

附件

## 甜菊糖苷（发酵法）等 9 种食品添加剂 新品种相关材料

### 一、拟征求意见的食品添加剂新品种名单

#### （一）食品添加剂新品种

中文名称：甜菊糖苷（发酵法）

英文名称：Steviol glycosides from fermentation

功能分类：甜味剂

#### 用量及使用范围

甜菊糖苷（发酵法）的使用范围、使用量执行《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB2760-2024）规定，可以单独或与甜菊糖苷、甜菊糖苷（酶转化法）混合使用，以甜菊醇当量计。

#### 质量规格要求：

##### 1 范围

本质量规格要求适用于以葡萄糖为原料，通过重组大肠杆菌 BL21（DE3）发酵后，通过灭活、树脂处理、浓缩、结晶、干燥制得的食品添加剂甜菊糖苷（发酵法）。甜菊糖苷（发酵法）的生产菌应经过安全性评估并符合附录A的要求。

##### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

###### 2.1 4 种糖苷的分子式

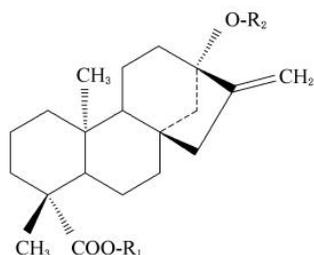
甜菊苷： $C_{38}H_{60}O_{18}$

瑞鲍迪昔A:  $C_{44}H_{70}O_{23}$

瑞鲍迪昔D:  $C_{50}H_{80}O_{28}$

瑞鲍迪昔M:  $C_{56}H_{90}O_{33}$

## 2.2 4种糖苷的结构式



4种糖苷的化合物名称、 $R_1$ 位取代基和 $R_2$ 位取代基见表1。甜菊醇 ( $R_1=R_2=H$ )为甜菊糖苷配基。

表1 4种糖苷的化合物名称、 $R_1$ 位取代基和 $R_2$ 位取代基

化合物名称		$R_1$ 位取代基	$R_2$ 位取代基
中文	英文		
甜菊苷	Stevioside	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)
瑞鲍迪昔A	Rebaudioside A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)   $\beta$ -Glc(3→1)
瑞鲍迪昔D	Rebaudioside D	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)   $\beta$ -Glc(3→1)
瑞鲍迪昔M	Rebaudioside M	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)   $\beta$ -Glc(3→1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2→1)   $\beta$ -Glc(3→1)

## 2.3 4种糖苷的相对分子质量

甜菊苷：804.87（按2018年国际相对原子质量）

瑞鲍迪苷A：967.01（按2018年国际相对原子质量）

瑞鲍迪苷D：1129.15（按2018年国际相对原子质量）

瑞鲍迪苷M：1291.29（按2018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2的规定。

表2 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	白色	取适量试样至于清洁、干净的白磁盘中，在自然光线下观察其色泽和状态。
状态	粉末晶体	

#### 3.2 理化指标

理化指标应符合表3的规定。

表3 理化指标

项目	指标	检验方法
甜菊糖苷含量 (以干基计)， w/%	≥ 95.0	GB 1886.355-2022 附录A中A.3
灰分， w/%	≤ 1.0	GB 5009.4
干燥减重， w/%	≤ 6.0	GB 5009.3 直接干燥法
pH	4.5-7	GB 1886.355-2022 附录A中A.4

项目	指标	检验方法
铅 (Pb) / (mg/kg)	≤ 1.0	GB 5009.75或 GB 5009.12
砷 (As) / (mg/kg)	≤ 1.0	GB 5009.76或 GB 5009.11
甲醇 / (mg/kg)	≤ 200	GB 1886.355-2022 附录A中A.5
乙醇 / (mg/kg)	≤ 5000	GB 1886.355-2022 附录A中A.5

### 3.3 微生物限量

微生物限量应符合表4的规定。

表 4 微生物限量

项目	指标	检验方法
菌落总数 / (CFU/g)	≤ 1000	GB 4789.2
霉菌 / (CFU/g)	≤ 100	GB 4789.15
酵母 / (CFU/g)	≤ 100	GB 4789.15
大肠杆菌 / (CFU/g)	≤ 10	GB 4789.3
肠杆菌科 / (CFU/g)	≤ 10	GB 4789.41
金黄色葡萄球菌 / (CFU/g)	≤ 10	GB 4789.10
沙门氏菌 / 25g	不得检出	GB 4789.4

## 附录 A 用于生产甜菊糖苷（发酵法）的生产菌信息

### A.1 用于生产甜菊糖苷（发酵法）的生产菌信息

用于生产甜菊糖苷（发酵法）的生产菌信息见表A.1。

表 A.1 用于生产甜菊糖苷（发酵法）的生产菌信息

食品添加剂	来源	供体
甜菊糖苷（发酵法） Steviol Glycosides from fermentation	大肠杆菌 BL21(DE3) <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	加拿大红豆杉 ( <i>Taxus canadensis</i> ) <sup>a</sup> 、甜叶菊 ( <i>Stevia rebaudiana</i> ) <sup>b</sup> 、拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) <sup>c</sup> 和水稻 ( <i>Oryza sativa</i> ) <sup>d</sup>

<sup>a</sup> 为牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸合成酶供体；

<sup>b</sup> 为焦磷酸合酶、异贝壳杉烯合酶、异贝壳杉烯氧化酶、细胞色素 P450 氧化还原蛋白酶和糖基转移酶供体；

<sup>c</sup> 为细胞色素单加氧酶供体；

<sup>d</sup> 为糖基转移酶供体。

## (二) 食品工业用酶制剂新品种

序号	酶	来源	供体
1	葡糖淀粉酶 Glucoamylase	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	草酸青霉 <i>Penicillium oxalicum</i>
2	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	<i>Fusarium venenatum</i>	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
3	脂肪酶 Lipase	法夫驹形氏酵母 <i>Komagataella phaffi</i>	米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</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。

## (三) 食品用香料新品种

中文名称：4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮

英文名称：4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanone

功能分类：食品用香料

### 质量规格要求：

本质量规格要求适用于由鼠李糖为原料制得的食品添加剂4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮。其余内容执行《食品安全国家标准 食品添加剂 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮》（GB28365）规定。

## (四) 食品营养强化剂新品种

1. 中文名称：2'-岩藻糖基乳糖

英文名称：2'-fucosyllactose, 2'-FL

功能分类：食品营养强化剂

2'-岩藻糖基乳糖的使用范围、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 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息除外），该营养强化剂新品种的生产菌信息见下表。

表 1 用于生产 2'-岩藻糖基乳糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
2'-岩藻糖基乳糖	大肠杆菌 BL21(DE3)	脆弱拟杆菌
2'-fucosyllactose	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	( <i>Bacteroides fragilis</i> ) <sup>a</sup>
	大肠杆菌 BL21(DE3)	埃希氏菌
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	( <i>Escherichia</i> spp.) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 为  $\alpha$ -1,2-岩藻糖基转移酶供体

2. 中文名称：乳糖-N-四糖

英文名称：Lacto-N-tetraose, LNT

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(仅限儿童用乳粉)	0.23-1.82 g/L (以纯品计, 以	当与 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖

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

### 质量规格要求：

#### 1 范围

本质量规格要求适用于以乳糖等为原料，经发酵、提纯、干燥等工艺制得的营养强化剂乳糖-N-四糖。乳糖-N-四糖的生产菌应经过安全性评估并符合附录 C 的要求。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

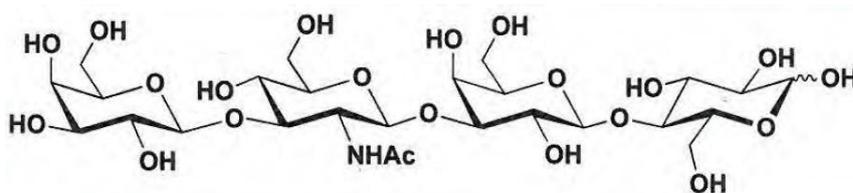
##### 2.1 化学名称

$\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1→3)-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1→3)- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-(1→4)-D-葡萄糖

##### 2.2 分子式



##### 2.3 结构式



## 2.4 相对分子质量

707.63 (按 2020 年国际相对原子质量)

## 3. 技术要求

### 3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	要求	检验方法
色泽	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
乳糖- <i>N</i> -四糖 (以干基计), w/%	$\geq$ 90.0	附录 A 中 A.2
D-乳糖, w/%	$\leq$ 5.0	附录 A 中 A.2
乳糖- <i>N</i> -三糖II, w/%	$\leq$ 5.0	附录 A 中 A.2

线性乳糖-N-六糖, w/%	≤	5.0	附录 A 中 A.2
D-半乳糖和 D-葡萄糖, w/%	≤	5.0	附录 A 中 A.2
水分, w/%	≤	9.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
灰分, w/%	≤	1.0	GB 5009.4
残留蛋白/(mg/kg)	≤	100	附录 A 中 A.3
内毒素/(EU/mg)	≤	10	附录 A 中 A.4
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	≤	0.2	GB 5009.11
铅(Pb)/(mg/kg)	≤	0.05	GB 5009.12

### 3.3 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项目		指标	检验方法
菌落总数/(CFU/g)	≤	1000	GB 4789.2
酵母/(CFU/g)	≤	10	GB 4789.15
霉菌/(CFU/g)	≤	10	GB 4789.15
肠杆菌科/(CFU/g)	<	10	GB 4789.41
沙门氏菌/(25 g)		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 乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖的测定

#### A.2.1 方法提要

试样溶于水，采用离子色谱法分离，脉冲安培检测器检测，以乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖对照品的保留时间定性，外标法或面积归一化法定量。

#### A.2.2 试剂和材料

A.2.2.1 乳糖-*N*-四糖对照品 (CAS 14116-68-8)：纯度  $\geq 91\%$  或标明含量的等同物。

A.2.2.2 D-乳糖对照品 (CAS 64044-51-5)：无水乳糖含量  $\geq 95\%$  或标明含量的等同物。

A.2.2.3 乳糖-*N*-三糖 II 对照品 (CAS 75645-27-1)：纯度  $\geq 95\%$  或标明含量的等同物。

A.2.2.4 线性乳糖-N-六糖对照品 (CAS 64331-48-2)：纯度 $\geq$ 90%或标明含量的等同物。

A.2.2.5 D-半乳糖对照品 (CAS 59-23-4)：纯度 $\geq$ 99%或标明含量的等同物。

A.2.2.6 D-葡萄糖对照品 (CAS 50-99-7)：纯度 $\geq$ 99%或标明含量的等同物。

A.2.2.7 50%氢氧化钠溶液 (NaOH)：色谱纯。

### A.2.3 仪器和设备

A.2.3.1 离子色谱仪：配有脉冲安培检测器，Au 工作电极。

A.2.3.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

A.2.3.3 涡旋混合仪。

A.2.3.4 超声波清洗器。

### A.2.4 参考色谱条件

A.2.4.1 色谱柱：离子交换色谱柱，250 mm $\times$ 4 mm 及其保护柱，50 mm $\times$ 4 mm。

A.2.4.2 柱温：30 $^{\circ}$ C。

A.2.4.3 淋洗液：A：水；B：氢氧化钠溶液 (500 mmol/L)。

A.2.4.4 洗脱类型：梯度洗脱，条件见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱条件

时间/min	流速 mL/min	淋洗液%		曲线
		A	B	

0 ~ 30	0.45	93	7	线性
30.1 ~ 37	0.45	80	20	线性
37.1 ~ 42	0.45	20	80	线性
42.1 ~ 57	0.45	93	7	线性

A.2.4.5 进样量：10  $\mu\text{L}$ 。

A.2.4.6 检测器：脉冲安培检测器。

A.2.4.6.1 检测器温度：35 $^{\circ}\text{C}$ 。

A.2.4.6.2 数据收集速率（Hz）：10。

A.2.4.6.3 参比电极：银/氯化银电极。

A.2.4.6.4 工作电极：金电极。

## A.2.5 分析步骤

### A.2.5.1 标准储备溶液的配制

#### A.2.5.1.1 乳糖-*N*-四糖标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取约 10.0 mg（精确至 0.01 mg）乳糖-*N*-四糖标准品于 10 mL 容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.2 D-乳糖标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取约 10.0 mg（精确至 0.01 mg）D-乳糖标准品于 10 mL 容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.3 乳糖-*N*-三糖 II 标准储备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取约 10.0 mg（精确至 0.01mg）乳糖-*N*-三糖 II 标准品于 10 mL 容量瓶中，加水后摇匀，定容至刻度。

#### A.2.5.1.4 线性乳糖-*N*-六糖标准储备液（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：

准确称取约 5.0 mg (精确至 0.01 mg) 线性乳糖-*N*-六糖标准品于 10 mL 容量瓶中, 加水后摇匀, 定容至刻度。

#### A.2.5.1.5 D-半乳糖标准储备液 (1000 µg/mL) :

准确称取 10.0 mg (精确至 0.01 mg) D-半乳糖标准品于 10 mL 容量瓶中, 加水后摇匀, 定容至刻度。

#### A.2.5.1.6 D-葡萄糖标准储备液 (1000 µg/mL) :

准确称取 10.0 mg (精确至 0.01 mg) D-葡萄糖标准品于 10 mL 容量瓶中, 加水后摇匀, 定容至刻度。

#### A.2.5.1.7 标准混合中间液 (约 10 µg/mL) :

分别吸取不同体积的各种储备液于 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 得到浓度约为 10 µg/mL 的标准混合中间液。建议的配制过程见表 A.2。

表 A.2 标准混合中间液的配制

化合物名称	乳糖- <i>N</i> -四糖	D-乳糖	乳糖- <i>N</i> -三糖 II	D-葡萄糖 /D-半乳糖 <sup>1</sup>	线性乳糖- <i>N</i> -六糖
移取体积 (mL)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20

<sup>1</sup> D-半乳糖和 D-葡萄糖同时洗脱, 并通过组合峰测定。两个物质响应基本一致, 因此, 仅需要 D-半乳糖或 D-葡萄糖其中一种储备溶液用于定量。

#### A.2.5.2 标准工作溶液配制

分别吸取混合中间液 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL 于 10 mL 容量瓶中加水定容至刻度，得到浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液。另取适量标准混合中间液，作为浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液。

#### A.2.5.3 试样制备

称量约 20.0 mg（精确至 0.1 mg）乳糖-*N*-四糖样品于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容。取 1.0 mL 该试样溶液于 10 mL 容量瓶中，用水稀释并定容，得到的溶液 A 用于测定副产物。另取 1.0 mL 溶液 A，用水定容至 50 mL，得到的溶液 B 用于测定主含量。

注：如需要，可调整试样的称样量或稀释体积，确保所测浓度在工作曲线的范围内。

#### A.2.5.4 系统适应性试验

以水为空白样，连续进样至少两次，进行系统适用性测试。当满足以下条件时，可进行样品检测：

——浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液进样 2 次后，色谱图中的乳糖-*N*-四糖的信噪比应  $\geq 10$ ；

——峰面积的相对偏差应不大于 10%。如不满足相对偏差要求，需复测。

#### A.2.5.5 测定

将标准曲线工作溶液从低到高依次注入离子色谱仪中，测定相应的响应值（峰面积），以标准工作液中各种糖的质量浓度为

横坐标，以响应值（峰面积）为纵坐标，绘制标准曲线。离子交换色谱柱条件下标准溶液色谱图参见附录 B。

将试样溶液注入离子色谱仪中，记录色谱图。根据保留时间定性，记录峰面积。根据标准曲线得到待测液中各种糖的质量浓度。同时测定试剂空白。

#### A.2.5.6 计算

试样中乳糖-N-四糖的含量按式（A.1）计算：

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V \times f_1}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$\omega_1$ ——乳糖-N-四糖含量的质量分数，%；

$\rho_1$ ——试样测定液中乳糖-N-四糖的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$f_1$ ——乳糖-N-四糖的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

乳糖-N-四糖以干基计的结果按式（A.2）计算：

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

式中:

$\omega_2$ ——试样中乳糖-N-四糖（以干基计）的质量分数，%；

$\omega_1$ ——试样中乳糖-N-四糖的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

$\omega$ ——使用 GB 5009.3 卡尔·费休法测得的样品中水分的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中乳糖-N-三糖 II 的含量按式（A.3）计算:

$$\omega_3 = \frac{\rho_2 \times V \times f_2}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

$\omega_3$ ——试样中乳糖-N-三糖 II 的质量分数，%；

$\rho_2$ ——试样测定液中乳糖-N-三糖 II 的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$f_2$ ——乳糖-N-三糖 II 的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中 D-乳糖的含量按式 (A.4) 计算：

$$\omega_4 = \frac{\rho_3 \times V \times f_3}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

$\omega_4$ ——试样中 D-乳糖的含量的质量分数，% ；

$\rho_3$ ——试样测定液中 D-乳糖的质量浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ ) ；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升 (mL) ；

$f_3$ ——D-乳糖的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克 (g) ；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中线性乳糖-N-六糖的含量按式 (A.5) 计算：

$$\omega_5 = \frac{\rho_4 \times V \times f_4}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

$\omega_5$ ——试样中线性乳糖-N-六糖的质量分数，%；

$\rho_4$ ——试样测定液中线性乳糖-N-六糖的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$f_4$ ——线性乳糖-N-六糖的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克（ $\text{g}$ ）；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

试样中 D-半乳糖和 D-葡萄糖的含量按式（A.6）计算：

$$\omega_6 = \frac{\rho_5 \times V \times f_5}{m \times 1000000} \times 100 \dots\dots\dots (\text{A.6})$$

式中：

$\omega_6$ ——试样中 D-半乳糖和 D-葡萄糖的质量分数，%；

$\rho_5$ ——试样测定液中 D-半乳糖和 D-葡萄糖的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样的定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$f_5$ ——D-半乳糖和 D-葡萄糖的稀释因子；

$m$ ——试样质量，单位为克（ $\text{g}$ ）；

1000000——单位转换系数；

100——单位转换系数。

计算结果保留小数点后一位。

### A.3 残留蛋白含量的测定

#### A.3.1 方法提要

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

#### A.3.2 试剂和材料

A.3.2.1 牛血清白蛋白对照品：纯度 $\geq 99\%$ 或标明含量的等同物。

A.3.2.2 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.3.3 仪器和设备

A.3.3.1 紫外-可见分光光度计。

A.3.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

#### A.3.4 分析步骤

##### A.3.4.1 牛血清白蛋白储备溶液的制备

称取 20.0 mg 牛血清白蛋白对照品于 10 mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

##### A.3.4.2 牛血清白蛋白标准溶液的制备

取 100  $\mu$ L 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。

#### A.3.4.3 试样溶液的制备

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

#### A.3.4.4 测定

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

表 A.3 测试试样溶液制备

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

#### A.3.4.5 结果计算

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

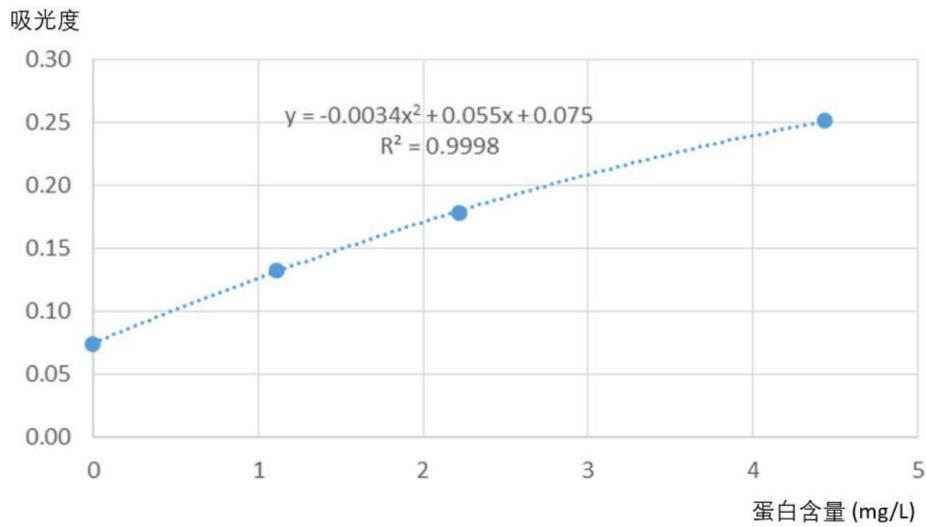


图 A.1 蛋白含量测定的标准曲线示意图

试样中蛋白含量 $\omega_7$ 按式 (A.7) 计算, 单位为 mg/kg。

$$\omega_7 = \frac{-1 \times C_1 \times V_1}{0.6 \times m_1} \times 1000 \dots\dots\dots (A.7)$$

式中:

$C_1$ ——标准曲线与横坐标左半轴交点对应浓度值, 数值为负值, 单位为毫克每升 (mg/L);

$-1 \times C_1$ ——通过标准曲线求得的测定混合溶液中蛋白的浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

$V_1$ ——试样溶液的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$f$ ——稀释因子;

$m_1$ ——试样的质量, 单位毫克 (mg);

0.6——1 mL 混合溶液中试样溶液的体积为 0.6 mL;

1000——单位转换系数。

该方法的定量限为 17 mg/kg。若结果低于定量限, 则结果表

示为  $< 17 \text{ mg/kg}$ 。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 内毒素的测定（凝胶法）

##### A.4.1 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（ $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、至少  $30 \text{ min}$ ）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.4.2 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.4.3 试剂和材料

A.4.3.1 细菌内毒素标准品。

A.4.3.2 鲎试剂：带有灵敏度标示值 $\lambda$ 。

A.4.3.3 细菌内毒素检查用水：内毒素含量  $< 0.015 \text{ EU/mL}$ 。

##### A.4.4 仪器和设备

A.4.4.1 旋涡混合器。

#### A.4.4.2 恒温水浴箱。

### A.4.5 分析步骤

#### A.4.5.1 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.4.5.2 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 sec 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、变形并从管壁滑脱者为阴性。保温和拿取试管过程应避免受到振动，造成假阴性结果。

当最大浓度  $2\lambda$  管均为阳性，最低浓度  $0.25\lambda$  管均为阴性，阴性对照管为阴性，试验方为有效。

反应终点浓度的几何平均值，即为鲎试剂灵敏度的测定值 ( $\lambda_c$ ) 按式 (A.8) 计算，单位为 EU/mL。

$$\lambda_c = \text{antilg} \sum X/n \dots\dots\dots \text{(A.8)}$$

式中：

$X$ ——为反应终点浓度的对数值 ( $\lg$ )，反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度；

$n$ ——为每个浓度的平行管数。

当  $\lambda_c$  在  $0.5\lambda \sim 2\lambda$  (包括  $0.5\lambda$  和  $2\lambda$ ) 时，方可用于细菌内毒素检查，并以标示灵敏度  $\lambda$  为该批鲎试剂的灵敏度。

#### A.4.5.3 干扰试验

按表 A.4 制备溶液 A、B、C 和 D，使用的试样溶液应为未检验出内毒素且不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的溶液，按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。最大有效稀释倍数 (MVD)

是指在试验中试样溶液被允许达到稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测，MVD 按式 (A.9) 计算：

$$MVD = cL/\lambda \dots\dots\dots (A.9)$$

式中：

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

$L$ ——试样的细胞内毒素限量，单位为内毒素单位每毫克 (EU/mg)；

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

表 A.4 干扰试验溶液的制备

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

C	2λ/内毒素检查 用水	检查用 水	1	2λ	2
			2	λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/内毒素检查 用水	—	—	—	2

注：A 为试样溶液；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.4.5.4 测定

##### A.4.5.4.1 凝胶限度试验

按表 A.5 制备溶液 A、B、C 和 D。使用稀释倍数不超过 MVD 并且已经排除干扰的试样溶液来制备溶液 A 和 B。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.5 凝胶限度试验溶液制备

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	平行管数
A	无/试样溶液	2
B	2λ/试样溶液	2
C	2λ/内毒素检查用水	2
D	无/内毒素检查用水	2

注：A 为试样溶液；B 为试样阳性对照；C 为阳性对照；D 为阴性对照。

保温 60 min±2 min 后观察结果。若阴性对照溶液 D 的平行管均为阴性，试样阳性对照溶液 B 的平行管均为阳性，阳性对照溶液 C 的平行管均为阳性，试验有效。

若溶液 A 的两个平行管均为阴性，判定试样符合规定。若溶液 A 的两个平行管均为阳性，判定试样不符合规定。若溶液 A 的两个平行管中的一管为阳性，另一管为阴性，需进行复试。复试时溶液 A 需做 4 支平行管，若所有平行管均为阴性，判定

试样符合规定，否则判定试样不符合规定。

若试样的稀释倍数小于MVD而溶液A结果出现不符合规定时，可将试样稀释至MVD重新实验，再对结果进行判断。

#### A.4.5.4.2 凝胶半定量试验

通过确定反应终点浓度来量化试样中内毒素的含量。按表A.6制备溶液A、B、C和D。按试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 A.6 凝胶半定量试验溶液的制备

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

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

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

#### A.4.5.5 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  $c_x = \text{antilog}(\sum \lg c/2)$ ]。若试验中试样溶液的所有平行管均为阴性, 应记为内毒素浓度小于  $\lambda$  (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 高效液相参考色谱图

### B.1 离子交换色谱柱条件下乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖色谱图

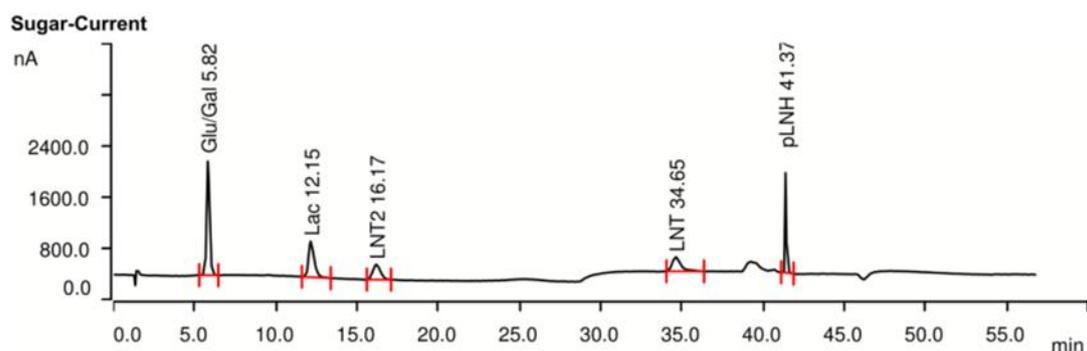


图 B.1 离子交换色谱柱条件下乳糖-*N*-四糖、D-乳糖、乳糖-*N*-三糖 II、线性乳糖-*N*-六糖、D-半乳糖和 D-葡萄糖色谱图

表 B.1 色谱条件下各物质的参考保留时间

化合物	保留时间 (min)
乳糖- <i>N</i> -四糖	34.65
D-乳糖	12.15
乳糖- <i>N</i> -三糖 II	16.17
线性乳糖- <i>N</i> -六糖	41.37
D-半乳糖和 D-葡萄糖	5.82

## 附录 C 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

### C.1 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息见表 C.1。

表 C.1 用于生产乳糖-N-四糖的生产菌信息

营养强化剂	来源	供体
乳糖-N-四糖 Lacto-N-tetraose	大肠杆菌 BL21 star( DE3 ) <i>Escherichia coli</i> BL21 star ( DE3 )	奈瑟菌 ( <i>Neisseria</i> spp. ) <sup>a</sup> 、沙门氏菌 ( <i>Salmonella</i> spp. ) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 为 $\beta$ -1,3-N-乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶供体

<sup>b</sup> 为 $\beta$ -1,3-半乳糖基转移酶供体

(五) 扩大使用范围的食品添加剂

序号	名称	食品 分类号	食品名称	最大使用量 (g/kg)	备注
1	环己基氨基磺酸钠 (又名甜蜜素)	01.02.02	风味发酵乳	0.65	以环己基氨基磺酸计
		16.07	其他(仅限魔芋凝胶制品)	1.0	
2	甜菊糖苷	01.03.02	调制乳粉和调制奶油粉	0.3	以甜菊醇当量计
		01.06.04	再制干酪和干酪制品	0.4	
		04.03.02.03	腌渍的食用菌和藻类	0.23	
		06.07	方面米面制品	0.4	

## 二、拟征求意见的食品添加剂新品种背景材料

### （一）甜菊糖苷（发酵法）

1.背景资料。甜菊糖苷（发酵法）申请作为食品添加剂新品种，其使用范围和用量与 GB2760 中已批准甜菊糖苷的规定一致。国际食品法典委员会、美国食品药品监督管理局等允许甜菊糖苷（发酵法）作为甜味剂用于多种食品类别。根据联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果，该物质的每日允许摄入量为 0-4 mg/kg bw（以甜菊醇当量计）。

2.工艺必要性。该物质作为甜味剂用于上述食品类别，改善产品口感、替代蔗糖。其质量规格按照公告的相关要求执行。

### （二）葡糖淀粉酶

1.背景资料。黑曲霉（*Aspergillus niger*）来源的葡糖淀粉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，催化淀粉水解。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）丝氨酸蛋白酶

1.背景资料。*Fusarium venenatum* 来源的丝氨酸蛋白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、澳大利亚和新西兰食品标准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，催化胰

蛋白水解。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）。

#### （四）脂肪酶

1.背景资料。法夫驹形氏酵母（*Komagataella phaffi*）来源的脂肪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、欧盟委员会、日本厚生劳动省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，催化甘油二酯的合成。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）。

#### （五）4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮

1.背景资料。4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮申请作为食品用香料新品种。美国食用香料和提取物制造者协会、欧盟委员会等允许其作为食品用香料使用。

2.工艺必要性。该物质配制成食品用香精后用于各类食品（《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<GB2760>表 B.1 食品类别除外），改善食品的味道。其质量规格按照公告的相关要求执行。

#### （六）2'-岩藻糖基乳糖

1.背景资料。2'-岩藻糖基乳糖申请作为食品营养强化剂新品种。美国食品药品监督管理局、欧盟委员会、澳大利亚和新西兰食品标准局等允许 2'-岩藻糖基乳糖用于婴幼儿配方食品等食品类别。

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

### （七）乳糖-N-四糖

1.背景资料。乳糖-N-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-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。

### （八）环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）

1.背景资料。环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）作为甜味剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），允许用于冷冻饮品、果酱、面包、糕点、饮料类、果冻等食品类别。本次申请扩大使用范围用于风味发酵乳（食品类别 01.02.02）和其他（仅限魔芋凝胶制品）（食品类别 16.07）。国际食品法典委员会、欧盟委员会等允许其作为甜味剂用于风味发酵乳。根据联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会评估结果，该物质的每日允许摄入量为 0-11 mg/kg bw。

2.工艺必要性。该物质作为甜味剂用于风味发酵乳（食品类别 01.02.02）和其他（仅限魔芋凝胶制品）（食品类别 16.07），改善产品的口感、替代蔗糖。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂 环己基氨基磺酸钠（又名甜蜜素）》（GB 1886.37）。

### （九）甜菊糖苷

1.背景资料。甜菊糖苷作为甜味剂已列入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》（GB 2760），允许用于调

制乳、风味发酵乳、腌渍的蔬菜、糕点等食品类别。本次申请扩大使用范围用于调制乳粉和调制奶油粉（食品类别 01.03.02）、再制干酪和干酪制品（食品类别 01.06.04）、腌渍的食用菌和藻类（食品类别 04.03.02.03）和方面米面制品（食品类别 06.07）。国际食品法典委员会、欧盟委员会、日本厚生劳动省等允许其作为甜味剂用于多种食品。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为 0-4 mg/kg bw（以甜菊醇当量计）。

2.工艺必要性。该物质作为甜味剂用于调制乳粉和调制奶油粉（食品类别 01.03.02）、再制干酪和干酪制品（食品类别 01.06.04）、腌渍的食用菌和藻类（食品类别 04.03.02.03）和方面米面制品（食品类别 06.07），改善产品的口感、替代蔗糖。其质量规格执行《食品安全国家标准 食品添加剂甜菊糖苷》（GB 1886.355）。