附件 1

2026 年第 7 号公告中动物双歧杆菌乳亚种 CP-9 等 4 种新食品原料配套参考检验方法

一、新食品原料 L-茶氨酸（发酵法）

1. 感官要求

1.1 色泽、滋味、气味、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，嗅其气味，品其滋味。

2. 理化指标

2.1 L-茶氨酸（以干基计）按 GB/T 23193 规定的方法执行。

2.2 比旋光度（50 g/L 水溶液）（α_m (20°C, D)）按 GB/T 613 规定的方法执行。

2.3 水分按 GB 5009.3 规定的方法执行。

2.4 灰分按 GB 5009.4 规定的方法执行。

2.5 pH 值（10 g/L 水溶液）按 GB/T 9724 规定的方法执行。

2.6 铅（Pb）按 GB 5009.12 规定的方法执行。

2.7 总砷（As）按 GB 5009.11 规定的方法执行。

2.8 残留蛋白含量按附录 A 规定的方法执行。

3. 微生物限量

3.1 菌落总数按 GB 4789.2 规定的方法执行。

3.2 大肠菌群按 GB 4789.3 规定的方法执行。

3.3 霉菌和酵母按 GB 4789.15 规定的方法执行。

3.4 沙门氏菌按 GB 4789.4 规定的方法执行。

3.5 金黄色葡萄球菌按 GB 4789.10 规定的方法执行。

附录 A　　残留蛋白含量的检测方法 分光光度法

A.1 原理

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

A.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.1 磷酸。

A.2.2 乙醇。

A.2.3 脱氧胆酸钠。

A.2.4 三氯乙酸。

A.2.5 氢氧化钠。

A.2.6 考马斯亮蓝 G-250 试剂。

A.2.7 牛血清白蛋白对照品：纯度>99%。

A.3 仪器和设备

A.3.1 紫外可见分光光度计：配玻璃比色皿。

A.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

A.3.3 冷冻离心机。

A.4 分析步骤

A.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg（精确至 0.0001 g）牛血清白蛋白对照品于 10 ml 容量瓶中用水溶解并定容至刻度，混匀。

A.4.2 牛血清白蛋白标准溶液的制备

精确量取 100 μL 上述储备溶液于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。或者取 1 支浓度 5 mg/mL 规格 1 mL 的牛血清白蛋白标准品稀释并定容至 250 mL，即得浓度 0.02 mg/mL 的牛血清白蛋白标准溶液。

A.4.3 试样储备溶液的制备

精确称取 4 g（精确到 0.0001 g）样品于 100 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，摇匀，即得试样储备溶液。

A.4.4 考马斯亮蓝 G-250 溶液的制备

称取约 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 试剂，溶于 50 mL 乙醇后，再加入 100 mL 磷酸，用水稀释至 1 L，滤纸过滤。

A.4.5 1.5 mg/mL 脱氧胆酸钠溶液的制备

称取 150 mg 脱氧胆酸钠，加水定容至 100 mL。

A.4.6 720 mg/mL 三氯乙酸溶液的制备

称取 72 g 三氯乙酸，加水定容至 100 mL。

A.4.7 0.1%氢氧化钠溶液的制备

称取 0.1 g 氢氧化钠，加水定容至 100 mL。

A.4.8 试样溶液的制备

取试样储备溶液 5 mL，加入 0.5 mL 1.5 mg/mL 的脱氧胆酸钠溶液，涡旋混匀，室温静置 10 min。加入 0.5 mL 720

mg/mL 的三氯乙酸溶液，涡旋混匀，4~5℃ 11000~12000 rpm 离心 20 min。去掉上清液，加入 4 mL0.1%氢氧化钠溶液复溶沉淀物，转移至 5 mL 容量瓶，加水定容至刻度，摇匀，即得试样溶液。

A.4.9 测定

按表 1 在比色管中依次加入试样溶液、水、牛血清白蛋白标准溶液，每个溶液临检测前，加入考马斯亮蓝试剂，混匀，然后以水作为参比，在 595 nm 波长下依次测定混合溶液的吸光值（表 1 各溶液体积也可依据实际情况放大量取，混匀后，再转移至比色皿中立即检测）。

表 1 测试试样溶液制备

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

A.5 计算

分别以混合溶液的吸光值减去空白吸光值的平均值得到校准吸光值。以校准吸光值为纵坐标，牛血清白蛋白标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线（二次拟合），以混合溶液 0 的校准吸光值代入标准曲线线性方程，计算溶液中残留蛋白含量（数值为负值）。标准曲线的示意图见图 A.1.。

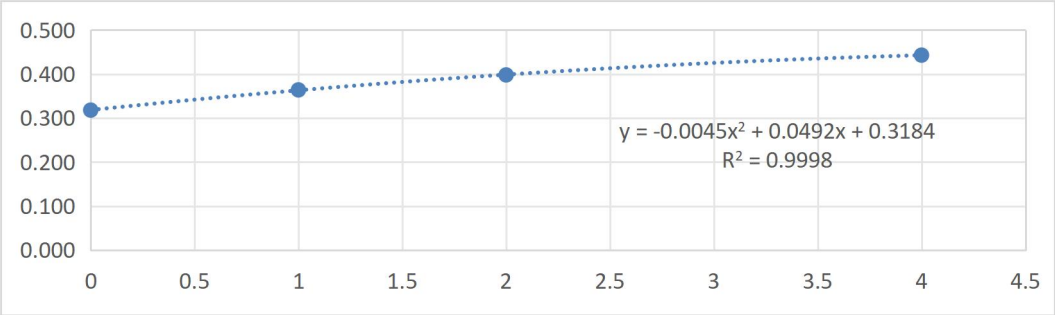

图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

样品中残留蛋白含量按式（1）计算:

$$X=\frac{-1\times C\times V}{m\times 0.6}\times f \quad \text{……（1）}$$

式中:

X—样品中残留蛋白含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）;

$-1\times C$—通过标准曲线求得的测定混合溶液中残留蛋白浓度（数值为负值），单位为毫克每升（mg/L）;

V—试样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）;

m—试样的质量，单位为克（g）;

0.6—1 mL 混合溶液中试样溶液的体积，单位为毫升（mL）;

f—稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均

值表示，结果保留一位小数。

A.6 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的20%。

A.7 检出限和定量限

当取样量为 4 g 时，本方法的检出限为 5.6 mg/kg，定量限为 19 mg/kg。

二、新食品原料 L-麦角硫因

1. 感官要求

1.1 色泽、滋味、气味、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，嗅其气味，品其滋味。

2. 理化指标

2.1 L-麦角硫因（以干基计）按附录 A 规定的方法执行。

2.2 水分按 GB 5009.3 规定的方法执行。

2.3 灰分按 GB 5009.4 规定的方法执行。

2.4 比旋光度（10 g/L 水溶液）（a_m (20°C, D)）按 GB/T 613 规定的方法执行。

2.5 铅（Pb）按 GB 5009.12 规定的方法执行。

2.6 镉（Cd）按 GB 5009.15 规定的方法执行。

2.7 总汞（Hg）按 GB 5009.17 规定的方法执行。

2.8 总砷（As）按 GB 5009.11 规定的方法执行。

2.9 残留蛋白含量按附录 B 规定的方法执行。

2.10 溶剂残留（苯甲醛）按附录 C 规定的方法执行。

2.11 液溴按 GB/T 1281 规定的方法执行。

2.12 3-巯基丙酸按附录 D 规定的方法执行。

3. 微生物限量

3.1 菌落总数按 GB 4789.2 规定的方法执行。

3.2 大肠菌群按 GB 4789.3 规定的方法执行。

3.3 霉菌和酵母按 GB 4789.15 规定的方法执行。

3.4 沙门氏菌按 GB 4789.4 规定的方法执行。

3.5 金黄色葡萄球菌按 GB 4789.10 规定的方法执行。

附录 A　　L-麦角硫因测定方法 液相色谱法

A.1 原理

L-麦角硫因溶液采用高效液相色谱法（紫外检测器）进行检测，紫外检测器检测（检测波长为254 nm），保留时间定性，外标法定量。

A.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.1 乙腈，色谱纯。

A.2.2 L-麦角硫因标准品（CAS号: 497-30-3），纯度≥99.5%。

A.2.3 水相微孔滤膜：0.22 μm。

A.3 仪器与设备

A.3.1 电子天平：感量为0.0001 g。

A.3.2 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

A.4 分析步骤

A.4.1 标准溶液配制

准确称取 L-麦角硫因标准品 10 mg（精确至 0.1 mg）于 100 mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，混匀，得到 100 μg/mL 的标准品储备液。分别取储备液 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 加入到 10 mL 容量瓶中，加水稀释并定容至刻度，得到浓度分别为 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L 的标准品溶液，将标准品溶液和储备液分别用用 0.22 μm 水系滤膜

过滤，即得 L-麦角硫因系列标准品溶液。

A.4.2 试样溶液配制

准确称取 L-麦角硫因样品 100 mg（精确至 0.1 mg）于 100 mL 容量瓶中，加水溶解并定容至刻度，混匀，得到 L-麦角硫因试样溶液。取试样溶液 0.5 mL 加入到 10 mL 容量瓶中，加水稀释并定容至刻度，混匀，0.22 μm 水系滤膜过滤，即得待测溶液，平行制备两份。

A.4.3 参考色谱条件

a）色谱柱: AQ-C18色谱柱，4.6 mm × 250 mm，粒径5 μm 或等效色谱柱;

b）检测波长：254 nm;

c）流速：1.0 mL/min;

d）进样量：20 μL;

e）柱温：30℃;

f）流动相：水:乙腈=98:2。

A.5 测定

分别取系列标准品溶液 20 μL 进样，绘制标准曲线。取 L-麦角硫因待测溶液 20 μL 进样，根据标准曲线计算试样中 L-麦角硫因含量。

A.6 计算

样品中 L-麦角硫因的含量按式（1）计算，计算结果保留小数点后两位有效数字:

$$X=\frac{C_0}{W_S/V_S\times(1-h_S)}\times100\%\text{.....（1）}$$

式中：

X—L-麦角硫因含量，单位为百分比（%）；

C_0—根据标准曲线计算出的试样溶液中 L-麦角硫因的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

W_s—试样质量，单位为毫克（mg）；

V_s—试样溶解后定容体积，单位为升（L）；

h_s—试样水分，单位为百分比（%）。

A.7 检出限和定量限

当称样量为 100 mg，定容体积为 100 mL 时，本方法检出限为 10 μg/100 mg，定量限为 30 μg/100 mg。

A.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2%。

A.9 液相色谱图

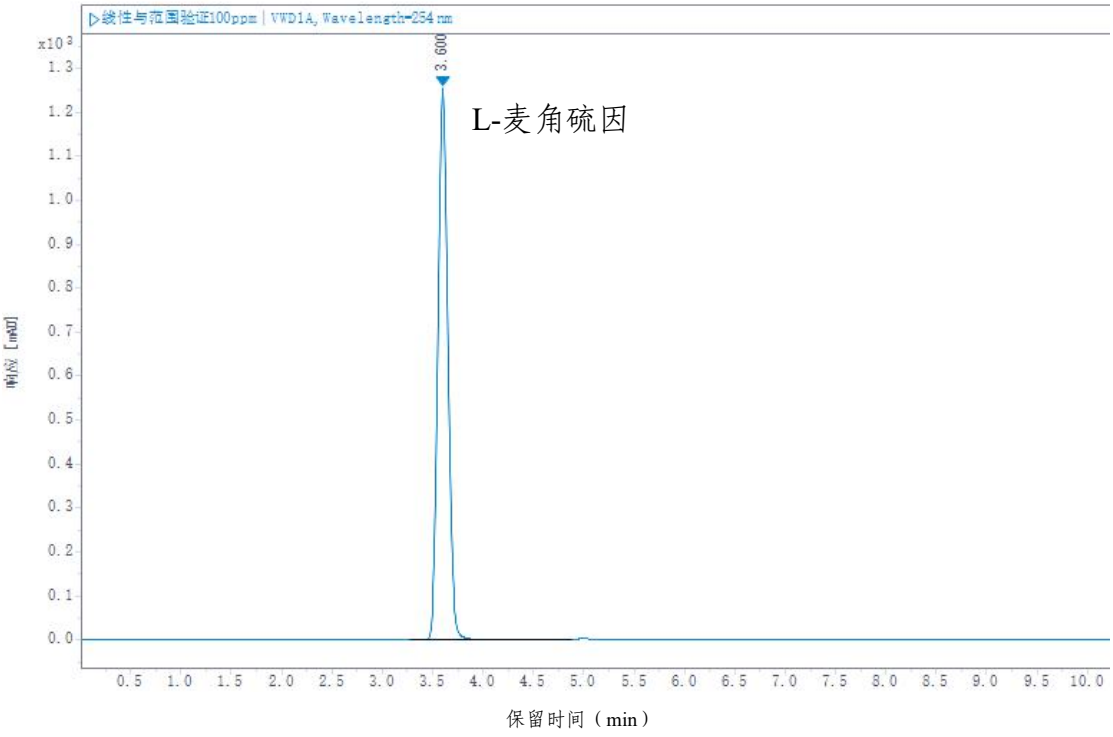

图 A.1 L-麦角硫因标准溶液液相图谱（0.1 mg/mL）

附录 B　　残留蛋白含量测定方法 考马斯亮蓝法

B.1 原理

蛋白质与考马斯亮蓝 G250 在酸性溶液中结合，使染料的最大吸收峰由 465 nm 变为 595 nm。在一定浓度范围内，稳定的染料-蛋白复合物的 OD 值与蛋白质含量成正比。向样品中添加标准蛋白，绘制标准曲线，根据标准曲线与横坐标的交点计算样品中的蛋白质含量。

B.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

B.2.1 标准蛋白：牛血清白蛋白（BSA），纯度≥99%。

B.2.2 样品溶液：称取 2.0 g 样品，加水定容至 10 mL，混匀。

注：根据实际情况可适当调整样品量。

B.2.3 0.1 g/L 考马斯亮蓝 G-250 溶液：称取 50.0 mg 考马斯亮蓝 G-250，溶于 25 mL90%乙醇中，加入 50 mL 磷酸（85%），加水定容到 500 mL（或市售等同物）。

B.2.4 2 mg/mL BSA 储备液：准确称取 20.0 mg BSA，加水定容至 10 mL。

B.2.5 100 μg/mL BSA 工作液：移取 500 μL 2 mg/mL 的 BSA 储备液，加水定容至 10 mL。

B.2.6 1.5 mg/mL DOC 溶液：称取 15.0 mg 脱氧胆酸钠（DOC），加水定容至 10 mL。

B.2.7 720 mg/mL TCA 溶液：称取 7.2 g 三氯乙酸（TCA），加水定容至 10 mL。

B.3 仪器与设备

B.3.1 分析天平：感量 0.1 g 和 0.0001 g。

B.3.2 酶标仪：可检测 595 nm 吸光度值。

B.3.3 低温高速离心机。

B.4 分析步骤

B.4.1 前处理

吸取 10 mL 样品溶液，加入 1 mL 1.5 mg/mL 的 DOC 溶液，涡旋混匀，室温静置 10 min。加入 1 mL 720 mg/mL 的 TCA 溶液，涡旋混匀，4℃，12000 rpm 离心 20 min。去掉上清液，加入 10 mL 去离子水复溶沉淀物。

B.4.2 待测溶液的测定

B.4.2.1 按表 B.1 在 96 孔板中依次加入样品溶液、水、BSA 工作液和考马斯亮蓝溶液,其中 BSA 的终浓度分别为 0 mg/L，2.50 mg/L，5.00 mg/L，10.0 mg/L，15.0 mg/L，20.0 mg/L。混匀，室温下静置 5 min。注：可根据实际情况调整 BSA 终浓度。

B.4.2.2 以水作为空白对照，采用酶标仪在 595 nm 波长下测定混合溶液的吸光度值。空白对照及所有样品均做三个平行测定。

B.4.2.3 以混合溶液的吸光度值减去空白对照吸光度值的平

均值得到校准吸光度值。以校准吸光度值为纵坐标，BSA 浓度为横坐标，绘制通过横坐标 X 轴负半轴的标准曲线。

表 B.1 待测溶液制备

溶液	BSA 蛋白浓度（mg/L）	样品溶液（μL）	水（μL）	BSA 工作液（μL）	考马斯亮蓝溶液（μL）
空白对照	0	0	100	0	100
混合溶液 0	0	80	20	0	100
混合溶液 1	2.50	80	17.5	2.5	100
混合溶液 2	5.00	80	15	5	100
混合溶液 3	10.0	80	10	10	100
混合溶液 4	15.0	80	5	15	100
混合溶液 5	20.0	80	0	20	100

B.5 计算

绘制标准曲线，计算标准曲线与横坐标 X 轴负半轴的交点数值，样品中的蛋白含量按公式（1）计算。

$$X=\frac{|C|\times V}{0.8\times m}\times F \quad \text{.....（1）}$$

式中：

X—样品中蛋白含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C—标准曲线与横坐标 X 轴负半轴交点对应的浓度值，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V—样品溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

F—稀释因子（若实验中样品未稀释，*F*=1）；

m—样品的质量，单位为克（g）；

0.8—混合溶液中试样溶液体积的占比。

含量大于 10 mg/kg，结果保留有效位数 3 位；含量小于 10 mg/kg，结果保留至小数点后 2 位。

如果 C 值为 0，则样品中不含有蛋白残留。如果 C 为正值，则实验失败，需要查找原因，重新检测。

本方法的检出限为 8.50 mg/kg，定量限为 25.0 mg/kg。

B.5 结果表述

如待测样品中蛋白含量小于检出限，则表述为“未检出”。

如待测样品中蛋白含量大于或等于检出限但小于定量限，则表述为“定性检出”。

如待测样品中蛋白含量等于或高于定量限，则表述为“XX mg/kg”。

附录 C　　苯甲醛检测方法 液相色谱法

C.1 原理

试样用 40%乙腈水溶解，采用高效液相色谱法检测试样中苯甲醛的含量，紫外检测器检测，保留时间定性，外标法定量。

C.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

C.2.1 苯甲醛对照品（CAS 号：100-52-7）：纯度≥99%。

C.2.2 乙腈：色谱纯。

C.3 仪器和设备

C.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外检测器。

C.3.2 电子天平：感量为 0.1 mg。

C.4 分析步骤

C.4.1 标准溶液制备

C.4.1.1 苯甲醛标准储备液

准确称取 16 mg（精确至 0.1 mg）苯甲醛对照品，置 100 mL 容量瓶中，用流动相（C.4.3）稀释后定容，摇匀，得到苯甲醛浓度 0.16 mg/mL 苯甲醛标准储备液。

C.4.1.2 苯甲醛标准溶液

准确移取 1.0 mL 苯甲醛标准储备液，置 100 mL 容量瓶中，用流动相（C.4.3）稀释后定容，摇匀，得到浓度为 0.0016 mg/mL 苯甲醛标准溶液。

C.4.2 试样溶液的制备

精确称取约 50 mg（精确至 0.1 mg）试样，加入到 25 mL 容量瓶中，加流动相（C.4.3）至容量瓶刻度线约 2 cm 以下，振荡溶解，然后加流动相（C.4.3）定容至刻度，配制成 2 mg/mL 的试样溶液。相同试样做两个平行实验。

C.4.3 参考色谱条件

a）色谱柱：C18 柱，250 mm × 4.6 mm，5 μm 或其他等效色谱柱。

b）流动相：乙腈:水=40:60 (v/v)。

c）柱温：30℃。

d）流速：1 mL/min。

e）进样量：20 μL。

f）运行时间：20 min。

g）波长：248 nm。

C.5 测定

按照表 C.1 的序列，依次将待测溶液注入高效液相色谱仪进行测定，按外标法计算苯甲醛的含量。

表 C.1 测试序列

测试顺序	待测溶液

1	流动相（C.4.3）
2	苯甲醛标准溶液（C.4.1）
3	待测试样溶液（C.4.2）

C.6 计算

苯甲醛含量的质量分数ω_2按式（1）计算。

$$\omega_2 = \frac{A_3 \times m_4 \times p_2 \times V_3}{A_4 \times m_3 \times V_4} \times 100\% \quad \text{.....（1）}$$

式中：

A_3—试样溶液中苯甲醛的峰面积；

A_4—苯甲醛标准溶液中苯甲醛峰面积的平均值；

m_3—试样的质量，单位为毫克（mg）；

m_4—苯甲醛对照品的质量，单位为毫克（mg）；

p_2—苯甲醛对照品的纯度，单位为百分比（%）；

V_3—试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4—苯甲醛对照品的定容体积，单位为毫升（mL）；

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

C.7 检出限和定量限

当取样量为 50 mg，定容量为 25 mL 时，本方法检出限为 0.0003 g/100 g，定量限为 0.0009 g/100 g。

C.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

C.9 液相色谱图

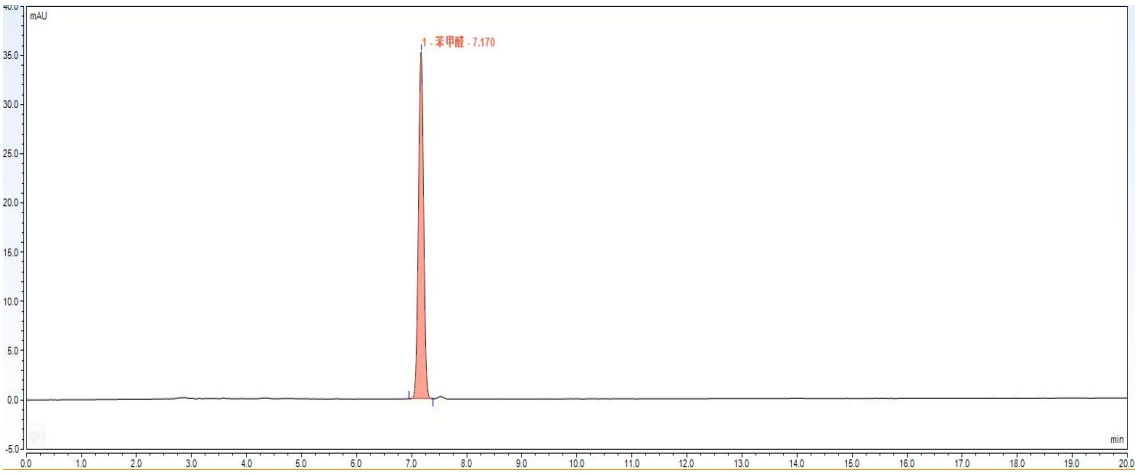

图 C.1 苯甲醛标准溶液参考液相色谱图（0.0016 mg/mL）

附录 D　　3-巯基丙酸检测方法 液相色谱-串联质谱法

D.1 原理

试样用 0.1%甲酸水溶解，采用液相色谱-串联质谱仪进行检测，外标法定量。

D.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

D.2.1 3-巯基丙酸对照品（CAS 号：107-96-0），纯度≥99.5%。

D.2.2 乙腈：色谱纯。

D.2.3 甲酸：质谱纯。

D.3 仪器与设备

D.3.1 电子天平：感量为 0.0001 g。

D.3.2 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源（ESI 源）。

D.4 分析步骤

D.4.1 甲酸水溶液配制

0.1%甲酸水溶液：量取 1mL 甲酸移入 1000 mL 容量瓶中，加水稀释并定容至刻度，混匀。

D.4.2 标准储备母液配制

准确称取 3-巯基丙酸对照品 20 mg（精确至 0.1mg）于 20 mL 容量瓶中，用甲酸水溶液稀释并定容至刻度，混匀，得到 1000 μg/mL 的 3-巯基丙酸标准储备母液，现配现用。

D.4.3 标准储备液配制

准确吸取 0.2 mL3-巯基丙酸标准储备母液，置 20 mL 容量瓶中，加甲酸水溶液稀释并定容至刻度；再精密移取上述溶液 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，加甲酸水溶液稀释并定容至刻度，混匀，得到 1 μg/mL 的 3-巯基丙酸标准储备液，现用现配。

D.4.4 标准使用液配制

分别取 3-巯基丙酸标准储备液 0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL 加入到 10 mL 容量瓶中，加稀释剂稀释并定容至刻度，得到 3-巯基丙酸浓度分别为 50 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、250 ng/mL、300 ng/mL 的系列标准溶液，现用现配。

D.4.5 试样溶液配制

准确称取试样 25 mg（精确至 0.1mg）于 20 mL 容量瓶中，加甲酸水溶液溶解并定容至刻度，混匀，得到试样溶液，平行制备两份，现用现配。

D.4.6 液相色谱参考条件

a）色谱柱：C_{18} 色谱柱（2.1 mm × 100 mm，1.9 μm），或等效色谱柱。

b）流动相 A：甲酸:水=0.5:1000（v:v）。

c）流动相 B：乙腈。

d）柱温：40℃。

e）流速：0.3 mL/min。

f）进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	90	10
2	90	10
4	50	50
4.1	90	10
5	90	10

D.4.7 质谱参考条件

a）离子源：电喷雾离子源（ESI 源）；

b）扫描模式：负离子扫描;

c）检测方式：多反应监测（MRM）；

d）毛细管电压：4000 V;

e）气体温度：300℃;

f）气体流速：7.0 L/min;

g）雾化压力：30 psi;

h）鞘气温度：250℃;

i）鞘气流速：11.0 L/min;

j）定性离子对、定量离子对、碎裂电压和碰撞能量的参考值见表 2;

k）0~1.5 min 不进质谱分析仪，1.5~4.2 min 进入质谱仪分析，4.2~5min 不进质谱分析仪。

表 2　3-巯基丙酸监测离子对、碎裂电压和碰撞能量参考值

化合物	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量	
3-巯基丙酸	105 m/z	33 m/z	55	4V	定量离子对
		41 m/z		48V	定性离子对

按照参考条件测定试样溶液和系列标准溶液，如果试样中的 3-巯基丙酸质量色谱峰保留时间与标准溶液一致（变化范围在±2.5％之内），且试样中所监测定性离子出现，3-巯基丙酸的两个子离子的相对丰度比（k）与浓度相当标准溶液的 3-巯基丙酸的两个子离子的相对丰度比相比，其允许偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为试样中存在 3-巯基丙酸。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度(k)	k>50%	20%<k≤50%	10%<k≤20%	k≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

D.5 测定

取甲酸水溶液 2 μL 进样，稀释剂对检测不得有干扰（干扰低于检出限）。分别取系列标准溶液 2 μL 进样，绘制 3-巯基丙酸标准曲线。取试样溶液 2 μL 进样，根据标准曲线计算试样中 3-巯基丙酸含量。

D.6 计算

3-巯基丙酸的含量通过外标法定量。以系列标准溶液中3-巯基丙酸浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，根据标准曲线回归方程计算样品中3-巯基丙酸的浓度。

L-麦角硫因样品中3-巯基丙酸的含量按式（1）计算。

$$\omega_3 = \frac{C_1 \times V_s}{W_s \times 1000000} \times 100\% \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中:

ω_3—L-麦角硫因试样中3-巯基丙酸含量，单位为百分比（%）；

C_1—根据标准曲线计算出的试样溶液中3-巯基丙酸的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

W_s—试样质量，单位为毫克（mg）；

V_s—试样溶解后定容体积，单位为毫升（mL）；

1000000—单位换算系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

D.7 检出限和定量限

当称样量为12.5 mg，定容体积为10 mL时，本方法检出限为0.0016 g/100 g，定量限为0.004 g/100 g。

D.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

D.9 色谱图

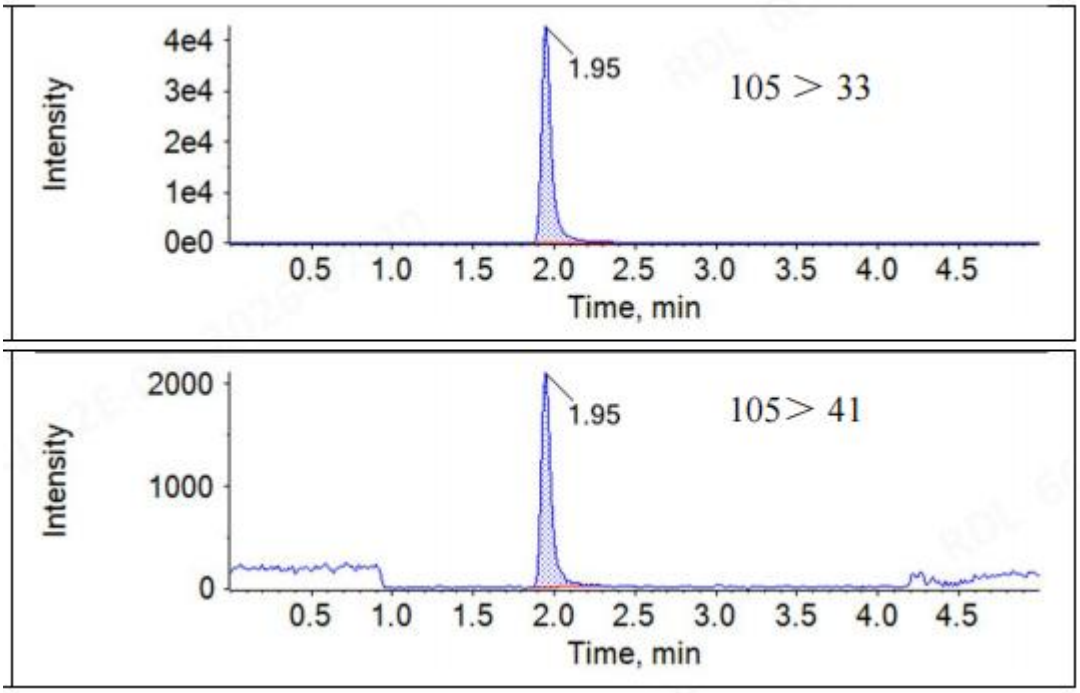

图 D.1 3-巯基丙酸标准溶液质量色谱图（300 ng/mL）

三、新食品原料β-乳球蛋白（发酵法）

1. 感官要求

1.1 色泽、滋味、气味、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，嗅其气味，品其滋味。

2. 理化指标

2.1 总蛋白按 GB 5009.5 规定的方法执行。

2.2 β-乳球蛋白占总蛋白质量百分比按附录 A 规定的方法执行。

3.1 水分按 GB 5009.3 规定的方法执行。

3.2 灰分按 GB 5009.4 规定的方法执行。

3.3 铅（Pb）按 GB 5009.12 规定的方法执行。

3.4 镉（Cd）按 GB 5009.15 规定的方法执行。

3.5 总汞（Hg）按 GB 5009.17 规定的方法执行。

3.6 总砷（As）按 GB 5009.11 规定的方法执行。

3. 微生物限量

3.1 菌落总数按 GB 4789.2 规定的方法执行。

3.2 大肠菌群按 GB 4789.3 规定的方法执行。

3.3 霉菌和酵母按 GB 4789.15 规定的方法执行。

3.4 沙门氏菌按 GB 4789.4 规定的方法执行。

3.5 金黄色葡萄球菌按 GB 4789.10 规定的方法执行。

附录 A　　β-乳球蛋白测定方法 液相色谱法

A.1 原理

试样用水溶解，反相色谱柱分离，二极管阵列检测器或紫外检测器检测，保留时间定性，外标法定量。

A.2 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.1 β-乳球蛋白标准品（CAS 号：9066-45-9），纯度≥90%。

A.2.2 三氟乙酸（CAS 号：76-05-1），纯度≥99%。

A.2.3 乙腈，色谱纯。

A.3 仪器和设备

A.3.1 高效液相色谱仪：配二极管阵列检测器或紫外检测器。

A.3.2 分析天平：感量 0.1 mg。

A.4 分析步骤

A.4.1 流动相的配制

A 相：在 1 L 水中加入 1 mL 三氟乙酸，混合均匀后过 0.45 μm 滤膜备用。

B 相：在 1 L 乙腈中加入 1 mL 三氟乙酸，混合均匀后过 0.45 μm 滤膜备用。

A.4.2 标准溶液制备

称取 50.0 mg β-乳球蛋白标准品于 50 mL 容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，得 1000 mg/L 的β-乳球蛋白标准储备

液。

分别准确量取 0.5 mL，1.0 mL，2.5 mL，4.0 mL 和 5.0 mL 上述储备液至 10 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度线，摇匀。得到 50.0 mg/L，100.0 mg/L，250.0 mg/L，400.0 mg/L，500.0 mg/L 的β-乳球蛋白标准溶液。

A.4.3 标准曲线的制备

把标准溶液根据浓度从低到高依次注入液相色谱中，测定相应的峰面积。以标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

A.4.4 试样溶液制备

称取 30.0 mg（精确至 0.1 mg）样品于 100 mL 容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，获得试样溶液。

A.4.5 参考色谱条件

a）色谱柱：BEH C_4 反相色谱柱（250 mm×4.6 mm，粒径 3.5 μm）。

b）柱温：40℃。

c）检测器：二极管阵列检测器或紫外检测器。

d）检测波长：214 nm。

e）流速：0.8 mL/min。

f）流动相：见 A.4.1，洗脱梯度表见表 A.1。

g）进样量：20 μL。

表 A.1 梯度洗脱条件

时间（min）	A 相（%）	B 相（%）
0	70	30
5	70	30
10	30	70
15	30	70
16	70	30
20	70	30

A.5 测定

在规定的色谱条件下取试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中β-乳球蛋白的浓度。

A.6 计算

样品溶液中β-乳球蛋白含量按式（1）计算:

$$\omega_1 = \frac{(A-b)\times V\times 100}{a\times m} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中:

ω_1—样品中β-乳球蛋白的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

A—试样的峰面积;

a—β-乳球蛋白标准曲线的斜率;

b—β-乳球蛋白标准曲线的截距;

V—试样溶液定容体积，单位为升（L）；

m—试样称样量，单位为毫克（mg）；

100—单位换算系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留小数点后两位。

β-乳球蛋白占蛋白质质量百分比按式（2）计算:

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{\omega} \times 100\% \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（2）$$

式中:

ω_2—样品中β-乳球蛋白占蛋白质质量百分比，单位为百分比（%）；

ω_1—试样中β-乳球蛋白的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

ω—试样中蛋白质含量的实测值，单位为克每百克（g/100 g）；

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留小数点后两位有效数字。

A.7 检出限和定量限

当取样量为 30.0 mg，定容体积为 100 mL 时，β-乳球蛋白的方法检出限为 0.33 g/100 g，定量限为 1.00 g/100 g。

A.8 精确度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

A.9 色谱图

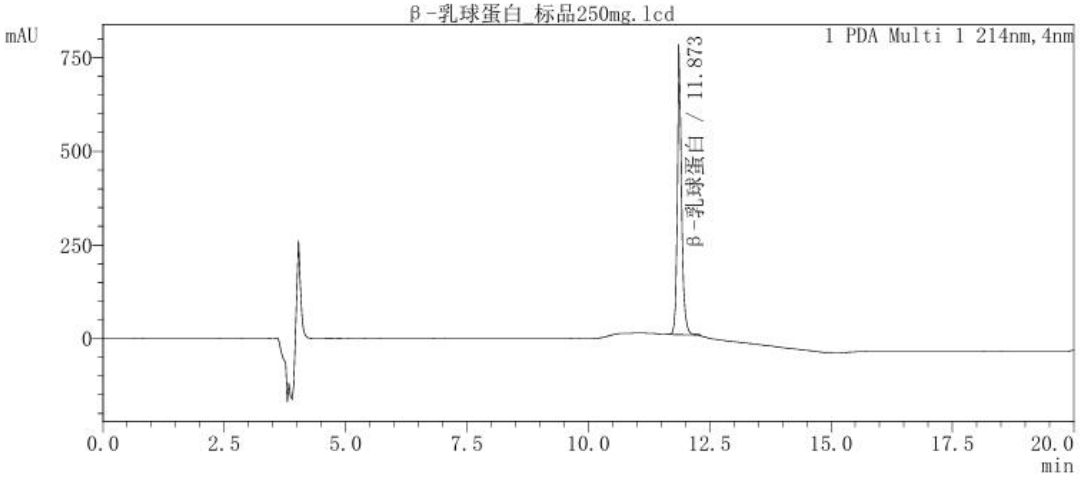

图 A.1 β-乳球蛋白标准溶液色谱图（0.25 mg/mL）

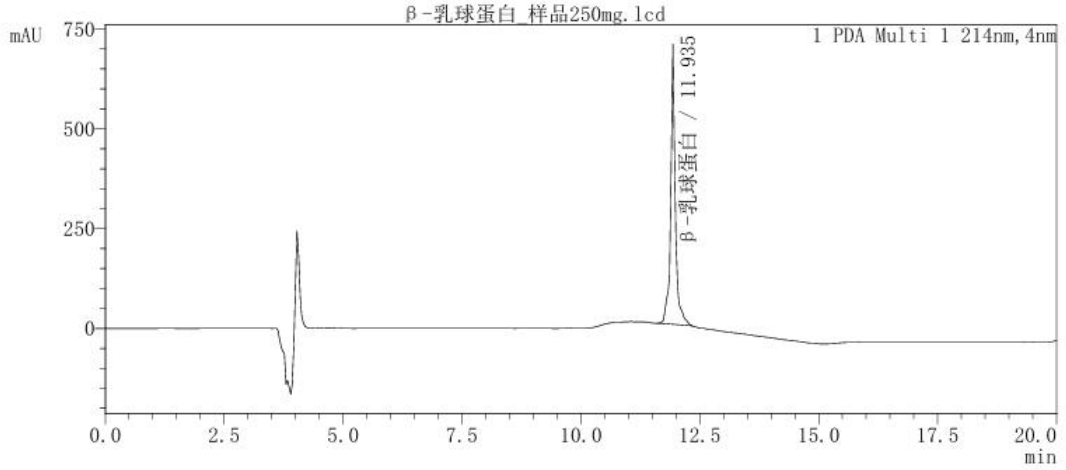

图 A.2 试样溶液的液相色谱图（0.25 mg/mL）