



# 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，原料中增加十字花科蔬菜，相应修订工艺描述；
- 修订了定义，修订为“硒蛋白是硒以天然植物来源硒代氨基酸的形式存在的蛋白质”；
- “硒代蛋氨酸”指标修订为“硒代氨基酸”；
- 增加了硒代氨基酸测定的“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

## 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（如莖叶碎米荠、油菜、西蓝花）等可食性植物为原料，经清洁、水提、分离、浓缩、干燥等工艺制得的富含硒代氨基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天然植物来源硒代氨基酸（硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸/硒代半胱氨酸、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	浅黄色至黄棕色	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	具有硒化合物特有的气味	

#### 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		附录 A
有机硒占总硒质量百分比, ω% ≥	70	80	GB5009.93 测定总硒含量, 附录 A 中方法测定硒代氨基酸(以 Se 计), 有机硒占总硒质量百分比为硒代氨基酸(以 Se 计)含量/总硒含量的百分比
蛋白质, ω% ≥	40		GB 5009.5 凯氏定氮法 <sup>a</sup>
水分/% ≤	5		GB 5009.3
灰分/% ≤	15	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
镉(以 Cd 计)/(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	限 量	检验方法
菌落总数/(CFU/g) ≤	3 000	GB 4789.2
大肠菌群/(MPN/g) ≤	3.0	GB4789.3 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/T 6682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 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）或高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪（HPLC-AFS）中，利用高效液相色谱分离，电感耦合等离子体质谱或原子荧光光谱检测，保留时间定性，外标法定量。

#### A.4 鉴别试验

在硒代氨基酸[硒代半胱氨酸(SeCys)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、硒代蛋氨酸(SeMet)]含量试验的色谱操作条件下，试样溶液与硒代氨基酸[硒代半胱氨酸(SeCys)、甲基硒代半胱氨酸(MeSeCys)、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%。硒代氨基酸标准溶液的参考色谱图见附录 B。

#### A.5 硒代氨基酸含量的测定

##### A.5.1 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法（HPLC-ICP/MS法）

###### A.5.1.1 试剂和材料

A.5.1.1.1 硒代半胱氨酸（ $C_3H_7NO_2Se$ ，CAS 号：10236-58-5）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.1.1.2 甲基-硒代半胱氨酸（ $C_4H_9NO_2Se$ ，CAS 号：26046-90-2）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.1.1.3 硒代蛋氨酸 ( $C_5H_{11}NO_2Se$ , CAS 号: 1464-42-2) 纯度 $\geq 98\%$ , 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.1.1.4 胰蛋白酶 (Trypsin)。

A.5.1.1.5 蛋白酶 K (Proteinase K)。

A.5.1.1.6 链霉菌蛋白酶 (Pronase XIV)。

A.5.1.1.7 磷酸氢二铵。

A.5.1.1.8 甲醇: 色谱纯。

A.5.1.1.9 甲酸: 色谱纯。

A.5.1.1.10 四丁基溴化铵。

A.5.1.1.11 三(羟甲基)氨基甲烷。

A.5.1.1.12 盐酸。

A.5.1.1.13 氩气(纯度 $>99.99\%$ )。

#### A.5.1.2 溶液的配制

A.5.1.2.1 30 mmol/L 磷酸氢二铵+0.5 mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇: 准确称取磷酸氢二铵 3.965 g, 四丁基溴化铵 0.161 g 于 1000 mL 容量瓶, 加入甲醇 30 mL, 用 10%甲酸精准调节 pH 值至 6.0。临用前, 超声脱气 10 min, 过 0.45  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜。

A.5.1.2.2 Tris 缓冲液 (0.1 mol/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.5.1.2.3 盐酸溶液 (1 mol/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.5.1.2.4 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.2): 取 50 mL Tris 缓冲液 (0.1 mol/L) 和 4.5 mL HCl (1 mol/L) 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

#### A.5.1.2.5 硒代氨基酸标准溶液的制备

A.5.1.2.5.1 硒代半胱氨酸标准储备溶液 (100 mg/L, 以 Se 计): 称取硒代半胱氨酸标准品 (95% 纯度) (A.5.1.1.1) 11.2 mg 于 50 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存, 有效期为 1 个月。

A.5.1.2.5.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备溶液（100 mg/L，以 Se 计）：称取甲基硒代半胱氨酸标准品（98%纯度）（A.5.1.1.2）11.8mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，于 4 °C 冷藏保存，有效期为 1 个月。

A.5.1.2.5.3 硒代蛋氨酸标准储备溶液（100 mg/L，以 Se 计）：称取硒代蛋氨酸标准品（98%纯度）（A.5.1.1.3）12.7 mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，于 4 °C 冷藏保存，有效期为 1 个月。

A.5.1.2.5.4 硒代氨基酸混合标准溶液（10.0 mg/L，以 Se 计）：分别取 10.0 mL 硒代氨基酸标准储备溶液（A.5.1.2.5.1、A.5.1.2.5.2、A.5.1.2.5.3）于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

A.5.1.2.5.5 硒代氨基酸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，硒代氨基酸混合标准溶液（A.5.1.2.5.4）于 100 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.5.1.3 仪器和设备

A.5.1.3.1 分析天平，感量0.1 mg和0.01 mg。

A.5.1.3.2 超声清洗器。

A.5.1.3.3 恒温水浴振荡仪。

A.5.1.3.4 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.5.1.3.5 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪（HPLC-ICP/MS）。

### A.5.1.4 分析步骤

#### A.5.1.4.1 试样的制备

A.5.1.4.1.1 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 50 mL 的塑料具塞离心管中，加入 30 mL Tris-HCl (pH7.2)（A.5.1.2.4），超声 5 min 后置于 37°C 恒温水浴振荡仪上，加入 5 mg 胰蛋白酶（A.5.2.4）、5 mg 蛋白酶 K（A.5.1.1.5）及 5 mg 链霉菌蛋白酶（A.5.1.1.6），在 37 °C 下振荡酶解（摇速为 100~120 r/min）共 1 h。酶解后以 4 000 r/min 离心 10 min；吸取上清液稀释至标准曲线范围浓度，用水定容，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.5.1.4.1.1）所述方法进行处理。

## A.5.1.4.2 测定

## A.5.1.4.2.1 液相色谱（HPLC）参考条件：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm×4.1 mm，10μm）和保护柱或同等性能的色谱柱；
- b) 柱温：20±5 °C；
- c) 流动相：30 mmol/L 磷酸氢二铵+0.5 mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇（A.5.1.2.1）；
- d) 流速：1 mL/min；
- e) 进样量：50 μL；

## A.5.1.4.2.2 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( <i>m/z</i> )	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.5.1.4.2.3 标准曲线的绘制按（A.5.1.4.2.1）和（A.5.1.4.2.2）所列测定条件，将标准工作溶液依次进样，测量硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积。以标准工作溶液中硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的浓度（ng/mL）为横坐标，以硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

按公式（A.1）计算回归参数：

$$y = ax + b \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

*y*——硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积；

*a*——回归曲线的斜率；

*x*——标准工作溶液中硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

*b*——回归曲线的截距。

## A.5.1.4.2.4 试样测定

将空白溶液（A.5.1.4.1.2）和试样溶液（A.5.1.4.1.1）依次进样，扣除空白值，获得硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积。

### A.5.5 结果计算

试样中硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）含量（以 Se 计），按式（A.2）计算：

$$X = \frac{(C_x - C_0) \times V \times f_i}{m \times 1000} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

$X$  —试样中硒的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$C_x$  —试样溶液中硒代氨基酸（SeCys、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、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）；

$f_i$  —提取液稀释倍数；

$m$  —试样质量，单位为克（g）；

1 000 —单位换算系数。

试样中硒代氨基酸( $T_{SeAA}$ ) 总量等于样品中 SeCys、MeSeCys 和 SeMet 含量（以 Se 计）之和，按公式（A.3）计算：

$$T_{SeAA} = X_1 + X_2 + X_3 \dots\dots\dots (A.3)$$

$T_{SeAA}$  —硒代氨基酸之和（以 Se 计），单位为毫克每千克（mg/kg）；

$X_1$  —试样中 SeCys 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）；

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.5.2 高效液相色谱-原子荧光光谱联用法（HPLC-AFS）

#### A.5.2.1 试剂和材料

A.5.2.1.1 硒代半胱氨酸（ $C_3H_7NO_2Se$ ，CAS 号：10236-58-5）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.2.1.2 甲基-硒代半胱氨酸（ $C_4H_9NO_2Se$ ，CAS 号：26046-90-2）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.2.1.3 硒代蛋氨酸 ( $C_5H_{11}NO_2Se$ , CAS 号: 1464-42-2) 纯度 $\geq 98\%$ , 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

A.5.2.1.4 胰蛋白酶 (Trypsin)。

A.5.2.1.5 蛋白酶 K (Proteinase K)。

A.5.2.1.6 链霉菌蛋白酶 (Pronase XIV)。

A.5.2.1.7 磷酸氢二铵。

A.5.2.1.8 甲醇: 色谱纯。

A.5.2.1.9 甲酸: 色谱纯。

A.5.2.1.10 四丁基溴化铵。

A.5.2.1.11 三(羟甲基) 氨基甲烷。

A.5.2.1.12 盐酸。

A.5.2.1.13 氢氧化钠。

A.5.2.1.14 硼氢化钾。

A.5.2.1.14 碘化钾。

A.5.2.1.15 氙气(纯度 $>99.99\%$ )。

#### A.5.2.2 溶液的配制

A.5.2.2.1 30 mmol/L 磷酸氢二铵+0.5 mmol/L 四丁基溴化铵+3%甲醇: 准确称取磷酸氢二铵 3.965 g, 四丁基溴化铵 0.161 g 于 1000 mL 容量瓶, 加入甲醇 30 mL, 用 10%甲酸精准调节 pH 至 6.0。临用前, 超声脱气 10 min, 过 0.45  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜。

A.5.2.2.2 Tris 缓冲液 (0.1 mol/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.5.2.2.3 盐酸溶液 (1 mol/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.5.2.2.4 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.2): 取 50 mL Tris 缓冲液 (0.1 mol/L) 和 4.5 mL HCl (1 mol/L) 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

A.5.2.2.5 氢氧化钠溶液 (5 g/L): 称取 5.0 g 氢氧化钠, 溶于 1000 mL 水中, 混匀。

A.5.2.2.6 硼氢化钾碱溶液 (15 g/L): 称取 15.0 g 硼氢化钾, 溶于氢氧化钠溶液 (5 g/L) 中, 混匀。现配现用。

A.5.2.2.7 碘化钾碱溶液（0.2 g/L）：称取 0.2 g 碘化钾，溶于氢氧化钠溶液（5 g/L）中，混匀。现配现用。

A.5.2.2.8 盐酸溶液（5%）：量取 50 mL 盐酸，缓慢加入 950 mL 水，混匀。

A.5.2.2.9 硒代氨基酸标准溶液的配制

A.5.2.2.9.1 硒代半胱氨酸标准储备溶液（100 mg/L，以 Se 计）：称取硒代半胱氨酸标准品（A.5.1.1.1）（95%纯度）11.2 mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，于 4 °C 冷藏保存，有效期为 1 个月。

A.5.2.2.9.2 甲基硒代半胱氨酸标准储备溶液（100 mg/L，以 Se 计）：称取甲基硒代半胱氨酸标准品（98%纯度）（A.5.1.1.2）11.8 mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，于 4 °C 冷藏保存，有效期为 1 个月。

A.5.2.2.9.3 硒代蛋氨酸标准储备溶液（100 mg/L，以 Se 计）：称取硒代蛋氨酸标准品（98%纯度）（A.5.1.1.3）12.7 mg 于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容，于 4 °C 冷藏保存，有效期为 1 个月。

A.5.2.2.9.4 硒代氨基酸混合标准溶液（10.0 mg/L，以 Se 计）：分别取 10.0 mL 硒代氨基酸标准储备溶液（A.5.1.2.5.1、A.5.1.2.5.2、A.5.1.2.5.3）于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

A.5.2.2.9.5 硒代氨基酸系列标准工作溶液的配制：分别取 0.50 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL，硒代氨基酸混合标准溶液（A.5.1.2.5.4）于 100 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：50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL。

A.5.2.3 仪器和设备

A.5.2.3.1 分析天平，感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

A.5.2.3.2 超声清洗器。

A.5.2.3.3 恒温水浴振荡仪。

A.5.2.3.4 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.5.2.3.5 高效液相色谱-原子荧光光谱联用仪（配备紫外在线消解装置）。

A.5.2.4 分析步骤

## A.5.2.4.1 试样的制备

同A.5.1.4.1。

## A.5.2.4.2 测定

## A.5.2.4.2.1 液相色谱（HPLC）参考条件

同 A.5.1.4.2.1。

## A.5.2.4.2.2 原子荧光光谱仪参考条件

还原剂：硼氢化钾碱溶液（15 g/L）。

氧化剂：碘化钾碱溶液（10 g/L）。

载流：盐酸溶液（5%）。

灯电流(主/辅)：80/40 mA。

负高压：300 V。

泵转速：60 r/min。

紫外消化：开。

载气/屏蔽气流速：900/300 mL/min。

## A.5.2.4.2.3 标准曲线的绘制

A.5.2.4.2.3 标准曲线的绘制按（A.5.2.4.2.1）和（A.5.2.4.2.2）所列测定条件，将标准工作溶液依次进样，测量硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积。以标准工作溶液中硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的浓度（ng/mL）为横坐标，以硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

按公式（A.4）计算回归参数：

$$y = ax + b \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

$y$ ——硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的峰面积；

$a$ ——回归曲线的斜率；

$x$ ——标准工作溶液中硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys和SeMet）的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$b$ ——回归曲线的截距。

## A.5.2.4.2.4 试样测定

同 A.5.1.4.2.4

### A.5.2.5 结果计算

同A.5.1.5

## 附录 B

### 硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）HPLC-ICP/MS 色谱图

B.1 硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）HPLC-ICP/MS 色谱图见图 B.1。

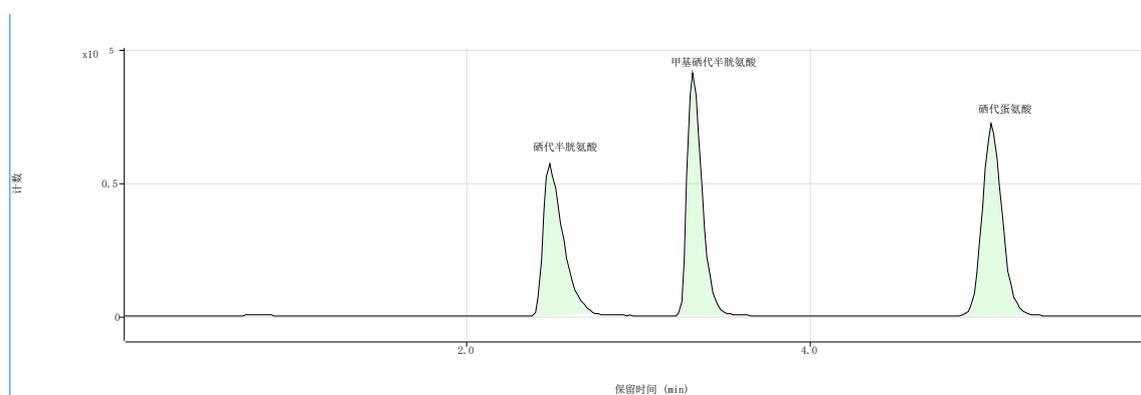


图 B.1 硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）标准品 HPLC-ICP/MS 色谱图

B.2 硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）HPLC-AFS 色谱图见图 B.2。

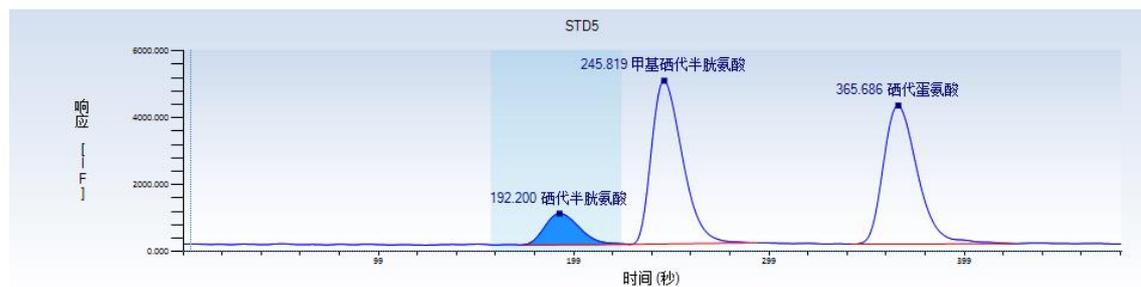


图 B.2 硒代氨基酸（SeCys、MeSeCys 和 SeMet）标准品 HPLC-AFS 色谱图