

附件

## 过氧化物酶等 6 种食品添加剂 新品种相关材料

### 一、拟征求意见的食品添加剂新品种名单

#### (一) 食品工业用酶制剂新品种

| 序号 | 酶                   | 来源                              | 供体                          |
|----|---------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1  | 过氧化物酶<br>Peroxidase | 黑曲霉<br><i>Aspergillus niger</i> | <i>Marasmius scorodoni</i>  |
| 2  | 木聚糖酶<br>Xylanase    | 黑曲霉<br><i>Aspergillus niger</i> | <i>Rasamsonia emersonii</i> |

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

#### (二) 食品营养强化剂新品种

1. 中文名称: 3'-唾液酸乳糖钠盐

英文名称: 3'-Sialyllactose sodium salt

功能分类: 食品营养强化剂

#### 用量及使用范围

| 食品分类号    | 食品名称         | 使用量                      | 备注             |
|----------|--------------|--------------------------|----------------|
| 01.03.02 | 调制乳粉(仅限儿童用乳) | 0.06 ~ 0.28g/L<br>(以纯品计, | 当与 2'-岩藻糖基乳糖、乳 |

|          |              |                         |   |
|----------|--------------|-------------------------|---|
|          | 粉)           | 以即食状态计, 粉状产品按冲调倍数折算使用量) | 糖-N-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64.5 g/kg。 |
| 13.01.01 | 婴儿配方食品       |                         |   |
| 13.01.02 | 较大婴儿和幼儿配方食品  |                         |   |
| 13.01.03 | 特殊医学用途婴儿配方食品 |                         |   |

## 质量规格要求

### 1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖等为原料, 经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂 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 D 的要求。

### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

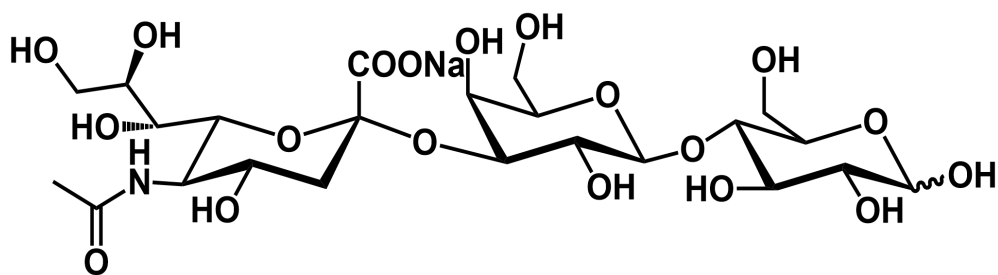
#### 2.1 化学名称

N-乙酰基- $\alpha$ -D-神经氨酸-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖钠盐

#### 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/% | $\geq$ 88.0 | 附录 A 中的 A.2 |

| 项目                    | 指标                  | 检验方法                |
|-----------------------|---------------------|---------------------|
| N-乙酰神经氨酸, w/%         | ≤ 1.5               | 附录 A 中的 A.2         |
| 3'-唾液酸乳果糖, w/%        | ≤ 5.0               | 附录 A 中的 A.2         |
| D-乳糖, w/%             | ≤ 3.0               | 附录 A 中的 A.3         |
| 水分, w/%               | ≤ 10.5              | GB 5009.3<br>卡尔·费休法 |
| 钠/ (mg/100g)          | ≤ $4.2 \times 10^3$ | GB 5009.91          |
| 残留蛋白/ (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-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖测定

#### A.2.1 高效液相色谱-紫外法

##### A.2.1.1 方法提要

3'-唾液酸乳糖钠盐溶于水，在酰胺键合色谱条件下分离，紫外检测器检测，外标法定量。

##### A.2.1.2 试剂和材料

A.2.1.2.1 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品（CAS 128596-80-5）：纯度 $\geq 90\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.1.2.2 N-乙酰神经氨酸对照品（CAS 131-48-6）：纯度 $\geq 90\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.1.2.3 3'-唾液酸乳果糖钠盐对照品：纯度 $\geq 70\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.1.2.4 磷酸二氢钾：分析纯。

A.2.1.2.5 氢氧化钾：分析纯。

A.2.1.2.6 乙腈：色谱纯。

A.2.1.2.7 氢氧化钾溶液（1 mol/L）：称取 5.6 g 氢氧化钾，加水定容至 100 mL。

A.2.1.2.8 磷酸二氢钾缓冲液（10 mmol/L，pH 6.5）：称取磷酸二氢钾 1.361 g，加入 800 mL 水溶解，用 1 mol/L 氢氧化钾溶液（A.2.1.2.7）调节 pH 值至 6.5，用水定容至 1 L，混匀过滤，超声脱气备用。

A.2.1.3 仪器与设备

A.2.1.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外检测器。

A.2.1.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

A.2.1.4 参考色谱条件

A.2.1.4.1 色谱柱：酰胺键合色谱柱 250 mm×4.6 mm，3 μm 或等效色谱柱。

A.2.1.4.2 流动相：乙腈:磷酸二氢钾缓冲液（A.2.1.2.8）=75:25（v/v）。

A.2.1.4.3 柱温：40℃。

A.2.1.4.4 流速：1.0 mL/min。

A.2.1.4.5 波长：210 nm。

A.2.1.4.6 进样量：10 μL。

A.2.1.4.7 运行时间：30 min。

## A.2.1.5 分析步骤

### A.2.1.5.1 标准溶液配制

#### A.2.1.5.1.1 3'-唾液酸乳糖钠盐标准工作溶液

分别准确称取三份适量的 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品,用水溶解后定容,得到标准工作溶液 1、2 和 3,根据对照品纯度折算后 3'-唾液酸乳糖钠盐标准溶液的浓度分别约为 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 和 4.0 mg/mL。

#### A.2.1.5.1.2 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液

称取约 1.5 mg 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品,加入 1 mL 水溶解,配制成 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液。置于冰箱的-20℃冷冻保存,有效期 1 年。

#### A.2.1.5.1.3 3'-唾液酸乳糖色谱峰鉴定溶液

量取 100  $\mu$ L 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液(A.2.1.5.1.2)和 100  $\mu$ L 3'-唾液酸乳糖钠盐标准工作溶液 1 (A.2.1.5.1.1)转移至 5 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。

#### A.2.1.5.1.4 用于 3'-唾液酸乳糖含量测定的标准储备溶液

3'-唾液酸乳糖含量用 3'-唾液酸乳糖钠盐标准品定量。准确称取适量的 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品,用水溶解后定容,根据对照品纯度折算后 3'-唾液酸乳糖钠盐浓度约为 0.5 mg/mL 标准储备溶液。该溶液在 2℃ ~ 8℃ 冰箱中保存,有效期 4 周。

#### A.2.1.5.1.5 N-乙酰神经氨酸标准储备溶液

准确称取 N-乙酰神经氨酸对照品，转移至合适的容量瓶中，用水溶解，并稀释至刻度，配制成 N-乙酰神经氨酸浓度为 0.5 mg/mL 的标准储备溶液。该溶液在 2℃ ~ 8℃ 冰箱中保存，有效期 4 周。

#### A.2.1.5.1.6 3'-唾液酸乳糖和 N-乙酰神经氨酸混合标准工作溶液

按照表 A.1 方法配制 3'-唾液酸乳糖和 N-乙酰神经氨酸混合标准工作溶液。

表 A.1 混合标准工作液配制

| 工作溶液       | 配制方法   | 浓度                                      |
|------------|--|---|
| 混合标准工作溶液 4 | 吸取 0.5 mg/mL 3'-唾液酸乳糖钠盐和 0.5 mg/mL N-乙酰神经氨酸标准储备溶液各 1 mL 于同一 10 mL 容量瓶中，用水定容。 | 3'-唾液酸乳糖钠盐溶液浓度和 N-乙酰神经氨酸浓度均约为 50 µg/mL。 |
| 混合标准工作溶液 5 | 吸取 6.0 mL 标准工作溶液 4 至 10 mL 容量瓶中，用水定容。  | 3'-唾液酸乳糖钠盐溶液浓度和 N-乙酰神经氨酸浓度均约为 30 µg/mL。 |
| 混合标准       | 吸取 2.0 mL 标准工作   | 3'-唾液酸乳糖钠盐溶                             |



|   |                         |  |
|---|-------------------------|--|
| 工作溶液 6                                    | 溶液 4 至 10 mL 容量瓶中，用水定容。 | 液浓度和 N-乙酰神经氨酸浓度均约为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。 |
| 注：混合标准工作溶液 4~6 在 2°C ~ 8°C 条件下储存，有效期 2 周。 |                         |  |

#### A.2.1.5.2 试样溶液配制

精确称取约 200 mg（精确到 0.1 mg）试样，加入到 100 mL 容量瓶中，加水至约容量瓶刻度线 2 cm 以下，振荡溶解，加水定容至刻度，配制成浓度约为 2 mg/mL 的试样溶液。相同试样做两个平行试验。

#### A.2.1.5.3 进样顺序

按照表 A.2 的序列测试。

表 A.2 测试序列

| 测试顺序 | 待测溶液  |
|------|---|
| 1    | 空白（水）                                       |
| 2    | 3'-唾液酸乳糖峰鉴定溶液（A.2.1.5.1.3）                  |
| 3    | 3'-唾液酸乳糖钠盐标准工作溶液（A.2.1.5.1.1）1、2、3          |
| 4    | 3'-唾液酸乳糖和 N-乙酰神经氨酸混合标准工作液（A.2.1.5.1.6）4、5、6 |
| 5    | 待测试样溶液（A.2.1.5.2）                           |

#### A.2.1.5.4 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：

——连续 3 次对照品峰保留时间的相对标准偏差 < 1.0% (n = 3) ；

——连续 3 次对照品峰响应值的相对标准偏差 < 2.0% (n = 3) ；

——洗脱液的色谱图应为纯基线。

酰胺键合柱色谱条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖的参考色谱图谱见附录 B.1。

#### A.2.1.6 结果计算

##### A.2.1.6.1 3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）含量测定

3'-唾液酸乳糖钠盐的含量通过外标法定量。以 3'-唾液酸乳糖钠盐的标准溶液 1、2、3 的峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制过零点的线性标准曲线。试样 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数  $\omega_1$  按式 (A.1) 计算。

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

式中：

$C_1$  —— 由标准曲线得到的待测试样溶液中 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) 。

三次进样测定结果的相对标准偏差不超过 2%。测试结果取算术平均值。

3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）含量的质量分数  $\omega_2$  按式（A.2）计算。

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

式中：

$\omega_1$  —— 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数，%；

$\omega$  —— 按照 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的试样中水分的质量分数，%。

结果保留小数点后一位。

#### A.2.1.6.2 N-乙酰神经氨酸含量测定

N-乙酰神经氨酸的含量通过外标法定量。以混合标准工作溶液 4、5、6 进样获得的 N-乙酰神经氨酸的峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标绘制过零点的线性标准曲线。试样 N-乙酰神经氨酸含量的质量分数  $\omega_3$  按式（A.3）计算。

$$\omega_3 = \frac{C_2 \times V_2}{m_2 \times 10} \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$C_2$  —— 由标准曲线得到的待测试样溶液中 N-乙酰神经氨酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V_2$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_2$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）；

10 —— 换算系数。

#### A.2.1.6.3 3'-唾液酸乳糖含量测定

3'-唾液酸乳糖的含量通过外标法定量。以混合标准工作溶液 4、5、6 进样获得的 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制通过零点的线性标准标准曲线。3'-唾液酸乳糖含量的质量分数  $\omega_4$  按式(A.4)计算。

$$\omega_4 = \frac{C_3 \times V_3}{m_3 \times 10 \times 1.03} \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

$C_3$  —— 由标准曲线得到的待测样品溶液中 3'-唾液酸乳糖的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V_3$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_3$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）；

1.03 —— 3'-唾液酸乳糖钠盐转换为 3'-唾液酸乳糖的换算系数；

10 —— 单位换算系数。

上述结果计算方法测定的 N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖结果保留小数点后两位。本方法的检测限为 0.25%。

如结果低于检测限，则结果表示为 <0.25%。

### A.2.2 高效液相色谱-电雾式法

#### A.2.2.1 方法提要

3'-唾液酸乳糖钠盐溶于水，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.2.2.2 试剂和材料

A.2.2.2.1 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品（CAS 128596-80-5）：纯度 $\geq 90\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.2.2 N-乙酰神经氨酸对照品（CAS 131-48-6）：纯度 $\geq 90\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.2.3 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 $\geq 70\%$ 或标明含量的等同物。

A.2.2.2.4 乙腈：色谱纯。

A.2.2.2.5 甲酸铵水溶液（25 mmol/L）：市售，色谱纯。

A.2.2.2.6 稀释溶剂：乙腈:甲酸铵水溶液=60:40（v/v）。

#### A.2.2.3 仪器和设备

A.2.2.3.1 高效液相色谱仪：配备电雾式检测器。

A.2.2.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

#### A.2.2.4 参考色谱条件

A.2.2.4.1 色谱柱：亲水性相互作用色谱柱 150 mm $\times$ 4.6 mm，5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.2.2.4.2 色谱保护柱：亲水性相互作用色谱柱 10 mm $\times$ 4.6 mm，5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.2.2.4.3 流动相：A 为乙腈，B 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.3。

表 A.3 梯度洗脱条件

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

A.2.2.4.4 柱温: 60°C。

A.2.2.4.5 电雾式检测器: 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.2.2.4.6 流速: 1 mL/min。

A.2.2.4.7 进样量: 10  $\mu$ L。

A.2.2.4.8 运行时间: 50 min。

A.2.2.5 分析步骤

A.2.2.5.1 标准溶液配制

A.2.2.5.1.1 3'-唾液酸乳糖钠盐标准溶液

标准储备溶液: 准确称取适量的 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品 (A.2.2.2.1), 转移到合适的容量瓶中, 用水溶解。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 的标准储备溶液, 现用现配。

标准工作溶液: 吸取不同体积的标准储备溶液, 用稀释溶剂 (A.2.2.2.6) 配制成 3 个不同浓度的系列标准溶液, 标

准工作溶液 1、2、3 中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度依次约为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 4 $^{\circ}\text{C}$  ~ 8 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，有效期 1 个月。

#### A.2.2.5.1.2 N-乙酰神经氨酸标准溶液

标准储备溶液：准确称取适量的 N-乙酰神经氨酸对照品（A.2.2.2.2），转移到合适的容量瓶中，用水溶解。根据对照品的纯度折算，配制成 N-乙酰神经氨酸浓度约为 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的标准储备溶液，现用现配。

标准工作溶液：吸取 1.0  $\text{mL}$  的 N-乙酰神经氨酸标准储备溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成 N-乙酰神经氨酸浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作溶液。在 4 $^{\circ}\text{C}$  ~ 8 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，有效期 3 周。

#### A.2.2.5.1.3 用于 3'-唾液酸乳糖钠盐含量测定的标准溶液

3'-唾液酸乳糖钠盐含量用 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品（A.2.2.2.1）定量。吸取 2.5  $\text{mL}$  3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成 3'-唾液酸乳糖钠盐浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作溶液。在 4 $^{\circ}\text{C}$  ~ 8 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，有效期 1 个月。

#### A.2.2.5.2 试样溶液

测定 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的试样溶液：精确称取 500  $\text{mg}$ （精确到 0.1  $\text{mg}$ ）试样，加入到 50  $\text{mL}$  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，吸取适量定容后的溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的试样溶液。

测定 N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的试样溶液：精确称取 500 mg（精确到 0.1 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，吸取适量定容后的溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成 1 mg/mL 的试样溶液。

### A.2.2.5.3 系统适用性试验

#### A.2.2.5.3.1 系统适用性测试溶液的配制

系统适用性试验储备液配制：准确称量 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品和 N-乙酰神经氨酸对照品，置于合适的容量瓶中，用水溶解，配制系统适用性测试储备液。储备液中每种对照品的浓度约为 1.0 mg/mL。

系统适用性试验溶液 1：取适量系统适用性测试储备液，加入稀释溶剂后配制成各对照品浓度约为 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：取适量系统适用性测试储备液，加入稀释溶剂后配制成各对照品浓度约为 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对照品浓度约为  $5 \mu\text{g/mL}$  的系统适用性试验溶液 3。

#### A.2.2.5.3.2 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：

——在测量系统适用性试验溶液 1~3 时，每个溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积与浓度的相关系数应  $\geq 0.995$ ；

——系统适用性试验溶液 1 的色谱图中，3'-唾液酸乳糖钠盐与 N-乙酰神经氨酸的分离度应  $\geq 1.5$ ；

——系统适用性试验溶液 1 的色谱图中，3'-唾液酸乳糖钠盐峰响应值的相对标准偏差  $\leq 2.0\%$  ( $n = 6$ )；

——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  $\geq 150$ ；

——系统适用性试验溶液 3 色谱图中，3'-唾液酸乳糖钠盐和 N-乙酰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%。

在此色谱条件下非挥发性  $\text{Na}^+$ 、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳糖、3'-唾液酸乳糖的参考色谱图谱见附录 B.2。

#### A.2.2.6 结果计算

##### A.2.2.6.1 3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）含量的测定

3'-唾液酸乳糖钠盐的含量通过外标法定量。以 3'-唾液酸乳糖钠盐的标准溶液 1、2、3 的峰面积为纵坐标，对应的

浓度为横坐标，绘制过零点的线性标准曲线。试样中 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数  $\omega_5$  按式 (A.5) 计算。

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

式中：

$C_4$  —— 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)；

$V_4$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_4$  —— 试样的质量，单位为毫克 (mg)。

三次进样测定结果的相对标准偏差不超过 2%。结果取算术平均值。

3'-唾液酸乳糖钠盐含量（以干基计）的质量分数  $\omega_6$  按式 (A.6) 计算。

$$\omega_6 = \frac{\omega_5}{1-\omega} \times 100\% \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

$\omega_5$  —— 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数，%；

$\omega$  —— 按照 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的样品中水的百分含量，%。

结果保留小数点后一位。

#### A.2.2.6.2 N-乙酰神经氨酸含量测定

N-乙酰神经氨酸含量的质量分数  $\omega_7$  按式 (A.7) 计算。

$$\omega_7 = \frac{A_1 \times C_5 \times V_5}{A_2 \times m_5} \times f \times 100\% \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

$A_1$  —— 试样溶液中 N-乙酰神经氨酸的峰面积；

$A_2$  —— 标准工作溶液中 N-乙酰神经氨酸的峰面积；

$C_5$  —— 标准工作溶液中 N-乙酰神经氨酸的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$m_5$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）；

$V_5$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$f$  —— 稀释因子。

本方法的检测限为 0.28 %。如结果低于检测限，则结果表示为 <0.28%。

#### A.2.2.6.3 3'-唾液酸乳糖含量测定

3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数  $\omega_8$  按式（A.8）计算。

$$\omega_8 = \frac{A_3 \times C_6 \times V_6}{A_4 \times m_6} \times f \times 100\% \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

$A_3$  —— 试样溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积；

$C_6$  —— 标准工作溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V_6$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$A_4$  —— 标准工作溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的峰面积;

$m_6$  —— 试样的质量, 单位为毫克 (mg);

$f$  —— 稀释因子。

3'-唾液酸乳糖含量的质量分数  $\omega_9$  按式 (A.9) 计算。

$$\omega_9 = \frac{\omega_8}{1.09 \times 1.03} \dots\dots\dots (A.9)$$

式中:

$\omega_8$  —— 3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数, %;

1.09 —— 用 3'-唾液酸乳糖钠盐定量时, 3'-唾液酸乳糖钠盐转换为 3'-唾液酸乳糖钠盐的换算系数;

1.03 —— 3'-唾液酸乳糖钠盐转换为 3'-唾液酸乳糖的换算系数。

本方法的检测限为 0.11%。如结果低于检测限, 则结果表示为 <0.11%。

### A.2.3 离子色谱法

#### A.2.3.1 方法提要

试样溶于水, 采用弱阴离子交换柱分离, 脉冲安培检测器检测, 以 3'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖对照品的保留时间定性, 外标法定量。

#### A.2.3.2 试剂、标准品和溶液

A.2.3.2.1 氢氧化钠溶液: 质量分数 50%。

A.2.3.2.2 三水合乙酸钠: 色谱纯。

A.2.3.2.3 氮气：纯度>99.99%。

A.2.3.2.4 八水合 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品：纯度 $\geq$ 95.0%或标明含量的等同物。

A.2.3.2.5 二水合 N-乙酰神经氨酸对照品：纯度 $\geq$ 90.0%或标明含量的等同物。

A.2.3.2.6 3'-唾液酸乳果糖对照品：纯度 $\geq$ 70.0%或标明含量的等同物。

A.2.3.2.7 一水合 D-乳糖对照品：含量 $\geq$ 95.0%或标明含量的等同物。

A.2.3.2.8 乙腈：色谱纯。

A.2.3.3 设备和材料

A.2.3.3.1 离子色谱仪：配备脉冲安培检测器。

A.2.3.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

A.2.3.4 参考色谱条件

A.2.3.4.1 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 $\times$ 3 mm)或等效离子交换色谱柱，及其对应分离柱(250 mm $\times$ 3 mm)或等效离子交换色谱柱。

A.2.3.4.2 柱温：20℃。

A.2.3.4.3 淋洗液 A：水。淋洗液 B：100 mmol/L 氢氧化钠+ 125 mmol/L 乙酸钠溶液。淋洗液 C：100 mmol/L 氢氧化钠溶液。

洗脱条件：淋洗液 A+淋洗液 B+淋洗液 C= 25+30+45 (v/v)。

A.2.3.4.4 流速：0.4 mL/min。

A.2.3.4.5 运行时间：3'-唾液酸乳糖钠盐含量测定的运行时间为 15 min；D-乳糖、N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖含量测定的运行时间为 30 min。

A.2.3.4.6 进样量：5.0  $\mu$ L。

A.2.3.4.7 检测器温度：35 $^{\circ}$ C。

A.2.3.4.8 检测器采集频率：2 Hz。

A.2.3.4.9 检测器波形为四电位波形，从 0.2 s 开始数据记录，到 0.4 s 停止采集数据，参数见表 A.4。

表 A.4 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.2.3.4.10 检测电极：金；参比电极：银-氯化银。

A.2.3.5 分析步骤

A.2.3.5.1 淋洗液配制

淋洗液 A (水)：0.2  $\mu$ m 滤膜过滤，装入塑料瓶，真空脱气后，用氮气置换塑料瓶的上部空气做氮封保护。

淋洗液 B (100 mmol/L 氢氧化钠+125 mmol/L 乙酸钠溶液)：称取 17.0 g 三水合乙酸钠 (A.2.3.2.2)，用约 500 mL

水溶解，转移至 1 L 塑料定量瓶中，用水定容至刻度。0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后，真空脱气，与 5.2 mL 氢氧化钠溶液 (A.2.3.2.1) 混合。用氮气置换塑料瓶的上部空气做氮封保护。临用前配制。

淋洗液 C (100 mmol/L 氢氧化钠溶液)：量取 1 L 水置于塑料瓶，0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，真空脱气后与 5.2 mL 氢氧化钠溶液 (A.2.3.2.1) 混合均匀，配制成 100 mmol/L 的氢氧化钠溶液。用氮气置换塑料瓶的上部空气做氮封保护。临用前配制。

#### A.2.3.5.2 溶液配制

##### A.2.3.5.2.1 标准储备液

3'-唾液酸乳糖钠盐储备液：准确称取三份适量的八水合 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品 (A.2.3.2.4) 至适宜的容量瓶中，用适量的水溶解后并定容至刻度。根据 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品的标识纯度折算，配制成最终浓度分别约为 1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 和 1.4 mg/mL 的标准储备溶液 1、2 和 3。

D-乳糖储备液：准确称取约 10 mg 的一水合 D-乳糖对照品 (A.2.3.2.7) 至 10 mL 定量瓶中，用适量的水溶解后并定容至刻度。

N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖峰鉴定储备液：分别称取约 1.0 mg 的二水合 N-乙酰神经氨酸 (A.2.3.2.5) 和 3'-

唾液酸乳糖（A.2.3.2.6），置入不同的小瓶中，每个小瓶中加入 0.9 mL 水和 0.1 mL 乙腈（A.2.3.2.8）溶解。

#### A.2.3.5.2.2 标准工作溶液

按表 A.5 进行配制。

表 A.5 标准工作溶液的配制

| 工作溶液     | 配制方法  | 浓度   |
|----------|---|--|
| 标准工作溶液 1 | 分别吸取 100 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 1 和 100 $\mu\text{L}$ D-乳糖储备液至同一 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。 | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，D-乳糖的浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。   |
| 标准工作溶液 2 | 分别吸取 50 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 1 和 50 $\mu\text{L}$ D-乳糖储备液至同一 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。   | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，D-乳糖的浓度约为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。     |
| 标准工作溶液 3 | 吸取 1.0 mL 标准工作溶液 2 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。  | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，D-乳糖的浓度约为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 |
| 标准工作溶液   | 吸取 1.0 mL 标准工作溶液 3  | 3'-唾液酸乳糖钠盐   |



|          |  |  |
|----------|--|--|
| 溶液 4     | 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。  | 的浓度约为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，D-乳糖的浓度约为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 |
| 标准工作溶液 5 | 吸取 100 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 2 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。 | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                                 |
| 标准工作溶液 6 | 吸取 50 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 2 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。  | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                                  |
| 标准工作溶液 7 | 吸取 1.0 mL 的标准工作溶液 6 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。                    | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                                |
| 标准工作溶液 8 | 吸取 100 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 3 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。 | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                                 |
| 标准工作溶液 9 | 吸取 50 $\mu\text{L}$ 3'-唾液酸乳糖钠盐标准储备液 3 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。  | 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度约为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                                  |
| 标准工作     | 吸取 1.0 mL 的标准工作溶   | 3'-唾液酸乳糖钠盐   |

|                             |   |   |
|-----------------------------|---|---|
| 溶液 10                       | 液 9 至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。   | 的浓度约为 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。                     |
| N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖峰鉴定用工作溶液 | 分别吸取 N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖峰鉴定储备液各 5 $\mu\text{L}$ 至同一 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。 | N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖的浓度各约为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 |

#### A.2.3.5.2.3 试样溶液

##### A.2.3.5.2.3.1 试样储备液

准确称取约 10 mg 试样于 10 mL 容量瓶中，用适量水溶解后并定容至刻度。每个试样两个平行。

##### A.2.3.5.2.3.2 3'-唾液酸乳糖钠盐含量测定用试样溶液

吸取 50  $\mu\text{L}$  试样储备液至 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。

##### A.2.3.5.2.3.3 D-乳糖、N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖含量测定用试样溶液

吸取 0.5 mL 试样储备液于 10 mL 容量瓶中，加水定容至刻度。

#### A.2.3.5.3 进样顺序

按照表 A.6 的顺序进行测定。

表 A.6 进样序列

| 进样顺序  | 待测溶液  |
|---|---|
| 1   | 空白（水）   |
| 2   | N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖峰鉴定用工作溶液                      |
| 3   | 按标准工作溶液 4、3、7、10、2、6、9、1、5、8 的顺序进样              |
| 4   | 3'-唾液酸乳糖钠盐含量测定用试样溶液（A.2.3.5.2.3.2）              |
| 5   | D-乳糖、N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖含量测定用试样溶液（A.2.3.5.2.3.3） |
| 6   | N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳糖峰鉴定用工作溶液                      |
| <p>注 1：空白至少进样两次，其余溶液进样一次。</p> <p>注 2：连续测定 10 个试样溶液后重复步骤 3，重新绘制标准曲线。</p> |   |

#### A.2.3.5.4 系统适用性

3'-唾液酸乳糖钠盐和 D-乳糖标准曲线的相关系数应  $\geq 0.999$ 。

#### A.2.3.6 结果计算

##### A.2.3.6.1 3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）含量测定

3'-唾液酸乳糖钠盐的含量通过外标法定量。以3'-唾液酸乳糖钠盐标准工作溶液的峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标绘制过零点的线性标准曲线。参考色谱图见附录 B.3。试样中3'-唾液酸乳糖钠盐含量的质量分数  $\omega_{10}$  按式 (A.10) 计算。

$$\omega_{10} = \frac{C_7 \times V_7 \times 200}{m_7 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.10)$$

式中：

$C_7$  —— 根据标准曲线得到的试样溶液中3'-唾液酸乳糖钠盐的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_7$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_7$  —— 试样的称样量，单位毫克 (mg)；

200 —— 稀释倍数；

1000 —— 换算系数。

试样中3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）的质量分数  $\omega_{11}$  按式 (A.11) 计算。

$$\omega_{11} = \frac{\omega_{10}}{1-\omega} \times 100\% \dots\dots\dots (A.11)$$

式中：

$\omega_{10}$  —— 式 (A.10) 得出的3'-唾液酸乳糖钠盐的质量分数，%；

$\omega$  —— 按照 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的试样中水

分的质量分数，%。

结果以 2 次平行试验测定结果的算术平均值表示，保留一位小数。

#### A.2.3.6.2 N-乙酰神经氨酸含量测定

N-乙酰神经氨酸通过对照品定性，3'-唾液酸乳糖钠盐的线性标准曲线定量。参考色谱图见附录 B.3。试样中 N-乙酰神经氨酸含量的质量分数  $\omega_{12}$  按式 (A.12) 计算。

$$\omega_{12} = \frac{C_8 \times V_7 \times 20 \times 1.11}{m_7 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.12)$$

式中：

$C_8$  —— 根据 N-乙酰神经氨酸峰面积，由标准曲线得到的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_7$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_7$  —— 试样的称样量，单位毫克 (mg)；

20 —— 稀释倍数；

1.11 —— N-乙酰神经氨酸相对于 3'-唾液酸乳糖钠盐的校正因子；

1000 —— 换算系数。

结果以 2 次平行测定结果的算术平均值表示。当结果  $\geq 0.1\%$  时，保留一位小数；当结果  $< 0.1\%$  时，保留两位小数。N-乙酰神经氨酸的报告限为 0.06%。如结果低于报告限，则结果表示为  $< 0.06\%$ 。

### A.2.3.6.3 3'-唾液酸乳糖含量测定

3'-唾液酸乳糖通过对照品定性，3'-唾液酸乳糖钠盐的线性标准曲线定量。参考色谱图见附录 B.3。试样中 3'-唾液酸乳糖含量的质量分数  $\omega_{13}$  按式 (A.13) 计算。

$$\omega_{13} = \frac{C_9 \times V_7 \times 20}{m_7 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.13)$$

式中：

$C_9$  —— 根据 3'-唾液酸乳糖峰面积，由标准曲线得到的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )；

$V_7$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_7$  —— 试样的称样量，单位毫克 (mg)；

20 —— 稀释倍数；

1000 —— 换算系数。

结果以 2 次平行试验测定结果的算术平均值表示，保留两位小数。3'-唾液酸乳糖的报告限为 0.10%。如结果低于报告限，则结果表示为 <0.10%。

## A.3 D-乳糖的测定

### A.3.1 高效液相色谱-示差法

#### A.3.1.1 方法提要

D-乳糖溶于水后，在亲水保留色谱柱的液相色谱条件下分离，示差折光检测器检测，外标法定量。

#### A.3.1.2 试剂和材料

A.3.1.2.1 D-乳糖对照品 (CAS 63-42-3): D-乳糖含量 $\geq$ 95%或标明含量的等同物。

A.3.1.2.2 乙腈: 色谱纯。

A.3.1.3 仪器与设备

A.3.1.3.1 高效液相色谱仪: 配备示差折光检测器。

A.3.1.3.2 分析天平: 感量 0.0001 g。

A.3.1.4 色谱条件

A.3.1.4.1 色谱柱: 亲水保留色谱柱, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.3.1.4.2 流动相: 乙腈:水=72:28 (v/v)。

A.3.1.4.3 柱温: 25 $^{\circ}$ C。

A.3.1.4.4 示差折光检测器温度: 40 $^{\circ}$ C。

A.3.1.4.5 流速: 1.1 mL/min。

A.3.1.4.6 进样量: 5  $\mu$ L。

A.3.1.4.7 运行时间: 30 min。

A.3.1.5 分析步骤

A.3.1.5.1 标准溶液配制

D-乳糖标准溶液的配制: 准确称取适量的 D-乳糖对照品到适宜的容量瓶中, 用水溶解, 配制成 D-乳糖浓度约为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 的标准溶液。该溶液在冰箱中 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下保存, 有效期为 4 周。

A.3.1.5.2 试样溶液制备

精确称取约 500 mg (精确到 1 mg) 试样, 加入到 10 mL 容量瓶中, 加水至约容量瓶刻度线 2 cm 以下, 振荡溶解, 加

水定容至刻度，配制成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。每个试样同时制备两个平行试样溶液。

#### A.3.1.5.3 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：

- 保留时间重复性的相对标准偏差 < 1.0% (n = 3) ；
- 响应值重复性的相对标准偏差 < 2.0% (n = 3) ；
- 洗脱液的色谱图应为纯基线。

亲水保留色谱条件下，D-乳糖的参考色谱图谱见附录 B.4。

#### A.3.1.6 D-乳糖含量测定

用标准溶液进样获得的 D-乳糖的峰面积为纵坐标，D-乳糖的浓度为横坐标通过零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-乳糖的含量  $\omega_{14}$  按式 (A.14) 计算。

$$\omega_{14} = \frac{C_{10} \times V_8}{m_8} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.14)$$

式中：

$C_{10}$  —— 由标准曲线得到的待测样品溶液中 D-乳糖的浓度，单位为毫克每毫升 (mg/mL) ；

$V_8$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL) ；



$m_8$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）。

结果保留小数点后两位。本方法的检测限为 0.50%。如结果低于检测限，则结果表示为 <0.50%。

### A.3.2 离子色谱-梯度洗脱法

#### A.3.2.1 方法提要

试样溶于水，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.3.2.2 试剂和材料

A.3.2.2.1 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.3.2.2.2 氢氧化钠溶液：市售，质量分数 50%。

A.3.2.2.3 乙酸钠：分析纯。

#### A.3.2.3 仪器和设备

离子色谱仪：配备电化学脉冲安培检测器。

#### A.3.2.4 参考色谱条件

A.3.2.4.1 色谱柱：阴离子交换色谱柱 250 mm  $\times$  4.0 mm, 10  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.3.2.4.2 色谱保护柱：阴离子交换色谱柱 50 mm  $\times$  4.0 mm, 10  $\mu$ m 或等效色谱柱。

A.3.2.4.3 流动相：A 为水；B 为 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液；C 为 0.28 mol/L 乙酸钠溶液 + 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液。梯度洗

脱条件见表 A.7。

表 A.7 梯度洗脱条件

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

A.3.2.4.4 柱温: 30℃。

A.3.2.4.5 流速: 1.2 mL/min。

A.3.2.4.6 检测器: 脉冲安培检测器

A.3.2.4.6.1 参比电极: 银/氯化银电极。

A.3.2.4.6.2 工作电极: 金电极。

A.3.2.4.7 进样体积: 10 μL。

A.3.2.4.8 运行时间: 55 min。

A.3.2.5 分析步骤

A.3.2.5.1 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 μg/mL 的标准溶液。

A.3.2.5.2 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.3.2.5.3 系统适用性试验

#### A.3.2.5.3.1 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，其中 D-乳糖对照品的浓度约为 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，用水稀释制成系统适用性试验溶液 2，其中 D-乳糖对照品的浓度约为 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### A.3.2.5.3.2 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-乳糖的色谱图分离度应  $\geq 1.5$ 。

——系统适用性试验溶液 1 中 D-乳糖峰面积的相对标准偏差应  $\leq 2.0\%$  ( $n = 6$ )。

依据前述分析条件测定，D-乳糖标准品的参考图谱见附录 B.5。

#### A.3.2.6 D-乳糖结果计算

D-乳糖含量的质量分数  $\omega_{15}$  按式 (A.15) 计算。

$$\omega_{15} = \frac{A_5 \times C_{11} \times V_9}{A_6 \times m_9} \times f \times 100\% \dots \dots \dots (A.15)$$

式中:

$A_5$  —— 试样溶液中 D-乳糖的峰面积;

$A_6$  —— 标准溶液中 D-乳糖的峰面积;

$C_{11}$  —— 标准工作溶液中 D-乳糖的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$m_9$  —— 试样的质量, 单位为毫克 (mg);

$V_9$  —— 试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$  —— 稀释因子。

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.3.3 离子色谱-等度洗脱法

#### A.3.3.1 方法提要

试样溶于水, 采用高效阴离子交换色谱法分离, 脉冲安培检测器检测, 以 D-乳糖对照品的保留时间定性, 外标法定量。

#### A.3.3.2 试剂、标准品和溶液

同 2.3.2。

#### A.3.3.3 设备和材料

同 2.3.3。

#### A.3.3.4 参考色谱条件

同 2.3.4。

#### A.3.3.5 分析步骤

同 2.3.5。

#### A.3.3.6 计算

D-乳糖的含量通过外标法计算。以标准工作溶液中 D-乳糖的峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标绘制过零点的线性标准曲线。D-乳糖含量的质量分数  $\omega_{16}$  按式 (A.16) 计算。

$$\omega_{16} = \frac{C_{12} \times V_7 \times 20}{m_7 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.16)$$

式中：

$C_{12}$  —— 根据标准曲线得到的试样溶液中 D-乳糖的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_7$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_7$  —— 试样的称样量，单位毫克 (mg)；

20 —— 稀释倍数；

1000 —— 换算系数。

结果以 2 个平行测定结果的算术平均值表示。当结果  $\geq 0.1\%$  时，保留一位小数；当结果  $< 0.1\%$  时，保留两位小数。D-乳糖检测的报告限为 0.03%。若结果低于报告限，则结果表示为  $< 0.03\%$ 。

## A.4 残留蛋白含量的测定

### A.4.1 三氯乙酸沉淀法

#### A.4.1.1 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。为了防止试样基质对显色反应的干扰，需在试样中加入脱氧胆酸钠和三氯乙酸溶液，沉淀蛋白质，除去上清溶液，将蛋白沉淀复溶后，与考马斯亮蓝染色试剂显色，根据牛血清白蛋白标准溶液的标准曲线，计算试样蛋白质的含量。

#### A.4.1.2 试剂和材料

A.4.1.2.1 牛血清白蛋白对照品：纯度 $\geq 95\%$ 或标明含量的等同物。

A.4.1.2.2 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.4.1.2.3 脱氧胆酸钠。

A.4.1.2.4 三氯乙酸。

#### A.4.1.3 仪器和设备

A.4.1.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.4.1.3.2 电子分析天平：感量 0.0001g。

A.4.1.3.3 离心机。

#### A.4.1.4 分析步骤

#### A.4.1.4.1 牛血清白蛋白储备溶液

称取 50.0 mg 牛血清白蛋白对照品于 50 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.1.4.2 牛血清白蛋白标准溶液

分别移取不同体积的牛血清白蛋白储备液于 10 mL 容量瓶中，用水定容，配制成浓度为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、30  $\mu\text{g/mL}$  和 50  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白标准工作溶液。

#### A.4.1.4.3 脱氧胆酸钠溶液

称取 15.0 mg 脱氧胆酸钠于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.1.4.4 三氯乙酸溶液

称取 7.20 g 三氯乙酸于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.1.4.5 试样溶液的制备

称取 1.0 g 试样于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

#### A.4.1.4.6 测定

取 1 mL 试样溶液至 2 mL 离心管，以水作为空白对照，加入 0.1 mL 脱氧胆酸钠溶液（A.4.1.4.3），混匀，室温静置 10 min，然后加入 0.1 mL 三氯乙酸溶液（A.4.1.4.4），混匀，12000 rpm 离心 20 min，用注射器针头吸取上清液（试管壁

上不能有残留液体)，加入 1 mL 水复溶蛋白质。

移取 1 mL 考马斯亮蓝染液至离心管，混匀，静置 5 min，在 595 nm 波长下测定吸光值。记录试样溶液读数为 A，空白对照读数为 B。

注：若试样溶液吸光值 A 扣去空白对照吸光值 B 后的差值大于标准曲线上限，则降低试样溶液的浓度，重新检测，直至差值在标准曲线范围内。

#### A.4.1.4.7 牛血清白蛋白标准曲线

分别移取 2.5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL 和 50 μg/mL 牛血清白蛋白标准溶液 1 mL 至 2 mL 离心管，以水作为空白对照，按照“A.4.1.4.6”步骤检测，以牛血清白蛋白标准溶液的吸光值减去空白吸光值得到校准吸光值，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，绘制标准曲线。参考标准曲线见附录 C.1。

#### A.4.1.5 结果计算

试样中蛋白含量  $\omega_{17}$  按式 (A.17) 计算，单位为 mg/kg。

$$\omega_{17} = \frac{C_{13} \times V_{10} \times 1000}{m_{10}} \dots\dots\dots (A.17)$$

式中：

$C_{13}$  —— 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 (μg/mL)；

$V_{10}$  —— 试样溶液的定容体积，单位为毫升 (mL)；



$m_{10}$  —— 试样的质量，单位毫克（mg）；

1000 —— 单位转换系数。

方法的定量限为 25 mg/kg。若结果低于定量限，则结果表示为 <25 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.4.2 考马斯亮蓝直接测定法

### A.4.2.1 方法提要

考马斯亮蓝染色试剂与试样中的蛋白反应，在 595 nm 波长下检测试样溶液的吸光度。以牛血清白蛋白标准溶液绘制二次标准曲线，计算试样中蛋白的含量。

### A.4.2.2 试剂和材料

A.4.2.2.1 牛血清白蛋白对照品：标明含量的蛋白定量标准品。

A.4.2.2.2 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 仪器和设备

A.4.2.3.1 紫外分光光度计。

A.4.2.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

### A.4.2.4 分析步骤

A.4.2.4.1 牛血清白蛋白标准储备液

称取 20 mg 牛血清白蛋白对照品 (A.4.2.2.1) 于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解、混匀并定容。

#### A.4.2.4.2 牛血清白蛋白标准溶液

吸取 100  $\mu$ L 牛血清白蛋白标准储备液 (A.4.2.4.1) 于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解、混匀并定容。

#### A.4.2.4.3 试样溶液

称取 250 mg 试样, 用适量的水溶解, 转移至 5 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。如果试样溶液浑浊, 可使用离心机离心或 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 取上清液。

#### A.4.2.4.4 牛血清白蛋白标准工作溶液

按表 A.8 制备牛血清白蛋白标准工作溶液。

表 A.8 空白溶液和牛血清白蛋白标准工作溶液

|                       | 蛋白浓度<br>(mg/L) | 水<br>( $\mu$ L) | BSA 标<br>准溶液<br>( $\mu$ L) | 考马斯亮<br>蓝试剂<br>( $\mu$ L) |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| 空白溶液                  | 0              | 800             | 0                          | 200                       |
| 空白溶液                  | 0              | 800             | 0                          | 200                       |
| 空白溶液                  | 0              | 800             | 0                          | 200                       |
| 牛血清白蛋白<br>标准工作溶液<br>1 | 1              | 750             | 50                         | 200                       |

|                       |   |     |     |     |
|-----------------------|---|-----|-----|-----|
| 牛血清白蛋白<br>标准工作溶液<br>2 | 2 | 700 | 100 | 200 |
| 牛血清白蛋白<br>标准工作溶液<br>4 | 4 | 600 | 200 | 200 |
| 牛血清白蛋白<br>标准工作溶液<br>6 | 6 | 500 | 300 | 200 |

#### A.4.2.4.5 试样待测溶液

吸取试样溶液 600  $\mu\text{L}$  (A.4.2.4.3) 于比色皿中, 加入 200  $\mu\text{L}$  牛血清白蛋白标准溶液 (A.4.2.4.2) 及 200  $\mu\text{L}$  考马斯亮蓝试剂 (A.4.2.2.2)。

#### A.4.2.4.6 试样测定

上述空白溶液、牛血清白蛋白标准工作溶液和试样待测溶液在室温下静置 10 min。以水为参比, 依次测定各溶液在 595 nm 下的吸光度值。

#### A.4.2.5 结果计算

用牛血清白蛋白标准工作溶液、试样待测溶液的吸光值减去 3 个空白溶液的平均吸光度值, 得到校正吸光度值。以牛血清白蛋白标准工作溶液校正吸光度值和相应的浓度

(mg/L) 绘制二次标准曲线, 标准曲线的示意图见附录 C.2。  
样品中蛋白含量  $\omega_{18}$  按式 (A.18) 计算。

$$\omega_{18} = \frac{(C_{14} - C_{cal4}) \times V_{11}}{0.6 \times m_{11}} \times f \times 1000 \dots\dots\dots(A.18)$$

式中:

$C_{14}$  —— 试样待测溶液在标准曲线中对应的浓度值, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$C_{cal4}$  —— 标准溶液 4 的蛋白质含量, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V_{11}$  —— 试样溶液的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$  —— 试样溶液稀释倍数 (如适用);

$m_{11}$  —— 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 —— 换算系数。

结果以 2 次平行试验测定结果的算术平均值表示, 保留一位小数。方法的定量限为 50 mg/kg。若结果低于定量限, 则结果表示为 <50 mg/kg。

## A.5 内毒素的测定 (凝胶法)

### A.5.1 一般规定

本测定所用的水应符合灭菌注射用水标准, 试验所用器皿需经处理, 以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法 (250°C、至少 30 min) 去除, 也可采用其他

确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

#### A.5.2 方法提要

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

#### A.5.3 试剂和材料

A.5.3.1 细菌内毒素标准品。

A.5.3.2 鲎试剂：带有灵敏度标示值 $\lambda$ 。

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

#### A.5.4 仪器和设备

A.5.4.1 旋涡混合器。

A.5.4.2 恒温水浴箱。

#### A.5.5 分析步骤

##### A.5.5.1 试样溶液配制

样品加细菌内毒素检查用水溶解。必要时，可调节被测溶液（或其稀释液）的 pH 值，一般试样溶液和鲎试剂混合

后溶液的 pH 值在 6.0 ~ 8.0 的范围内为宜，可使用适宜的酸、碱溶液或缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查用水在已去除内毒素的容器中配制。所用溶剂、酸碱溶液及缓冲液应不含内毒素和干扰因子。

#### A.5.5.2 鲎试剂灵敏度复核试验

在本检查法规定的条件下，使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度，用 EU/mL 表示。当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行鲎试剂灵敏度复核试验。根据鲎试剂灵敏度的标示值（ $\lambda$ ），将细菌内毒素标准品用细菌内毒素检查用水溶解，在旋涡混合器上混匀 15 min 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作，然后制成  $2\lambda$ 、 $\lambda$ 、 $0.5\lambda$  和  $0.25\lambda$  四个浓度的内毒素标准溶液，每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作。取不同浓度的内毒素标准溶液，分别与等体积的鲎试剂溶液混合，每一个内毒素浓度平行做 4 管；另外取 2 管加入等体积的细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后，封闭管口，垂直放入  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴箱中，保温  $60 \text{ min} \pm 2 \text{ min}$ 。将试管从恒温水浴箱中轻轻取出，缓缓倒转  $180^{\circ}$ ，若管内形成凝胶，并且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性；未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、



式中:

$c$  —— 为试样溶液的浓度,单位为毫克每毫升( $\text{mg/mL}$ );  
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 ( $\text{EU/mg}$ );

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

表 A.9 干扰试验溶液的制备

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



|   |           |   |   |   |   |
|---|-----------|---|---|---|---|
| D | 无/内毒素检查用水 | — | — | — | 2 |
|---|-----------|---|---|---|---|

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

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

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

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

#### A.5.5.4 测定

##### A.5.5.4.1 凝胶限度试验

按表 A.10 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.10 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  | 2 λ /试样溶液      | 2    |
| C  | 2 λ /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.11 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.11 凝胶半定量试验溶液的制备

| 编号 | 内毒素浓度/<br>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              | —     | —    | —        | 2    |

|  |     |  |  |  |  |
|--|-----|--|--|--|--|
|  | 查用水 |  |  |  |  |
|--|-----|--|--|--|--|

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

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

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

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

均为阳性，可记为内毒素的浓度大于或等于最大的稀释倍数乘以 $\lambda$ 。

附录 B 3'-唾液酸乳糖钠盐、3'-唾液酸乳果糖、N-乙酰神经氨酸和 D-乳糖对照品参考图谱

B.1 液相色谱-紫外检测条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品色谱图

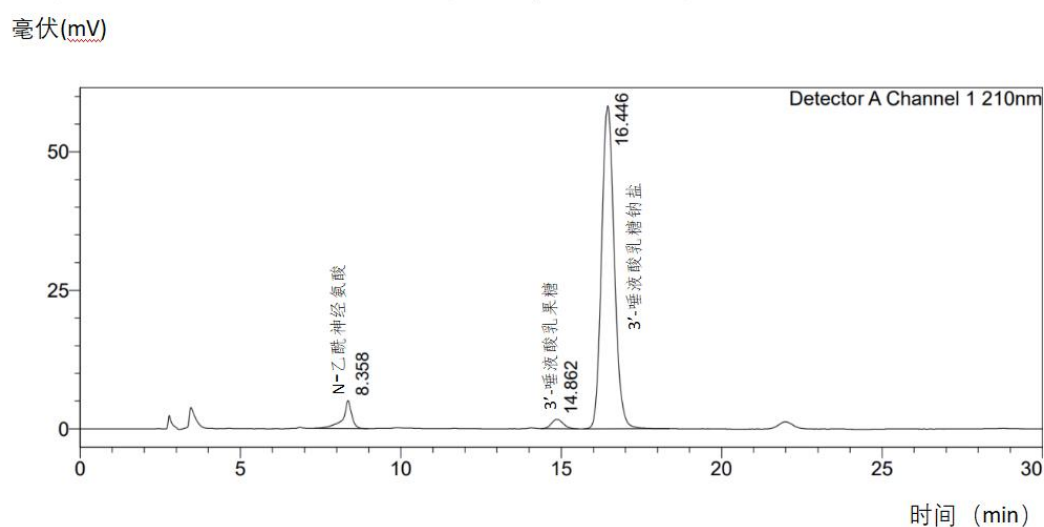


图 B.1 液相色谱-紫外检测条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品色谱图

表 B.1 液相色谱-紫外检测法条件下各物质参考保留时间

| 化合物        | 保留时间 (min) |
|------------|------------|
| N-乙酰神经氨酸   | 8.4        |
| 3'-唾液酸乳果糖  | 14.9       |
| 3'-唾液酸乳糖钠盐 | 16.5       |

B.2 液相色谱-电雾式检测条件下  $\text{Na}^+$ 、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖、3'-唾液酸乳糖对照品的色谱图

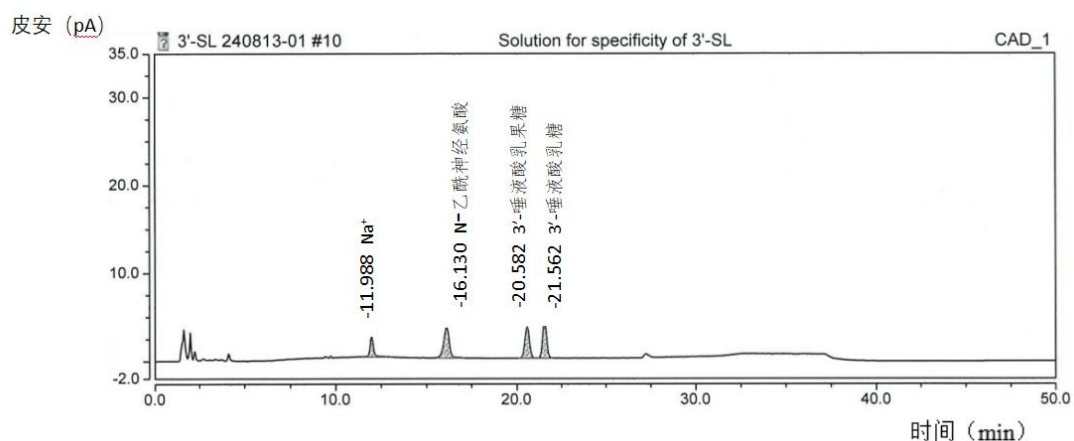


图 B.2 液相色谱-电雾式检测条件下  $\text{Na}^+$ 、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖对照品的色谱图

表 B.2 液相色谱-电雾式检测条件下各物质参考保留时间

| 化合物           | 保留时间 (min) |
|---------------|------------|
| $\text{Na}^+$ | 12.0       |
| N-乙酰神经氨酸      | 16.1       |
| 3'-唾液酸乳果糖     | 20.6       |
| 3'-唾液酸乳糖      | 21.6       |

B.3 阴离子交换色谱-脉冲安培检测条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、D-乳糖、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品色谱图

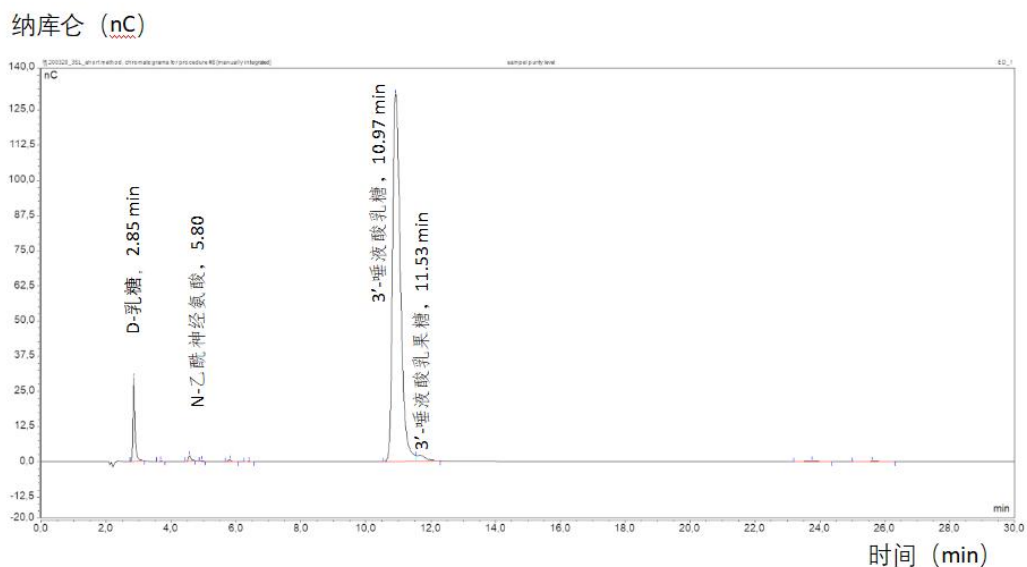


图 B.3 阴离子交换色谱-脉冲安培检测条件下 3'-唾液酸乳糖钠盐、D-乳糖、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品色谱图

表 B.3 阴离子交换色谱-脉冲安培检测条件下各物质参考保留时间

| 化合物        | 保留时间 (min) | 相对保留时间 (min) |
|------------|------------|--------------|
| D-乳糖       | ~2.9       | ~0.26        |
| N-乙酰神经氨酸   | ~5.8       | ~0.53        |
| 3'-唾液酸乳糖钠盐 | 10.99      | 1.00         |
| 3'-唾液酸乳果糖  | ~11.8      | ~1.07        |



### B.4 液相色谱-示差检测法条件下 D-乳糖对照品色谱图

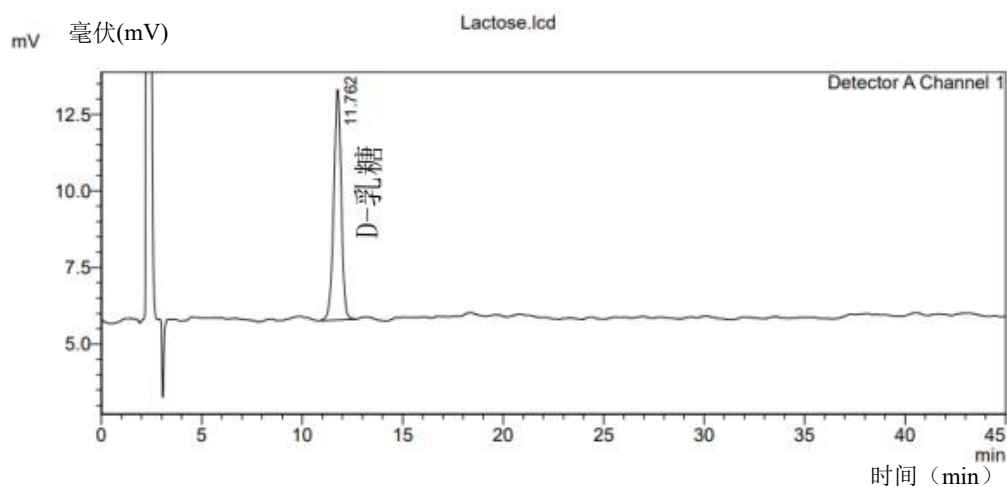


图 B.4 液相色谱-示差检测法条件下 D-乳糖对照品色谱图

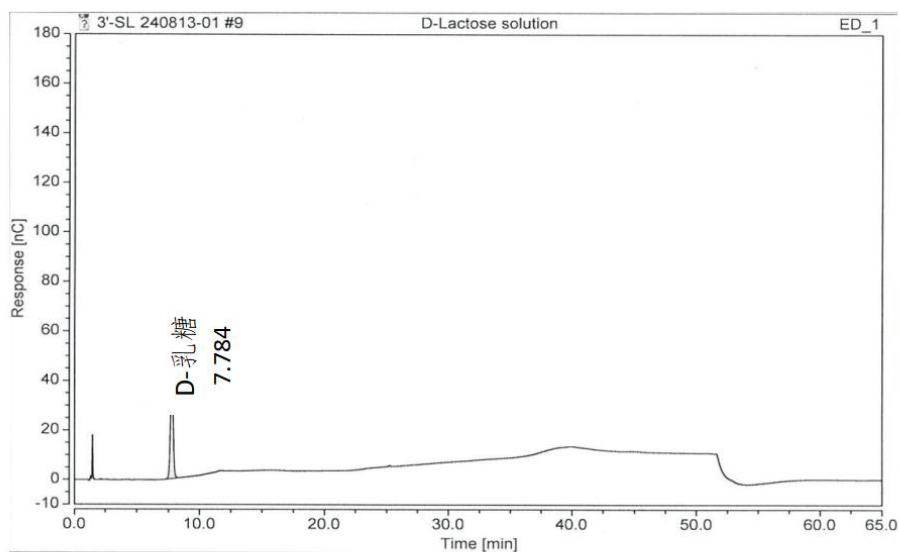
表 B.4 液相色谱-示差检测条件下 D-乳糖参考保留时间

| 化合物  | 保留时间 (min) |
|------|------------|
| D-乳糖 | 11.8       |

### B.5 液相色谱-脉冲安培检测器色谱（梯度洗脱法）条件下

### D-乳糖对照品色谱图

纳库仑 (nC)



时间 (min)

图 B.5 液相色谱-脉冲安培检测器色谱（梯度洗脱法）  
条件下 D-乳糖对照品色谱图

表 B.5 液相色谱-脉冲安培检测器色谱（梯度洗脱法）条件  
下各物质的参考保留时间

| 化合物  | 保留时间（min） |
|------|-----------|
| D-乳糖 | 7.8       |

## 附录 C 残留蛋白含量测定的参考标准曲线

### C.1 三氯乙酸沉淀法参考标准曲线

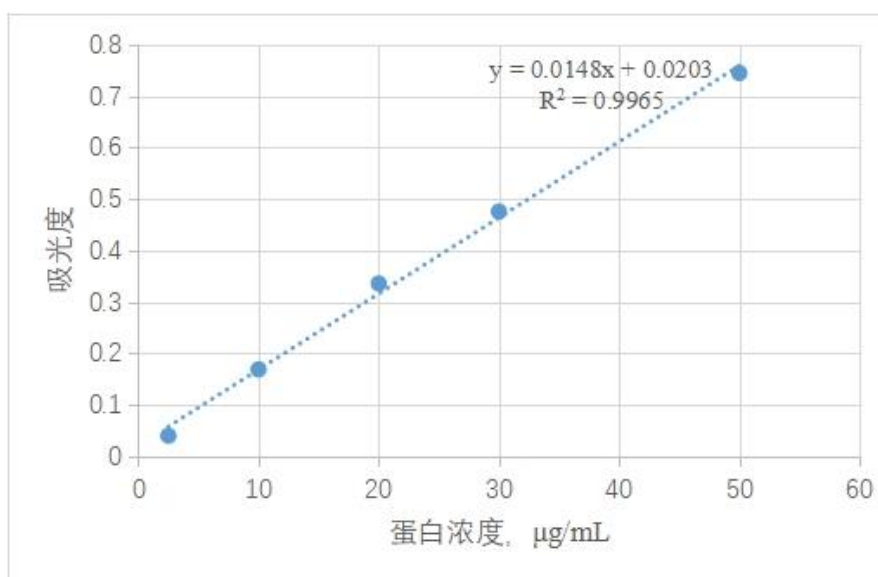


图 C.1 三氯乙酸沉淀法参考标准曲线

### C.2 考马斯亮蓝直接测定法参考标准曲线

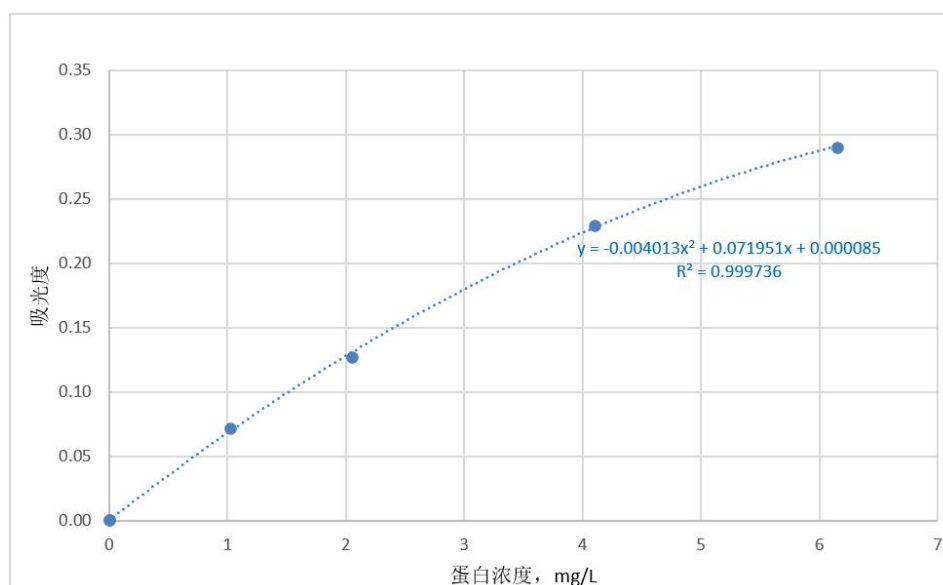


图 C.2 考马斯亮蓝直接测定法参考标准曲线

附录 D 用于生产 3'-唾液酸乳糖钠盐的生产菌信息

D.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 D.1。

表 D.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<br>钠盐<br>3'-Sialyllactose<br>sodium salt | 大肠杆菌 BL21<br>(DE3)<br><i>Escherichia coli</i> BL21<br>(DE3)       | 弯曲菌 ( <i>Campylobacter</i> spp.) <sup>a</sup><br>奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>b</sup><br>百伯史坦菌 ( <i>Bibersteinia</i> spp.) <sup>c</sup>   |
|   | 大肠杆菌 W<br>(ATCC 9637)<br><i>Escherichia coli</i> W<br>(ATCC 9637) | 酵母菌 ( <i>Saccharomyces</i> spp.) <sup>d</sup><br>集胞藻 ( <i>Synechocystis</i> spp.) <sup>e</sup><br>红细菌 ( <i>Rhodobacter</i> spp.) <sup>f</sup><br>巴氏杆菌 ( <i>Pasteurella</i> spp.) <sup>g</sup><br>奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>h</sup> |
|   | 大肠杆菌 K-12 DH1<br>MDO<br><i>Escherichia coli</i> K-12<br>DH1 MDO   | 奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>i</sup><br>弯曲菌 ( <i>Campylobacter</i> spp.) <sup>j</sup>   |

a, f, j 为 N-乙酰神经氨酸合酶供体

a, j 为尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺差向异构酶供体

b, g, j 为胞嘧啶 5'-单磷酸-N-乙酰神经氨酸合成酶供体

c, h, i 为  $\alpha$ -2,3-唾液酸转移酶供体

d 为葡萄糖胺 6-磷酸 N-乙酰转移酶供体

e 为 N-乙酰葡萄糖胺-2-差向异构酶供体

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

乳糖-*N*-新四糖的使用范围、使用量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 用于生产乳糖-*N*-新四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 2 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<br>Lacto- <i>N</i> -neotetraose | 大肠杆菌 BL21<br>(DE3)<br><i>Escherichia coli</i><br>BL21 (DE3) | 奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp.) <sup>a</sup><br>和螺杆菌 ( <i>Helicobacter</i><br>spp.) <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

### （三）扩大使用范围的食品添加剂

| 序号 | 名称  | 食品<br>分类号       | 食品名称                     | 最大使用量<br>(g/kg) | 备注 |
|----|-----|-----------------|--------------------------|-----------------|----|
| 1  | 氧化镁 | 04.01.01.<br>02 | 经表面处理的鲜<br>水果（仅限柑橘<br>类） | 按生产需要<br>适量使用   |    |

### （四）扩大使用范围的食品工业用加工助剂

| 序号 | 助剂中文名称 | 助剂英文名称               | 功能  | 使用范围           |
|----|--------|----------------------|-----|----------------|
| 1  | 过氧化氢   | hydrogen<br>peroxide | 脱硫剂 | 酵母衍生制品加工<br>工艺 |

## 二、拟征求意见的食品添加剂新品种解读材料

### （一）过氧化物酶

1.解读材料。黑曲霉（*Aspergillus niger*）来源的过氧化物酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。美国食品药品监督管理局、加拿大卫生部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，主要用于催化反应底物的氧化，在乳酪乳清的脱色工艺中使用。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂》（GB 1886.174）。

### （二）木聚糖酶

1.解读材料。黑曲霉（*Aspergillus niger*）来源的木聚糖酶申请作为食品工业用酶制剂新品种。美国食品药品监督管理局、法国食品安全局、丹麦兽医和食品局等允许其作为食品工业用酶制剂使用。

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

### （三）3'-唾液酸乳糖钠盐

1.解读材料。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、欧盟委员会等允许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。

### （四）乳糖-N-新四糖

1.解读材料。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。

### （五）氧化镁

1.解读材料。氧化镁作为食品工业用加工助剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），可在各类食品加工过程中使用。本次申请扩大使用范围用于经表面处理的鲜水果（仅限柑橘类）（食品类别 04.01.01.02）。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会允许其作为固化剂用于食品。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“不作具体规定”。

2.工艺必要性。该物质作为其他（固化剂）用于经表面处理的鲜水果（仅限柑橘类）（食品类别 04.01.01.02），固化柑橘果皮中果胶，提高果胶凝胶强度。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 氧化镁》（GB 1886.216）。

### （六）过氧化氢

1.解读材料。过氧化氢作为食品工业用加工助剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），作为脱硫剂、脱色剂、去碘剂用于淀粉糖和淀粉加工工艺、油脂加工工艺、海藻加工工艺等生产工艺，本次申请扩大使用范围用于酵母衍生制品加工工艺。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脱硫剂用于食品。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“不作具体规定”。

2.工艺必要性。该物质作为食品工业用加工助剂（脱硫剂）用于酵母衍生制品加工工艺，发挥脱硫作用。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 过氧化氢》（GB 22216）。