

## 附件 1

# 食品添加剂新品种

## 爱德万甜 (N- {N- [3- (3-羟基-4-甲氧基苯基) 丙基] -L-a-天冬氨酰} -L-苯丙氨酸-1-甲酯)

英文名称: N-[N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) propyl]-L- $\alpha$ -aspartyl]-L-phenylalanine  
1-methyl ester

功能分类: 甜味剂

### (一) 用量及使用范围

食品分类号	食品名称	最大使用量 (g/kg)	备注	
01.02	发酵乳和风味发酵乳	0.006	—	
03.0	冷冻饮品 (03.04 食用冰除外)	0.0005		
04.01.02	加工水果	0.12		
05.0	可可制品、巧克力和巧克力制品 (包括代可可脂巧克力及制品) 以及糖果	0.0005		
10.03	蛋制品 (改变其物理性状)	0.0004		
11.04	餐桌甜味料	按生产需要适量使用		
11.05	调味糖浆	按生产需要适量使用		
11.06	其他甜味料	按生产需要适量使用		
12.10	复合调味料	0.0005		
14.05	茶、咖啡、植物 (类) 饮料	0.003		
14.06	固体饮料	0.004		
16.01	果冻	0.0004		如用于果冻粉, 按冲调 倍数增加使用量

### (二) 质量规格要求

#### 1. 范围

本标准适用于以香兰素和阿斯巴甜经化学反应制得的食品添加剂爱德万甜 (N- {N- [3- (3-羟基-4-甲氧基苯基) 丙基] -L-a-天冬氨酰} -L-苯丙氨酸-1-甲酯)。

#### 2. 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

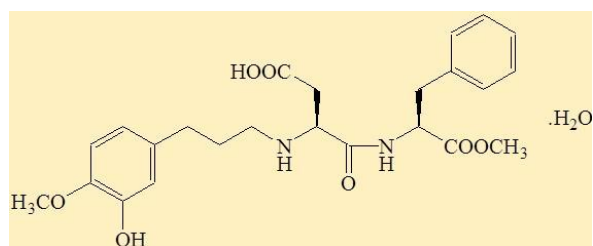
##### 2.1 化学名称

N- {N- [3- (3-羟基-4-甲氧基苯基) 丙基] -L-a-天冬氨酰} -L-苯丙氨酸-1-甲酯

##### 2.2 分子式

$C_{24}H_{30}N_2O_7 \cdot H_2O$

## 2.3 结构式



## 2.4 相对分子量

476.52 (按 2007 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	白色到黄色粉末	将试样置于一洁净白纸上, 用目测法观察
状态	粉末	
气味	无异味	取适量样品, 闻其气味

### 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
爱德万甜, w/%	97.0 ~102.0	附录 A 中 A.2
爱德万甜酸, w/%	≤ 1	附录 A 中 A.3
其他相关物质, w/%	≤ 1.5	附录 A 中 A.3
比 旋 光 度 $\alpha_m(20\text{ }^\circ\text{C}, D)/[(\text{ }^\circ) \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}]$	-45 ~-38	GB/T 613 <sup>a</sup>
水分, w/%	≤ 5.0	GB 5009.3 第四法 卡尔·费休法
灼烧残渣, w/%	≤ 0.2	GB/T 9741
砷 (As) /(mg/kg)	≤ 2	GB 5009.75
铅 (Pb) /(mg/kg)	≤ 1	GB 5009.12

<sup>a</sup> 配制质量分数为 0.2% 的试样溶液, 计算结果以干基计。

## 附录 A 检验方法

### A.1 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中规定的三级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、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 爱德万甜的测定

#### A.2.1 方法提要

用高效液相色谱测定法，在选定的工作条件下，通过色谱柱使试样溶液中各组份分离，用紫外检测器检测，用内标法定量，计算试样中爱德万甜的含量。

#### A.2.2 试剂与材料

A.2.2.1 爱德万甜标准品。

A.2.2.2 苯甲酸。

A.2.2.3 乙腈：色谱纯。

A.2.2.4 磷酸二氢钾。

A.2.2.5 磷酸。

#### A.2.3 仪器与设备

A.2.3.1 高效液相色谱仪（HPLC）。

A.2.3.2 恒流泵。

A.2.3.3 紫外检测器。

#### A.2.4 参考色谱分析条件

参考色谱分析条件见表 A.1。

表 A.1 参考色谱分析条件

色谱柱：	反相柱（C18），内径 4.6 mm×250 mm，5μm 粒径，或其他等效色谱柱	
色谱柱温度：	40℃	
流动相 A：	磷酸盐缓冲液（pH 2.8）和乙腈的混合液（75:25 体积比）	
流动相 B：	磷酸盐缓冲液（pH 2.8）和乙腈的混合液（50:50 体积比）	
流速：	1.0 mL/min	
进样量：	20 μL	
检测器：	紫外检测器，检测波长：280 nm	
运行时间：	55 min	
梯度洗脱程序：		
时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
20	100	0
50	0	100
55	0	100

#### A.2.5 分析步骤

### A. 2. 5. 1 溶液制备

#### A. 2. 5. 1. 1 磷酸盐缓冲液的制备

准确称取 13.61 g 磷酸二氢钾 (A.2.2.4), 溶解在 1000 mL 水中, 用磷酸 (A.2.2.5) 调节 pH 为 2.8。

#### A. 2. 5. 1. 2 流动相 A

准确量取 750 mL 磷酸盐缓冲溶液 (A.2.5.1.1), 加入 250 mL 乙腈 (A.2.2.3), 混匀, 超声波处理约 5 min。

#### A. 2. 5. 1. 3 流动相 B

准确量取 500 mL 磷酸盐缓冲溶液, 加入 500 mL 乙腈 (A.2.2.3), 混匀, 超声波处理约 5 min。

#### A. 2. 5. 1. 4 水和乙腈的混合液 (7:3 体积比)

准确量取 300 mL 乙腈 (A.2.2.3), 加入 1000 mL 容量瓶中, 用水稀释到刻度。

#### A. 2. 5. 1. 5 内标溶液

准确称取约 40 mg 苯甲酸 (A.2.2.2), 溶解于水和乙腈的混合液 (A.2.5.1.4), 精确定容至 50mL。

#### A. 2. 5. 1. 6 标准贮备溶液

准确称取 40 mg 爱德万甜标准品 (A.2.2.1), 溶解于水与乙腈的混合液 (A.2.5.1.4), 定容至 50 mL。

#### A. 2. 5. 1. 7 标准溶液

用移液管吸取 8、9、10、11、12mL 标准贮备溶液 (A.2.5.1.6) 分别转入 5 个容量瓶中, 向每个容量瓶中加入 5 mL 内标溶液 (A.2.5.1.5), 然后加入水与乙腈的混合液 (A.2.5.1.4), 精准定容至 50 mL。

#### A. 2. 5. 1. 8 试样溶液

准确称取约 40 mg 试样, 溶解于水与乙腈的混合液 (A.2.5.1.4), 精准定容至 50 mL。用移液管移取 10 mL 该溶液, 转入 50 mL 容量瓶内, 精准地加入 5 mL 内标溶液 (A.2.5.1.5), 然后加入水与乙腈的混合液 (A.2.5.1.4), 并精确定容至刻度。

### A. 2. 5. 2 系统适应性

系统适用性要求1: 在爱德万甜标准品浓度最接近160 µg/mL的标准溶液色谱图中, 苯甲酸和爱德万甜色谱峰的分离度不低于10。(备注: 洗脱顺序必须是先苯甲酸, 然后爱德万甜。)

系统适用性要求 2: 当连续注射六次溶液时, 对于爱德万甜标准品浓度最接近 160 µg/mL 的标准溶液, 爱德万甜峰值保留时间的相对标准偏差不超过 1.0%。

### A. 2. 6 测定

分别将标准溶液注射到色谱仪中(包括标准贮备溶液), 记录色谱图, 测定所生成色谱图中主要色谱峰的峰面积响应值 (注: 爱德万甜保留时间约为 16.5 min)。爱德万甜典型液相色谱图参见附录 B。对于每种标准溶液, 计算爱德万甜峰面积响应值与内标物苯甲酸峰面积响应值的比率。绘制生成的峰面积响应值比率和标准溶液浓度之间的标准曲线。将试样溶液注射到色谱仪中, 记录色谱图, 测定所生成色谱图中主要色谱峰的峰面积响应值。计算爱德万甜峰值的峰面积响应值和内标物苯甲酸的峰面积响应的比率。利用标准曲线, 测定试样溶液

中爱德万甜浓度( $C_A$ ), 单位为  $\mu\text{g/mL}$ 。

### A. 2. 7 计算

试样中爱德万甜百分比 $W_A$ 按式 (A. 1) 计算:

$$W_A = \frac{C_A}{C_U} \times 100 \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中:

$C_A$  ——由标准曲线测定的试样溶液爱德万甜浓度( $\mu\text{g/mL}$ );

$C_U$  ——试样溶液的浓度( $\mu\text{g/mL}$ );

100 ——百分比。

### A. 3 爱德万甜酸和其他相关物质的测定

#### A. 3. 1 方法提要

用高效液相色谱测定法, 在选定的工作条件下, 通过色谱柱使试样溶液中各组份分离, 用紫外检测器检测, 用内标法定量, 计算试样中爱德万甜酸和其他相关物质的含量。

#### A. 3. 2 试剂与材料

A. 3. 2. 1 爱德万甜酸标准品。

A. 3. 2. 2 爱德万甜标准品。

A. 3. 2. 3 乙腈: 分析纯。

A. 3. 2. 4 磷酸二氢钾。

A. 3. 2. 5 磷酸。

#### A. 3. 3 仪器与设备

A. 3. 3. 1 高效液相色谱系统 (HPLC)。

A. 3. 3. 2 恒流泵。

A. 3. 3. 3 紫外检测器。

#### A. 3. 4 参考色谱分析条件

参考色谱分析条件见表 A.2

表 A. 2 参考色谱分析条件

色谱柱:	反相柱 (C18), 内径 4.6 mm×250 mm, 5 $\mu\text{m}$ 粒径, 或其他等效色谱柱	
色谱柱温度:	50 $^{\circ}\text{C}$	
流动相 A:	磷酸盐缓冲液 (pH 2.8) 和乙腈混合液 (9: 1 体积比)	
流动相 B:	磷酸盐缓冲液 (pH 2.8) 和乙腈混合液 (2: 3 体积比)	
流速:	1.0 mL/min	
进样量:	20 $\mu\text{L}$	
检测器:	紫外检测器, 检测波长: 210 nm	
运行时间:	80 min	
梯度洗脱程序:		
时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	85	15
30.0	85	15

55.0	75	25
75.0	0	100
80.0	0	100
80.1	85	15
90.0	85	15

### A. 3.5 分析步骤

#### A. 3.5.1 溶液制备

##### A. 3.5.1.1 磷酸盐缓冲液的制备

准确称取 13.61 g 磷酸二氢钾 (A.3.2.4)，溶解在 1000 mL 水中，用磷酸 (A.3.2.5) 调节 pH 为 2.8，制成磷酸盐缓冲液。

##### A. 3.5.1.2 流动相 A

准确量取 900 mL 磷酸盐缓冲溶液 (A.3.5.1.1)，加入 100 mL 乙腈 (A.3.2.3)，混匀，用超声波处理约 5 min。

##### A. 3.5.1.3 流动相 B

准确量取 400 mL 磷酸盐缓冲溶液 (A.3.5.1.1)，加入 600 mL 乙腈 (A.3.2.3)，混匀，用超声波处理约 5 min。

##### A. 3.5.1.4 标准溶液制备

将爱德万甜酸标准品 (A.3.2.1) 溶解于水和乙腈混合液 (A.2.5.1.4)，配制成浓度为 15、10、2 和 0.2  $\mu\text{g/mL}$  的溶液。

##### A. 3.5.1.5 试样溶液制备

在水和乙腈混合液溶液 (A.2.5.1.4) 中溶解试样，配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液。

##### A. 3.5.1.6 系统适应性溶液制备

在水和乙腈混合液溶液 (A.2.5.1.4) 中，制备含有 10  $\mu\text{g/mL}$  爱德万甜标准品 (A.3.2.2) 溶液，及 10  $\mu\text{g/mL}$  爱德万甜酸标准品 (A.3.2.1) 溶液。

#### A. 3.5.2 系统适应性要求

在系统适应性溶液谱图中，爱德万甜和爱德万甜酸色谱峰的分离度不小于 3.0。

备注：爱德万甜酸和爱德万甜的保留时间分别约为 29.6 min 和 56.0 min。

#### A. 3.6 测定

分别将标准溶液和试样溶液注入色谱仪中，记录色谱图；测定所生成色谱图中的峰面积响应值。爱德万甜酸和其他相关物质典型液相色谱图见附录 C。

#### A. 3.7 计算

爱德万甜酸的百分比  $W_{AA}$  按式 (A.2) 计算：

$$W_{AA} = \frac{r_u \times C_s}{r_s \times C_u} \times 100 \dots \dots \dots (A.2)$$

式中：

$r_u$  —— 试样溶液色谱图中爱德万甜酸的峰面积响应值；

$r_s$  —— 标准溶液色谱图中爱德万甜酸的峰面积响应值；

$C_s$  —— 标准溶液的浓度，单位  $\mu\text{g/mL}$ ；

$C_u$  —— 试样溶液的浓度，单位  $\mu\text{g/mL}$ ；  
100 —— 百分比。

其他相关物质的总百分比  $W_Q$  按式 (A.3) 计算：

$$W_Q = \frac{r_T \times C_S}{r_S \times C_U} \times 100 \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

- $r_T$  —— 试样溶液色谱图中爱德万甜和爱德万甜酸之外其他成分的峰面积响应值之和；
- $r_S$  —— 标准溶液色谱图中爱德万甜酸的峰面积响应值；
- $C_S$  —— 标准溶液的浓度，单位  $\mu\text{g/mL}$ ；
- $C_U$  —— 试样溶液的浓度，单位  $\mu\text{g/mL}$ ；
- 100 —— 百分比。

## 附录 B 爱德万甜典型液相色谱图

### B.1 爱德万甜典型液相色谱图

爱德万甜典型液相色谱图见图 B.1。

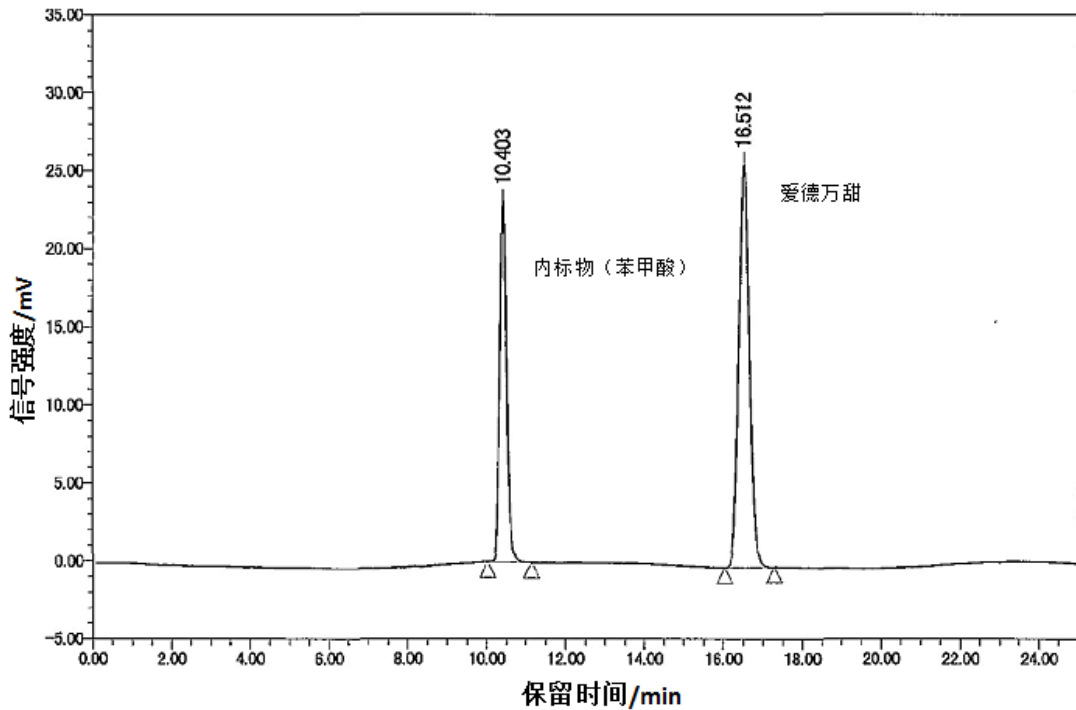


图 B.1 爱德万甜典型液相色谱图

## 附录 C

### 爱德万甜酸和其他相关物质典型液相色谱图

#### C.1 爱德万甜酸和其他相关物质典型液相色谱图

爱德万甜酸和其他相关物质典型液相色谱图见图 C.1。

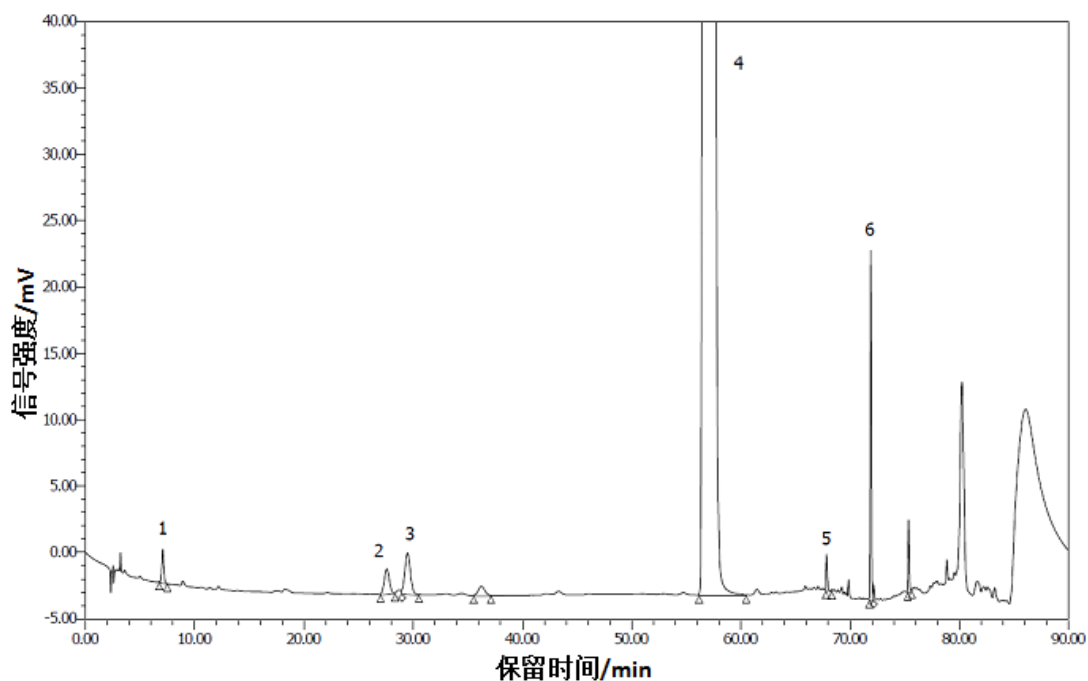


图 C.1 爱德万甜酸和其他相关物质典型液相色谱图

1. 阿斯巴甜 7.156
2. *N*-{*N*-[*N*-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)丙基]- $\alpha$ -L-天冬氨酰]- $\alpha$ -L-天冬氨酰-L-苯丙氨酸 1-甲酯 (N-Alkyl-AAPM) 27.664
3. 爱德万甜酸 29.250
4. 爱德万甜 56.894
5. *N*-{*N*-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)戊基]- $\alpha$ -L-天冬酰胺酶}-L-苯丙氨酸 1-甲酯 (9801-D) 67.925
6. *N*-{*N*-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)庚基]- $\alpha$ -L-天冬酰胺酶}-L-苯丙氨酸 1-甲酯 (9801-T) 71.972



## 附件 2

# 2-丙酰吡咯等 2 种食品用香料新品种

## 一、 2-丙酰吡咯

英文名称：2-Propionylpyrrole

功能分类：食品用香料

### （一）用量及使用范围

配制成食品用香精用于各类食品（GB2760-2014 表 B.1 食品类别除外），用量为按生产需要适量使用。

### （二）质量规格要求

#### 1 范围

本标准适用于由吡咯为原料经化学反应制得食品添加剂 2-丙酰吡咯。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

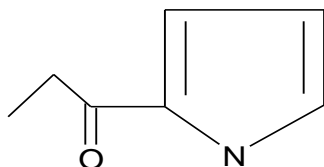
##### 2.1 化学名称

2-丙酰吡咯

##### 2.2 分子式

$C_7H_9NO$

##### 2.3 结构式



##### 2.4 相对分子质量

123.16 (按 2007 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	白色至黄色	将试样置于一洁净白纸上，用目测法观察
状态	固体	
香气	橡胶、皮革、喹啉样气息	GB/T 14454.2

### 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
2-丙酰吡咯含量, w /%	≥ 99.0	附录 A
熔点 (°C)	49.0~52.0	GB/T 14457.3

#### 附录 A

##### 2-丙酰吡咯含量的测定

###### A.1 仪器和设备

A.1.1 色谱仪：按GB/T 11538—2006中第5章的规定。

A.1.2 柱：毛细管柱。

A.1.3 检测器：氢火焰离子化检测器。

###### A.2 测定方法

面积归一化法：按 GB/T 11538—2006 中 10.4 测定含量。

试样制备：称取试样 0.1g 溶于 10mL 无水乙醇中，摇匀备用。

###### A.3 重复性及结果表示

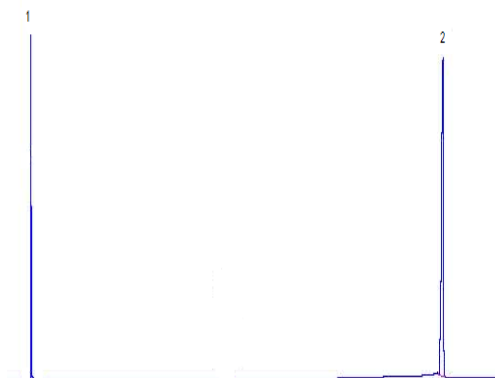
按 GB/T 11538—2006 中 11.4 规定进行，应符合要求。

食品添加剂 2-丙酰吡咯气相色谱图及操作条件参见附录 B。

#### 附录 B

##### 食品添加剂 2-丙酰吡咯气相色谱图及操作条件 (面积归一化法)

B.1 食品添加剂 2-丙酰吡咯气相色谱图见图B.1。



说明：

1—乙醇(溶剂)；

2—2-丙酰吡咯。

图 B.1 食品添加剂2-丙酰吡咯气相色谱图

## B.2 操作条件

- B.2.1 柱：毛细管柱，长25 m，内径0.20 mm。
- B.2.2 固定相：甲基硅。
- B.2.3 膜厚：0.33 μm。
- B.2.4 色谱炉温度：75 °C恒温4 min，然后线性程序升温从75 °C至220 °C，速率2 °C/min，最后在225 °C恒温8 min。
- B.2.5 进样口温度：250 °C。
- B.2.6 检测器温度：250 °C。
- B.2.7 检测器：氢火焰离子化检测器。
- B.2.8 载气：氮气。
- B.2.9 柱前压：0.06 MPa。
- B.2.10 进样量：0.1 μL。
- B.2.11 分流比：75:1。

---

## 二、 烯丙基-1-丙烯基二硫醚

英文名称：Allyl 1-propenyl disulfide

功能分类：食品用香料

### (一) 用量及使用范围

配制成食品用香精用于各类食品（GB2760-2014 表 B.1 食品类别除外），用量为按生产需要适量使用。

### (二) 质量规格要求

#### 1 范围

本标准适用于由烯丙基硫醇为原料经化学反应制得的食物添加剂烯丙基-1-丙烯基二硫醚。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

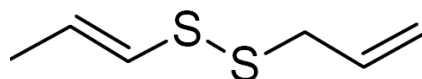
##### 2.1 化学名称

烯丙基-1-丙烯基二硫醚

##### 2.2 分子式

$C_6H_{10}S_2$

##### 2.3 结构式



##### 2.4 相对分子质量

146.27 (按 2007 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	浅黄色	将试样置于比色管内，用目测法观察
状态	液体	
香气	大蒜样气息	GB/T 14454.2

### 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
烯丙基-1-丙烯基二硫醚含量, w/%	≥ 95.0 (两个异构体之和)	附录 A
折光指数(20 °C)	1.5412~1.5512	GB/T 14454.4
相对密度(20 °C/20 °C)	1.004~1.014	GB/T 11540

#### 附录 A

##### 烯丙基-1-丙烯基二硫醚含量的测定

#### A.1 仪器和设备

A.1.1 色谱仪：按GB/T 11538—2006中第5章的规定。

A.1.2 柱：毛细管柱。

A.1.3 检测器：氢火焰离子化检测器。

#### A.2 测定方法

面积归一化法：按 GB/T 11538—2006 中 10.4 测定含量。

#### A.3 重复性及结果表示

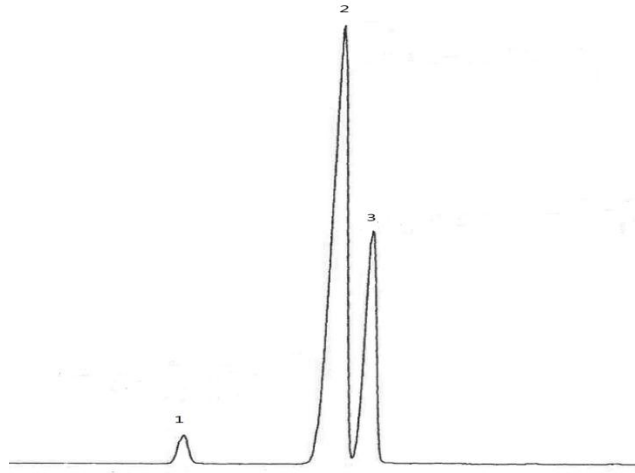
按 GB/T 11538—2006 中 11.4 规定进行，应符合要求。

食品添加剂烯丙基-1-丙烯基二硫醚气相色谱图及操作条件参见附录 B。

#### 附录 B

##### 食品添加剂烯丙基-1-丙烯基二硫醚气相色谱图及操作条件 (面积归一化法)

B.1 食品添加剂烯丙基-1-丙烯基二硫醚气相色谱图见图B.1。



说明:

- 1—双(烯丙基硫)醚;
- 2—顺式-烯丙基-1-丙烯基二硫醚;
- 3—反式-烯丙基-1-丙烯基二硫醚。

图 B.1 食品添加剂烯丙基-1-丙烯基二硫醚气相色谱图

## B.2 操作条件

- B.2.1 柱: 毛细管柱, 长50 m, 内径0.32 mm。
- B.2.2 固定相: 甲基硅。
- B.2.3 膜厚: 0.5  $\mu\text{m}$ 。
- B.2.4 色谱炉温度: 75  $^{\circ}\text{C}$ 恒温4 min, 然后线性程序升温从75  $^{\circ}\text{C}$ 至220  $^{\circ}\text{C}$ , 速率2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 最后在220  $^{\circ}\text{C}$ 恒温8 min。
- B.2.5 进样口温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ 。
- B.2.6 检测器温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ 。
- B.2.7 检测器: 氢火焰离子化检测器。
- B.2.8 载气: 氮气。
- B.2.9 柱前压: 0.06 MPa。
- B.2.10 进样量: 0.1  $\mu\text{L}$ 。
- B.2.11 分流比: 75:1。

## 附件 3

# 食品工业用酶制剂新品种 $\beta$ -葡聚糖酶

酶	来源	供体
$\beta$ -葡聚糖酶	绳状青霉 <i>Penicillium funiculosum</i>	—

$\beta$ -葡聚糖酶的质量规格要求应符合《食品安全国家标准 食品工业用酶制剂》(GB1886.174-2016)的规定。

## 附件 4

# (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐等 2 种食品营养强化剂新品种

## 一、(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐

英文名称：(6S)-5-methyltetrahydrofolic acid, glucosamine salt

功能分类：食品营养强化剂

### (一) 用量及使用范围

食品分类号	食品名称	使用量	备注
14.06	固体饮料	600 µg/kg ~ 6000 µg/kg	以叶酸计

### (二) 质量规格要求

#### 1 范围

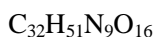
本标准适用于以叶酸为原料，经甲基化、盐化、结晶、冻干等工艺生产而成的食品营养强化剂(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

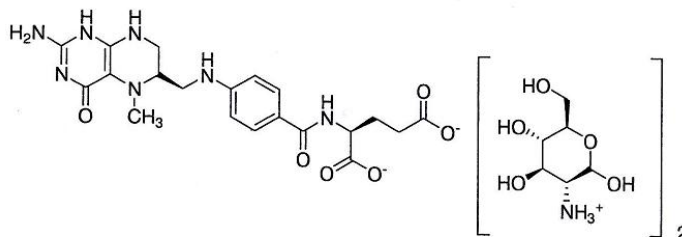
##### 2.1 化学名称

N-[4-[[[(6S)-2-氨基-1,4,5,6,7,8-六元-5-甲基-4-含氧-6-蝶啶]甲基]氨基]苯甲酰]-L-谷氨酸，氨基葡萄糖盐

##### 2.2 分子式



##### 2.3 结构式



##### 2.4 相对分子质量

817.80 (按 2007 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	乳白色至淡棕色	取适量样品置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下，观察其色泽和状态
状态	粉末，无肉眼可见杂质	

气味	无臭	态、嗅其气味。
----	----	---------

### 3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的要求。

表 2 理化指标

项 目		指 标	检验方法
(6S)-5-甲基四氢叶酸, 氨基葡萄糖盐, w/%		96 ~ 105	附录 A中A.2
(6S)-5-甲基四氢叶酸 (以干基计), w/%		54 ~ 59	附录 A中A.2
氨基葡萄糖 (以干基计), w/%		34 ~ 46	附录 A中A.3
非对映异构体 ((6S)-5-甲基四氢叶酸), w/%		≥ 99.0	附录 A中A.4
水分, w/%		≤ 8	GB 5009.3 第四法
灰分, w/%		≤ 0.2	GB 5009.4
重金属(以Pb计)/(mg/kg)		≤ 10	GB 5009.74
铅(Pb)/(mg/kg)		≤ 2.0	GB 5009.12
镉(Cd)/(mg/kg)		≤ 1.0	GB 5009.15
汞(Hg)/(mg/kg)		≤ 0.1	GB 5009.17
杂质	4-氨基苯甲酰谷氨酸 (ABGA), w/%	≤ 0.3	附录 A中A.5
	4 $\alpha$ -羟基-5-甲基四氢叶酸 (HOMEThFA), w/%	≤ 1.0	附录 A中A.5
	(6S)-吡嗪-s-三嗪衍生物 [(6S)-Mefox], w/%	≤ 0.3	附录 A中A.5
	5-甲基四氢蝶酸 (MeTHPA), w/%	≤ 0.3	附录 A中A.5
	总杂质, w/%	≤ 2.5	附录 A中A.5

### 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)	≤ 100	GB 4789.2
大肠菌群/(MPN/g)	< 3.0	GB 4789.3
霉菌和酵母/(CFU/g)	≤ 100	GB 4789.15
致病菌 (沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌)	不得检出	GB 4789.4、GB 4789.5、GB 4789.10

## 附 录 A

### 检 验 方 法

#### A.1 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 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, 在没有注明其他要求时, 均按 GB/T 601、GB/T 602、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 (6S)-5-甲基四氢叶酸, 氨基葡萄糖盐和 (6S)-5-甲基四氢叶酸 (以干基计) 的测定

##### A.2.1 试剂和材料

##### A.2.1.1 水。



- A. 2. 1. 2 乙腈，色谱纯。
- A. 2. 1. 3 磷酸二氢钾。
- A. 2. 1. 4 氢氧化钾。
- A. 2. 1. 5 (6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品：摩尔质量  $M_{C_{20}H_{23}CaN_7O_6}=497.52 \text{ g/mol}$ 。
- A. 2. 1. 6 氢氧化钾溶液： $c(\text{KOH})=20 \text{ g/100 mL}$ 。

#### A. 2. 2 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备紫外-可见光检测器。

#### A. 2. 3 参考色谱条件

参考色谱条件见表A.1。

表A. 1 参考色谱条件

色谱柱	反相 $C_{18}$ 柱，4.6 mm×250 mm，粒径 5 $\mu\text{m}$ ；或其他等效的色谱柱。
流动相	流动相A：称取6.8 g 磷酸二氢钾溶解于1L水中，用氢氧化钾溶液调节pH至6.5。过滤并超声。
	流动相B：称取4.08 g 磷酸二氢钾溶解于 650 mL 水中，与 350 mL 乙腈混合，用氢氧化钾溶液调节pH至 8.0。过滤并超声。
流速	1.0 mL/min
检测波长	280 nm
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
运行时长	36 min
进样体积	10 $\mu\text{L}$

#### A. 2. 4 线性梯度情况

线性梯度情况见表A.2。

表A. 2 线性梯度情况

时间 (min)	流动相 B%	步骤
0	0	等度
15	40	线性梯度
17	70	线性梯度
22	70	等度
31	0	线性梯度
36	0	线性梯度

(6S)-5-甲基四氢叶酸的保留时间 (Rt)：约13 min

5-甲基四氢蝶酸的保留时间 (Rt)：约15 min

#### A. 2. 5 分析步骤

##### A. 2. 5. 1 标准溶液的制备

称取一定量的(6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品（相当于0.040 g (6S)-5-甲基四氢叶酸），精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，先用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20  $^{\circ}\text{C}$ 环境下（在超声浴中放入冰块）超声2 min，经0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后立即进样。

##### A. 2. 5. 2 试样溶液的制备

称取0.070 g 试样，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，先用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20 ℃ 环境下（在超声浴中放入冰块）超声2 min，经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。(6S)-5-甲基四氢叶酸试样溶液的参考色谱图见附录B。

#### A. 2. 5. 3 系统适用性试验

按照以下步骤执行系统适用性试验。使用带冷却功能的自动进样器，设置温度低于8℃；若使用不带冷却功能的进样器，进样前需将溶液在2℃~ 8℃ 下储存。进行五次标准溶液进样，计算如下参数见表A.3。

表A. 3 系统适用性试验参数

参数		限值
RSD (峰面积), %	≤	2.0
RSD (保留时间), %	≤	1.0
拖尾因子	≤	2
理论塔板数	≥	40000

#### A. 2. 5. 4 测定

在表A.1色谱条件下，将水（不含溶质）注入，按照上述时间运行色谱仪。然后分别对标准溶液和试样溶液进行色谱分析。

[注：分析结束后，使用乙腈和水（65：35）的混合溶液冲洗色谱柱，随后用乙腈和水（65：35）混合溶液封柱。]

#### A. 2. 6 结果计算

(6S)-5-甲基四氢叶酸(以干基计)的质量分数  $w_1$ ，按式 (A.1) 计算：

$$w_1 = \frac{A_C \times m_{Std} \times T\%}{A_{Std} \times m_C \times (100\% - M)} \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

- $A_C$  —— 试样溶液色谱图中(6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积；
- $m_{Std}$  —— 标准品的质量，单位为克 (g)；
- $T\%$  —— (6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品中(6S)-5-甲基四氢叶酸的质量分数 (%)；
- $A_{Std}$  —— 标准溶液色谱图中(6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积；
- $m_C$  —— 试样的质量，单位为克 (g)；
- $M$  —— 试样的水分含量 (%)。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的2%。

(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的质量分数  $w_2$ ，按式 (A.2) 计算：

$$w_2 = \frac{w_1 \times M_1}{M_2} \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

$w_1$ ——(6S)-5-甲基四氢叶酸（以干基计）的质量分数（%）；

$M_1$ ——(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）  
（ $M_{C_{32}H_{51}N_9O_{16}}=817.80$ ）；

$M_2$ ——(6S)-5-甲基四氢叶酸的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M_{C_{20}H_{25}N_7O_6}=459.45$ ）。

### A. 3 氨基葡萄糖（以干基计）的测定

#### A. 3. 1 试剂和材料

A. 3. 1. 1 水。

A. 3. 1. 2 85%磷酸。

A. 3. 1. 3 乙腈，色谱纯。

A. 3. 1. 4 磷酸二氢钾。

A. 3. 1. 5 氢氧化钾。

A. 3. 1. 6 D-(+)-氨基葡萄糖盐酸盐标准品：摩尔质量  $M_{C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl}=215.63$  g / mol。

A. 3. 1. 7 乙腈-水溶液（1+1，体积比）：量取500 mL 水和500 mL 乙腈，混匀。

A. 3. 1. 8 氢氧化钾溶液： $c(KOH)=20$  g / 100 mL。

A. 3. 1. 9 20 mmol / L 磷酸盐缓冲溶液：精确称取2.72 g 磷酸二氢钾溶于水，用氢氧化钾溶液将pH准确调至7.5，加水定容至1 000 mL，过滤并超声。

#### A. 3. 2 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备紫外-可见光检测器。

#### A. 3. 3 参考色谱条件

参考色谱条件见表A.4。

表A. 4 参考色谱条件

色谱柱	NH <sub>2</sub> 柱，4.6 mm×250 mm，粒径5μm；或其他等效的色谱柱。
流动相	乙腈:20 mmol/L磷酸盐缓冲液=75:25
流动速度	1.5 mL/min
检测波长	195 nm
柱温	35 ℃
进样量	10 μL
时间	30 min

氨基葡萄糖的保留时间：约18 min

#### A. 3. 4 分析步骤

##### A. 3. 4. 1 氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液的制备

称取0.375 g 氨基葡萄糖盐酸盐标准品，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，加50 mL 乙腈-水溶液溶解后，用乙腈-水溶液定容至刻度，摇匀，立刻过滤并进样。

##### A. 3. 4. 2 试样溶液的制备

称取0.350 g 试样，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，加50 mL 乙腈-水溶液溶解后，加乙腈-水溶液定容至刻度，摇匀，立刻过滤并进样。氨基葡萄糖试样溶液的参考色谱图见附录B。

##### A. 3. 4. 3 系统适用性试验

氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液进样5次，确定峰面积相对标准差（RSD）、拖尾因子和理

论塔板数。合格标准：RSD≤2.0%，拖尾因子≤2.0，理论塔板数≥1500。

#### A. 3. 4. 4 测定

按表A.4色谱条件，先注入氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液，根据上述时长进行色谱测定，记录色谱图，另取试样溶液，同法测定。

#### A. 3. 5 结果计算

氨基葡萄糖（以干基计）的质量分数  $w_3$ ，按式（A.3）计算：

$$w_3 = \frac{A_C \times m_{Std} \times T\%}{A_{Std} \times m_C \times (100\% - M)} \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$A_C$  ——试样溶液色谱图中氨基葡萄糖的峰面积；

$m_{Std}$  ——标准品的质量，单位为克（g）；

$T\%$  ——D-(+)-氨基葡萄糖盐酸盐标准品中D-(+)-氨基葡萄糖的质量分数（%）；

$A_{Std}$  ——标准溶液色谱图中氨基葡萄糖的峰面积；

$m_C$  ——试样的质量，单位为克（g）；

$M$  ——试样的水分含量（%）。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的2%。

### A. 4 非对映异构体（(6S)-5-甲基四氢叶酸）的测定

#### A. 4. 1 试剂和材料

A. 4. 1. 1 水。

A. 4. 1. 2 异丙醇，色谱纯。

A. 4. 1. 3 磷酸二氢钠。

A. 4. 1. 4 氢氧化钠。

A. 4. 1. 5 (6R,S)-5-甲基四氢叶酸钙盐。

A. 4. 1. 6 氢氧化钠溶液：c (NaOH)= 10 g / 100 mL

A. 4. 1. 7 100 mmol / L 磷酸钠缓冲溶液：将12.0 g 磷酸二氢钠溶于水中，用氢氧化钠溶液调节pH至7.0，加水定容至1 000 mL，过滤并超声。

#### A. 4. 2 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备紫外-可见光检测器。

#### A. 4. 3 参考色谱条件

参考色谱条件见表A.5。

表A. 5 参考色谱条件

色谱柱	HSA手性柱，4.0 mm×100 mm，粒径5 μm；或其他等效的色谱柱。
流动相	异丙醇：100 mmol / L 磷酸钠缓冲溶液= 6:94
流速	0.7 mL / min，调整流速，使(6S)-5-甲基四氢叶酸保留时间约为4.7 min
检测波长	225 nm
柱温	30 ℃
运行时长	20 min
进样量	5 μL
(6R)、(6S)分离度	不小于2

#### A. 4. 4 分析步骤

##### A. 4. 4. 1 标准溶液的制备(用于峰识别和计算分离度)

称取约0.025 g (6R,S)-5-甲基四氢叶酸钙盐, 精确至0.000 1 g, 置于100 mL 容量瓶中, 用90 mL水溶解, 20 ℃ 超声1 min, 用水定容至刻度。移取5 mL 该溶液至10 mL 容量瓶中, 用流动相定容, 经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。

##### A. 4. 4. 2 试样溶液的制备

称取约0.035 g 试样, 精确至0.000 1 g, 置于100 mL 容量瓶中, 用90 mL 水溶解。20 ℃ 超声1 min, 用水定容至刻度。移取5 mL 该溶液至10 mL 容量瓶中, 用流动相定容, 经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。

##### A. 4. 4. 3 测定

首先进样标准溶液, 检查系统适用性。(6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸的分离度应不小于2。然后进样试样溶液。

分离度 $R$ , 按式(A.4)计算:

$$R = \frac{1.18 \times (T_2 - T_1)}{W_1 + W_2} \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

$T_2$  ——相邻两色谱峰中后一峰的保留时间, 单位为分钟 (min);

$T_1$  ——相邻两色谱峰中前一峰的保留时间, 单位为分钟 (min);

$W_1$  ——相邻两色谱峰中前一峰的半高峰宽;

$W_2$  ——相邻两色谱峰中后一峰的半高峰宽;

1.18 ——分离度系数。

##### A. 4. 4. 4 保留时间

(6S)-5-甲基四氢叶酸: 约4.7 min。

(6R)-5-甲基四氢叶酸: 约8.7 min。

注: 标准溶液和试样溶液必须在制备好后立即进样。

##### A. 4. 5 结果计算

非对映异构体(6S)-5-甲基四氢叶酸的质量分数  $w_4$ , 按式(A.5)计算:

$$w_4 = \frac{A_S}{A_S + A_R} \times 100\% \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

$A_S$  ——试样溶液色谱图中 (6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积;

$A_R$  ——试样溶液色谱图中 (6R)-5-甲基四氢叶酸的峰面积;

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的2%。

#### A. 5 杂质的测定

### A. 5.1 试剂和材料

A. 5.1.1 水。

A. 5.1.2 磷酸二氢钾。

A. 5.1.3 氢氧化钾。

A. 5.1.4 乙腈，色谱纯。

A. 5.1.5 (6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品：摩尔质量  $M_{C_{20}H_{23}CaN_7O_6}=497.52 \text{ g/mol}$ 。

A. 5.1.6 氢氧化钾溶液： $c(\text{KOH})=20 \text{ g/100 mL}$

### A. 5.2 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备紫外-可见光检测器。

### A. 5.3 参考色谱条件

参考色谱条件见表A.6。

表A.6 参考色谱条件

色谱柱	反相 $C_{18}$ 柱，4.6 mm×250 mm，粒径5 $\mu\text{m}$ ；或其他等效的色谱柱。
流动相	流动相A：称取 6.8 g 磷酸二氢钾溶于1 L 水中，用氢氧化钾溶液调节 pH至6.5。过滤并超声。
	流动相B：称取4.08 g 磷酸二氢钾溶于 650 mL 水中，与 350 mL 乙腈混合，用氢氧化钾溶液调节 pH至 8.0。过滤并超声。
流速	1.0 mL/min
检测波长	280 nm
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
运行时长	36 min
进样量	10 $\mu\text{L}$

### A. 5.4 线性梯度情况

线性梯度情况见表A.7。

表A.7 线性梯度情况

时间 (min)	流动相 B%	步骤
0	0	等度
15	40	线性梯度
17	70	线性梯度
22	70	等度
31	0	线性梯度
36	0	线性梯度

(6S)-5-甲基四氢叶酸的保留时间 (Rt)：约13 min。

5-甲基四氢蝶酸的保留时间 (Rt)：约15 min。

### A. 5.5 分析步骤

#### A. 5.5.1 标准溶液的制备

称取一定量的(6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品[相当于0.040 g (6S)-5-甲基四氢叶酸]，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20  $^{\circ}\text{C}$  环境下（在超声浴中放入冰块）超声2 min。经0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后立即

进样。

#### A. 5. 5. 2 试样溶液的制备

称取0.070 g 试样，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20 ℃ 环境下（在超声浴中放入冰块）超声2 min。经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。

#### A. 5. 5. 3 保留时间（近似值）

表A. 8 单个杂质的保留时间

杂质	指示性保留时间 (min)
4-氨基苯甲酰谷氨酸 (ABGA)	5.6
4α-羟基-5-甲基四氢叶酸 (HOMeTHFA)	6.5
(6S)-吡嗪-s-三嗪衍生物 [(6S)-Mefox]	8.6
5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF)	13.2
5-甲基四氢蝶酸 (MeTHPA)	14.7

#### A. 5. 5. 4 系统适用性试验

按照以下步骤执行系统适用性试验。进行五次标准溶液进样，计算如下参数：

表A. 9 系统适用性试验参数

参数	限值
RSD（面积），%	≤ 2.0
RSD（保留时间），%	≤ 1.0
拖尾因子	≤ 2
理论塔板数	≥ 40000

#### A. 5. 5. 5 测定

在测试条件下进样水（空白），运行色谱系统至规定时间。以相同步骤分析标准溶液和试样溶液。

[注意：分析结束后，使用乙腈和水（65：35）的混合液冲洗色谱柱，然后用乙腈和水（65：35）混合溶液封柱。]

#### A. 5. 6 结果计算

利用试样溶液色谱图计算所有单个杂质的质量分数  $X_i$ ，范围包括除主峰以外的所有色谱峰，并忽略试样溶液（0.1 %）色谱图中峰面积为主峰面积0.1 倍的所有峰。

单个杂质的质量分数  $X_i$ ，按式（A.6）计算：

$$X_i = \frac{A_i \times m_{Std} \times T\% \times (RF)_i}{A_{Std} \times m_C} \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

$A_i$  ——试样溶液色谱图中单个杂质的峰面积；

$m_{Std}$  ——标准品的质量，单位为克（g）；

$T\%$  ——(6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品中(6S)-5-甲基四氢叶酸的质量分数（%）；

$(RF)_i$  ——单个杂质的响应因子。

$A_{Std}$  ——标准溶液色谱图中(6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积；

$m_c$  ——试样的质量，单位为克（g）；

注：5-甲基四氢蝶酸的RF为0.68，其他单个杂质的RF均为1.00。

总杂质为单个杂质的质量分数相加，总杂质的质量分数 $w_5$ ，按式（A.7）计算：

$$w_5 = \sum X_i \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

$X_i$  ——单个杂质的质量分数（%）。

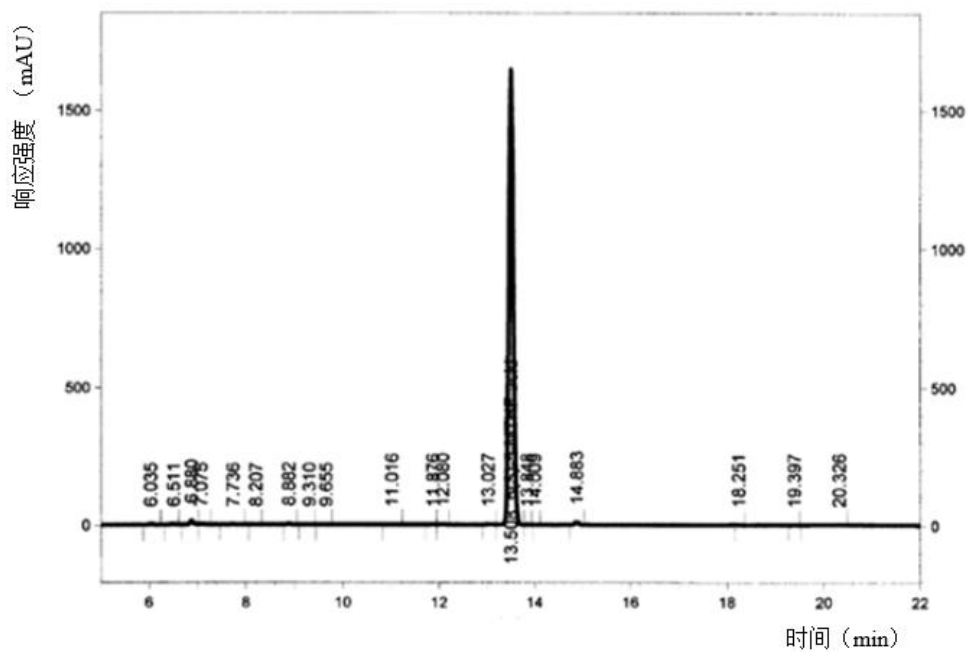


## 附录 B

### (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖含量测定高效液相色谱图

#### B.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸的参考色谱

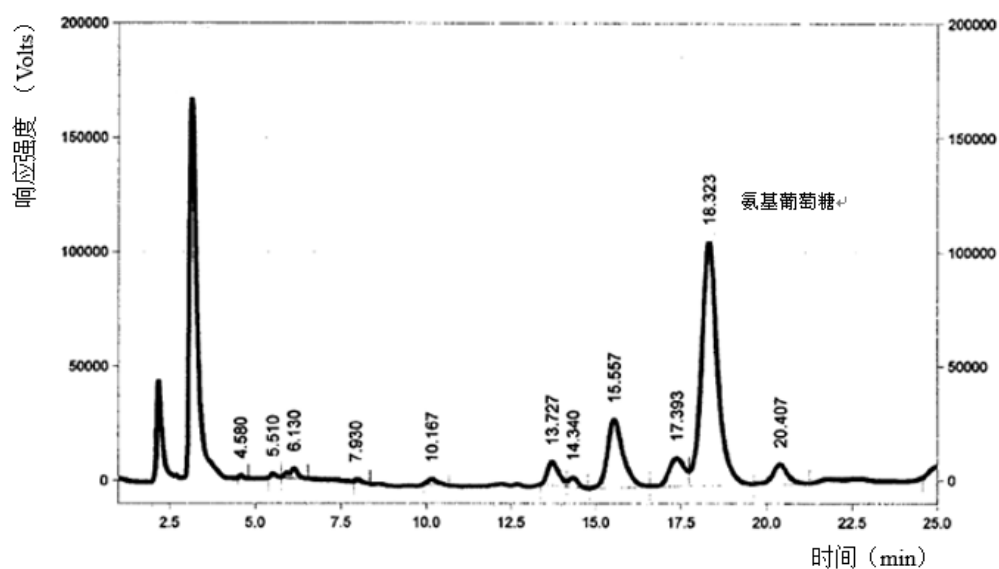
(6S)-5-甲基四氢叶酸的参考色谱见图B.1。



图B.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸的参考色谱图

#### B.2 氨基葡萄糖的参考色谱图

氨基葡萄糖的参考色谱图见图B.2。



图B.2 氨基葡萄糖的参考色谱图

## 二、低聚半乳糖（乳清滤出液来源）

英文名称：Galacto-oligosaccharides（GOS）（sourced from whey permeate）

功能分类：食品营养强化剂

### （一）用量及使用范围

食品分类号	食品名称	使用量
13.01	婴幼儿配方食品	单独或混合使用，该类物质的总量不超过 64.5 g/kg
13.02.01	婴幼儿谷类辅助食品	

### （二）质量规格要求

#### 1 范围

本标准适用于以乳清滤出液为原料，经米曲霉(*Aspergillus oryzae*)生产的 $\beta$ -半乳糖苷酶催化水解半乳糖苷键，将乳糖水解成为半乳糖和葡萄糖，同时通过转移半乳糖苷的作用，将水解下来的半乳糖苷转移到乳糖分子，制成的食品营养强化剂低聚半乳糖。

#### 2 技术要求

##### 2.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表1 感官要求

项 目	指 标	检 验 方 法
色泽与状态	白色或微黄色粉末	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，并嗅（品）其味
气味	无异味	
滋味	味甜	

##### 2.2 理化要求

理化指标要求应符合表 2 的规定。

表2 理化指标

项 目	指 标	检 验 方 法
低聚半乳糖含量（以干基计），w/%	$\geq$ 46	附录 A 中 A.2
乳糖含量（以干基计），w/%	25 ~45	附录 A 中 A.3
葡萄糖含量（以干基计），w/%	$\leq$ 10	附录 A 中 A.4
半乳糖含量（以干基计），w/%	$\leq$ 5	附录 A 中 A.4
唾液乳糖含量（以干基计），w/%	$\geq$ 0.2	附录 A 中 A.5
蛋白质（以干基计），w/%	$\leq$ 4.47	GB 5009.5
水分,w/%	$\leq$ 5.5	GB/T 20884
灰分（以干基计），w/%	$\leq$ 4	GB 5009.4
pH(10% 溶液)	5 ~6	GB/T 20885
铅（以 Pb 计）/（mg/kg）	$\leq$ 0.1	GB 5009.12

##### 2.3 微生物要求

微生物指标要求应符合表 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)	≤	3000	GB 4789.2
大肠菌群/(CFU /g)	≤	10	GB 4789.3
霉菌/(CFU /g)	≤	50	GB 4789.15
酵母菌/(CFU /g)	≤	50	GB 4789.15
金黄色葡萄球菌/25 g		不得检出	GB 4789.10
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 中规定的三级水。试验中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602、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 低聚半乳糖含量的测定

##### A. 2.1 高效液相色谱双柱法

###### A. 2.1.1 方法提要

试样用水提取后，分别利用银型阳离子交换柱、氨基柱分离，高效液相色谱-示差检测器测定，面积归一化法进行定量。

###### A. 2.1.2 试剂和材料

A. 2.1.2.1 乙腈：色谱纯。

A. 2.1.2.2 半乳糖、葡萄糖、乳糖、异乳糖、低聚半乳二糖、低聚半乳三糖、低聚半乳四糖、低聚半乳五糖、低聚半乳六糖、低聚半乳七糖、低聚半乳八糖标准品（纯度≥95%）。

A. 2.1.2.3 半乳糖、葡萄糖、乳糖、低聚半乳二糖、低聚半乳三糖、低聚半乳四糖、低聚半乳五糖、低聚半乳六糖、低聚半乳七糖、低聚半乳八糖各单组份标准溶液。

称取适量的半乳糖、葡萄糖、乳糖、低聚半乳二糖、低聚半乳三糖、低聚半乳四糖、低聚半乳五糖、低聚半乳六糖、低聚半乳七糖、低聚半乳八糖标准品，分别用适量的水溶解，配制成浓度分别为20 mg/mL的各单组份标准溶液。

###### A. 2.1.3 仪器和设备

A. 2.1.3.1 高效液相色谱仪，带示差检测器。

A. 2.1.3.2 超声波振荡器。

###### A. 2.1.4 分析步骤

###### A. 2.1.4.1 试样溶液的制备

称取试样 1.0 g，加适量的水溶解，于超声波振荡器中振荡 10 min，用水定容至 100 mL，混匀，0.2 μm 微孔滤膜过滤，用于银型阳离子交换柱测定。称取试样 5.0 g，加适量的水溶解，

于超声波振荡器中振荡 10 min，用水定容至 100 mL，混匀，0.2 μm 微孔滤膜过滤，用于氨基柱测定。

#### A. 2. 1. 4. 2 参考色谱条件

##### A. 2. 1. 4. 2. 1 银型阳离子交换柱参考色谱条件

A. 2. 1. 4. 2. 1. 1 银型阳离子交换柱（10 mm×200 mm）；或具有同等性能的色谱柱。

A. 2. 1. 4. 2. 1. 2 检测器温度：50℃。

A. 2. 1. 4. 2. 1. 3 流动相流速：0.3 mL/min。

A. 2. 1. 4. 2. 1. 4 柱温：75℃。

A. 2. 1. 4. 2. 1. 5 进样量：20 μL。

A. 2. 1. 4. 2. 1. 6 流动相：高纯水。

##### A. 2. 1. 4. 2. 2 氨基柱参考色谱条件

A. 2. 1. 4. 2. 2. 1 氨基柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；或具有同等性能的色谱柱。

A. 2. 1. 4. 2. 2. 2 流动相：乙腈：水=70：30。

A. 2. 1. 4. 2. 2. 3 流动相流速：1.0 mL/min。

A. 2. 1. 4. 2. 2. 4 检测器温度：40℃。

A. 2. 1. 4. 2. 2. 5 柱温：35℃。

A. 2. 1. 4. 2. 2. 6 进样量：20 μL。

#### A. 2. 1. 5 定性测定

在参考色谱条件（A.2.1.4.2.1）和（A.2.1.4.2.2）下，根据各单糖标准品的保留时间，与待测样品中组份的保留时间进行定性，定性色谱图参见附录B中图B.1和图B.2。

#### A. 2. 1. 6 定量测定

A. 2. 1. 6. 1 按照银型阳离子交换柱参考色谱条件（A.2.1.4.2.1）稳定好高效液相色谱仪，将制备的样品（A.2.1.4.1），注入高效液相色谱仪中，测定样品中各组份色谱峰面积，采用面积归一化法计算各组份相对百分含量。

A. 2. 1. 6. 2 按照氨基柱参考色谱条件（A.2.1.4.2.2）稳定好高效液相色谱仪，将制备的样品（A.2.1.4.1），注入高效液相色谱仪中，测定样品中各组份色谱峰面积，采用面积归一化法计算各组份相对百分含量。

#### A. 2. 1. 7 结果计算

A. 2. 1. 7. 1 银型阳离子交换柱，试样中组份*i*占总糖的相对百分比含量*DP<sub>i</sub>*按式（A.1）计算：

$$DP_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

*A<sub>i</sub>* —— 试样中组份*i*的峰面积；

$\sum A_i$  —— 试样中所有各组份的峰面积的总和；

100 —— 单位换算系数。

A. 2. 1. 7. 2 氨基柱，试样中乳糖在总二糖中的百分比含量*X<sub>lac</sub>*按式（A.2）计算。

$$X_{lac} = \frac{A_{lac}}{A_{gd} + A_{is} + A_{lac}} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

$A_{gd}$ ——试样中低聚半乳糖二糖的峰面积；

$A_{is}$  ——试样中异乳糖的峰面积；

$A_{lac}$ ——试样中乳糖的峰面积；

100 ——单位换算系数。

A. 2. 1. 7. 3 试样中低聚半乳糖百分比含量 $G_n$ 按式 (A.3) 计算。

$$G_n = 100 - DP_{gl} - DP_{glu} - X_{lac} \times PD_2 \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$DP_{gl}$  ——试样中半乳糖在总糖中的百分含量，%；

$DP_{glu}$  ——试样中葡萄糖在总糖中的百分含量，%；

$PD_2$  —— 总二糖（低聚半乳糖二糖、乳糖、异乳糖）在总糖中的百分含量，%；

100 —— 单位换算系数。

#### A. 2. 1. 8 精密度

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的5%。

#### A. 2. 2 高效液相色谱法

##### A. 2. 2. 1 方法提要

在邻氨基苯甲酸酰胺标记后，利用内标法确定不同低聚糖的摩尔浓度，通过不同低聚糖的分子量，将摩尔浓度换算为质量浓度进行定量。

##### A. 2. 2. 2 试剂和材料

A. 2. 2. 2. 1 二甲亚砜，纯度> 99.9%。

A. 2. 2. 2. 2 邻氨基苯甲酸酰胺，纯度> 98%。

A. 2. 2. 2. 3 氰基硼氢化钠，纯度> 95%。

A. 2. 2. 2. 4 甲酸 纯度：98~100%。

A. 2. 2. 2. 5 乙腈，纯度> 99%。

A. 2. 2. 2. 6 25%氢氧化铵溶液。

A. 2. 2. 2. 7 昆布三糖，纯度> 90%。

A. 2. 2. 2. 8 麦芽三糖，纯度> 95%。

A. 2. 2. 2. 9 无水乙酸，纯度：100%。

A. 2. 2. 2. 10 麦芽三糖标准储备液：3.0  $\mu\text{mol/mL}$ 。

称取 75.0 $\pm$ 5.0mg 麦芽三糖(A.2.2.2.8)，精确到 0.1 mg。在 50mL 容量瓶中用 40 mL 水溶解，加水定容至刻度。此溶液可在 4  $^{\circ}\text{C}$  下存放 1 周。

A. 2. 2. 2. 11 麦芽三糖标准工作液：0.30  $\mu\text{mol/mL}$ 。

用移液枪量取 10.0 mL 麦芽三糖标准储备液(A.2.2.2.10) 到 100 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。此溶液可在 4  $^{\circ}\text{C}$  下存放 1 周。

A. 2. 2. 2. 12 昆布三糖内标标准储备液：2.0  $\mu\text{mol/mL}$ 。

定量移取 50mg 昆布三糖(A.2.2.2.7)和大约 15 mL 水至 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。此溶液可在-18℃下存放 1 年。

**A. 2. 2. 2. 13 昆布三糖内标标准工作液: 0.4 μmol/mL。**

用移液枪移取 4 mL 昆布三糖内标标准储备液(A.2.2.2.12)至 20 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。此溶液可在-18℃下存放 1 年。

**A. 2. 2. 2. 14 水-乙腈(25%-75%)溶液。**

称取 50mL ± 1 mL 水和 150 mL ± 1 mL 乙腈(A.2.2.2.5)放入玻璃瓶中混合。此溶液可在室温下存放 3 个月。

**A. 2. 2. 2. 15 洗脱液 B: 甲酸铵, 50 mmol/L, pH 4.4。**

在盛有 800mL 水的烧杯中加入 2.3g ± 0.1g (1.89 mL)甲酸(A.2.2.2.4)。用氢氧化铵(A.2.2.2.6)调节 pH 至 4.40 ± 0.05。将溶液移入 1000mL 容量瓶中,加水定容至刻度。此溶液可在室温下存放 1 周。

**A. 2. 2. 2. 16 邻氨基苯甲酸酰胺标记试剂: 邻氨基苯甲酸酰胺[0.35mol/L] - 氰基硼氢化钠 [1.0mol/L] 二甲亚砷-乙酸[30%]溶液。**

根据实验中需要测定的最大样品数量,用移液枪移取相应量的二甲亚砷(A.2.2.2.1)和乙酸(A.2.2.2.9),放入 10 mL 玻璃管中使用涡旋混合器充分混合(参照表 A.1)。按表 A.1 准确称取相应质量的邻氨基苯甲酸酰胺和氰基硼氢化钠,放入玻璃管中,随后加入含有 30%乙酸的二甲亚砷通过使用涡旋混合器混合并使用超声波清洗机直至完全溶解(约 10min)。

**表 A.1 邻氨基苯甲酸酰胺标记试剂样品量**

最大检测数	含 30% 乙酸的二甲亚砷		邻氨基苯甲酸酰胺(0.35M)和氰基硼氢化钠(1M) 溶于含 30% 乙酸的二甲亚砷		
	二甲亚砷 (mL)	乙酸 (mL)	含 30% 乙酸的二 甲亚砷(mL)	邻氨基苯甲酸 酰胺(mg)	氰基硼氢化钠 (mg)
11	2.10	0.90	2.50	118 ± 5	157 ± 5
22	4.20	1.80	5.00	236 ± 10	314 ± 10
35	6.30	2.70	7.50	354 ± 10	471 ± 10
47	7.70	3.30	10.00	708 ± 10	942 ± 10

**A. 2. 2. 3 仪器和设备**

A. 2. 2. 3. 1 高效液相色谱仪配备荧光检测器。

A. 2. 2. 3. 2 带有自锁的 2 mL 离心管。

A. 2. 2. 3. 3 微型管架。

A. 2. 2. 3. 4 离心机。

A. 2. 2. 3. 5 水浴或加热平板。

A. 2. 2. 3. 6 涡旋混合器。

A. 2. 2. 3. 7 移液枪。

A. 2. 2. 3. 8 分析天平: 精度 0.1 mg。

A. 2. 2. 3. 9 超声波清洗机。

**A. 2. 2. 4 色谱参考条件**

A. 2. 2. 4. 1 色谱柱: 酰胺基 80 柱 3 μm; 4.6mm x 150mm, 或其他等效色谱柱。

- A. 2. 2. 4. 2 预分离柱：酰胺基 80 保护柱；3  $\mu\text{m}$ ；3.2mm x 15mm。
- A. 2. 2. 4. 3 柱温 23  $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- A. 2. 2. 4. 4 进样量：10  $\mu\text{L}$ 。
- A. 2. 2. 4. 5 流动相 A：乙腈(A.2.2.2.5)。
- A. 2. 2. 4. 6 流动相 B：甲酸铵(A.2.2.2.15)。
- A. 2. 2. 4. 7 梯度洗脱：洗脱程序参见表 A.2。

表 A.2 洗脱程序表

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相%		10 位 6 通阀切换位置
		A	B	
0	1.0	98	2	6/10-1(上样)
4.0	1.0	98	2	6/10-1 (上样)
7.5	1.0	98	2	1-2 (分析)
8.0	1.0	84	16	1-2 (分析)
16.0	1.0	84	16	1-2 (分析)
50.0	1.0	61	39	1-2 (分析)
51.0	0.80	20	80	1-2 (分析)
54.0	0.80	20	80	1-2 (分析)
55.0	0.80	90	10	1-2 (分析)
61.0	1.0	90	10	1-2 (分析)

A. 2. 2. 4. 8 激发波长：330nm。

A. 2. 2. 4. 9 发射波长：420nm。

#### A. 2. 2. 5 分析步骤

##### A. 2. 2. 5. 1 样品与溶液的制备

##### A. 2. 2. 5. 1. 1 试验溶液的制备

准确称取 0.250 g  $\pm$  0.050 g 低聚半乳糖放入容量瓶中，加 70 mL  $\pm$  5 mL 水。将容量瓶置于 70  $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  水浴中 20 min~25 min 并搅拌。将溶液冷却至室温，加水定容至刻度。

##### A. 2. 2. 5. 1. 2 空白试剂

在每个系列的检验中，向 500  $\mu\text{L}$  水中加入标记物，代替试验样品作为空白试剂。

##### A. 2. 2. 5. 1. 3 邻氨基苯甲酸酰胺标记

##### A. 2. 2. 5. 1. 3. 1 添加内标物

用移液枪量取 500  $\mu\text{L}$  试验溶液(A.2.2.5.1.1)或麦芽三糖标准工作液(A.2.2.2.11)至 2 mL 微型管中，随后向每个样品或标准液中加入 200  $\mu\text{L}$  昆布三糖内标标准工作液(A.2.2.2.13)，在漩涡混合器上进行混合。

##### A. 2. 2. 5. 1. 3. 2 邻氨基苯甲酸酰胺试剂的添加

量取 20  $\mu\text{L}$  含有内标物的试验溶液(A.2.2.5.1.3.1)放入 2 mL 微型管中，向每个微型管中加入 200  $\mu\text{L}$  邻氨基苯甲酸酰胺标记试剂(A.2.2.2.16)，在漩涡混合器上进行混合，随后置于 65  $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴中反应 2 h  $\pm$  5 min。每隔 20 min，漩涡混合一次。反应 2 h 后，混合试验溶液，并放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  环境下至少 10 min。

#### A. 2. 2. 5. 1. 4 样品稀释

在进行邻氨基苯甲酸酰胺标记后，向每个微型管中加入 1.5 mL 水-乙腈(25%-75%)溶液(A.2.2.2.14)。混合(旋涡混合)后在 10000g 下离心 5min，随后移取 1 mL 上清液至进样瓶中。将进样瓶置于自动进样器中(10℃)，进样 10 μL 标准溶液和试验样品。

#### A. 2. 2. 5. 2 仪器稳定性测试

使色谱系统在初始条件下平衡 15 min。确保基线和系统压力在开始检验前保持稳定，在开始试验前，至少进样一次参照样品或标准工作溶液。检查保留时间、分离与前次试验比较。通过检验不同浓度的麦芽三糖-邻氨基苯甲酸酰胺标准溶液的响应系数，检查荧光检测器在整个量程内的线性响应。

#### A. 2. 2. 5. 3 校准

在每一个分析序列中，两次重复测定含有与测试样品相同内标物( $Amt_{IS}$ )的麦芽三糖标准溶液。至少每 8 个测试样品之间需要重新进样标准品。以( $\frac{Area_{maltotriose}}{Area_{IS}}$ )的平均值为 Y 轴，标准溶液摩尔浓度( $\frac{Conc_{maltotriose}}{Conc_{IS}}$ )为 X 轴，来绘制通过原点的内标法校准曲线。

利用麦芽三糖标准曲线的响应系数，定量每一个确定色谱峰(或色谱峰组)在色谱图中的摩尔浓度。

#### A. 2. 2. 5. 4 鉴定和确认

积分和定性每一个色谱峰(或具有相同分子量的色谱峰组)。通过与参考液相色谱图(附录 B 中图 B.3)进行比较，确定不同色谱峰的分子量。

#### A. 2. 2. 6 结果计算

##### A. 2. 2. 6. 1 低聚糖的摩尔浓度

试样中低聚糖的摩尔浓度  $C_{OS}$ ，数值以 μmol/mL 表示，按式(A.4)计算。

$$C_{OS} = \frac{A_{OS_{sple}}}{A_{IS_{sple}}} \times \frac{C_{std}}{Amt_{IS_{std}}} \times \frac{A_{IS_{std}}}{A_{std}} \times Amt_{IS_{sple}} \times \frac{V}{m_{sple}} \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

- $C_{std}$  ——标准溶液中麦芽三糖的浓度，单位: μmol/mL;
- $Amt_{IS_{sple}}$  ——样品测试中加入昆布三糖内标溶液的量;
- $Amt_{IS_{std}}$  ——标准测试中加入昆布三糖内标溶液的量;
- $A_{OS_{sple}}$  ——进样样品中低聚半乳糖的峰面积;
- $A_{std}$  ——标准液中麦芽三糖的峰面积;
- $A_{IS_{sple}}$  ——进样样品中内标的峰面积;
- $A_{IS_{std}}$  ——标准液中内标的峰面积;
- $V$  ——样品的体积，单位 mL;



$m_{sple}$  —— 试验样品的质量，单位 mg。

#### A. 2. 2. 6. 2 低聚半乳糖的质量分数

低聚半乳糖（包括二糖或不包括二糖）的质量分数  $W$ ，以 g/100g 计，按式（A.5）计算。

$$W = \sum(C_{os} \times M) \times 0.0001 \dots \dots \dots (A.5)$$

式中：

$C_{os}$ ——测试样品中低聚糖的摩尔浓度，单位：μmol/g，按式(A.4)计算；

$M$ ——不同分析物的摩尔质量（见附录 B 中 B.3）；

0.0001——μg/g 到 g/100g 的转换系数。

#### A. 2. 2. 7 结果的表达

结果以低聚半乳糖（包括二糖或不包括二糖）的质量分数表示。

如果检验值高于 1.00g/100g，总低聚糖的结果（g/100g）保留 3 位有效数字。

如果检验值低于 1.00g/100g，总低聚糖的结果（g/100g）保留 2 位有效数字。

#### A. 2. 2. 8 精确性

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 0.65g/100g。

### A. 3 乳糖含量的测定

#### A. 3. 1 高效液相色谱双柱法

##### A. 3. 1. 1 分析步骤

同A.2.1.4。

##### A. 3. 1. 2 定量测定

同A.2.1.6。

##### A. 3. 1. 3 结果计算

试样中乳糖的质量分数  $W_{lac}$ （以干物质计），数值以%表示，按式（A.6）计算。

$$W_{lac} = X_{lac} \times DP_2 \dots \dots \dots (A.6)$$

式中，

$W_{lac}$ —— 试样中乳糖的含量，%；

$X_{lac}$ —— 试样中乳糖在总二糖中的百分含量，%；

$DP_2$ —— 总二糖（低聚半乳糖二糖、乳糖、异乳糖）在总糖中的百分含量，%。

##### A. 3. 1. 4 精密度

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的 5%。

#### A. 3. 2 直接计算法

试样中乳糖也可通过直接计算法得到，乳糖含量  $W_{lac}$ （以干物质计），用数值%表示，按式（A.7）计算。

$$W_{lac} = 100 - W_{gos} - W_{glu} - W_{gla} - W_{ash} - W_{pro} \dots \dots \dots (A.7)$$

式中，

$W_{lac}$ —— 试样中乳糖的含量，%；

$W_{gos}$ —— 试样中低聚半乳糖的百分含量，%；

$W_{glu}$ —— 试样中葡萄糖的百分含量，%；

$W_{gos}$ —— 试样中半乳糖的百分含量，%；

$W_{ash}$ —— 试样中灰分的百分含量，%；

$W_{pro}$ —— 试样中蛋白质的百分含量，%。

#### A. 4 葡萄糖和半乳糖含量的测定

##### A. 4. 1 高效液相色谱双柱法

###### A. 4. 1. 1 分析步骤

同A.2.1.4。

###### A. 4. 1. 2 定量测定

同A.2.1.6。

###### A. 4. 1. 3 结果计算

同A.2.1.7。

##### A. 4. 2 高效阴离子交换色谱 - 脉冲安培检测法

###### A. 4. 2. 1 方法提要

用热水提取糖，注入带有脉冲安培检测器的高效阴离子交换色谱（HPAEC-PAD）系统进行分析。糖在强碱性条件下部分电离，然后用阴离子交换色谱聚合柱分离。通过测量糖在金电极表面发生氧化反应所产生的电流，进行计算分析。柱后加碱可以增加检测器灵敏度和线性范围，以及稳定基线。

###### A. 4. 2. 2 试剂和材料

A. 4. 2. 2. 1 氢氧化钠溶液，50mmol/L。

A. 4. 2. 2. 2 50%（w/w）氢氧化钠溶液。

A. 4. 2. 2. 3 无水乙酸钠，纯度 > 99%。

A. 4. 2. 2. 4 D- (+) -无水葡萄糖，纯度 > 99.5%。

A. 4. 2. 2. 5 D-(+)-半乳糖，纯度> 99.0%。

A. 4. 2. 2. 6 甲醇。

A. 4. 2. 2. 7 氦气，纯度 > 99.996%。

A. 4. 2. 2. 8 含有指示剂的硅胶。

A. 4. 2. 2. 9 氢氧化钠溶液：0.05 mol/L。

用移液枪量取 10.0 mL 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液（A.4.2.2.1），至 1000 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。用聚乙烯瓶盛装保存于室温下，可稳定保存长达 6 个月。

A. 4. 2. 2. 10 洗脱液 A：氢氧化钠溶液：300 mmol/L。

用 1000 mL 量筒量取 985 mL 去离子水，注入仪器储液罐 A 中，用氦气（A.4.2.2.7）脱气 20min。用一次性塑料移液管加入 15.6 mL 50%（w/w）氢氧化钠溶液（A.4.2.2.2），缓慢涡旋混合。用氦气（A.4.2.2.7）喷洒 15 min。在室温下用氦气（A.4.2.2.7）（34.47 kPa~55.16 kPa）封闭保存。该溶液可保存 4 天。

#### A. 4. 2. 2. 11 洗脱液 B: 去离子水。

量取 2000 mL 去离子水, 注入仪器储液罐 B, 用氦气 (A.4.2.2.7) 脱气 20 min。该洗脱液须在使用当天配制, 用氦气 (A.4.2.2.7) (34.47 kPa~55.16 kPa) 封闭保存。

#### A. 4. 2. 2. 12 洗脱液 C: 氢氧化钠: 150 mmol/L, 乙酸钠: 500 mmol/L。

称取 41.0 g±0.1 g 无水乙酸钠 (A.4.2.2.3), 置于 1000 mL 容量瓶中, 用 800 mL 水溶解并混匀。加水定容至刻度, 经 0.20 μm 尼龙膜滤器过滤至仪器储液罐 C 中。用氦气 (A.4.2.2.7) 脱气 20 min。用一次性塑料移液管加入 7.8 mL 50% (w/w) 氢氧化钠溶液 (A.4.2.2.2)。缓慢涡旋混合, 然后再用氦气 (A.4.2.2.7) 喷洒 15 min。在室温下用氦气 (A.4.2.2.7) (34.47 kPa~55.16 kPa) 封闭保存。该溶液可保存 4 天。

#### A. 4. 2. 2. 13 柱后试剂, 氢氧化钠: 300 mmol/L。

用量筒准确量取 985 mL 水, 注入柱后储液罐中。用一次性塑料移液管加入 15.6 mL 50% (w/w) 氢氧化钠溶液 (A.4.2.2.2), 缓慢涡旋混合。该溶液可在室温下保存 4 周。

#### A. 4. 2. 2. 14 糖标准储备液。

用加塞烧瓶盛装标准溶液, 保存于干燥器中, 置于含有指示剂的硅胶 (A.4.2.2.8) 上方。按表 A.3 所列称取适量糖, 置于 100 mL 容量瓶中。记录质量, 精确至 0.1 mg, 用水定容至刻度。

表 A.3. 标准储备液配制的称量方案

糖类	质量 (mg)	容量瓶 (mL)	浓度 (mg/mL)
葡萄糖	100±5	100	1.0
半乳糖	100±5	100	1.0

#### A. 4. 2. 2. 15 多糖校准标准工作液。

按照表 A.4, 通过稀释标准储备溶液制备校准溶液。

表 A.4 校准溶液制备方案

标准溶液	储备液用量		最终体积 (mL)	校准标准溶液中各糖组份浓度	
	葡萄糖 (μL)	半乳糖 (μL)		葡萄糖 (μg/mL)	半乳糖 (μg/mL)
A	100	50	100	1.50	0.375
B	250	100	100	3.75	0.750
C	500	200	100	7.50	1.50
D	750	400	100	11.25	3.00
E	1000	600	100	15.00	4.50
F	1250	800	100	18.75	6.00

上表中所示浓度为建议值。实际溶液浓度应通过计算并用于校准。将溶液分装保存于 -20℃, 可保存 12 个月。

#### A. 4. 2. 3 仪器和设备

A. 4. 2. 3. 1 无金属离子干扰的惰性离子色谱, 配备脉冲电化学检测器。

A. 4. 2. 3. 2 移液管。

A. 4. 2. 3. 3 真空过滤系统。

- A. 4. 2. 3. 4 尼龙滤膜。
- A. 4. 2. 3. 5 水浴微型管。
- A. 4. 2. 3. 6 微型管。
- A. 4. 2. 3. 7 离心机。
- A. 4. 2. 3. 8 一次性注射器。
- A. 4. 2. 3. 9 分析天平，精度为 0.1 mg。
- A. 4. 2. 3. 10 尼龙注射式过滤器。
- A. 4. 2. 3. 11 进样瓶。
- A. 4. 2. 4 色谱条件
  - A. 4. 2. 4. 1 柱：CarboPac PA20 色谱柱，3×150 mm，6.5 μm，或其他性能相当的柱子。
  - A. 4. 2. 4. 2 柱温：30 ℃±2 ℃。
  - A. 4. 2. 4. 3 进样量：25 μL。
  - A. 4. 2. 4. 4 进样口温度：室温或 10 ℃（如有冷却系统）。
  - A. 4. 2. 4. 5 洗脱液 A：300 mmol/L 氢氧化钠溶液（A.4.2.2.10）。
  - A. 4. 2. 4. 6 洗脱液 B：去离子水（A.4.2.2.11）。
  - A. 4. 2. 4. 7 洗脱液 C：氢氧化钠：150 mmol/L，乙酸钠：500 mmol/L（A.4.2.2.12）。
  - A. 4. 2. 4. 8 洗脱程序：洗脱程序如表 A.5 所示：

表 A.5. 葡萄糖和半乳糖测定的洗脱程序

时间	流速	洗脱液 A	洗脱液 B	洗脱液 C	备注
[min]	[mL/min]	[%]	[%]	[%]	
初始	0.5	2.0	98.0	0.0	
0.0	0.5	2.0	98.0	0.0	开始采集信号
1.0	0.5	2.0	98.0	0.0	
12.0	0.5	5.0	95.0	0.0	
21.0	0.5	22.4	65.6	12.0	
21.1	0.5	0.0	0.0	100.0	开始冲洗
26.0	0.5	0.0	0.0	100.0	
26.1	0.5	100.0	0.0	0.0	
31.0	0.5	100.0	0.0	0.0	停止冲洗
31.1	0.5	2.0	98.0	0.0	开始重新平衡
37.0	0.5	2.0	98.0	0.0	停止重新平衡

- A. 4. 2. 4. 9 柱后添加：300 mmol/L 氢氧化钠（A.4.2.2.13），流速 0.2 mL/min。
- A. 4. 2. 4. 10 检测器波形：采用优化的脉冲电化学条件，如表 A.6 中所示糖的四倍波形。

表 A.6. 脉冲电化学检测器测得糖的四倍波形

时间[s]	电势[V]	积分
0.00	+ 0.1	
0.20	+ 0.1	开始

0.40	+ 0.1	结束
0.41	- 2.0	
0.42	- 2.0	
0.43	+ 0.6	
0.44	- 0.1	
0.50	- 0.1	

A. 4. 2. 4. 11 估计保留时间：葡萄糖 9.6 min；半乳糖 8.6 min。此仅为参考保留时间，实际保留时间会因仪器设定，色谱柱批次等因素而不同。

#### A. 4. 2. 5 分析步骤

##### A. 4. 2. 5. 1 样品和试液制备

###### A. 4. 2. 5. 1. 1 样品准备

称取 1 g~10 g 均质试样 ( $m_S$ )，精确至 0.0001 g，置于 100 mL ( $V_S$ ) 容量瓶中。

###### A. 4. 2. 5. 1. 2 提取

加入 60 mL~70 mL 水，测量 pH。若 pH < 4.0，滴加 50 mmol/L 氢氧化钠溶液 (A.4.2.2.1) 调节 pH 至 6-7。置于 70 °C ± 2 °C 水浴中，持续搅拌下加热 25 min ~ 30 min。冷却至室温，加水至刻度，剧烈振摇。

###### A. 4. 2. 5. 1. 3 试液制备

量取 1.5 mL 溶液 (A.4.2.5.1.2)，转移至 2 mL 微型管中，在 12000 g 离心力作用下，离心 5 min。如有必要，可以将样品进一步稀释，保证样品中糖的浓度落在标准曲线之内。将样品溶液和多糖校准标准工作液 (A.4.2.2.15)，经 0.2 μm 尼龙注射式过滤器过滤至自动进样小瓶中。

##### A. 4. 2. 5. 2 仪器校验

在 A.4.2.4 节所述色谱初始条件下，对色谱系统平衡 1 h。确保系统压力和基线稳定，无泄漏。进样前使标准工作液和样品溶液平衡至自动进样器温度。

开始分析序列，首先注入水（检查基线）进行分析，然后注入多糖校准标准工作液 (A.4.2.2.15)（至少 3 个）。通过检查保留时间和响应的重复性确保系统稳定性。保留时间和峰面积的变异系数分别不得大于 2% 和 3%。如果不符合该要求，则需要延长平衡时间。通过与之前分析结果（色谱图示例见附录 C 中图 C.1）比较检查分离效果。上述初始进样分析的结果不计入数据统计范围内。

##### A. 4. 2. 5. 3 序列设置

在每个分析序列开始和结束时以及每 8 个样品进样分析后，分别注入 25 μL 多糖校准标准工作液 (A.4.2.2.15) 进行分析。这样可以确保必要的额外校准。

##### A. 4. 2. 5. 4 校准

以标准品浓度与峰面积为坐标，绘制标准曲线。通过软件自带的夹层校正 (Bracket calibration，即在测试样品前后分别进样相同的标准品，用前后进样的标准品的平均峰面积校正测试样品) Bracket calibration 定量样品。此定量方式可以弥补保留时间和检测器响应的不同。使用峰面积以及标准曲线反推所得的浓度，计算试验样品溶液中每种糖的浓度。

##### A. 4. 2. 5. 5 定性和确认

###### A. 4. 2. 5. 5. 1 通过保留时间定性

通过与多糖校准标准工作液（A.4.2.2.15）中相应峰的保留时间进行比较，定性试样溶液中每种糖的色谱峰。色谱图见附录 C 中图 C.1。

#### A. 4. 2. 5. 5. 2 样品加标确认

如果峰的定性存在不确定性，应对样品进行加标处理，然后将其色谱图与未加标的样品色谱图进行比较。

#### A. 4. 2. 5. 5. 3 分析时间

至少 20 个样品（二次重复进样），包括一个参考样品。上述样品数量需要 48 h 的分析时间。

#### A. 4. 2. 6 计算

以样品浓度与峰面积为坐标绘制每种糖类的标准曲线，按照线性回归，得到校准曲线公式。曲线公式的参数，按式（A.8）计算。

$$A_{Std} = mx + C \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

$A_{Std}$ ——标准工作液（A.4.2.2.15）峰面积；

$x$  ——糖组份的浓度，单位  $\mu\text{g/mL}$ ；

$C$  ——校准曲线的截距；

$m$  ——校准曲线的斜率。

每种糖的质量分数（ $w$ ），以  $\text{g}/100\text{g}$  样品计，按式（A.9）计算。

$$W = \frac{A_S - C}{m} \times \frac{V_S \times D_S}{10^6} \times \frac{100}{m_s} \dots\dots\dots (A.9)$$

式中：

$A_S$ ——试样溶液中糖的峰面积；

$V_S$  ——试样溶液的体积，单位： $\text{mL}$ ；

$D_S$  ——试样溶液（A.4.2.5.1.3）的稀释因子；

$10^6$  ——从  $\mu\text{g}$  到  $\text{g}$  的换算因子；

100 ——将结果转换成  $\text{g}/100\text{g}$  的换算因子；

$m_s$  ——样品（A.4.2.5.1.1）的质量，单位为  $\text{g}$ ；

$C$  ——校准曲线的截距；

$m$  ——校准曲线的斜率。

#### A. 4. 2. 7 精密度

同一操作员在相同实验室内采用相同设备，在较短时间间隔内对相同实验材料进行的两次独立单一试验测得的结果之间的绝对差值（按  $\frac{|x_1 - x_2|}{\bar{x}} \times 100$ ）不得超过样品平均值的 5%。

## A.5 唾液乳糖的检测

### A.5.1 方法提要

用 70°C 水提取唾液乳糖 (SL)。添加内标物 (葡醛酸基-乳糖-N-四糖) 后, 溶液经氨基固相萃取柱洗脱后, 将 SL (带电的) 与其它不带电的低聚糖 (OS) 分离。然后用荧光剂 (2AB) 标记唾液乳糖。经乙腈稀释后, 采用高效液相色谱对唾液乳糖进行分离, 通过监测其荧光进行检测, 最后通过与采用相同荧光试剂处理且经过内标物校正的外标校准曲线对比进行定量分析。

### A.5.2 试剂和材料

A.5.2.1 水。

A.5.2.2 二甲亚砜, 纯度≥99.7%。

A.5.2.3 2-氨基苯甲酰胺 (邻氨基苯甲酰胺), 纯度≥98%。

A.5.2.4 氰基硼氢化钠, 纯度: 95%。

A.5.2.5 甲酸, 纯度 98~100%。

A.5.2.6 乙酸, 纯度: 100%。

A.5.2.7 氨水, 纯度: 25%。

A.5.2.8 甲醇。

A.5.2.9 乙腈。

A.5.2.10 3'-唾液乳糖钠盐。

A.5.2.11 6'-唾液乳糖钠盐。

A.5.2.12 葡醛酸基-乳糖-N-四糖钠盐。

A.5.2.13 乙酸溶液, 1 m。

向装有 800 mL 去离子水的 1000 mL 容量瓶中加入 57 mL±2 mL 乙酸, 使用去离子水定容至刻度。

A.5.2.14 氨水 (NH<sub>4</sub>OH), 5% (v/v)。

向装有 300 mL 去离子水的 500 mL 容量瓶中加入 100 mL±1 mL 氨水, 然后用去离子水定容至刻度。

A.5.2.15 2AB 标记试剂: 含 0.35m 2AB- 1.0m NaBH<sub>3</sub>CN 30% 乙酸溶液的 DMSO (二甲基亚砜)。

根据试验次数, 按表 A.7 所述吸取适量二甲基亚砜 (DMSO) 和乙酸于 10 mL 试管 (带有螺旋塞) 中。采用涡旋混合器混合溶液。

称取适量邻氨基苯甲酰胺 (2AB) 和氰基硼氢化钠 (NaBH<sub>3</sub>CN) 于另一 10 mL 试管 (带有螺旋塞) 中, 然后加入相应体积的 30% 乙酸-DMSO 溶液。

用涡旋混合器混匀, 用超声波清洗器使其完全溶解 (约 10min)。

表 A.7. 2AB 标记试剂的制备

最多试验次数	30% 乙酸-DMSO 溶液		含 0.35M 2AB - 1 M NaBH <sub>3</sub> CN 的 30% 乙酸溶液的 DMSO 溶液		
	DMSO [mL]	100% 乙酸 [mL]	30% 乙酸 DMSO 溶液 [mL]	2AB [mg]	NaBH <sub>3</sub> CN [mg]

11	2.10	0.90	2.50	118 ± 5	157 ± 5
22	4.20	1.80	5.00	236 ± 10	314 ± 10
35	6.30	2.70	7.50	354 ± 10	471 ± 10
47	7.70	3.30	10.00	472 ± 10	628 ± 10
72	11.20	4.80	15.00	708 ± 10	942 ± 10

A. 5. 2. 16 水-乙腈 25+75 溶液。

向装有 150 mL ± 1 mL 乙腈的玻璃瓶中加入 50 mL ± 1 mL 水，混匀。

A. 5. 2. 17 标准溶液。

A. 5. 2. 17. 1 葡醛酸基-乳糖-N-四糖内标 (IS) 储备液，约 700 µg/mL (游离酸)。

称取 20 mg ± 2 mg 葡醛酸基-乳糖-N-四糖钠盐，精确至 0.1 mg。用去离子水定量转移至 25 mL 容量瓶中，使用相同溶剂定容至刻度。

A. 5. 2. 17. 2 葡醛酸基-乳糖-N-四糖内标 (IS) 工作液，约 140 µg/mL (游离酸)。

吸取 4.0 mL 葡醛酸基-乳糖-N-四糖储备液 (A.5.2.17.1) 至 20 mL 容量瓶中。用去离子水定容至刻度。

A. 5. 2. 17. 3 3'-唾液乳糖储备液，约 1040 µg/mL (游离酸)。

称取 30 mg ± 3 mg 3'-唾液乳糖钠盐，精确至 0.1 mg，用去离子水定量转移至 25 mL 容量瓶中，使用相同溶剂定容至刻度。

A. 5. 2. 17. 4 6'-唾液乳糖储备液，约 660 µg/mL (游离酸)。

称取 18 mg ± 2 mg 6'-唾液乳糖钠盐，精确至 0.1 mg，用去离子水定量转移至 25 mL 容量瓶中，使用相同溶剂定容至刻度。

A. 5. 2. 17. 5 3'-唾液乳糖 / 6'-唾液乳糖标准工作液。

按表 A.8. 所述，量取适量 3'-唾液乳糖储备液 (A.5.2.17.3) 和 6'-唾液乳糖储备液 (A.5.2.17.4) 于 6 个 25 mL 容量瓶中。用 5% (v/v) 氨水 (A.5.2.14) 定容至刻度。

表 A.8. 6 级校准曲线的稀释方案

	容量瓶 [mL]	3'-唾液乳糖 [µL]	6'-唾液乳糖 [µL]	3'-唾液乳糖 (游离酸) 浓度 [µg/mL]	6'-唾液乳糖 (游离酸) 浓度 [µg/mL]
#1	25	50	50	2.1	1.3
#2	25	200	75	8.4	2.0
#3	25	350	100	14.6	2.6
#4	25	500	125	20.9	3.3
#5	25	650	150	27.1	4.0
#6	25	800	175	33.4	4.6

A. 5. 3 仪器和设备

A. 5. 3. 1 高效液相色谱仪配备荧光检测器。

A. 5. 3. 2 分析天平，精度 0.1 mg。

A. 5. 3. 3 水浴。

A. 5. 3. 4 10 mL 试管，带有螺旋塞。

A. 5. 3. 5 固相萃取柱。



- A. 5. 3. 6 固相萃取真空歧管。
- A. 5. 3. 7 涡旋混合器。
- A. 5. 3. 8 超声波清洗机。
- A. 5. 3. 9 带有安全锁或螺旋塞的 2 mL 微型管。
- A. 5. 3. 10 微型管架。
- A. 5. 3. 11 微型离心机。
- A. 5. 3. 12 自动进样瓶。
- A. 5. 3. 13 在线柱前过滤器。
- A. 5. 4 色谱条件
  - A. 5. 4. 1 色谱柱：酰胺基 80 柱；3  $\mu\text{m}$ ；4.6 mm x 150 mm；或其他等效色谱柱。
  - A. 5. 4. 2 捕获柱：酰胺基 80 保护柱；3  $\mu\text{m}$ ；3.2 mm x 15 mm。
  - A. 5. 4. 3 柱温：23  $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
  - A. 5. 4. 4 进样量：20  $\mu\text{L}$ 。
  - A. 5. 4. 5 流动相 A：乙腈。
  - A. 5. 4. 6 流动相 B：甲酸铵，50 mmol/L，pH 4.40。
  - A. 5. 4. 7 洗脱程序：洗脱程序见表 A.9。

表 A.9. 洗脱程序表

时间 [min]	流速 [mL/min]	洗脱液 (A) [%]	洗脱液 (B) [%]	10 位 6 通阀切换位置
0	1.0	98.0	2.0	1-10 (上样)
4.0	1.0	98.0	2.0	1-10 (上样)
7.5	1.0	98.0	2.0	1-2 (分析)
8.0	1.0	84.0	16.0	1-2 (分析)
16.0	1.0	84.0	16.0	1-2 (分析)
50.0	1.0	61.0	39.0	1-2 (分析)
51.0	0.7	20.0	80.0	1-2 (分析)
55.0	0.7	20.0	80.0	1-2 (分析)
56.0	0.8	90.0	10.0	1-2 (分析)
62.0	1.0	90.0	10.0	1-10 (上样)
62.1	1.0	98.0	2.0	1-10 (上样)
64.0	1.0	98.0	2.0	1-10 (上样)

- A. 5. 4. 8 激发波长：330 nm。
- A. 5. 4. 9 发射波长：420 nm。
- A. 5. 4. 10 开始流速：1 mL/min。

#### A. 5. 5 分析步骤

##### A. 5. 5. 1 样品及试液的制备

###### A. 5. 5. 1. 1 样品

准确称取 0.5 g $\pm$ 50 mg 均匀的样品 ( $m_s$ ) 至 50 mL ( $V_s$ ) 容量瓶中，精确至 0.0001g。

###### A. 5. 5. 1. 2 提取

加入 35 mL~40 mL 去离子水，在 70.0 °C±1.0 °C 水浴中搅拌 20 min ~25 min。随后冷却至室温，用去离子水稀释至刻度，剧烈振摇。

#### A. 5. 5. 1. 3 空白试样

用 5.50 mL 水代替样品溶液和内标物，其余步骤（包括 SPE）与样品制备完全相同。

#### A. 5. 5. 1. 4 试液制备

##### A. 5. 5. 1. 4. 1 加入内标（IS）

准确量取 5.00 mL 样品溶液或 3'-唾液乳糖/6'-唾液乳糖的标准工作液（A.5.2.17.5）至 10 mL 试管（带有螺旋塞）中。加入 500 µL 葡醛氨基-乳糖-N-四糖内标工作液（A.5.2.17.2）。盖紧后用涡旋混合器充分混匀。

##### A. 5. 5. 1. 4. 2 固相萃取洗脱步骤

a) SPE 活化步骤如下：

- 1) 5 mL 甲醇。
- 2) 5 mL 水。
- 3) 2 x 5 mL 的 1 M 乙酸溶液（A.5.2.13）。
- 4) 4 x 5 mL 水。

b) 将用内标稀释的 5.5 mL 样品溶液注入 SPE 滤筒上部，然后缓慢通过。弃去淋洗液。

c) 用 3 x 5 mL 水冲洗柱子，弃去洗涤液。

d) 用 5 x 1 mL 5%（v/v）氨水（A.5.2.14）缓慢洗脱至干净的 10 mL 试管（带有螺旋塞）中。

##### A. 5. 5. 1. 4. 3 2AB 标记

将 20 µL 净化后的样品溶液或标准工作液转移至 2 mL 微型管中。加入 200 µL 2AB 标记试剂（A.5.2.15）。塞紧试管，用涡旋混合器充分混匀后将试管置于微型管架上。置于 65 °C ± 1 °C 水浴中 2 h ± 5 min。水浴 20 min 后混匀。反应 2 h 后，混匀并置于 4 °C 冰箱中迅速冷却 10 min。

##### A. 5. 5. 1. 4. 4 稀释

冷却后，打开微管并加入 1.5 mL 水-乙腈 25+75 溶液（A.5.2.16）进行稀释。用涡旋混合器充分混匀，在 10000 g 离心力作用下离心 5 min。将 1 mL 上清液转移至进样瓶中。进样前保持进样瓶冷却。

#### A. 5. 5. 2 仪器检查测试

平衡色谱系统并预热荧光检测器。进样前，使标准溶液和样品溶液平衡至自动进样器温度。确保系统压力及基线稳固，无泄漏。

开始分析前，向色谱系统中注入水-乙腈 25+75 溶液（A.5.2.16）（以检查基准线），然后至少两次注入第一个标准溶液。检查保留时间、分离、响应并与先前的分析比较。

#### A. 5. 5. 3 序列设置

水平标准校准曲线分两次进样分析：分析序列开始时进样分析#1-3-5 三个水平的标准工作液，结束前进样分析#2-4-6 三个水平的标准工作液，其间至多进样 20 个样品。以确保等效校准。

#### A. 5. 5. 4 校准与样品分析

以标准物质与内标物的峰面积比（校准曲线进样分析所得）对相应的唾液乳糖浓度（单

位为  $\mu\text{g/mL}$ ) 绘制 3'-唾液乳糖和 6'-唾液乳糖的线性回归曲线。计算各回归曲线的斜率和截距, 按照 A.10 公式, 计算样品溶液中两种唾液乳糖的浓度。

#### A. 5. 5. 5 鉴定与确认

分别配制两种唾液乳糖的单一标准溶液和单一内标溶液, 分别进样分析。在最优色谱条件下, 确定每种化合物的保留时间后, 可安全使用混合标准溶液。

通过与标准溶液所得相应峰的保留时间比较, 鉴定衍生化样品溶液的三个峰(3'-唾液乳糖, 6'-唾液乳糖及内标葡醛酸基-乳糖-N-四糖)。色谱图示例见附录 D 中图 D.1。

#### A. 5. 6 计算

3'-唾液乳糖或 6'-唾液乳糖的质量分数 ( $w$ ), 单位为  $\text{mg}/100\text{g}$  样品, 按式 A.10 计算。

$$W = \frac{(\frac{A_S}{A_{IS}} - I) \times V_S \times 100}{S \times m_S \times 10^3} \dots\dots\dots \text{(A.10)}$$

其中:

- $A_S$  —— 试样溶液 (A.5.5.3.4) 中唾液乳糖的峰面积;
- $A_{IS}$  —— 试样溶液 (A.5.5.3.4) 中内标的峰面积;
- $I$  —— 校准曲线的截距;
- $V_S$  —— 试液 (A.5.5.1.1) 的体积 (通常是 50), 单位为  $\text{mL}$ ;
- 100 —— 基于 100 g 的转换因子;
- $S$  —— 校准曲线的斜率;
- $m_S$  —— 样品 (A.5.5.1.1) 的质量, 单位为  $\text{g}$ ;
- $10^3$  —— 从  $\mu\text{g}$  到  $\text{mg}$  的转换因子。

#### A. 5. 7 结果表述

以  $\text{mg}/100\text{g}$  为单位报告 3'-唾液乳糖和 6'-唾液乳糖的结果, 保留一位小数。

#### A. 5. 8 精密度

对于 3'-唾液乳糖, 同一操作员在同一实验室内采用相同设备和方法以同一试验材料在较短时间间隔内所进行的两次独立单一检测结果间的绝对差值 (通过  $|x_1 - x_2|$  计算) 不应大于:

- 1) 3  $\text{mg}$ , 对于 3'-唾液乳糖含量  $< 200 \text{ mg}/100\text{g}$  的低聚半乳糖而言;
- 2) 6  $\text{mg}$ , 对于 3'-唾液乳糖含量  $> 200 \text{ mg}/100\text{g}$  的低聚半乳糖而言。

对于 6'-唾液乳糖, 同一操作员在同一实验室内采用相同设备和方法以同一试验材料在较短时间间隔内所进行的两次独立单一检测结果间的绝对差值 (通过  $|x_1 - x_2|$  计算) 不应大于 2  $\text{mg}$ 。

## 附录 B

### 低聚半乳糖高效液相色谱图

#### B.1 双柱法高效液相色谱测定低聚半乳糖的谱图

低聚半乳糖双柱法高效液相色谱图见图 B.1 和 B.2。

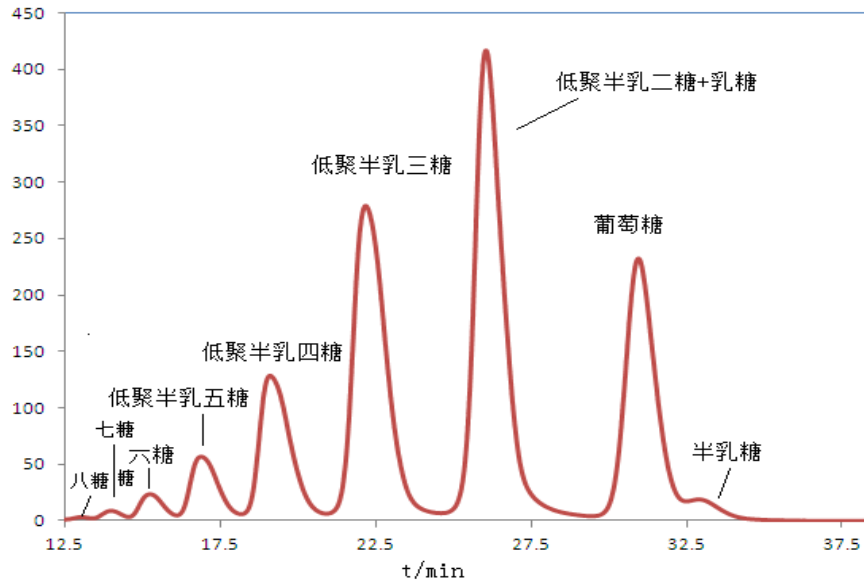


图 B.1 银型阳离子交换柱测定低聚半乳糖的色谱图

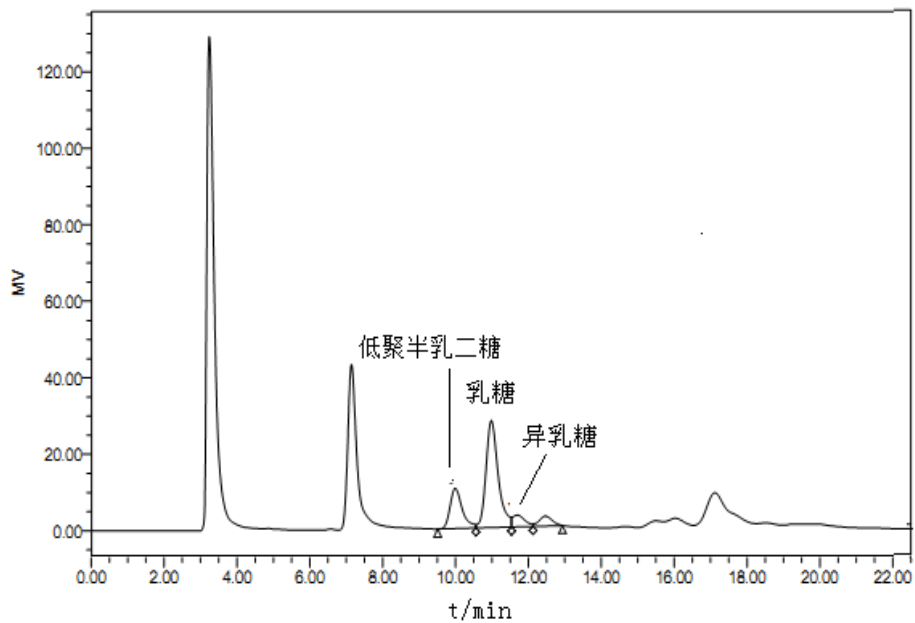


图 B.2 氨基柱测定低聚半乳糖的色谱图

## B.2 高效液相色谱测定低聚半乳糖的谱图

低聚半乳糖的高效液相色谱图见图 B.3。

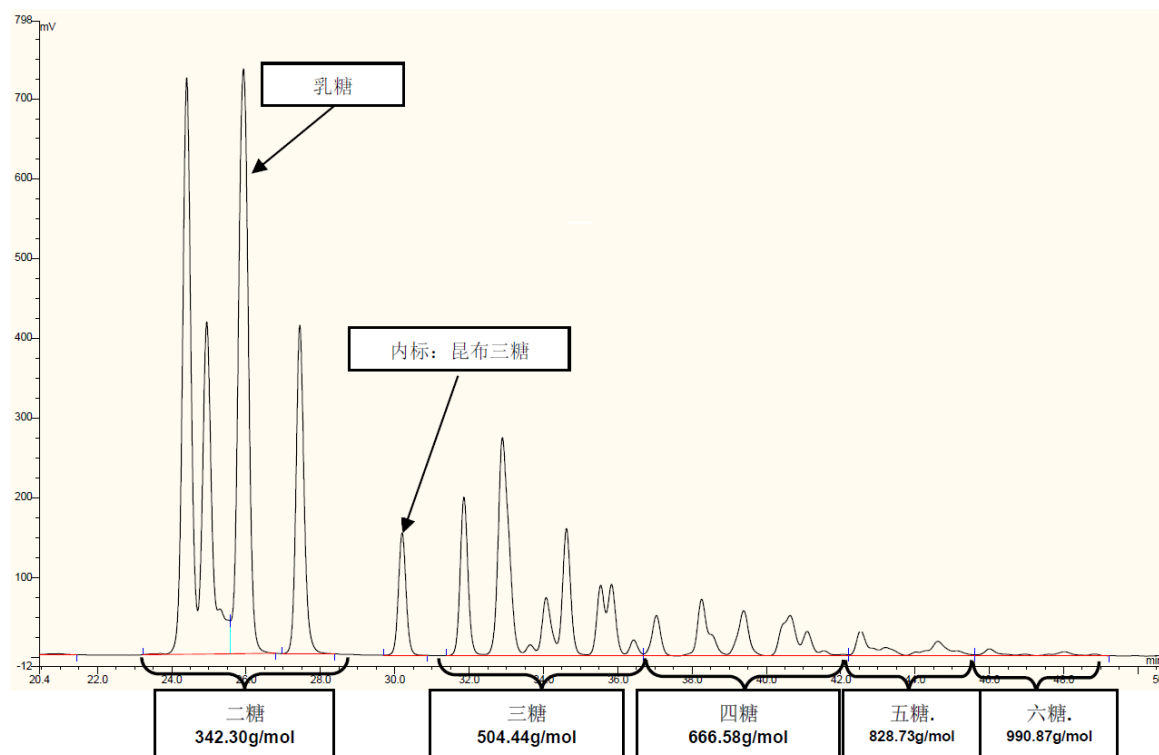


图 B.3 低聚半乳糖的高效液相色谱图

## B.3 定量检验的不同低聚糖的分子量

B.3.1 二糖: 342.30 g/mol

B.3.2 三糖: 504.44 g/mol

B.3.3 四糖: 666.58 g/mol

B.3.4 五糖: 828.73 g/mol

B.3.5 六糖: 990.87 g/mol

## 附录 C

### 葡萄糖和半乳糖的高效液相色谱图

#### C.1 葡萄糖和半乳糖的高效液相色谱图

葡萄糖和半乳糖的高效液相色谱图见图 C.1。

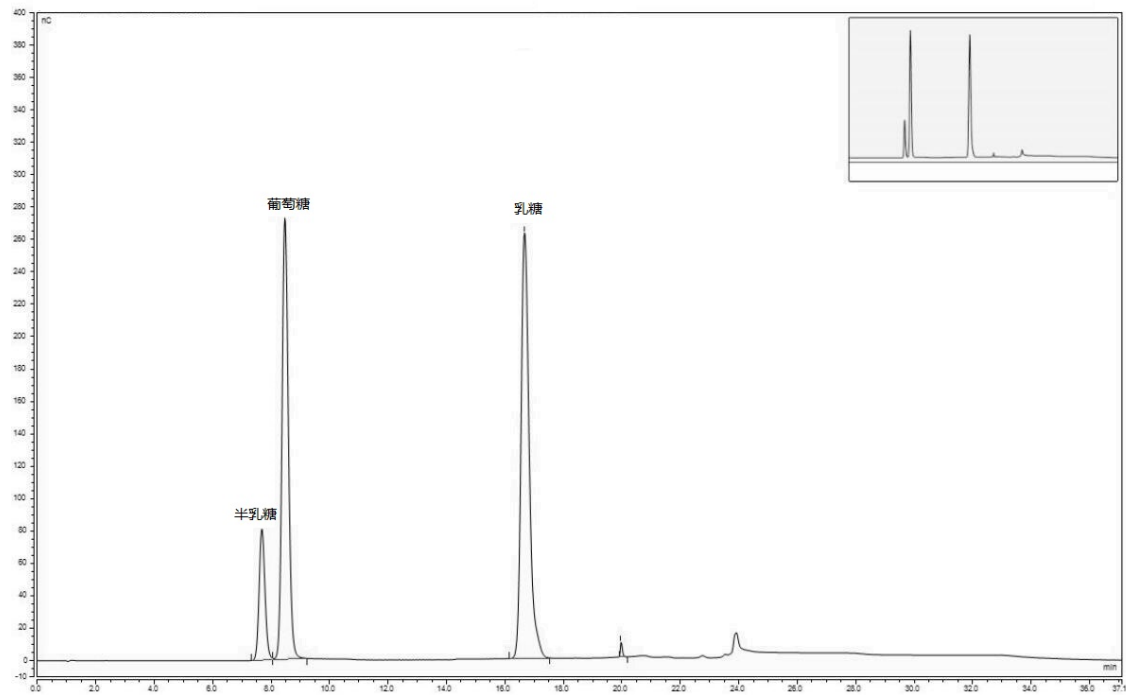


图 C.1 葡萄糖和半乳糖的高效液相色谱图（乳糖仅作为定性参考）

附录 D  
唾液乳糖的高效液相色谱图

D.1 唾液乳糖的高效液相色谱图

唾液乳糖的高效液相色谱图见图 D.1。

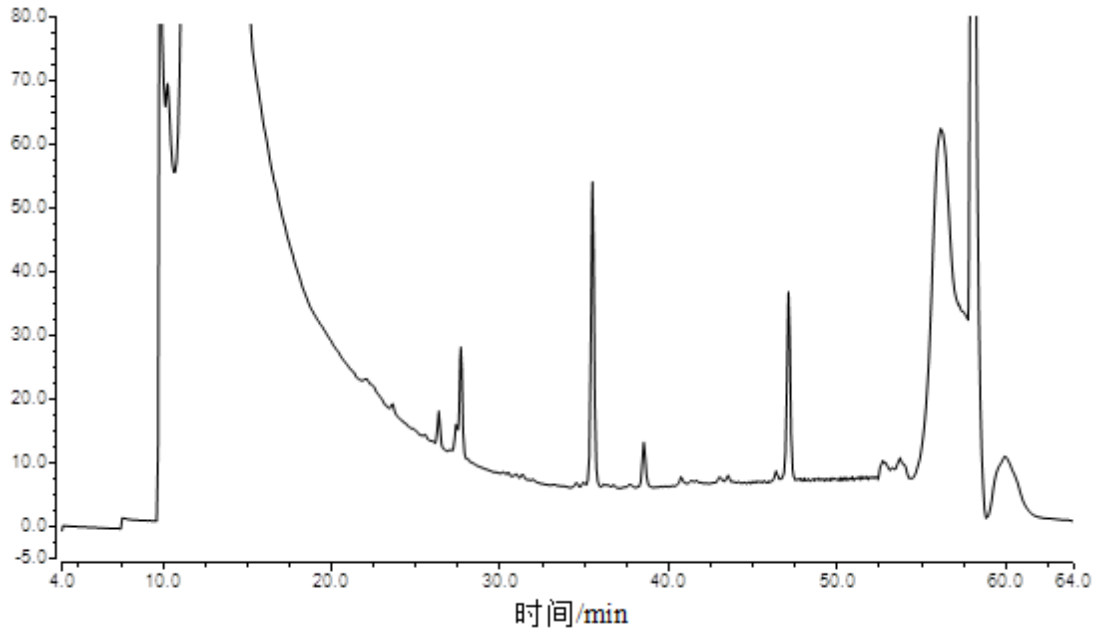


图 D.1 唾液乳糖的高效液相色谱图

## 附件 5

## 环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）等 6 种 扩大用量和使用范围的食品添加剂

序号	名称	功能	食品分类号	食品名称	最大使用量 (g/kg)	备注
1.	环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）	甜味剂	06.07	方便米面食品（仅限调味面制品）	1.6	以环己基氨基磺酸计
2.	罗望子多糖胶	增稠剂	12.10.02	半固体复合调味料	7.0	—
			12.10.03	液体复合调味料（不包括 12.03、12.04）	3.0	
3.	迷迭香提取物	抗氧化剂	02.02.01	脂肪含量 80% 以上的乳化制品	0.7	—
			02.03	02.02 类以外的脂肪乳化制品，包括混合的和（或）调味的脂肪乳化制品		
4.	山梨糖醇	水份保持剂	09.04.01	熟干水产品	按生产需要适量使用	—
			09.04.02	经烹调或油炸的水产品		
			09.04.03	熏、烤水产品		
5.	乙二胺四乙酸二钠	抗氧化剂	04.03.02.03	腌渍的食用菌和藻类	0.2	—
6.	乙醚	食品工业用加工助剂（提取溶剂）	-	米糠油加工工艺	残留量≤2 mg/kg	



