

《食品安全国家标准 食品中酵母β-葡聚糖的测定》

征求意见稿 编制说明

（一）工作简况，包括任务来源与项目编号、标准主要起草单位、协作单位、主要起草人

- 1、任务来源：国家卫生健康委员会食品安全标准与监测评估司
- 2、项目编号：spaq-2017-070
- 3、标准主要起草单位：中国食品发酵工业研究院、青岛海关检验检疫技术中心
- 4、标准主要起草人：陈楠楠、宫萍、元晓梅、吕宁、刘明、翟丽娜、高红波、崔明敏、李国辉、王晓龙、刘捷、武竹英、常迪、李斌

（二）与我国有关法律法规和其他标准的关系

根据原卫生部2010第9号公告酵母β-葡聚糖正式列入新资源食品目录；2014年批准作为食品营养强化剂，并规定除婴幼儿食品外，使用限量为250mg/d；GB14880中规定在较大婴幼儿乳品中允许用量为210-670mg/kg。目前的检测方法标准均针对酵母β-葡聚糖产品，均未涉及食品中添加酵母β-葡聚糖含量测定。本标准是限量标准和公告的配套检测方法。

表1. 我国有关法律法规

法规标准	产品类别	使用量
营养强化剂	婴儿配方粉、调制乳粉	210~670mg/kg
新资源食品	除婴幼儿食品外	250mg/d

（三）国外有关法律、法规和标准情况的说明

2011年11月24日，欧盟发布2011/762/EU号决定，批准酵母β-葡聚糖作为新型食品配料上市销售，欧盟委员会从膳食补充剂、特殊营养用途食品、饮料、饼干等方面分别对酵母β-葡聚糖的使用范围和使用量进行了限定。2009年，美国FDA批准酵母β-葡聚糖为GRAS食品原料，在奶及奶制品中使用限量为830 mg/kg。目前国际上FCC和AOAC均发布了酵母β-葡聚糖产品纯度的检测方法标准，但关于食品中酵母β-葡聚糖的检测方法标准仍属于缺失状态。

表2. 国际有关法律法规

法规标准	产品类别	使用量
欧盟EFSA	蛋白粉	6000 mg/kg
欧盟EFSA	酸奶产品、乳酪及其他乳基甜点	1600 mg/kg
美国GRAS	奶及奶制品	0.083%=830mg/kg

(四) 标准的制定与起草原则

建立与《GB 14880 食品安全国家标准 营养强化剂使用标准》中酵母 β -葡聚糖规定的食品中使用范围和限量相配套的补充检测方法标准。

(五) 确定各项技术内容的依据以及国内外检测方法情况

1、国内外检测方法情况

由于酵母 β -葡聚糖的结构特点，即主要由葡萄糖（98%以上）组成的均一多糖，所以目前国内外对于其检测仍以测定其水解产物葡萄糖为主，在经过系数的换算得出酵母 β -葡聚糖的含量。酵母 β -葡聚糖水解为葡萄糖主要采取酸解或酶解这两种方式；而葡萄糖的检测手段较多，主要有高效液相色谱法、离子色谱法、己糖激酶法、苯酚-硫酸法、刚果红法、葡萄糖氧化酶法等。

对于食品中酵母 β -葡聚糖含量的测定，目前国内外研究较少，国内无相关检测方法标准，文献方法主要集中在通过前处理将食品中酵母 β -葡聚糖富集，去除杂质后按照酵母 β -葡聚糖纯品方法进行分析测定。

表3. 国内外检测方法情况

文献	蛋白质处理方式	水解方法	检测手段
一种乳制品中酵母 β -葡聚糖的检测方法	乙酸锌和亚铁氰化钾	酸解	HPLC
酶解法检测牛奶中酵母 β -葡聚糖含量的方法	蛋白酶	酶解	分光光度计
一种乳或乳制品中酵母 β -葡聚糖的检测方法	蛋白酶	酸解	离子色谱
牛奶中酵母 β -葡聚糖的应用与测定	乙酸锌和亚铁氰化钾	酸解	HPLC

2、样品前处理条件的优化

对于乳制品中酵母 β -葡聚糖含量的测定，目前国内外研究较少，均无相关检测方法标准，文献方法主要集中在通过前处理将乳制品中酵母 β -葡聚糖富集，去除杂质后按照酵母 β -葡聚糖产品含量测定方法进行分析测定。其重点在于葡聚糖的提取与富集，以及减少基质中其他成分对于结果的干扰。由于酶法具有专一性强的特点，乳制品中含有的糖类（如乳糖，蔗糖等）和稳定剂不会影响葡聚糖的测定，但乳制品中的蛋白质和脂肪会干扰测定结果。综合所述，本方法采用蛋白酶和脂肪酶水解去除乳制品中的蛋白质和脂肪，再对富集后的酵母 β -葡聚糖进行酶解及测定。

2.1 主要影响因素的研究

采用蛋白酶将样品中大部分蛋白质进行水解（表 4）；采用脂肪酶将样品中大部分脂肪进行水解（表 4）。乳制品中乳糖含量较高，另外还有可能外源添加的葡萄糖、白砂糖、果糖、低聚果糖等可溶性糖，利用其可溶性本方法采用了水洗的方式有效去除了糖类的干扰（表 3）。由于添加的酵母 β -葡聚糖的不可溶性，添加时为了使产品整体稳定均一，在乳制品生产过程中可能会添加食品用稳定剂，如结冷胶、黄原胶和果胶等。经试验验证，由于酶解的专一性，以上稳定剂并不会对实验结果造成影响（表 4）。

表4. 蛋白质和脂肪的去除效果考察

未经蛋白酶处理	蛋白酶处理	未经脂肪酶处理(样品经蛋白酶处理后)	脂肪酶处理(样品经蛋白酶处理后)
---------	-------	--------------------	------------------

未经蛋白酶处理	蛋白酶处理	未经脂肪酶处理(样品经蛋白酶处理后)	脂肪酶处理(样品经蛋白酶处理后)
			
描述：底部蛋白质沉淀明显减少		描述：上层脂肪明显减少，下层沉淀明显增多	

表5. 糖类的去除效果考察

主要添加的糖类	处理步骤	上清液中葡萄糖, g/L
白砂糖 (酸奶)	按照4.3进行处理	未检出
低聚果糖 (奶粉)		未检出
葡萄糖 (奶粉)		未检出

表6. 稳定剂影响情况考察

主要添加的稳定剂	处理步骤	酶解液中葡萄糖含量, g/L
结冷胶0.4g	按照4.4和4.5处理	未检出
黄原胶0.4g		未检出
果胶0.4g		未检出

2.2 酶解葡聚糖的方法优化

2.2.1 对照品

由于乳制品中酵母 β -葡聚糖添加量较低(210 mg/kg-670mg/kg)，测定方法中取样量为10g，其中酵母 β -葡聚糖仅为2.1 mg-6.7 mg，前处理过程中产生的损失将会对最终结果造成较大的影响。参考其他同类标准，引入对照品以补偿及修正前处理过程中的损失。

表7. 对照品对于前处理损失的补偿

序号	基质	添加量, g/kg	未引入对照品的回收率, %	引入对照品的回收率, %
1	牛奶	0.24	85	105
2	牛奶	0.40	82	111
3	酸奶	0.24	68	92
4	酸奶	0.40	64	98
5	奶粉	0.24	72	107

6	奶粉	0.40	77	105
---	----	------	----	-----

2.2.2 酶的用量

FCC 中酶解葡聚糖的量为 15 mg-20 mg，本方法中富集后的葡聚糖多为 3 mg -8 mg，是 FCC 中的三分之一以下。称取 10 份 5 mg 葡聚糖样品（牛奶基质），分别按照 FCC 的酶用量和本方法的用量（表 8）进行实验，最终葡萄糖含量表明二者没有明显差别（表 9）。

表8. FCC方法和本标准酶的用量

	FCC用量	本标准用量
溶壁酶	600 μ L \times 10 U / μ L	500 μ L \times 5 U / μ L
(1,6)-葡聚糖酶	300 μ L \times 1 U /300 μ L	300 μ L \times 1 U /300 μ L
(1,3)-葡聚糖酶+ β -葡萄糖苷酶	390 μ L \times (20U/mL+4U/mL)	300 μ L \times (20U/mL+4U/mL)

表9. FCC方法和本标准测定结果对比

样品编号	FCC酶用量测定的葡萄糖含量, g/L	本标准酶用量测定的葡萄糖含量, g/L
1	0.22	0.21
2	0.24	0.23
3	0.22	0.23
4	0.25	0.26
5	0.27	0.22
平均值	0.24	0.23

2.3 方法的线性范围、检出限和定量限

2.3.1 校准曲线

校准曲线浓度范围的设置要有一个比较大的跨度，能够涵盖所要检测的大多数样品的浓度，即样品的浓度要在校准曲线浓度范围之内，包括上限和下限。

2.3.1.1 校准曲线线性范围上限

以 GB14880-2012 中酵母 β -葡聚糖允许使用量为 0.21g/kg-0.67g/kg 计算，当含量为 0.67 g/kg，取样量为 10 g，样品定容体积为 0.75 mL，酵母 β -葡聚糖纯度为 100%时，样品溶液中由酵母 β -葡聚糖水解为葡萄糖的浓度为 0.55 g/L。考虑到其他食品的使用情况，最终校准曲线的上限浓度定在 1.20 g/L 满足检验需要。

2.3.1.2 校准曲线线性范围下限

校准曲线一般以检出限的 3~10 倍为第一个点，本方法光度计的仪器定量限为 0.04 g/L，酵母 β -葡聚糖最低添加量为 210mg/kg，理论水解葡萄糖 0.19 g/L，因此本方法以 0.12 g/L 为校准曲线的第一个点。

2.3.1.3 校准曲线各点浓度设定

校准曲线具有 5 个点，各点浓度设定为：0.12 g/L、0.25 g/L、0.50 g/L、0.80 g/L，1.00 g/L。

2.3.1.4 结果分析

标准储备液的配制：精确称取 0.2 g 葡萄糖标准品（精确至 0.1mg）至 80 mL 烧杯中，加入适量水溶解后，转移至 100 mL 容量瓶中，水定容后，摇匀。分装后保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱，使用前恢复室温。

系列标准溶液的配制：移取适量标准储备液和水，充分混匀备用。

结论：结果表明，在 0.12g/L~1.00g/L 浓度范围葡萄糖的吸光度均呈线性关系，符合定量要求。相关系数达到 0.9995，线性方程 $y = 1.1406x + 0.0049$ 。

表10. 标准曲线

序号	葡萄糖储备液的体积, mL	水的体积, mL	葡萄糖浓度, g/L	吸光度
1	0.12	1.88	0.12	0.143
2	0.25	1.75	0.25	0.288
3	0.50	1.50	0.50	0.582
4	0.80	1.20	0.80	0.903
5	1.00	1.00	1.00	1.154
标准曲线		$y = 1.1406x + 0.0049$	相关系数	0.9995

2.3.2 方法的回收率和精密度

分别取牛奶、酸奶和奶粉空白样品，进行加标实验，按照标准文本中描述进行前处理，样品待测液按照标准中规定的方法分别进行测定，计算回收率、精密度，结果见下表。结果表明，在添加量为 224 mg/kg~600 mg/kg 之间时，回收率在 82%~113%之间，符合方法学要求。

表11. 方法回收率

样品		葡聚糖添加量（纯度以 100%计）mg/kg	计算葡聚糖含量 mg/kg	回收率%
牛奶	对照品	585	-	-
	葡聚糖	224	202.96	90.61
		248	238.78	96.28
		248	262.65	105.91
		544	585.00	107.54
		536	513.37	95.78
	488	453.67	92.97	
奶粉	对照品	624	-	-
	葡聚糖	304	256.29	84.30
		272	234.00	86.03
		488	434.57	89.05
		544	445.71	81.93
酸奶	对照品	647.4	-	-
	葡聚糖	280	307.52	109.83
		312	339.89	108.94
		504	534.11	105.97
		600	679.77	113.30

表12. 精密度

牛奶样品		酸奶样品		奶粉样品	
序号	葡聚糖含量 mg/kg	序号	葡聚糖含量 mg/kg	序号	葡聚糖含量 mg/kg
1	262	1	355	1	434
2	258	2	320	2	445

3	270	3	362	3	488
4	268	4	349	4	502
5	249	5	358	5	452
RSD%	3.22	RSD%	4.81	RSD%	6.30

2.3.3 方法的检出限、定量限

2.3.3.1 计算检出限和定量限

分光光度计法：对空白样测定 20 次，根据 AOAC 推荐公式 $A_L=A_b+KS_b$ ，计算仪器检出限和定量限分别为 0.009 g/L 和 0.025 g/L。进一步计算理论方法检出限和定量限为 14.0 mg/kg 和 39.0 mg/kg。

式中 A_L 是分析试样在检出限水平时测得的分析信号的平均值，即最小检测信号值； A_b 和 S_b 分别为在测定试样相同条件下，对空白试样进行足够多次（比如 20 次）测量所得的空白信号（噪声）的平均值和测定的标准偏差； K 是由置信水平决定的系数，IUPAC 推荐 $K=3$ ，在误差正态分布条件下，其置信度为 99.7%。 A_L 它所对应的被测元素的量或浓度即为最小检出量 Q_L 和最小检出浓度 C_L ，即为检出限， $K=10$ 为定量限。

表13. 分光光度计法的检出限与定量限 (g/L)

测试次数	吸光度	测试次数	吸光度
1	0.001	11	0.006
2	0.004	12	0.001
3	0.008	13	0.003
4	0.001	14	0.001
5	0.002	15	0.003
6	0.000	16	0.001
7	0.003	17	0.000
8	0.002	18	0.005
9	0.000	19	0.000
10	0.000	20	0.002
平均值	标准偏差	检出限	定量限
0.00215	0.002207	0.009	0.0249

2.3.3.2 定量限的验证

分别在奶粉空白样品中添加适量葡聚糖（纯度 85%），使其浓度分别达到 33 mg/kg、99 mg/kg、150 mg/kg、264 mg/kg、330mg/kg。结果表明，虽然理论定量限为 39.0mg/kg，但在实际添加实验中，添加量达到 150mg/kg 以上时，回收率才能获得良好结果。方法实际的定量限为 150 mg/kg，计算得出检出限为 50 mg/kg。

表14. 定量限验证

序号	添加量 mg/kg	测定结果 mg/kg	回收率%	评价
1	33	25	75.75	差
2	99	112	113.13	较差
3	150	145	96.67	良好
4	264	272	103.03	良好
5	330	351	106.36	良好

（六）实验室比对结果分析

2019年1月至2020年1月，组织进行了多次食品（牛奶、酸奶和奶粉）中酵母β-葡聚糖添加量测定的实验室比对工作。由于目前市场上暂无相关产品销售。组织方实验室制备了2种添加了酵母β-葡聚糖的牛奶、酸奶样品作为盲样分发至各实验室；对于奶粉样品，组织方委托相关奶粉企业根据特定工艺制备了一批添加了酵母β-葡聚糖的奶粉样品作为盲样分发至各实验室，各实验室严格按照标准方法对3种样品的含量进行测定。结果表明，各个样品的实验室内精密度为0.99~8.22%，结果良好；实验室间精密度为5.59~8.80%，结果良好。具体检测结果见表15。

表15. 乳制品中酵母β-葡聚糖含量测定各实验室结果

实验室编号	样品编号	测定结果1	测定结果2	测定结果3	实验室内RSD%	平均回收率%	实验室间RSD%
1	SCFF-NN 牛奶 480mg/kg	423	434	415	2.25	88.33	5.59
2		431	447	-	2.58	91.45	
3		468	474	482	1.48	98.89	
4		474	486	468	1.93	99.12	
1	SCFF-SN 酸奶 480mg/kg	396	445	445	6.60	89.30	5.70
2		421	380	448	8.22	86.74	
3		445	396	445	6.60	89.31	
4		430	424	-	0.99	88.96	
1	SCFF-NF 奶粉 230mg/kg	245	225	257	6.67	105.36	8.80
2		263	264	233	6.95	110.14	
3		290	283	-	1.73	124.56	