

## 附件 2

# 2026 年第 1 号公告中 D-阿洛酮糖-3-差向 异构酶等 11 种食品添加剂新品种 配套参考检验方法

### 一、食品营养强化剂新品种 3'-唾液酸乳糖钠盐

#### 1. 感官要求

1.1 色泽、状态：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。

#### 2. 理化指标

2.1 3'-唾液酸乳糖钠盐（以干基计）、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳糖按附录 A 中 A.2 规定的方法执行。

2.2 D-乳糖按附录 A 中 A.3 规定的方法执行。

2.3 水分按 GB 5009.3 中卡尔·费休法执行。

2.4 钠按 GB 5009.91 规定的方法执行。

2.5 残留蛋白按附录 A 中 A.4 规定的方法执行。

2.6 内毒素按国家卫生健康委 2023 年第 8 号公告 2'-岩藻糖基乳糖附录 A 中 A.5 规定的方法执行。

2.7 总砷（以 As 计）按 GB 5009.11 规定的方法执行。

2.8 铅（Pb）按 GB 5009.12 规定的方法执行。

#### 3. 微生物限量

3.1 菌落总数限量按 GB 4789.2 规定的方法执行。

3.2 肠杆菌科限量按 GB 4789.41 规定的方法执行。

3.3 沙门氏菌限量按 GB 4789.4 规定的方法执行。



## 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，在亲水保留柱的液相色谱条件下分离，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，加水溶解并定容至 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 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：亲水性相互作用色谱柱 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°C。

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，得到系列标准工作溶液 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，配制成浓度为 1 mg/mL 的 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液。置于冰箱的-20°C冷冻保存，有效期 1 年。

A.2.1.5.1.3 3'-唾液酸乳糖标准储备溶液

吸取 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，用水定容。

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'-唾液酸乳糖钠盐对照品定量。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°C~8°C 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

准确称取适量的 N-乙酰神经氨酸对照品，转移至适宜的容量瓶中，用水溶解并定容，配制成浓度为 0.5 mg/mL N-乙酰神经氨酸的标准储备溶液。该溶液在 2°C~8°C 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 混合标准工作溶液配制

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-乙酰神经氨酸溶液浓度均约为 50 µg/mL。
混合标准工作溶液 5	吸取 6.0 mL 混合标准工作溶液 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-乙酰神经氨酸溶液浓度均约为

		30 µg/mL。
混合标准 工作溶液 6	吸取 2.0 mL 混合标准 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 氨酸溶液浓度均约为 10 µg/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，加水至容量瓶刻度线约 2 cm 以下，振荡溶解后用水定容，配制成浓度约为 2 mg/mL 的试样溶液。每个试样做两个平行。

#### A.2.1.5.3 进样顺序

按照表 A.2 的进样顺序测试。

表 A.2 进样顺序

测试顺序	待测溶液
1	空白（水）
2	3'-唾液酸乳糖色质谱峰鉴定溶液（A.2.1.5.1.3）
3	3'-唾液酸乳糖钠盐标准工作溶液 1、2、3 （A.2.1.5.1.1）
4	混合标准工作溶液 4、5、6（A.2.1.5.1.6）

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 次相同的混合标准工作溶液 4，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。

亲水保留色谱条件下 3'-唾液酸乳糖、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖的参考色谱图见附录 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'-唾液酸乳糖钠盐的系列标准溶液 1、2、3 中的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，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，%；

$\omega$  —— 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 中 N-乙酰神经氨酸的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，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。

$$\omega_3 = \frac{C_2 \times V_2}{m_2 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.3)$$

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）；

1000 —— 换算系数。

#### A.2.1.6.3 3'-唾液酸乳果糖含量测定

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

$$\omega_4 = \frac{C_3 \times V_3}{m_3 \times 1000 \times 1.03} \times 100\% \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

$C_3$  —— 由标准曲线得到的待测样品溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度，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'-唾液酸乳果糖的换算系数；

1000 —— 换算系数。

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

如结果低于检出限，则结果表示为  $<0.25\%$ 。

### A.2.2 高效液相色谱-电雾式检测法

#### 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）：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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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。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), 转移到适宜的容量瓶中, 用水溶解定容。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。

标准工作溶液: 吸取不同体积的 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 5 个不同浓度的

系列标准工作溶液。标准工作溶液 1、2、3、4、5 中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度依次约为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 4°C~8°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），转移到适宜的容量瓶中，用水溶解定容。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。

标准工作溶液：吸取不同体积的 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 5 个不同浓度的系列标准工作溶液。标准工作溶液 1、2、3、4、5 中 N-乙酰神经氨酸的浓度依次约为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 4°C~8°C 冰箱中保存，有效期 3 周。

#### A.2.2.5.1.3 用于 3'-唾液酸乳糖含量测定的标准溶液

3'-唾液酸乳糖含量用 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品定量。吸取不同体积的 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 5 个不同浓度的系列标准工作溶液。标准工作溶液 1、2、3、4、5 中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度依次约为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 4°C~8°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 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，振荡溶解后用水定容。吸取适量上述溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成浓度约为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的试样溶液。

测定 N-乙酰神经氨酸和 3'-唾液酸乳果糖含量的试样溶液：精确称取 500 mg（精确到 0.1 mg）试样，加入到 50 mL 的容量瓶中，加水至容量瓶刻度线约 2 cm 以下，振荡溶解后用水定容。吸取适量上述溶液，用稀释溶剂（A.2.2.2.6）配制成浓度约为 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的试样溶液。每个试样做两个平行。

#### 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：准确称取适量的 3'-唾液酸乳糖钠盐对照品，3'-唾液酸乳果糖钠盐对照品和 N-乙酰神经氨酸对照品，置于适宜的容量瓶中，用水溶解定容，配制系统适用性测试储备液。储备液中每种对照品的浓度均约为 1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ 。

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（A.2.2.2.6），配制成每种对照品浓度均约为 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 (A.2.2.2.6), 配制成每种对照品浓度均约为 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 (A.2.2.2.6), 配制成每种对照品浓度均约为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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、3'-唾液酸乳果糖与 N-乙酰神经氨酸的分离度应  $\geq 1.5$ , 且 3'-唾液酸乳糖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'-唾液酸乳糖的信噪比  $\geq 150$ ;

在此色谱条件下非挥发性  $\text{Na}^+$ 、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖、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'-唾液酸乳糖钠盐系列标准工作溶液 (A.2.2.5.1.1) 中的 3'-唾液酸乳

糖钠盐的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制过零点的二次标准曲线。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。

$$\omega_5 = \frac{C_4 \times V_4}{m_4 \times 1000} \times f \times 100\% \dots\dots\dots (A.5)$$

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，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_4$  —— 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)；

$f$  —— 稀释因子；

1000 —— 换算系数。

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，%；

$\omega$  —— 试样中水分的质量分数，%。

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

以 N-乙酰神经氨酸系列标准工作溶液的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制过零点的二次标准曲线。

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

$$\omega_7 = \frac{C_5 \times V_5}{m_5 \times 1000} \times f \times 100\% \dots \dots \dots (A.7)$$

式中：

$C_5$  —— 从标准曲线得到试样溶液中 N-乙酰神经氨酸的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_5$  —— 试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_5$  —— 试样的质量，单位为毫克 (mg)；

$f$  —— 稀释因子；

1000 —— 换算系数。

本方法的检出限为 0.28 %。

#### A.2.2.6.3 3'-唾液酸乳糖含量测定

以 3'-唾液酸乳糖钠盐系列标准工作溶液(A.2.2.5.1.3)中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制过零点的二次标准曲线。

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

$$\omega_8 = \frac{C_6 \times V_6}{m_6 \times 1000 \times 1.03} \times f \times 100\% \dots \dots \dots (A.8)$$

式中：

$C_6$  —— 从标准曲线得到试样溶液中 3'-唾液酸乳糖钠盐的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_6$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_6$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）；

$f$  —— 稀释因子；

1.03 —— 3'-唾液酸乳糖钠盐转换为 3'-唾液酸乳果糖的换算系数；

1000 —— 换算系数。

本方法的检出限为 0.11%。

### 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，在氨基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：氨基色谱柱，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℃。

A.3.1.4.4 示差折光检测器温度：40℃。

A.3.1.4.5 流速：1.1 mL/min。

A.3.1.4.6 进样量：5 μL。

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：分别准确称取三份适量的 D-乳糖对照品到适宜的容量瓶中，用水溶解定容，配制成 D-乳糖浓度约为 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 的系列标准溶液 1~3。该溶液在冰箱中 2℃~8℃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，加水至容量瓶刻度线约 2 cm 以下，振荡溶解，用水定容，配制成浓度约为 50 mg/mL 的试样溶液。每个试样做两个平行。

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 3，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：

——保留时间的相对标准偏差 $<1.0\%$ （ $n=3$ ）；

——响应值的相对标准偏差 $<2.0\%$ （ $n=3$ ）；

氨基色谱柱色谱条件下，D-乳糖的参考色谱图见附录

### B.3。

#### A.3.1.6 D-乳糖含量测定

以系列标准工作溶液中的 D-乳糖的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制过零点线性标准曲线。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  $\omega_9$  按式（A.9）计算。

$$\omega_9 = \frac{C_7 \times V_7}{m_7} \times 100\% \dots\dots\dots (A.9)$$

式中：

$C_7$  —— 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）；

$V_7$  —— 试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_7$  —— 试样的质量，单位为毫克（mg）。

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

#### A.3.2 离子色谱-脉冲安培法

##### A.3.2.1 方法提要

试样溶于水，采用离子色谱柱分离，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.3.2.2 试剂和材料

A.3.2.2.1 氢氧化钠溶液：质量分数 50%。

A.3.2.2.2 三水合乙酸钠：色谱纯。

A.3.2.2.3 氮气：纯度 >99.99%。

A.3.2.2.4 一水合 D-乳糖对照品：含量  $\geq 95.0\%$  或标明含量的等同物。

#### A.3.2.3 仪器和设备

A.3.2.3.1 离子色谱仪：配备脉冲安培检测器。

A.3.2.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

#### A.3.2.4 参考色谱条件

A.3.2.4.1 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) 或等效离子色谱柱，及其对应分离柱(250 mm  $\times$  3 mm) 或等效离子色谱柱。

A.3.2.4.2 柱温：20°C。

A.3.2.4.3 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。

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

A.3.2.4.4 流速：0.4 mL/min。

A.3.2.4.5 运行时间：30 min。

A.3.2.4.6 进样量：5.0  $\mu\text{L}$ 。

A.3.2.4.7 检测器温度：35 $^{\circ}\text{C}$ 。

A.3.2.4.8 检测器采集频率：2 Hz。

A.3.2.4.9 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.3.2.4.10 检测电极：金；参比电极：银-氯化银。

### A.3.2.5 分析步骤

#### A.3.2.5.1 淋洗液配制

淋洗液 A (水)：0.2  $\mu\text{m}$  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.3.2.2.2)，用约 500 mL 水溶解，转移至 1 L 塑料定量瓶中，用水定容。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.3.2.2.1) 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.3.2.2.1) 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.3.2.5.2 溶液配制

##### A.3.2.5.2.1 标准储备液

D-乳糖标准储备液: 称取约 10 mg 的一水合 D-乳糖对照品 (A.3.2.2.4) 至 10 mL 定量瓶中, 用适量的水溶解并定容, 配制成浓度为 1 mg/mL 的 D-乳糖标准储备液。

##### A.3.2.5.2.2 标准工作溶液

D-乳糖标准工作溶液按表 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	D-乳糖的浓度
标准工作溶液 1	吸取 100 $\mu$ L D-乳糖储备液至 10 mL 容量瓶中, 用水定容。	约为 10 $\mu$ g/mL
标准工作溶液 2	吸取 50 $\mu$ L D-乳糖储备液至 10 mL 容量瓶中, 用水定容。	约为 5 $\mu$ g/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, 用水定容。	约为 0.5 $\mu$ g/mL
标准工作溶液	吸取 1.0 mL 标准工作溶液 3	浓度为 0.05 $\mu$ g/mL

溶液 4	至 10 mL 容量瓶中，用水定容。	
------	--------------------	--

### A.3.2.5.2.3 试样溶液

#### A.3.2.5.2.3.1 试样储备液

称取约 10 mg 试样于 10 mL 容量瓶中，用适量水溶解并定容。每个试样做两个平行。

#### A.3.2.5.2.3.2 D-乳糖含量测定用试样溶液

吸取 0.5 mL 试样储备液于 10 mL 定量瓶中，用水定容。

### A.3.2.5.3 测定

按照表 A.6 的进样序列顺序测定试样溶液中 D-乳糖含量。根据标准工作溶液的保留时间定性，色谱图参见附录 B.4。以标准工作溶液中 D-乳糖的浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制过零点的线性标准曲线；根据标准曲线计算试样中 D-乳糖的含量。

表 A.6 进样顺序

进样顺序	待测溶液
1	空白（水）
2	标准工作溶液 4、3、2、1
3	D-乳糖含量测定用试样溶液（A.3.2.5.2.3.2）

注 1：空白至少进样两次，其余溶液进样一次。

注 2：连续测定 10 个试样溶液后重复步骤 2，重新绘制标准

曲线。

#### A.3.2.5.4 系统适用性

D-乳糖标准曲线的相关系数应 $\geq 0.999$ 。

#### A.3.2.6 计算

D-乳糖含量的质量分数 $\omega_{10}$ 按式(A.10)计算。

$$\omega_{10} = \frac{C_8 \times V_8 \times 20}{m_8 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (A.10)$$

式中：

$C_8$  —— 由标准曲线得到的试样溶液中 D-乳糖的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_8$  —— 试样储备液的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_8$  —— 试样的质量，单位毫克 (mg)；

20 —— 稀释倍数；

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。D-乳糖检测的检出限为 0.03%。若结果低于检出限，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 试剂和材料

A.4.2.1 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 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 牛血清白蛋白标准储备液

称取 20 mg 牛血清白蛋白对照品 (A.4.2.1) 于 10 mL 容量瓶中，用水溶解、混匀并定容。

##### A.4.4.2 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.4.4.1)于 10 mL 容量瓶中，用水溶解、混匀并定容。

##### A.4.4.3 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。

##### A.4.4.4 牛血清白蛋白标准工作溶液

按表 A.7 制备牛血清白蛋白标准工作溶液。

表 A.7 空白溶液和牛血清白蛋白标准工作溶液

	蛋白浓度 (mg/L)	水 ( $\mu\text{L}$ )	BSA 标 准溶液 ( $\mu\text{L}$ )	考马斯亮 蓝试剂 ( $\mu\text{L}$ )
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 标准工作溶液 1	1	750	50	200
牛血清白蛋白 标准工作溶液 2	2	700	100	200
牛血清白蛋白 标准工作溶液 4	4	600	200	200
牛血清白蛋白 标准工作溶液 6	6	500	300	200

#### A.4.4.5 试样待测溶液

吸取试样溶液 600  $\mu\text{L}$  (A.4.4.3) 于比色皿中, 加入 200  $\mu\text{L}$  牛血清白蛋白标准溶液 (A.4.4.2) 及 200  $\mu\text{L}$  考马斯亮蓝试剂 (A.4.2.2)。

#### A.4.4.6 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.4.5 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.1。样品中蛋白含量  $\omega_{11}$  按式 (A.11) 计算。

$$\omega_{11} = \frac{(C_9 - C_{cal4}) \times V_9}{0.6 \times m_9} \times f \times 1000 \dots \dots \dots (A.11)$$

式中：

$C_9$  —— 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 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V_9$  —— 试样溶液的定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m_9$  —— 试样的质量，单位为毫克 (mg)；

$f$  —— 试样溶液稀释倍数 (如适用)；

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。

附录 B 3'-唾液酸乳糖、3'-唾液酸乳果糖、N-乙酰神经氨酸  
和 D-乳糖对照品参考色谱图

B.1 液相色谱-紫外检测器条件下 3'-唾液酸乳糖、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品参考色谱图

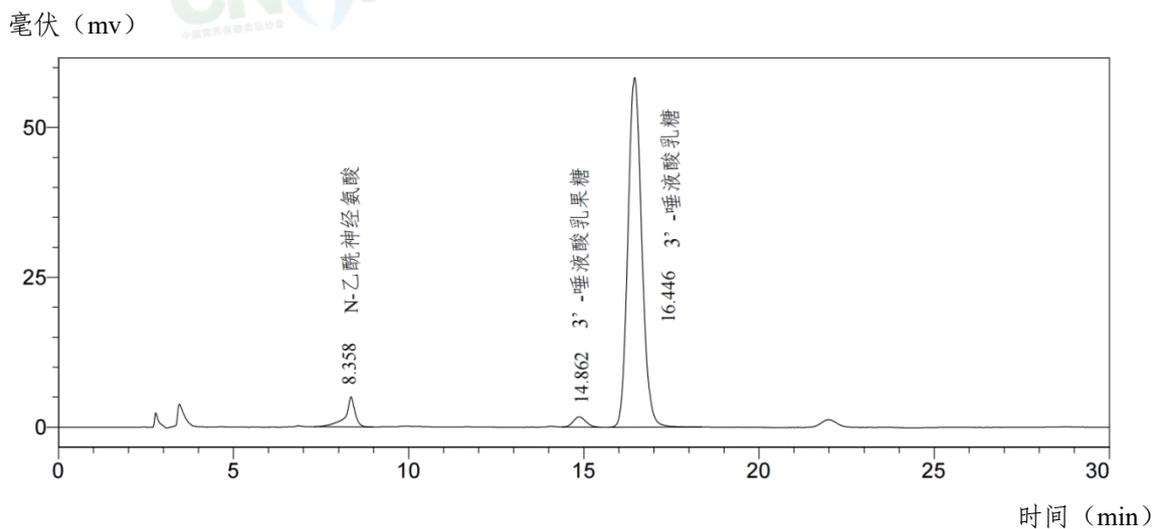


图 B.1 液相色谱-紫外检测器条件下 3'-唾液酸乳糖、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖对照品参考色谱图

表 B.1 液相色谱-紫外检测器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	16.5

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

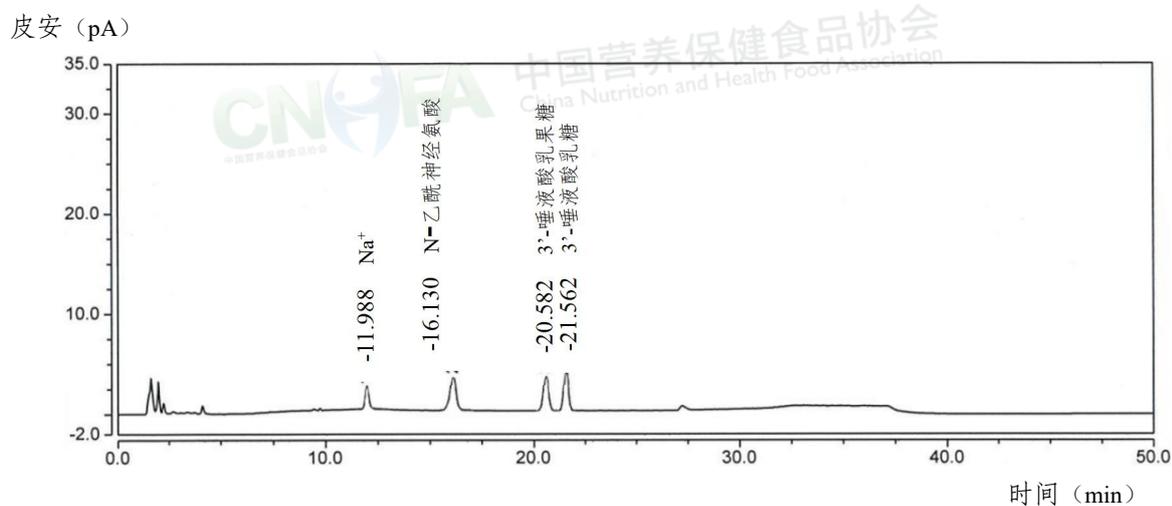


图 B.2 液相色谱-电雾式检测器条件下  $\text{Na}^+$ 、N-乙酰神经氨酸、3'-唾液酸乳果糖和 3'-唾液酸乳糖对照品的参考色谱图

表 B.2 液相色谱-电雾式检测器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 液相色谱-示差检测器条件下 D-乳糖对照品参考色谱图

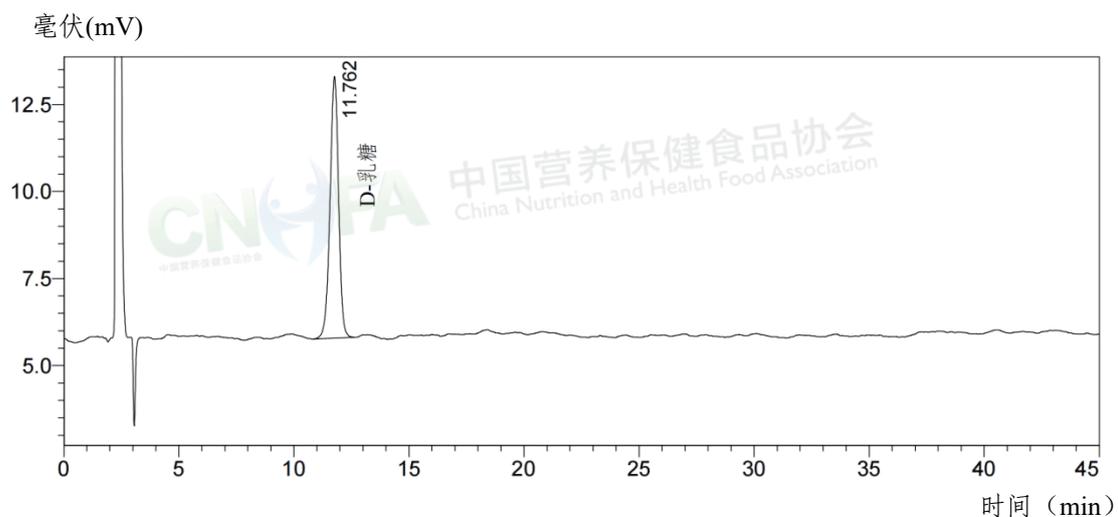


图 B.3 液相色谱-示差检测器条件下  
D-乳糖对照品参考色谱图

表 B.3 液相色谱-示差检测器条件下 D-乳糖参考保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-乳糖	11.8

## B.4 离子色谱-脉冲安培检测器条件下 D-乳糖对照品参考色谱图

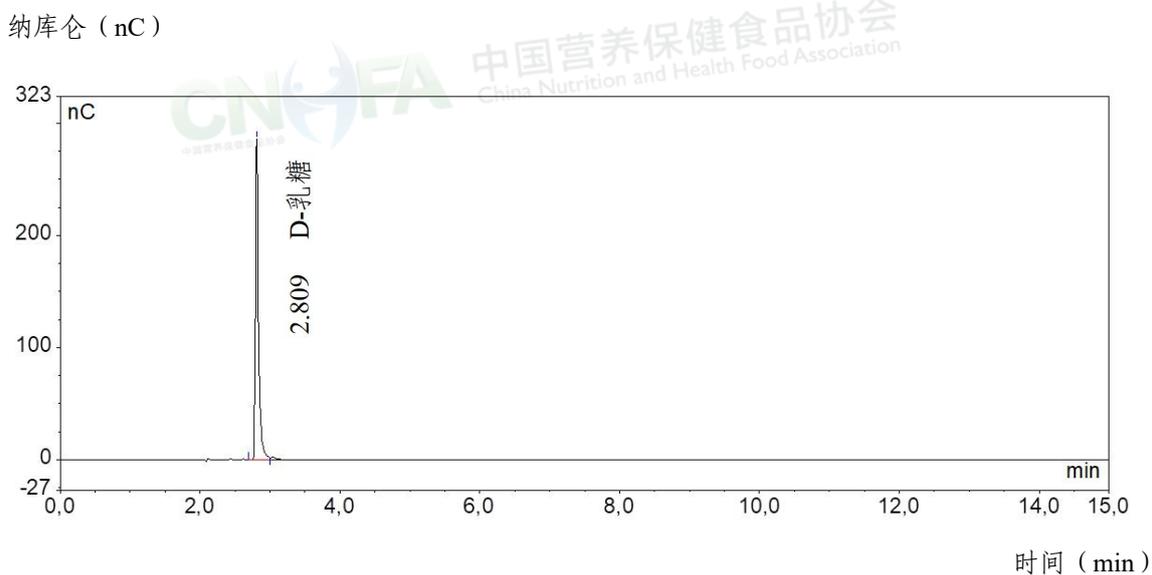


图 B.4 离子色谱-脉冲安培检测器条件下  
D-乳糖对照品参考色谱图

表 B.4 离子色谱-脉冲安培检测器条件下各物质参考  
保留时间

化合物	保留时间 (min)
D-乳糖	2.8

## 附录 C 残留蛋白含量测定的参考标准曲线

### C.1 考马斯亮蓝直接测定法参考标准曲线

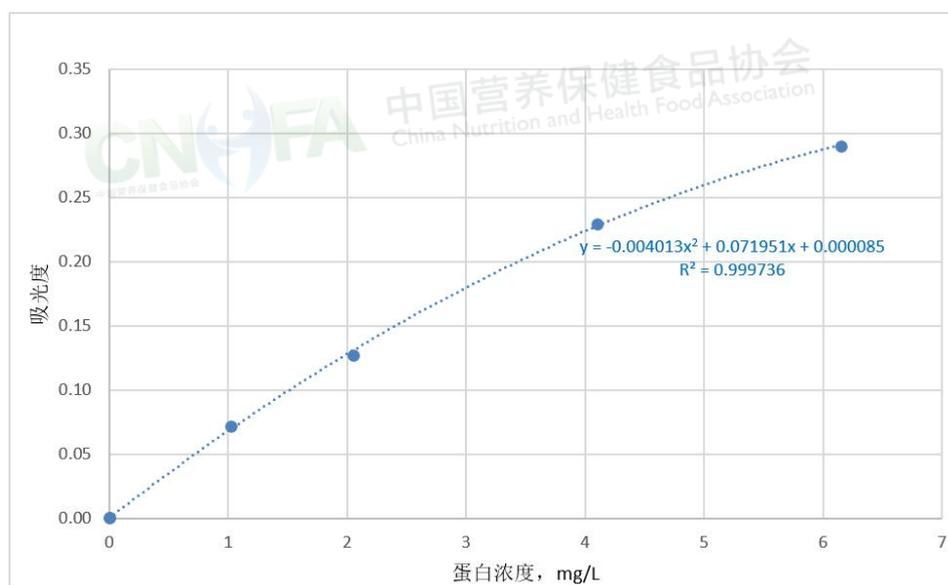


图 C.1 考马斯亮蓝直接测定法参考标准曲线

## 二、增补质量规格要求的食品添加剂大茴香脑（合成法）

### 1. 感官要求

1.1 色泽、状态：将试样置于一洁净白纸上或比色管内，用目测法观察。

1.2 香气按 GB/T 14454.2 规定的方法执行。

### 2. 理化指标

2.1 反式大茴香脑含量、顺式大茴香脑含量按附录 A 规定的方法执行。

2.2 折光指数按 GB/T 14454.4 规定的方法执行。

2.3 相对密度按 GB/T 11540 规定的方法执行。

2.4 溶解度按 GB/T 14455.3 规定的方法执行。

## 附录 A 大茴香脑含量的测定

### A.1 仪器和设备

A.1.1 色谱仪：按照 GB/T 11538—2006 中第 5 章规定。

A.1.2 色谱柱：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：按照 GB/T 11538—2006 中 10.4 条规定测定大茴香脑含量。

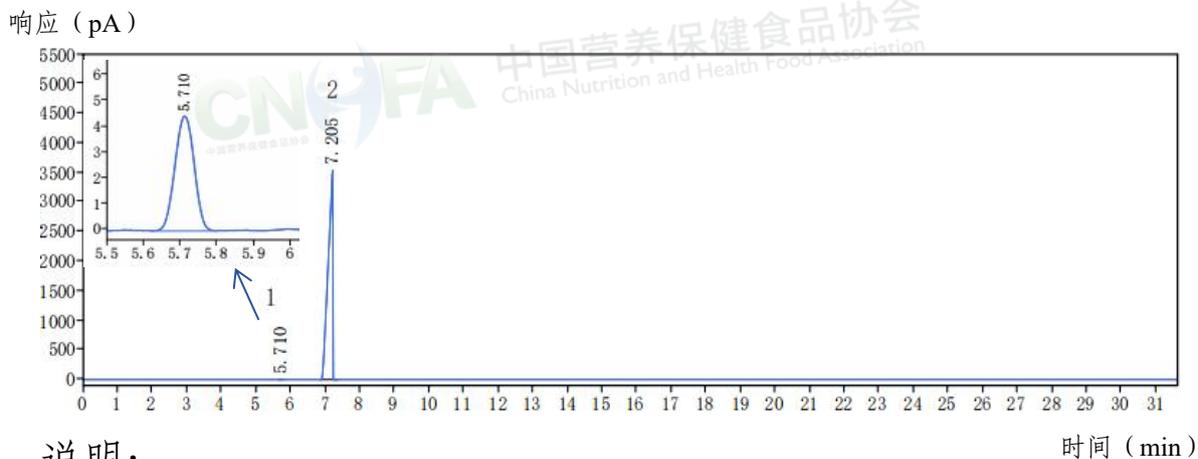
### A.3 重复性及结果表示

按照 GB/T 11538—2006 中 11.4 条规定。

食品添加剂大茴香脑气相色谱图(面积归一化法)参见附录 B。

## 附录 B 食品添加剂大茴香脑气相色谱图

B.1 食品添加剂大茴香脑气相色谱图见图B.1。



说明:

- 1——顺式大茴香脑;
- 2——反式大茴香脑。

图 B.1 食品添加剂大茴香脑气相色谱图

### B.2 操作条件

B.2.1 色谱柱: 毛细管柱, 30 m×0.25 mm。

B.2.2 固定相: 聚乙二醇。

B.2.3 膜厚: 0.25 μm。

B.2.4 色谱炉温度: 150°C恒温8 min, 以20°C/min升温至230°C恒温20 min (共计32 min)。

B.2.5 进样口温度: 230°C。

B.2.6 检测器温度: 230°C。

B.2.7 检测器: 氢火焰离子化检测器。

B.2.8 载气: 氮气。

B.2.9 载气流量: 1 mL/min。

B.2.10 进样量：0.2  $\mu\text{L}$ 。

B.2.11 分流比：100:1。

