

## 附件

# 氨肽酶等 8 种食品添加剂新品种相关材料

## 一、拟征求意见的食品添加剂新品种名单

### (一) 食品工业用酶制剂新品种

序号	酶	来源	供体
1	氨肽酶 Aminopeptidase	李氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	棒曲霉 <i>Aspergillus clavatus</i>
2	木聚糖酶 Xylanase	李氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	轮枝镰刀菌 <i>Fusarium verticillioides</i>

食品工业用酶制剂的质量规格要求应符合《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》(GB 1886.174)的规定。

### (二) 食品营养强化剂新品种

1. 中文名称: 3-岩藻糖基乳糖

英文名称: 3-fucosyllactose, 3-FL

功能分类: 食品营养强化剂

### 用量及使用范围

食品分类号	食品名称	使用量	备注
01.03.02	调制乳粉(仅限儿童用乳粉)	0.25-1.75 g/L (以纯品计, 以即食状态计, 粉)	当与 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-新四糖、低聚半乳糖、低聚
13.01.01	婴儿配方食品		

食品分类号	食品名称	使用量	备注
13.01.02	较大婴儿和幼儿配方食品	状产品按冲调倍数折算使用量)	果糖、多聚果糖、棉子糖混合使用时,该类物质总量不超过64.5g/kg。
13.01.03	特殊医学用途婴儿配方食品		

## 质量规格要求

### 1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖等为原料,经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂 3-岩藻糖基乳糖。3-岩藻糖基乳糖的生产菌应经过安全性评估并符合附录 C 的要求。

### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

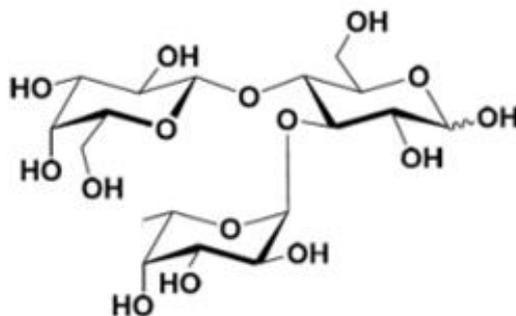
#### 2.1 化学名称

$\beta$ -D-吡喃半乳糖基 - (1 $\rightarrow$ 4) - [ $\alpha$ -L-吡喃岩藻糖基 - (1 $\rightarrow$ 3) ]-D-葡萄糖

#### 2.2 分子式



#### 2.3 结构式



## 2.4 相对分子质量

488.44（按 2022 年国际相对原子质量）

## 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	白色至类白色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘或烧杯中，在自然光线下，观察其色泽和状态。
状态	粉末	

### 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
3-岩藻糖基乳糖（以干基计），w/%	$\geq 90.0$	附录 A 中 A.2
D-乳糖，w/%	$\leq 3.0$	附录 A 中 A.3
L-岩藻糖，w/%	$\leq 3.0$	附录 A 中 A.3
D-半乳糖和 D-葡萄糖，w/%	$\leq 2.0$	附录 A 中 A.4
乙醇 <sup>a</sup> ，w/%	$< 0.5$	附录 A 中 A.5
水分，w/%	$\leq 9.0$	GB 5009.3 卡尔·费休法
灰分，w/%	$\leq 0.5$	GB 5009.4
残留蛋白/（mg/kg）	$\leq 100$	附录 A 中 A.6

内毒素/(EU/mg)	≤	10	附录 A 中 A.7
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	≤	0.2	GB 5009.11
铅(Pb)/(mg/kg)	≤	0.05	GB 5009.12
<sup>a</sup> 仅适用于以乙醇作为溶剂制得的 3-岩藻糖基乳糖产品。			

### 3.3 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项目		指标	检验方法
菌落总数/(CFU/g)	≤	500	GB 4789.2
肠杆菌科/(CFU/g)	<	10	GB 4789.41
沙门氏菌/(25 g)		不得检出	GB 4789.4

## 附录 A 检验方法

### A.1 一般规定

本质量规格要求所用的试剂和水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品，在未注明其他要求时，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.2 3-岩藻糖基乳糖（以干基计）的测定

#### A.2.1 高效液相色谱-示差折光检测器测定（方法一）

##### A.2.1.1 方法提要

3-岩藻糖基乳糖溶于水或溶剂，在氨基键合色谱柱的液相色谱条件下分离，示差折光检测器检测，用外标法定量。

##### A.2.1.2 试剂和材料

A.2.1.2.1 3-岩藻糖基乳糖对照品（CAS 41312-47-4）：纯度 $\geq$ 90%。

A.2.1.2.2 D-乳糖对照品（CAS 63-42-3）：纯度 $\geq$ 98%。

A.2.1.2.3 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.1.2.4 乙腈：色谱纯。

##### A.2.1.3 仪器和设备

A.2.1.3.1 高效液相色谱仪：配备示差折光检测器。

A.2.1.3.2 电子天平：感量为 0.00001 g。

A.2.1.3.3 超声波清洗机。

A.2.1.3.4 循环水式多用真空泵。

A.2.1.4 参考色谱条件

A.2.1.4.1 色谱柱：氨基键合色谱柱，150 mm × 4.6 mm，5 μm 或等效色谱柱。

A.2.1.4.2 流动相：乙腈:水=72:28 (v/v) (可根据实际仪器系统调整比例)。

A.2.1.4.3 柱温：25 °C。

A.2.1.4.4 示差折光检测器温度：37 °C。

A.2.1.4.5 流速：1 mL/min。

A.2.1.4.6 进样量：20 μL。

A.2.1.4.7 运行时间：15 min。

A.2.1.5 分析步骤

A.2.1.5.1 系列标准溶液的配制

分别准确称取三份适量的 3-岩藻糖基乳糖对照品，转移到合适的容量瓶中，加水溶解并用流动相稀释，得到系列标准溶液 1、2 和 3。根据对照品溶液纯度折算后 3-岩藻糖基乳糖的浓度分别为 4.0 mg/mL、5.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL。

A.2.1.5.2 系统适用性试验溶液的配制

称取 D-乳糖对照品 10 mg，置 10 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为 D-乳糖对照品储备液。称取试样 50 mg 置 10 mL 容量瓶中，加 D-乳糖对照品储备液 1 mL，加流动

相溶解并稀释至刻度，含 3-岩藻糖基乳糖和 D-乳糖分别为 5 mg/mL 和 0.1 mg/mL 混合溶液作为系统适用性试验溶液。

#### A.2.1.5.3 试样溶液配制

准确称取试样 50.0 mg~54.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用溶剂溶解并定容至刻度，摇匀。相同试样做三个平行实验。

#### A.2.1.5.4 系统适用性试验

当满足以下条件时，可进行试样溶液的测定：

——空白溶剂除溶剂峰外无其他色谱峰干扰。

——系统适用性溶液中 3-岩藻糖基乳糖与 D-乳糖的分离度应不小于 1.5。

——连续进样 3 次系列标准溶液，进样标准溶液 2 时，3-岩藻糖基乳糖峰信噪比应大于 50。

系统适用性试验参考色谱图谱见附录 B.1。

#### A.2.1.5.5 进样顺序

空白溶剂，系列标准溶液 1、2 和 3，试样溶液，系列标准溶液 1、2 和 3。前后测得系列标准溶液中相同浓度的对照品峰面积的相对偏差需小于 2.0%。如不满足偏差限度要求，需要复测。

#### A.2.1.5.6 3-岩藻糖基乳糖（以干基计）的测定

以系列标准溶液中 3-岩藻糖基乳糖的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标绘制过零点的线性标准曲线，依试样溶液的峰面积在标准曲线上确定其中 3-岩藻糖基乳糖的浓度。

3-岩藻糖基乳糖含量的质量分数 $\omega_1$ 按式（A.1）计算。

$$\omega_1 = \frac{C_1 \times V_1}{m_1} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$C_1$ ——由标准曲线得到的试样溶液中 3-岩藻糖基乳糖的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V_1$ ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_1$ ——试样的质量，单位为毫克（mg）。

3-岩藻糖基乳糖（以干基计）含量的质量分数 $\omega_2$ 按式（A.2）计算：

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{1 - \omega} \times 100\% \dots\dots\dots (A.2)$$

$\omega_1$ ——3-岩藻糖基乳糖含量的质量分数，%；

$\omega$ ——产品水分含量实测值，%。

## A.2.2 高效离子交换色谱-脉冲安培检测器测定（方法二）

### A.2.2.1 方法提要

3-岩藻糖基乳糖溶于水，采用高效离子交换色谱-脉冲安培检测器测定，用保留时间定性，外标法定量。

### A.2.2.2 试剂和材料

A.2.2.2.1 3-岩藻糖基乳糖对照品（CAS 41312-47-4）：纯度 $\geq 90.0\%$ 。

A.2.2.2.2 氢氧化钠溶液：50%（w/w）。

A.2.2.2.3 三水合乙酸钠：纯度 $\geq 99.0\%$ 。

### A.2.2.3 仪器和设备

A.2.2.3.1 高效离子交换色谱仪：配备脉冲安培检测器。

A.2.2.3.2 天平：感量为 0.0001 g。

### A.2.2.4 参考色谱条件

A.2.2.4.1 色谱柱：具有强聚合物阴离子交换树脂的糖离子交换柱：250 mm × 4 mm 或等效色谱柱；保护柱：具有强聚合物阴离子交换树脂的糖离子交换柱：50 mm × 4 mm 或等效色谱柱。

#### A.2.2.4.2 流动相

流动相 A（200 mM 氢氧化钠溶液）：量取 10.56 mL 50% 的氢氧化钠溶液，用水定容至 1 L。

流动相 B（200 mM 氢氧化钠溶液 + 300 mM 乙酸钠溶液）：称量 41 g 三水合乙酸钠，加入适量水溶解，然后量取 10.56 mL 50% 的氢氧化钠溶液，混合均匀，用水定容至 1 L。

流动相 C：水。

A.2.2.4.3 洗脱条件见下表。

表 A.1 洗脱条件

时间 (min)	流动相比例 (体积, %)		
	A	B	C
0 ~ 10	49.7	0.3	50
10 ~ 20	25	25	50
20 ~ 36	49.7	0.3	50

A.2.2.4.4 柱温：20 °C。

A.2.2.4.5 检测器温度：35 ℃。

A.2.2.4.6 流速：1.0 mL/min。

A.2.2.4.7 进样量：10 μL。

A.2.2.4.8 运行时间：36 min。

A.2.2.4.9 检测电位： $E_1 = +0.10 \text{ V}$ ， $t_1 = 400 \text{ ms}$ ， $t_s = 200 \text{ ms}$ ； $E_2 = -2.00 \text{ V}$ ， $t_2 = 20 \text{ ms}$ ； $E_3 = +0.60 \text{ V}$ ， $t_3 = 10 \text{ ms}$ ； $E_4 = -0.10 \text{ V}$ ， $t_4 = 70 \text{ ms}$ 。量程：50 μA。

注： $E_n$  为电压， $t_n$  为步长的持续时间， $t_s$  为步长 1 结束时样品的测量间隔。

#### A.2.2.5 分析步骤

##### A.2.2.5.1 标准储备溶液的配制

准确称取适量的 3-岩藻糖基乳糖对照品，转移到合适的容量瓶中，用水溶解，配制成浓度约为 1000 μg/mL 的 3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液。

##### A.2.2.5.2 标准工作溶液的配制

按照表 A.2 移取不同体积的 3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液，用水定容至 10 mL，制成系列标准工作溶液。

表 A.2 3-岩藻糖基乳糖标准工作溶液

标准工作溶液编号	3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液移取体积 (mL)	定容体积 (mL)	标准工作溶液的浓度 (μg/mL)
----------	-------------------------	-----------	-------------------

1	3.0	10	300
2	3.5	10	350
3*	4.0	10	400
4	4.5	10	450
5	5.0	10	500

\*标准工作溶液3需进行额外处理。除了4.0 mL 3-岩藻糖基乳糖标准储备溶液外，额外添加1.0 mL 20 µg/mL D-乳糖储备溶液和1.0 mL 20 µg/mL L-岩藻糖储备溶液后，定容。

#### A.2.2.5.3 试样溶液的配制

精确称取 850 mg(精确到 0.1 mg)试样到 2 L 的容量瓶中，加水至约容量瓶刻度线 2 cm 以下，振荡溶解，然后用水定容，配制成浓度约为 425 µg/mL 的试样溶液。每份试样做三个平行试验。

#### A.2.2.5.4 测定

以水为空白样，进样至少两次以平衡色谱柱。

按照低浓度到高浓度的顺序测量标准工作溶液，然后测量试样溶液。之后，再次测量标准工作溶液。

参考色谱图见附录 B.2。

#### A.2.2.5.5 3-岩藻糖基乳糖（以干基计）含量计算

3-岩藻糖基乳糖含量以外标法定量（以进样前后分别进样一组标准溶液来校准）。以系列标准溶液中 3-岩藻糖基乳糖的浓度为横坐标，以进样前和进样后测量的相应标准溶液水平的平均峰面积为纵坐标绘制线性标准曲线，依试样溶液的峰面积在标准曲线上确定其中 3-岩藻糖基乳糖的浓度。

3-岩藻糖基乳糖含量的质量分数 $\omega_3$ 按式（A.3）计算。

$$\omega_3 = \frac{C_2 \times V_2}{m_2} \times 100\% \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$C_2$ ——由标准曲线得到的试样溶液中 3-岩藻糖基乳糖的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V_2$ ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_2$ ——试样的质量，单位为毫克（mg）。

三次进样测定结果的相对标准偏差不超过 2%，结果取算术平均值。

3-岩藻糖基乳糖（以干基计）含量的质量分数 $\omega_4$ 按式（A.4）计算：

$$\omega_4 = \frac{\omega_3}{1 - \omega} \times 100\% \dots\dots\dots (A.4)$$

$\omega_3$ ——3-岩藻糖基乳糖含量的质量分数，%；

$\omega$ ——产品水分含量实测值，%。

结果保留小数点后一位。

### A.3 D-乳糖和 L-岩藻糖的测定

#### A.3.1 高效液相色谱-示差折光检测器测定（方法一）

##### A.3.1.1 方法提要

3-岩藻糖基乳糖样品溶于水或溶剂，在氨基键合色谱柱的液相色谱条件下分离，使用示差折光检测器检测，以 D-乳糖，L-岩藻糖对照品的保留时间定性，面积归一化法定量。

### A.3.1.2 试剂和材料

A.3.1.2.1 D-乳糖对照品 (CAS 63-42-3): 纯度 $\geq$ 98%。

A.3.1.2.2 L-岩藻糖对照品 (CAS 2438-80-4): 纯度 $\geq$ 95%。

A.3.1.2.3 D-葡萄糖对照品 (CAS 50-99-7): 纯度 $\geq$ 98%

A.3.1.2.4 D-半乳糖对照品 (CAS 59-23-4): 纯度 $\geq$ 98%。

A.3.1.2.5 水: GB/T 6682 规定的一级水。

A.3.1.2.6 乙腈: 色谱纯。

### A.3.1.3 仪器和设备

A.3.1.3.1 高效液相色谱仪: 配备示差折光检测器。

A.3.1.3.2 电子天平: 感量为 0.0001 和 0.00001 g。

A.3.1.3.3 超声波清洗机。

A.3.1.3.4 循环水式多用真空泵。

### A.3.1.4 参考色谱条件

A.3.1.4.1 色谱柱: 氨基键合色谱柱, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.3.1.4.2 流动相: 乙腈:水=80:20 (v/v) (可根据实际仪器系统调整比例)。

A.3.1.4.3 柱温: 25  $^{\circ}$ C。

A.3.1.4.4 示差折光检测器温度: 37  $^{\circ}$ C。

A.3.1.4.5 流速: 1 mL/min。

A.3.1.4.6 进样量: 5  $\mu$ L。

A.3.1.4.7 运行时间: 30 min。

### A.3.1.5 分析步骤

#### A.3.1.5.1 系统适用性试验溶液的配制

分别称取 D-乳糖、L-岩藻糖、D-半乳糖、D-葡萄糖对照品和试样各约 10 mg、10 mg、5 mg、5mg 和 500 mg，置于同一 10 mL 容量瓶中，加适量水溶解后用流动相定容并稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性试验溶液。

#### A.3.1.5.2 系统适用性试验

连续进样至少 3 次相同的标准溶液，进行系统适用性测试。当满足以下条件时，可进行试样溶液的测定：

——D-乳糖、L-岩藻糖与相邻其他成分的分离度应不小于 1.5；

——化合物保留时间和响应值重复性的相对偏差均应小于 2.0% (n=3)。

系统适用性试验溶液的参考色谱图谱见附录 B.3。

#### A.3.1.5.3 试样溶液的配制

精确称取样品适量（精确至 1 mg），加入 20 mL 容量瓶中，加适量水溶解后用流动相稀释至刻度制成 50 mg/mL 的溶液，摇匀，过滤，作为试样溶液。

#### A.3.1.5.4 进样顺序

空白溶剂 1 次，系统适用性试验溶液连续进样 3 次，试样溶液 1 次。

#### A.3.1.5.5 D-乳糖和 L-岩藻糖含量的测定

试样溶液中 D-乳糖及 L-岩藻糖含量以面积归一法定量。  
D-乳糖及 L-岩藻糖含量的质量分数 $\omega_5$ 按式(A.5)计算。

$$\omega_5 = \frac{A_1}{S_1} \times 100\% \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

$A_1$ ——试样溶液中 D-乳糖或 L-岩藻糖的峰面积;

$S_1$ ——试样溶液中除溶剂峰之外的所有峰面积的总和。

测定结果保留小数点后一位。该方法的检出限约为  
0.1%。

### A.3.2 高效离子交换色谱-脉冲安培检测器测定(方法二)

#### A.3.2.1 方法提要

3-岩藻糖基乳糖溶于水,采用高效离子交换色谱-脉冲安培检测器测定,以 D-乳糖和 L-岩藻糖对照品的保留时间定性,面积归一化法定量。

#### A.3.2.2 试剂和材料

A.3.2.2.1 D-乳糖对照品(CAS 63-42-3): 纯度 $\geq 98.0\%$ 。

A.3.2.2.2 L-岩藻糖对照品(CAS 2438-80-4): 纯度 $\geq 95.0\%$ 。

#### A.3.2.3 仪器和设备

同 A.2.2.3。

#### A.3.2.4 参考色谱条件

同 A.2.2.4。

#### A.3.2.5 分析步骤

#### A.3.2.5.1 D-乳糖和 L-岩藻糖标准储备溶液的配制

分别称取一定量的 D-乳糖对照品和 L-岩藻糖对照品到适宜的容量瓶中，用水溶解，分别配制成浓度约为 20 μg/mL 的标准储备溶液。

分别取标准储备溶液 1 mL 加入至 3-岩藻糖基乳糖标准工作溶液 3 中，用水定容至 10 mL（同 A.2.2.5.2）。

#### A.3.2.5.2 试样溶液配制

同 A.2.2.5.3。

#### A.3.2.5.3 测定

同 A.2.2.5.4。

对照溶液（标准工作溶液 3）测定两次（一次在进样前，一次在进样后），以确定相应的副产物。

参考色谱图见附录 B.2。

#### A.3.2.5.4 D-乳糖和 L-岩藻糖含量测定

D-乳糖和 L-岩藻糖含量以面积归一化法定量。

D-乳糖及 L-岩藻糖含量的质量分数 $\omega_6$ 按式（A.6）计算。

$$\omega_6 = \frac{A_2}{S_2} \times 100\% \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

$A_2$ ——试样溶液中 D-乳糖或 L-岩藻糖的峰面积；

$S_2$ ——试样溶液中除溶剂峰之外的所有成分峰面积的总和。

除非相对峰面积结果小于 0.5%，否则三次进样测定结果的相对标准偏差应不超过 3%。如果相对峰面积结果小于 0.5%，结果表示为“相对峰面积 < 0.5%”。结果取算术平均值，保留小数点后一位。

#### A.4 D-半乳糖和 D-葡萄糖的测定

3-岩藻糖基乳糖溶于水或溶剂，在氨基键合色谱柱的液相色谱条件下分离，使用示差折光检测器检测，以 D-半乳糖和 D-葡萄糖对照品的保留时间定性，面积归一化法定量。

##### A.4.1 试剂和材料

同 A.3.1.2。

##### A.4.2 仪器和设备

同 A.3.1.3。

##### A.4.3 参考色谱条件

同 A.3.1.4。

##### A.4.4 分析步骤

###### A.4.4.1 系统适用性试验溶液的配制

同 A.3.1.5.1。

###### A.4.4.2 系统适用性试验

同 A.3.1.5.2。

系统适用性试验的参考色谱图谱见附录 B.3。

###### A.4.4.3 试样溶液的配制

同 A.3.1.5.3。

#### A.4.4.4 进样顺序

同 A.3.1.5.4。

#### A.4.4.5 D-半乳糖和 D-葡萄糖含量测定

试样溶液中 D-半乳糖和 D-葡萄糖含量以面积归一法定量。

D-半乳糖和 D-葡萄糖含量的质量分数 $\omega_7$ 按式 (A.7) 计算。

$$\omega_7 = \frac{A_3}{S_3} \times 100\% \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

$A_3$ ——试样溶液中 D-半乳糖或 D-葡萄糖的峰面积；

$S_3$ ——试样溶液中除溶剂峰之外的所有峰面积的总和。

测定结果保留小数点后一位。该方法的检出限约为 0.1%。

### A.5 乙醇残留的测定

#### A.5.1 方法提要

试样溶于适当的溶剂，顶空进样气相色谱氢火焰离子检测器分析，外标法定量。

#### A.5.2 试剂和材料

A.5.2.1 无水乙醇：色谱级，含量 $\geq 99.8\%$ 。

A.5.2.2 水：GB/T 6682 规定的一级水。

#### A.5.3 仪器和设备

A.5.3.1 气相色谱仪：配备氢火焰离子检测器。

A.5.3.2 电子天平：精度为 0.0001 g。

A.5.3.3 顶空进样器。

A.5.4 参考色谱条件

A.5.4.1 顶空条件

A.5.4.1.1 顶空瓶温度：80 °C。

A.5.4.1.2 定量环温度：90 °C。

A.5.4.1.3 传输线温度：100 °C。

A.5.4.1.4 顶空瓶平衡时间：30 min。

A.5.4.1.5 气相循环时间：22.8 min。

A.5.4.2 色谱条件

A.5.4.2.1 色谱柱：TG-Wax MS 毛细管柱 30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm 或等效柱。

A.5.4.2.2 载气：氮气。

A.5.4.2.3 流量：1 mL/min。

A.5.4.2.4 程序升温条件：初始温度 60 °C，维持 5 min，以 50 °C/min 升至 200 °C，维持 15 min。

A.5.4.2.5 进样口温度：200 °C。

A.5.4.2.6 检测器温度：250 °C。

A.5.4.2.7 分流比：5:1。

A.5.4.2.8 进样量：1 mL。

A.5.5 分析步骤

A.5.5.1 对照品溶液的配制

取无水乙醇 1000 mg 于 100 mL 容量瓶中，加水稀释制成每 1 mL 中含乙醇 10 mg 的溶液，精密量取 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，加水稀释制成每 1 mL 中含乙醇 1 mg 的溶液，精密量取 5 mL，置 20 mL 容量瓶中，加水稀释制成每 1 mL 中含乙醇 0.25 mg 的溶液，精密量取 2 mL 置 20 mL 顶空瓶中，密封，作为对照品溶液。

#### A.5.5.2 试样溶液

取试样约 100 mg 于 20 mL 顶空瓶中，加水 2 mL，密封，室温下轻轻振摇使样品溶解，作为试样溶液。

#### A.5.5.3 测定

以水作为空白溶液，按照空白溶液 1 次，对照品溶液 5 次，试样溶液顺序分别顶空进样测定，记录色谱图，按外标法以峰面积计算。

#### A.5.5.4 结果计算

乙醇含量的质量分数 $\omega_8$ 按式 (A.8) 计算：

$$\omega_8 = \frac{A_4}{A_5} \times \frac{m_3 \times x}{100 \times f_1} \times \frac{2}{m_4} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

$A_4$ ——试样溶液中乙醇的峰面积；

$A_5$ ——对照品溶液乙醇峰面积的平均值；

$m_3$ ——乙醇对照品的称样量，单位为毫克 (mg)；

$x$ ——乙醇对照品的百分含量，%；

$f_1$ ——对照品的稀释倍数；

$m_4$ ——试样的称样量，单位为毫克（mg）；

2——移取的溶液体积，单位为毫升（mL）。

乙醇对照品的参考色谱图谱见附录 B.5。

## A.6 残留蛋白含量的测定

### A.6.1 方法提要

考马斯亮蓝染色试剂与蛋白质反应，在 595 nm 波长下检测吸光度用于蛋白质测定。为了防止样品基质对显色反应的干扰，样品溶液与不同浓度的牛血清白蛋白标准溶液混合后显色，绘制二次标准曲线，计算样品蛋白质含量。

### A.6.2 试剂和材料

A.6.2.1 牛血清白蛋白对照品：纯度  $\geq 99\%$  或标明含量的等同物。

A.6.2.2 考马斯亮蓝试剂：市售，适用于 0.1 mg/mL~1.4 mg/mL 蛋白含量的测定。

### A.6.3 仪器和设备

A.6.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.6.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

### A.6.4 分析步骤

#### A.6.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg 牛血清蛋白溶液对照品于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.6.4.2 牛血清白蛋白标准溶液的制备

取 100  $\mu\text{L}$  上述储备溶液于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.6.4.3 试样溶液的制备

称取 200 mg 样品于 5 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.6.4.4 测定

按表 A.3 直接在比色皿中依次加入试样溶液、水、牛血清白蛋白标准溶液和考马斯亮蓝试剂，混匀，室温下静置 10 min。然后以水为参比，在 595 nm 波长下依次测定混合溶液的吸光度。

表 A.3 测试试样溶液的制备

溶液	蛋白浓度 (mg/L)	试样溶液 ( $\mu\text{L}$ )	水( $\mu\text{L}$ )	牛血清 白蛋白 标准溶 液 ( $\mu\text{L}$ )	考马斯亮 蓝试剂 ( $\mu\text{L}$ )
空白溶液 1	0	0	800	0	200
空白溶液 2	0	0	800	0	200
混合溶液 0	0	600	200	0	200
混合溶液 1	1	600	150	50	200
混合溶液 2	2	600	100	100	200
混合溶液 3	4	600	0	200	200

#### A.6.4.5 结果计算

以混合溶液的吸光度分别减去空白溶液的吸光度得到

校正吸光度。以校正吸光度为纵坐标，以牛血清蛋白标准溶液的浓度为横坐标，绘制通过横坐标左半轴交点的二次标准曲线。标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值的绝对值即为试样中蛋白的浓度。标准曲线的示意图见图 A.1:

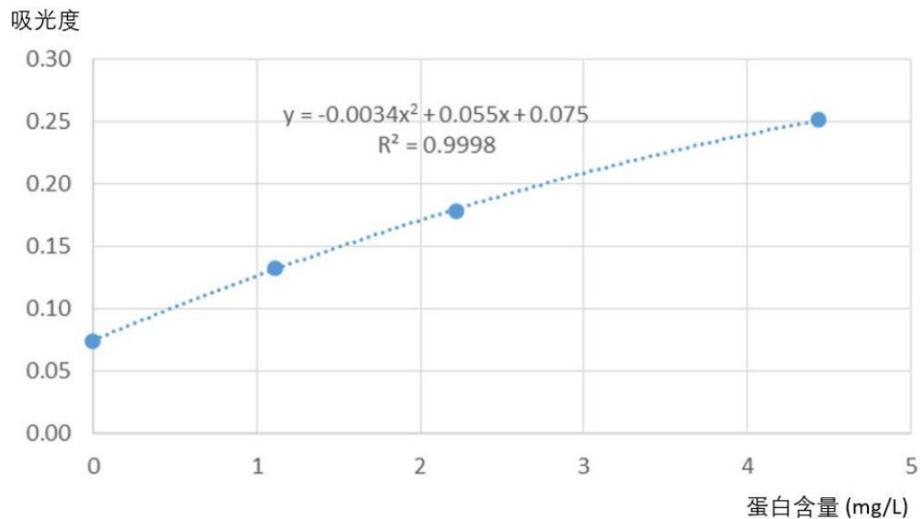


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量 $\omega_9$ 按式 (A.9) 计算，单位为 mg/kg。

$$\omega_9 = \frac{-1 \times C_3 \times V_3}{0.6 \times m_5} \times f_2 \times 1000 \dots\dots\dots (A.9)$$

式中:

$C_3$ ——标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值，数值为负值，单位为毫克每升 (mg/L);

$-1 \times C_3$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度，单位为毫克每升 (mg/L);

$V_3$ ——试样溶液的定容体积，单位为毫升 (mL);

$f_2$ ——稀释因子;

$m_5$ ——试样的质量，单位毫克 (mg);

0.6——1 mL 混合溶液中试样溶液的体积为 0.6 mL;

1000——单位转换系数。

该方法的定量限为 17 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 <17 mg/kg。结果保留整数位。

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值 20%。

## A.7 内毒素的测定（凝胶法）

### A.7.1 一般规定

本测定所用的水应符合细菌内毒素检查用水，试验所用器皿需经处理，以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法（250 °C、至少 30 min）去除，也可采用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。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.7.2 方法提要

利用鲎试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素，以判断试样中细菌内毒素的限量是否符合规定。鲎试剂是从鲎的血液中提取出的冻干试剂，可以与细菌内毒素发生凝集反应，通过凝胶法进行限度检测或半定量检测内毒素。

### A.7.3 试剂和材料

A.7.3.1 细菌内毒素标准品。

A.7.3.2 鲎试剂：带有灵敏度标示值 $\lambda$ 。

A.7.3.3 细菌内毒素检查用水：内毒素含量 $<0.015$  EU/mL。

A.7.4 仪器和设备

A.7.4.1 旋涡混合器。

A.7.4.2 恒温水浴箱。

A.7.5 分析步骤

A.7.5.1 试样溶液配制

样品加细菌内毒素检查用水溶解。必要时，可调节被测溶液（或其稀释液）的 pH 值，一般试样溶液和鲎试剂混合后溶液的 pH 值在 6.0 ~ 8.0 的范围内为宜，可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查用水在已去除内毒素的容器中配制。所用溶剂、酸碱溶液及缓冲液应不含内毒素和干扰因子。

A.7.5.2 鲎试剂灵敏度复核试验

在本检查法规定的条件下，使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度，用 EU/mL 表示。当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。

根据鲎试剂灵敏度的标示值（ $\lambda$ ），将细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解，在旋涡混合器上混匀 15 min 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作，然后

制成  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$ 和  $0.25\lambda$ 四个浓度的内毒素标准溶液，每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作。取不同浓度的内毒素标准溶液，分别与等体积的鲎试剂溶液混合，每一个内毒素浓度平行做 4 管；另外取 2 管加入等体积的细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴锅中，保温  $60\text{ min} \pm 2\text{ min}$ 。

将试管从恒温水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转  $180^{\circ}$ ，若管内形成凝胶，并且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性；未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。保温和拿取试管过程应避免受到振动，造成假阴性结果。

当最大浓度  $2\lambda$ 管均为阳性，最低浓度  $0.25\lambda$ 管均为阴性，阴性对照管为阴性，试验方为有效。

反应终点浓度的几何平均值，即为鲎试剂灵敏度的测定值 ( $\lambda_c$ ) 按式 (A.10) 计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilg}\Sigma X/n \dots\dots\dots (\text{A.10})$$

式中：

$X$ ——为反应终点浓度的对数值 ( $\lg$ )，反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度；

$n$ ——为每个浓度的平行管数。

当  $\lambda_c$  在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$  (包括  $0.5\lambda$ 和  $2\lambda$ ) 时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度  $\lambda$  为该批鲎试剂的灵敏度。

### A.7.5.3 干扰试验

按表 A.4 制备溶液 A、B、C 和 D，使用的试样溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的溶液，按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。最大有效稀释倍数 (MVD) 是指在试验中试样溶液被允许达到稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测，MVD 按式 (A.11) 计算：

$$MVD = cL/\lambda \dots\dots\dots (A.11)$$

式中：

$c$ ——为试样溶液的浓度，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；  
如需计算在 MVD 时的试样浓度，即最小有效稀释浓度，可使用公式  $c=\lambda/L$ ；

$L$ ——为试样的细胞内毒素限值，单位为内毒素单位每毫克 (EU/mg)；

$\lambda$ ——鲎试剂的标示灵敏度，单位为内毒素蛋白每毫升 (EU/mL)。

表 A.4 凝胶法干扰试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/ 被加入内毒 素的溶液	稀释用液	稀释倍 数	所含内毒 素的浓度	平行管 数
A	无/试样溶液	—	—	—	2
B	2λ/试样溶液	试样溶液	1	2λ	4
			2	λ	4

			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/内毒素检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/内毒素检查用水	—	—	—	2

注：A 为试样溶液；B 为干扰试验系列；C 为鲎试剂标示灵敏度的对照系列；D 为阴性对照。

只有当溶液 A 和阴性对照溶液 D 的所有平行管都为阴性，并且系列溶液 C 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时，试验有效。当系列溶液 B 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时，认为试样在该浓度下无干扰作用。其他情况则认为试样在该浓度下存在干扰作用。若试样溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰，应将试样溶液进行不超过 MVD 的进一步稀释，再次重复干扰试验。

可通过对试样进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法（如过滤、中和、透析或加热处理等）排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性，要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的试样溶液进行干扰试验。

当进行样品的内毒素检查试验前，须进行干扰试验。当

噬试剂、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，须重新进行干扰试验。

#### A.7.5.4 测定

##### A.7.5.4.1 凝胶限度试验

按表 A.5 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超过 MVD 并且已经排除干扰的试样溶液来制备溶液 A 和 B。按噬试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.5 凝胶限度试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	平行管数
A	无/试样溶液	2
B	2λ/试样溶液	2
C	2λ/内毒素检查用水	2
D	无/内毒素检查用水	2

注：A 为试样溶液；B 为试样阳性对照；C 为阳性对照；D 为阴性对照。

保温 60 min ± 2 min 后观察结果。若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，试样阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，阳性对照溶液 C 的平行管均为阳性，试验有效。

若溶液 A 的两个平行管均为阴性，判定试样符合规定。若溶液 A 的两个平行管均为阳性，判定试样不符合规定。若溶液 A 的两个平行管中的一管为阳性，另一管为阴性，需进行复试。复试时溶液 A 需做 4 支平行管，若所有平行管均为阴性，判定试样符合规定，否则判定试样不符合规定。

若试样的稀释倍数小于 MVD 而溶液 A 结果出现不符合规定时，可将试样稀释至 MVD 重新实验，再对结果进行判断。

#### A.7.5.4.2 凝胶半定量试验

通过确定反应终点浓度来量化试样中内毒素的含量。按表 A.6 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.6 凝胶半定量试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/ 被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/试样溶液	检查用水	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ/试样溶液	—	1	2λ	2
C	2λ/内毒素检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/内毒素检查用水	—	—	—	2

注：A 为不超过 MVD 并且通过干扰试验的试样溶液。从通过干扰试验的稀释倍数开始用内毒素检查用水稀释如 1 倍、2 倍、4 倍和 8 倍，最后的稀释倍数不得超过 MVD；B 为含  $2\lambda$  溶度内毒素标准品的溶液 A（试样阳性对照）；C 为鲎试剂标示灵敏度对照系列；D 为阴性对照。

若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，试样阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，系列溶液 C 的反应终点浓度的几何平均值在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$ ，试验有效。

#### A.7.5.5 结果判定

系列溶液 A 中每一系列平行管的终点稀释倍数乘以  $\lambda$ ，为每个系列的反应终点浓度。如果检验的是经稀释的试样，则将终点浓度乘以试样进行半定量试验的初始稀释倍数，即得到每一系列内毒素浓度  $c$ 。

若每一系列内毒素浓度均小于规定的限值，判定试样符合规定。每一系列内毒素浓度的几何平均值即为试样溶液的内毒素浓度[按公式  $c_E = \text{antilg}(\sum \lg c / 2)$ ]。若试验中试样溶液的所有平行管均为阴性，应记为内毒素浓度小于  $\lambda$ （如果检验的是稀释过的试样，则记为小于  $\lambda$  乘以试样进行半定量试验的初始稀释倍数）。

若任何系列内毒素浓度不小于规定的限值时，则判定试样不符合规定。当试样溶液的所有平行管均为阳性，可记为内毒素的浓度大于或等于最大的稀释倍数乘以  $\lambda$ 。

附录 B 3-岩藻糖基乳糖、D-乳糖、L-岩藻糖、D-半乳糖和  
D-葡萄糖、乙醇的参考色谱图

B.1 高效液相色谱法测定 3-岩藻糖基乳糖系统适用性参考色  
谱图

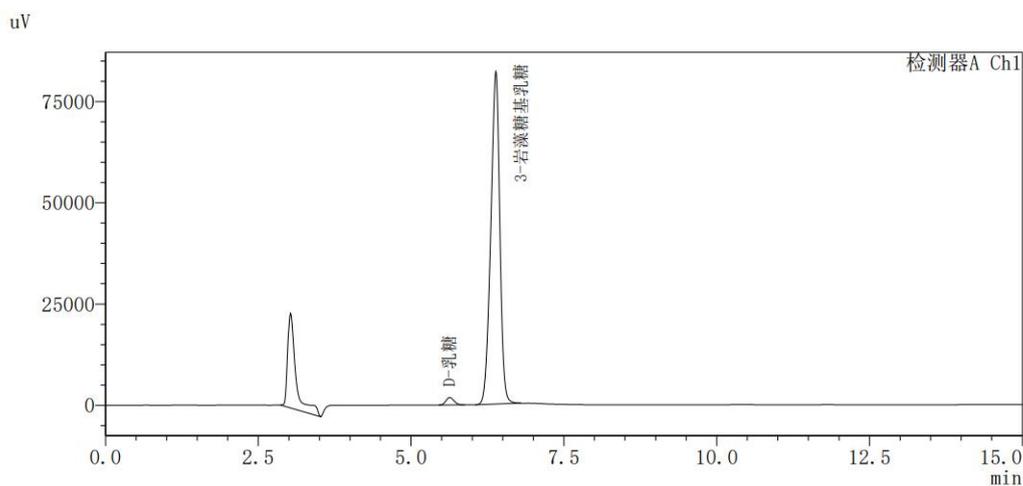


图 B.1 高效液相色谱法测定 3-岩藻糖基乳糖系统适用  
性试验参考色谱图

表 B.1 高效液相色谱法测定 3-岩藻糖基乳糖色谱条件  
下各物质的保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-乳糖	5.7
3-岩藻糖基乳糖	6.3

## B.2 高效离子色谱法测定 3-岩藻糖基乳糖、D-乳糖和 L-岩藻糖的参考色谱图

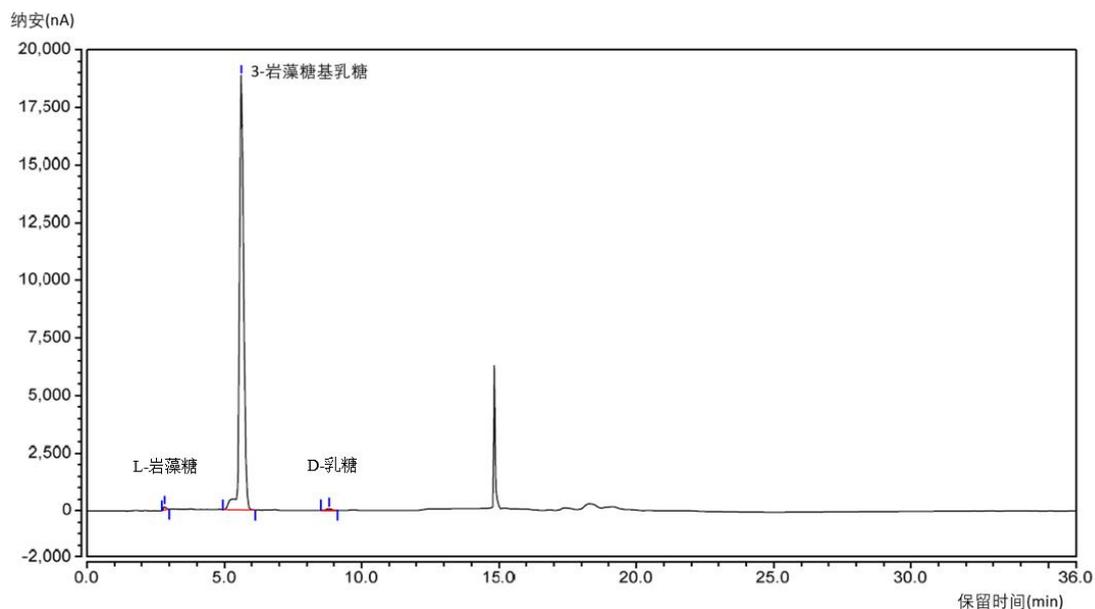


图 B.2 高效离子色谱法测定 3-岩藻糖基乳糖、D-乳糖和 L-岩藻糖的参考色谱图

表 B.2 高效离子交换色谱条件下各物质的保留时间

化合物	保留时间 (min)
L-岩藻糖	2.8
3-岩藻糖基乳糖	5.6
D-乳糖	8.8
系统溶剂 (水)	14.8

### B.3 高效液相色谱法测定 D-乳糖、L-岩藻糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖系统适用性试验参考色谱图

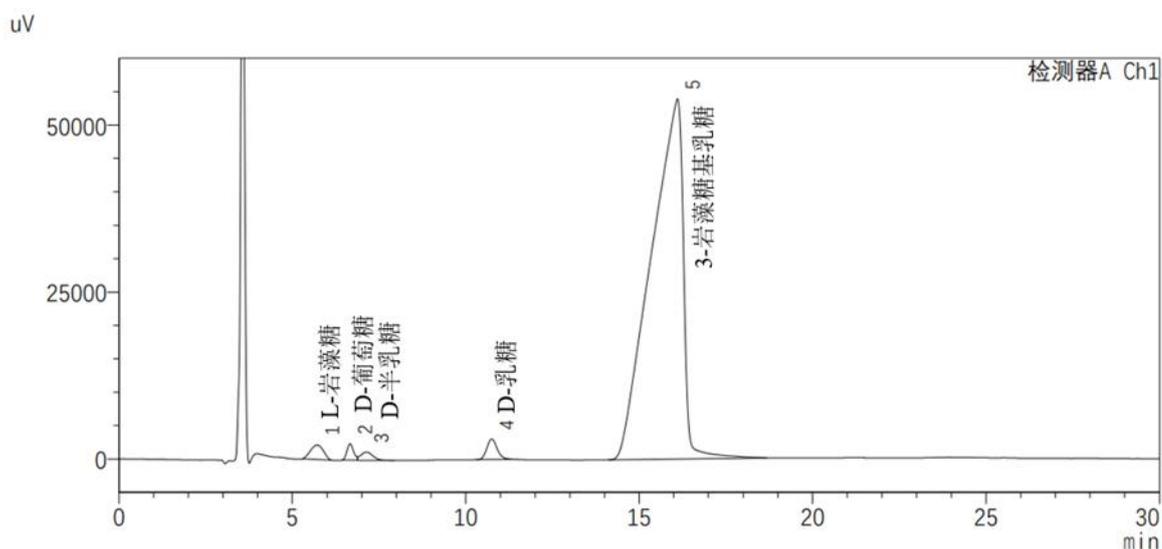


图 B.3 高效液相色谱法测定 D-乳糖、L-岩藻糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖系统适用性试验参考色谱图

表 B.3 高效液相色谱法测定色谱条件下系统适用性试验中各物质的保留时间

化合物	保留时间 (min)
L-岩藻糖	5.7
D-葡萄糖	6.7
D-半乳糖	7.1
D-乳糖	10.8
3-岩藻糖基乳糖	16.4

## B.4 乙醇对照品的参考色谱图

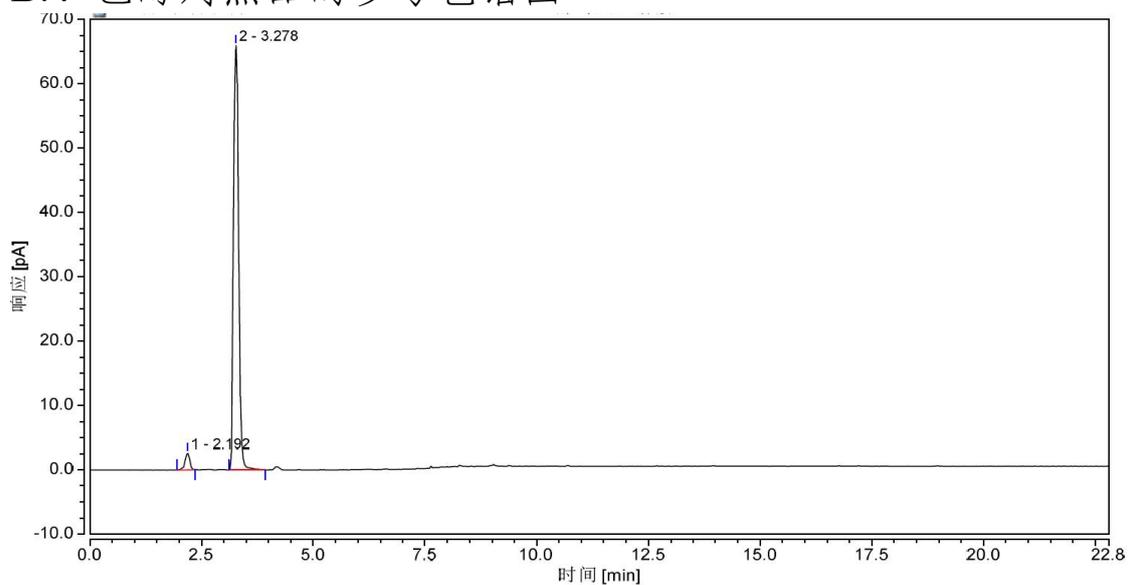


图 B.4 乙醇对照品的参考色谱图

表 B.4 乙醇对照品的保留时间

化合物	保留时间 (min)
乙醇	3.3

## 附录 C 用于生产 3-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

### C.1 用于生产 3-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

用于生产 3-岩藻糖基乳糖的生产菌信息见表 C.1。

表 C.1 用于生产 3-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
3-岩藻糖基乳糖	大肠杆菌 K-12 MG1655 <i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	螺杆菌 ( <i>Helicobacter</i> spp.) <sup>a</sup>
3-fucosyllactose	大肠杆菌 BL21(DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	脆弱拟杆菌 ( <i>Bacteroides fragilis</i> ) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 为  $\alpha$ -1,3-岩藻糖基转移酶供体。

2.中文名称：乳糖-*N*-四糖

英文名称：Lacto-*N*-tetraose, LNT

功能分类：食品营养强化剂

**用量及使用范围：**

食品分类号	食品名称	使用量	备注
01.03.02	调制乳粉(仅限儿童用乳粉)	0.25-1.82 g/L (以纯品计,以即食状态计,粉状产品按冲调倍数折算使用量)	当与 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖- <i>N</i> -新四糖、低聚半乳糖、低聚果糖、多聚果糖、棉子糖混合使用时,该类物质总量不超过 64.5g/kg。
13.01.01	婴儿配方食品		
13.01.02	较大婴儿和幼儿配方食品		
13.01.03	特殊医学用途婴儿配方食品		

### 质量规格要求

#### 1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖等为原料,经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂乳糖-*N*-四糖。乳糖-*N*-四糖的生产菌应经过安全性评估并符合附录 C 的要求。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

##### 2.1 化学名称

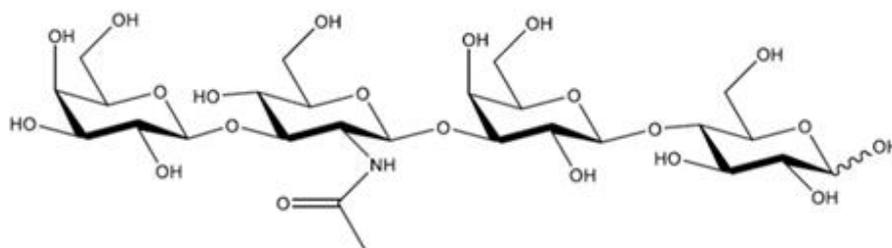
$\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1→3)-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃

葡萄糖基-(1→3)-β-D-吡喃半乳糖基-(1→4)-D-吡喃葡萄糖

## 2.2 分子式



## 2.3 结构式



## 2.4 相对分子质量

707.63 (按 2022 年国际相对原子质量)

## 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	白色至类白色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘或烧杯中，在自然光线下观察其色泽和状态。
状态	粉末	

### 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
乳糖-N-四糖(以干基计), w/% $\geq$	80.0	附录 A 中 A.2
乳糖-N-三糖II, w/% $\leq$	5.0	附录 A 中 A.2
线性乳糖-N-六糖II, w/% $\leq$	5.0	附录 A 中 A.2
D-乳糖, w/% $\leq$	5.0	附录 A 中 A.2
D-半乳糖和 D-葡萄糖, w/% $\leq$	5.0	附录 A 中 A.2
其它碳水化合物, w/% $\leq$	15.0	附录 A 中 A.3
水分, w/% $\leq$	9.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
灰分, w/% $\leq$	1.0	GB 5009.4
残留蛋白/(mg/kg) $\leq$	100	附录 A 中 A.4
内毒素/(EU/mg) $\leq$	10	附录 A 中 A.5
总砷(以 As 计)/(mg/kg) $\leq$	0.2	GB 5009.11
铅(Pb)/(mg/kg) $\leq$	0.05	GB 5009.12

### 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) $\leq$	500	GB 4789.2
霉菌/(CFU/g) $\leq$	10	GB 4789.15
酵母/(CFU/g) $\leq$	10	GB 4789.15
肠杆菌科/(CFU/g) $<$	10	GB 4789.41
沙门氏菌/(25 g)	不得检出	GB 4789.4

## 附录 A 检验方法

### A.1 一般规定

本质量规格要求所用的试剂和水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品，在未注明其他要求时，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.2 乳糖-*N*-四糖（以干基计）、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖的测定

#### A.2.1 方法提要

试样溶于水，采用离子色谱法分离，脉冲安培检测器检测，以乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖对照品的保留时间定性，外标法定量。

#### A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 乳糖-*N*-四糖对照品（CAS 14116-68-8）：纯度 $\geq 91\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.2 D-乳糖对照品（CAS 64044-51-5）：无水乳糖纯度 $\geq 95\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.3 乳糖-*N*-三糖 II 对照品 (CAS 75645-27-1): 纯度 $\geq$ 95%或标明含量的等同物。

A.2.2.4 线性乳糖-*N*-六糖 II 对照品: 纯度 $\geq$ 90%或标明含量的等同物。

A.2.2.5 D-半乳糖对照品 (CAS 59-23-4): 纯度 $\geq$ 99%或标明含量的等同物。

A.2.2.6 D-葡萄糖对照品 (CAS 50-99-7): 纯度 $\geq$ 99%或标明含量的等同物。

A.2.2.7 50%氢氧化钠溶液 (NaOH): 色谱纯。

A.2.2.8 氢氧化钠溶液 (500 mmol/L): 取 26.0 mL 50%氢氧化钠溶液, 用水稀释至 1000 mL, 缓慢摇匀, 室温下可放置 7 天。

### A.2.3 仪器和设备

A.2.3.1 离子色谱仪: 配有脉冲安培检测器, Au 工作电极。

A.2.3.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

A.2.3.3 涡旋混合仪。

A.2.3.4 超声波清洗器。

### A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 色谱柱: 离子交换色谱柱, 150 mm $\times$ 3 mm (带保护柱 30 mm $\times$ 3 mm) 或性能相当的离子色谱柱。

A.2.4.2 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

A.2.4.3 洗脱液：A：水；B：氢氧化钠溶液（500 mmol/L）。

A.2.4.4 洗脱类型：梯度洗脱，条件见表 A. 1。

表 A. 1 梯度洗脱条件

时间/min	流速 mL/min	洗脱液%		曲线
		A	B	
0 ~ 30	0.45	93	7	线性
30.1 ~ 37	0.45	80	20	线性
37.1 ~ 42	0.45	20	80	线性
42.1 ~ 57	0.45	93	7	线性

A.2.4.5 进样量：20  $\mu$ L。

A.2.4.6 检测器：脉冲安培检测器。

A.2.4.7 检测器温度：35 $^{\circ}$ C。

A.2.4.8 数据收集速率（Hz）：10。

A.2.4.9 参比电极：银/氯化银电极或其他类似电极。

A.2.4.10 工作电极：金电极。

## A.2.5 分析步骤

### A.2.5.1 标准储备溶液的配制

#### A.2.5.1.1 乳糖-N-四糖标准储备液（1000 $\mu$ g/mL）：

准确称取适量乳糖-N-四糖标准品于合适的容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.2 D-乳糖标准储备液（1000 $\mu$ g/mL）：

准确称取适量 D-乳糖标准品于合适的容量瓶中，加水后

摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.3 乳糖-N-三糖 II 标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取适量乳糖-N-三糖 II 标准品于合适的容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.4 线性乳糖-N-六糖 II 标准储备液（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取适量线性乳糖-N-六糖 II 标准品于合适的容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.5 D-半乳糖标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取适量 D-半乳糖标准品于合适的容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.6 D-葡萄糖标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取适量 D-葡萄糖标准品于合适的容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.7 标准混合中间液（约 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

分别吸取不同体积的各种储备液于合适的容量瓶中，加水定容至刻度，得到浓度约为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准混合中间液。建议的配制过程见表 A. 2。

表 A. 2 标准混合中间液的配制

化合物名称	乳糖-N-四糖	D-乳糖	乳糖-N-三糖 II	D-葡萄糖/D-半乳糖 <sup>1</sup>	线性乳糖-N-六糖 II
-------	---------	------	------------	--------------------------	--------------

移取体 积( mL )	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20
----------------	------	------	------	------	------

<sup>1</sup> D-半乳糖和 D-葡萄糖同时洗脱，并通过组合峰测定。两个物质响应基本一致，因此，仅需要 D-半乳糖或 D-葡萄糖其中一种储备溶液用于定量。

#### A.2.5.2 标准工作溶液配制

分别吸取混合中间液 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL 于 10 mL 容量瓶中加水定容至刻度，得到浓度分别为 0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg/mL 的标准工作液。另取适量标准混合中间液，作为浓度为 10 µg/mL 的标准工作液。

#### A.2.5.3 试样制备

称量 20.0 mg( 精确至 0.1 mg )乳糖-N-四糖样品于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容。取 1.0 mL 该试样溶液于 10 mL 容量瓶中，用水稀释并定容，得到的溶液 A 用于测定副产物。另取 1.0 mL 溶液 A，用水定容至 50 mL，得到的溶液 B 用于测定主含量。

注：如需要，可调整试样的称样量或稀释体积，确保所测浓度在工作曲线的范围内。

#### A.2.5.4 系统适应性试验

以水为空白样，连续进样至少两次，进行系统适用性测试。当满足以下条件时，可进行样品检测：

——浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液进样 2 次后，色谱图中的乳糖-*N*-四糖的信噪比应  $\geq 10$ ;

——峰面积的相对偏差应不大于 10%。如不满足相对偏差要求，需复测。

#### A.2.5.5 测定

将标准曲线工作溶液从低到高依次注入离子色谱仪中，测定相应的响应值（峰面积），以标准工作液中各种糖的质量浓度为横坐标，以响应值（峰面积）为纵坐标，绘制标准曲线。离子交换色谱条件下乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖的对照品溶液参考色谱图见附录 B.1。

将试样溶液注入离子色谱仪中，记录色谱图。根据保留时间定性，记录峰面积。根据标准曲线得到待测液中各种糖的质量浓度。同时测定试剂空白。试样溶液中离子交换色谱条件下乳糖-*N*-四糖的参考色谱图见附录 B.2，D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖的参考色谱图见附录 B.3。

#### A.2.5.6 计算

试样中乳糖-*N*-四糖的含量的质量分数 $\omega_1$ 按式(A.1)计算:

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V \times f_1}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (\text{A. 1})$$

式中:

$\rho_1$ ——试样测定液中乳糖-N-四糖的质量浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ——试样的定容体积, 单位为毫升 ( $\text{mL}$ );

$f_1$ ——乳糖-N-四糖的稀释因子;

$m$ ——试样质量, 单位为克 ( $\text{g}$ );

1000000——单位转换系数;

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

乳糖-N-四糖(以干基计)含量的质量分数 $\omega_2$ 按式(A. 2)

计算:

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{100 - \omega} \times 100 \dots\dots\dots (\text{A. 2})$$

式中:

$\omega_1$ ——试样中乳糖-N-四糖含量的质量分数, %;

$\omega$ ——按照 GB 5009.3 测得的试样中水分含量的质量分数, %;

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中乳糖-N-三糖 II 含量的质量分数 $\omega_3$ 按式(A. 3)计

算:

$$\omega_3 = \frac{\rho_2 \times V \times f_2}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A. 3)$$

式中:

$\rho_2$ ——试样测定液中乳糖-N-三糖 II 的质量浓度, 单位为  
微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f_2$ ——乳糖-N-三糖 II 的稀释因子;

$m$ ——试样质量, 单位为克 (g);

1000000——单位转换系数;

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中 D-乳糖含量的质量分数  $\omega_4$  按式 (A. 4) 计算:

$$\omega_4 = \frac{\rho_3 \times V \times f_3}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A. 4)$$

式中:

$\rho_3$ ——试样测定液中 D-乳糖的质量浓度, 单位为微克每  
毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f_3$ ——D-乳糖的稀释因子;

$m$ ——试样质量, 单位为克 (g);

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中线性乳糖-N-六糖 II 含量的质量分数 $\omega_5$ 按式 (A.

5) 计算:

$$\omega_5 = \frac{\rho_4 \times V \times f_4}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A. 5)$$

式中:

$\rho_4$ ——试样测定液中线性乳糖-N-六糖 II 的质量浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f_4$ ——线性乳糖-N-六糖 II 的稀释因子;

$m$ ——试样质量, 单位为克 (g);

1000000——单位转换系数;

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中 D-半乳糖和 D-葡萄糖含量的质量分数 $\omega_6$ 按式(A.

6) 计算:

$$\omega_6 = \frac{\rho_5 \times V \times f_5}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A. 6)$$

式中:

$\rho_5$ ——试样测定液中 D-半乳糖和 D-葡萄糖的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$f_5$ ——D-半乳糖和 D-葡萄糖的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克 (g)；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。本方法的定量限为 0.2 g/100 g。

### A.3 其它碳水化合物的计算

其它碳水化合物含量的质量分数 $\omega_8$ 按式 (A.7) 计算：

$$\omega_8 = 100\% - \omega_1 - \omega_3 - \omega_4 - \omega_5 - \omega_6 - \omega_7 - \omega \dots\dots\dots \text{(A.7)}$$

式中：

$\omega_1$ ——试样中乳糖-N-四糖含量的质量分数，%；

$\omega_3$ ——试样中乳糖-N-三糖 II 含量的质量分数，%；

$\omega_4$ ——试样中 D-乳糖含量的质量分数，%；

$\omega_5$ ——试样中线性乳糖-N-六糖 II 含量的质量分数，%；

$\omega_6$ ——试样中 D-半乳糖和 D-葡萄糖含量的质量分数，%；

$\omega_7$ ——按照 GB 5009.4 测得的试样中灰分含量的质量分

数， %;

$\omega$ ——按照 GB 5009.3 测得的试样中水分含量的质量分数， %;

计算结果保留小数点后一位。

#### A.4 残留蛋白含量的测定

##### A.4.1 方法提要

考马斯亮蓝染色试剂与蛋白质反应，在 595 nm 波长下检测吸光度用于蛋白质测定。为了防止样品基质对显色反应的干扰，样品溶液与不同浓度的牛血清白蛋白标准溶液混合后显色，绘制二次标准曲线，计算样品蛋白质含量。

##### A.4.2 试剂和材料

A.4.2.1 牛血清白蛋白对照品：纯度  $\geq 99\%$  或标明含量的等同物。

A.4.2.2 考马斯亮蓝试剂：市售，适用于 0.1 mg/mL~1.4 mg/mL 蛋白含量的测定。

##### A.4.3 仪器和设备

A.4.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.4.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

##### A.4.4 分析步骤

###### A.4.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg 牛血清白蛋白对照品于 10 mL 容量瓶中，

用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.4.2 牛血清白蛋白标准溶液的制备

取 100  $\mu\text{L}$  上述储备溶液于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.4.3 试样溶液的制备

称取 200 mg 样品于 5 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.4.4 测定

按表 A.3 直接在比色皿中依次加入试样溶液、水、牛血清白蛋白标准溶液和考马斯亮蓝试剂，混匀，室温下静置 10 min。然后以水作为参比，在 595 nm 波长下依次测定混合溶液的吸光值。

表 A.3 测试试样溶液制备

溶液	蛋白浓度 (mg/L)	试样溶 液 ( $\mu\text{L}$ )	水( $\mu\text{L}$ )	牛血清白 蛋白标准 溶液 ( $\mu\text{L}$ )	考马斯亮 蓝试剂 ( $\mu\text{L}$ )
空白溶液 1	0	0	800	0	200
空白溶液 2	0	0	800	0	200
混合溶液 0	0	600	200	0	200
混合溶液 1	1	600	150	50	200
混合溶液 2	2	600	100	100	200
混合溶液 3	4	600	0	200	200

#### A.4.4.5 结果计算

以混合溶液的吸光值减去空白吸光值的平均值得到校准吸光值。以校准吸光值为纵坐标，牛血清白蛋白标准溶液浓度为横坐标，绘制通过横坐标左半轴交点的二次标准曲线。标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值的绝对值即为试样中蛋白的浓度。标准曲线的示意图见图 A.1。

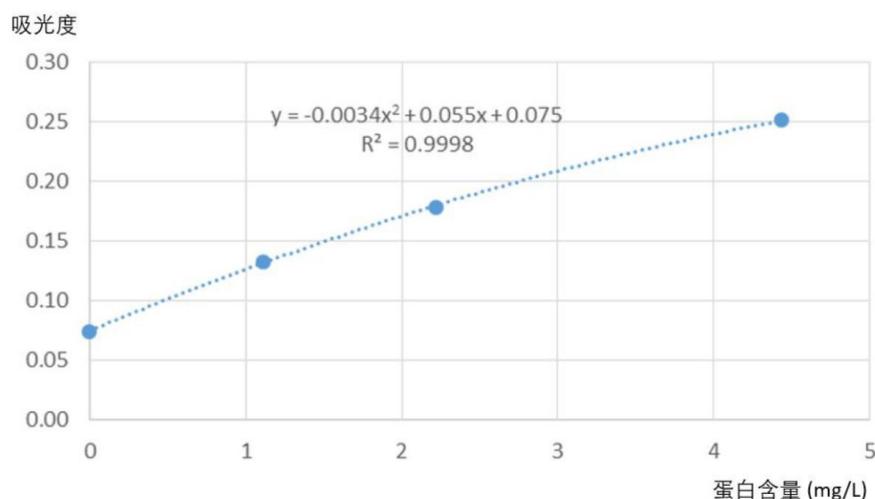


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量 $\omega_9$ 按式 (A.8) 计算，单位为 mg/kg。

$$\omega_9 = \frac{-1 \times C_1 \times V_1}{0.6 \times m_1} \times f \times 1000 \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

$C_1$ ——标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值，数值为负值，单位为毫克每升 (mg/L)；

$-1 \times C_1$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

$V_1$ ——试样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

$f$ ——稀释因子；

$m_1$ ——试样的质量，单位毫克（mg）；

0.6——1 mL 混合溶液中试样溶液的体积为 0.6 mL；

1000——单位转换系数。

该方法的定量限为 17 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 < 17 mg/kg。结果保留整数位。

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值 20%。

## A.5 内毒素的测定（凝胶法）

### A.5.1 一般规定

本测定所用的水应符合灭菌注射用水标准，试验所用器皿需经处理，以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法（250°C、至少 30 min）去除，也可采用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。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.5.2 方法提要

利用鲎试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素，以判断试样中细菌内毒素的限量是否符合规定。鲎试

剂是从鲎的血液中提取出的冻干试剂，可以与细菌内毒素发生凝集反应，通过凝胶法进行限度检测或半定量检测内毒素。

### A.5.3 试剂和材料

A.5.3.1 细菌内毒素标准品。

A.5.3.2 鲎试剂：带有灵敏度标示值 $\lambda$ 。

A.5.3.3 细菌内毒素检查用水：内毒素含量 $<0.015$  EU/mL。

### A.5.4 仪器和设备

A.5.4.1 旋涡混合器。

A.5.4.2 恒温水浴箱。

### A.5.5 分析步骤

#### A.5.5.1 试样溶液配制

样品加细菌内毒素检查用水溶解。必要时，可调节被测溶液（或其稀释液）的 pH 值，一般试样溶液和鲎试剂混合后溶液的 pH 值在 6.0 ~ 8.0 的范围内为宜，可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查用水在已去除内毒素的容器中配制。所用溶剂、酸碱溶液及缓冲液应不含内毒素和干扰因子。

#### A.5.5.2 鲎试剂灵敏度复核试验

在本检查法规定的条件下，使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度，用 EU/mL 表示。当

使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。

根据鲎试剂灵敏度的标示值 ( $\lambda$ )，将细菌内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解，在旋涡混合器上混匀 15 min 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作，然后制成  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$  和  $0.25\lambda$  四个浓度的内毒素标准溶液，每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作。取不同浓度的内毒素标准溶液，分别与等体积的鲎试剂溶液混合，每一个内毒素浓度平行做 4 管；另外取 2 管加入等体积的细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴箱中，保温  $60\text{ min}\pm 2\text{ min}$ 。

将试管从恒温水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转  $180^{\circ}$ ，若管内形成凝胶，并且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性；未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。保温和拿取试管过程应避免受到振动，造成假阴性结果。

当最大浓度  $2\lambda$  管均为阳性，最低浓度  $0.25\lambda$  管均为阴性，阴性对照管为阴性，试验方为有效。

反应终点浓度的几何平均值，即为鲎试剂灵敏度的测定值 ( $\lambda_c$ ) 按式 (A.9) 计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilg} \sum X/n \dots\dots\dots (\text{A. 9})$$

式中:

$X$ ——为反应终点浓度的对数值 (lg), 反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度;

$n$ ——为每个浓度的平行管数。

当 $\lambda_c$  在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$  (包括  $0.5\lambda$ 和  $2\lambda$ ) 时, 方可用于细菌内毒素检查, 并以标示灵敏度 $\lambda$ 为该批试剂的灵敏度。

#### A.5.5.3 干扰试验

按表 A.4 制备溶液 A、B、C 和 D, 使用的试样溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的溶液, 按试剂灵敏度复核试验项下操作。最大有效稀释倍数 (MVD) 是指在试验中试样溶液被允许达到稀释的最大倍数, 在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测, MVD 按式 (A. 10) 计算:

$$MVD = cL/\lambda \dots\dots\dots (\text{A. 10})$$

式中:

$c$ ——为试样溶液的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL); 如需计算在 MVD 时的试样浓度, 即最小有效稀释浓度, 可使用公式  $c=\lambda/L$ ;

$L$ ——试样的细胞内毒素限量，单位为内毒素单位每毫克（EU/mg）；

$\lambda$ ——鲎试剂的标示灵敏度，单位为内毒素单位每毫升（EU/mL）。

表 A.4 干扰试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/ 被加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/试样溶液	—	—	—	2
B	$2\lambda$ /试样溶液	试样溶液	1	$2\lambda$	4
			2	$\lambda$	4
			4	$0.5\lambda$	4
			8	$0.25\lambda$	4
C	$2\lambda$ /内毒素检查用水	检查用水	1	$2\lambda$	2
			2	$\lambda$	2
			4	$0.5\lambda$	2
			8	$0.25\lambda$	2
D	无/内毒素检查用水	—	—	—	2

注：A 为试样溶液；B 为干扰试验溶液；C 为鲎试剂标示灵敏度对照系列；D 为阴性对照。

只有当溶液 A 和阴性对照溶液 D 的所有平行管都为阴性，并且系列溶液 C 的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验要求时，试验有效。当系列溶液 B 的结果符合鲎试剂灵敏度复核

试验要求时，认为试样在该浓度下无干扰作用。其他情况则认为试样在该浓度下存在干扰作用。若试样溶液在小于MVD的稀释倍数下对试验有干扰，应将试样溶液进行不超过MVD的进一步稀释，再次重复干扰试验。

可通过对试样进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法（如过滤、中和、透析或加热处理等）排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性，要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的试样溶液进行干扰试验。

当进行样品的内毒素检查试验前，须进行干扰试验。当鲎试剂、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，须重新进行干扰试验。

#### A.5.5.4 测定

##### A.5.5.4.1 凝胶限度试验

按表 A.5 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超过 MVD 并且已经排除干扰的试样溶液来制备溶液 A 和 B。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.5 凝胶限度试验溶液制备

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	平行管数
A	无/试样溶液	2
B	2λ/试样溶液	2
C	2λ/内毒素检查用水	2

D	无/内毒素检查用水	2
---	-----------	---

注：A 为试样溶液；B 为试样阳性对照；C 为阳性对照；D 为阴性对照。

保温 60 min±2 min 后观察结果。若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，试样阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，阳性对照溶液 C 的平行管均为阳性，试验有效。

若溶液 A 的两个平行管均为阴性，判定试样符合规定。若溶液 A 的两个平行管均为阳性，判定试样不符合规定。若溶液 A 的两个平行管中的一管为阳性，另一管为阴性，需进行复试。复试时溶液 A 需做 4 支平行管，若所有平行管均为阴性，判定试样符合规定，否则判定试样不符合规定。

若试样的稀释倍数小于 MVD 而溶液 A 结果出现不符合规定时，可将试样稀释至 MVD 重新实验，再对结果进行判断。

#### A.5.5.4.2 凝胶半定量试验

通过确定反应终点浓度来量化试样中内毒素的含量。按表 A.6 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.6 凝胶半定量试验溶液的制备

编号	内毒素浓度/ 被加入内毒 素的溶液	稀释用液	稀释倍 数	所含内 毒素的 浓度	平行管 数
----	-------------------------	------	----------	------------------	----------

A	无/试样溶液	检查用水	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ/试样溶液	—	1	2λ	2
C	2λ/内毒素检查用水	检查用水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/内毒素检查用水	—	—	—	2

注：A 为不超过 MVD 并且通过干扰试验的试样溶液。从通过干扰试验的稀释倍数开始用内毒素检查用水稀释如 1 倍、2 倍、4 倍和 8 倍，最后的稀释倍数不得超过 MVD；B 为含 2λ 溶度内毒素标准品的溶液 A（试样阳性对照）；C 为鲎试剂标示灵敏度对照系列；D 为阴性对照。

若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，试样阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，系列溶液 C 的反应终点浓度的几何平均值在 0.5λ ~ 2λ，试验有效。

#### A.5.5.5 结果判定

系列溶液 A 中每一系列平行管的终点稀释倍数乘以 λ，为每个系列的反应终点浓度。如果检验的是经稀释的试样，则将终点浓度乘以试样进行半定量试验的初始稀释倍数，即得到每一系列内毒素浓度 c。

若每一系列内毒素浓度均小于规定的限值，判定试样符合规定。每一系列内毒素浓度的几何平均值即为试样溶液的内毒素浓度[按公式  $c_E = \text{antilg}(\sum \lg c/2)$ ]。若试验中试样溶液的所有平行管均为阴性，应记为内毒素浓度小于 $\lambda$ （如果检验的是稀释过的试样，则记为小于 $\lambda$ 乘以试样进行半定量试验的初始稀释倍数）。

若任何系列内毒素浓度不小于规定的限值时，则判定试样不符合规定。当试样溶液的所有平行管均为阳性，可记为内毒素的浓度大于或等于最大的稀释倍数乘以 $\lambda$ 。

## 附录 B 参考色谱图

### B.1 乳糖-N-四糖、D-乳糖、乳糖-N-三糖 II、线性乳糖-N-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖对照品溶液的参考离子色谱图

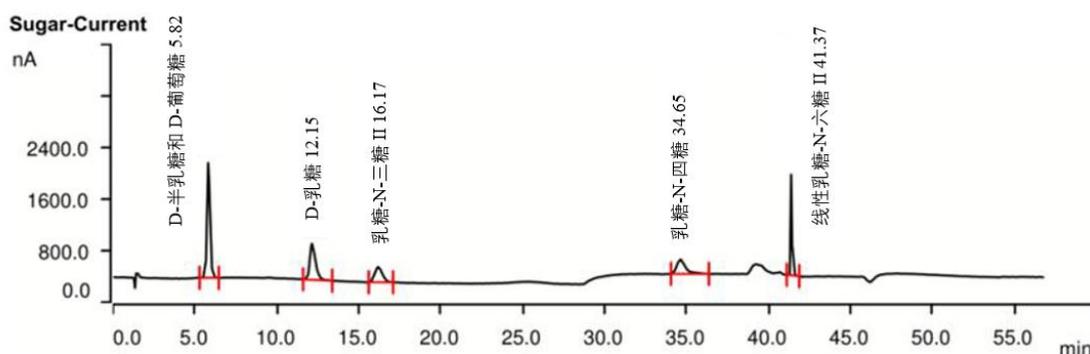


图 B.1 乳糖-N-四糖、D-乳糖、乳糖-N-三糖 II、线性乳糖-N-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖对照品溶液的参考离子色谱图

表 B.1 色谱条件下各物质的参考保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-半乳糖和 D-葡萄糖	5.82
D-乳糖	12.15
乳糖-N-三糖 II	16.17
乳糖-N-四糖	34.65
线性乳糖-N-六糖 II	41.37

## B.2 试样溶液中乳糖-N-四糖参考离子色谱图

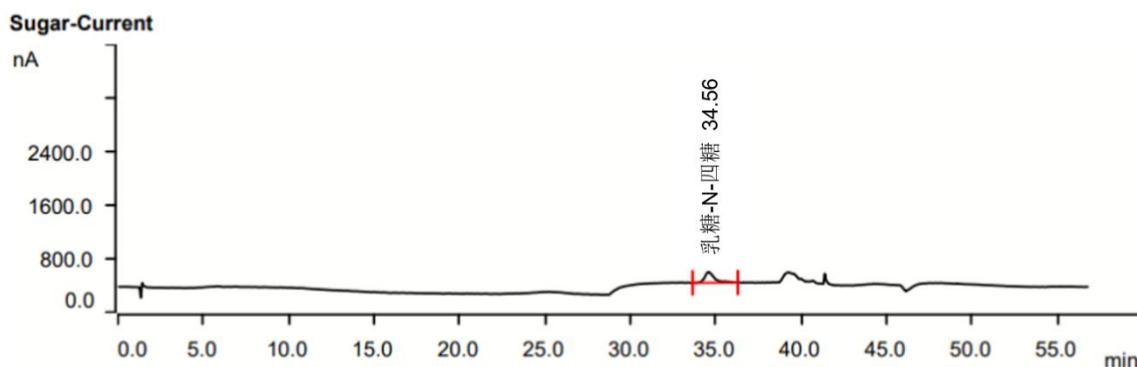


图 B.2 试样溶液中乳糖-N-四糖参考离子色谱图

## B.3 试样溶液中 D-乳糖、乳糖-N-三糖 II、线性乳糖-N-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖参考离子色谱图

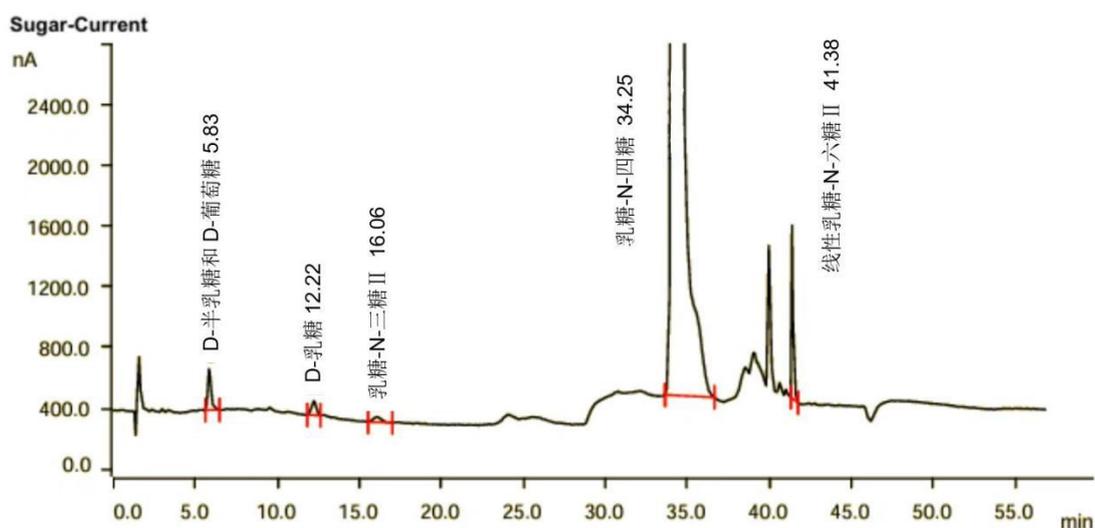


图 B.3 试样溶液中 D-乳糖、乳糖-N-三糖 II、线性乳糖-N-六糖 II、D-半乳糖和 D-葡萄糖参考离子色谱图

## 附录 C 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

### C.1 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息见表 C.1。

表 C.1 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
乳糖-N-四糖 Lacto-N-tetraose	大肠杆菌 BL21 star (DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21 star (DE3)	奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>a</sup> 、 沙门氏菌 ( <i>Salmonella</i> spp.) <sup>b</sup>
	大肠杆菌 K-12 GI724 <i>Escherichia coli</i> K-12 GI724	奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>a</sup> 、 螺杆菌 ( <i>Helicobacter</i> spp.) <sup>b</sup>
	大肠杆菌 BL21 (DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	肠道沙门氏菌 ( <i>Salmonella enterica</i> ) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 为 $\beta$ -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶供体

<sup>b</sup> 为 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶供体

### (三) 扩大使用范围的食品添加剂

序号	名称	食品分类号	食品名称	最大使用量 (g/kg)	备注
1	抗坏血酸 棕榈酸酯 (酶法)	13.01	婴幼儿配方食品	0.05	以油脂中抗坏血酸计
		13.02	婴幼儿辅助食品	0.05	以油脂中抗坏血酸计

### (四) 扩大使用范围的食品工业用加工助剂

序号	助剂中文名称	助剂英文名称	功能	使用范围
1	硫酸	sulfuric acid	破壁	藻类破壁工艺
2	乙酸乙酯	ethyl acetate	提取溶剂	藻类来源的油脂加工工艺 (残留量 $\leq 20$ mg/kg)

### (五) 增补质量规格要求的食品添加剂

#### 1. 食品营养强化剂 2'-岩藻糖基乳糖

该物质的质量规格要求按照国家卫生健康委员会 2023 年第 8 号公告执行 (附录 C 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息除外), 该营养强化剂新品种的生产菌信息见下表。

表 1 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
2'-岩藻糖基乳糖 2'-fucosyllactose	枯草芽孢杆菌 168 <i>Bacillus subtilis</i> 168	枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) <sup>a</sup> 、大肠杆菌

		( <i>Escherichia coli</i> ) <sup>b</sup> 、幽门螺杆菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> ) <sup>c</sup>
	大肠杆菌 BL21(DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	幽门螺杆菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> ) <sup>c</sup> 、大肠杆菌 O126 ( <i>Escherichia coli</i> O126) <sup>c</sup>
	大肠杆菌 K-12 MG1655 <i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	幽门螺杆菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> ) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 为甘露糖-6-磷酸异构酶供体

<sup>b</sup> 为磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷转移酶、GDP-甘露糖脱水酶、GDP-岩藻糖合酶、乳糖渗透酶、糖外排转运蛋白供体

<sup>c</sup> 为 $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶供体

## 二、拟征求意见的食品添加剂新品种解读材料

### （一）氨肽酶

1.解读材料。李氏木霉（*Trichoderma reesei*）来源的氨肽酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。美国食品药品监督管理局等允许其作为食品工业用酶制剂使用。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用酶制剂，主要用于催化蛋白质氨基端氨基酸的水解。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》（GB 1886.174）。

### （二）木聚糖酶

1.解读材料。李氏木霉（*Trichoderma reesei*）来源的木聚糖酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。法国食品安全局、丹麦兽医和食品局等允许其作为食品工业用酶制剂使用。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用酶制剂，主要用于催化木聚糖的水解。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》（GB 1886.174）。

### （三）3-岩藻糖基乳糖

1.解读材料。3-岩藻糖基乳糖申请作为食品营养强化剂新品种。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会等允许3-岩藻糖基乳糖用于婴幼儿配方食品等食品类别。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂，是一种母

乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

#### （四）乳糖-N-四糖

1.背景资料。乳糖-N-四糖申请作为食品营养强化剂新品种。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会、澳大利亚和新西兰食品标准局等允许乳糖-N-四糖用于婴幼儿配方食品等食品类别。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂，是母乳中一种主要的母乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

#### （五）抗坏血酸棕榈酸酯（酶法）

1.背景资料。抗坏血酸棕榈酸酯（酶法）作为抗氧化剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），允许用于脂肪、油和乳化脂肪制品，方便米面制品等食品类别，本次申请扩大使用范围用于婴幼儿配方食品（食品类别 13.01）和婴幼儿辅助食品（食品类别 13.02）。澳大利亚和新西兰食品标准局、日本厚生劳动省、韩国食品药品安全部等允许其作为抗氧化剂用于婴幼儿配方食品等食品类别。根据联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果，该物质的每日允许摄入量为 0-1.25 mg/kg bw。

2.工艺必要性。该物质作为抗氧化剂用于婴幼儿配方食品（食品类别 13.01）和婴幼儿辅助食品（食品类别 13.02），

延缓食品氧化。其质量规格执行国家卫生健康委（原国家卫生和计划生育委员会）2016年第9号公告。

#### （六）硫酸

1.解读材料。硫酸作为食品工业用加工助剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），发挥絮凝剂、中和除皂等功能，用于啤酒、淀粉、乳制品、油脂的加工工艺，本次申请扩大使用范围用于藻类破壁工艺。美国食品药品监督管理局等允许其用于藻类破壁工艺。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用加工助剂，用于藻类破壁工艺，发挥破壁功能。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 硫酸》（GB 29205）。

#### （七）乙酸乙酯

1.解读材料。乙酸乙酯作为食品工业用加工助剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），作为提取溶剂，用于配制酒、酵母抽提物的加工工艺，本次申请扩大使用范围用于藻类来源的油脂加工工艺。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会等允许其作为提取溶剂用于食品。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用加工助剂，用于藻类来源的油脂加工工艺，发挥提取溶剂功能。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 乙酸乙酯》（GB 1886.190）。

#### （八）2'-岩藻糖基乳糖

1.背景资料。2'-岩藻糖基乳糖作为食品营养强化剂已列入国家卫生健康委 2023 年第 8 号及相关公告,本次申报的 2'-岩藻糖基乳糖是新生产菌来源的营养强化剂新品种。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会、澳大利亚和新西兰食品标准局等允许 2'-岩藻糖基乳糖用于婴幼儿配方食品等食品类别。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂,是母乳中一种主要的母乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。