

附件

羟基酪醇等 7 种食品添加剂新品种 相关材料

一、拟征求意见的食品添加剂新品种名单

(一) 食品添加剂新品种

1. 中文名称：羟基酪醇

英文名称：Hydroxytyrosol

功能分类：抗氧化剂

用量及使用范围

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	羟基酪醇	抗氧化 剂	02.01.01	植物油脂	0.05	—

质量规格要求

1 范围

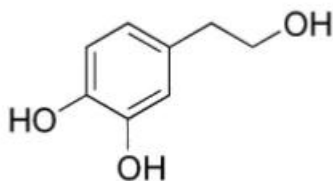
本质量规格要求适用于以酪氨酸为原料，经谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）培养发酵液催化转化、分离纯化工艺制得的食品添加剂羟基酪醇。

2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式

C₈H₁₀O₃

2.2 结构式



2.3 相对分子质量

154.165 g/mol (按 2022 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	淡黄色	取本品少量液体,于洁净白色容器内,在良好的自然光线下,用肉眼观察其色泽、状态和检查有无异物,嗅其气味。
状态	粘稠液体	
气味	辛辣味,略苦味	

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
羟基酪醇含量, w/%	≥	99.0	附录 A 中 A.3
水分, w/%	≤	1.6	GB 5009.3

铅 (Pb) / (mg/kg)	<	0.05	GB 5009.12
总砷 (以 As 计) / (mg/kg)	<	0.05	GB 5009.11
总汞 (以 Hg 计) / (mg/kg)	<	0.05	GB 5009.17
镉 (Cd) / (mg/kg)	<	0.05	GB 5009.15

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	要求	检验方法
菌落总数 / (CFU/g)	< 1000	GB 4789.2
霉菌和酵母 / (CFU/g)	< 10	GB 4789.15
大肠菌群 / (MPN/g)	< 0.3	GB 4789.3
金黄色葡萄球菌 / 25g	不得检出	GB 4789.10
沙门氏菌 / 25g	不得检出	GB 4789.4

附录 A 羟基酪醇含量检验方法

A.1 警示

试验方法规定的一些试验过程可能导致危险情况。操作者应采取适当的安全和健康措施。

A.2 一般规定

除非另有说明，在分析中仅适用分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的三级水或相应纯度的水。试验中所需标准溶液、制剂及制品，在没有其他规定下，均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T603 的规定进行制备。

A.3 羟基酪醇含量测定方法

A.3.1 仪器

A.3.1.1 电子天平：感量为 0.01 mg。

A.3.1.2 高效液相色谱仪，配紫外检测器。

A.3.2 试剂

A.3.2.1 甲醇（色谱纯）。

A.3.2.2 三蒸水（含 1‰甲酸）。

A.3.2.3 标准品：羟基酪醇（纯度 \geq 98.0%）。

A.3.3 液相色谱参考条件

A.3.3.1 色谱柱：Shim-pack GIS C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm 或等效色谱柱。

A.3.3.2 柱温：30 $^{\circ}$ C。

A.3.3.3 流速：1 mL/min。

A.3.3.4 波长：280 nm。

A.3.3.5 进样量：10 μ L。

A.3.3.6 流动相：流动相 A：甲醇；流动相 B：三蒸水。采用梯度洗脱，见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A%	B%
0	25	75
9	70	30
11	25	75
15	25	75

A.3.4 操作方法

A.3.4.1 标准品溶液的制备：准确称取标准品 100 mg（精确至 0.01mg），置 100 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得羟基酪醇标准品溶液。羟基酪醇标准品溶液的参考高效液相色谱图见附录 B.1。

A.3.4.2 样品溶液的制备：准确称取羟基酪醇样品 100 mg（精确至 0.01 mg），置 100 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，采用 0.22 μ m 水相微孔过滤膜过滤，取滤液进行检测。

A.3.4.3 测定方法：分别精密吸取羟基酪醇标准品溶液和样品溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪，进行色谱分析。按外标法

计算样品中羟基酪醇含量。

A.3.5 结果计算

羟基酪醇含量 X 按公式 (A.1) 计算:

$$X = \frac{S_1 \times m_2 \times P}{S_2 \times m_1} \times 100\% \quad \text{----- (A.1)}$$

式中:

S_1 ——样品溶液色谱图中羟基酪醇的峰面积;

S_2 ——标准品溶液色谱图中羟基酪醇的峰面积;

m_1 ——样品的质量, 单位为毫克 (mg);

m_2 ——标准品的质量, 单位为毫克 (mg);

P ——标准品纯度, %。

附录 B 羟基酪醇标准品溶液的参考高效液相色谱图

B.1 羟基酪醇标准品溶液的参考高效液相色谱图

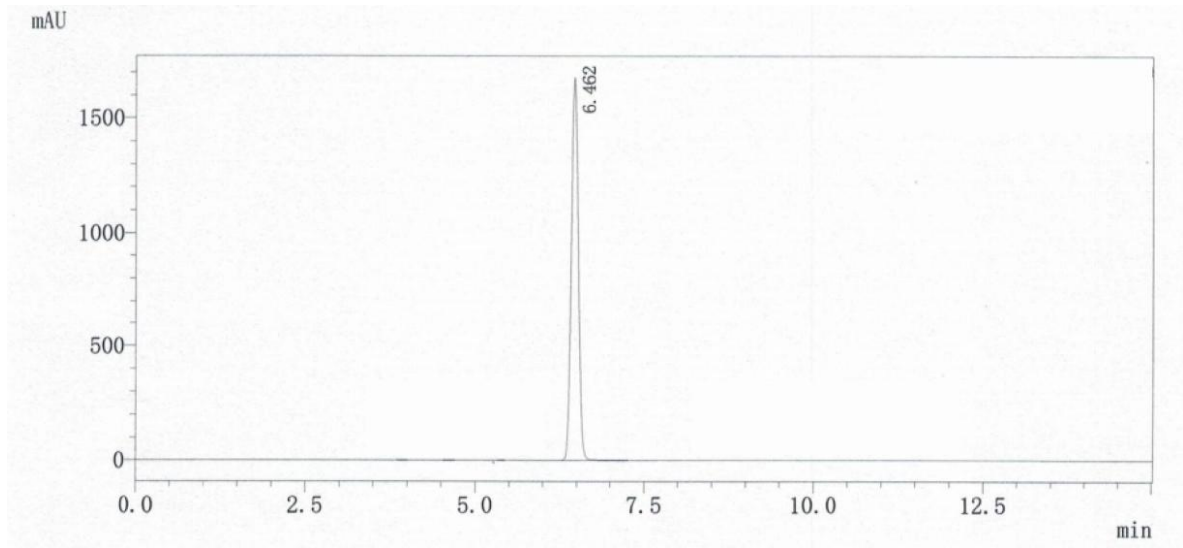


图 B.1 羟基酪醇标准品溶液的参考高效液相色谱图

2. 中文名称：二氯甲烷

英文名称：Methylene chloride

功能分类：食品工业用加工助剂

用量及使用范围

序号	助剂中文名称	助剂英文名称	功能	使用范围
1	二氯甲烷	methylene chloride	提取溶剂	茶叶脱咖啡因工艺 (残留量 ≤ 2 mg/kg)

质量规格要求

1 范围

本质量规格要求适用于以甲醇和盐酸为原料，在氯化锌的催化下生成一氯甲烷，一氯甲烷与氯气反应生成不同的甲烷氯化物，再经精馏制得食品添加剂二氯甲烷。

2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

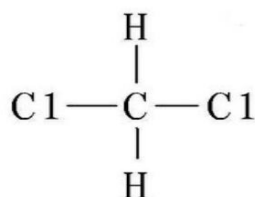
2.1 化学名称

二氯甲烷

2.2 分子式

CH_2Cl_2

2.3 结构式



2.4 相对分子质量

84.932 (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	无色	取适量样品置于清洁、干燥的具塞锥形瓶中,在自然光线下,观察其色泽和状态。
状态	液态	

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	检测方法
二氯甲烷含量, w/%	≥ 99.2	GB/T 16983
折光率(n_{20}^0)	1.423-1.425	GB/T 614
水分, w/%	≤ 0.02	GB 5009.3 卡尔·费休法
蒸发残渣, w/%	≤ 0.015	GB/T 9740
游离氯 (Cl), w/%	≤ 0.0002	GB/T 16983
酸度 (以 HCl 计), mmol/g	≤ 0.0005	GB/T 9736
碱度 (以 NaOH 计), mmol/g	≤ 0.0025	GB/T 9736
铅 (Pb)/(mg/kg)	≤ 1	GB 5009.12

附录 A 检验方法

A.1 一般规定

本质量规格要求所用的试剂和水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品，在未注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

A.2 鉴别试验

A.2.1 鉴别原理

二氯甲烷略溶于水，与乙醇和乙醚混溶。

A.2.2 溶解性试验

A.2.2.1 有机溶剂溶解性：取 5 mL 样品于 100 mL 具塞比色管中，分别任取 1~10 倍体积比的乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂与样品混合，振摇 1 min，静置 10 min，观察是否分层。试样应与乙醇、乙醚、丙酮混溶。

A.2.2.2 水溶解性：取 0.5 mL 样品于 100 mL 具塞比色管中，加入 100 倍以上体积比的水与样品混合，振摇 1 min，静置 10 min，观察是否分层。试样溶于约 120 倍体积的水。

(二) 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

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

表 1 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
2'-岩藻糖基乳糖 2'-fucosyllactose	大肠杆菌 BL21 star (DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21 star (DE3)	大肠杆菌 O126 (<i>Escherichia coli</i> O126) ^a

^a 为 α -1,2-岩藻糖基转移酶供体

2. 中文名称: 3'-唾液酸乳糖钠盐

英文名称: 3'-Sialyllactose sodium salt, 3'-SL

功能分类: 食品营养强化剂

用量及使用范围

食品分类号	食品名称	使用量	备注
13.01.01	婴儿配方食品	0.11~0.24 g/L (以 3'-唾液酸	当与 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖

食品分类号	食品名称	使用量	备注
13.01.02	较大婴儿和幼儿配方食品	乳糖计，以即食状态计，粉状产品按冲调倍数增加使用量)	-N-新四糖、6'-唾液酸乳糖钠盐、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。
13.01.03	特殊医学用途婴儿配方食品		

质量规格要求

1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖、葡萄糖为原料，经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂 3'-唾液酸乳糖钠盐。3'-唾液酸乳糖钠盐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

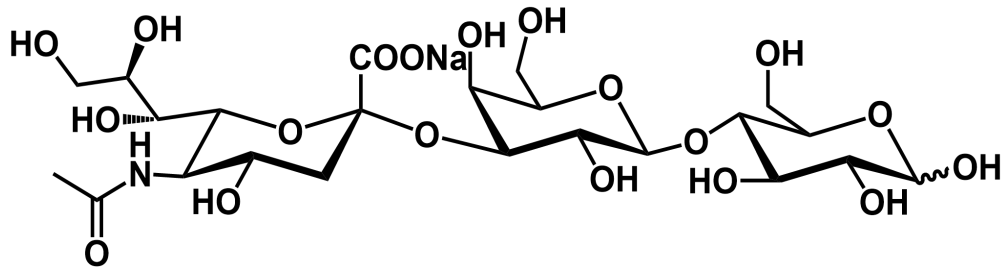
2.1 化学名称

O-(N-乙酰基- α -神经氨酸基)-(2 \rightarrow 3)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖单钠盐

2.2 分子式



2.3 结构式



2.4 相对分子质量

655.53 (按 2022 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

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

3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目	指标	检验方法
3'-唾液酸乳糖钠盐 (以干基计), w/%	≥ 88.0	附录 A 中的 A.2
N-乙酰 D-神经氨酸, w/%	≤ 1.5	附录 A 中的 A.2
3'-唾液酸乳果糖和 6'-唾液酸乳糖钠盐, w/%	≤ 5.0	附录 A 中的 A.2
D-乳糖, w/%	≤ 0.5	附录 A 中的 A.3

项目	指标	检验方法
水分, w/%	≤ 10.5	GB 5009.3 卡尔·费休法
钠/(mg/100g)	≤ 4.2×10 ³	GB 5009.91
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
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	≤ 0.1	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

本质量规格要求所用的试剂和水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品，在未注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

A.2 3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）、N-乙酰 D-神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖和 6'-唾液酸乳糖钠盐的测定

A.2.1 方法提要

试样用水溶解和稀释后，在亲水性相互作用色谱柱的液相色谱条件下分离，电雾式检测器检测，外标法定量。

A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 >98.5%。

A.2.2.2 6'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 >98.5%。

A.2.2.3 N-乙酰 D-神经氨酸对照品：纯度 >98.0%。

A.2.2.4 乙腈：色谱纯。

A.2.2.5 甲酸铵：色谱纯。

A.2.2.6 稀释溶剂：乙腈：25 mmol/L 甲酸铵水溶液=60:40 (v/v)。

A.2.3 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备电雾式检测器（CAD）或其他等效检测器。

A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 色谱柱：亲水性相互作用色谱柱 4.6 mmol/L×150 mmol/L，5 μm 或等效柱。

A.2.4.2 色谱保护柱：亲水性相互作用色谱柱 4.6 mmol/L×10 mmol/L，5 μm 或等效柱。

A.2.4.3 流动相：A 相为乙腈，B 相为 25 mmol/L 甲酸铵水溶液。无需调整溶液的 pH 值。梯度洗脱条件见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
24	72	28
30	62	38
35	62	38
37	90	10
50	90	10

A.2.4.4 柱温：60 °C。

A.2.4.5 检测器：雾化器温度：35°C；数据采集速率：10 Hz；功率功能：1；过滤器：5。

A.2.4.6 流速：1 mL/min。

A.2.4.7 进样量：10 μ L。

A.2.4.8 运行时间：50 min。

A.2.5 分析步骤

A.2.5.1 标准溶液配制

A.2.5.1.1 3'-唾液酸乳糖钠盐标准溶液的配制

标准储备液配制：准确称取适量的 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品，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 3'-唾液酸乳糖钠盐浓度约为 1.0 mg/mL 的标准原液。

标准溶液配制：吸取不同体积的标准储备液中，用稀释溶剂，配制成 5 个不同浓度的系列标准溶液，浓度分别约为 20 μ g/mL，30 μ g/mL，40 μ g/mL，50 μ g/mL 和 60 μ g/mL。

A.2.5.1.2 N-乙酰 D-神经氨酸标准溶液的制备

标准储备液配制：准确称取适量的 N-乙酰 D-神经氨酸对照品，转移到合适的容量瓶中，用水溶解，配制成的 N-乙酰 D-神经氨酸标准原液，根据对照品的纯度折算，其浓度约为 1.1 mg/mL。

标准溶液配制：取适量 N-乙酰 D-神经氨酸标准原液，加入稀释溶剂后配制成浓度为 66 μ g/mL 的 N-乙酰 D-神经氨酸标准溶液。

A.2.5.2 试样溶液配制

精确称取 550 mg（精确到 1 mg）试样，加入到 50 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；再取 5 mL 定容后的溶液，移液后加入稀释溶剂，定容至 50 mL；取 2.5 mL 定容后的溶液，移液后加入稀释溶剂，定容至 50 mL。

A.2.5.3 系统适用性试验

A.2.5.3.1 系统适用性测试溶液的制备

系统适用性试验原液配制：准确称量 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品、6'-唾液酸乳糖钠盐对照品和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品，置于合适的容量瓶中，用水溶解。配制系统适用性测试原液，使每种对照物质的浓度约为 1.0 mg/mL。

系统适用性试验溶液 1：取适量系统适用性试验溶液原液，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性试验溶液 1。

系统适用性试验溶液 2：取适量系统适用性试验溶液原液，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性试验溶液 2。

系统适用性试验溶液 3：取适量系统适用性试验溶液 1，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性试验溶液 3。

A.2.5.3.2 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：

——在测量标准溶液 1-3 时，每个样品中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积与浓度的相关系数应 ≥ 0.995 ；

——在系统适用性试验溶液 1 的色谱图中，3'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳糖钠盐与 N-乙酰 D-神经氨酸的分离度为 1.5 以上；

——系统适用性试验溶液 1 重复测量 6 次，3'-唾液酸乳糖钠盐峰面积的相对标准偏差 $\leq 2.0\%$ ；

——系统适用性试验溶液 2 色谱图中 3'-唾液酸乳糖钠盐的信噪比 ≥ 150 ；

——系统适用性试验溶液 3 中 3'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积为系统适用性试验溶液 1 峰面积的 5%-15%。

在此色谱条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的参考色谱图谱见附录 B.1。

A.2.6 结果计算

A.2.6.1 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的测定

以系列标准溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，建立校准曲线，并根据试样溶液的峰面积确定测试样品中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度。

3'-唾液酸乳糖钠盐含量（以干基计）的质量分数 X_1 按式（A.1）计算。

$$X_1 = \frac{C_1 \times V_1}{m_1 \times \left(\frac{100 - \omega_1}{100} \right)} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

C_1 ——从标准曲线得到试样溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度，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）；

ω_1 ——试样的水分，单位为%；

$\left(\frac{100 - \omega_1}{100} \right)$ ——水分校正；

f ——稀释因子。

A.2.6.2 N-乙酰 D-神经氨酸含量的测定

N-乙酰 D-神经氨酸含量的质量分数 X_2 按(式 A.2)计算。

$$X_2 = \frac{A_1 \times m_3 \times V_2 \times (P_1/100) \times \left(\frac{100 - \omega_2}{100} \right)}{A_2 \times m_2 \times V_3} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

A_1 ——试样溶液中 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积；

A_2 ——标准溶液中 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积；

m_2 ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

m_3 ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

ω_2 ——标准品的水分，单位为%；

$((100-\omega_2)/100)$ ——水分校正；

P_1 ——N-乙酰 D-神经氨酸标准品纯度，单位为%；

$(P_1/100)$ ——纯度校正；

V_2 ——试样的定容体积，单位为 mL；

V_3 ——标准品的定容体积，单位为 mL；

f ——稀释因子。

A.2.6.3 3'-唾液酸乳果糖和 6'-唾液酸乳糖钠盐含量的测定

3'-唾液酸乳果糖和 6'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数 X_3 按（式 A.3）计算。

$$X_3 = \frac{(A_3+A_4) \times m_5 \times V_4 \times (P_2/100) \times \left(\frac{100-\omega_3}{100}\right)}{A_5 \times m_4 \times V_5} \times f \times 100 \dots (\text{A.3})$$

式中：

A_3 ——试样溶液中 3'-唾液酸乳果糖的峰面积；

A_4 ——试样溶液中 6'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积；

A_5 ——标准溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积；

m_4 ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

m_5 ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

ω_3 ——标准品的水分，单位为%；

$((100-\omega_3)/100)$ ——水分校正；

P_2 ——3'-唾液酸乳糖钠盐标准品纯度，单位为%；

$(P_2/100)$ ——纯度校正;

V_4 ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

V_5 ——标准品的定容体积, 单位为 (mL);

f ——稀释因子。

A.3 D-乳糖的测定

A.3.1 方法提要

试样用水溶解后, 在阴离子交换色谱柱的液相色谱条件下分离, 电化学脉冲安培检测器检测, 外标法定量。

A.3.2 试剂和材料

A.3.2.1 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品: 纯度 >98.5%。

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 50%氢氧化钠溶液: 浓度 47.0%~53.0%;

A.3.2.4 醋酸钠: 纯度 >99.0%。

A.3.3 仪器和设备

液相色谱仪: 配备电化学脉冲安培检测器 (PAD)。

A.3.4 参考色谱条件

A.3.4.1 色谱柱: 阴离子交换色谱柱 4.0 mmol/L \times 250 mmol/L, 10 μ m 或等效柱。

A.3.4.2 色谱保护柱: 阴离子交换色谱柱 4.0 mmol/L \times 50 mmol/L, 10 μ m 或等效柱。

A.3.4.3 流动相：A 相为水；B 相为 0.5 M 氢氧化钠溶液；C 相为 0.28 M 醋酸钠溶液+0.03 M 氢氧化钠溶液。梯度洗脱条件见表 A.2。

表 A.2 梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%	C%
0.0	72	28	0
5.0	72	28	0
13.5	50	28	22
20.0	50	28	22
38.0	0	35	65
50.0	0	35	65
50.0	72	28	0
55.0	72	28	0

A.3.4.4 柱温：30°C。

A.3.4.5 流速：1.2 mL/min。

A.3.4.6 检测器：脉冲安培检测器

A.3.4.6.1 参比电极：银/氯化银电极。

A.3.4.6.2 工作电极：金电极。

A.3.4.7 进样体积：10 μ L。

A.3.4.8 运行时间：55 min。

A.3.5 分析步骤

A.3.5.1 标准溶液配制

准确称取适量的乳糖一水合物对照品，置于同一个合适

的容量瓶中，用水溶解，配制成浓度约为 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。

A.3.5.2 试样溶液制备

精确称取 100 mg 试样，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。

A.3.5.3 系统适用性试验

A.3.5.3.1 系统适用性测试溶液制备

系统适用性试验溶液 1: 准确称取乳糖一水合物对照品，置于一个合适的容量瓶中，用水溶解，制备得到系统适用性溶液 1，使标准品参考浓度约为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

系统适用性试验溶液 2: 取适量系统适用性试验溶液 1，加入稀释溶剂后配制成标准品浓度约为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性试验溶液 2。

A.3.5.3.2 系统适用性测试

系统适用性应同时满足以下条件：

——在系统适用性试验溶液 2 中得到的 D-乳糖的峰面积为系统适用性试验溶液 1 峰面积的 3.5%~6.5%。

——系统适用性试验溶液 1 中 D-乳糖的色谱图分辨率应 ≥ 1.5 。

——当系统适用性试验溶液 1 重复测量 6 次，D-乳糖峰

面积的相对标准偏差应 $\leq 2.0\%$ 。

依据前述分析条件测定，D-乳糖标准品的参考色谱图谱见附录 B.2。

A.3.6 D-乳糖结果计算

根据下式 (A.4)，通过标准溶液和样品溶液中 D-乳糖的峰面积计算并确定了 D-乳糖含量的质量分数 X_4 。

$$X_4 = \frac{A_6 \times m_7 \times 342.30 \times V_6 \times \left(\frac{100 - \omega_4}{100} \right)}{A_7 \times m_6 \times 360.31 \times V_7} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

A_6 ——试样溶液中 D-乳糖的峰面积；

A_7 ——标准溶液中 D-乳糖的峰面积；

m_6 ——试样的质量，单位为毫克 (mg)；

m_7 ——标准品的质量，单位为毫克 (mg)；

ω_4 ——标准品的水分，单位为%；

$((100 - \omega_4) / 100)$ ——水分校正；

V_6 ——试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

V_7 ——标准品的定容体积，单位为毫升 (mL)；

342.30——D-乳糖的分子量 (无水)；

360.31——乳糖一水化合物的分子量；

f ——稀释因子。

A.4 残留蛋白含量的测定

A.4.1 方法提要

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

A.4.2 试剂和材料

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

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

A.4.3 仪器和设备

A.4.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.4.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

A.4.4 分析步骤

A.4.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg 牛血清白蛋白对照品 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 μ L 上述储备溶液 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

A.4.4.3 试样溶液的制备

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

A.4.4.4 测定

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

表 A.3 测试试样溶液制备

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

A.4.4.5 结果计算

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

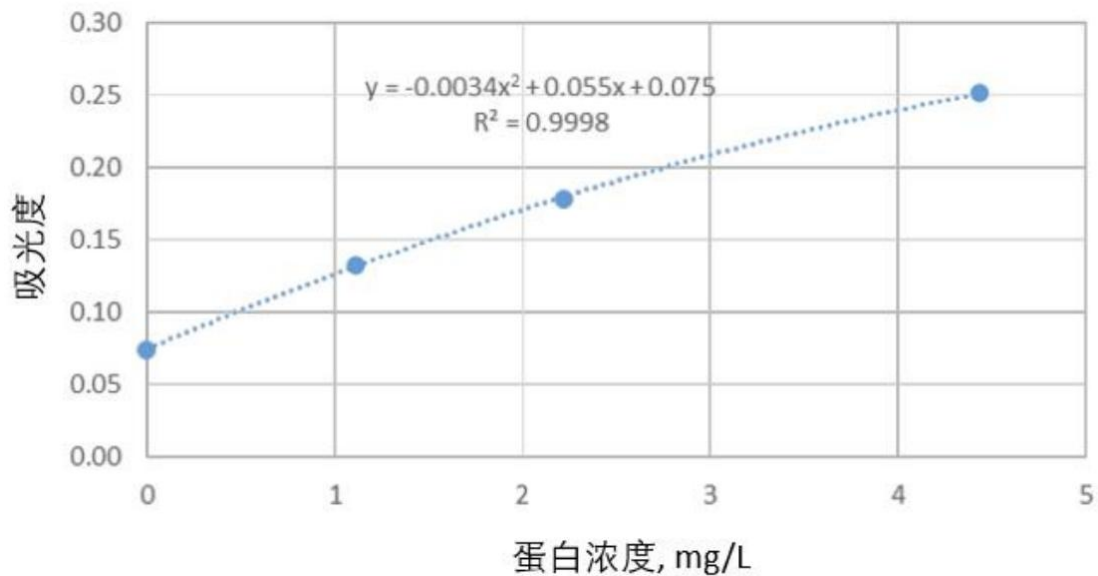


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量 X_5 按式 (A.5) 计算, 单位为 mg/kg。

$$X_5 = \frac{-1 \times C_2 \times V_8}{0.6 \times m_8} \times f \times 1000 \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

C_2 ——标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值, 数值为负值, 单位为毫克每升 (mg/L);

$-1 \times C_2$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

V_8 ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

f ——稀释因子;

m_8 ——试样的质量, 单位为毫克 (mg);

0.6——1 mL 混合溶液中试样溶液的体积为 0.6 mL;

1000——单位转换系数。

该方法的定量限为 17 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 <17 mg/kg。结果保留整数位。在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值 20%。

A.5 内毒素的测定（凝胶法）

A.5.1 一般规定

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

A.5.2 方法提要

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

A.5.3 试剂和材料

A.5.3.1 细菌内毒素标准品。

A.5.3.2 鲎试剂：带有灵敏度标示值 λ 。

A.5.3.3 细菌内毒素检查用水：内毒素含量 <0.015 EU/mL。

A.5.4 仪器和设备

A.5.4.1 旋涡混合器。

A.5.4.2 恒温水浴箱。

A.5.5 分析步骤

A.5.5.1 试样溶液配制

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

A.5.5.2 鲎试剂灵敏度复核试验

在本检查法规定的条件下，使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度，用 EU/mL 表示。当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。根据鲎试剂灵敏度的标示值（ λ ），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 15min 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 2λ 、 λ 、 0.5λ 和

0.25λ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 °C±1 °C 的恒温水浴箱中，保温 60 min ± 2 min。将试管从恒温水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转 180°，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 2λ管均为阳性，最低浓度 0.25λ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 (λ_c) 按式 (A.6) 计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilg} \Sigma X/n \dots \dots \dots \text{(A.6)}$$

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λ_c 在 0.5 λ ~ 2λ (包括 0.5λ和 2λ) 时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度λ为该批鲎试剂的灵敏度。

A.5.5.3 干扰试验

按表 A.4 制备溶液 A、B、C 和 D，使用的试样溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数（MVD）的溶液，按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.7）计算：

$$MVD=cL/\lambda \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

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

L ——试样的细胞内毒素限量，单位为内毒素单位每毫克（EU/mg）；

λ ——鲎试剂的标示灵敏度，单位为内毒素单位每毫升（EU/mL）。

表 A.4 干扰试验溶液的制备

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

		液	2	λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2 λ /内毒素检查用水	检查用水	1	2 λ	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.5 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超
过 MVD 并且已经排除干扰的试样溶液来制备溶液 A 和 B。
按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.5 凝胶限度试验溶液的制备

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.6 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.6 凝胶半定量试验溶液的制备

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

注：A 为不超过 MVD 并且通过干扰试验的试样溶液。从通

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

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

A.5.5.5 结果判定

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

若每一系列内毒素浓度均小于规定的限值，判定试样符合规定。每一系列内毒素浓度的几何平均值即为试样溶液的内毒素浓度[按公式 $C_E = \text{antilg}(\sum \lg c / 2)$]。若试验中试样溶液的所有平行管均为阴性，应记为内毒素浓度小于 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 3'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳果糖、6'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰 D-神经氨酸和 D-乳糖对照品参考高效液相色谱图谱

B.1 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳果糖、6'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的色谱图

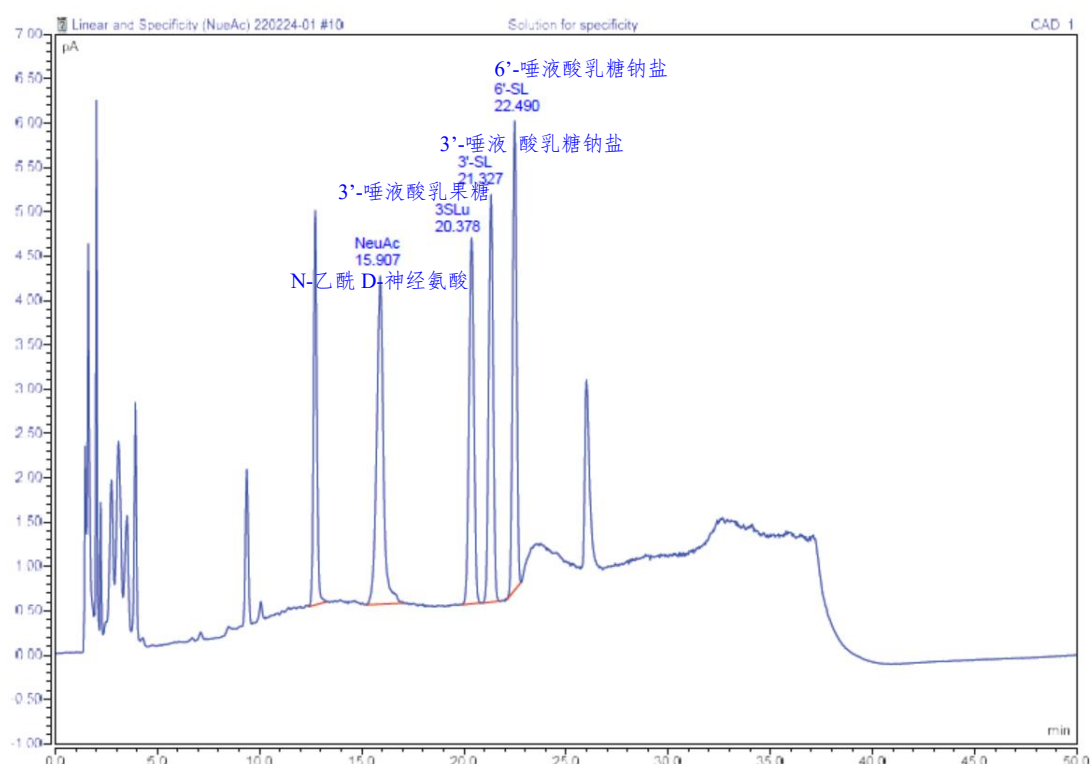


图 B.1 3'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳果糖、6'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的色谱图

表 B.1 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下各物质保留时间

化合物	保留时间 (min)
N-乙酰 D-神经氨酸	15.9
3'-唾液酸乳果糖*	20.4
3'-唾液酸乳糖钠盐	21.3

6'-唾液酸乳糖钠盐

22.5

*注：3'-唾液酸乳糖为本质质量规格中需要控制的杂糖，其纯对照品难以获取，检测时利用 HPLC-CAD 浓度相同、峰面积相同的原理，使用 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积计算浓度，图 B.1 及表 B.1 分别提供该物质的谱图及保留时间。

B.2 液相色谱-脉冲安培检测器色谱条件下 D-乳糖对照品色谱图

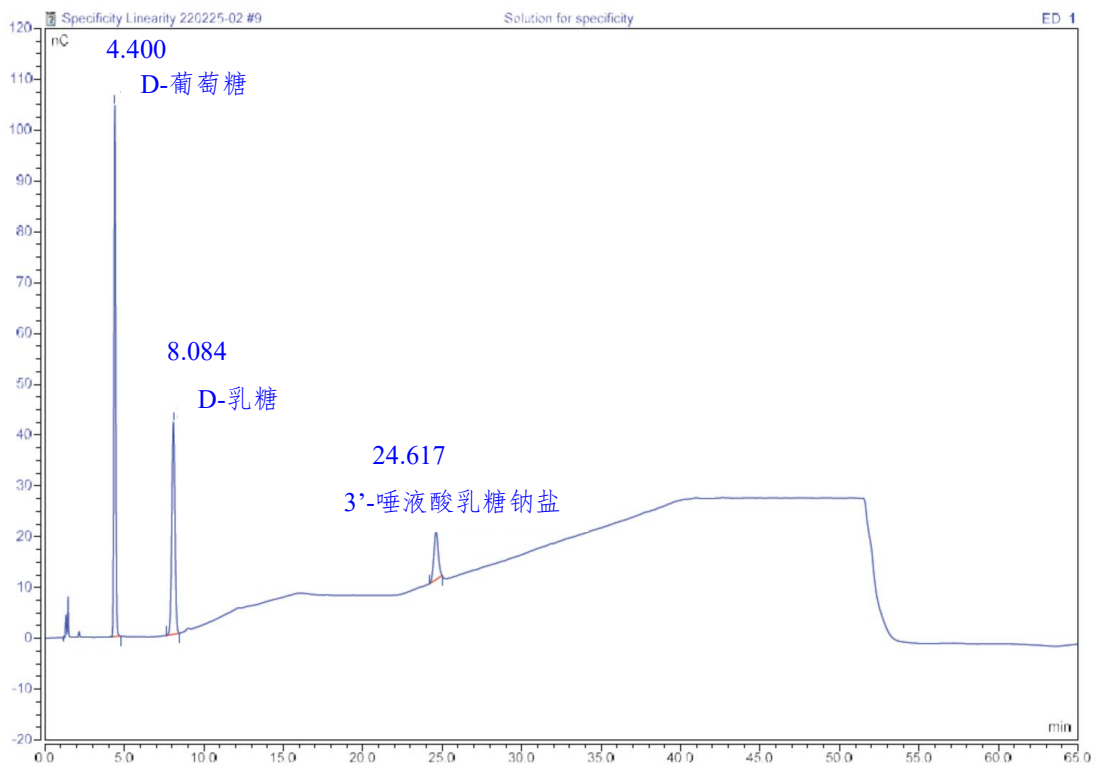


图 B.2 D-乳糖对照品的色谱图

表 B.2 液相色谱-脉冲安培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-葡萄糖	4.4
D-乳糖	8.1
3'-唾液酸乳糖钠盐	24.6

附录 C 用于生产 3'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

C.1 用于生产 3'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

用于生产 3'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息见表 C.1。

表 C.1 用于生产 3'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
3'-唾液酸乳糖钠盐 3'-Sialyllactose sodium salt	大肠杆菌 W NEO3 <i>Escherichia coli</i> W NEO3	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ^a ; 集胞藻 (<i>Synechocystis</i> sp.) ^b ; 荚膜红细菌 (<i>Rhodobacter capsulatus</i>) ^c ; 多杀性巴氏杆菌 (<i>Pasteurella multocida</i>) ^d ; 乳糖奈瑟氏菌 (<i>Neisseria lactamica</i>) ^e

^a 为葡萄糖胺 6-磷酸 N-乙酰转移酶供体

^b 为 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶供体

^c 为 N-乙酰基神经氨酸合成酶供体

^d 为胞苷 5'-单磷酸酯-N-乙酰基神经氨酸合成酶供体

^e 为 α -2,3-唾液酸转移酶供体

3.中文名称：6'-唾液酸乳糖钠盐

英文名称：6'-Sialyllactose sodium salt, 6'-SL

功能分类：食品营养强化剂

用量及使用范围

食品分类号	食品名称	使用量	备注
13.01.01	婴儿配方食品	0.14~0.40 g/L (以6'-唾液酸乳糖计,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、乳糖-N-新四糖、3'-唾液酸乳糖钠盐、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。
13.01.02	较大婴儿和幼儿配方食品		
13.01.03	特殊医学用途婴儿配方食品		

质量规格要求

1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖、葡萄糖为原料,经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂6'-唾液酸乳糖钠盐。6'-唾液酸乳糖钠盐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

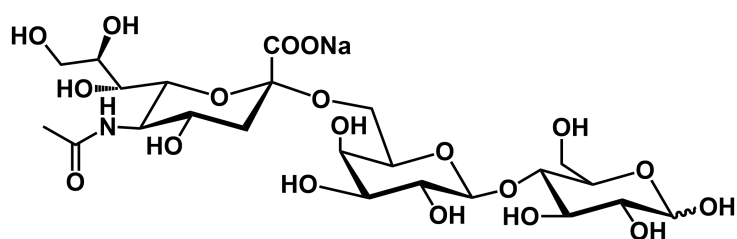
2.1 化学名称

O-(N-乙酰基- α -神经氨酸基)-(2 \rightarrow 6)-O- β -D-吡喃半乳糖基-(1 \rightarrow 4)-D-葡萄糖单钠盐

2.2 分子式



2.3 结构式



2.4 相对分子质量

655.53 (按 2022 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

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

3.2 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目	指标	检验方法
----	----	------

项目	指标	检验方法
6'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计），w/% \geq	90.0	附录 A 中的 A.2
N-乙酰 D-神经氨酸，w/% \leq	2.0	附录 A 中的 A.2
6'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖钠盐，w/% \leq	5.0	附录 A 中的 A.2
D-乳糖，w/% \leq	0.5	附录 A 中的 A.3
水分，w/% \leq	10.5	GB 5009.3 卡尔·费休法
钠/（mg/100g） \leq	4.2×10^3	GB 5009.91
残留蛋白含量/（mg/kg） \leq	100	附录 A 中的 A.4
内毒素/（EU/mg） \leq	10	附录 A 中的 A.5
总砷（以 As 计）/（mg/kg） \leq	0.1	GB 5009.11
铅（Pb）/（mg/kg） \leq	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） \leq	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

本质量规格要求所用的试剂和水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品，在未注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602 和 GB/T 603 的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

A.2 6'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）、N-乙酰 D-神经氨酸、6'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖钠盐的测定

A.2.1 方法提要

试样用水溶解和稀释后，在亲水性相互作用色谱柱的液相色谱条件下分离，电雾式检测器检测，外标法定量。

A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 6'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 > 98.5%。

A.2.2.2 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 > 98.5%。

A.2.2.3 N-乙酰 D-神经氨酸对照品：纯度 > 98.0%。

A.2.2.4 乙腈：色谱纯。

A.2.2.5 甲酸铵：色谱纯。

A.2.2.6 稀释溶剂：乙腈：25 mmol/L 甲酸铵水溶液 = 60:40 (v/v)。

A.2.3 仪器和设备

高效液相色谱仪：配备电雾式检测器（CAD）或其他等效检测器。

A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 色谱柱：亲水性相互作用色谱柱 4.6 mmol/L×150 mmol/L，5 μm 或等效柱。

A.2.4.2 色谱保护柱：亲水性相互作用色谱柱 4.6 mmol/L×10 mmol/L，5 μm 或等效柱。

A.2.4.3 流动相：A 相为乙腈，B 相为 25 mmol/L 甲酸铵水溶液。无需调整溶液的 pH 值。梯度洗脱条件见表 A.1。

表 A.1 色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
24	72	28
30	62	38
35	62	38
37	90	10
50	90	10

A.2.4.4 柱温：60 °C。

A.2.4.5 检测器：雾化器温度：35°C；数据采集速率：10 Hz；功率功能：1；过滤器：5。

A.2.4.6 流速：1 mL/min。

A.2.4.7 进样量：10 μL。

A.2.4.8 运行时间: 50 min。

A.2.5 分析步骤

A.2.5.1 标准溶液配制

A.2.5.1.1 6'-唾液酸乳糖钠盐标准溶液的配制

标准储备液配制: 准确称取适量的 6'-唾液酸乳糖钠盐对照品, 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 6'-唾液酸乳糖钠盐浓度约为 1.0 mg/mL 的标准原液。

标准溶液配制: 吸取不同体积的标准储备液中, 用稀释溶剂, 配制成 5 个不同浓度的系列标准溶液, 浓度分别约为 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 60 $\mu\text{g/mL}$ 。

A.2.5.1.2 N-乙酰 D-神经氨酸标准溶液的制备

标准储备液配制: 准确称取适量的 N-乙酰 D-神经氨酸对照品, 转移到合适的容量瓶中, 用水溶解, 配制成的 N-乙酰 D-神经氨酸标准原液, 根据对照品的纯度折算, 其浓度约为 1.1 mg/mL。

标准溶液配制: 取适量 N-乙酰 D-神经氨酸标准原液, 加入稀释溶剂配制成浓度为 66 $\mu\text{g/mL}$ 的 N-乙酰 D-神经氨酸标准溶液。

A.2.5.2 试样溶液配制

精确称取 550 mg (精确到 1 mg) 试样, 加入到 50 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；再取 5 mL 定容后的溶液，移液后加入稀释溶剂，定容至 50 mL；取 2.5 mL 定容后的溶液，移液后加入稀释溶剂，定容至 50 mL。

A.2.5.3 系统适用性试验

A.2.5.3.1 系统适用性测试溶液的制备

系统适用性试验原液配制：准确称量 6'-唾液酸乳糖钠盐对照品、3'-唾液酸乳糖钠盐对照品和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品，置于合适的容量瓶中，用水溶解。配制系统适用性测试原液，使每种对照物质的浓度约为 1.0 mg/mL。

系统适用性试验溶液 1：取适量系统适用性试验溶液原液，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的系统适用性试验溶液 1。

系统适用性试验溶液 2：取适量系统适用性试验溶液原液，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的系统适用性试验溶液 2。

系统适用性试验溶液 3：取适量系统适用性试验溶液 1，加入稀释溶剂后配制成各标准品浓度约为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的系统适用性试验溶液 3。

A.2.5.3.2 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：

——在测量标准溶液 1-3 时，每个样品中 6'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积与浓度的相关系数应 ≥ 0.995 ;

——在系统适用性试验溶液 1 的色谱图中，6'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳糖钠盐与 N-乙酰 D-神经氨酸的分离度为 1.5 以上;

——系统适用性试验溶液 1 重复测量 6 次，6'-唾液酸乳糖钠盐峰面积的相对标准偏差 $\leq 2.0\%$;

——系统适用性试验溶液 2 色谱图中 6'-唾液酸乳糖钠盐的信噪比 ≥ 150 ;

——系统适用性试验溶液 3 中 6'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积为系统适用性试验溶液 1 峰面积的 5%-15%。

在此色谱条件下 6'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的参考色谱图谱见附录 B.1。

A.2.6 结果计算

A.2.6.1 6'-唾液酸乳糖钠盐含量的测定

以系列标准溶液中 6'-唾液酸乳糖钠盐的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，建立校准曲线，并根据试样溶液的峰面积确定测试样品中 6'-唾液酸乳糖钠盐的浓度。

6'-唾液酸乳糖钠盐含量（以干基计）的质量分数 X_1 按式（A.1）计算。

$$X_1 = \frac{C_1 \times V_1}{m_1 \times \left(\frac{100 - \omega_1}{100} \right)} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

C_1 ——从标准曲线得到试样溶液中 6'-唾液酸乳糖钠盐的浓度，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）；

ω_1 ——试样水分，单位为%；

$\left(\frac{100 - \omega_1}{100} \right)$ ——水分校正；

f ——稀释因子。

A.2.6.2 N-乙酰 D-神经氨酸含量的测定

N-乙酰 D-神经氨酸含量的质量分数 X_2 按(式 A.2)计算。

$$X_2 = \frac{A_1 \times m_3 \times V_2 \times (P_1/100) \times \left(\frac{100 - \omega_2}{100} \right)}{A_2 \times m_2 \times V_3} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

A_1 ——试样溶液中 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积；

A_2 ——标准溶液中 N-乙酰 D-神经氨酸的峰面积；

m_2 ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

m_3 ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

ω_2 ——标准品水分，单位为%；

$\left(\frac{100 - \omega_2}{100} \right)$ ——水分校正；

P_1 ——N-乙酰 D-神经氨酸标准品纯度，单位为%；

$(P_1/100)$ ——纯度校正；

V_2 ——试样的定容体积，单位为 mL；

V_3 ——标准品的定容体积，单位为 mL；

f ——稀释因子。

A.2.6.3 6'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的测定

6'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数 X_3 按（式 A.3）计算。

$$X_3 = \frac{(A_3+A_4) \times m_5 \times V_4 \times (P_2/100) \times \left(\frac{100-\omega_3}{100}\right)}{A_5 \times m_4 \times V_5} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

A_3 ——试样溶液中 6'-唾液酸乳果糖的峰面积；

A_4 ——试样溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积；

A_5 ——标准溶液中 6'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积；

m_4 ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

m_5 ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

ω_3 ——标准品的水分，单位为%；

$((100-\omega_3)/100)$ ——水分校正；

P_2 ——3'-唾液酸乳糖钠盐标准品纯度，单位为%；

$(P_2/100)$ ——纯度校正；

V_4 ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_5 ——标准品的定容体积，单位为（mL）；

f ——稀释因子。

A.3 D-乳糖的测定

A.3.1 方法提要

试样用水溶解后，在阴离子交换色谱柱的液相色谱条件下分离，电化学脉冲安培检测器检测，外标法定量。

A.3.2 试剂和材料

A.3.2.1 6'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 >98.5%。

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 50%氢氧化钠溶液：浓度 47.0%~53.0%；

A.3.2.4 醋酸钠：纯度 >99.0%。

A.3.3 仪器和设备

液相色谱仪：配备电化学脉冲安培检测器（PAD）

A.3.4 参考色谱条件

A.3.4.1 色谱柱：阴离子交换色谱柱 4.0 mmol/L \times 250 mmol/L，10 μ m 或等效柱。

A.3.4.2 色谱保护柱：阴离子交换色谱柱 4.0 mmol/L \times 50 mmol/L，10 μ m 或等效柱。

A.3.4.3 流动相：A 相为水；B 相为 0.5 M 氢氧化钠溶液；C 相为 0.28 M 醋酸钠溶液+0.03 M 氢氧化钠溶液。梯度洗脱条件见表 A.2。

表 A.2 梯度洗脱条件

时间 (min)	A%	B%	C%
0.0	72	28	0
5.0	72	28	0
13.5	50	28	22
20.0	50	28	22
38.0	0	35	65
50.0	0	35	65
50.0	72	28	0
55.0	72	28	0

A.3.4.4 柱温：30°C。

A.3.4.5 流速：1.2 mL/min。

A.3.4.6 检测器：脉冲安培检测器

A.3.4.6.1 参比电极：银/氯化银电极。

A.3.4.6.1 工作电极：金电极。

A.3.4.7 进样体积：10 μ L。

A.3.4.8 运行时间：55 min。

A.3.5 分析步骤

A.3.5.1 标准溶液配制

准确称取适量的乳糖一水合物对照品，置于同一个合适的容量瓶中，用水溶解，配制成浓度约为 10.0 μ g/mL 的标准溶液。

A.3.5.2 试样溶液制备

精确称取 100 mg 试样，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。

A.3.5.3 系统适用性试验

A.3.5.3.1 系统适用性测试溶液制备

系统适用性试验溶液 1：准确称取乳糖一水合物对照品，置于一个合适的容量瓶中，用水溶解，制备得到系统适用性溶液 1，使标准品参考浓度约为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

系统适用性试验溶液 2：取适量系统适用性试验溶液 1，加入稀释溶剂后配制成标准品浓度约为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系统适用性试验溶液 2。

A.3.5.3.2 系统适用性测试

系统适用性应同时满足以下条件：

——在系统适用性试验溶液 2 中得到的 D-乳糖的峰面积为系统适用性试验溶液 1 峰面积的 3.5~6.5%。

——系统适用性试验溶液 1 中 D-乳糖的色谱图分辨率应 ≥ 1.5 。

——当系统适用性试验溶液 1 重复测量 6 次，D-乳糖峰面积的相对标准偏差应 $\leq 2.0\%$ 。

依据前述分析条件测定，D-乳糖标准品的参考色谱图谱见附录 B.2。

A.3.6 D-乳糖结果计算

根据下式 (A.4)，通过标准溶液和样品溶液中 D-乳糖的峰面积计算并确定了 D-乳糖含量的质量分数 X_4 。

$$X_4 = \frac{A_6 \times m_7 \times 342.30 \times V_6 \times \left(\frac{100 - \omega_4}{100} \right)}{A_7 \times m_6 \times 360.31 \times V_7} \times f \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

A_6 ——试样溶液中 D-乳糖的峰面积；

A_7 ——标准溶液中 D-乳糖的峰面积；

m_6 ——试样的质量，单位为毫克 (mg)；

m_7 ——标准品的质量，单位为毫克 (mg)；

ω_4 ——标准品的水分，单位为%；

$\left(\frac{100 - \omega_4}{100} \right)$ ——水分校正；

V_6 ——试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

V_7 ——标准品的定容体积，单位为毫升 (mL)；

342.30——D-乳糖的分子量 (无水)；

360.31——乳糖一水化合物的分子量；

f ——稀释因子。

A.4 残留蛋白含量的测定

A.4.1 方法提要

考马斯亮蓝染色试剂与蛋白质反应，在 595 nm 波长下检测吸光度用于蛋白质测定。为了防止样品基质对显色反应

的干扰，样品溶液与不同浓度的牛血清白蛋白标准溶液混合后显色，绘制二次标准曲线，计算样品蛋白质含量。

A.4.2 试剂和材料

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

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

A.4.3 仪器和设备

A.4.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.4.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

A.4.4 分析步骤

A.4.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg 牛血清白蛋白对照品 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 μ L 上述储备溶液 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

A.4.4.3 试样溶液的制备

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

A.4.4.4 测定

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

表 A.3 测试试样溶液制备

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

A.4.4.5 结果计算

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

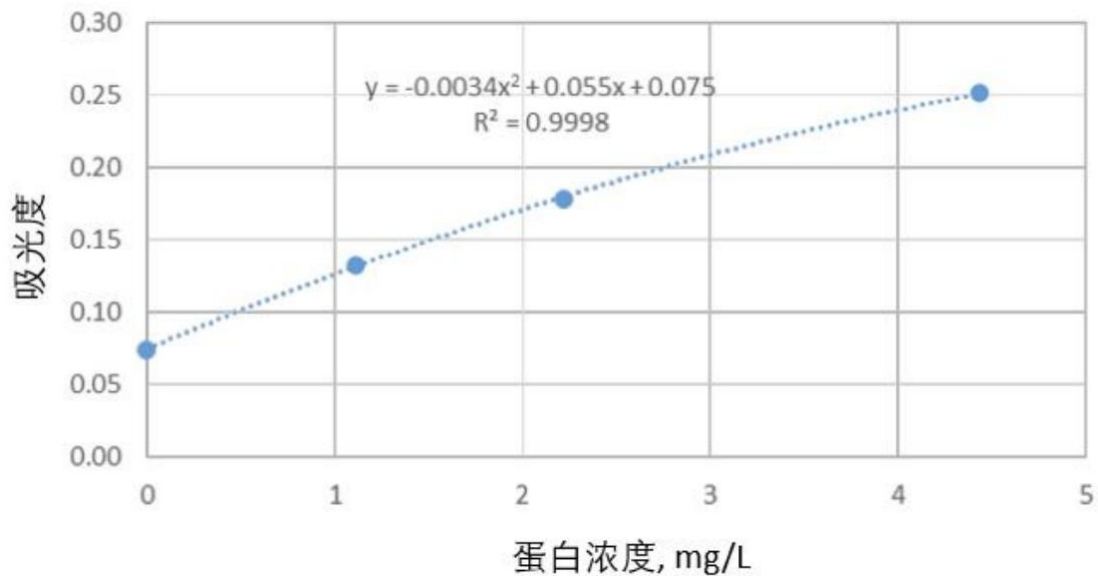


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量 X_5 按式 (A.5) 计算, 单位为 mg/kg。

$$X_5 = \frac{-1 \times C_2 \times V_8}{0.6 \times m_8} \times f \times 1000 \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

C_2 ——标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值, 数值为负值, 单位为毫克每升 (mg/L);

$-1 \times C_2$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

V_8 ——试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

f ——稀释因子;

m_8 ——试样的质量, 单位为毫克 (mg);

0.6——1 mL 混合溶液中试样溶液的体积为 0.6 mL;

1000——单位转换系数。

该方法的定量限为 17 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 <17 mg/kg。结果保留整数位。在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值 20%。

A.5 内毒素的测定（凝胶法）

A.5.1 一般规定

本测定所用的水应符合灭菌注射用水标准，试验所用器皿需经处理，以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法（250℃、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 λ 。

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

A.5.4 仪器和设备

A.5.4.1 旋涡混合器。

A.5.4.2 恒温水浴箱。

A.5.5 分析步骤

A.5.5.1 试样溶液配制

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

A.5.5.2 鲎试剂灵敏度复核试验

在本检查法规定的条件下，使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度，用 EU/mL 表示。当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。根据鲎试剂灵敏度的标示值（ λ ），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 2λ 、 λ 、 0.5λ 和

0.25λ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 °C±1°C 的恒温水浴箱中，保温 60 min ± 2 min。将试管从恒温水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转 180°，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 2λ管均为阳性，最低浓度 0.25λ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 (λ_c) 按式 (A.6) 计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilg} \Sigma X / n \dots \dots \dots (A.6)$$

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λ_c 在 0.5λ ~ 2λ (包括 0.5λ和 2λ) 时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度λ为该批鲎试剂的灵敏度。

A.5.5.3 干扰试验

按表 A.4 制备溶液 A、B、C 和 D，使用的试样溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数（MVD）的溶液，按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.7）计算：

$$MVD=cL/\lambda \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

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

L ——试样的细胞内毒素限量，单位为内毒素单位每毫克（EU/mg）；

λ ——鲎试剂的标示灵敏度，单位为内毒素单位每毫升（EU/mL）。

表 A.4 干扰试验溶液的制备

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

			2	λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2 λ /内毒素检查用水	检查用水	1	2 λ	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.5 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超过 MVD 并且已经排除干扰的试样溶液来制备溶液 A 和 B。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.5 凝胶限度试验溶液的制备

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.6 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.6 凝胶半定量试验溶液的制备

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

注：A 为不超过 MVD 并且通过干扰试验的试样溶液。从通

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

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

A.5.5.5 结果判定

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

若每一系列内毒素浓度均小于规定的限值，判定试样符合规定。每一系列内毒素浓度的几何平均值即为试样溶液的内毒素浓度[按公式 $C_E = \text{antilg}(\sum \lg c / 2)$]。若试验中试样溶液的所有平行管均为阴性，应记为内毒素浓度小于 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 6'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳果糖、3'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰 D-神经氨酸和 D-乳糖对照品参考高效液相色谱图谱

B.1 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下 6'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳果糖、3'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的色谱图

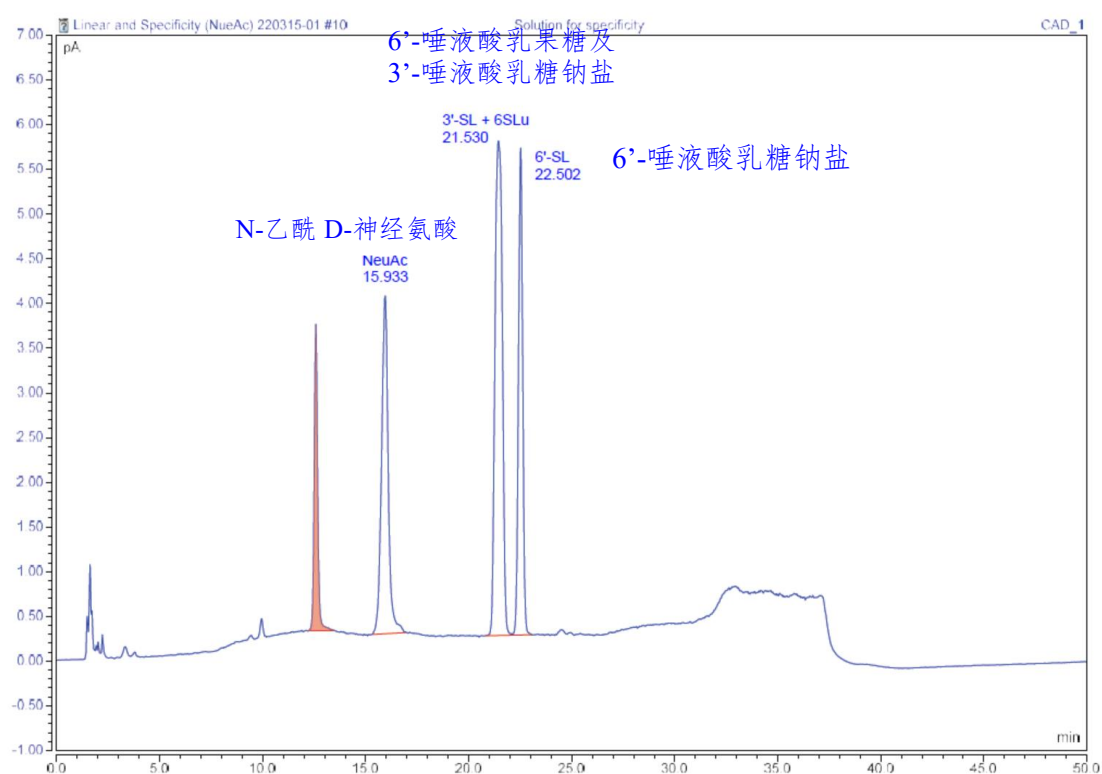


图 B.1 6'-唾液酸乳糖钠盐、6'-唾液酸乳果糖、3'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰 D-神经氨酸对照品的色谱图

表 B.1 液相色谱-电雾式检测器色谱条件下各物质保留时间

化合物	保留时间 (min)
N-乙酰 D-神经氨酸	15.9
6'-唾液酸乳果糖*	21.5

3'-唾液酸乳糖钠盐	21.5
6'-唾液酸乳糖钠盐	22.5

*注：6'-唾液酸乳糖为本质量规格中需要控制的杂糖，无法与3'-唾液酸乳糖钠盐分离，因此合并设定限量和。6'-唾液酸乳糖纯对照品难以获取，检测时利用HPLC-CAD浓度相同、峰面积相同的原理，使用6'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积计算浓度，图B.1及表B.1分别提供该物质谱图及保留时间。

B.2 液相色谱-脉冲安培检测器色谱条件下D-乳糖对照品色谱图

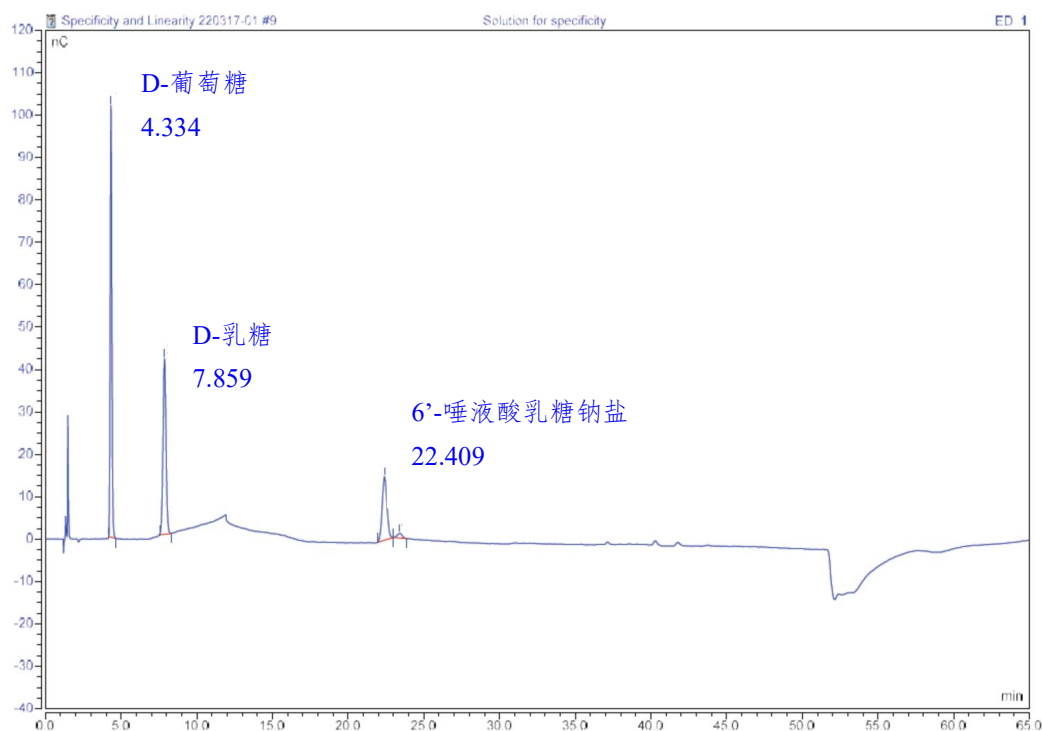


图 B.2 D-乳糖对照品的色谱图

表 B.2 液相色谱-脉冲安培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-葡萄糖	4.3
D-乳糖	7.9
6'-唾液酸乳糖钠盐	22.4

附录 C 用于生产 6'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

C.1 用于生产 6'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

用于生产 6'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息见表 C.1。

表 C.1 用于生产 6'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

食品营养强化剂	来源	供体
6'-唾液酸乳糖钠盐 6'-Sialyllactose sodium salt	大肠杆菌 W NEO6 <i>Escherichia coli</i> W NEO6	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ^a ; 集胞藻(<i>Synechocystis</i> sp.) ^b ; 多杀性巴氏杆菌(<i>Pasteurella multocida</i>) ^c ; 美人鱼发光杆菌 (<i>Photobacterium damsela</i>) ^d ; 荚膜红细菌 (<i>Rhodobacter capsulatus</i>) ^e

^a 为葡萄糖胺 6-磷酸 N-乙酰转移酶供体

^b 为 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶供体

^c 为胞苷 5'-单磷酸酯-N-乙酰基神经氨酸合成酶供体

^d 为 α -2,6-唾液酸转移酶供体

^e 为 N-乙酰基神经氨酸合成酶供体

(三) 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	聚甘油 蓖麻醇 酸酯	乳化剂	01.05.03	调制稀奶油	10.0	—

(四) 扩大使用范围的食品营养强化剂

序号	名称	食品 分类号	食品名称	使用量	备注
1	(6S)-5- 甲基四 氢叶酸, 氨基葡 萄糖盐	13.05	除 13.01~13.04 外的其他特殊 膳食用食品 (仅限孕妇及 乳母营养补充 食品)	执行《食品安 全国家标准 孕妇及乳母营 养补充食品》 (GB 31601) 中叶酸的规定	—

二、拟征求意见的食品添加剂新品种背景材料

（一）羟基酪醇

1.背景资料。羟基酪醇申请作为食品添加剂新品种。本次申请用于植物油脂（食品类别 02.01.01）。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会等允许其用于植物油中。

2.工艺必要性。该物质作为抗氧化剂用于植物油脂（食品类别 02.01.01），延缓油脂氧化。其质量规格按照公告的相关要求执行。

（二）二氯甲烷

1.背景资料。二氯甲烷申请作为食品工业用加工助剂新品种。本次申请用于茶叶脱咖啡因工艺。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其作为提取溶剂脱咖啡因。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用加工助剂用于茶叶脱咖啡因工艺，在茶叶提取加工中发挥作用。其质量规格按照公告的相关要求执行。

（三）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 2'-岩藻糖基乳糖用于婴幼儿配方食品等食品类别。

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

（四）3'-唾液酸乳糖钠盐

1.背景资料。3'-唾液酸乳糖钠盐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、欧盟委员会允许 3'-唾液酸乳糖钠盐用于婴幼儿配方食品等食品类别。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂，是一种母乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

（五）6'-唾液酸乳糖钠盐

1.背景资料。6'-唾液酸乳糖钠盐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、欧盟委员会允许 6'-唾液酸乳糖钠盐用于婴幼儿配方食品等食品类别。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂，是一种母乳低聚糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

（六）聚甘油蓖麻醇酸酯

1.背景资料。聚甘油蓖麻醇酸酯作为乳化剂、稳定剂已列入《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》（GB 2760），允许用于水油状脂肪乳化制品等食品类别，本次申请扩大使用范围用于调制稀奶油（食品类别 01.05.03）。美国食品药品监督管理局、日本厚生劳动省等允许其用于人造黄油等食品类别。根据联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果，该物质的每日允许摄入量为 0-7.5 mg/kg bw。

2.工艺必要性。该物质作为乳化剂用于调制稀奶油（食品类别 01.05.03），改善产品品质。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 聚甘油蓖麻醇酸酯（PGPR）》（GB 1886.95）。

（七）（6S）-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐

1.背景资料。叶酸作为营养素，在《食品安全国家标准 孕妇及乳母营养补充食品》（GB31601）中规定作为孕妇及乳母营养补充食品中的必需成分。原国家卫生和计划生育委员会 2017 年第 8 号公告批准食品营养强化剂新品

种(6S)-5-甲基四氢叶酸,氨基葡萄糖盐作为叶酸的一种化合物来源用于固体饮料等食品类别。本次申请扩大使用范围用于除13.01~13.04外的其他特殊膳食用食品(仅限孕妇及乳母营养补充食品)(食品类别13.05)。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会等允许其用于食品。

2.工艺必要性。该物质作为食品营养强化剂用于除13.01~13.04外的其他特殊膳食用食品(仅限孕妇及乳母营养补充食品)(食品类别13.05),强化食品中叶酸含量。其质量规格执行国家卫生健康委(原国家卫生和计划生育委员会)2017年第8号公告。