《富铬酵母中三价铬和六价铬的测定》编制说明

（征求意见稿）

一、工作简况

1 、任务来源

根据《工业和信息化部办公厅印发的 2022 年第二批行业标准制修订和外文版项目计划的通知》(工信厅科函〔2022〕158 号)，《富铬酵母中三价铬和六价铬的测定》被列入制定计划项目，项目编号为 2022-0898T-OB。由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会归口，中国食品发酵工业研究院有限公司牵头，计划应完成时间为 2024 年。

2、主要工作过程

（1）起草阶段

2022 年期间，项目陆续下达后，秘书处公开发文筹建起草工作组，各相关单位积极申请参与标准制定工作，企业涵盖科研、检测、生产企业等单位。为保证标准修订工作的科学性、先进性及可操作性，工作组广泛查阅和分析国内外相关标准和法规情况，为顺利开展标准制定工作提供基础材料，行业标准的制修订工作也为本标准积累了相关经验和可借鉴的思路。

2023 年 8 月，标准起草工作组在湖北宜昌召开了第一次标准起草工作启动会议，讨论了标准的制定思路和标准的覆盖范围。经过研讨，确定了该标准的检测方法及相关内容，同时会上明确了工作分工。

2023 年 9 月~12 月，参照 SN/T2210-2021《出口食口中六价铬的测定》第二法“离子色谱柱后衍生法”的基础上，对方法进行调整与优化。通过现有的设备是液相色谱（附柱后衍生），而非离子色谱，对流动相流速、衍生试剂中加酸量、衍生试剂流速以及色谱柱等关键参数进行了相应的修改与调整。这些修改旨在确保测定方法能够在液相色谱（附柱后衍生）设备上实现精确、稳定的运行，从而提高测定的准确性与可靠性。

2024 年 1 月~4 月进行方法研究，经过后期对测定方法的调整，定量限达到了 0.05 mg/kg，线性范围则覆盖了 0.5 μg/L 至 20 μg/L 的广泛区间。这意味着该方法能够准确、灵敏地检测出食品中微量的六价铬含量，为食品安全监管提供了

有力的技术支持。

2024 年 4 月~5 月，标准起草工作组根据修改的方案对标准的前处理方法、色谱测定条件及标准溶液的标定进行优化研究，根据前期讨论意见进一步修改标准文本，形成了标准征求意见稿。

3、主要参加单位和工作组成员及其所做的工作等

本标准主要单位成员包括：暂略。

主要成员：暂略。

所做的工作：中国食品发酵工业研究院有限公司负责收集、分析国内外相关技术文献和资料，并对生产现状和发展情况进行了全面调研。并负责组织方法研究工作和本标准其他材料的编制和意见及建议进行归纳、分析。负责开展方法验证和意见修改等工作。

二、标准编制原则和主要内容

1. 标准编制原则

以科学技术和实验数据为依据，结合食品富铬酵母实际生产情况，制定本标准。制定过程中充分考虑了行业发展、产品质量提升及市场竞争力增强，确保标准的科学、先进和可操作性。贴近生产实际，为企业提供指导。推动行业健康发展，提升产品质量，引导企业遵循标准，共同推动行业进步。

本标准起草过程中，主要按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》和 GB/T 1.2-2002《标准化工作导则 第 2 部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等要求进行编写。

2. 标准主要内容的论据

项目起草工作组查阅了国内食品中关于六价铬的产品标准、测定方法等相关标准，通过检索国内外文献数据库，收集与食品中六价铬含量测定相关的国内外参考文献，比较不同的测定方法，采用液相色谱柱后衍生方法富铬酵母中六价铬的测定含量测定，对样品提取的各影响因素、色谱分离条件等进行优化，对方法学进行了系统研究，最终形成了《富铬酵母中六价铬的测定》行业标准征求意见稿。

本文件规定了富铬酵母中六价铬的液相色谱柱后衍生测定方法。

本文件适用于富铬酵母中六价铬的测定。

3. 解决的主要问题

富硒酵母是通过生物转化技术，将无机硒转化为有机硒的一种营养补充品。它不仅可以提高人体对硒的吸收利用率，还具有抗氧化、增强免疫力等多种保健功能。而六价铬是一种有毒的重金属元素，长期摄入会对人体造成损害，甚至引发癌症等严重疾病。因此，确保富硒酵母中六价铬的含量在安全范围内，对于保障消费者的健康具有重要意义。

市场上的富硒酵母产品种类繁多，质量参差不齐。一些不法商家为了追求利润，可能会采用劣质原料或简化生产工艺，导致产品中六价铬含量超标。通过建立统一的测定方法标准，可以确保各生产厂家在生产和销售过程中遵循相同的质量要求，从而提高整个市场的产品质量，建立富硒酵母中六价铬的测定方法标准还有助于推动科研进步和技术创新。

现行发布的六价铬检测标准有 3 个，分别为 SN/T 3821-2014《出口化妆品中六价铬的测定 液相色谱—电感耦合等离子体质谱法》、QB/T 5291-2018《化妆品中六价铬含量的测定》、SN/T 2210-2021《出口食品中六价铬的测定》。对以上 3 个方法进行比较如下：

表 1：三个标准的比较

	SN/T3821-2014	QB/T 5291-2018	SN/T 2210-2021
方法	LC-ICP/MS /	分光光度法（UV-VIS） IC-ICP/MS	LC-ICP/MS IC（柱后衍生）
检出限	0.040 mg/kg [测定低限]	0.25mg/kg[UV-VIS]、0.01 mg/kg[IC-ICP/MS]	/
定量限	/	0.83 mg/kg[UV-VIS]、0.033 mg/kg[IC-ICP/MS]	0.05 mg/kg

采用 IC-ICP/MS 的方法对产品富铬酵母进行六价铬的测定。但是在测定过程中发现该方法对于富铬酵母的适用性不佳，主要原因可以富铬酵母中含有的铬络合物与六价铬无法分离，使 ICP/MS 基线偏高。

三、主要试验（或验证）情况分析

针对《富铬酵母中六价铬的测定》方法进行了系统研究，详细的研究见附件一。

（1）提取条件研究：通过对富硒酵母样品的中六价铬提取溶剂等条件的研究，确定了最佳标准适用富铬酵母中六价铬的测定提取条件。

（2）分离条件研究：通过比较六价铬的最大吸收波长，比较不同色谱柱，

优化程序经多次实验所得液相等梯度柱温 60℃；流速 0.6 mL/min；衍生液流速 0.6 mL/min；检测波长为 540 nm；参比波长：350 nm。

（3）方法线性及检出限：方法的检出限为 0.02 mg/kg，定量限为 0.05 mg/kg。

（4）当检测结果低于 0.02 mg/kg 时，报告未检出，并标注检出限为 0.01 mg/kg；当检测结果大于 0.02 mg/kg 且小于 0.05 mg/kg 时，报告实际含量，并标注检出限 0.02 mg/kg，定量限 0.05 mg/kg；当检测结果大于 0.05 mg/kg，报告实际含量。

（5）方法加标回收率：在样品中加入六价铬标准，按照试验方法进行处理后上机分析，平均回收率在 80%~103%之间。

（6）方法精密度试验：对同一食品样品平行多次进行测定，样品测定结果的 RSD 在 10%以内，说明该方法日内测定结果重复性，精密度较高。

四、 标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利问题。

五、 预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

市场上的富硒酵母产品种类繁多，质量参差不齐。一些不法商家为了追求利润，可能会采用劣质原料或简化生产工艺，导致产品中六价铬含量超标。建立统一的测定方法标准，通过制定和执行这一标准，可以确保各生产厂家在生产和销售过程中遵循相同的质量要求，从而有效提高整个市场的产品质量。

建立测定方法标准还有助于推动科研进步和技术创新。随着科学技术的不断发展，人们对于富硒酵母及其六价铬含量测定的研究也在不断深入。通过建立统一的标准，可以为科研人员提供一个更加准确、可靠的测定方法，推动相关领域的研究进展。同时，这也将激发生产厂家进行技术创新和升级，提高产品质量和竞争力。

六、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

本标准未采用国际标准。

本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

本标准制定过程中未测试国外的样品、样机。

七、 在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及标准，特别是强制性标准的协调性

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

八、 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、 标准性质的建议说明

建议本标准的性质为推荐性行业标准。

建议本标准通过审核、批准发布之后，由相关部门组织力量对本标准进行宣贯，在行业内进行推广。

十、 贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准自发布 6 个月之后开始实施。

十一、 废止现行相关标准的建议 废止现行相关标准的建议

无。

十二、 其它应予说明的事项 其它应予说明的事项

无

附件一　　富铬酵母中六价铬的含量的测定方法条件优化

1. 研究背景

随着健康生活理念普及，食品营养与安全备受关注。富硒酵母作为硒元素补充品，受到消费者欢迎。但在其生产加工中，可能引入微量有害物质。因此，质量的体外评价对质量控制和市场监管至关重要，富硒酵母是通过生物转化技术，将无机硒转化为有机硒的一种营养补充品。它不仅可以提高人体对硒的吸收利用率，还具有抗氧化、增强免疫力等多种保健功能。而六价铬是一种有毒的重金属元素，长期摄入会对人体造成损害，甚至引发癌症等严重疾病。因此，确保富硒酵母中六价铬的含量在安全范围内，市场上的富硒酵母产品种类繁多，质量参差不齐。一些不法商家为了追求利润，可能会采用劣质原料或简化生产工艺，导致产品中六价铬含量超标。

建立富硒酵母中六价铬的测定方法标准，有助于规范市场秩序，提高产品质量，对于保障消费者的健康具有重要意义。

2. 方法优化

2.1. 衍生条件 pH 的测定

参照 QB/T 5291-2018《化妆品中六价铬含量的测定》（分光光度法）中 3.4.2 显色“加 2.0 mL 二苯碳酰二肼显色剂到滤液，混匀，滴加硫酸溶液，使滤液 pH 值达到 2.0±0.5，然后将溶液全部转入至 50 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀，显色 10 min 后待测”所述，流动相与衍生试剂混合后的 pH 值应在 1.5~2.5 之间。

依照 SN/T2210-2021 第二法 离子色谱柱后衍生法所述，配制流动相及衍生试剂，按其 15.2.1 离子色谱参考条件：d）流动相流速：1.2 mL/min；e）衍生剂流速：0.7 mL/min。流动相与衍生试剂按 12：7 混合，测定 pH=0.23。

依据以上文献及测定数据，确定将流动相与衍生液混合后的 pH 定为≤≤2.5。

2.2. 衍生时间试验

取 10 mL 25 μg/L 六价铬标准溶液于 25 mL 比色管内，加入 1 mL 衍生试剂，混匀。计时，观察显色时间。肉眼观察显色时间在 2.0~3.0 min 之间。流动相在衍生管内的停留时间应≥≥3.0 min。

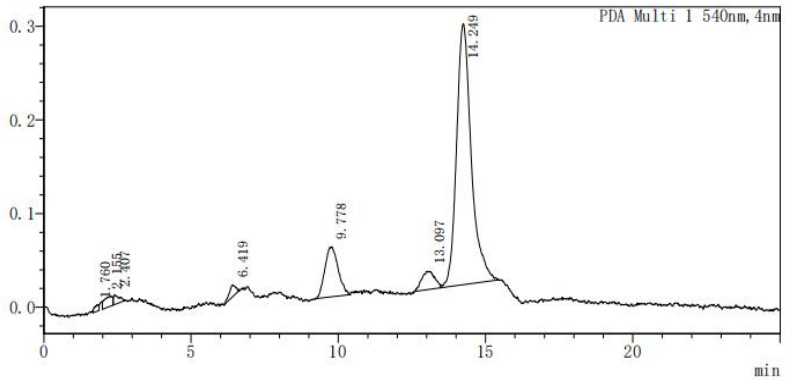
由于目标化合物经色谱柱及柱后衍生管的推动力均为流动相泵，目标化合物出色谱柱后的流速即时流动相流速。衍生时间即为衍生管长度÷流动相流速。逐步降低流动相流速，进 10 μg/L 六价铬标准品，至 0.7 mL/min 时，有峰出现。

以上现象的解释：柱后衍生器配置衍生柱为：1/32 聚醚醚酮（PEEK）管×5 m，衍生时间不够。流动相条件的修改为了测定条件更稳定，设定：流动相流速：0.6 mL/min。衍生液流速：0.6 mL/min。增加衍生温度：60℃。

2.3. 洗脱液及 pH 的选择

液相色谱，其柱后衍生泵、二极管检测器可承受的溶液 pH 范围为 1.0~14.0；按 SN/T2210-2021《出口食品中六价铬的测定》中柱后衍生溶液:称取 0.4g 二苯基碳酰二肼，用 50 mL 甲醇溶解，转移至 500 mL 容量瓶中，量取 50 mL 2 mol/L 硫酸加人到 500 mL 容量瓶中，摇匀，加水定容至刻度。若按上述吸取 50 mL 2 mol/L 的硫酸溶液，定容 500 mL，测定其 pH 为 0.03。为了保护仪器，选择 45 mL 2 mol/L 的硫酸溶液，定容 1000 mL，测定其 pH 为 1.1 左右。

按SN/T2210-2021《出口食品中六价铬的测定》中配制流动相准确移取2.5 mL 硝酸和 3.5mL， 氨水溶液于 500 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，超声脱气 10 min。经多次配制，以上流动相的 pH 范围为 6.65~7.40 之间。由于选用 PRP-X100 作为分析柱，阴离子交换柱控制 pH≥7.0，但衍生试剂所加的硫酸产生了变化，经试验流动相 pH 控制在 7.0~7.2 之间，与衍生试剂反应后的溶液 pH≤2.5，可以满足反应的要求。



富铬酵母样品谱图

2.4. 方法线性范围

取混合物对照品溶液，按照选定方法进样测定，以各组分定量色谱峰的峰面

积（y）对质量浓度（x）绘制曲线，得回归方程和相关系数的平方（R^2），见表2。结果表明，线性关系在线性范围内良好，R^2均在0.998以上。

表2　六价铬标准曲线

浓度（μg/L）	0.41144	0.82288	2.0572	4.1144	8.2288	20.572
平均面积	702	1061	2769	5313	11687	26640
标准曲线: $y = 1298.2x + 194.88$　$R^2 = 0.9983$						

2.5. 方法检出限、定量限

由于SN/T 2210-2021已给出定量限0.05 mg/kg，本方法定量限只需≤≤0.05 mg/kg即可。

由于无阳性样品，采用F55样品加标测定，加标量分为低水平加标与高水平加标。按SN/T 2210-210给出定量限为0.05 mg/kg，则检出限大约为0.015 mg/kg。称取1.0 g F55中添加0.015 mg/kg的六价铬计算，添加量为0.015 μg，设计添加量为100 μg/L×0.2 mL=0.02 μg，另一加标水平≥≥2×0.02 μg。

方法的检出限为0.02 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

2.5.1 低水平加标样品

称取1.0 g样品于50 mL塑料离心管内，加入0.2 mL六价铬中间使用液（100 μg/L），加入24.8 mL磷酸氢二钾缓冲提取液，涡旋振荡2 min，重复3次，5000 r/min离心5 min，取上清液过0.45 μm膜，上机分析。

2.5.2 高水平加标样品

称取1.0 g样品于50 mL塑料离心管内，加入0.5 mL六价铬中间使用液（100 μg/L），加入24.5 mL磷酸氢二钾缓冲提取液，涡旋振荡2 min，重复3次，5000 r/min离心5 min，取上清液过0.45 μm膜，上机分析。

表3 样品测定浓度

浓度μg/L	平行1	平行2	平行3	平行4	平行5	平行6	平行7
低水平加标	0.482	0.543	0.591	0.767	0.647	0.658	0.505
高水平加标	0.895	0.975	0.858	1.009	0.894	0.910	0.945
备注	低水平加标样品质量0.9983 g；高水平加标样品质量1.0029 g						

表4 样品测定含量

含量mg/kg	平行1	平行2	平行3	平行4	平行5	平行6	平行7

低水平加标	0.01207052	0.013598117	0.0148	0.019207653	0.016203	0.016478	0.012646
高水平加标	0.0223103	0.024304517	0.021388	0.025152059	0.022285	0.022684	0.023557

依据以下公式计算

$$S_p = \frac{\sqrt{V_A {S_A}^2 + V_B {S_B}^2}}{V_A + V_B} \quad \text{.....1}$$

$$MDL = t_{(V_A+V_B,0.99)} \times S_p \quad \text{.....2}$$

式 1、式 2 中：

V_A—方差较大批次的自由度，nA-1；

V_B—方差较小批次的自由度，nB-1；

S_A—方差较大批次标准偏差；

S_B—方差较小批次标准偏差；

S_p—组合标准偏差；

$t_{(V_A+V_B,0.99)}$—自由度为 V_A+V_B，置信度为 99%时的 t 分布。

则检出限 MDL= 0.0015 mg/kg，则定量限为 0.0045 mg/kg

上述值小于 SN/T 2210-2021 中规定的 0.05 mg/kg 的定量限。

2.6. 线性及校准

按 SN/T 2210-2021 中线性范围 0.5 μg/L~20 μg/L。配制六价铬标准系列溶液，上机测定。

表 5 标准系列测定数据

标液浓度 ug/L	平行 1 峰面积	平行 2 峰面积	平行 3 峰面积	RSD%
0.4	3471	2846	1973	27.23
1	2150	3575	3176	24.78
2	4441	5485	5068	10.51
5	6955	7790	7106	6.11
10	16021	17404	16506	4.22
20	33227	33486	33226	0.45
标曲		f(x)=157.06x+1541.44	R2=0.999115	

线性范围在 SN/T 2210-2021 范围内，线性范围≥0.99。

2.7. 样品加标回收率测定

由于富铬酵母中六价铬暂无标准物质，所以采用 GB/T 32465-2015《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》7.3.2“可结合回收率进行正确度研究”。

表 6 富铬酵母加标测定数据

称样质量 g	加标量	测定浓度μg/L	含量 mg/kg	回收率%
0	0	3.108	/	/
0	0	3.084	/	/
1.0675	0	3.092	未检出	/
0.9960	0	3.126		

0.5194		3.615	/	103.8%
0.4887	125μL×100μg/L	3.501	/	81.0%
0.6431		3.498	/	80.4%
0.5259		4.039	/	94.3%
0.4701	500μL×100μg/L	3.938	/	84.2%
0.5263		3.981	/	88.5%

2.8. 方法的重复性

取 6 支 50 mL 塑料离心管，每支管内称取 1.0 g 样品，加入 24.5 mL 磷酸氢二钾缓冲提取液，涡旋振荡 2 min，每管加入 0.5 mL 的六价铬中间使用液（200 μg/L），混匀，振荡 2 min，5000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 膜，上机分析。

表 7 精密度数据

样品	质量 g	峰面积	浓度μg/L
平行 1	1.0006	5056	2.382
平行 2	1.0024	4824	2.255
平行 3	1.0126	4622	2.144
平行 4	1.0089	4810	2.247
平行 5	1.0012	4866	2.278
平行 6	1.0031	4670	2.170

由于富铬酵母中不含六价铬，仅有添加的六价铬，以测定浓度计算相对偏差，RSD=3.77%≤10%。