

附件 1:

## 拟征求意见的食品添加剂新品种名单

### (一) 食品添加剂新品种聚天冬氨酸钾

英文名称: Potassium Polyaspartate

功能分类: 稳定剂和凝固剂

#### (1) 用量及使用范围

食品分类号	食品名称	最大使用量	备注
15.03.01	葡萄酒	0.3 g/L	—

#### (2) 质量规格要求

##### 1 范围

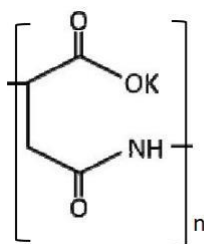
本质量规格适用于以 L-天冬氨酸和氢氧化钾溶液 (45%) 为原料, 在高温下将 L-天冬氨酸转化为一种不溶性化合物聚琥珀酰亚胺, 然后在受控条件下用氢氧化钾对聚琥珀酰亚胺进行处理, 制得食品添加剂聚天冬氨酸钾。

##### 2 分子式、结构式与相对分子质量

###### 2.1 分子式



###### 2.2 结构式



###### 2.3 相对分子质量

153.178n (按 2019 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	浅棕色	室温下,取适量试样置于无色、清洁、干燥的烧杯或白瓷盘中,在自然光线下观察其色泽和状态,并嗅其味道
状态	固体粉末	
气味	无味	

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
聚天冬氨酸钾含量(以干基计), w/%	≥ 98.0	附录 A 中 A.3
取代度(以干基计), w/%	≥ 91.5	附录 A 中 A.2
天冬氨酸, w/%	≤ 1.0	附录 A 中 A.4
干燥失重, w/%	≤ 10	附录 A 中 A.5
pH	7.5~8.5	附录 A 中 A.6
总砷(As)/(mg/kg)	≤ 2.5	GB 5009.11
铅(Pb)/(mg/kg)	≤ 1.5	GB 5009.75
汞(Hg)/(mg/kg)	≤ 0.5	GB 5009.17
镉(Cd)/(mg/kg)	≤ 0.1	GB 5009.15



## 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规定的三级水。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 取代度（以干基计）的测定

#### A.2.1 方法提要

通过使用化学重量法分析钾含量来测定聚天冬氨酸钾的取代度。为计算取代度，将测得的钾含量与100%替换时的理论含量进行比较。

#### A.2.2 分析步骤

钾含量的测定，按GB/T 8574规定方法测定。

注：钾含量以氧化钾（K<sub>2</sub>O）质量分数（%）表示。

#### A.2.3 结果计算

A.2.3.1 试样中钾的质量分数（以干基计）*K*，数值以%表示，按式A.1计算。

$$K_{\text{(以干基计)}} = \frac{A}{(1 - w_4)} \times 0.83 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

*A*——试样中钾含量（以氧化钾计）的质量分数表示，按GB/T 8574中公式计算所得；

0.83——氧化钾质量换算为钾质量的系数；

*w*<sub>4</sub>——试样的干燥失重（%），按式A.5计算所得。

A.2.3.2 取代度（以干基计）的质量分数*w*<sub>1</sub>，数值以%表示，按式A.2计算。

$$w_1 = \frac{K_{\text{(以干基计)}}}{\frac{AW_K}{MW_{\text{聚天冬氨酸钾单体}}}} \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

*K*<sub>(以干基计)</sub>——以干基计的钾质量百分比（%）；

*AW*<sub>*K*</sub>——钾相对原子质量39.10；

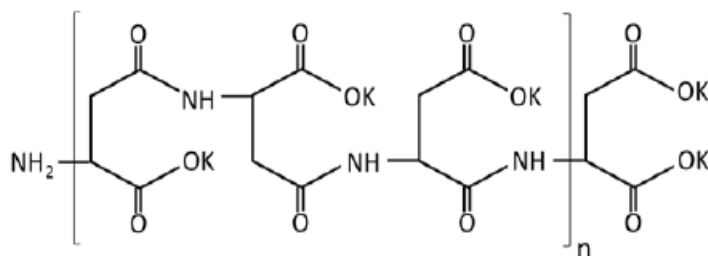
*MW*<sub>聚天冬氨酸钾单体</sub>——聚天冬氨酸钾单体分子量 153.18。

### A.3 聚天冬氨酸钾含量（以干基计）的测定

#### A.3.1 方法提要

通过对测试试样进行氮含量测定，再与测试试样的分子式所计算得到的预期理论值作比较，经计算获得聚天冬氨酸钾的含量。聚天冬氨酸的重均分子量经测试为 5301，相当于由 34.2 个单体组成的聚合物链的分子量。这种平均聚合物中所含的 34.2 个氮分子的摩尔质量

为 479.6，即氮占聚天冬氨酸含量的 9.05%，此数值为理论值。



### A. 3. 2 分析步骤

按照 GB 5009.5 的方法，称取 0.500g 聚天冬氨酸钾试样进行消解并测试氮含量。

注：只测试氮含量，不需要换算系数，测试值与理论值比较即得聚天冬氨酸钾的含量。

### A. 3. 3 结果计算

试样中聚天冬氨酸钾的质量分数（以干基计） $w_2$ ，数值以%表示，按式 A.3 计算。

$$w_2 = \frac{C_0}{C \times (1 - w_4)} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$C_0$ ——氮含量测试值，按 GB 5009.5 中公式计算所得；

$C$ ——氮含量理论值，9.05%；

$w_4$ ——试样的干燥失重（%），按式 A.5 计算所得。

## A. 4 天冬氨酸的测定

### A. 4. 1 方法提要

利用邻苯二甲醛（OPA）衍生天冬氨酸，通过高效液相色谱-荧光检测（FLD）对聚天冬氨酸钾中的天冬氨酸进行测定。

### A. 4. 2 设备和仪器

A. 4. 2. 1 容量瓶。

A. 4. 2. 2 高效液相色谱仪，配荧光检测器（FLD）。

A. 4. 2. 3 色谱柱：C18，例如：C18，4.6 x 250 mm，5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

### A. 4. 3 试剂和材料

A. 4. 3. 1 天冬氨酸对照品（D,L-天冬氨酸  $\geq 99\%$ ；CAS 号：617-45-8）。分别配制成 8000 mg/L 水溶液（溶液 1）和 200 mg/L 水溶液（溶液 2），用于配制标准溶液。

A. 4. 3. 2 氨基己酸对照品（6-氨基己酸  $\geq 99\%$ ，CAS 号：60-32-2）。配制成 1000 mg/L 氨基己酸水溶液原液，作为内标备用。

A. 4. 3. 3 通过稀释溶液 1 和溶液 2（A.4.3.1）制备的校准液参照值如下表 A.1 所示：

表 A.1 稀释溶液 1 和溶液 2 制备的天冬氨酸标准液

标准液	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6
水（mL）	18.8	19.0	15.0	19.750	19.375	18.750
溶液 1（mL）	-	-	-	0.250	0.625	1.250

溶液 2 (mL)	0.2	1.0	5.0	-	-	-
天冬氨酸 (mg/L)	2	10	50	100	250	500

A. 4. 3. 4 甲醇 (色谱级)。

A. 4. 3. 5 用四氢呋喃 (色谱级)。

A. 4. 3. 6 无水乙酸钠。

A. 4. 3. 7 乙腈 (色谱级)。

A. 4. 3. 8 十水合四硼酸钠。

A. 4. 3. 9 邻苯二甲醛 (OPA)。

A. 4. 3. 10 巯基乙醇。

A. 4. 3. 11 衍生剂: 向 10 mL 容量瓶中加入 100 mg 邻苯二甲醛 (OPA)、200  $\mu$ L 巯基乙醇以及 1 mL 甲醇, 然后用 pH 值为 10.5 的 0.1 mol/L 十水合四硼酸钠缓冲液定容。应在使用前制备溶液。

A. 4. 3. 12 试样溶液: 向 20 mL 容量瓶中加入 250 mg 的聚天冬氨酸钾, 添加 0.2 mL 的氨基己酸内标溶液, 加水定容。

#### A. 4. 4 色谱条件

A. 4. 4. 1 波长 ( $\lambda$ ): 最大激发波长: 340 nm, 最大发射波长: 450 nm;

A. 4. 4. 2 柱温: 40°C;

A. 4. 4. 3 进样量: 10  $\mu$ L;

A. 4. 4. 4 流速: 1.1 mL/min;

A. 4. 4. 5 流动相 A: 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液/四氢呋喃 (体积比: 96:4); 流动相 B: 甲醇; 流动相 C: 乙腈; 在如下梯度模式下进行。

表 A.2 流动相的梯度设置

时间 (min)	% A	% B	% C	流量 (mL/min)
0.00	100.0	0.0	0.0	1.1
3.00	100.0	0.0	0.0	1.1
15.00	50.0	25.0	25.0	1.1
17.00	84.0	8.0	8.0	1.1
18.00	100.0	0.0	0.0	1.1
运行时间: 21 min+2 min 停机时间				

#### A. 4. 5 分析步骤

A. 4. 5. 1 将 5.0 mL 标准溶液 (A.4.3.3) 和 0.2 mL 内标溶液 (A.4.3.2) 在 20 mL 容量瓶内混合制备校准溶液, 水定容并混匀。

A. 4. 5. 2 使用 20  $\mu$ L 甲醇稀释 5.0  $\mu$ L 试样溶液, 加入 0.5  $\mu$ L 邻苯二甲醛 (OPA) 衍生。将 10.0  $\mu$ L 上述获得的溶液在注射器中摇匀 10 次, 0.5 min 后进样。

注: 如果结果高于校准曲线的上限, 则稀释试样并重复分析程序。

A. 4. 6 试样中天冬氨酸的质量分数  $w_3$ , 数值以%表示, 按式 A.4 计算如下:

$$w_3 = \frac{A \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times m} \times d \times 100\% \quad \dots\dots\dots(A.4)$$

式中：

$A$ ——试样溶液中天冬氨酸的峰面积；

$C_s$ ——标准溶液中天冬氨酸浓度（mg/L）；

$V$ ——试样溶液的体积（mL）；

$A_s$ ——标准溶液中天冬氨酸峰面积；

$m$ ——试样溶液中试样质量（mg）；

$d$ ——试样溶液的稀释倍数；

1000——体积换算系数。

## A. 5 干燥失重测定

### A. 5. 1 仪器和设备

A. 5. 1. 1 玻璃制称量瓶。

A. 5. 1. 2 电热恒温干燥箱。

A. 5. 1. 3 干燥器：内附有效干燥剂。

A. 5. 1. 4 天平：感量为 0.1 mg。

### A. 5. 2 分析步骤

取洁净玻璃制的称量瓶，置于 101℃~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，加热 1.0 h，取出盖好，置干燥器内冷却 0.5 h，称量，并重复干燥至前后两次质量差不超过 2 mg，即为恒重。将试样迅速磨细至颗粒小于 2 mm，放入此称量瓶中，试样厚度不超过 5 mm，加盖，精密称量后，置于 101℃~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥 12 h~24 h 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 0.5 h 后称量。然后再放入 101℃~105℃干燥箱中干燥 12 h~24 h 左右，取出，放入干燥器内冷却 0.5 h 后再称。并重复以上操作至前后两次质量差不超过 2 mg，即为恒重。

注：两次恒重值在最后计算中，取质量较小的一次称量值。

### A. 5. 3 结果计算

试样中干燥失重的质量分数  $w_4$ ，数值以%表示，按式 A.5 计算如下：

$$w_4 = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(A.5)$$

式中：

$m_1$ ——称量瓶和试样的质量（g）；

$m_2$ ——称量瓶和试样干燥后的质量（g）；

$m_3$ ——称量瓶的质量（g）。

## A. 6 pH测定

### A. 6. 1 方法提要

以玻璃电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极,同时插入被测溶液中组成一个电池。此电池产生的电位差与被测溶液的pH有关,它们之间的关系符合能斯特方程式。在25℃时,每单位pH值相当于59.1mV电位差,即电位差每改变59.1mV,溶液中的pH相应改变1个单位。可在仪器上直接读出pH值。

## A. 6. 2 试剂和材料

A. 6. 2. 1 磷酸盐标准缓冲溶液(20℃):称取在105℃烘干2 h的磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3.40 g和磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3.55 g,溶于水中,并稀释至1 L,储存于塑料瓶中。此溶液20℃时,pH为6.88。

A. 6. 2. 2 硼酸钠标准缓冲溶液:称取四硼酸钠( $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 3.81 g,溶于水中,稀释至1 L,储存于塑料瓶中。此溶液20℃时,pH为9.22。

## A. 6. 3 仪器和设备

A. 6. 3. 1 精密酸度计(准确度0.01)。

A. 6. 3. 2 复合电极。

A. 6. 3. 3 磁力搅拌器(附有加温控制功能)。

A. 6. 3. 4 烧杯,100 mL。

A. 6. 3. 5 容量瓶,100 mL。

A. 6. 3. 6 天平。

## A. 6. 4 分析步骤

### A. 6. 4. 1 试样处理

称取试样约40 g(精确到0.01g),加水(无二氧化碳)溶解并定容至100 mL,摇匀,取约50 mL溶液于100 mL烧杯中,作为待测溶液。

### A. 6. 4. 2 测定

A. 6. 4. 2. 1 电极活化:复合电极在使用前应放入水中浸泡24 h以上。

A. 6. 4. 2. 2 校准仪器:使用磷酸盐标准缓冲溶液和硼酸钠标准缓冲溶液在温度补偿条件下进行校准。

A. 6. 4. 2. 3 试样测定:用水洗涤电极,用滤纸吸干后,将电极插入被测试样中,启动搅拌器,待酸度计读数稳定1 min后,停搅拌器,直接从仪器上读出pH值。测试两次,误差范围 $\pm 0.1$ ,取其平均读数值。



## (二) 食品工业用酶制剂新品种

序号	酶	来源	供体
1	蛋白酶 Protease	李氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	樟绒枝霉 <i>Malbranchea sulfurea</i>
2	磷脂酶 A2 Phospholipase A2	李氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>
3	麦芽糖淀粉酶 Maltogenic amylase	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	嗜热脂解地芽孢杆菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
4	乳糖酶 (β-半乳糖苷酶) Lactase (beta-galactosidase)	<i>Papiliotrema terrestris</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。

## (三) 食品用香料新品种 2-己基吡啶

英文名称: 2-Hexylpyridine

功能分类: 食品用香料

### (1) 用量及使用范围

食品分类号	食品名称	最大使用量	备注
—	配制成食品用香精应用于在各类食品中 (GB 2760-2014 表 B.1 食品类别除外)	按生产需要适量使用	—

## (2) 质量规格要求

### 1 范围

本质量规格适用于以 2,4-十一碳二烯醛为主要原料经化学反应制得食品添加剂 2-己基吡啶。

### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

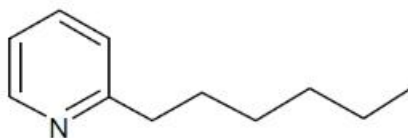
#### 2.1 化学名称

2-己基吡啶

#### 2.2 分子式

$C_{11}H_{17}N$

#### 2.3 结构式



#### 2.4 相对分子质量

163.26 (按 2021 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	无色到淡黄色	将试样置于比色管内,用目测法观察。
状态	液体	
香气	蔬菜样青香,并具有药草香和油脂气息	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
含量, w/%	> 95.0	附录 A
相对密度 (20℃/20℃)	0.875~0.915	GB/T 11540
折光指数 (20℃)	1.480~1.490	GB/T 14454.4

## 附录 A 2-己基吡啶含量的测定

### 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 2-己基吡啶气相色谱图（面积归一化法）参见附录 B。

附录 B 食品添加剂 2-己基吡啶气相色谱图  
(面积归一化法)

B.1 食品添加剂 2-己基吡啶气相色谱图

食品添加剂 2-己基吡啶气相色谱图见图 B.1。

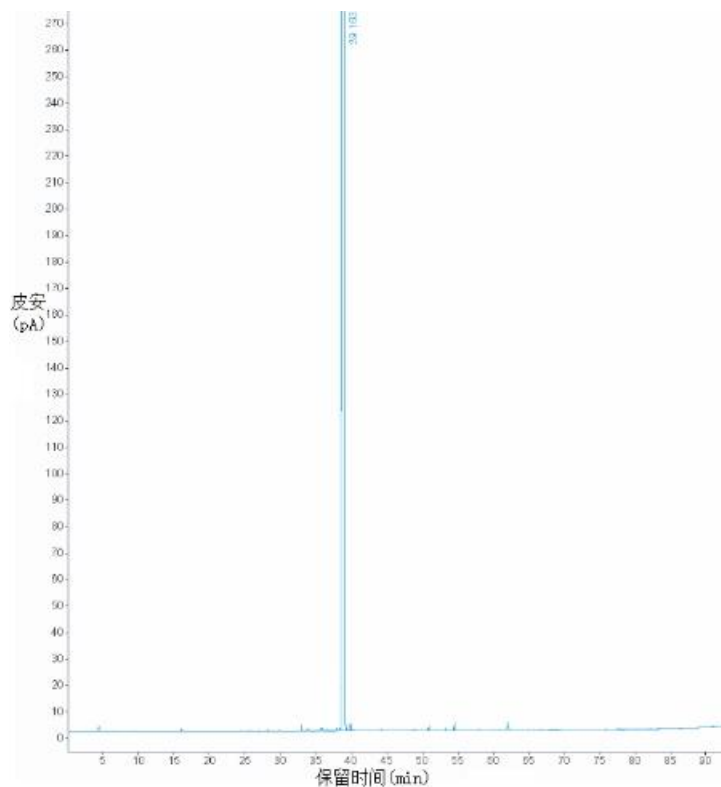


图 B.1 食品添加剂 2-己基吡啶气相色谱图

物质保留时间

化合物	保留时间 (min)
2-己基吡啶	39.16

B.2 操作条件

- B.2.1 柱：毛细管柱，长 25 m，内径 200  $\mu\text{m}$ 。
- B.2.2 固定相：聚乙二醇。
- B.2.3 膜厚：0.20  $\mu\text{m}$ 。
- B.2.4 色谱柱温度：线性升温从 40  $^{\circ}\text{C}$  至 270  $^{\circ}\text{C}$ ，速率 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，最后在 270  $^{\circ}\text{C}$  恒温 5 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：氢气。
- B.2.9 柱前压：118 kPa。
- B.2.10 进样量：0.2  $\mu\text{L}$ 。
- B.2.11 分流比：200:1。

#### (四) 食品营养强化剂新品种

1. 中文名称：2'-岩藻糖基乳糖

英文名称：2'-fucosyllactose, 2'-FL

功能分类：食品营养强化剂

##### (1) 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)	0.7-2.4 g/L(以纯品计,以即食状态计,粉状产品按冲调倍数增加使用量)	当与乳糖- <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		

##### (2) 质量规格要求

###### 1 范围

本质量规格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 2'-岩藻糖基乳糖。2'-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

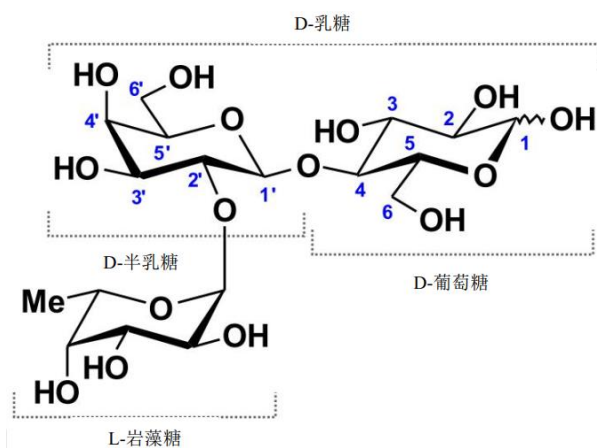
###### 2.1 化学名称

$\alpha$ -L-吡喃岩藻糖基-(1→2)- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1→4)-D-葡萄糖

###### 2.2 分子式

$C_{18}H_{32}O_{15}$

###### 2.3 结构式



## 2.4 相对分子质量

488.44 (按 2020 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

指标	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
2'-岩藻糖基乳糖 (以干基计), w/%	≥ 94.0	附录 A 中的 A.2
D-乳糖, w/%	≤ 3.0	附录 A 中的 A.3
二岩藻糖基乳糖, w/%	≤ 2.0	附录 A 中的 A.3
水分, w/%	≤ 9.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
残留蛋白含量/ (mg/kg)	≤ 100	附录 A 中的 A.4
内毒素/ (EU/mg)	≤ 10	附录 A 中的 A.5
灰分, w/%	≤ 0.5	GB 5009.4

项 目	指 标	检验方法
总砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤ 0.2	GB 5009.11
铅（Pb）/（mg/kg）	≤ 0.05	GB 5009.12

### 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/(25g)	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 规定的三级水。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 2'-岩藻糖基乳糖（以干基计）的测定

#### A.2.1 方法提要

2'-岩藻糖基乳糖溶于水或溶剂，在亲水保留色谱柱或酰胺键合色谱柱的液相色谱条件下分离，示差折光检测器检测，用面积归一化法或外标法定量。

#### A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 2'-岩藻糖基乳糖对照品：纯度 $\geq 95\%$ 。

A.2.2.2 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.2.3 乙腈：色谱纯。

A.2.2.4 三乙胺：色谱纯。

A.2.2.5 溶剂：乙腈:水=50:50 (v/v)。

#### A.2.3 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备示差折光检测器。

#### A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 亲水保留色谱柱色谱条件如下：

A.2.4.1.1 色谱柱：亲水保留色谱柱，250 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.2.4.1.2 流动相：精确称量 582.8 g 乙腈，加入适量水，得到 857.2 g 的溶液，再加入 10 mL 的三乙胺。

A.2.4.1.3 柱温：25  $^{\circ}$ C。

A.2.4.1.4 示差折光检测器温度：35  $^{\circ}$ C。

A.2.4.1.5 流速：1 mL/min。

A.2.4.1.6 进样量：5  $\mu$ L。

A.2.4.1.7 运行时间：45 min。

A.2.4.2 酰胺键合柱色谱条件如下：

A.2.4.2.1 色谱柱：酰胺键合色谱柱，150 mm $\times$ 4.6 mm, 3  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.2.4.2.2 流动相：乙腈:水=64:36 (v/v)。

A.2.4.2.3 柱温：25 $^{\circ}$ C。

A.2.4.2.4 示差折光检测器温度：37 $^{\circ}$ C。

A.2.4.2.5 流速：1.1 mL/min。

A.2.4.2.6 进样量：5  $\mu$ L。

A.2.4.2.7 运行时间：8 min。

#### A.2.5 分析步骤

##### A.2.5.1 标准溶液配制

##### A.2.5.1.1 亲水保留色谱柱色谱条件标准溶液的配制

准确称取适量的 2'-岩藻糖基乳糖对照品，转移到合适的容量瓶中，用水溶解对照品。根据对照品的纯度折算，配制成 2'-岩藻糖基乳糖浓度约为 5.0 g/100 mL 的标准溶液。该溶液在 4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冰箱中保存，有效期 4 周。



#### A. 2. 5. 1. 2 酰胺键合柱色谱条件标准溶液的配制

分别准确称取三份适量的 2'-岩藻糖基乳糖对照品，用溶剂溶解，容量瓶中定容，得到系列标准溶液 1、2 和 3。根据对照品纯度折算后 2'-岩藻糖基乳糖标准溶液的浓度分别约为 4.2 mg/mL、5.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL。该溶液在冰箱中 4℃~ 8℃ 保存，有效期 4 周。

#### A. 2. 5. 2 试样溶液配制

##### A. 2. 5. 2. 1 亲水保留色谱柱色谱条件试样溶液的配制

精确称取 5 g±0.5 g（精确到 1 mg）样品，加入到 100 mL 的容量瓶中，加水至约容量瓶刻度线 2 cm 以下，振荡溶解，然后加水定容至刻度，配制成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。相同试样做三个平行实验。

如用于测试的样品不足 5 g，可相应按照比例折算所需精确称取的样品量，配置成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。

##### A. 2. 5. 2. 2 酰胺键合柱色谱条件试样溶液的配制

准确称取试样 47.0 mg ~ 54.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用溶剂溶解并定容至刻度。相同试样做三个平行实验。

#### A. 2. 5. 3 系统适用性试验

##### A. 2. 5. 3. 1 亲水保留色谱柱色谱条件的系统适用性试验

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：

- 化合物保留时间重复性的相对标准偏差 < 1.0% (n=3)；
- 化合物响应值重复性的相对标准偏差 < 1.0% (n=3)；
- 洗脱液的色谱图应为纯基线。

亲水保留色谱柱色谱条件下 2'-岩藻糖基乳糖对照品的参考色谱图谱见附录 B.1。

##### A. 2. 5. 3. 2 酰胺键合柱色谱条件的系统适用性试验

当满足以下条件时，可进行试样溶液的测定：

- 连续进样溶剂 5 次。最后一次进样在色谱图 4 min ~ 7 min 保留时间段内未发现色谱峰；
- 进样对照品溶液 2 时，计算得到的 2'-岩藻糖基乳糖信噪比 ≥ 100，保留时间约为 5min ~ 6 min；
- 连续 3 次进样试样溶液获得的峰面积的相对标准偏差应 < 1.0%。

——按照系列标准溶液，试样测试溶液，系列标准溶液序列测试。试样溶液前后测得系列标准溶液中相同浓度的 2'-岩藻糖基乳糖峰面积的相对偏差需小于 2.0%。如不满足偏差要求，需复测。

酰胺键合柱色谱条件下 2'-岩藻糖基乳糖对照品的参考色谱图谱见附录 B.2。

#### A. 2. 5. 4 2'-岩藻糖基乳糖含量测定

##### A. 2. 5. 4. 1 面积归一化法

在亲水保留色谱柱参考色谱条件下，2'-岩藻糖基乳糖含量以面积归一化法定量。

2'-岩藻糖基乳糖含量（以干基计）的质量分数  $\omega_1$  按式 (A.1) 计算。

$$\omega_1 = \frac{A_1}{S_1} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$A_1$  —— 试样溶液中 2'-岩藻糖基乳糖的峰面积；

$S_1$  —— 试样溶液中除溶剂峰外所有成分峰面积的和。

#### A. 2. 5. 4. 2 外标法

在酰胺键合柱参考色谱条件下，2'-岩藻糖基乳糖含量以外标法定量。

以系列标准溶液中 2'-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 2'-岩藻糖基乳糖的浓度。

2'-岩藻糖基乳糖含量的质量分数  $\omega_2$  按式 (A.2) 计算。

$$\omega_2 = \frac{C_1 \times V_1}{m_1} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

$C_1$  ——由标准曲线得到的试样溶液中 2'-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)。

2'-岩藻糖基乳糖含量 (以干基计) 的质量分数  $\omega_3$  按式 (A.3) 计算。

$$\omega_3 = \frac{\omega_2}{1-\omega} \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$\omega_2$  ——2'-岩藻糖基乳糖含量的质量分数，%；

$\omega$  ——产品水分含量的实测值，%。

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 2%。

### A. 3 D-乳糖和二岩藻糖基乳糖的测定

#### A. 3. 1 方法提要

2'-岩藻糖基乳糖溶于水或溶剂，在亲水保留色谱柱或氨基聚合物柱的液相色谱条件下分离，使用示差折光检测器或电雾式检测器检测，以 D-乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的保留时间定性，外标法或面积归一化法定量。

#### A. 3. 2 试剂和材料

A. 3. 2. 1 2'-岩藻糖基乳糖对照品：纯度  $\geq 95\%$ 。

A. 3. 2. 2 D-乳糖一水合物对照品：无水 D-乳糖含量  $\geq 95\%$  或标明含量的等同物。

A. 3. 2. 3 二岩藻糖基乳糖对照品：纯度  $\geq 84\%$  或标明含量的等同物。

A. 3. 2. 4 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A. 3. 2. 5 乙腈：色谱纯。

A. 3. 2. 6 三乙胺：色谱纯。

A. 3. 2. 7 溶剂：乙腈:水=50:50 (v/v)。

#### A. 3. 3 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备示差折光检测器或电雾式检测器。

#### A. 3. 4 参考色谱条件

A. 3. 4. 1 液相色谱-示差折光检测器条件如下：

A. 3. 4. 1. 1 色谱柱：亲水保留色谱柱，250 mm×4.6 mm，3.5  $\mu\text{m}$  或等效色谱柱。

A. 3. 4. 1. 2 流动相：精确称量 582.8 g 乙腈，加入适量水，得到 857.2 g 的溶液，再加入 10 mL 的三乙胺。

A. 3. 4. 1. 3 柱温：25  $^{\circ}\text{C}$ 。

A. 3. 4. 1. 4 示差折光检测器温度：35  $^{\circ}\text{C}$ 。

A. 3. 4. 1. 5 流速：1 mL/min。

- A. 3. 4. 1. 6 进样量：5  $\mu\text{L}$ 。
- A. 3. 4. 1. 7 运行时间：45 min。
- A. 3. 4. 2 液相色谱-电雾式检测器条件如下：
- A. 3. 4. 2. 1 色谱柱：氨基聚合物柱，250 mm $\times$ 4.6 mm，5  $\mu\text{m}$  或等效色谱柱。
- A. 3. 4. 2. 2 流动相：乙腈:水=72:28 (v/v)。
- A. 3. 4. 2. 3 柱温：25  $^{\circ}\text{C}$ 。
- A. 3. 4. 2. 4 流速：1.1 mL/min。
- A. 3. 4. 2. 5 电雾式检测器：雾化器温度：35  $^{\circ}\text{C}$ ；数据采集速率：20 Hz；功率功能：1；过滤器：5。
- A. 3. 4. 2. 6 进样量：10  $\mu\text{L}$ 。
- A. 3. 4. 2. 7 运行时间：25 min。
- A. 3. 5 分析步骤
- A. 3. 5. 1 标准溶液配制
- A. 3. 5. 1. 1 用于示差折光检测的标准溶液
- 乳糖标准溶液的配制：准确称取适量的 D-乳糖一水合物对照品到适宜的容量瓶中，用水溶解，配制成浓度约为 0.5 mg/mL 的标准溶液。该溶液在冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存，有效期为 4 周。
- 二岩藻糖基乳糖标准溶液的配制：准确称取适量的二岩藻糖基乳糖对照品到适宜的容量瓶中，用水溶解，配制成浓度约为 0.5 mg/mL 的标准溶液。该标准溶液在冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存，有效期为 4 周。
- A. 3. 5. 1. 2 用于电雾式检测的标准溶液
- 准确称取适量 2'-岩藻糖基乳糖对照品，二岩藻糖基乳糖对照品和 D-乳糖一水合物对照品到不同的容量瓶中，用溶剂溶解，根据对照品的纯度折算分别配制成 2'-岩藻糖基乳糖浓度约为 2.5 mg/mL、二岩藻糖基乳糖浓度约为 2.5 mg/mL 的储备液，D-乳糖的浓度约为 3.0 mg/mL 的储备液。
- 分别取不同体积的二岩藻糖基乳糖和 D-乳糖储备液，用溶剂稀释成 5 个不同浓度的系列标准溶液，即标准溶液 1、标准溶液 2、标准溶液 3、标准溶液 4 和标准溶液 5。标准溶液中二岩藻糖基乳糖的浓度依次约为 5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、37.5  $\mu\text{g/mL}$  和 55  $\mu\text{g/mL}$ ；D-乳糖的浓度依次约为 15  $\mu\text{g/mL}$ 、30  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$ 、120  $\mu\text{g/mL}$  和 150  $\mu\text{g/mL}$ 。
- 再分别取以上三种储备液适量于同一容量瓶中，用溶剂稀释，配制成 2'-岩藻糖基乳糖浓度约为 20  $\mu\text{g/mL}$ ，二岩藻糖基乳糖浓度约为 20  $\mu\text{g/mL}$  和 D-乳糖浓度约为 60  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液 6。取适量的 2'-岩藻糖基乳糖储备液于容量瓶中，用溶剂稀释，配制成 2'-岩藻糖基乳糖浓度约为 5  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液 7。
- A. 3. 5. 2 试样溶液制备
- A. 3. 5. 2. 1 用于示差折光检测的试样溶液
- 精确称取 5 g $\pm$ 0.5 g（精确到 1 mg）样品，加入到 100 mL 的容量瓶中，加水至约容量瓶刻度线 2 cm 以下，振荡溶解，然后加水定容至刻度，配制成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。同时准备三份平行试样溶液。
- 如用于测试的样品不足 5 g，可相应按照比例折算所需精确称取的样品量，配置成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。
- A. 3. 5. 2. 2 用于电雾式检测的试样溶液

准确称取试样 49.0 mg ~ 52.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用溶剂溶解并定容至刻度。每份试样准备三个平行。如需要，调整试样的称样量或稀释体积，确保样品中 D-乳糖或二岩藻糖基乳糖含量在工作曲线的范围内。

### A. 3. 5. 3 系统适用性试验

#### A. 3. 5. 3. 1 示差折光检测器色谱条件的系统适用性试验

满足以下条件时，可进行样品测试：

- 化合物保留时间重复性的相对标准偏差 < 1.0% (n=3)；
- 化合物响应值重复性的相对标准偏差 < 1.0% (n=3)；
- 洗脱液的色谱图应为纯基线。

依据前述分析条件测定，D-乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的参考色谱图谱见附录 B.1。

#### A. 3. 5. 3. 2 电雾式检测器色谱条件的系统适用性试验

系统适用性应同时满足以下条件：

- 2'-岩藻糖基乳糖的保留时间在 12 min ~ 14 min 之间；
- 标准溶液 6 的色谱图中，2'-岩藻糖基乳糖峰的不对称度不小于 0.75，且不大于 1.25；
- 标准溶液 6 的色谱图中，D-乳糖与 2'-岩藻糖基乳糖之间的分离度大于 3.0；
- 以标准溶液 6 的三次进样计算，D-乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖峰面积的相对标准偏差小于 2.5%；

——标准溶液 7 的色谱图中，2'-岩藻糖基乳糖峰的信噪比 ≥ 10。如果检测器不能到达此信噪比，需要相应提高 D-乳糖、二岩藻糖基乳糖标准溶液浓度和试样溶液的浓度。

——按照系列标准溶液，试样测试溶液，系列标准溶液序列测试。试样溶液前后测得系列标准溶液中相同浓度的 2'-岩藻糖基乳糖峰面积的相对偏差或 D-乳糖峰面积的相对偏差需小于 10.0%。如不满足相对偏差要求，需复测。

依据前述分析条件测定，D-乳糖、二岩藻糖基乳糖标准品的参考色谱图谱见附录 B.3。

### A. 3. 5. 4 D-乳糖和二岩藻糖基乳糖含量测定

#### A. 3. 5. 4. 1 面积归一化法

在液相色谱-示差折光检测器参考色谱条件下，D-乳糖和二岩藻糖基乳糖含量以面积归一化法定量。

D-乳糖或二岩藻糖基乳糖含量的质量分数  $\omega_4$  按式 (A.4) 计算。

$$\omega_4 = \frac{A_2}{S_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

- $A_2$ ——试样溶液中 D-乳糖或二岩藻糖基乳糖的峰面积；
  - $S_2$ ——试样溶液中除溶剂峰之外的所有成分峰面积的总和。
- 测定结果保留小数点后两位。

#### A. 3. 5. 4. 2 外标法

在液相色谱-电雾式检测器参考色谱条件下，D-乳糖和二岩藻糖基乳糖含量以外标法定量。

以系列标准溶液中各物质的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标计算过零点的二次标准曲线，依试样溶液的相应的峰面积确定其中 D-乳糖和二岩藻糖基乳糖浓度。

D-乳糖或二岩藻糖基乳糖含量的质量分数  $\omega_5$  按式 (A.5) 计算。

$$\omega_5 = \frac{C_2 \times V_2}{m_2} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

$C_2$  ——由标准曲线得到的待测样品溶液中 D-乳糖或二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）；

$f$  ——稀释因子；

$m_2$  ——试样的质量，单位为毫克（mg）。

上述结果计算方法测定的 D-乳糖或二岩藻糖基乳糖结果保留至小数点后面两位。本方法的检测限为 0.03%。如结果低于检测限，则结果表示为 <0.03%。

#### 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 ≥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.4.2.3 水：GB/T 6682 规定的一级水。

##### 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 μL 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.1 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.1 测试试样溶液制备

溶液	蛋白浓度 (mg/L)	试样溶液	水	牛血清白蛋白标准溶液	考马斯蓝试剂
空白溶液 1	0	0 μL	800 μL	0 μL	200 μL
空白溶液 2	0	0 μL	800 μL	0 μL	200 μL
混合溶液 0	0	600 μL	200 μL	0 μL	200 μL
混合溶液 1	1	600 μL	150 μL	50 μL	200 μL
混合溶液 2	2	600 μL	100 μL	100 μL	200 μL
混合溶液 3	4	600 μL	0 μL	200 μL	200 μL

###### 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。

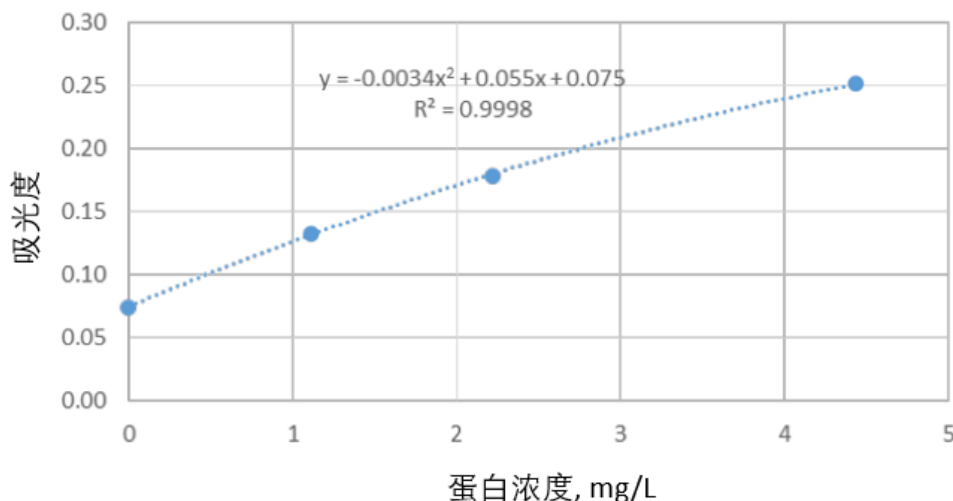


图 A. 1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量  $\omega_6$  按式 (A.6) 计算，单位为 mg/kg。

$$\omega_6 = \frac{-1 \times C_3 \times V_3}{0.6 \times m_3} \times f \times 1000 \dots \dots \dots (A.6)$$

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，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$-1 \times C_3$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_3$ ——试样溶液的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$F$ ——稀释因子；

$m_3$ ——试样的重量，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数平均值 20%。

## A. 5 内毒素的测定

### A. 5. 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. 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 试样溶液配置

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变化时，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 min  $\pm$  2 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.7）计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilog} \sum X/n \dots\dots\dots \text{(A.7)}$$

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. 5. 5. 3 干扰试验

按表 A.2 制备溶液 A、B、C 和 D，使用的试样溶液应为未检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.8）计算：

$$MVD = cL/\lambda \dots\dots\dots (A.8)$$

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，10 EU/mg；

*λ* —— 鲎试剂的标示灵敏度(EU/ml)。

表 A.2 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	试样溶液	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.3 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.3 干扰试验溶液的制备

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. 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.4 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. 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	—	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ/试样溶液	试样溶液	1	2λ	2
C	2λ/内毒素检查用水	试样溶液	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 0.5 λ~2λ，试验有效。

#### A. 5. 5. 5 结果计算

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 2'-岩藻糖基乳糖、D-乳糖和二岩藻糖基乳糖的参考高效液相色谱图谱

B.1 亲水保留色谱柱色谱条件下 D-乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

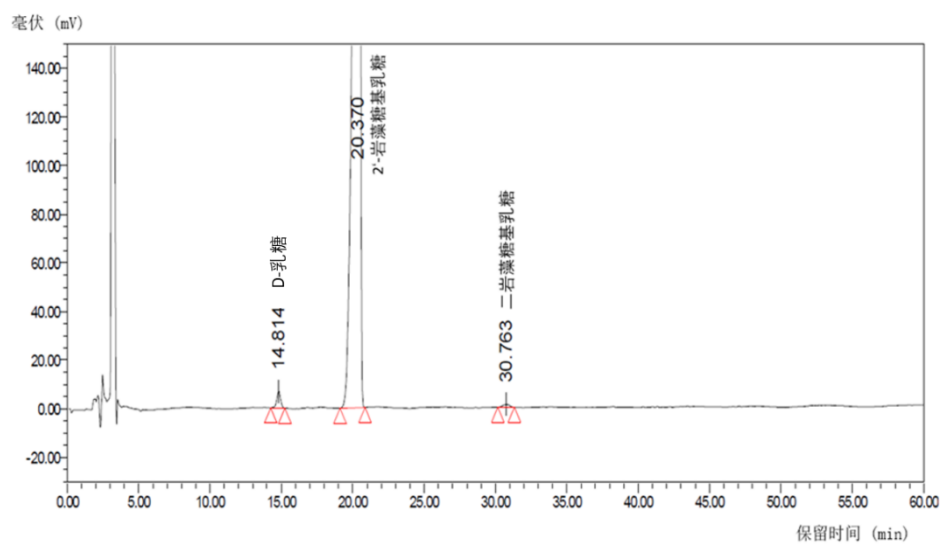


图 B.1 亲水保留色谱柱色谱条件下 D-乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

表 B.1 亲水保留色谱柱色谱条件下各物质的保留时间

化合物	保留时间 (min)
系统溶剂 (水)	2.0 ~ 3.0
D-乳糖	14.8
2'-岩藻糖基乳糖	20.4
二岩藻糖基乳糖	30.8

## B. 2 酰胺键合柱色谱条件下 2'-岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

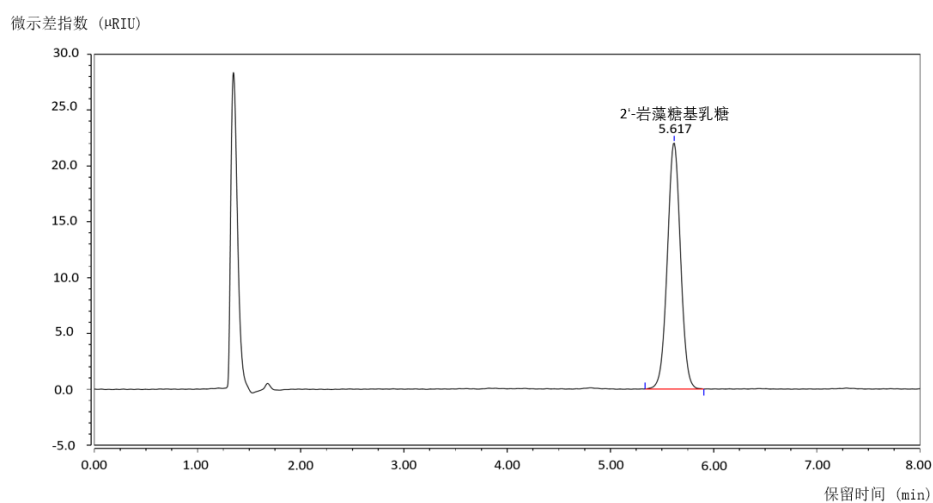


图 B. 2 酰胺键合柱色谱条件下 2'-岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

## B. 3 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下 D-乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

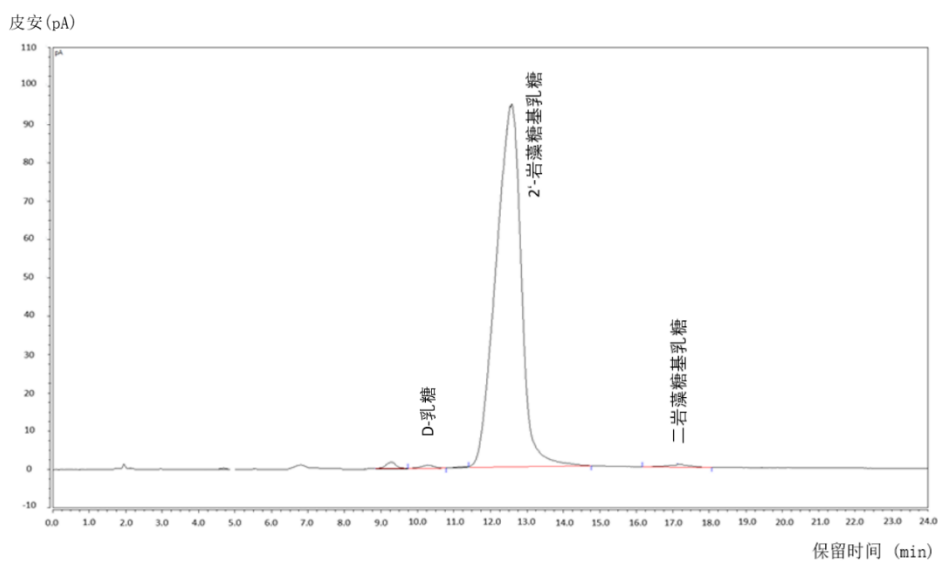


图 B. 3 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下 D-乳糖、2'-岩藻糖基乳糖和二岩藻糖基乳糖对照品的色谱图

表 B.2 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下各物质的保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-乳糖	10.4
2'-岩藻糖基乳糖	12.6
二岩藻糖基乳糖	17.2

## 附录 C 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

### C.1 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息见表 C.1。

表 C.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	大肠杆菌 K-12 DH1 MDO <i>E. coli</i> K-12 DH1 MDO	螺杆菌 ( <i>Helicobacter spp.</i> ) <sup>a</sup>
	大肠杆菌 K-12 MG1655 <i>E. coli</i> K-12 MG1655	螺杆菌 ( <i>Helicobacter spp.</i> ) <sup>a</sup>

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

2.中文名称：乳糖-*N*-新四糖

英文名称：Lacto-*N*-neotetraose, LNnT

功能分类：食品营养强化剂

### (1) 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)	0.2-0.6 g/L (以纯品计,以即食状态计,粉状产品按冲调倍数增加使用量)	当与 2'-岩藻糖基乳糖、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		

### (2) 质量规格要求

#### 1 范围

本质量规格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*-新四糖。乳糖-*N*-新四糖的生产菌应经过安全性评估并符合附录 D 的要求。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

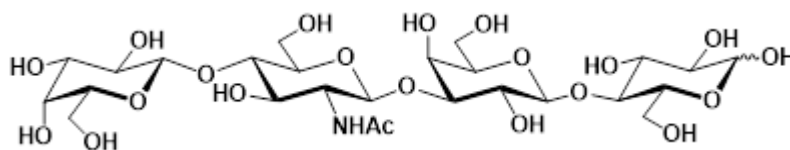
##### 2.1 化学名称

$\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖。

##### 2.2 分子式



##### 2.3 结构式



##### 2.4 相对分子质量

707.63 (按 2020 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	白色至米白色	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	要求	检验方法	
乳糖- <i>N</i> -新四糖（以干基计），w/%	≥	92.0	附录 A 中 A.2
乳糖- <i>N</i> -新四糖果糖异构体，w/%	≤	1.0	附录 A 中 A.2
D-乳糖，w/%	≤	3.0	附录 A 中 A.3
乳糖- <i>N</i> -三糖 II，w/%	≤	3.00	附录 A 中 A.3
线性乳糖- <i>N</i> -新六糖，w/%	≤	3.00	附录 A 中 A.3
母乳总糖 <sup>a</sup> （以干基计），w/%	≥	95.0	附录 A 中 A.4
pH（20℃，5%溶液）		4.0~7.0	GB/T 20885
水分，w/%	≤	9.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
灰分，w/%	≤	0.4	GB 5009.4
甲醇/（mg/kg）	≤	100	附录 A 中 A.5
残留蛋白/（mg/kg）	≤	0.01	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> 母乳总糖指乳糖- <i>N</i> -新四糖、D-乳糖、乳糖- <i>N</i> -三糖 II 和线性乳糖- <i>N</i> -新六糖的和，结构式见附录 C。			

#### 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）	500	GB 4789.2



酵母/ (CFU/g)	10	GB 4789.15
霉菌/ (CFU/g)	10	GB 4789.15
肠杆菌科/ (CFU/g)	10	GB 4789.41
沙门氏菌/(25g)	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 规定的三级水。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*-新四糖（以干基计）和乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的测定

#### A.2.1 方法提要

试样溶于溶剂，在氨基色谱柱的液相色谱条件下分离，用紫外检测器检测乳糖-*N*-新四糖，外标法定量；用电雾式检测器检测乳糖-*N*-新四糖果糖异构体，使用乳糖-*N*-新四糖对照品校准外标法定量。

#### A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 乳糖-*N*-新四糖对照品（CAS 13007-32-4）：纯度 $\geq 91\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.2 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体对照品：纯度 $\geq 70\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.3 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.2.4 乙腈：色谱纯。

A.2.2.5 溶剂：乙腈:水=50:50 (v/v)。

#### A.2.3 仪器和设备

A.2.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外检测器和电雾式检测器。

A.2.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

#### A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 色谱柱：氨基聚合物柱，250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.2.4.2 流动相：A:水；B:乙腈。

A.2.4.3 流速：1.1 mL/min。

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

流动相	时间/min				
	0	16	22	22.2	28
流动相 A, %	30	36	36	30	30
流动相 B, %	70	64	64	70	70

A.2.4.5 柱温：25  $^{\circ}$ C。

A.2.4.6 紫外检测器：波长 205 nm。

A.2.4.7 电雾式检测器：雾化器温度：35  $^{\circ}$ C；数据采集速率：20 Hz；功率功能：1；过滤器：5。

A.2.4.8 进样量：10  $\mu$ L。

A.2.4.9 运行时间：28 min。

#### A.2.5 分析步骤

##### A.2.5.1 溶液的配制

###### A.2.5.1.1 标准储备溶液

乳糖-*N*-新四糖系列标准储备溶液：准确称取三份适量乳糖-*N*-新四糖对照品至适宜的容量瓶中，用溶剂溶解，根据对照品的纯度折算，配制成乳糖-*N*-新四糖最终浓度约为 1.6

mg/mL、2.0 mg/mL 和 2.4 mg/mL 的标准储备溶液 1、标准储备溶液 2 和标准储备溶液 3。该溶液在 4℃ ~ 8℃ 冰箱中保存，有效期 4 周。

乳糖-*N*-新四糖果糖异构体标准储备溶液：称取约 2.0 mg ~ 3.0 mg 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体对照品于 1.5 mL 的玻璃小瓶中，加入 1 mL 溶剂溶解，配制成乳糖-*N*-新四糖果糖异构体标准储备溶液。该溶液在 4℃ ~ 8℃ 冰箱中密封保存，有效期 4 个月。

#### A. 2. 5. 1. 2 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体色谱峰鉴定溶液

将 50 μL 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体标准储备溶液和 50 μL 乳糖-*N*-新四糖标准储备溶液 2 转移至 5 mL 容量瓶中，用溶剂稀释至刻度。

#### A. 2. 5. 1. 3 乳糖-*N*-新四糖标准工作溶液

分别吸取乳糖-*N*-新四糖标准储备溶液 1、2 和 3 各 1.0 mL 至三个 10 mL 容量瓶中，用溶剂稀释并定容，配制成乳糖-*N*-新四糖标准工作溶液 1、2 和 3，浓度分别约为 0.16 mg/mL、0.20 mg/mL 和 0.24 mg/mL。

#### A. 2. 5. 1. 4 用于乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量测定的标准工作溶液

乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量用乳糖-*N*-新四糖标准品定量。分别取不同体积的乳糖-*N*-新四糖标准储备溶液 2 储备液，用溶剂稀释成 4 个不同浓度的系列标准工作溶液，即标准工作溶液 1、标准工作溶液 2、标准工作溶液 3、标准工作溶液 4。标准工作溶液中乳糖-*N*-新四糖的浓度依次约为 6 μg/mL、12 μg/mL、20 μg/mL 和 40 μg/mL。

#### A. 2. 5. 1. 5 试样溶液

测定乳糖-*N*-新四糖含量的试样溶液：准确称取试样 20.0 mg ~ 22.0 mg 于 100 mL 容量瓶中，用溶剂溶解并定容。每份试样准备三个平行。

测定乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量的试样溶液：准确称取试样 20.0 mg ~ 22.0 mg 于 10 mL 容量瓶中，用溶剂溶解并定容。如需要，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。每份试样准备三个平行。

#### A. 2. 5. 2 系统适用性试验

溶剂连续进样至少五次，待液相色谱响应稳定后在电雾式检测器条件下进行系统适用性测试。满足以下条件后可进行乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量测试：

- 乳糖-*N*-新四糖标准溶液 3 中乳糖-*N*-新四糖色谱峰的不对称性在 0.95 ~ 1.25 之间；
- 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体色谱峰鉴定溶液的色谱图中，乳糖-*N*-新四糖和乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的分离度大于 2.2；
- 用于乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量测定的标准工作溶液 2 连续进样 3 次，乳糖-*N*-新四糖峰面积的相对标准偏差 < 5%；
- 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体标准工作溶液 1 的色谱图中，乳糖-*N*-新四糖色谱峰的信噪比大于 10；

——按照标准工作溶液、试样溶液和标准工作溶液顺序进样测试。试样溶液前后的两次标准工作溶液 2 测试的峰面积的相对偏差需小于 10.0%。如不满足相对偏差要求，需复测。

#### A. 2. 5. 3 乳糖-*N*-新四糖（以干基计）的测定

使用紫外检测器测定乳糖-*N*-新四糖的含量。乳糖-*N*-新四糖的参考色谱图见附录 B.1。

以系列标准溶液中乳糖-*N*-新四糖的浓度为横坐标，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乳糖-*N*-新四糖的浓度。

若标准曲线的相关系数 ( $R^2$ ) 小于 0.995，或试样溶液的信噪比小于 100，则需重新进行含量测定。

乳糖-*N*-新四糖含量的质量分数  $\omega_1$  按式 (A.1) 计算。

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

式中：

$C_1$ ——由标准曲线得到的待测样品溶液中乳糖-*N*-新四糖的浓度，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）；

$f$ ——稀释因子；

$m_1$ ——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%。测试结果取算数平均值。

乳糖-*N*-新四糖（以干基计）含量的质量分数  $\omega_2$  按式（A.2）计算。

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

式中：

$\omega_1$ ——乳糖-*N*-新四糖含量的质量分数，%；

$\omega$ ——按照 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的样品中水的质量百分含量。

结果保留小数点后一位。

#### A. 2. 5. 4 乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的测定

使用电雾式检测器测定乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的含量。参考色谱图见附录 B.2。

以系列乳糖-*N*-新四糖标准工作溶液的峰面积为纵坐标，标准工作溶液浓度为横坐标，绘制通过原点的二次标准曲线。通过试样溶液中乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的峰面积，在二次标准曲线上求得其对应的浓度。

乳糖-*N*-新四糖果糖异构体含量的质量分数  $\omega_3$  按式（A.3）计算。

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

式中：

$C_2$ ——由标准曲线得到的试样溶液中乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的浓度，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）；

$f$ ——稀释因子；

$m_2$ ——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 10%。测试结果取算数平均值，结果保留小数点后一位。本方法的检测限为 0.3%。如结果低于检测限，则结果表示为 <0.3%。

### A. 3 D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II 和线性乳糖-*N*-新六糖的测定

#### A. 3. 1 方法提要

试样溶于水，采用弱阴离子交换色谱法分离，脉冲安培检测器检测，以 D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-新六糖对照品的保留时间定性。外标法定量 D-乳糖；使用乳糖-*N*-新四糖对照品校准，外标法定量乳糖-*N*-三糖 II 和线性乳糖-*N*-新六糖。

#### A. 3. 2 试剂和材料

- A. 3. 2. 1 乳糖-*N*-新四糖对照品 (CAS 13007-32-4)：纯度 $\geq 91\%$ 或标明含量的等同物。
- A. 3. 2. 2 D-乳糖一水合物对照品 (CAS 64044-51-5)：无水 D-乳糖含量 $\geq 95\%$ 或标明含量的等同物。
- A. 3. 2. 3 乳糖-*N*-三糖 II 对照品：纯度 $\geq 70\%$ 或标明含量的等同物。
- A. 3. 2. 4 线性乳糖-*N*-新六糖对照品：纯度 $\geq 70\%$ 或标明含量的等同物。
- A. 3. 2. 5 水：GB/T 6682 规定的一级水。
- A. 3. 2. 6 乙腈：色谱纯。
- A. 3. 2. 7 氢氧化钠溶液：1 g/mL。
- A. 3. 2. 8 氮气：纯度 $> 99.99\%$ 。
- A. 3. 3 仪器和设备
- A. 3. 3. 1 高效阴离子交换色谱仪：配备脉冲安培检测器。
- A. 3. 3. 2 分析天平：感量 0.0001 g。
- A. 3. 4 参考色谱条件
- A. 3. 4. 1 色谱柱：乙基乙烯基苯/二乙烯基苯底物 (55% 交联) 吸附 6% 交联季胺官能化乳胶胶粒为固定相的保护柱 (50 mm  $\times$  4 mm) 或等效离子交换色谱柱，及其对应分离柱 (250 mm  $\times$  4 mm) 或等效离子交换色谱柱。
- A. 3. 4. 2 柱温：25  $^{\circ}\text{C}$ 。
- A. 3. 4. 3 流动相：淋洗液 A、淋洗液 B 和淋洗液 C。
- A. 3. 4. 4 洗脱类型：梯度洗脱，洗脱条件见表 A.2。

表 A. 2 离子色谱梯度洗脱条件

流动相	时间 (min)							
	0	20	20.5	38	38.5	43.5	44	59
淋洗液 A, %	0	0	0	0	80	80	0	0
淋洗液 B, %	65	65	0	0	20	20	65	65
淋洗液 C, %	35	35	100	100	0	0	35	35

- A. 3. 4. 5 流速：0.45 mL/min。
- A. 3. 4. 6 进样量：5  $\mu\text{L}$ 。
- A. 3. 4. 7 脉冲安培检测器
- A. 3. 4. 7. 1 检测器温度：35  $^{\circ}\text{C}$ 。
- A. 3. 4. 7. 2 数据收集速率 (Hz)：10。
- A. 3. 4. 7. 3 检测器波形为碳水化合物检测四电位波形，从 0.2s 开始数据记录，到 0.4s 停止采集数据，参数见表 A.3。
- A. 3. 4. 7. 4 参比电极：银/氯化银电极。
- A. 3. 4. 7. 5 工作电极：金电极。

表 A. 3 检测器波形

参数	时间 (s)							
	0	0.2	0.4	0.41	0.42	0.43	0.44	0.5
电压 (V)	0.1	0.1	0.1	-2.0	-2.0	0.6	-0.1	-0.1

### A. 3. 5 分析步骤

#### A. 3. 5. 1 流动相的配制

淋洗液 A：在塑料瓶内加入 1L 经 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜真空过滤的水，与 26 mL 1 g/mL 氢氧化钠溶液混合，轻摇，配制成 26 g/L 的氢氧化钠溶液。临用前配制，用氮气置换塑料瓶的上部空间，做氮封保护。

淋洗液 B: 临用前将经 0.2 μm 滤膜真空过滤的水装入塑料瓶, 并用氮气置换塑料瓶的上部空间, 做氮封保护。

淋洗液 C: 在塑料瓶内加入 1L 经 0.2 μm 滤膜真空过滤的水, 与 5.2 mL 1 g/mL 氢氧化钠溶液混合, 轻摇, 配制成 5.2 g/L 的氢氧化钠溶液。临用前配制, 氮气置换塑料瓶的上部空间, 做氮封保护。

淋洗液用水均需使用纯水机新鲜制备的纯净水 (≥18.2 MΩcm)。淋洗液塑料瓶在实验中保持 35 千帕 ~ 55 千帕的氮气保护。淋洗液每周新鲜配置。

### A. 3. 5. 2 溶液配制

#### A. 3. 5. 2. 1 杂质峰鉴别用储备溶液

称取约 1.0 mg 乳糖-N-三糖 II 和 1.0 mg 线性乳糖-N-新六糖对照品于 2 个具塞的玻璃小瓶中, 各自用 0.9 mL 水和 0.1 mL 乙腈混合溶液溶解后, 作为杂质峰鉴别用的储备溶液。置于冰箱的冷冻保存, 有效期一年。解冻后在 15°C 条件下, 两个月内有效。

#### A. 3. 5. 2. 2 标准储备溶液

称取约 20 mg 乳糖-N-新四糖标准品于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容, 制备乳糖-N-新四糖标准储备溶液。称取约 20 mg D-乳糖一水合物对照品于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容, 制备 D-乳糖标准储备溶液。以上标准储备溶液在冰箱中 2°C ~ 8°C 保存。有效期为 8 周。

#### A. 3. 5. 2. 3 标准工作溶液

按照表 A.4 的规定的规定, 用水配制标准工作溶液。

表 A. 4 工作溶液的配制

工作溶液	配制方法	备注
标准工作溶液 1	各吸取乳糖-N-新四糖标准储备溶液和 D-乳糖标准储备溶液 50 μL 于同一 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	在 2°C ~ 8°C 条件下可稳定储存 2 周。
标准工作溶液 2	吸取 1.0 mL 标准工作溶液 1 于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
标准工作溶液 3	吸取 1.0 mL 标准工作溶液 2 于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	
峰鉴别用工作溶液	各吸取乳糖-N-三糖 II 标准储备溶液和线性乳糖-N-新六糖标准储备溶液 20 μL 于同一 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。	在冷冻条件下可稳定储存 1 年。解冻后, 在 15°C 条件下的自动取样器中, 可以稳定储存 2 个月。

#### A. 3. 5. 2. 4 试样溶液

称量 20.0 mg 乳糖-N-新四糖样品于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容。取 1.0 mL 该试样储备溶液于 20 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容。如需要, 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. 3. 5. 3 系统适用性试验

以水为空白样, 连续进样至少二次, 进行系统适用性测试。当满足以下条件时, 可进行样品检测:

——标准工作溶液 3 进样后, 色谱图中乳糖-N-新四糖的信噪比应 ≥10;

——按照标准工作溶液 1 和标准工作溶液 2 各进样一次, 2 个平行试样溶液各进样一次, 标准工作溶液 1 和标准工作溶液 2 各进样一次的顺序进行测试。试样溶液前后测得标准

工作溶液 1, 标准工作溶液 2 中相同浓度的 D-乳糖的峰面积或乳糖-N-新四糖峰面积相对偏差应不大于 10.0%。若不满足相对偏差要求, 需复测。

### A. 3. 6 测定

标准工作溶液 3 和峰鉴别用工作溶液进样后, 得到的色谱图与附录 B.3 色谱图比较, 确定所测杂质的色谱峰位置。以 D-乳糖的标准曲线, 外标法定量 D-乳糖的含量。以乳糖-N-新四糖标准曲线, 外标法定量乳糖-N-三糖 II 和线性乳糖-N-新六糖。试样溶液进样的色谱图和局部放大图见附录 B.4。

### A. 3. 7 结果计算

#### A. 3. 7. 1 D-乳糖结果的计算

用标准工作溶液 1 及标准工作溶液 2 进样获得的 D-乳糖的峰面积为纵坐标, D-乳糖的浓度为横坐标通过原点绘制线性标准曲线。通过试样溶液色谱图中 D-乳糖的峰面积, 在标准曲线上获得对应的浓度。

D-乳糖含量质量分数  $\omega_4$  按式 (A.4) 计算。

$$\omega_4 = \frac{C_3 \times V_3}{m_3} \times f \times 100\% \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

$C_3$  ——由标准曲线得到的试样溶液中 D-乳糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$V_3$  ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$  ——稀释因子;

$m_3$  ——试样的质量, 单位为毫克 (mg)。

结果以两次平行测定的平均值表示。该方法对 D-乳糖的报告限为 0.03%。若结果高于报告限, 以质量分数表示, 结果保留小数点后二位; 若结果低于报告限, 结果表示为 <0.03%。

#### A. 3. 7. 2 乳糖-N-三糖 II 结果的计算

用标准工作溶液 1 及标准工作溶液 2 进样获得的乳糖-N-新四糖的峰面积为纵坐标, 乳糖-N-新四糖浓度为横坐标, 通过原点绘制的线性标准曲线。通过试样溶液色谱图中乳糖-N-三糖 II 的峰面积, 在标准曲线上获得对应的浓度。

乳糖-N-三糖 II 含量的质量分数  $\omega_5$  按式 (A.5) 计算。

$$\omega_5 = \frac{C_4 \times V_4 \times 0.94}{m_4} \times f \times 100\% \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

$C_4$  ——由标准曲线得到的试样溶液中乳糖-N-三糖 II 的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$V_4$  ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$  ——稀释因子;

$m_4$  ——试样的质量, 单位为毫克 (mg)。

0.94 ——乳糖-N-三糖 II 与线性乳糖-N-新四糖相对校正系数。

结果以两次平行测定的平均值表示。该方法对乳糖-N-三糖 II 的报告限是 0.03%。若结果高于报告限, 以质量分数表示, 结果保留小数点后二位; 若结果低于报告限, 结果表示为 <0.03%。

#### A. 3. 7. 3 线性乳糖-N-新六糖结果的计算

用标准工作溶液 1 及标准工作溶液 2 的乳糖-*N*-新四糖的峰面积为纵坐标, 乳糖-*N*-新四糖浓度为横坐标, 通过原点绘制的线性标准曲线。通过试样溶液色谱图中线性乳糖-*N*-新六糖的峰面积, 在标准曲线上获得对应的浓度。

线性乳糖-*N*-新六糖含量的质量分数  $\omega_6$  按式 (A.6) 计算。

$$\omega_6 = \frac{C_5 \times V_5 \times 1.30}{m_5} \times f \times 100 \dots\dots\dots (A.6)$$

式中:

$C_5$  ——由标准曲线得到的试样溶液中线性乳糖-*N*-新六糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$V_5$  ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$  ——稀释因子;

$m_5$  ——试样的质量, 单位为毫克 (mg);

1.30 ——线性乳糖-*N*-新六糖与乳糖-*N*-新四糖相对校正因子的系数。

结果以两次平行测定的平均值表示。该方法对线性乳糖-*N*-新六糖的报告限是 0.04%。若结果高于报告限, 以质量分数表示, 结果保留小数点后二位; 若结果低于报告限, 结果表示为 <0.04%。

#### A. 4 母乳总糖 (以干基计) 含量的计算

以干基计的母乳总糖含量的质量分数  $\omega_7$  按式 (A.7) 计算。

$$\omega_7 = \frac{\omega_1 + \omega_4 + \omega_5 + \omega_6}{1 - \omega} \dots\dots\dots (A.7)$$

式中:

$\omega_1$  ——乳糖-*N*-新四糖质量分数, %;

$\omega_4$  ——D-乳糖含量质量分数, %;

$\omega_5$  ——乳糖-*N*-三糖 II 含量的质量分数, %;

$\omega_6$  ——线性乳糖-*N*-新六糖含量的质量分数, %;

$\omega$  ——按照 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的样品中水的质量百分含量。

#### A. 5 甲醇的测定

##### 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, 内标法定量。

##### A. 5. 2 试剂和溶液

A. 5. 2. 1 N,N-二甲基乙酰胺: 色谱纯。

A. 5. 2. 2 1,4-二氧六环: 试剂级。

A. 5. 2. 3 甲醇: 色谱纯。

A. 5. 2. 4 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 顶空进样器。

A. 5. 3. 3 分析天平: 感量 0.0001 g。

##### A. 5. 4 测试条件

###### A. 5. 4. 1 顶空条件

A. 5. 4. 1. 1 顶空瓶温度: 90 °C。



- A. 5. 4. 1. 2 定量环温度：150 °C。
- A. 5. 4. 1. 3 传输线温度：160 °C。
- A. 5. 4. 1. 4 顶空瓶平衡时间：15 min。
- A. 5. 4. 1. 5 气相循环时间：21 min。
- A. 5. 4. 2 色谱条件
  - A. 5. 4. 2. 1 毛细管色谱柱：氰丙苯基（6%）和聚二甲硅氧烷（94%）交联的固定相，长 40 m，内径 0.18 mm，膜厚 1 μm 或等效柱。
  - A. 5. 4. 2. 2 载气：氮气。
  - A. 5. 4. 2. 3 载气流量：1.4 mL/min。
  - A. 5. 4. 2. 4 进样口温度：250 °C。
  - A. 5. 4. 2. 5 程序升温条件：45 °C，保持 6 min，每分钟以 20 °C 升至 230 °C，保持 5.75 min。
  - A. 5. 4. 2. 6 检测器温度：300 °C。
  - A. 5. 4. 2. 7 分流比：25:1。
  - A. 5. 4. 2. 8 进样量：250 μL
- A. 5. 5 分析步骤
  - A. 5. 5. 1 溶液配制
    - A. 5. 5. 1. 1 内标溶液
 

取 20 mL N,N-二甲基乙酰胺，置于干净干燥的密封试剂瓶内。将约 100 mg ~ 125 mg (100 μL ~ 125 μL) 的 1,4-二氧六环转移至试剂瓶内，再加入 5 mL N,N-二甲基乙酰胺稀释至 25 mL 并充分混合。
    - A. 5. 5. 1. 2 标准储备溶液
 

取 8 mL 内标溶液于 10 mL 容量瓶中。将容量瓶放在分析天平上去皮后，加入 45 mL 的甲醇，称量加入甲醇的重量。用内标溶液稀释定容，混合均匀。
    - A. 5. 5. 1. 3 标准工作溶液
 

准确转移 290 μL 内标溶液于 20 mL 顶空样品瓶中，加入 10 μL 的标准储备溶液，再加入 300 μL 水，最终体积为 600 μL，作为标准工作溶液 1。

准确转移 270 μL 内标溶液于 20 mL 顶空样品瓶中，加入 30 μL 标准储备溶液及 300 μL 水，作为标准工作溶液 2。

准确转移 230 μL 内标溶液至 20 mL 顶空样品瓶中，加入 70 μL 标准储备溶液及 300 μL 水，作为标准工作溶液 3。
    - A. 5. 5. 1. 4 空白溶液
 

取 300 μL 内标溶液于 20 mL 顶空样品瓶中，然后加入 300 μL 水。
    - A. 5. 5. 1. 5 试样溶液
 

准确称取 100 mg 样品于一个 20 mL 的顶空样品瓶中，准确加入 300 μL 内标溶液，再加入 300 μL 水。
  - A. 5. 5. 2 测定
 

按照空白溶液、试样溶液、空白溶液和系列标准工作溶液的顺序进样测定。
- A. 5. 6 结果计算
 

以标准工作溶液中甲醇峰面积与 1,4-二氧六环峰面积的比值为纵坐标，标准工作溶液中甲醇质量（微克）为横坐标，绘制标准曲线。

甲醇含量的  $\omega_8$  按式（A.8）计算，单位以 mg/kg 表示。

$$\omega_8 = \frac{R}{a \times m_s} \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

$R$ ——试样中甲醇与内标 1,4-二氧六环峰面积比；

$A$ ——标准曲线斜率，单位为每微克 ( $\mu\text{g}$ )；

$m_6$ ——试样质量，单位为克 (g)。

参考色谱图见附录 B.5。

该方法的定量限为 10 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 <10 mg/kg。结果保留整数。

## 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. 6.2.3 水：GB/T 6682 规定的一级水。

### 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. 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.5 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.5 测试试样溶液制备

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

#### A. 6.4.5 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。

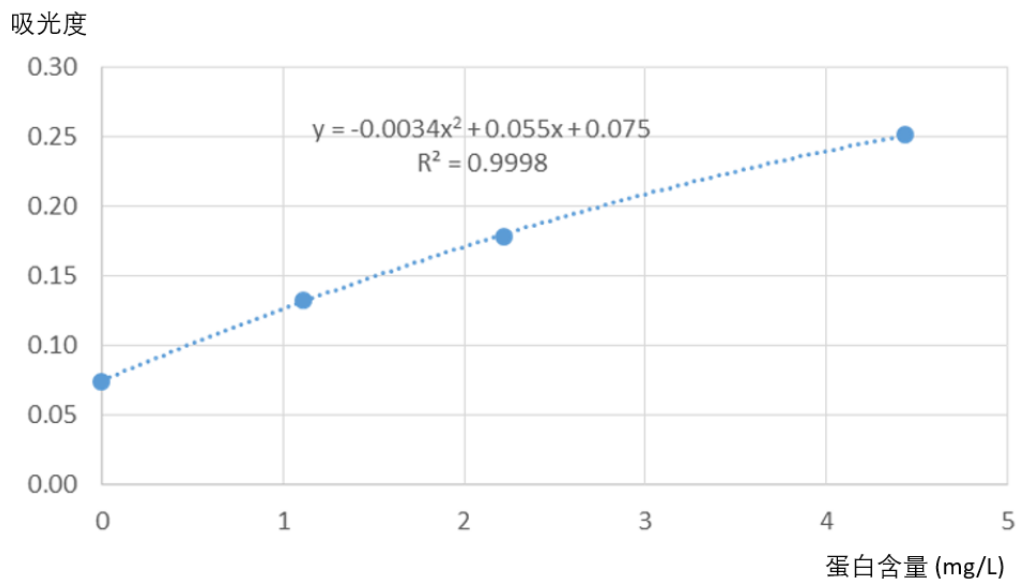


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量  $\omega_6$  按式 (A.9) 计算, 单位为 mg/kg。

$$\omega_6 = \frac{-1 \times C_3 \times V_3}{0.6 \times m_3} \times f \times 1000 \dots \dots \dots (A.9)$$

式中:

$C_3$ ——混合溶液中蛋白浓度, 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);

$f$ ——稀释因子;

$m_3$ ——试样的重量, 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数平均值 20%。

## A.7 内毒素的测定

### 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  $< 0.015 \text{ EU/mL}$ 。

### 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 试样溶液配置

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 sec 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 min  $\pm 2$  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。

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

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.6 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  $c=\lambda/L$ ；

$L$  —— 试样的细胞内毒素限量，10 EU/mg；

$\lambda$  —— 鲎试剂的标示灵敏度(EU/ml)。

表 A. 6 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	试样溶液	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. 7. 5. 4 测定

##### A. 7. 5. 4. 1 凝胶限度试验

按表 A.7 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. 7 干扰试验溶液的制备

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.8 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. 8 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	—	1	—	2
			2	—	2
			4	—	2
			8	—	2
B	2λ/试样溶液	试样溶液	1	2λ	2
C	2λ/内毒素检查用水	试样溶液	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 0.5 λ~2λ，试验有效。

#### A. 7. 5. 5 结果计算

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  $c_g = \text{antilog}(\sum \lg c / 2)$ ]。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 λ（如果检验的是稀释过的试样，则记为小于 λ 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 λ。

## 附录 B 高效液相参考色谱图

### B. 1 紫外检测器条件下乳糖-*N*-新四糖的参考色谱图

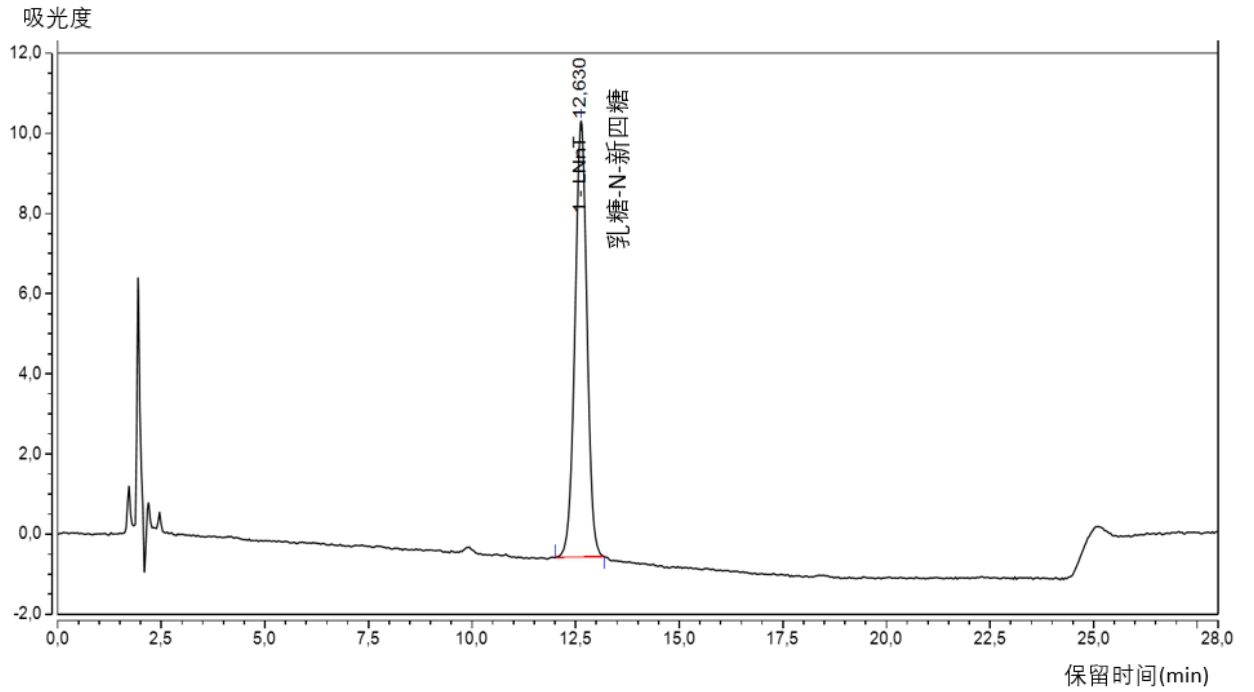


图 B. 1 紫外检测器条件下乳糖-*N*-新四糖的参考色谱图

### B. 2 液相色谱电雾式检测条件下乳糖-*N*-新四糖和乳糖-*N*-新四糖果糖异构体的参考色谱图

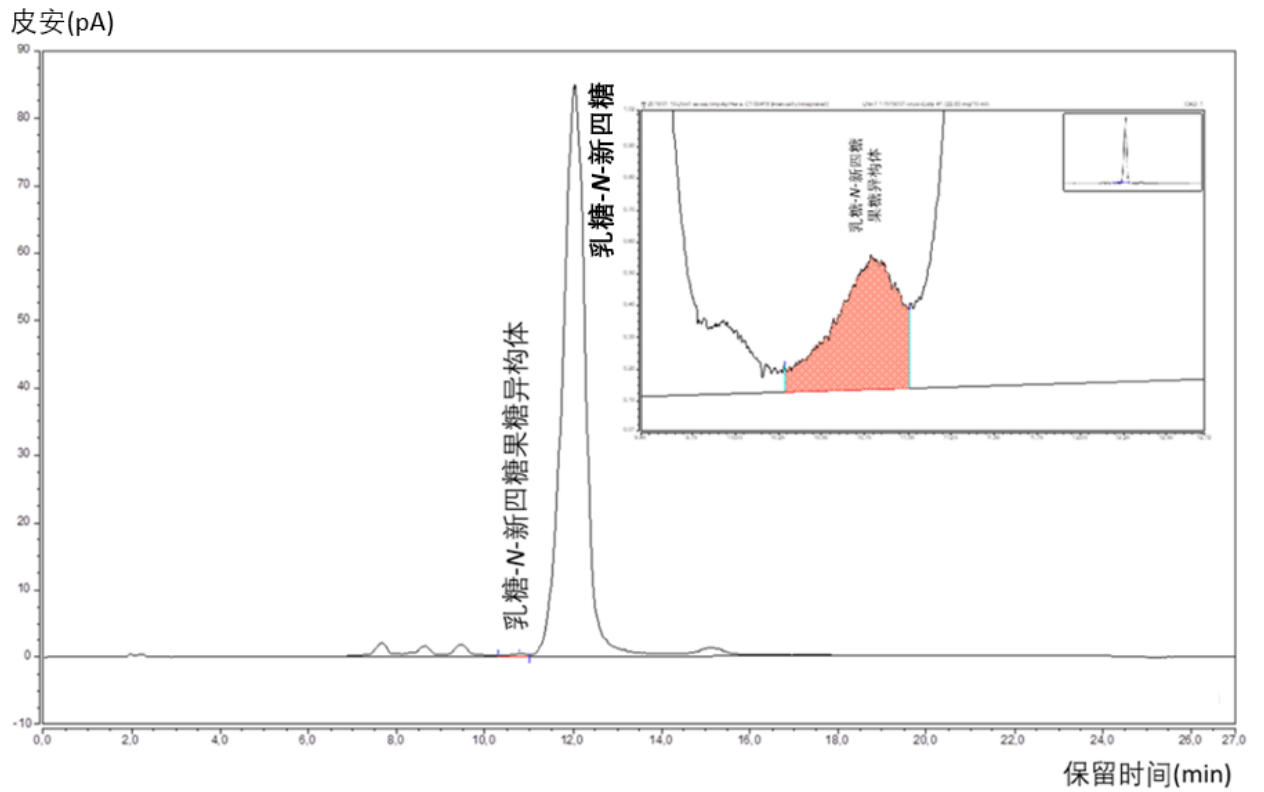


图 B. 2 液相色谱电雾式检测条件下乳糖-*N*-新四糖和乳糖-*N*-新四糖果糖异构体

的参考色谱图

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)
乳糖- <i>N</i> -新四糖	12 ~ 13
乳糖- <i>N</i> -新四糖果糖异构体	10 ~ 11

B.3 浓度为 0.01mg/mL 的 D-乳糖和乳糖-*N*-新四糖对照品溶液的参考色谱图  
纳库伦(nC)

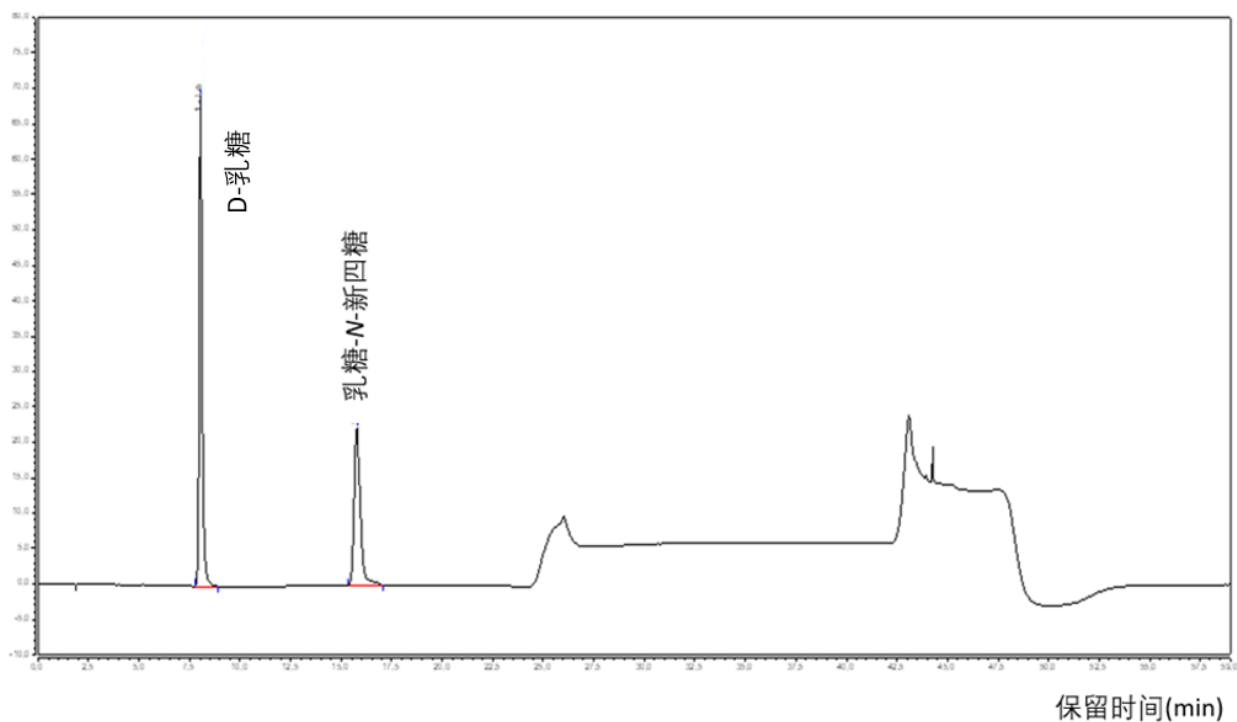


图 B.3 浓度为 0.01mg/mL 的 D-乳糖和乳糖-*N*-新四糖对照品溶液的参考色谱图



#### B. 4 乳糖-N-新四糖试样溶液的参考色谱图

纳库伦(nC)

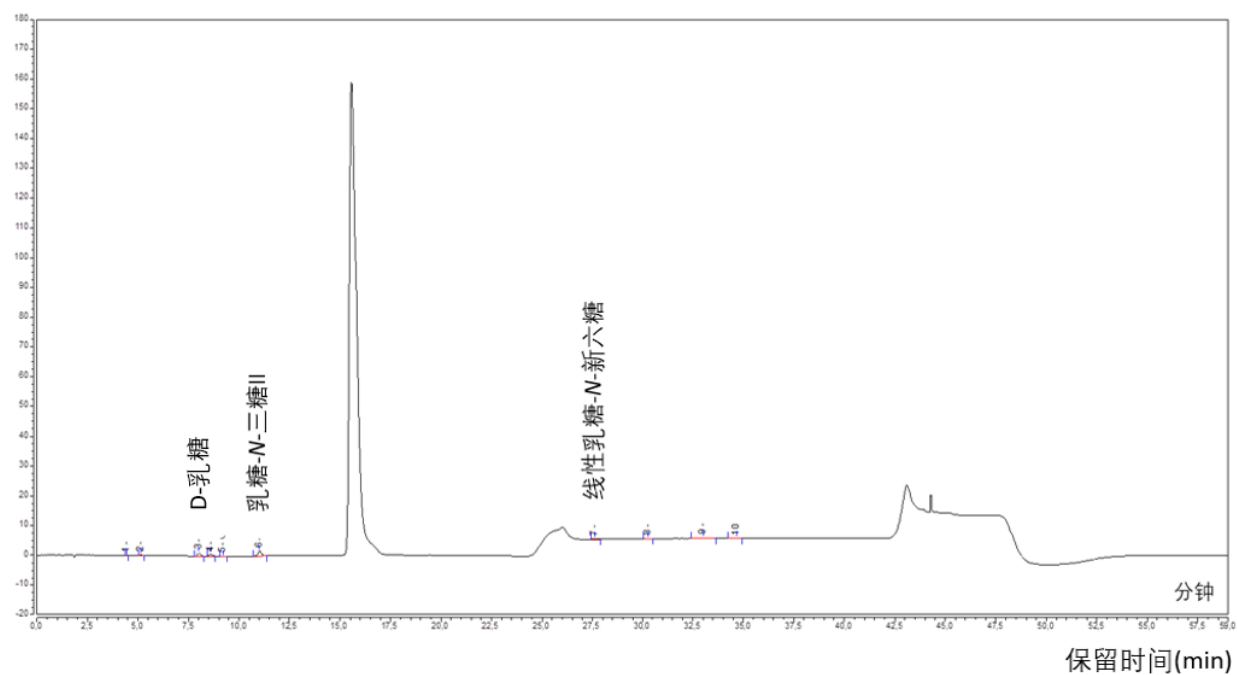


图 B. 4. 1 乳糖-N-新四糖试样溶液的参考色谱图

纳库伦(nC)

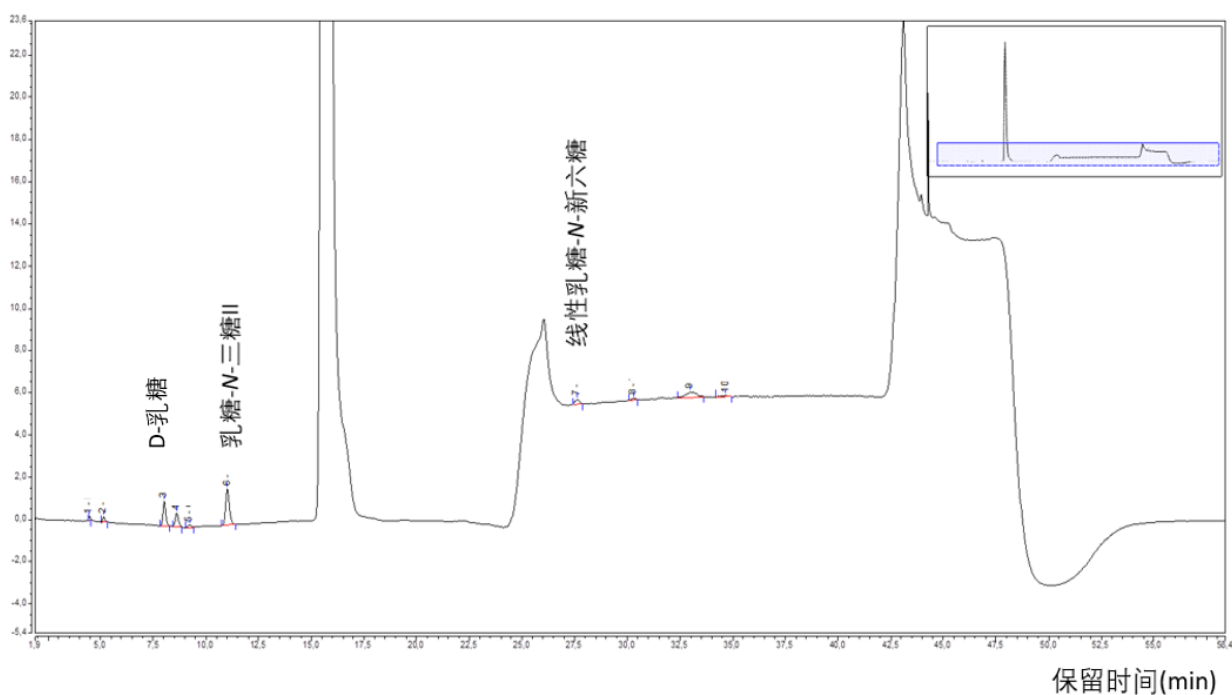


图 B. 4. 2 乳糖-N-新四糖试样溶液放大的参考色谱图

表 B. 2 色谱条件下各物质的参考保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-乳糖	8.0
乳糖-N-三糖II	11.0
乳糖-N-新四糖	15.8
线性乳糖-N-新六糖	27.6

B. 5 含有甲醇、1,4-二氧六环和 N, N-二甲基乙酰胺校准溶液的参考色谱图

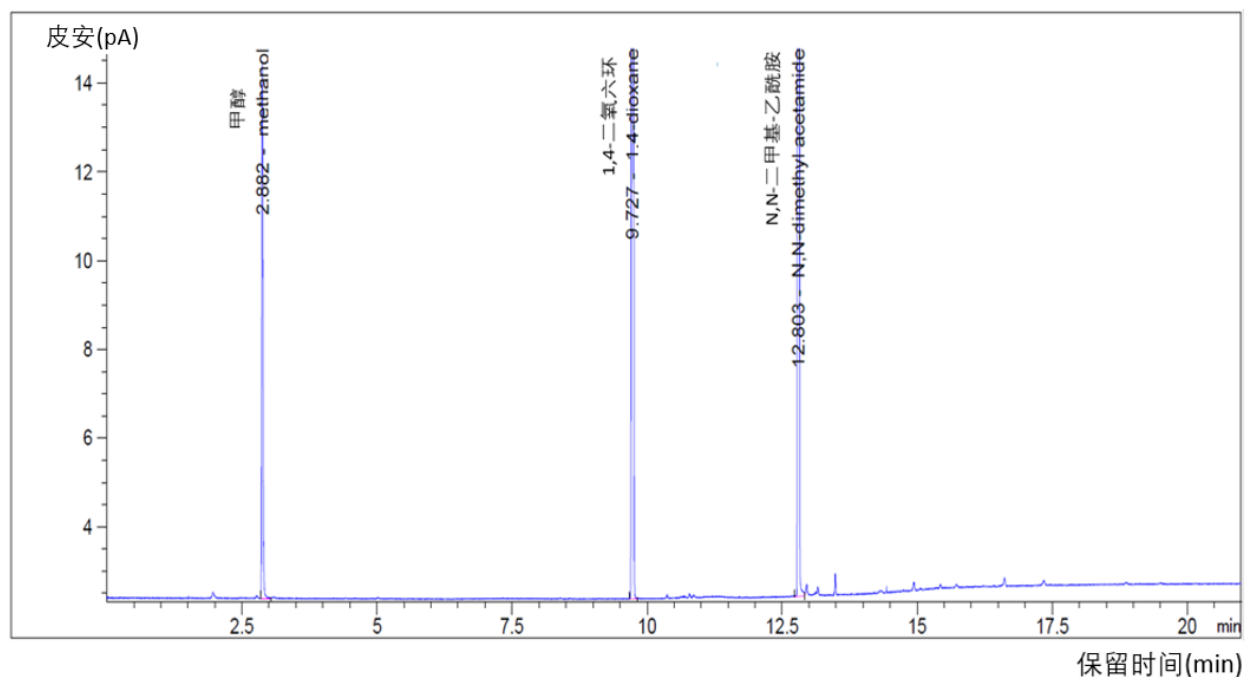


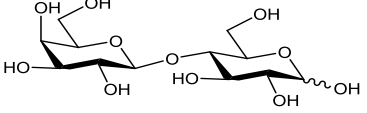
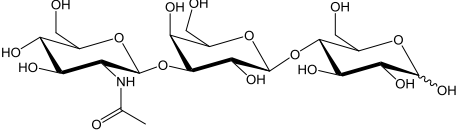
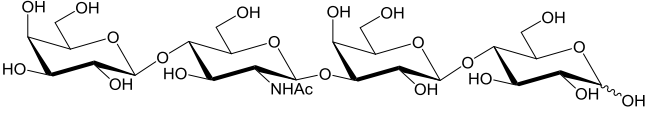
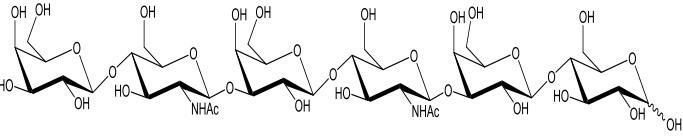
图 B. 5 含有甲醇、1,4-二氧六环和 N, N-二甲基乙酰胺校准溶液的参考色谱图

## 附录 C 母乳总糖各物质的结构式

### C.1 母乳总糖各物质的结构式

母乳总糖各物质的结构式见表 C.1。

表 C.1 母乳总糖各物质的结构式

化合物名称	结构式
D-乳糖	
乳糖-N-三糖 II	
乳糖-N-新四糖	
线性乳糖-N-新六糖	

## 附录 D 用于生产乳糖-*N*-新四糖的生产菌信息

### D. 1 用于生产乳糖-*N*-新四糖的生产菌信息

用于生产乳糖-*N*-新四糖的生产菌信息见表 D. 1。

表 D. 1 用于生产乳糖-*N*-新四糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
乳糖- <i>N</i> -新四糖	大肠杆菌K-12 DH1 MDO	奈瑟菌 ( <i>Neisseria spp.</i> ) <sup>a</sup> 和
Lacto- <i>N</i> -neotetraose	<i>E. coli</i> K-12 DH1 MDO	螺杆菌 ( <i>Helicobacter spp.</i> ) <sup>b</sup>

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

<sup>b</sup>为  $\beta$ -1,4-半乳糖苷基转移酶供体

(五) 扩大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	07.04	焙烤食品馅料 及表面用挂浆 (仅限焙烤食品馅料)	2.0	以环己基氨基磺酸计
			16.06	膨化食品	0.2	
2	维生素 E	抗氧化剂	06.03.02.04	面糊(如用于 鱼和禽肉的拖 面糊)、裹粉、 煎炸粉	0.2	—

附件 2:

## 拟征求意见的食品添加剂新品种背景材料

### (一) 聚天冬氨酸钾

1.背景资料。聚天冬氨酸钾申请作为食品添加剂新品种。本次申请用于葡萄酒（食品类别 15.03.01）。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允许其作为食品添加剂用于葡萄酒。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不需要限定。

2.工艺必要性。该物质作为稳定剂和凝固剂用于葡萄酒（食品类别 15.03.01），改善产品的感官品质和稳定性。其质量规格按照公告的相关要求执行。

### (二) 蛋白酶

1.背景资料。李氏木霉（*Trichoderma reesei*）来源的蛋白酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。丹麦兽医和食品局、法国食品安全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) 磷脂酶 A2

1.背景资料。李氏木霉（*Trichoderma reesei*）来源的磷脂酶 A2 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允许其用于食品。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用酶制剂，主要用于催化磷脂的水解。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）。

#### (四) 麦芽糖淀粉酶

1.背景资料。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 来源的麦芽糖淀粉酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。澳大利亚和新西兰食品标准局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，主要用于催化淀粉的水解。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)。

#### (五) 乳糖酶 ( $\beta$ -半乳糖苷酶)

1.背景资料。*Papiliotrema terrestris* 来源的乳糖酶 ( $\beta$ -半乳糖苷酶) 申请作为食品工业用酶制剂新品种。丹麦兽医和食品局、澳大利亚和新西兰食品标准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，主要用于催化乳糖水解和转糖基反应。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)。

#### (六) 2-己基吡啶

1.背景资料。2-己基吡啶申请作为食品用香料新品种。美国食用香料和提取物制造者协会、国际食品用香料香精工业组织、欧盟委员会等允许其作为食品用香料在各类食品中按生产需要适量使用。

2.工艺必要性。该物质配制成食品用香精后用于各类食品(《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<GB 2760>表 B.1 食品类别除外)，改善食品的味道。该物质的质量规格按照公告的相关内容执行。

#### (七) 2'-岩藻糖基乳糖

1.背景资料。2'-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、澳大利亚和新西兰食品标准局等允许该菌种来源的 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，是母乳中含量最丰富的母乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

#### （八）乳糖-N-新四糖

1.背景资料。乳糖-N-新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该菌种来源的乳糖-N-新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。

#### （九）环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）

1.背景资料。环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）作为甜味剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），允许用于冷冻饮品、果酱、面包、糕点、饮料类、果冻等食品类别。本次申请扩大使用范围用于焙烤食品馅料及表面用挂浆（仅限焙烤食品馅料）（食品类别 07.04）和膨化食品（食品类别 16.06）。国际食品法典委员会、欧盟委员会等允许其作为甜味剂用于焙烤制品。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 0-11 mg/kg bw。

2.工艺必要性。该物质作为甜味剂用于焙烤食品馅料及表面用挂浆（仅限焙烤食品馅料）（食品类别 07.04）和膨化食品（食品类别 16.06），赋予食品甜味。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）》（GB 1886.37）。

#### （十）维生素 E



1.背景资料。维生素 E 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), 允许用于油炸面制品、方便米面制品、复合调味料、膨化食品等食品类别。本次申请扩大使用范围用于面糊(如用于鱼和禽肉的拖面糊)、裹粉、煎炸粉(食品类别 06.03.02.04)。美国食品药品监督管理局、日本厚生劳动省等允许其作为抗氧化剂用于食品。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 0.15-2 mg/kg bw。

2.工艺必要性。该物质作为抗氧化剂用于面糊(如用于鱼和禽肉的拖面糊)、裹粉、煎炸粉(食品类别 06.03.02.04), 减缓食品氧化褪色。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 E》(GB 1886.233)。