仪器参考条件见表1

表1　　仪器参考条件

流　程	参数名称	参数条件
HPLC分离	色谱柱	C_{18}色谱柱（150mm×4.6mmi.d.，5μm）
	流动相	2%甲醇＋25mmol/L＋磷酸氢二铵＋0.5mmol/L四丁基溴化铵溶液，pH＝6.0
	流速	1.0mL/min
	柱温	30℃
	进样体积	100μL
HG发生	氧化剂	0.5%KOH＋1.0%KI
	还原剂	0.5%KOH＋2%KBH_4
	载流	7%HCl
	紫外灯开/关	开UV
AFS测定	元素灯	Se
	负高压	300V
	灯电流	80/30mA
	载气	400mL/min
	屏蔽气	600mL/min

5.3 标准曲线的制作

分别吸取Se（IV）、Se（VI）标准混合液（3.4.2）0mL、0.15mL、0.30mL、0.60mL、0.90mL、1.20mL、1.50mL于10mL刻度试管中，用0.1mol/L磷酸二氢钾溶液（3.2.1）定容至3mL，配制成Se（IV）浓度为0μg/mL、0.051μg/mL、0.103μg/mL、0.206μg/mL、0.308μg/mL、0.411μg/mL、0.514μg/mL；Se（VI）浓度为0μg/mL、0.050μg/mL、0.100μg/mL、0.200μg/mL、0.300μg/mL、0.400μg/mL、0.500μg/mL的标准系列，进样量100μL，以标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积响应值为纵坐标，绘制标准曲线。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液100μL注入原子荧光形态分析仪进行检测，采集试样中Se（IV）和Se（VI）的图谱，根据标准曲线得到待测液中Se（IV）和Se（VI）的浓度，平行测定次数不少于两次。

Se（IV）和Se（VI）的标准色谱图见附录A。

6. 分析结果的表述

样品中Se（IV）、Se（VI）和无机硒总量的计算见公式（1）、（2）、（3）：

$$X_{Se\ (IV)}=\frac{(C_1-C_0)\times V\times 1000}{m\times 1000} \quad \cdots (1)$$

$$X_{Se\ (VI)}=\frac{(C_1-C_0)\times V\times 1000}{m\times 1000} \quad \cdots (2)$$

$$X_T=X_{Se\ (IV)}+X_{Se\ (VI)} \quad \cdots (3)$$

式中：

$X_{Se\ (IV)}$——试样中 Se(IV)的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L)

$X_{Se\ (VI)}$——试样中 Se(VI)的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L)

X_T——试样中 Se（IV）或 Se（VI）的总量，单位为毫克每千克（mg/kg）或毫克每升（mg/L）

m——试样质量或体积，单位为克（g）或毫升（mL）

C_1——从曲线中计算出的试液中 Se（IV）或 Se（VI）的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）

C_0——从曲线中计算出的试剂空白液中 Se（IV）或 Se（VI）的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）

V——浸提液体积，单位为毫升（mL）

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果保留到小数点后二位。

7. 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的 10%。

8. 检测限

本标准方法仪器检测限 Se（IV）为 1.2μg/kg，Se（VI）为 3.5μg/kg

本标准固体样品方法检出限为 Se（IV）为 12μg/kg，Se（VI）为 35μg/kg

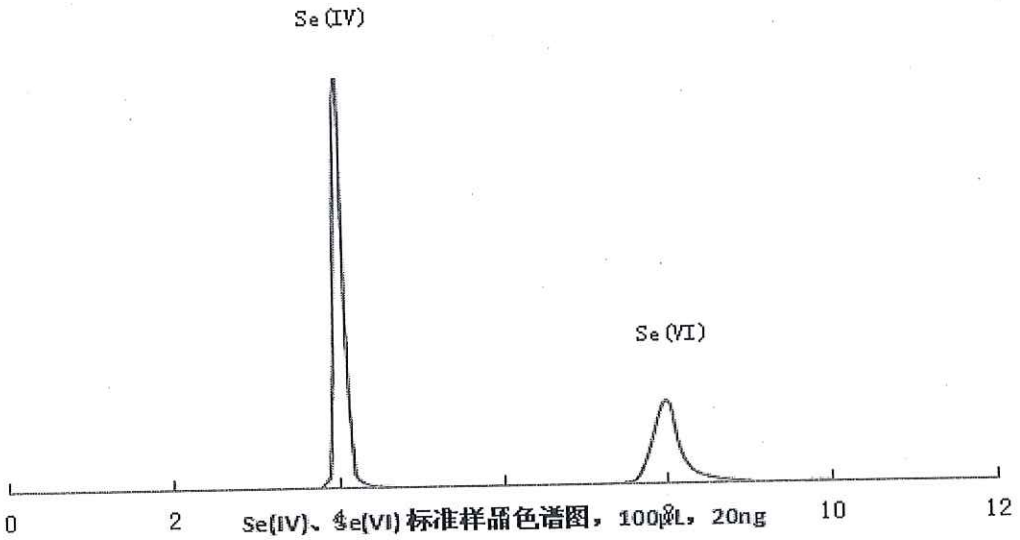
本标准液体样品方法检出限为 Se（IV）为 0.2μg/L，Se（VI）为 0.6μg/L

本标准液体植物油方法检出限为 Se（IV）为 0.8μg/L，Se（VI）为 2.3μg/L

9. 其它

GB5009.93-2010 中总硒含量的单位是 mg/kg 或 mg/L，DBS42/002-2014 中总硒、有机硒含量单位为 μg/100g 或 μg/100mL，二者的换算关系是 1mg/kg（L）＝100μg/100g（mL）。

附录 A　　无机硒标准样品色谱图



第二法　固相萃取原子荧光光谱法

1．范围

本标准规定了固相萃取-原子荧光光谱法测定富硒食品中无机硒（四价硒、六价硒）的方法。

本标准适用于富硒食品中无机硒的测定。

2．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（SeO_4^{2-}）和亚硒酸根（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 SeO_4^{2-}和 SeO_3^{2-}，洗脱液经 6mol/L 盐酸加热使试样中的 SeO_4^{2-}还原成 SeO_3^{2-}，用硼氢化钠或硼氢化钾使还原成硒化氢（H_2Se），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。

3．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/T6682 中规定的二级水。

3.1 试剂

3.1.1 硝酸（HNO_3）：优级纯

3.1.2 盐酸（HCl）：优级纯

3.1.3 高氯酸（$HClO_4$）：优级纯

3.1.4 氢氧化钠（NaOH）：优级纯

3.1.5 硼氢化钾（KBH_4）：优级纯

3.1.6 铁氰化钾[$K_3Fe(CN)_6$]

3.2 试剂配制

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

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

1000mL，混匀。

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

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

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

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

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

3.3 标准品

硒标准溶液：1000mg/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。

3.4 标准溶液的制备

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

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

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

4. 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。

4.1 原子荧光光度计，带硒元素空心阴极灯

4.2 电热板

4.3 天平：感量为 1mg

4.4 粉碎机

4.5 烘箱

4.6 超声波清洗器

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

4.8 水浴恒温振荡器

4.9 SAX 强阴离子交换柱：1000mg/6mL 或以上

5. 分析步骤

5.1 试样制备

注：在采样和制备过程中，应避免试样污染。

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

5.1.2 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。

5.1.3 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。

5.2 试样提取

5.2.1 固体样品

准确称取试样 0.2g～1.0g（精确至 0.001g），置于 50mL 塑料离心管中，准确加入 20mL 纯水，涡旋混匀，超声 10min 后，于 80～90℃水浴振荡提取 1h，其间每隔 20min 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 20min，确保样品中无机硒被充分提取。提取完毕，冷却至室温，以 8000r/min 离心 15min。取上层清液，用氢氧化钠溶液（5g/L）调节 pH 至 4～7 后，经 0.45μm 针头式有机滤膜过滤，准确吸取 10mL 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。

5.2.2 液体样品（水、饮料、酒、醋、酱油、液体乳等）

准确移取试样 30.00mL（精确到 0.01mL）于 100mL 小烧杯中，加热浓缩至 5mL 以下，转移至 10mL 离心管中，纯水定容至 10mL，涡旋混匀，超声 10min 后，于 80～90℃水浴振荡提取 1h，其间每隔 20min 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 20min。提取完毕，冷却至室温，以 8000r/min 离心 15min。

取上层清液，用氢氧化钠溶液（5g/L）调节 pH 至 4～7 后，经 0.45μm 针头式有机滤膜过滤，准确吸取 5mL 滤液，待用。同时做空白试验。

5.2.3 植物油

准确称取试样 10.0g（精确到 0.001g）于 50mL 离心管中，准确加入 10mL 纯水，涡旋混匀，超声 10min 后，于 80～90℃水浴振荡提取 1h，其间每隔 20min 取出上下颠倒，水浴结束后，再使用超声提取 20min。提取完毕，冷却至室温，以 8000r/min 离心 15min。取下层水溶液，用氢氧化钠溶液（5g/L）调节 pH 至 4～7 后，经 0.45μm 针头式有机滤膜过滤，准确吸取 5mL 滤液，待用。同时做空白试验。

5.3 试样净化

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

5.4 试样消解

5.3 所得洗脱液按照 GB5009.93 第一法处理。即：洗脱液置于锥形瓶中，加 10.0mL 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 2mL 左右，切不可蒸干。冷却，再加 5.0mL 盐酸溶液（6mol/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 10mL 容量瓶中，加入 2.5mL 铁氰化钾溶液（100g/L），用水定容，混匀待测。

5.5 测定

5.5.1 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 300V；灯电流 80mA；炉高 8mm；载气流速 400mL/min；屏蔽气流速 1000mL/min；测量方式标准曲线法；读数方式峰面积。

5.5.2 标准曲线的制作

以盐酸溶液（5＋95）为载流，硼氢化钾碱溶液（8g/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。

5.5.3 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。

6. 分析结果的表述

按式（1）计算试样中无机硒的含量：

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

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（μg/L）

C_0 ——空白溶液中无机硒的质量浓度，单位为微克每升（μg/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≥1.00mg/kg（或 mg/L）时，计算结果保留三位有效数字，当无机硒含量<1.00mg/kg（或 mg/L）时，计算结果保留两位有效数字。

7. 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%。

8. 其他

本方法检出限：当称样量为 1g（或 1mL），定容体积为 10mL 时，方法检出限为 0.003mg/kg（或 0.003mg/L），方法定量限为 0.009mg/kg（或 0.009mg/L）。

GB5009.93 中总硒含量的单位是 mg/kg 或 mg/L，DBS42/002-2014 中总硒、有

机硒含量单位为 μg/100g 或 μg/100mL，二者的换算关系为 1μg/100g（mL）＝0.01mg/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。

湖北省卫生健康委员会办公室　　2018年12月10日印发