

中华人民共和国国家标准

GB 1903.28—2018

食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒蛋白

2018-06-21 发布

2018-12-21 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品营养强化剂 硒蛋白

1 范围

本标准适用于以硒含量较高的大豆等可食性植物为原料,经去脂、水提、乙醇沉淀、干燥的工艺精制而成富含硒代蛋氨酸的食品营养强化剂硒蛋白。

2 定义

本标准所指的硒蛋白是硒以硒代蛋氨酸的形式存在的蛋白质。

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	浅黄色或黄绿色	取适量试样置于洁净、干燥的白瓷盘中,在自然光线下观察其色泽和状态,嗅其气味
状态	粉末,无正常视力可见杂质	
气味	具有硒化合物特有的类大蒜气味	

3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
硒代蛋氨酸(以 Se 计)含量 /(mg/kg)	1000~2500	附录 A
有机硒占总硒质量百分比, <i>w</i> /%	≥ 80	GB 5009.93 测定总硒含量;附录 A 中方法测定硒代蛋氨酸(以 Se 计)。有机硒占总硒质量百分比为硒代蛋氨酸(以 Se 计)含量/总硒含量的百分比
蛋白质, <i>w</i> /%	≥ 40	GB 5009.5 凯氏定氮法 ^a
水分/%	≤ 5	GB 5009.3 直接干燥法

表 2 (续)

项 目	指 标	检验方法
灰分/%	≤	10 GB 5009.4
砷(As)/(mg/kg)	≤	0.5 GB 5009.76
铅(Pb)/(mg/kg)	≤	1 GB 5009.75
总汞(以 Hg 计)/(mg/kg)	≤	0.1 GB 5009.17 原子荧光光谱分析法
镉(Cd)/(mg/kg)	≤	1 GB 5009.15 石墨炉原子吸收光谱法
^a 蛋白质系数:6.25。		

3.3 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项 目	指 标	检测方法
菌落总数/(CFU/g)	≤	3 000 GB 4789.2
大肠菌群/(MPN/g)	≤	3.0 GB 4789.3 MPN 计数法
霉菌和酵母菌/(CFU/g)	≤	100 GB 4789.15
沙门氏菌/25 g	不得检出	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌/25 g	不得检出	GB 4789.10 定性检验

附录 A

硒代蛋氨酸检验方法

A.1 安全提示

本检验方法中使用的部分试剂具有毒性和腐蚀性,操作时须小心谨慎。如溅到皮肤上应立即用水冲洗,严重者应立即治疗。使用易燃品时,严禁使用明火加热。

A.2 一般规定

本标准所用试剂和水在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质标准溶液、制剂和制品,在没有注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.3 原理

样品经酶解处理后,导入高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪(HPLC-ICP/MS)中,利用离子交换-高效液相色谱分离,电感耦合等离子体质谱检测,保留时间定性,外标法定量。

A.4 鉴别试验

在硒代蛋氨酸(SeMet)含量试验的色谱操作条件下,试样溶液与硒代蛋氨酸(SeMet) 标准溶液的色谱峰的保留时间相对差值不超过 10%。硒代蛋氨酸(SeMet)标准溶液 HPLC-ICP/MS 参考色谱图见附录 B。

A.5 硒代蛋氨酸含量的测定

A.5.1 试剂和材料

- A.5.1.1 硒代蛋氨酸(SeMet)标准品。
- A.5.1.2 胰蛋白酶(Trypsin)。
- A.5.1.3 蛋白酶 K(Proteinase K)。
- A.5.1.4 链霉蛋白酶(Pronase)。
- A.5.1.5 柠檬酸铵。
- A.5.1.6 甲醇:色谱纯。
- A.5.1.7 柠檬酸。
- A.5.1.8 氨水。
- A.5.1.9 硝酸。
- A.5.1.10 三(羟甲基)氨基甲烷。
- A.5.1.11 盐酸。
- A.5.1.12 超滤离心管(截留分子量为 3 000 u)。

A.5.1.13 氩气(纯度>99.99%)。

A.5.2 溶液的配制

A.5.2.1 5 mmol/L 柠檬酸铵+2%甲醇溶液:准确称取 1.211 4 g 柠檬酸铵于 1 000 mL 容量瓶,加入 20 mL 甲醇使其溶解,用柠檬酸和氨水精准调节 pH 至 4.85~4.95。临用前,过 0.45 μm 有机微孔滤膜。

A.5.2.2 硝酸溶液:取 5.0 mL 浓硝酸于 100 mL 容量瓶,用水稀释至刻度,摇匀。

A.5.2.3 Tris 缓冲液(0.1 mmol/L):准确称取 12.16 g 三(羟甲基)氨基甲烷于烧杯中,加入适量水使其溶解,并转移至 1000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

A.5.2.4 盐酸溶液(1 mmol/L):取 9 mL 浓盐酸于 100 mL 容量瓶中,加入适量水稀释至刻度,摇匀。

A.5.2.5 Tris-HCl 缓冲液(pH7.2):取 50 mL Tris 缓冲液(0.1 mmol/L)和 4.5 mL HCl(1mmol/L)于 100 mL 容量瓶中,加入水,并稀释至刻度,摇匀。

A.5.2.6 硒代蛋氨酸(SeMet)标准溶液(1000 ng/mL)的制备:准确称取 24.0 mg(精确至 0.1 mg) 硒代蛋氨酸(SeMet) 标准品(A.5.1.1)于 10.0 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得到 1000 μg/mL 的标准储备液,稀释 1000 倍后得到 1000 ng/mL 的标准溶液。进样前采用 0.45 μm 有机微孔膜过滤。

A.5.2.7 硒代蛋氨酸(SeMet)系列标准工作溶液的配制:分别取 0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、1.0 mL、2.0 mL 硒代蛋氨酸(SeMet)标准溶液(A.5.2.6)于 10 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。标准工作溶液的浓度分别为:20 ng/mL、40 ng/mL、60 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL。

A.5.3 仪器和设备

A.5.3.1 电子天平,感量 0.01 mg。

A.5.3.2 超声清洗器。

A.5.3.3 恒温水浴震荡仪。

A.5.3.4 离心机:最大转速 16 000 r/min,配有 50 mL 与 10 mL 离心管适配器。

A.5.3.5 高效液相色谱仪(HPLC)。

A.5.3.6 电感耦合等离子体质谱仪(ICP/MS)。

A.5.4 分析步骤

A.5.4.1 试样的制备

A.5.4.1.1 样品溶液的制备:称取经制备均匀的样品约 0.1 g(精确至 0.1 mg)置于 2 mL 的塑料具塞离心管中,加入 1 mL 5% 的硝酸溶液(A.5.2.2),立即盖紧盖子剧烈振摇后,在旋涡振荡器上振摇 15 s 后,以转速 12 000 r/min 离心 5 min,去除上清液,用纯水洗涤两次后保留沉淀物质,备用。将沉淀物质用 30 mL Tris-HCl(pH 7.2)(A.5.2.5)转移至 250 mL 三角锥瓶中,超声 5 min 后置于 37 °C 恒温水浴震荡仪上,每隔 12 h 依次加入 15 mg 胰蛋白酶(A.5.1.2)、10 mg 蛋白酶 K(A.5.1.3)及 15 mg 链霉蛋白酶(A.5.1.4),在 37 °C 下振荡酶解(摇速为 100~120 r/min)共 36 h。酶解后转移至 50mL 离心管中,以 4 000 r/min 离心 10 min;上清液用截留分子量为 3 000 u 的超滤管(A.5.1.12)离心除去蛋白酶及大分子物质,0.45 μm 有机微孔滤膜过滤,备用。

A.5.4.1.2 空白溶液的制备:除不加试样外,其他按(A.5.4.1.1)所述方法进行处理。

A.5.4.1.3 硒代蛋氨酸(SeMet)系列标准工作溶液的处理:分别准确吸取(A.5.2.7)中硒代蛋氨酸(SeMet)系列标准工作溶液 2 mL 于 10 mL 带盖离心管中,加入“……”,以下按(A.5.4.1.1)中自“30 mL Tris-HCl(pH 7.2)(A.5.2.5)……0.45 μm 有机微孔滤膜过滤,备用。”操作。

A.5.4.2 测定

A.5.4.2.1 液相色谱(HPLC)参考条件:

- a) 色谱柱:阴离子交换色谱柱(250 mm×4.1 mm,10 μ m)和保护柱或同等性能的色谱柱;
 - b) 柱温:20±5 °C;
 - c) 流动相:5 mmol/L 柠檬酸铵+2%甲醇(A. 5. 2. 1);
 - d) 流速:1 mL/min;
 - e) 进样量:100 μ L;

A.5.4.2.2 电感耦合等离子体质谱(ICP/MS)参考条件见表A.1。

表 A.1 ICP/MS 参考条件

参数选项	参数值
质荷比(m/z)	78
射频功率/W	1 400
等离子气流速/(L/min)	18.0
雾化器流速/(L/min)	0.98
辅助气流速/(L/min)	1.8

A.5.4.2.3 标准曲线的绘制按(A.5.4.2.1)和(A.5.4.2.2)所列测定条件,将标准工作溶液依次进样,测量硒代蛋氨酸(SeMet)的峰面积。以标准工作溶液中硒代蛋氨酸(SeMet)的浓度(ng/mL)为横坐标,以硒代蛋氨酸(SeMet)的峰面积比为纵坐标,绘制标准曲线。

按式(A.1)计算回归参数:

式中：

y ——硒代蛋氨酸(SeMet)的峰面积；

a ——回归曲线的斜率；

x——标准工作溶液中硒代蛋氨酸(SeMet)的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

b ——回归曲线的截距。

A.5.4.2.4 试样测定

将空白溶液(A. 5. 4. 1. 2)和试样溶液(A. 5. 4. 1. 1)依次进样,扣除空白值,获得硒代蛋氨酸(SeMet)的峰面积。

A. 5.5 结果计算

试样中硒代蛋氨酸含量(以 Se 计),按式(A.2)计算:

式中：

X ——试样中硒的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_X ——试样溶液中硒代蛋氨酸(SeMet)的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_0 ——空白溶液中硒代蛋氨酸(SeMet)的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——加入 Tris-HCl 的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量, 单位为克(g);

1 000——单位换算系数。

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 10%。

附录 B
硒代蛋氨酸 HPLC-ICP/MS 色谱图

硒代蛋氨酸 HPLC-ICP/MS 色谱图见图 B. 1。

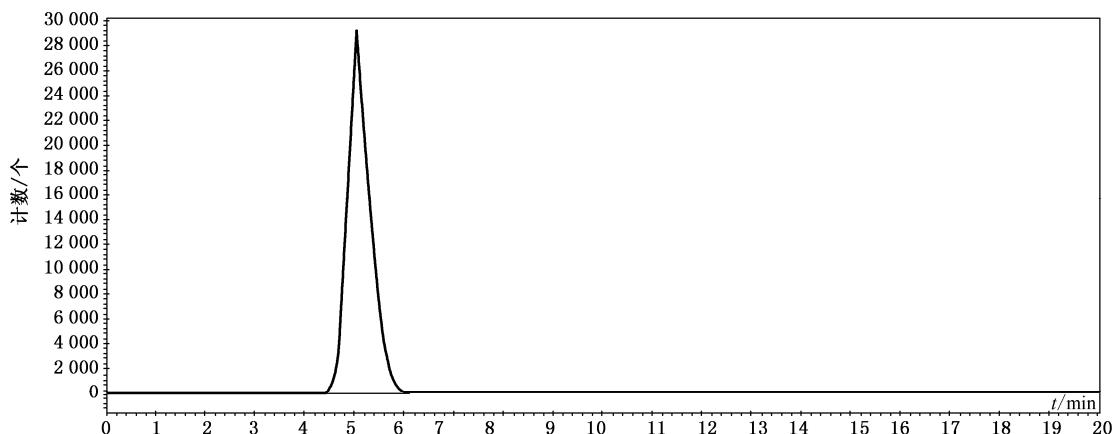


图 B. 1 硒代蛋氨酸标准品 HPLC-ICP/MS 色谱图