

# 中华人民共和国国家标准

GB 1903.28—××××

## 食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒蛋白

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

## 前 言

本标准代替GB 1903.28-2018《食品安全国家标准 食品营养强化剂 硒蛋白》。

本标准与GB 1903.28-2018相比，主要变化如下：

——修订了范围项下的描述，增加了“十字花科蔬菜”原料，修订了工艺描述；

——修订了硒蛋白定义，将“硒代蛋氨酸”修订为“硒代氨基酸”；

——修改了理化指标，将“硒代蛋氨酸（以Se计）含量”修订为“硒代氨基酸（以Se计）含量”，将“有机硒占总硒的质量百分比”修订为“硒代氨基酸（以Se计）占总硒的质量百分比”；

——增加十字花科蔬菜来源硒蛋白的质量规格指标；

——附录A 硒代氨基酸检验方法中增加了“高效液相色谱-原子荧光光谱联用法（HPLC-AFS）”。

食品安全国家标准公开征求意见

# 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、十字花科蔬菜等可食性植物为原料，经前处理、水提、精制而得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植物来源硒代氨基酸（硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸、甲基硒代半胱氨酸等）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	浅黄色至棕色	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	具有产品应有的气味	

#### 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
	十字花科 蔬菜来源	大豆来源	
硒代氨基酸（以 Se 计）含量/（mg/kg）	1000-2500		见附录 A
硒代氨基酸（以 Se 计）占总硒质量百分比， $\omega/\%$ $\geq$	70	80	见附录 A
蛋白质， $\omega/\%$ $\geq$	40		GB 5009.5 凯氏定氮法 <sup>a</sup>
水分/ $\%$ $\leq$	7	5	GB 5009.3
灰分/ $\%$ $\leq$	15	10	GB 5009.4
总砷（以 As 计）/（mg/kg） $\leq$	0.5		GB 5009.76 或 GB 5009.11
铅（Pb）/（mg/kg） $\leq$	1		GB 5009.75 或 GB 5009.12
总汞（以 Hg 计）/（mg/kg） $\leq$	0.1		GB 5009.17

镉 (Cd) / (mg/kg)	≤	1	GB 5009.15
<sup>a</sup> 蛋白质折算系数：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	检验方法
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/25g	不得检出	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌/25g	不得检出	GB 4789.10

食品安全国家标准公开征求意见

## 附录 A

### 硒代氨基酸检验方法

#### 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/T6682中规定的一级水。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 硒代氨基酸含量的测定

##### A.3.1 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法（HPLC-ICP/MS）

###### A.3.1.1 方法原理

试样经酶解处理后，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.3.1.2 试剂和材料

A.3.1.2.1 硒代胱氨酸（SeCys<sub>2</sub>，C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se<sub>2</sub>，CAS 号：29621-88-3）：有证标准物质，或纯度≥95%的对照品。

A.3.1.2.2 甲基硒代半胱氨酸（MeSeCys，C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>Se，CAS 号：26046-90-2）：有证标准物质，或纯度≥98%的对照品。

A.3.1.2.3 硒代蛋氨酸（SeMet，C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>Se，CAS 号：1464-42-2）：有证标准物质，或纯度≥98%的对照品。

A.3.1.2.4 胰蛋白酶（Trypsin）：酶活力≥10000U/mg。

A.3.1.2.5 蛋白酶 K（Proteinase K）：酶活力≥30U/mg。

A.3.1.2.6 链霉菌蛋白酶（Pronase XIV）：酶活力≥3.5U/mg。

A.3.1.2.7 磷酸氢二铵（(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>）。

A.3.1.2.8 甲醇 (CH<sub>3</sub>OH)：色谱纯。

A.3.1.2.9 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

A.3.1.2.10 四丁基溴化铵 (C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>BrN)。

A.3.1.2.11 三(羟甲基)氨基甲烷 (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)。

A.3.1.2.12 盐酸 (HCl)。

A.3.1.2.13 氩气 (纯度≥99.99%)。

### A.3.1.3 溶液的配制

A.3.1.3.1 流动相 (30mmol/L 磷酸氢二铵+0.5mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇, pH 值 4.0)：准确称取磷酸氢二铵 3.965g, 四丁基溴化铵 0.161g, 加入甲醇 30mL, 用水稀释至 1000mL, 添加甲酸使用酸度计辅助精准调节 pH 值至 4.0。临用前过 0.45μm 有机微孔滤膜, 超声脱气 10min。

A.3.1.3.2 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 溶液 (0.1mol/L)：准确称取 12.16g 三(羟甲基)氨基甲烷, 用水稀释至 1000mL, 混匀。

A.3.1.3.3 盐酸溶液 (1mol/L)：取 9mL 盐酸, 用水稀释至 100mL, 混匀。

A.3.1.3.4 三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液 (pH 值 7.2)：将 500mL Tris 溶液 (0.1mol/L), 用盐酸溶液 (1mol/L) 精准调节 pH 值至 7.2, 用水稀释至 1000mL, 混匀。

### A.3.1.3.5 硒代氨基酸标准溶液的制备

A.3.1.3.5.1 硒代胱氨酸标准储备溶液 (100mg/L, 以 Se 计)：称取硒代胱氨酸标准品 (A.3.1.2.1) (95%纯度) 11.1mg 于 50mL 容量瓶中, 用 5mL 5%盐酸溶液溶解, 并用水定容至刻度, 于 4℃ 冷藏保存, 有效期为 1 个月。

A.3.1.3.5.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备溶液 (100mg/L, 以 Se 计)：称取甲基硒代半胱氨酸标准品 (98%纯度) (A.3.1.2.2) 11.8mg 于 50mL 容量瓶中, 用水溶解, 并定容至刻度, 于 4℃ 冷藏保存, 有效期为 1 个月。

A.3.1.3.5.3 硒代蛋氨酸标准储备溶液 (100mg/L, 以 Se 计)：称取硒代蛋氨酸标准品 (98%纯度) (A.3.1.2.3) 12.7mg 于 50mL 容量瓶中, 用水溶解, 并定容至刻度, 于 4℃ 冷藏保存, 有效期为 1 个月。

A.3.1.3.5.4 硒代氨基酸混合标准溶液 (10.0mg/L, 以 Se 计)：分别取 10.0mL 硒代氨基酸标准储备溶液 (A.3.1.3.5.1、A.3.1.3.5.2、A.3.1.3.5.3) 于 100mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀, 临用现配。

A.3.1.3.5.5 硒代氨基酸标准系列溶液的配制：分别取 0.00mL、0.20mL、0.40mL、0.60mL、1.0mL、2.0mL 硒代氨基酸混合标准溶液（A.3.1.3.5.4）于 100mL 容量瓶中，用流动相（A.3.1.3.1）定容至刻度，混匀。标准系列溶液的浓度分别为：0ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、100ng/mL、200ng/mL，临用现配。

注 1：可根据样品中硒代氨基酸的实际含量适当调整标准系列溶液中的硒代氨基酸的质量浓度范围。

注 2：使用不同纯度的对照品时，需要进行对照品称取量的校正，对照品的实际称样量=100%纯品理论称样量/纯度（%）。

#### A.3.1.4 仪器和设备

A.3.1.4.1 分析天平，感量0.1mg和1mg。

A.3.1.4.2 超声清洗器。

A.3.1.4.3 恒温水浴振荡仪。

A.3.1.4.4 离心机：转速 $\geq 4000$  r/min，配有50mL与10mL离心管适配器。

A.3.1.4.5 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪（HPLC-ICP/MS）。

A.3.1.4.6 酸度计，精度0.01。

#### A.3.1.5 分析步骤

##### A.3.1.5.1 试样的制备

A.3.1.5.1.1 试样溶液的制备：称取样品 0.1g（精确到 0.001g）置于 50mL 的塑料具塞离心管中，加入 30mL Tris-HCl 缓冲液（pH 值 7.2）（A.3.1.3.4），超声 5min 后，加入 5mg 胰蛋白酶（A.3.1.2.4）、5mg 蛋白酶 K（A.3.1.2.5）及 5mg 链霉菌蛋白酶（A.3.1.2.6），在 37℃ 恒温水浴振荡酶解（摇速为 100~120r/min）4h，酶解后以 4000r/min 离心 10min；吸取上清液用流动相（A.3.1.3.1）稀释至标准曲线范围浓度，0.45 $\mu$ m 有机微孔滤膜过滤，备用。

A.3.1.5.1.2 空白溶液的制备：除不加试样外，其他按（A.3.1.5.1.1）所述方法进行处理。

##### A.3.1.5.2 测定

A.3.1.5.2.1 高效液相色谱（HPLC）参考条件：

- a) 色谱柱：亲水性 C<sub>18</sub> 色谱柱（250mm×4.6mm，5 $\mu$ m）和保护柱或同等性能的色谱柱；
- b) 柱温：30℃；
- c) 流动相：30mmol/L 磷酸氢二铵+0.5mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇，pH 值 4.0；

d) 流速: 1mL/min;

e) 进样量: 50 $\mu$ L。

#### A.3.1.5.2.2 电感耦合等离子体质谱 (ICP/MS) 参考条件:

a) 质荷比 (m/z): 78;

b) 射频功率/W: 1400;

c) 等离子体气流速/ (L/min): 18.0;

d) 辅助气流速/ (L/min): 1.8。

#### A.3.1.5.2.3 标准曲线的绘制

标准曲线的绘制按 (A.3.1.5.2.1) 和 (A.3.1.5.2.2) 所列测定条件, 将标准溶液依次进样, 测量硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys和SeMet) 的峰面积, 以硒代氨基酸标准溶液 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys和SeMet) 的浓度 (ng/mL) 为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

#### A.3.1.5.2.4 试样测定

将空白溶液 (A.3.1.5.1.2) 和试样溶液 (A.3.1.5.1.1) 依次进样, 以试样溶液与硒代氨基酸 [SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet] 标准溶液的色谱峰的保留时间进行定性, 二者保留时间相对差值应不超过10%, 试样溶液和硒代氨基酸混合标准溶液的HPLC-ICP/MS色谱图见附录B.1。

试样溶液扣除空白值, 获得硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys和SeMet) 的峰面积进行定量。

#### A.3.1.6 结果计算

单个硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 和 SeMet) 含量 (以 Se 计), 按式 (A.1) 计算:

$$X = \frac{(C_x - C_0) \times V \times f}{m \times 1000} \dots \dots \dots (A.1)$$

式中:

$X$ —试样中单个硒代氨基酸的含量 (以 Se 计), 单位为毫克每千克 (mg/kg);

$C_x$ —试样溶液中硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 和 SeMet) 的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

$C_0$ —空白溶液中硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 和 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);

$f$ —提取液稀释倍数;

$m$ —试样质量, 单位为克 (g);

1000—单位换算系数。

试样中总的硒代氨基酸含量 ( $T_{Se-AA}$ ) 等于试样中 SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 和 SeMet 含量 (以 Se 计) 之和, 按公式 (A.2) 计算:

$$T_{Se-AA}=X_1+X_2+X_3\dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

$T_{Se-AA}$ —试样中总的硒代氨基酸含量 (以 Se 计), 单位为毫克每千克 (mg/kg);

$X_1$ —试样中 SeCys<sub>2</sub> 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

$X_2$ —试样中 MeSeCys 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

$X_3$ —试样中 SeMet 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

测定结果以平行测定的算术平均值表示, 保留 3 位有效数字。

#### A.3.1.7 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 10%。

#### A.3.2 高效液相色谱-原子荧光光谱联用法 (HPLC-AFS)

##### A.3.2.1 方法原理

试样经酶解处理后, 导入高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪 (HPLC-AFS) 中, 利用高效液相色谱分离, 在线紫外消解, 原子荧光光谱检测, 保留时间定性, 外标法定量。

##### A.3.2.2 试剂和材料

A.3.2.2.1 氢氧化钠 (NaOH)。

A.3.2.2.2 硼氢化钾 (KBH<sub>4</sub>)。

A.3.2.2.3 过硫酸钾 (K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>)。

其余同 A.3.1.2。

##### A.3.2.3 溶液的配制

A.3.2.3.1 流动相 (30mmol/L 磷酸氢二铵+0.5mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇, pH 值 4.0): 同

A.3.1.3.1。

A.3.2.3.2 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 溶液 (0.1mol/L): 同 A.3.1.3.2。

A.3.2.3.3 盐酸溶液 (1mol/L): 同 A.3.1.3.3。

A.3.2.3.4 三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(pH值7.2):同A.3.1.3.4。

A.3.2.3.5 硒代氨基酸标准溶液的配制

A.3.2.3.5.1 硒代胱氨酸标准储备溶液(100mg/L,以Se计):同A.3.1.3.5.1。

A.3.2.3.5.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备溶液(100mg/L,以Se计):同A.3.1.3.5.2。

A.3.2.3.5.3 硒代蛋氨酸标准储备溶液(100mg/L,以Se计):同A.3.1.3.5.3。

A.3.2.3.5.4 硒代氨基酸混合标准溶液(10.0mg/L,以Se计):分别取10.0mL硒代氨基酸标准储备溶液(A.3.2.3.5.1、A.3.2.3.5.2、A.3.2.3.5.3)于100mL容量瓶中,用水定容至刻度,混匀,临用现配。

A.3.2.3.5.5 硒代氨基酸标准系列溶液的配制:分别取0.00mL、0.50mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL、4.0mL、5.0mL硒代氨基酸混合标准溶液(A.3.2.3.5.4)于100mL容量瓶中,用流动相(A.3.2.3.1)定容至刻度,混匀。标准系列溶液的浓度分别为:0ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、300ng/mL、400ng/mL、500ng/mL,临用现配。

注:可根据样品中硒代氨基酸的实际含量适当调整标准系列溶液中的硒代氨基酸的质量浓度范围。

A.3.2.3.6 氢氧化钠溶液(5g/L):称取5.0g氢氧化钠,用水稀释至1000mL,混匀。

A.3.2.3.7 硼氢化钾碱溶液(15g/L):称取15.0g硼氢化钾,溶于氢氧化钠溶液(5g/L)中,混匀。临用现配。

A.3.2.3.8 过硫酸钾碱溶液(5g/L):称取5g过硫酸钾,溶于氢氧化钠溶液(5g/L)中,混匀。临用现配。

A.3.2.3.9 盐酸溶液(5+95):量取50mL盐酸,缓慢加入950mL水,混匀。

#### A.3.2.4 仪器和设备

A.3.2.4.1 分析天平,感量0.1mg和1mg。

A.3.2.4.2 超声清洗器。

A.3.2.4.3 恒温水浴振荡仪。

A.3.2.4.4 离心机:转速 $\geq 4000$  r/min,配有50mL与10mL离心管适配器。

A.3.2.4.5 高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪(配备在线紫外消解装置)。

A.3.2.4.6 酸度计,精度0.01。

#### A.3.2.5 分析步骤

## A.3.2.5.1 试样的制备

同 A.3.1.5.1。

## A.3.2.5.2 测定

## A.3.2.5.2.1 高效液相色谱（HPLC）参考条件：

同 A.3.1.5.2.1。

## A.3.2.5.2.2 原子荧光光谱仪参考条件：

- a) 还原剂：硼氢化钾碱溶液（15g/L）；
- b) 氧化剂：过硫酸钾碱溶液（5g/L）；
- c) 载流：盐酸溶液（5+95）；
- d) 灯电流（主/辅）：80/40mA；
- e) 负高压：300V；
- f) 泵转速：60r/min；
- g) 紫外消解：45W；
- h) 载气/屏蔽气流速：900/300mL/min。

## A.3.2.5.2.3 标准曲线的绘制

标准曲线的绘制按（A.3.2.5.2.1）和（A.3.2.5.2.2）所列测定条件，将标准溶液依次进样，测量硒代氨基酸（SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys和SeMet）的峰面积。以硒代氨基酸标准溶液（SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys和SeMet）的浓度（ng/mL）为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

## A.3.2.5.2.4 试样测定

同A.3.1.5.2.4。

硒代氨基酸混合标准溶液的HPLC-AFS色谱图见附录B.2。

试样溶液与硒代氨基酸[SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet]标准溶液色谱峰的保留时间相对差值不超过10%。

## A.3.2.6 结果计算

同 A.3.1.6。

## A.3.2.7 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10%。

A.4 硒代氨基酸（以Se计）占总硒质量百分比

A.4.1 总硒含量

按 GB5009.93 规定的方法测定。

A.4.2 硒代氨基酸（以 Se 计）占总硒质量百分比

按照 A.3 规定的方法测定总的硒代氨基酸含量（ $T_{Se-AA}$ ，以 Se 计），硒代氨基酸（以 Se 计）占总硒质量百分比( $\omega/\%$ )按公式（A.3）计算：

$$\text{硒代氨基酸（以 Se 计）占总硒质量百分比}(\omega/\%) = \frac{T_{Se-AA}}{\text{总硒含量}} \times 100 \dots\dots\dots (\text{A.3})$$

食品安全国家标准公开征求意见

## 附录 B

硒代氨基酸 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys 和 SeMet) 色谱图

B.1 硒代氨基酸标准品 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet) (60 ng/mL) HPLC-ICP/MS 色谱图见图 B.1。

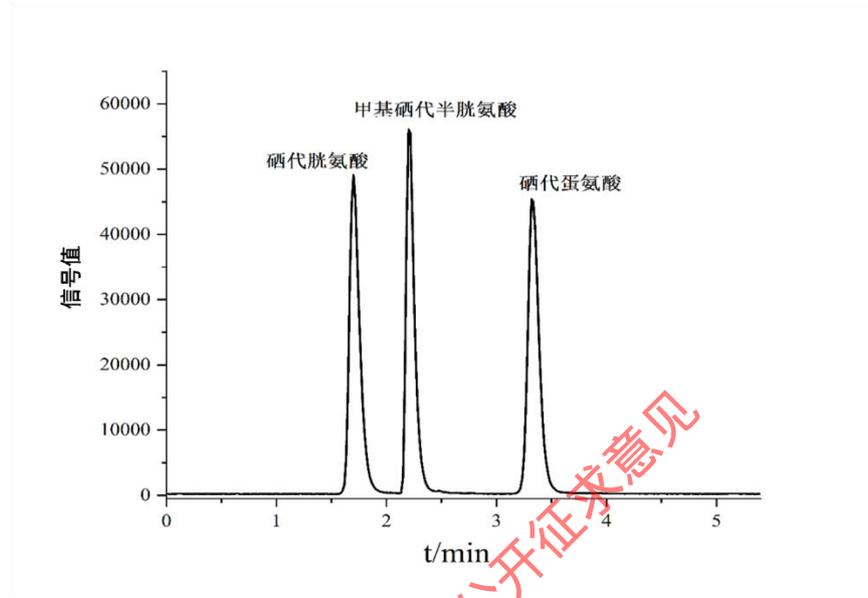


图 B.1 硒代氨基酸标准品 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet) (60 ng/mL) HPLC-ICP/MS 色谱图

B.2 硒代氨基酸标准品 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet) (200 ng/mL) HPLC-AFS 色谱图见图 B.2。

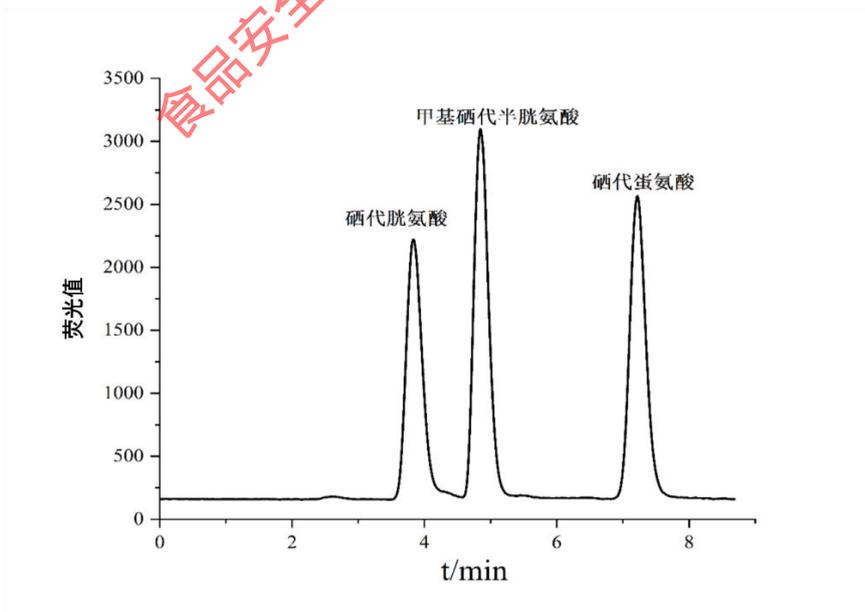


图 B.2 硒代氨基酸标准品 (SeCys<sub>2</sub>、MeSeCys、SeMet) (200ng/mL) HPLC-AFS 色谱图

食品安全国家标准公开征求意见