

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/CNHFA

团 体 标 准



中国营养保健食品协会  
China Nutrition and Health Food Association

T/CNHFA XXXX—XXXX

# 二十二碳六烯酸油脂粉

Docosahexaenoic acid oil powder

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会 发 布



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由东北农业大学提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：东北农业大学、中国营养保健食品协会。

本文件主要起草人：赵倩玉、姜毓君、张微。



# 二十二碳六烯酸油脂粉质量规范

## 1 范围

本文件规定了婴幼儿配方乳粉用DHA油脂粉的要求、检验规则、限量和标签、包装、运输、贮存，同时描述了相应的检测方法，界定了相关的术语和定义。

本文件适用于以二十二碳六烯酸油脂粉为原料，添加其他食品原料和食品添加剂等辅料，加工制成的二十二碳六烯酸油脂粉的生产和检验。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准  
GB 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量  
GB 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量  
GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则  
GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定  
GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数  
GB 5009.227-2023 食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定  
GB 5009.229 食品安全国家标准 食品中酸价的测定  
GB 5009.230 食品安全国家标准 食品中羰基价的测定  
GB 4789.18 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品检验  
GB/T 5413.2 婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定  
GB/T 24304 动植物油脂 茴香胺值的测定  
GB/T 25225-2010 动植物油脂 挥发性有机污染物的测定 气相色谱-质谱法  
GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则  
GB 10765 食品安全国家标准 婴儿配方食品  
GB 10766 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品  
GB 12693 食品安全国家标准 乳制品良好生产规范  
GB 14880 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准  
GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范  
GB 26687-2011 食品安全国家标准 复配食品添加剂通则  
GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则  
GB 1903.26-2022 食品安全国家标准 食品营养强化剂 二十二碳六烯酸油脂（金枪鱼油）  
GB 1903.66-2024 食品安全国家标准 食品营养强化剂 二十二碳六烯酸油脂（发酵法）  
QB/T 5631-2021 花生四烯酸油脂粉  
QB/T 5632-2021 二十二碳六烯酸油脂粉  
T/WSJD 57-2024 食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的测定

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 定义

二十二碳六烯酸（DHA）油脂粉：是以DHA油脂为主要原料，酪蛋白酸钠、麦芽糊精、辛烯基琥珀酸淀粉钠、阿拉伯胶等为壁材制成的油脂粉。作为婴幼儿配方乳粉的原料使用。

### 3.2 分类

按照原料使用的不同，分为DHA油脂粉（发酵法）和DHA油脂粉（金枪鱼油）

#### 3.2.1 DHA 油脂粉（发酵法）

是以裂壶藻（*Schizochytrium* sp.）或者吾肯氏壶藻（*Ulkenia amoeboida*）或者寇氏隐甲藻（*Cryptocodinium cohnii*）菌种，经生物发酵制得的油脂为主要原料，酪蛋白酸钠、麦芽糊精、辛烯基琥珀酸淀粉钠、阿拉伯胶等为壁材制成的DHA油脂粉。作为婴幼儿配方乳粉的原料使用。

#### 3.2.2 DHA 油脂粉（金枪鱼油）

是以金枪鱼为原料，经加热、分离、精制、提纯等工艺制成的二十二碳六烯酸油脂为主要原料，酪蛋白酸钠、麦芽糊精、辛烯基琥珀酸淀粉钠、阿拉伯胶等为壁材制成的DHA油脂粉。作为婴幼儿配方乳粉的原料使用。

## 4 技术要求

### 4.1 原料要求

- 4.1.1 产品中所使用的原料应符合相应的食品安全国家标准和（或）相关规定，不应使用可能危害婴幼儿健康的物质。
- 4.1.2 不应添加食盐。
- 4.1.3 不应使用氢化油脂。
- 4.1.4 不应使用经辐照处理过的原料。
- 4.1.5 根据 GB 10765、GB 10766，婴儿的配方食品不应使用果糖和蔗糖作为碳水化合物的来源，可适当添加葡萄糖聚合物（其中淀粉经预糊化后才可加入），对乳基配方食品，碳水化合物的来源应首选乳糖（乳糖占碳水化合物含量应 $\geq 90\%$ ）。

### 4.2 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                            |
|-------|-------------------------------|
| 滋味和气味 | 具有淡油脂粉气味，无特殊异味                |
| 组织状态  | 干燥粉末状，无粘连、结块、潮解和杂质现象，具有较好流动性  |
| 色泽    | 呈均匀一致白色或淡黄色粉末                 |
| 溶解性   | 25-45℃，完全均匀分散在水中，形成稳定乳状液，无沉淀物 |

### 4.3 理化指标

应符合表2的规定。

表2 理化指标

| 项目              | 指标         |
|-----------------|------------|
| DHA 含量（甘油三酯计）/% | $\geq 35$  |
| 水分/%            | $\leq 5.0$ |
| 灰分/%            | $\leq 5.0$ |

|                    |   |      |
|--------------------|---|------|
| 表面油 g/100g         | ≡ | 0.50 |
| 过氧化值 meq/kg        | ≡ | 4.7  |
| 茴香胺值               | ≡ | 5    |
| 丙二醛 nmol/g         | ≡ | 20   |
| 丙醛 μg/g            | ≡ | 0.3  |
| 戊醛 μg/g            | ≡ | 0.14 |
| 己醛 μg/g            | ≡ | 0.14 |
| 铅（以 Pb 计）/(mg/kg)  | ≡ | 0.08 |
| 总砷（以 As 计）/(mg/kg) | ≡ | 0.1  |
| 呕吐毒素/（μg/kg）       | ≡ | 0.4  |

4.4 微生物指标  
应符合表3的规定。

表3 微生物指标

| 项目           | 指标   |
|--------------|------|
| 菌落总数/(CFU/g) | 3000 |
| 大肠菌群/(CFU/g) | 10   |
| 霉菌/(CFU/g)   | 50   |
| 沙门氏菌/25g     | 不应检出 |
| 蜡样芽孢杆菌/25g   | 不应检出 |
| 金黄色葡萄球菌/25g  | 不应检出 |

5 实验方法

- 5.1 感官  
按照QB/T 5632-2021规定的方法测定。
- 5.2 含量  
按GB 5009.168规定的方法测定。
- 5.3 水分  
按GB 5009.3规定的方法测定。
- 5.4 灰分  
按GB 5009.4规定的方法测定。
- 5.5 表面油  
按QB/T 5631-2021规定的方法测定。
- 5.6 过氧化值  
按GB 5009.227-2023规定的方法测定。
- 5.7 茴香胺值  
测定茴香胺值的方法基于GB/T 24304-2009，见附录A。
- 5.8 丙二醛值  
按照格锐思生物丙二醛含量试剂盒说明书测定油脂粉中的丙二醛含量。
- 5.9 挥发性物质丙醛、戊醛、己醛  
按GB/T 25225-2010规定的方法测定。
- 5.10 铅含量  
按GB 5009.12规定的方法测定。
- 5.11 总砷含量  
按GB 5009.11规定的方法测定。
- 5.12 呕吐毒素

按T/WSJD 57-2024规定的方法测定。

5.13 菌落总数

按GB 4789.2规定的方法测定。

5.14 大肠菌群

按GB 4789.3规定的方法测定。

5.15 霉菌

按GB4789.15规定的方法测定。

5.16 沙门氏菌

按GB 4789.4规定的方法测定。

6 标签、包装、运输、贮存

6.1 标签

6.1.1 产品标签应符合 GB 7718、GB 28050 的规定。

6.1.2 有关产品使用（包括推荐食用量）、配制指导说明及图解宜在标签上明确说明。当包装最大表面积小于 100 cm<sup>2</sup>或产品质量小于 100 g 时，可以不标示图解。

6.2 包装

6.2.1 包装材料和容器应符合相关标准和公告的规定，可使用符合食品安全国家标准的二氧化碳和（或）氮气作为包装介质。

6.2.2 包装应完整、紧密、无破损。

6.3 运输

6.3.1 运输工具及车辆应符合卫生要求，不应与有毒、有污染的物品混装、混运。

6.3.2 装卸时应轻搬轻放、平面堆放、防止倾倒、重压，防止包装破碎和产品变形。

6.4 贮存

6.4.1 产品应存放于清洁、干燥、通风、避光的场所，有防尘、防火、防虫、防鼠等设施。

6.4.2 产品不应接触墙面或地面，堆放高度以提取方便为宜。

6.4.3 产品建议于低温条件下储存、运输。

## 附 录 A

(资料性)

### 婴幼儿配方乳粉用油脂粉茴香胺值的测定方法

#### A.1 测试样品的制备

称取1g油脂粉样品，精确到1 mg，置于50 mL离心管中，加入20 mL异辛烷，200 W冰浴超声1h（超声仪器的工作频率为40 KHz），经过滤，将滤液转移到25 mL容量瓶中，再用异辛烷洗涤过滤物（2 mL × 2次），滤液转移到容量瓶，最终用异辛烷稀释至刻度。

注：超声环节一定严格控制温度。冰浴超声：在超声容器中加入足量冰袋，以形成冰浴环境，保证温度在10-15℃的低温环境。

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/CNHFA

## 团 体 标 准



T/XXX XXXX—XXXX

# 基于核酸等温扩增的特殊食品中致病微生物检测方法

Detection methods for pathogenic microorganisms in special foods based on isothermal amplification of nucleic acids

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会 发 布



## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件由东北农业大学提出。

本文件起草单位：东北农业大学，中国营养保健食品协会。

本文件主要起草人：姜毓君、张现龙、张微、杨鑫焱、成学冰、邱满艳。



# 基于核酸等温扩增的特殊食品中致病微生物检测方法

## 1 范围

本文件规定了基于核酸等温扩增技术检测特殊食品中致病微生物的术语和定义、实验室基本要求、样品采集与处理、检测方法、结果判定、质量控制、生物安全与废弃物处理及记录与报告等要求。

本文件适用于特殊医学用途配方食品、婴幼儿配方食品、保健食品等特殊食品中沙门氏菌（*Salmonella*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）、阪崎克罗诺杆菌（*Cronobacter sakazakii*）的定性检测。其他特殊食品中致病微生物的检测可参照本文件执行。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

GB 4789.40 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB 5009.295 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 特殊食品

指根据《中华人民共和国食品安全法》规定，包括特殊医学用途配方食品、婴幼儿配方食品和保健食品在内的，具有特定营养功能或针对特定人群的食品。

### 3.2 核酸等温扩增技术

核酸等温扩增技术是一种在特定恒定温度下进行的核酸扩增方法，通过特定的酶和引物设计，实现了在恒定温度下对目标核酸序列的快速扩增。包括环介导等温扩增（LAMP）、重组酶聚合酶扩增（RPA）等技术类型。

### 3.3 质控菌株

由微生物菌种保藏专门机构或专业权威机构提供的,可溯源的标准菌株,包括用于验证检测体系有效性的阳性对照菌株和监测污染的阴性对照菌株。

### 3.4 检出限

在规定的检测条件下,目标致病微生物在检出限水平的检出概率不低于 95%时的最低浓度或数量,以菌落形成单位(CFU)/mL 或 CFU/g 表示。

## 4 技术概要(方法原理)

首先对特殊食品样品进行增菌培养并提取混合基因组 DNA。针对沙门氏菌属特有的 *stx*A 基因、阪崎克罗诺杆菌的 *ompA* 基因、大肠杆菌保守的 *uidA* 基因(或其他特异性致病基因),以及金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因,分别设计两对特异性 LAMP 引物(内引物 FIP/BIP 和外引物 F3/B3),每对引物均可识别靶序列上的六个独立区域,以确保扩增的高度特异性。将提取的 DNA 模板与上述引物混合后,于 62 ℃ 恒温条件下进行多重 LAMP 扩增反应,实现对样本中四种微量靶 DNA 的高效富集。扩增结束后,将反应产物与 CRISPR/Cas12a 检测体系混合,该体系包含针对上述四种靶基因分别设计并筛选的特异性 crRNA,以及荧光报告探针(ssDNA-FQ)。当沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、大肠杆菌或金黄色葡萄球菌存在时,Cas12a 在 crRNA 的引导下与靶 DNA 特异性结合,Cas12a 的反式切割活性被激活,从而无差别地切割系统中的单链 DNA(包括 ssDNA-FQ),使荧光基团与淬灭基团分离,引发荧光信号显著增强。相反,若不存在相应靶标,Cas12a 的反式切割活性无法激活,ssDNA-FQ 探针保持完整,荧光信号也不会表现增强趋势。该方法的检测结果可通过荧光酶标仪或便携式荧光检测器直接读取荧光定量值,也可借助图像分析软件将采集到的荧光图像转换为灰度值进行半定量估算,从而实现对特殊食品中沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的快速、灵敏及可视化检测。

## 5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中相关规定。

### 5.1 引物和探针序列

金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌和阪崎克罗诺杆菌扩增引物的名称与序列详见表 1。

表 1 试验用引物

| 致病菌名称   | 靶基因         | 引物名称             | 引物序列 (5'-3')                                                 |
|---------|-------------|------------------|--------------------------------------------------------------|
| 金黄色葡萄球菌 | <i>nuc</i>  | <i>nuc</i> -F3   | TTATTAAGTGCTGGCATATGTATGG                                    |
|         |             | <i>nuc</i> -B3   | CGTATCACCATCAATCGCTTTA                                       |
|         |             | <i>nuc</i> -FIP  | TAGCGAAATAAGAAAAACCTCTTTGCAAAATTTCAATATT<br>ACTTATAGGGATGGCT |
|         |             | <i>nuc</i> -BIP  | GCATCACAAACAGATAACGGCGTTTTTGTAAATTTTTTAGT<br>TGAAGTTGCACT    |
|         |             | <i>nuc</i> -LF   | TATTGCCCTTTCGAAACATTACTGAT                                   |
|         |             | <i>nuc</i> -LB   | AATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAA                                    |
| 沙门氏菌    | <i>InvA</i> | <i>InvA</i> -F3  | GACCTGAATTACTGATTCTGGT                                       |
|         |             | <i>InvA</i> -B3  | ATCGGCTTCAATCAAGATAAGA                                       |
|         |             | <i>InvA</i> -FIP | AACACCAATATCGCCAGTACGATCGTCATTCCATTACCTA<br>CCTA             |
|         |             | <i>InvA</i> -BIP | TTTCAACGTTTCCTGCGGTACTACTGGTACTGATCGATAA<br>TGC              |
|         |             | <i>InvA</i> -LF  | TGCGATCAGGAAATCAACCA                                         |
|         |             | <i>InvA</i> -LB  | ACCACGCTCTTTCGTCTG                                           |
| 大肠杆菌    | <i>fecA</i> | <i>fecA</i> -F3  | ACGACGTATTTGAACATGCTGG                                       |
|         |             | <i>fecA</i> -B3  | CGGGGATGCCGTCCAT                                             |
|         |             | <i>fecA</i> -FIP | CCTCACGCATGGTGGTTGCTTTTGTGACGTGATCCGCCGT<br>G                |
|         |             | <i>fecA</i> -BIP | CTTAACCGCATCCCTGGCGTTTTAAAGTTCATCGCCAGGT<br>CG               |
|         |             | <i>fecA</i> -LF  | CGGTTTTGGCGAAATCCT                                           |
|         |             | <i>fecA</i> -LB  | GCGCCGGAAAACAACG                                             |
| 阪崎克罗诺杆菌 | <i>ompA</i> | <i>ompA</i> -F3  | GGCATTATCAGCAAGCTCGA                                         |
|         |             | <i>ompA</i> -B3  | ACCACCAGATCCATCAGGAT                                         |
|         |             | <i>ompA</i> -FIP | AGCCATTGTCGTCCATTGGCGCTGCAACAGCTTGGCATC<br>A                 |
|         |             | <i>ompA</i> -BIP | TACGACGATATCGCCGCGGAGATAGATATCACGCGCCTTC<br>G                |
|         |             | <i>ompA</i> -LF  | TAGACCGGCGAGAGCCA                                            |

T/XXX XXXX—XXXX

|  |  |                 |                          |
|--|--|-----------------|--------------------------|
|  |  | <i>ompA</i> -LB | CGGAAATGGAACAGCTGATCCAGG |
|--|--|-----------------|--------------------------|

### 5.2 噬菌体的名称和菌株编号

金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌和阪崎克罗诺杆菌噬菌体的名称与菌株编号详见表 2。

表 2 试验用噬菌体

| 名称         | 菌株编号         |
|------------|--------------|
| 金黄色葡萄球菌噬菌体 | SHMCC D24622 |
| 鼠伤寒沙门氏菌噬菌体 | SHMCC D24621 |
| 大肠杆菌噬菌体 T2 | SHMCC D24695 |
| 阪崎克罗诺杆菌噬菌体 | JK004        |

### 5.3 试剂和材料

表 3 试剂和材料

| 试剂名称                 | 厂家                  |
|----------------------|---------------------|
| dNTP                 | New England Biolabs |
| MgSO <sub>4</sub>    | New England Biolabs |
| <i>Bst</i> DNA 聚合酶   | New England Biolabs |
| 甜菜碱                  | 索莱宝                 |
| 10×LAMP buffer       | 苏州近岸蛋白              |
| 离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒  | 北京天根生化              |
| N-羟基琥珀酰亚胺            | 上海麦克林生化科技股份有限公司     |
| 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 | 上海麦克林生化科技股份有限公司     |
| 牛血清白蛋白               | 上海源叶生物科技有限公司        |
| MES 缓冲液              | 上海源叶生物科技有限公司        |
| PBS 缓冲片              | 北京索莱宝科技有限公司         |
| 磁珠                   | Hesimo 新材料          |

## 6 仪器设备

6.1 高速台式离心机：离心力≥12 000 g。

6.2 微量移液器：100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ ，0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 。

6.3 水浴锅或加热模块：65  $^{\circ}\text{C}$  $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 和 100  $^{\circ}\text{C}$  $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.4 计时器。

6.5 酶标仪

6.6 生物安全柜：AII 型。

6.7 厌氧培养系统。

6.8 恒温培养箱：36 $^{\circ}\text{C}$ +1 $^{\circ}\text{C}$ ，42 +1 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.9 高压灭菌器。

6.10 细菌培养用仪器：见 GB 4789.4、GB 4789.10 和 GB 4789.40。

## 7 检验程序

特殊食品中中沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 LAMP-CRISPR/Cas12a-FQ 检验程序见图 1。

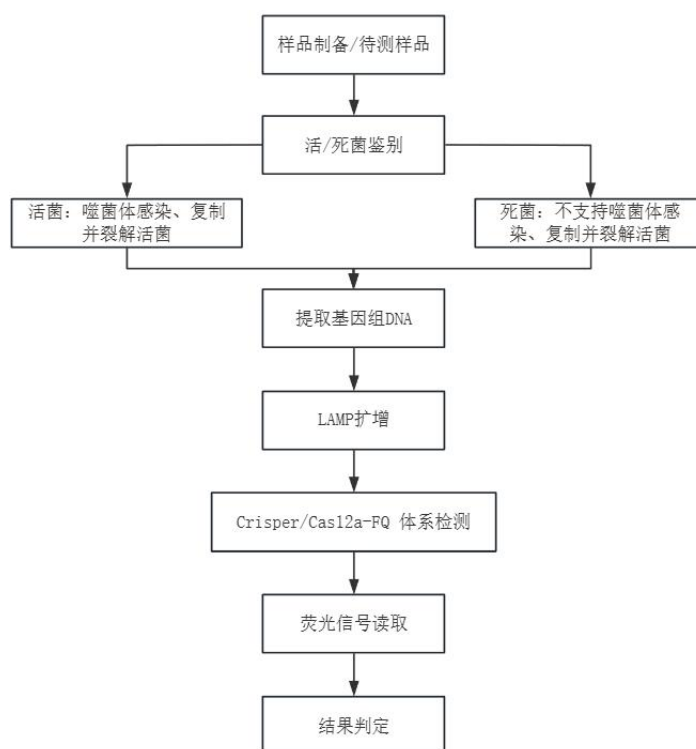


图 1 特殊食品中中沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 LAMP-CRISPR/Cas12a-FQ 检测程序图

## 8 操作步骤

### 8.1 样品制备和增菌培养

#### 8.1.1 样品准备

无菌操作开启样品包装。取样前将粉状样品充分混匀。称取 25 g 检样，缓缓加入装有 225 mL 无菌

缓冲蛋白胨水或其他经验证适用稀释液的无菌容器中，制备 1:10 样品匀液。对于粉状配方食品，可将稀释液预热至 41 °C ~ 45 °C，以利于样品复溶。样品加入后应避免剧烈振荡，待粉体充分润湿后再轻柔混匀，使其充分溶解和分散。

### 8.1.2 增菌培养

按照 GB 4789.10、GB 4789.4、GB 4789.38 和 GB 4789.40 的方法进行样品制备和增菌。

## 8.2 目标菌富集

### 8.2.1 磁珠@噬菌体的制备

取 100  $\mu$ L 磁珠置于无菌离心管中。将磁珠进行低功率超声分散，超声 30 ~ 60 s，使磁珠完全分散且无明显沉降或团聚。将离心管置于磁力架上磁分离约 3 min，待磁珠完全聚集后弃去上清液。加入 3 mL MES 溶液（50 mM，pH 6.0）洗涤三次，充分重悬磁珠，再次磁分离并弃去上清液。随后加入 200  $\mu$ L EDC（浓度为 20 mg/mL），再加入 200  $\mu$ L NHS（20 mg/mL）后，在管式旋转器上于 25 °C 垂直混合 1 小时以活化羧基。将活化的磁珠用 PBS（100 mM，pH 7.4）洗涤三次以去除过量的 NHS 和 EDC，随后用 PBS（100 mM，pH 7.0）重新悬浮。向羧基化磁珠中，加入 125  $\mu$ L 滴度为  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL 的宿主菌噬菌体，在 25 °C 下混合偶联 3 h。偶联结束后，将离心管置于磁力架上磁分离 3 min，弃去含未结合噬菌体的上清液。

向偶联后的磁珠沉淀中加入 1.5 mL 含 3% BSA 的 100 mM PBS，充分重悬，将反应体系置于 37 °C 条件下孵育 1 h，以封闭磁珠表面剩余的活性位点。封闭完成后磁分离 3 min，弃去封闭液。加入 PBS（100 mM，pH 7.4）重悬磁珠，磁分离并弃去上清液，重复清洗 3 次。最后将制备的磁珠@噬菌体重悬于 1 mL 含 0.1% BSA 的 100 mM PBS 中，置于 4 °C 保存。

### 8.2.2 磁珠@噬菌体捕获目标菌

向 1.0 mL 样品液中加入 200  $\mu$ g 磁珠@噬菌体，轻柔吹打混匀。将离心管置于恒温旋转混匀仪，在 37 °C 条件下轻柔旋转孵育 30 min，使磁珠表面的噬菌体与目标菌充分结合。

### 8.2.3 磁性分离与洗涤

捕获完成后，将离心管置于磁力架上磁分离 3 min。待磁性颗粒完全聚集后，吸取上清液。将离心管从磁力架上取下，加入 1.0 mL 无菌 PBS（100 mM，pH 7.4），采用轻柔吹打或低速颠倒方式重悬磁珠—细菌复合物。再次置于磁力架上分离 3 min，并弃去洗涤液。重复洗涤 1 次。最后将磁性沉淀重悬于 200  $\mu$ L 预温至 37 °C 的营养肉汤。

## 8.3 噬菌体介导裂解

将重悬后的磁珠@噬菌体—细菌复合物置于 37 °C 恒温条件下静置孵育，使磁珠表面的裂解性噬菌

体完成感染、复制并裂解活菌。

8.4 样品 DNA 的提取

裂解结束后，去除磁珠、细胞碎片和不溶性杂质，收集上清作为后续核酸扩增模板。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 DNA。如不能及时检验，提取的 DNA 溶液可于-20℃保存。

8.5 LAMP 反应体系

金黄色葡萄球菌 LAMP 反应体系、沙门氏菌 LAMP 反应体系、大肠杆菌 LAMP 反应体系和阪崎克罗诺杆菌 LAMP 反应体系见附录 A。

8.6 LAMP 反应过程

- 8.6.1 按表 2 所述配制反应体系。
- 8.6.2 65℃扩增 45 min，随后于 80℃ 孵育 2 分钟以终止反应。
- 8.6.3 空白对照、阴性对照和阳性对照设置。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。分别采用金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌和阪崎克罗诺杆菌 DNA 模板作阳性对照，用非目标菌的 DNA 模板作阴性对照，用等体积的无菌水代替模板 DNA 作空白对照。

8.7 CRISPR/Cas12a-FQ 荧光检测

8.7.1 crRNA 的设计与筛选

针对 8.4.1 中各靶基因 LAMP 扩增产物核心区域，使用 CRISPROR (<https://crispor.gi.ucsc.edu/>) 等在线工具设计候选 crRNA 序列。crRNA 格式为：5’ -UAAUUUCUACUAGUGUAGAU-3’ + 靶向序列（20~23 nt），确保靶序列下游存在 PAM 位点（TTTN）。合成经 HPLC 纯化的 crRNA，于-20 ℃保存备用。通过荧光强度比较筛选引导效果最佳的 crRNA 用于后续实验。

8.7.2 CRISPR/Cas12a 检测体系配制

将 8.6 所得 LAMP 扩增产物（建议稀释 10~100 倍后使用）作为 CRISPR 检测的靶 DNA。CRISPR/Cas12a-FQ 荧光检测体系（总体积 20 μL）配制见表 4。

表 4 CRISPR/Cas12a-FQ 荧光检测体系表

| 组分               | 工作液浓度      | 加样量（μL） | 反应体系终浓度    |
|------------------|------------|---------|------------|
| 10× Cas12a 反应缓冲液 | 10×        | 2       | 1×         |
| Cas12a 蛋白        | 3 μmol/L   | 1       | 150 nmol/L |
| crRNA（混合）        | 400 nmol/L | 2       | 40 nmol/L  |
| ssDNA-FQ 报告探针    | 10 μmol/L  | 1       | 500 nmol/L |
| LAMP 扩增产物（稀释后）   | —          | 2       | —          |

|              |   |        |   |
|--------------|---|--------|---|
| RNase-free 水 | — | 补齐至 20 | — |
|--------------|---|--------|---|

注：多重检测时，将针对四种靶标的 crRNA 按等摩尔比混合后一并加入体系，总体积不变。

### 8.5.3 反应条件

将配制好的反应体系混匀，瞬时离心后于 37 °C 恒温反应 40 min。反应结束后，立即置于冰上终止反应，或于 95 °C 加热 5 min 使酶失活。

### 8.5.4 荧光信号读取

使用荧光酶标仪或便携式荧光检测器进行检测，设置激发波长 470 nm，发射波长 490~650 nm( FAM 通道)，采集终点荧光强度值。每组实验设置 3 次重复，取平均值。

## 8.6 结果判定

### 8.6.1 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

- a) 空白对照：荧光信号无显著增强（维持在背景水平）；
- b) 阴性对照：荧光信号无显著增强；
- c) 阳性对照：荧光信号显著增强（ $\Delta F \geq$  阴性对照均值 + 3 倍标准差）。

### 8.6.2 结果判定

以荧光强度值（ $\Delta F =$  实验组荧光强度 - 空白对照荧光强度）进行结果判定：

阳性：实验组荧光强度显著高于阴性对照阈值（ $\Delta F \geq$  阴性对照均值 + 3 倍标准差），表明检出相应致病菌靶基因。

阴性：实验组荧光强度与阴性对照无显著差异，荧光信号未表现增强趋势，判为未检出目标致病菌。

对于荧光信号处于临界值的可疑阳性结果，建议按 GB 4789.4、GB 4789.40、GB 4789.10 和 GB 4789.38 规定的方法进行传统分离确认试验。

### 8.6.3 表述

CRISPR/Cas12a-FQ 荧光检测为阳性，且检测结果符合质控要求者，判为样品中含沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、金黄色葡萄球菌和/或大肠杆菌，表述为“检出沙门氏菌/阪崎克罗诺杆菌/金黄色葡萄球菌/大肠杆菌”。

CRISPR/Cas12a-FQ 荧光检测为阴性，判为样品中不含有上述目标致病菌，表述为“未检出沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌”。

注：在无法区分具体靶标的多重荧光体系中，阳性结果表示至少存在一种目标致病菌。如需明确区分具体菌种，建议进一步采用单重检测或测序确证。该方法的检测限可低至 1 CFU/mL（以阪崎克罗诺

杆菌为模型验证), 线性范围为  $10^2$ - $10^8$  CFU/mL。

## 9 生物安全与废弃物处理

### 9.1 生物安全要求

9.1.1 实验室应符合 GB 19489 二级生物安全实验室要求, 建立生物安全管理制度, 人员掌握应急处理措施, 操作致病性微生物时在生物安全柜内进行。

9.1.2 定期对实验室空气、台面进行微生物监测, 空气沉降菌检测符合洁净度要求; 实验结束后用 75% 乙醇擦拭台面, 紫外灯照射消毒 30 min 以上。

### 9.2 废弃物处理

9.2.1 生物废弃物(含菌样品、培养物、阳性对照)置于专用生物安全垃圾袋, 经 121℃ 高压灭菌 30min 后, 按医疗废弃物规定处置。

9.2.2 化学废液(裂解液、洗涤液)分类收集, 交由具备资质单位无害化处理; 一次性耗材使用后灭菌, 统一处置。

## 附录 A （规范性附录） 常见致病微生物检测参数

## A.1 LAMP反应体系

表A.1 金黄色葡萄球菌LAMP反应体系组分

| 反应试剂                 | 加样量（ $\mu\text{L}$ ） |
|----------------------|----------------------|
| 10×LAMP buffer       | 2.5                  |
| <i>InvA</i> -F3/B3   | 0.5                  |
| <i>InvA</i> -FIP/BIP | 2.0                  |
| <i>InvA</i> -LF/LB   | 1.0                  |
| dNTPs                | 3.5                  |
| 硫酸镁                  | 1.5                  |
| Bst DNA聚合酶           | 1.0                  |
| 甜菜碱                  | 2.5                  |
| DNA模板                | 3.0                  |
| 无菌水                  | 4.0                  |
| 总体积                  | 25                   |

表A.2 沙门氏菌LAMP反应体系组分

| 反应试剂                | 加样量（ $\mu\text{L}$ ） |
|---------------------|----------------------|
| 10×LAMP buffer      | 2.5                  |
| <i>nuc</i> -F3/B3   | 0.2                  |
| <i>nuc</i> -FIP/BIP | 0.8                  |
| <i>nuc</i> -LF/LB   | 0.5                  |
| dNTPs               | 3.5                  |
| 硫酸镁                 | 2.0                  |
| Bst DNA聚合酶          | 1.0                  |
| 甜菜碱                 | 1.0                  |
| DNA模板               | 2.0                  |
| 无菌水                 | 10.0                 |
| 总体积                 | 25                   |

表A.3 大肠杆菌LAMP反应体系组分

| 反应试剂                 | 加样量（ $\mu\text{L}$ ） |
|----------------------|----------------------|
| 10×LAMP buffer       | 2.5                  |
| <i>fecA</i> -F3/B3   | 0.32                 |
| <i>fecA</i> -FIP/BIP | 0.32                 |
| <i>fecA</i> -LF/LB   | 0.8                  |
| dNTPs                | 3.5                  |
| 硫酸镁                  | 2.0                  |
| Bst DNA聚合酶           | 1.0                  |
| 甜菜碱                  | 1.0                  |
| DNA模板                | 2.0                  |
| 无菌水                  | 10.12                |
| 总体积                  | 25                   |

表A.4 阪崎克罗诺杆菌LAMP反应体系组分

| 反应试剂                 | 加样量 (μL) |
|----------------------|----------|
| 10×LAMP buffer       | 2.5      |
| <i>ompA</i> -F3/B3   | 0.5      |
| <i>ompA</i> -FIP/BIP | 2.0      |
| <i>ompA</i> -LF/LB   | 1.0      |
| dNTPs                | 3.5      |
| 硫酸镁                  | 2.0      |
| Bst DNA聚合酶           | 1.0      |
| 甜菜碱                  | 1.0      |
| DNA模板                | 2.0      |
| 无菌水                  | 7.0      |
| 总体积                  | 25       |

## A.2 Cas12a 蛋白

| 产品组成                          | E373-YH01-01A<br>(规格:50 ug) | E373-YH01-01B<br>(规格:500 ug) |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| LbaCas12a Nuclease (2.5ug/pl) | 20 μL                       | 20 μL                        |
| 10xCas12a-dsDNA Buffer I      | 500 μL                      | 1 mL × 5                     |
| 10xCas12a-ssDNA Buffer II     | 500 μL                      | 1 mL × 5                     |

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/CNHFA

## 团 体 标 准



中国营养保健食品协会  
China Nutrition and Health Food Association

T/CNHFA XXXX—XXXX

# 基于环介导等温扩增（LAMP）-试纸条的 生鲜乳中多种致病菌同时检测

Simultaneous Detection of Multiple Pathogenic Bacteria in Raw Milk Using  
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Combined with Lateral Flow  
Dipstick

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会 发 布



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由东北农业大学提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：东北农业大学，中国营养保健食品协会。

本文件主要起草人：姜毓君、张现龙、张微、赵倩玉、张锡茹、邱满艳。

# 基于环介导等温扩增（LAMP）-试纸条的生鲜乳中多种致病菌同时检测

## 1 范围

本文件规定了生鲜乳中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌的多重环介导恒温核酸扩增（LAMP）-试纸条检测方法。

本文件适用于生鲜乳中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌的快速筛查检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403-2008 实验室质量控制规范、食品分子生物学检测

GB/T 40369-2021 免疫层析试纸条检测通则

GB 19301-2010 食品安全国家标准 生乳

GB 4789.4-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB 4789.40-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

多重环介导等温扩增反应（多重LAMP）multiple loop-mediated isothermal amplification reaction：在同一LAMP反应体系中加入两对以上的引物，同时扩增多个目标序列的LAMP反应。

## 4 技术概要

对样品中的沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌进行增菌培养后提取DNA。针对沙门氏菌属特有的*stx*A基因、克罗诺杆菌属的内源转录间隔区（*ITS*）序列，以及金黄色葡萄球菌的*nuc*基因，分别设计两对特异性引物（内引物FIP/BIP和外引物F3/B3），每对引物均可识别靶序列上的六个独立区域。靶向*stx*A、*ITS*和*nuc*基因的正向内引物分别在5'端标记了生物素（Biotin）、地高辛（Digoxin）和德克萨斯红（Texas Red），3组引物的反向内引物在5'端标记了FITC。多重LAMP反应后，在特定标记引物的触发下，通过多重LAMP探针对靶基因产生大量生物素-FITC、地高辛-FITC和德克萨斯红-FITC标记的扩增子。与运行缓冲液混合后，将扩增子滴加到试纸条的样品垫上。混合物通过毛细作用沿试纸条移动，并与结合垫上的抗FITC抗体-AuNPs结合，形成扩增子-FITC-抗FITC抗体-AuNP复合物。然后，复合物继续沿试纸条迁移，并依次被包被有链霉亲和素（T1）、抗地高辛抗体（T2）和抗德克萨斯红抗体（T3）的测试线捕获，由于AuNPs的聚集而可视化为一条红线。然后，过量的抗FITC抗体-AuNP结合物继续迁移，并通过IgG与AuNP表面的抗FITC抗体之间的非特异性反应被捕获形成另一条红线（C线）。该装置的目视检测依赖于夹心复合物积累形成的红色条带。也可使用图像分析软件通过将红色条带转换为灰度值来估算试纸条上线信号的强度。

## 5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水应符合GB/T 6682中相关规定。

### 5.1 引物和探针序列

沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌扩增引物的名称与序列详见表1。

表1 试验用引物

| 致病菌名称   | 靶基因         | 引物名称             | 引物序列 (5'-3')                                        | 5'端标记物 |
|---------|-------------|------------------|-----------------------------------------------------|--------|
| 沙门氏菌    | <i>siiA</i> | <i>siiA</i> -F3  | AGAAGCTTTTCAGAAGAGGA                                |        |
|         |             | <i>siiA</i> -B3  | GATAATAGCTTTACTCGTTGTACT                            |        |
|         |             | <i>siiA</i> -FIP | CTGCCTGAGGAATAACCATTCTATAATAAAG<br>GCTTGGTTAGAAGACA | 生物素    |
|         |             | <i>siiA</i> -BIP | TACGACTGGGATATGAACGGGACTCATGTCA<br>ATAACTACATCAG    | FITC   |
| 金黄色葡萄球菌 | <i>nuc</i>  | <i>nuc</i> -F3   | CGATTGATGGTGATACGGTTA                               |        |
|         |             | <i>nuc</i> -B3   | CCACGTCCATATTTATCAGTTC                              |        |
|         |             | <i>nuc</i> -FIP  | GGATGCTTTGTTTCAGGTGTATCATGTACAAA<br>GGTCAACCAATG    | 德克萨斯红  |
|         |             | <i>nuc</i> -BIP  | AGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGCCTTTGT<br>CAAACCTCGACTTC   | FITC   |
| 克罗诺杆菌   | ITS         | <i>ITS</i> -F3   | AAATGCGCGGTGTGTCAG                                  |        |
|         |             | <i>ITS</i> -B3   | GGTTTCCCCATTTCGGACAT                                |        |
|         |             | <i>ITS</i> -FIP  | ACCGTGTACGCTTGTTTCGCTTCTCTCAAAC<br>CGCAGCAC         | 地高辛    |
|         |             | <i>ITS</i> -BIP  | GGCAGTCAGAGGCGATGCGCCGGTTATAACG<br>GTTCA            | FITC   |

### 5.2 试剂和材料

5.2.1 细菌基因组DNA提取试剂盒。

5.2.2 10×ThermoPol缓冲液含：0.2 mol/L Tris-HCl，0.1 mol/L氯化钾，0.1 mol/L硫酸铵，20 mmol/L硫酸镁，1% Triton X-100，pH 8.8。

5.2.3 dNTPs：每种核苷酸浓度10 mmol/L。

5.2.4 硫酸镁（MgSO<sub>4</sub>）：浓度100 mmol/L。

5.2.5 Bst DNA 聚合酶：酶浓度8 U/μL。

5.2.6 灭菌双蒸水。

5.2.7 阳性质控菌株：来源于正规菌种保藏机构的沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌标准菌株，或含目的片段的DNA亦可。

5.2.8 阴性质控菌株：来源于正规菌种保藏机构的任何非目标菌株。

5.2.9 1.5 mL、2 mL塑料离心管。

5.2.10 试纸条：通过采购的原料试剂自行组装（参见附录B），或采用等效的商品化试纸条。

5.2.11 运行缓冲液：100 mM Tris（pH 9），0.05%酪蛋白（w/v），0.5% Tween 20，4%海藻糖（w/v），0.002%柠檬酸三钠（w/v），1%聚乙烯吡咯烷酮（PVP；w/v），0.2%BSA（w/v），0.05%叠氮化钠（w/v）和50 mM NaCl。

## 6 仪器设备

6.1 高速台式离心机：离心力≥12 000 g。

6.2微量移液器：100 μL~1 000 μL，10 μL~100 μL，0.5 μL~10 μL。

6.3水浴锅或加热模块：65 °C±1°C和100 °C±1°C。

6.4计时器。

6.5核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.6生物安全柜：AII型。

6.7厌氧培养系统。

6.8恒温培养箱：36°C+1°C，42 +1°C。

6.9高压灭菌器。

6.10细菌培养用仪器：见GB 4789.4、GB 4789.10和GB 4789.40。

6.11胶体金读数仪。

7 检验程序

生鲜乳中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌LAMP-试纸条检验程序见图1。

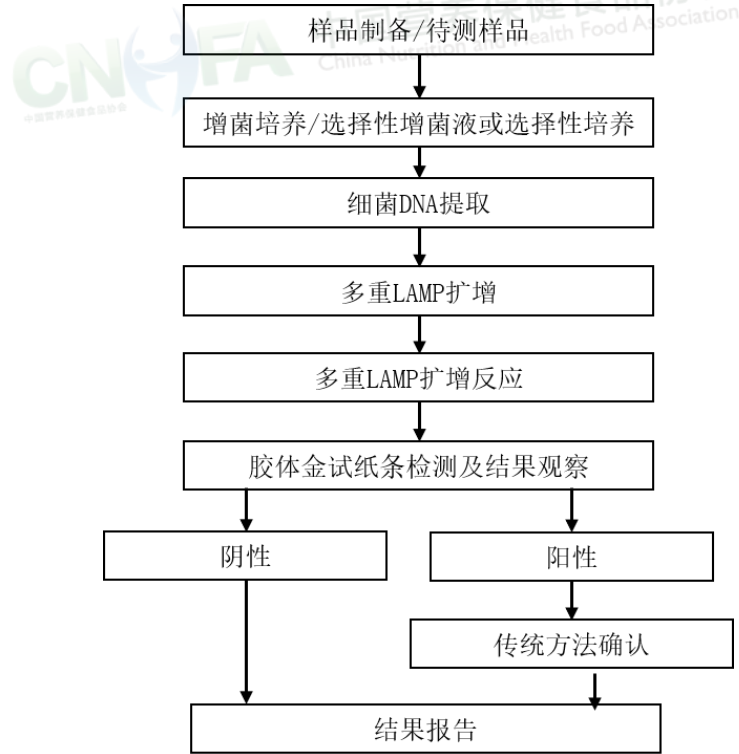


图1 生鲜乳中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌LAMP-试纸条检测程序图

8 操作步骤

8.1 样品制备和增菌培养

8.1.1 样品准备

按照GB 4789.18的方法进行样品的采样和检样处理。采集生鲜乳约（10~20 mL）置于灭菌的带盖塑料管中。 -20℃冻存备用。

8.1.2 增菌培养

按照GB 4789.4、GB 4789.10和GB 4789.40的方法进行样品制备和增菌。

8.2 样品 DNA 提取

对于8.1培养的增菌液，各取0.5 mL加到一个2mL无菌离心管中， 12 000 r/min离心2 min， 尽量弃去上清液，使用细菌基因组DNA提取试剂盒并按其说明提取制备模板DNA。如不能及时检验，提取的DNA溶液可于-20℃保存。

8.3 DNA 浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测260 nm和280 nm处的吸光值A260和A280。DNA的浓度按公式（1）计算：

$$C=A \times N \times 50 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C—DNA浓度，单位为纳克每微升（ng/μL）； 微克每毫升（μg/mL）；

A—260 nm处的吸光值

N—核酸稀释倍数

9 多重 LAMP 反应

9.1 多重 LAMP 反应体系

多重LAMP反应体系见表 2。

表2 多重LAMP反应体系

| 组分               | 工作液浓度      | 加样量（μL） | 反应体系终浓度（μM） |
|------------------|------------|---------|-------------|
| ThermoPol缓冲液     | 10×        | 2.5     | 1×          |
| <i>siiA</i> -F3  | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>siiA</i> -B3  | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>siiA</i> -FIP | 16 μmol/L  | 1.25    | 0.8 μmol/L  |
| <i>siiA</i> -BIP | 16 μmol/L  | 1.25    | 0.8 μmol/L  |
| <i>ITS</i> -F3   | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>ITS</i> -B3   | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>ITS</i> -FIP  | 14 μmol/L  | 1.25    | 0.7 μmol/L  |
| <i>ITS</i> -BIP  | 14 μmol/L  | 1.25    | 0.7 μmol/L  |
| <i>nuc</i> -F3   | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>nuc</i> -B3   | 5 μmol/L   | 0.5     | 0.1 μmol/L  |
| <i>nuc</i> -FIP  | 18 μmol/L  | 1.25    | 0.9 μmol/L  |
| <i>nuc</i> -BIP  | 18 μmol/L  | 1.25    | 0.9 μmol/L  |
| dNTPs            | 10 mmol/L  | 4       | 1.6 mmol/L  |
| 硫酸镁              | 100 mmol/L | 1       | 4 mmol/L    |
| Bst DNA聚合酶       | 8 U/μL     | 1       | 0.32 U/μL   |
| DNA模板            | -          | 2       | -           |
| 无菌水              | -          | 4       | -           |

9.2 LAMP 反应过程

9.2.1 按表2所述配制反应体系。

9.2.2 65℃扩增45 min，随后于80℃孵育2 min以终止反应。

9.2.3 空白对照、阴性对照和阳性对照设置。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。分别采用沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌DNA模板作阳性对照，用非目标菌的DNA模板作阴性对照，用等体积的无菌水代替模板DNA作空白对照。

10 试纸条检测

将25 μL的多重LAMP扩增产物与75 μL运行缓冲液（参照5.2.11）混合，并孵育5 min。然混匀后垂直缓慢滴加于试纸条的样品垫上。将装置静置5 min后，观察T线和C线显色情况，进行结果判定。

11 结果判定与表述

11.1 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

- a) 空白对照：质控线（C）变红，检测线（T）未变红；
- b) 阴性对照：质控线（C）变红，检测线（T）未变红；
- c) 阳性对照：质控线（C）变红，检测线（T）变红。

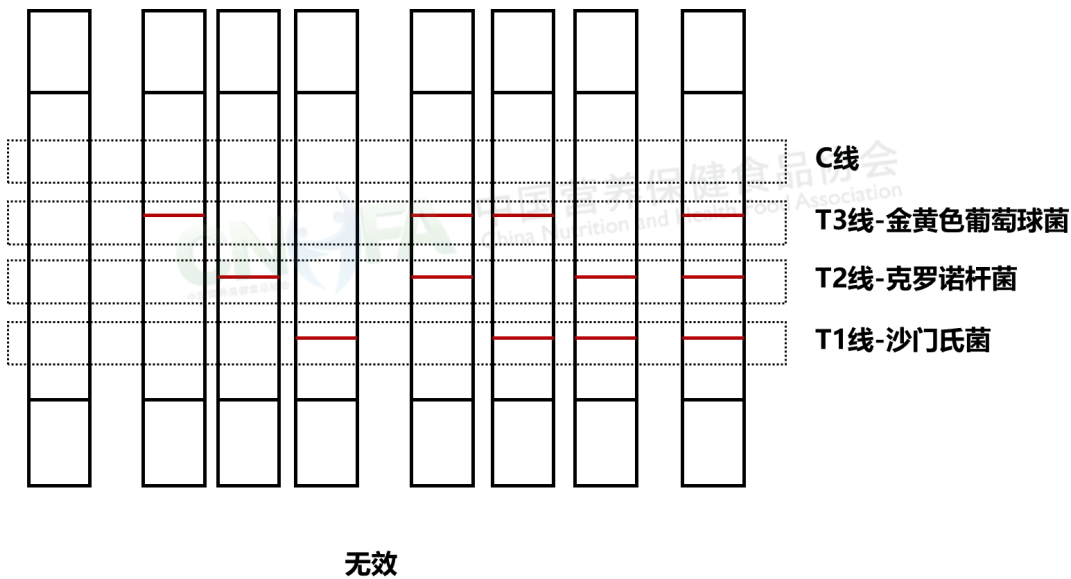


图2 目标判定示意图

11.2 结果判定

采用目视法对结果进行判读，目视判定示意图如图3所示。结果有以下几种：

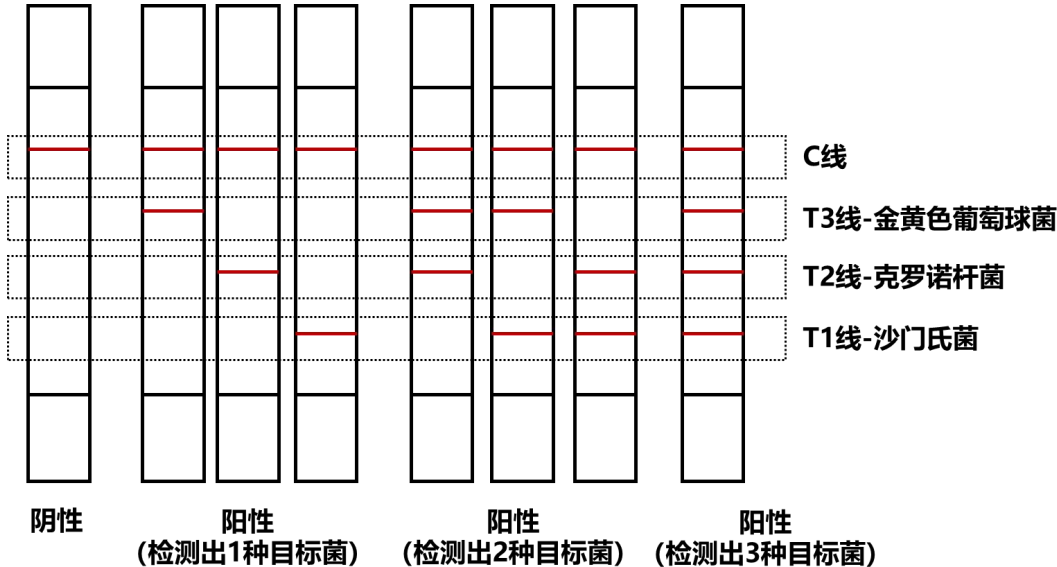


图3 目标判定示意图

试纸条质控线（C）变红色，且检测线（T）变红色，LAMP扩增产物为可疑阳性。可疑阳性产物经测序进行确证。

试纸条质控线（C）变红色，检测线（T）不变色，LAMP扩增产物为阴性。

对于可疑阳性样品建议按GB 4789.4、GB 4789.10、和GB 4789.40规定的方法进行确证试验。如果确证结果为阳性，判定结果阳性；如确证结果为阴性，判定结果阴性。

注：也可使用胶体金读数仪判读，读数仪的具体操作与判读原则参照读数仪的使用说明书。

试样中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌的含量由胶体金读数仪自动计算并显示，单位为CFU/mL。

11.3 试验要求

空白试验检测结果应为阴性，加标质控试验检测结果应为阳性。质控试验结果不符合要求时，同批次所有检测结果判定为无效结果。若出现无效结果，需对同批次样品进行重新检测。

11.4 表述

LAMP产物试纸条检测为可疑阳性，同时检测结果正确者，继续按照传统方法进行分离，若确分离到该菌，判为含沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌，表述为检出沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌。

LAMP产物试纸条检测为阴性，判为不含有沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌，表述为未检出沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌。

## 12 检出限

本文件所规定方法的最低检出限（LOD）为10 CFU/mL。

## 13 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

## 14 废弃物处理

检验过程中的废弃物需经121℃高压灭菌处理至少30 min后再弃置。

附录 A  
(资料性)

缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp (Base pair) : 碱基对

DNA (Deoxyribonucleic acid) : 脱氧核糖核酸

invA (invasion protein A gene) : 侵袭蛋白基因

siiA (Salmonella invasion-associated protein A) : 生物膜形成和毒力调控相关的基因

nuc (thermo-stable nuclease gene) : 耐热核酸酶基因

internal transcribed space (ITS) : 内源转录间隔区序列

LAMP (loop-mediated isothermal amplification) : 环介导恒温扩增

dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate) : 脱氧核苷酸三磷酸

Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane] : 三羟甲基氨基甲烷

Bst酶 (Bst DNA polymerase) : Bst DNA聚合酶

Triton X-100 : 聚乙二醇辛基苯基醚

IgG (Goat anti-mouse secondary polyclonal antibody) : 山羊抗小鼠IgG多克隆抗体

FITC (fluorescein 5-isothiocyanate) : 异硫氰酸盐

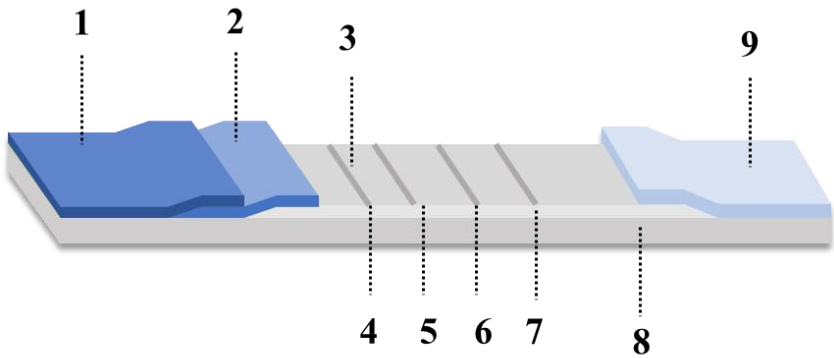
附录 B  
(资料性)

B.1 组成

- B.1.1 地高辛抗体（小鼠抗地高辛单克隆抗体）
- B.1.2 羊抗鼠二抗（山羊抗小鼠二级多克隆抗体）
- B.1.3 FITC 抗体（小鼠抗异硫氰酸荧光素单克隆抗体）
- B.1.4 兔抗德克萨斯红多克隆抗体
- B.1.5 链霉亲和素
- B.1.6 10% 蔗糖溶液
- B.1.7 0.1 mol/L碳酸钾（K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>）溶液
- B.1.8 氯金酸三水合物
- B.1.9 1%柠檬酸三钠溶液
- B.1.10 10%牛血清白蛋白（BSA）溶液
- B.1.11 聚酯膜
- B.1.12 硝酸纤维膜（NC膜）
- B.1.13 吸水纸
- B.1.14 PVC底板

B.2 试纸条结构

见图B.1。



图B.1 试纸条结构图

标引序号说明：

- 1—吸水滤纸垫；
- 2—结合物垫，附有FITC抗体与胶体金颗粒的交联体；
- 3—侧向层析基质（硝酸纤维素膜）；
- 4—检测带1，附有链霉亲和素；
- 5—检测带2，附有地高辛抗体；
- 6—检测带3，附有德克萨斯红抗体；
- 7—质控带，附有羊抗鼠二抗；
- 8—塑料衬底；
- 9—吸水垫。

B.3 试纸条的制备

B.3.1 试纸条材料准备

B.3.1.1 制金：

利用柠檬酸三钠作为还原剂把氯金酸还原为单质金的方法制备金纳米粒子。准备干净的锥形瓶和搅拌子，向锥形瓶中加入双蒸水和氯金酸并置于磁力加热搅拌器上加热，待瓶中液体沸腾后，加入柠檬酸三钠溶液（最好现配现用），边加热边搅拌，直到瓶内液体状态变为透明的酒红色，即为制得的金纳米粒

子（需质控金纳米粒子粒径为 $15 \pm 3.5$  nm），关闭热源后继续搅拌5 min至液体保持为透明酒红色不变后停止，取下锥形瓶待冷却后取出搅拌子，金纳米粒子置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### B.3.1.2 胶体金标记抗体：

将3  $\mu\text{L}$  0.2 M的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 加入1 mL AuNPs溶液中，将其调节至合适的pH值。由于AuNPs会损坏pH计的电极，因此将0.2 M的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液作为pH指示剂加入。随后，向溶液中加入3  $\mu\text{L}$ 浓度为1 mg/mL的抗FITC抗体，在室温下孵育15 min。接着加入10%（wt/vol）的牛血清白蛋白（BSA）并充分混匀，以封闭AuNPs表面剩余的活性位点。孵育15 min后，将混合物在 $4^{\circ}\text{C}$ 下以 $9,175 \times g$ 的离心力离心15 min。随后，移去上清液，将深红色的沉淀物重新悬浮于100  $\mu\text{L}$ 稀释缓冲液[含有100 mM Tris（pH 9）、4%（wt/vol）海藻糖和0.2%（wt/vol）BSA]中，并于 $4^{\circ}\text{C}$ 保存，待用。

#### B.3.2 横向流动检测装置（LFD）的组装：

LFD由4个部件（样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫）组成，这些部件粘贴在聚氯乙烯（PVC）基板上。样品垫和结合垫用运行缓冲液[100 mM Tris（pH 9）、0.05%（wt/vol）酪蛋白、0.5% Tween 20、4%（wt/vol）海藻糖、0.002%（wt/vol）柠檬酸三钠、1%（wt/vol）聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、0.2%（wt/vol）BSA和0.05%（wt/vol）叠氮化钠]饱和，然后在 $45^{\circ}\text{C}$ 下干燥2 h。然后，用抗FITC-AuNP偶联物处理结合垫，并在 $37^{\circ}\text{C}$ 下干燥2小时。将链霉亲和素（0.8 mg/mL）、抗地高辛抗体（0.8 mg/mL）、抗德克萨斯红抗体（0.8 mg/mL）和山羊抗小鼠IgG（1 mg/mL）依次喷涂到硝酸纤维素膜的检测线（T1至T3）和质控线（C线）上。检测试纸条按图B.1所示进行组装，并储存在含有硅胶干燥剂的袋子中，于 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。

---

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/CNHFA

## 团 体 标 准



T/CNHFA XXXX—XXXX

# 水解乳清蛋白中酶灭活工艺与残留控制

Enzyme inactivation process and residual enzyme activity control in hydrolyzed whey protein

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会 发 布



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：东北农业大学、中国营养保健食品协会。

本文件主要起草人：杨鑫焱、姜毓君、张微、黄镇、高悦。



# 水解乳清蛋白中酶灭活工艺与残留控制

## 1 范围

本文件规定了水解乳清蛋白生产过程中蛋白酶灭活的工艺要求、残留酶活力评价方法及过程控制要求。

本文件适用于以乳清蛋白为原料，在酶解工艺后进行蛋白酶灭活处理的生产过程。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 11674 食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉

GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准

GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

GB 1886.174 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂

GB/T 23527.1 酶制剂质量要求

GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 酶灭活

指通过高温处理，使酶蛋白的特定空间构象发生不可逆改变，从而导致其催化活性永久性丧失的过程。

### 3.2 酶活力单位

在一定温度与pH条件下，1 min水解酪蛋白产生1 μ酪氨酸所需的蛋白酶量，即为1个酶活力单位。

注：以U表示。

### 3.3 残留酶活力

水解乳清蛋白酶解反应结束并经灭酶处理后，样品中残留蛋白酶所具有的催化蛋白质水解的酶活力。

注：以单位质量或单位体积样品中的酶活力表示，单位为U/g或U/mL。

## 4 基本要求

应符合表 1的规定：

表 1 过程控制要求

| 指标                           | 推荐范围     | 目的                   |
|------------------------------|----------|----------------------|
| 灭活温度                         | 80-95℃   | 确保达到使蛋白酶不可逆失活所需的能量阈值 |
| 保持时间                         | 5-10 min | 确保热量充分传递，使酶蛋白充分、均匀变性 |
| 升温速率                         | < 1 min  | 防止“温瓶效应”导致局部反应不彻底    |
| 注：企业可根据产品特性和生产工艺要求确定灭酶温度和时间。 |          |                      |

## 附录 A

## (资料性)

## 残留酶活力的测定 紫外分光光度法

## A.1 原理

水解乳清蛋白样品中残留的蛋白酶在适宜条件下作用于酪蛋白底物,使其发生水解,生成可溶性水解产物。反应结束后加入三氯乙酸(TCA),使未水解蛋白质沉淀,离心取上清液,采用紫外分光光度法于275 nm处测定水解产物的吸光度,根据测定结果计算样品中残留蛋白酶活力。

## A.2 仪器与设备

A.2.1 紫外分光光度计:波长范围200 nm~800 nm。

A.2.2 恒温水浴锅:精度为 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。

A.2.3 离心机:转速满足样品分离要求。

A.2.4 分析天平:感量0.001 g。

A.2.5 pH计:精度为0.01 pH单位。

## A.3 试剂与材料

本方法中所用的水,在未注明其他要求时,应符合GB/T 6682中三级水的规格,所用试剂,在未注明其他规格时,均指分析纯。

## A.3.1 磷酸缓冲液

根据待测样品所用蛋白酶的适宜作用条件配制相应pH的磷酸缓冲液。

## A.3.2 酪蛋白溶液 (1 g/L)

称取1.00 g酪蛋白,加入适量磷酸缓冲液,充分搅拌使其分散均匀,用磷酸缓冲液定容至1 000 mL,混匀。使用前充分混合。

## A.3.3 三氯乙酸溶液 (0.4 mol/L)

称取65.4 g三氯乙酸,用水溶解并定容至1 000 mL,混匀。

## A.3.4 L-酪氨酸标准储备液 (1 mg/mL)

称取经105  $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的L-酪氨酸0.1000 g,用适量盐酸溶解后,转移至100 mL容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。该溶液质量浓度为1 mg/mL。

## A.3.5 L-酪氨酸标准工作液

分别吸取适量L-酪氨酸标准储备液,用水逐级稀释,配制成不同质量浓度的L-酪氨酸标准工作液,用于建立标准曲线。

#### A.4 分析步骤

##### A.4.1 标准曲线的绘制

分别吸取100 µg/mL L-酪氨酸标准工作液0.00 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL和6.00 mL，置于10 mL容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，得到质量浓度分别为0 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、30 µg/mL、40 µg/mL、50 µg/mL和60 µg/mL的L-酪氨酸标准系列溶液。

以水为空白，在275 nm波长处测定各标准溶液的吸光度。以L-酪氨酸质量浓度(µg/mL)为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程。

##### A.4.2 样品测定

准确称取(或吸取)一定量水解乳清蛋白样品，采用适宜倍数的缓冲液稀释，作为待测液。取1.0 mL待测液，加入1.0 mL酪蛋白溶液(1 g/L)，混匀后，于40 °C水浴中反应20 min。反应结束后，立即加入2.0 mL三氯乙酸溶液(0.4 mol/L)，混匀，静置10 min，使未水解蛋白质充分沉淀。以离心机于4000 r/min条件下离心10 min，取上清液，于275 nm波长处测定吸光度。

##### A.4.3 空白试验

取1.0 mL待测液，加入1.0 mL酪蛋白溶液(1 g/L)，混匀后立即加入2.0 mL三氯乙酸溶液(0.4 mol/L)，其余处理步骤同A.4.2。

以空白试验所得吸光度作为样品本底吸光度。

##### A.4.4 结果计算

样品中残留酶活力按式(1)计算：

$$X = \frac{C \times V \times n}{t \times m} \quad (1)$$

式中：

X——样品中残留酶活力，单位为U/g；

C——由L-酪氨酸标准曲线计算得到的酪氨酸生成量，单位为µg/mL；

V——反应体系总体积，单位为mL；

n——样品稀释倍数；

t——反应时间，单位为min；

m——参与反应的样品质量，单位为g。

注：本方法中，1个酶活力单位(U)定义为在规定反应条件下，每分钟生成1 µg酪氨酸当量所需的酶量。

##### A.4.5 重复性

试样应至少取两份平行样进行重复测定，平行样的相对标准偏差不超过10.0%。

T/CNHFA

团 体 标 准



T/XXX XXXX—XXXX

# UHT 调制乳稳定性评估规程

Protocol for Stability Evaluation of UHT Modified Milk

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会      发 布



## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件由东北农业大学提出。

本文件起草单位：东北农业大学、中国营养保健食品协会。

本文件主要起草人：时佳、张微、姜毓君。

# UHT 调制乳稳定性评估规程

## 1 范围

本文件规定了UHT调制乳稳定性评估的术语和定义、评估原则、评估项目与方法、评估结果判定、评估报告编制等要求。

本文件适用于以乳为主要原料，经配料调制、UHT瞬时灭菌和无菌灌装制成的液态乳制品稳定性评估。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 1.1-2020 标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则

GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验

GB 5009.237-2016 食品安全国家标准 食品pH值的测定

GB 5413.34-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品酸度的测定

GB 5413.29-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品溶解性的测定

GB 5009.227-2023 食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定

GB 5009.181-2016 食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定

GB 5009.24-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素M族的测定

GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

GB 2762-2025 食品安全国家标准 食品中污染物限量（即将实施）

ISO 7027:2019 水质 浊度的测定

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 UHT 调制乳 UHT modified milk

以生牛（羊）乳或复原乳为主要原料，添加其他食品原料、食品添加剂或营养强化剂，经超高温瞬时灭菌及无菌灌装等工艺制成的可在常温条件下较长时间贮藏的液态乳制品。

### 3.2 稳定性 stability

产品在规定的储存条件和保质期内，保持其物理性状、化学组成、营养成分、微生物指标及感官特性不发生超出允许范围变化的能力。

### 3.3 物理稳定性 physical stability

产品在储存过程中保持均一状态，不发生分层、沉淀、絮凝、乳化破乳、泡沫异常等物理变化的能力。

### 3.4 化学稳定性 chemical stability

产品中营养成分及化学物质在储存过程中保持稳定，不发生氧化、降解、转化等化学变化，营养成分保留率符合要求的能力。

### 3.5 微生物稳定性 microbial stability

产品在储存过程中微生物指标符合食品安全标准，不发生致病菌污染及微生物过度增殖的能力。

### 3.6 加速老化试验 accelerated aging test

在高于常规储存温度的受控环境下，加速产品劣变过程，通过短时间试验预测产品在常规储存条件下保质期的方法。

## 4 评估原则

### 4.1 科学性原则

评估方法应基于科学理论，结合 UHT 调制乳的特性，确保评估结果准确、可靠，能够真实反映产品稳定性状况。

### 4.2 系统性原则

全面覆盖物理、化学、微生物及感官等多个维度，综合评估产品在不同储存条件下的稳定性表现，避免单一指标评估的局限性。

### 4.3 适用性原则

评估方法应符合产品特性及实际应用场景，操作简便、可重复性强，适用于工业化生产及质量控制中的稳定性检测。

### 4.4 合规性原则

评估指标及限值应不低于国家食品安全强制性标准要求，同时兼顾行业技术水平及产品定位。

### 4.5 前瞻性原则

评估过程应考虑产品储存、运输、销售等全链条环境因素，为产品配方优化、包装改进及保质期设定提供科学依据。

## 5 评估项目与方法

### 5.1 样品准备

5.1.1 样品应从同一批次、同一生产线的成品中随机抽取，抽样数量不少于 10 件（每件为最小销售包装），抽样过程符合食品抽样相关规范。

5.1.2 抽样后应立即置于与产品标注储存条件一致的环境中暂存，避免运输及暂存过程中环境因素影响样品稳定性。

5.1.3 试验前将样品恢复至室温（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ），轻轻摇匀后开启，确保样品均匀性，避免剧烈震荡对样品性状造成破坏。

### 5.2 储存条件设置

5.2.1 常规储存条件：温度  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度  $60\pm 5\%$ ，避光、通风，无异味污染环境，作为产品稳定性的基准评估条件。

T/XXX XXXX—XXXX

5.2.2 加速储存条件：温度  $40\pm1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度  $75\pm5\%$ ，避光环境，用于加速老化试验，预测产品常规储存条件下的保质期。

5.2.3 极端储存条件：根据产品流通区域气候特点，可增设低温（ $4\pm2^{\circ}\text{C}$ 、 $-18\pm2^{\circ}\text{C}$ ）、高温（ $37\pm2^{\circ}\text{C}$ ）、光照（照度  $1000\pm100\text{ lx}$ ）等极端条件，评估产品对特殊环境的耐受能力。

5.2.4 储存周期：常规及极端条件储存周期应覆盖产品标注保质期，加速条件储存周期根据产品特性设定为 3-6 个月，按 0 天、15 天、30 天、90 天、180 天等时间节点取样检测。

5.3 物理稳定性评估

5.3.1 外观及分层状况：取 200 mL 样品置于透明具塞量筒中，静置 24 h 后观察，记录样品是否出现分层、沉淀、絮凝、浮油等现象，沉淀量按体积百分比计算，沉淀量 $\leq 0.5\%$ 、分层指数应 $\leq 5\%$ 。

5.3.2 浊度：按照 ISO 7027 标准方法，使用浊度计测定样品浊度，单位为 NTU，浊度变化率 $\Delta\text{NTU}\leq 10\%$ ，且保质期内浊度值 $\leq 50\text{ NTU}$ 。

5.3.3 粘度：按照 ASTM D2196 标准方法，使用粘度计在  $25\pm2^{\circ}\text{C}$  条件下测定，剪切速率  $100\text{ s}^{-1}$ ，粘度值 $\geq 2.5\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 。

5.4 化学稳定性评估

5.4.1 pH 值：按照 GB/T 5413.6 标准方法，使用精度 $\pm 0.01$  的 pH 计测定，pH 值应在 6.5-7.0 范围内。

5.4.2 酸度：按照 GB 5413.34 标准方法，酸度值应在 12-18 °T 范围内。

5.4.3 氧化指标：为管控产品脂肪氧化、品质劣变问题，测定脂肪过氧化值及硫代巴比妥酸值，过氧化值 $\leq 10\text{ meq/kg}$ ，TBA 值 $\leq 0.5\text{ mgMDA/kg}$ 。

5.5 微生物要求

5.5.1 采用灭菌工艺生产的 UHT 调制乳，在规定储存条件及货架期内需符合商业无菌要求。

5.5.2 非灭菌工艺生产的产品，微生物限量应符合表 1 的规定。

表 1 微生物限量

| 项 目                                               | 采样方案 <sup>a</sup> 及限量(若非指定，均以 CFU/g 或 CFU/mL 表示) |   |            |        | 检验方法            |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---|------------|--------|-----------------|
|                                                   | n                                                | c | m          | M      |                 |
| 菌落总数                                              | 5                                                | 2 | 50000      | 100000 | GB 4789.2       |
| 大肠菌群                                              | 5                                                | 2 | 1          | 5      | GB 4789.3 平板计数法 |
| 金黄色葡萄球菌                                           | 5                                                | 0 | 0/25 g(mL) | -      | GB 4789.10 定性检验 |
| 沙门氏菌                                              | 5                                                | 0 | 0/25 g(mL) | -      | GB 4789.2       |
| <sup>a</sup> 样品的分析及处理按 GB 4789.1 和 GB 4789.18 执行。 |                                                  |   |            |        |                 |

5.6 真菌毒素

真菌毒素限量应符合 GB 2761 的规定。

5.7 污染物

污染物限量应符合 GB 2762 的规定。

5.8 感官稳定性评估

5.8.1 评价 panel：由 5-7 名经过专业培训的感官评价员组成，建立统一的评价标准。

5.8.2 色泽：使用色差仪测定 Lab\*值，色泽偏差 $\Delta E\leq 2.0$ ，无明显褪色、变色现象。

5.8.3 气味：采用感官评分法（1-5 分制），评分 $\geq 4$  分，无异味、酸败味等异常气味。

5.8.4 口感及组织状态：评分 $\geq 4$  分，口感细腻、无颗粒感，无异常沉淀、分层带来的不良口感。

## 6 评估结果判定

### 6.1 综合判定原则

根据物理、化学、微生物及感官等各项指标的检测结果，综合判定产品稳定性等级，分为稳定、基本稳定、不稳定三个等级。

### 6.2 稳定

所有评估项目均符合本文件及产品设定要求，储存期间各项指标变化轻微，在允许范围内，产品可在标注保质期内保持良好品质。

### 6.3 基本稳定

核心指标符合要求，次要指标存在小幅超出允许范围的变化，但不影响产品安全性及正常食用，可通过优化配方或储存条件改善稳定性。

### 6.4 不稳定

任意一项核心指标不符合要求，或多项次要指标严重超出允许范围，产品出现明显劣变（如分层、酸败、微生物超标等），无法保证保质期内的品质及安全，需重新优化配方、工艺或包装。

### 6.5 保质期预测

基于加速老化试验结果，结合 Arrhenius 模型计算产品在常规储存条件下的保质期，预测值应不低于产品标注的保质期。

## 7 评估报告编制

7.1 报告内容应完整、规范，涵盖评估目的、范围、依据、方法、结果、结论及建议等核心内容。

7.2 具体内容包括：

- a) 产品信息：产品名称、规格、批次、配方特点、标注储存条件及保质期；
- b) 评估概况：评估依据的标准、储存条件设置、取样时间节点、检测设备及评价 panel 信息；
- c) 检测结果：各项评估项目的原始检测数据、变化趋势曲线及单项指标判定结果；
- d) 综合结论：根据检测结果给出产品稳定性等级判定，明确产品在保质期内的稳定性表现；
- e) 优化建议：针对稳定性不足的项目，提出配方调整、工艺优化、包装改进、储存条件控制等具体建议。

7.3 报告应由评估负责人签字、评估单位盖章，注明评估日期，具有可追溯性。