

团 体 标 准

T/BPSPA 0016—2022

天然化叶酸

(6S-5 甲基四氢叶酸钙)

Naturalization folate

2022-11-30 发布

2022-12-15 实施

北京民营科技促进会 发布

目 次

| | |
|-----------------------------|----|
| 前言 | II |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 2 |
| 4 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量 | 2 |
| 4.1 化学名称 | 2 |
| 4.2 分子式 | 2 |
| 4.3 结构式 | 2 |
| 4.4 相对分子质量 | 2 |
| 5 原料要求 | 2 |
| 5.1 生产用水 | 2 |
| 5.2 叶酸 | 2 |
| 5.3 氯化钙 | 3 |
| 5.4 加工助剂 | 3 |
| 6 技术要求 | 3 |
| 6.1 感官要求 | 3 |
| 6.2 理化指标 | 3 |
| 6.3 微生物指标 | 4 |
| 6.4 净含量及允许短缺量 | 4 |
| 7 生产环境要求 | 4 |
| 8 检验规则 | 5 |
| 8.1 出厂检验 | 5 |
| 8.2 型式检验 | 5 |
| 8.3 检验批的规定 | 5 |
| 8.4 抽样方法 | 5 |
| 8.5 判定规则 | 5 |
| 9 包装、运输和贮存 | 5 |
| 9.1 标志、标签 | 5 |
| 9.2 包装 | 5 |
| 9.3 运输 | 6 |
| 9.4 贮存 | 6 |
| 附录 A（规范性） 检验方法 | 7 |
| 参考文献 | 21 |

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由北京民营科技促进会标准工作委员会提出。

本文件由北京民营科技促进会归口。

本文件起草单位：连云港金康和信药业有限公司、北京华夏产业经济研究院、中卫安（北京）认证中心、北京金康和信药业科技有限公司。

本文件主要起草人：吴晓丹、包乐伟、刘康、乔园园、连增林、成永之、郭石泉、杨乙楠、郑晨曦。

天然化叶酸

(6S-5-甲基四氢叶酸钙)

1 范围

本文件规定了天然化叶酸的工艺、原料、感官、理化、微生物、净含量及允许短缺量、生产环境等要求，描述了相应的检验方法，规定了检验规则、标志、标签、包装、运输和贮存的内容，并给出了化学名称、分子式、结构式和相对分子质量的信息。

本文件适用于以叶酸和氯化钙为原料，经还原、环合、拆分、成盐等工艺制得的天然化叶酸（6S-5-甲基四氢叶酸钙）的生产、检验和销售。

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 191 包装储运图示标志
- GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
- GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
- GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB 1886.45 食品安全国家标准 食品添加剂 氯化钙
- 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 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 4789.5 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
- 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 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB 5009.3—2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定
- GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定
- GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定
- GB 5009.15 食品安全国家标准 食品中镉的测定
- GB 5009.17 食品安全国家标准 食品中总汞及有机汞的测定
- GB 5009.74 食品安全国家标准 食品添加剂中重金属限量试验
- GB 5009.92—2016 食品安全国家标准 食品中钙的测定
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 6543 运输包装用单瓦楞纸箱和双瓦楞纸箱
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
- GB/T 10004 包装用塑料复合膜、袋 干法复合、挤出复合
- GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范
- GB 15570 食品安全国家标准 食品添加剂 叶酸
- GB/T 16294 医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法
- GB/T 19538 危害分析与关键控制点（HACCP）体系及其应用指南
- GB/T 28118 食品包装用塑料与铝箔复合膜、袋
- GB 29924 食品安全国家标准 食品添加剂标识通则
- GB/T 32199 红外光谱定性分析技术通则

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
《定量包装商品计量监督管理办法》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

天然化叶酸 **naturalization folate**

以叶酸和氯化钙为原料，经还原、环合、拆分、成盐等工艺制得的达到或者接近天然叶酸安全水平的6S-5-甲基四氢叶酸钙，是活性叶酸的迭代升级产品。

注1：天然叶酸，也称膳食叶酸，其主要成分是6S-5-甲基四氢叶酸，主要存在于肝脏、谷物、豆类、深绿的叶菜蔬菜、橙和鸡蛋中。

注2：活性叶酸，是叶酸的活性形式，不需要代谢，能直接被人体吸收和利用。

4 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

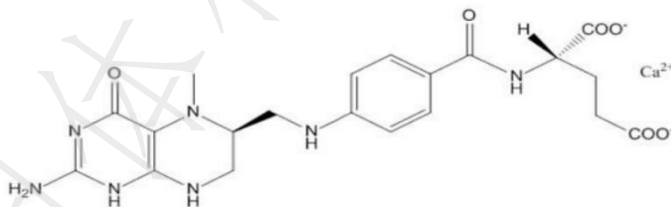
4.1 化学名称

N-[4-[[[2-氨基-1,4,5,6,7,8-六氢-4-氧-5-甲基-6-碟啶基]甲基]氨基]苯甲酰]-L-谷氨酸钙盐

4.2 分子式

$C_{20}H_{23}CaN_7O_6 \cdot 5H_2O$

4.3 结构式



4.4 相对分子质量

497.52（无水物）（按 2018 年国际相对原子质量）

5 原料要求

5.1 生产用水

应符合 GB 5749 的规定。

5.2 叶酸

应符合 GB 15570 的规定。

5.3 氯化钙

应符合 GB 1886.45 的规定。

5.4 加工助剂

不应使用含有铅、铂等金属催化剂以及甲醛、苯磺酸等对最终产品产生有害健康的残留污染的加工助剂。

6 技术要求

6.1 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 | 白色至淡黄色 | 取适量样品置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下，观察其色泽和状态、嗅其气味 |
| 状 态 | 结晶粉末，无肉眼可见杂质 | |
| 气 味 | 无臭 | |

6.2 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 |
|--------------------------------|-------------------------|--|------------------------|
| 6S-5-甲基四氢叶酸钙（以干基计）/（%） | | 95.0~102.0 | 附录 A 中 A.4 |
| 6S-5-甲基四氢叶酸（以干基计）/（%） | | 89.0~95.0 | 附录 A 中 A.4 |
| 水分/（%） | | 6.0~17.0 | GB 5009.3—2016 第四法 |
| 钙含量（以干基计）/（%） | | 7.0~8.5 | GB 5009.92—2016 第二法 |
| 相关物质 | JK12A ^a /（%） | ≤ 0.1 | 附录 A 中 A.5 |
| | 5-甲基四氢噻吩/（%） | 不应检出 | |
| | 总杂质/（%） | ≤ 0.5 | |
| D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)含量/（%） | | ≤ 0.1 | 附录 A 中 A.6 |
| 氯离子（以 Cl 计）/（%） | | ≤ 0.5 | 附录 A 中 A.7 |
| 溶剂残留（乙醇）/（%） | | ≤ 0.5 | 附录 A 中 A.8 |
| 溶解性 | | 0.5 g 试样，在（25±2）℃ 的 100 mL 水中 2 min 内溶解 | 附录 A 中 A.9 |
| 基因毒性杂质 （苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯） | | 不应检出 | 附录 A 中 A.10 |
| 重金属（以 Pb 计）/（mg/kg） | | ≤ 10 | GB 5009.74 |
| 铂（Pt）/（mg/kg） | | ≤ 2 | 附录 A 中 A.11 |
| 砷（As）/（mg/kg） | | ≤ 1.5 | GB 5009.11 |
| 铅（Pb）/（mg/kg） | | ≤ 1.0 | GB 5009.12 |

表2 (续)

| 项 目 | 指 标 | 检验方法 | |
|---|-----|------|------------|
| 镉 (Cd) / (mg/kg) | ≤ | 0.5 | GB 5009.15 |
| 总汞 (Hg) / (mg/kg) | ≤ | 0.1 | GB 5009.17 |
| ^a 化学名为: N-[4-(2-氨基-10-甲基-4-氧-6,7,8,9-四氢-4a,7-环亚胺嘧啶并[4,5-b][1,4]二氮杂卓-5(4H)-基)苯甲酰]-L-谷氨酸)。 | | | |

6.3 微生物指标

应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

| 项 目 | 指 标 | 检验方法 | |
|-------------------------|------|---|------------|
| 菌落总数/ (CFU/g) | ≤ | 1 000 | GB 4789.2 |
| 大肠菌群/ (MPN/g) | ≤ | 0.92 | GB 4789.3 |
| 霉菌/ (CFU/g) | ≤ | 25 | GB 4789.15 |
| 酵母/ (CFU/g) | ≤ | 25 | |
| 致病菌 (沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌) | 不应检出 | GB 4789.4、GB 4789.5、 GB 4789.10—2016 第一法 | |

6.4 净含量及允许短缺量

应符合《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，检测方法按照 JJF 1070 的规定执行。

7 生产环境要求

7.1 生产环境卫生指标应符合 GB 14881 及以下要求，其中：

- a) 生产车间空气中沉降菌不大于 1 500 CFU/m³，取样方法按 GB/T 16294 执行；
- b) 直接接触未包装产品的工作台、设备表面菌落总数不大于 20 CFU/cm²，并不应有致病菌。取样方法：用浸有灭菌生理盐水的棉签在被检物体表面（取与食品直接接触或有一定影响的表面）取 25 cm² 的面积，在其内涂抹 10 次，然后剪去手接触部分棉棒，将棉签放入含 10 mL 灭菌生理盐水的采样管内送检；
- c) 直接接触未包装产品的工人手表面菌落总数不大于 200 CFU/只手或手套，并不应检出致病菌。取样方法：被检人五指并拢，用浸湿生理盐水的棉签在右手手指曲面，从指尖到指端来回涂擦 10 次，然后剪去手接触部分棉棒，将棉签放入含 10 mL 灭菌生理盐水的采样管内送检。

7.2 环境监测频率：

- a) 车间转换不同卫生要求的产品时，在加工前进行采样，以便了解车间卫生清扫消毒情况；
- b) 全厂统一放长假后，车间生产前，进行采样；
- c) 产品检验结果超内控标准时，应及时对车间进行采样，若有检验不合格点，整改后再进行采样检验；
- d) 正常生产状态的采样，每周 1 次。

7.3 生产过程消毒要求应符合 GB/T 19538 相关要求。

8 检验规则

8.1 出厂检验

- 8.1.1 每批产品应经生产厂质量检验部门检验合格，签发合格证后方可出厂。
- 8.1.2 出厂检验项目为第 6 章规定的除基因毒性杂质、铂以外的所有项目。

8.2 型式检验

- 8.2.1 型式检验项目为第 6 章规定的所有项目。
- 8.2.2 在下列情况之一，应进行型式检验：
 - a) 新产品投产前；
 - b) 正常生产每半年或停产 3 个月以上恢复生产时；
 - c) 原料来源发生改变可能影响产品质量时；
 - d) 食品安全监管部门提出要求时。

8.3 检验批的规定

以相同原料、相同工艺、同一投料日期所生产的产品为一批。

8.4 抽样方法

- 8.4.1 感官要求按照检验量的 2 倍来取样。
- 8.4.2 理化指标按照检验量的 2 倍来取样。
- 8.4.3 微生物指标检验随机采样 1 件。

8.5 判定规则

- 8.5.1 检验项目符合本文件要求，判该批产品合格。
- 8.5.2 检验项目有 1 项（微生物指标除外）不符合本文件要求，可在同批产品中加倍抽样进行复检，复检结果符合本文件要求，则判该批产品合格；若复检结果仍不符合本文件要求，则判该批产品不合格。
- 8.5.3 微生物指标检测结果中有任一项不符合本文件要求，则判该批产品不合格。

9 包装、运输和贮存

9.1 标志、标签

产品标签应符合 GB 29924 及 GB 7718 的规定，包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

9.2 包装

- 9.2.1 产品内包装，如聚乙烯袋、复合膜包装等，应符合 GB/T 28118、GB/T 10004 等相关标准的规定。
- 9.2.2 产品外包装为瓦楞纸箱的应符合 GB/T 6543 的规定。
- 9.2.3 包装应牢固、防潮、整洁、美观、无异味，便于装卸、仓储和运输。

9.3 运输

9.3.1 产品在运输时应保持外包装完好无损。

9.3.2 运输工具应清洁、干燥、无异味、无污染。

9.3.3 运输途中应防潮，防雨，防曝晒。

9.3.4 不应与有毒、有害、有异味、易污染的物品混装混运，装运时应轻拿、轻放、轻装、轻卸。

9.4 贮存

在贮运过程中，应防止曝晒雨淋，不应与有毒或有异味的物品混贮、混运。应贮存于阴凉、干燥、通风的仓库中，不应露天堆放。

附 录 A
(规范性)
检 验 方 法

A.1 安全提示

本文件试验方法中使用的部分试剂具有毒性或腐蚀性，应按相关规定操作，操作时应小心谨慎。若溅到皮肤上应立即用水冲洗，严重者应立即治疗。在使用挥发酸时，应在通风厨中进行。

A.2 一般规定

本文件所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的三级水。试验中所用标准溶液和其他所需溶液，在没有注明其他要求时，均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备。

A.3 鉴别试验

按照 GB/T 32199 进行试验，要求样品的红外光谱图与标准品图谱一致。6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图见附录 B 中图 B.1。

A.4 6S-5-甲基四氢叶酸钙及 6S-5-甲基四氢叶酸的测定（高效液相色谱法）

A.4.1 试剂和材料

- A.4.1.1 二水合磷酸二氢钠。
- A.4.1.2 碳酸氢钠。
- A.4.1.3 碳酸钠。
- A.4.1.4 甲醇溶液：色谱级。
- A.4.1.5 叶酸标准品。
- A.4.1.6 对氨基苯甲酰谷氨酸标准品。
- A.4.1.7 DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品。
- A.4.1.8 氢氧化钠溶液：称取 32 g 氢氧化钠，加水溶解，并定容至 100 mL，摇均备用。
- A.4.1.9 磷酸盐缓冲溶液：称取约 7.80 g 二水合磷酸二氢钠，精确至 0.000 1 g，置于 1 000 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀备用。

A.4.2 仪器和设备

- A.4.2.1 电子分析天平。
- A.4.2.2 酸度计。
- A.4.2.3 高效液相色谱仪：配备紫外检测器。

A.4.3 参考色谱条件

- A.4.3.1 色谱柱：C₁₈柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm；或其他等效的色谱柱。
- A.4.3.2 流动相 A：用氢氧化钠溶液调节磷酸盐缓冲溶液 pH 至 6.5。
- A.4.3.3 流动相 B：按照甲醇溶液：磷酸盐缓冲溶液=35：65（体积比）的比例混合，然后用氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0。
- A.4.3.4 流速：1.1 mL/min。

- A. 4. 3. 5 检测波长：280 nm。
 A. 4. 3. 6 进样量：10 μ L。
 A. 4. 3. 7 柱温：32 $^{\circ}$ C。
 A. 4. 3. 8 梯度程序：见表 A.1。

表 A.1 梯度程序

| 时间/min | 流动相 A/ (%) | 流动相 B/ (%) |
|--------|------------|------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 14 | 45 | 55 |
| 17 | 0 | 100 |
| 24 | 0 | 100 |
| 24.01 | 100 | 0 |
| 33 | 100 | 0 |

A. 4. 4 分析步骤

A. 4. 4. 1 系统适用性溶液的制备

称取约 25 mg 叶酸标准品，约 25 mg 对氨基苯甲酰谷氨酸标准品，约 15 mg 碳酸氢钠，15 mg 碳酸钠，精确至 0.000 1 g，置于 100 mL 容量瓶中，加适量水，超声溶解，再加水稀释至刻度，摇匀。精密量取 1 mL，置另一个 100 mL 容量瓶中，此容量瓶应预先加入 DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品约 50 mg，精确至 0.000 1 g，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。

A. 4. 4. 2 标准溶液的制备

称取 DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品约 25 mg，精确至 0.000 1 g，置于 50 mL 容量瓶中，用近冰点的水溶解并稀释至刻度，摇匀。平行配制 3 份。

A. 4. 4. 3 试样溶液的制备

称取约 25 mg 试样，精确至 0.000 1 g，置于 50 mL 容量瓶中，用近冰点的水溶解并稀释至刻度，摇匀。平行配制两份。

溶液均应现配现用，不应长时间存放，宜在 2 min 内完成。

A. 4. 4. 4 系统适用性试验

分离度：对氨基苯甲酰谷氨酸峰与 JK12A 峰的分离度不小于 6；叶酸峰与 5-甲基四氢叶酸峰的分离度不小于 8。标准溶液配置 3 份，每份各进样 1 针，3 次进样的标准溶液主峰峰面积的相对标准偏差 (RSD) 不应大于 2%。（对氨基苯甲酰谷氨酸、JK12A、叶酸和 5-甲基四氢叶酸依次出峰，相对保留时间分别为：0.29、0.37、0.85、1）。

A. 4. 4. 5 测定

在 A.4.3 参考色谱条件下，按表 A.2 序列进样，并记录色谱图，见图 B.2，以保留时间定性，以峰面积定量。

表 A.2 进样序列

| 次序 | 溶液名称 | 进样针数 | 进样体积/ μL | 运行时间/min |
|----|---------|------|---------------------|----------|
| 1 | 空白溶液 | 1 | 10 | 33 |
| 2 | 系统适用性溶液 | 1 | 10 | 33 |
| 3 | 标准溶液 1# | 1 | 10 | 33 |
| 4 | 标准溶液 2# | 1 | 10 | 33 |
| 5 | 标准溶液 3# | 1 | 10 | 33 |
| 6 | 试样溶液 1# | 1 | 10 | 33 |
| 7 | 试样溶液 2# | 1 | 10 | 33 |

A.4.5 结果计算

6S-5-甲基四氢叶酸钙（以干基计）的质量分数 w_1 ，按公式（A.1）计算：

$$w_1 = \frac{A_u \times W_S \times P}{A_S \times W_u \times (1-w)} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

6S-5-甲基四氢叶酸（以干基计）的质量分数 w_2 ，按公式（A.2）计算：

$$w_2 = w_1 \times \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{A.2})$$

式中：

A_u ——试样中主峰峰面积；

W_S ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

P ——标准品的质量分数，单位为克每百克（g/100g）；

A_S ——标准品主峰峰面积；

W_u ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

w ——试样中水分的质量分数，用百分数（%）表示；

M_1 ——6S-5 甲基四氢叶酸的分子量，459.46；

M_2 ——6S-5 甲基四氢叶酸钙的分子量，497.52。

A.5 相关物质

A.5.1 试剂和材料、仪器和设备、参考色谱条件及分析步骤同 A.4.1、A.4.2、A.4.3、A.4.4。相关物质参考色谱图见图 B.3。

A.5.2 已知杂质的相对保留时间及响应因子见表 A.3。

表 A.3 已知杂质的相关信息

| 已知杂质名称 | 相对保留时间 | 响应因子（RF） |
|----------|--------|----------|
| JK12A | 0.37 | 1.09 |
| 5-甲基四氢噻吩 | 1.10 | 0.67 |

注：未知杂质的响应因子为 1.00，杂质峰小于 0.05% 的色谱峰均忽略不计，视为未检出。

A.5.3 6S-5-甲基四氢叶酸钙中单个杂质（以干基计）的质量分数 w_3 ，按公式（A.3）计算：

$$w_3 = \frac{A_i \times W_s \times P \times F \times M_1}{A_s \times W_u \times (1-w) \times M_2} \times 100\% \quad \text{..... (A.3)}$$

式中：

A_i ——试样中相应各杂质峰面积；

W_s ——标准品的质量，单位为毫克（mg）；

P ——标准品的质量分数，单位为克每百克（g/100g）；

F ——各个杂质相对响应因子；

M_1 ——6S-5-甲基四氢叶酸的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M_1=459.46$ ）；

A_s ——标准品主峰的峰面积；

W_u ——试样的质量，单位为毫克（mg）；

w ——试样中水分的质量分数，用百分数（%）表示；

M_2 ——6S-5-甲基四氢叶酸钙的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M_2=497.52$ ）。

总杂质的质量分数 w_4 ，按公式（A.4）计算：

$$w_4 = \sum w_3 \quad \text{..... (A.4)}$$

式中：

W_3 ——单个杂质的质量分数，用百分数（%）表示。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准，按标准要求保留 1 位有效数字为最终结果。

A.6 D-5 甲基四氢叶酸(6R-5 甲基四氢叶酸)的测定

A.6.1 试剂和材料

A.6.1.1 二水合磷酸二氢钠。

A.6.1.2 乙腈，色谱级。

A.6.1.3 氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠 32 g，用水溶解并稀释至 100 mL。

A.6.1.4 磷酸盐缓冲溶液：称取约 4.54 g 二水合磷酸二氢钠，精确至 0.000 1 g，置于 1 000 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀备用。

A.6.2 仪器和设备

A.6.2.1 电子分析天平。

A.6.2.2 酸度计。

A.6.2.3 高效液相色谱仪：配备紫外检测器。

A.6.3 参考色谱条件

A.6.3.1 色谱柱：人血清白蛋白手性色谱柱，150 mm×4.0 mm，粒径 5 μm；或其他等效的色谱柱。

A.6.3.2 流动相：按照缓冲盐溶液：乙腈=97：3（体积比）的比例混合，然后用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8。过滤，超声脱气。

A.6.3.3 流速：1.0 mL/min。

A.6.3.4 检测波长：280 nm。

A.6.3.5 进样量：10 μL。

A.6.3.6 柱温：40 °C。

A. 6.4 分析步骤

A. 6.4.1 标准溶液的制备

称取 DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品约 25 mg，精确至 0.000 1 g，置于 50 mL 容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。

A. 6.4.2 试样溶液的制备

称取约 50 mg 试样，精确至 0.000 1 g，置于 100 mL 容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。平行配制两份。

A. 6.4.3 系统适用性溶液的制备

精密量取 1.0 mL 标准溶液，置于 50 mL 容量瓶中，用试样溶液稀释至刻度，摇匀。

A. 6.4.4 系统适用性试验

6S-5-甲基四氢叶酸峰与 D-5-甲基四氢叶酸峰的分离度不小于 1.5。6S-5-甲基四氢叶酸和 D-5-甲基四氢叶酸的相对保留时间分别是 1 和 1.5。

A. 6.4.5 测定

按空白（稀释液）1 针、系统适用性溶液 1 针、试样溶液 1 针进样顺序进样，并同时记录色谱图。见图 B.4，以保留时间定性，以峰面积定量。

A. 6.5 结果计算

D-5-甲基四氢叶酸（6R-5 甲基四氢叶酸）的质量分数 w_5 ，按公式（A.5）计算：

$$w_5 = \frac{A_D}{A_T} \times 100\% \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

A_D —— 试样中 D-5-甲基四氢叶酸的峰面积；

A_T —— 试样中 6S-5-甲基四氢叶酸的峰面积和 D-5 甲基四氢叶酸的峰面积之和。

A. 7 氯离子（以 Cl⁻ 计）的测定

A. 7.1 试剂和材料

A. 7.1.1 硝酸。

A. 7.1.2 硝酸银标准滴定溶液： $c(\text{AgNO}_3) = 0.005 \text{ mol/L}$ 。

A. 7.2 仪器和设备

A. 7.2.1 电位滴定仪。

A. 7.2.2 滴定管。

A. 7.3 分析步骤

称取约 0.3 g 试样，精确至 0.000 1 g，置于 200 mL 烧杯中，加 75 mL 水。将烧杯置于蒸汽浴中加热。加 1 mL 硝酸，置于电位滴定仪的磁力搅拌器上，用滴定管滴加硝酸银标准滴定溶液至电位终点。

A.7.4 结果计算

氯离子的质量分数 w_6 ，按公式 (A.6) 计算：

$$w_6 = \frac{c \times V \times M}{m} \times 100\% \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

c ——硝酸银标准溶液的浓度，单位为摩尔每升 (mol/L)；

V ——硝酸银标准滴定溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

M ——氯的毫摩尔质量，单位为克每毫摩尔 (g/mmol) ($M=0.03545$)；

m ——试样的质量，单位为克 (g)。

计算结果表示到小数点后 1 位。取两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

A.8 残留溶剂（乙醇）的测定

A.8.1 试剂和材料

A.8.1.1 水：GB/T6682 中规定的一级水。

A.8.1.2 乙醇标准品。

A.8.2 仪器和设备

气相色谱仪：配备氢火焰离子化检测器 (FID) 和顶空进样器。

A.8.3 参考色谱条件

A.8.3.1 色谱柱：固定液为 5% 苯基-95% 甲基聚硅氧烷的石英毛细管柱，30 m×0.32 mm，膜厚 0.25 μm；或其他等效的色谱柱。

A.8.3.2 载气：氮气。

A.8.3.3 载气流量：1.3 mL/min。

A.8.3.4 柱温：40 °C 保持 4 min，以 15 °C/min 的速率升温至 200 °C，保持 5 min。

A.8.3.5 汽化温度：180 °C。

A.8.3.6 检测器温度：250 °C。

A.8.3.7 进样量：0.25 μL。

A.8.3.8 分流比：20 : 1。

A.8.4 参考顶空进样条件

A.8.4.1 顶空瓶平衡温度：80 °C。

A.8.4.2 定量环温度：95 °C。

A.8.4.3 传输线温度：105 °C。

A.8.4.4 试样加热时间：30 min。

A.8.5 分析步骤

A.8.5.1 标准溶液的制备

称取约 1 g 乙醇标准品，精确至 0.000 1 g，置于 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。精密量取 10 mL 上述溶液，置于 100 mL 容量瓶中，加水定容，混匀。精密量取 5 mL 上述溶液，置于顶空瓶中，作为标准溶液。

A. 8. 5. 2 试样溶液的制备

称取约 1 g 试样，精确至 0.000 1 g，置于顶空瓶中，精密量取 5 mL 水，混匀。作为试样溶液。平行配制两份。

A. 8. 5. 3 测定

取标准溶液和试样溶液，分别进样。

A. 8. 6 结果计算

残留溶剂（乙醇）的质量分数为 w_7 ，按公式（A.7）计算：

$$w_7 = \frac{C_S \times A_T}{C_T \times A_S} \times 100\% \dots\dots\dots (A.7)$$

式中：

C_S ——标准溶液中乙醇的浓度，单位为克每毫升（g/mL）；

A_T ——试样中乙醇色谱峰的峰面积；

C_T ——试样中 6S-5-甲基四氢叶酸钙的浓度，单位为克每毫升（g/mL）；

A_S ——标准溶液中乙醇色谱峰的峰面积。

取两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

A. 9 溶解性的测定

A. 9. 1 仪器和设备

A. 9. 1. 1 250 mL 具塞锥形瓶。

A. 9. 1. 2 电子分析天平。

A. 9. 2 分析步骤

称取约 0.5 g 试样，精确至 0.000 1 g，置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入（25±2）℃的水 100 mL，震荡，肉眼观察，2 min 内无颗粒悬浮物即溶解。

A. 10 基因毒性杂质的测定

A. 10. 1 试剂和材料

A. 10. 1. 1 乙腈：色谱级。

A. 10. 1. 2 磷酸：分析纯。

A. 10. 1. 3 氢氧化钠：分析纯。

A. 10. 1. 4 苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯、苯磺酸异丙酯标准品。

A. 10. 2 仪器和设备

A. 10. 2. 1 电子分析天平。

A. 10. 2. 2 液相色谱仪。

A. 10. 3 参考色谱条件

A. 10. 3. 1 色谱柱：Kromasil 4.6×250 mm，5 μm。

A. 10. 3. 2 流动相：水：乙腈=50：50（体积比）。

A. 10. 3. 3 检测波长：217 nm。

A. 10. 3. 4 柱温：30 °C。

A. 10. 3. 5 进样量：20 μL。

A. 10. 3. 6 流速：1 mL/min。

A. 10. 4 分析步骤

A. 10. 4. 1 供试品溶液的制备

临用新制。取本品约 20 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。

A. 10. 4. 2 标准品溶液的制备

临用新制。取苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯标准品各约 15 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 0.2 mL，置 100 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。

A. 10. 4. 3 测定

精密量取供试品溶液与标准品溶液各 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯的含量。

A. 10. 5 结果计算

苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯、苯磺酸异丙酯含量 w_8 计算，按公式 (A.8) 计算：

$$w_8 = \frac{A_i \times M_s \times F \times V_i}{A_s \times M_i \times V_s} \times 100\% \dots\dots\dots (A.8)$$

式中：

- A_i —— 供试品溶液中苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯的峰面积；
- M_s —— 苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯标准品的称样量，单位为毫克 (mg)；
- F —— 苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯标准品的含量，用百分数 (%) 表示；
- V_i —— 供试品的稀释倍数；
- A_s —— 标准品溶液中苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯的峰面积；
- M_i —— 供试品称样量，单位为毫克 (mg)；
- V_s —— 苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯标准品的稀释倍数。

A. 11 铂的测定

A. 11. 1 试剂和材料

A. 11. 1. 1 浓硝酸。

A. 11. 1. 2 浓盐酸。

A. 11. 1. 3 异丙醇：色谱级。

A. 11. 1. 4 超纯水。

A. 11. 1. 5 铜 (Au) 元素标准溶液 (浓度 1 000 μg/mL)。

A. 11. 1. 6 铂 (Pt) 元素标准溶液 (浓度 1 000 μg/mL)。

A. 11. 1. 7 钪 (Sc) 元素标准溶液 (浓度 1 000 μg/mL)。

- A. 11. 1. 8 铟 (In) 元素标准溶液 (浓度 1 000 $\mu\text{g/mL}$)。
- A. 11. 1. 9 铋 (Bi) 元素标准溶液 (浓度 1 000 $\mu\text{g/mL}$)。
- A. 11. 1. 10 锗 (Ge) 元素标准溶液 (浓度 1 000 $\mu\text{g/mL}$)。

A. 11. 2 仪器和设备

- A. 11. 2. 1 电感耦合等离子体质谱仪。
- A. 11. 2. 2 电子天平。

A. 11. 3 电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS 条件

见表 A.4。

表 A. 4 ICP-MS 条件

| 参 数 | 数 值 | 参 数 | 数 值 |
|------------------|-------|-----------------------------|------|
| 射频功率/W | 1 550 | 雾化室冷却温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 2.7 |
| 等离子体气流速/ (L/min) | 14 | 停留时间/s | 0.02 |
| 采集模式 | KED | 采样深度/mm | 5.00 |
| 提取时间/s | 50 | 清洗时间/s | 40 |

A. 11. 4 分析步骤

A. 11. 4. 1 稀释剂的制备

稀释剂 (2% HNO_3 +1% HCl) 的制备: 量取 40 mL 浓硝酸, 及 20 mL 浓盐酸, 加水稀释至 2 000 mL, 摇匀。

A. 11. 4. 2 内标溶液的制备

内标溶液 (Sc: 50 ng/mL; In: 50 ng/mL; Bi: 50 ng/mL; Ge: 50 ng/mL): 精密移取 Sc 元素标准溶液 0.10 mL、In 元素标准溶液 0.10mL、Bi 元素标准溶液 0.10mL 和 Ge 元素标准溶液 0.10mL 至 10 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 得到的内标溶液浓度分别为 Sc: 10 000 ng/mL; In: 10 000 ng/mL; Bi: 10 000 ng/mL; Ge: 10 000 ng/mL。再精密移取 1.00 mL 内标溶液 (Sc: 10 000 ng/mL; In: 10 000ng/mL、Bi: 10 000 ng/mL; Ge: 10 000 ng/mL) 及 10 mL 异丙醇至 200 mL 容量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 3 储备溶液的制备

储备溶液 (Pt: 5 000 ng/mL): 精密移取 Pt 元素标准溶液 0.50 mL 至 100 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 4 线性溶液的制备

A. 11. 4. 4. 1 线性溶液 1 (Pt: 20 ng/mL): 精密移取 0.10 mL 储备溶液至 25 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 4. 2 线性溶液 2 (Pt: 50 ng/mL): 精密移取 0.25 mL 储备溶液至 25 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 4. 3 线性溶液 3 (Pt: 100 ng/mL) : 精密移取 0.50 mL 储备溶液至 25 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 4. 4 线性溶液 4 (Pt: 150 ng/mL) : 精密移取 0.75 mL 储备溶液至 25 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 4. 5 线性溶液 5 (Pt: 200 ng/mL) : 精密移取 1.00 mL 储备溶液至 25 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 5 供试品溶液的制备

取本品约 100 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。

A. 11. 4. 6 测定

取线性溶液、供试品溶液进样分析。

A. 11. 4. 7 结果计算

铂的含量 w_9 计算, 按公式 (A.9) 计算:

$$w_9 = \frac{C \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (A.9)$$

式中:

w_9 ——供试品铂的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

C ——供试品溶液中铂的质量浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

m ——供试品的称样量, 单位为毫克 (mg);

V ——供试品的稀释体积, 单位为毫升 (mL)。

附录 B
(资料性)
色谱图

B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图

见 B.1。

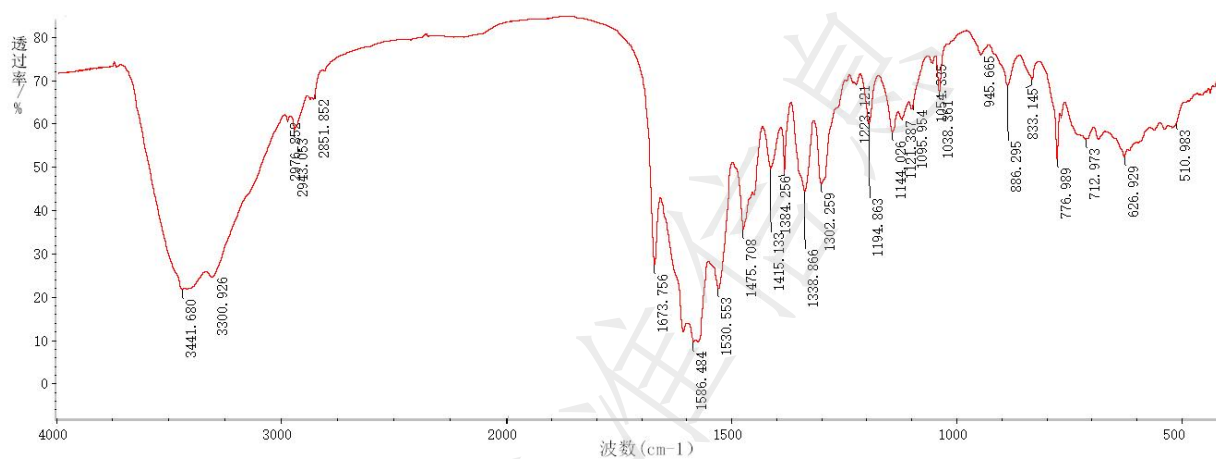


图 B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图

B.2 6S-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图

见图 B.2。

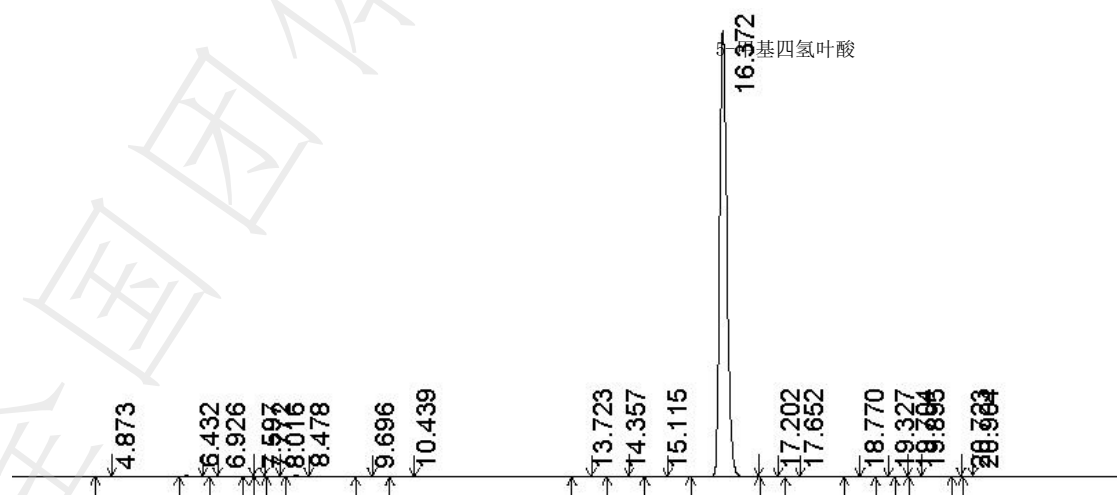
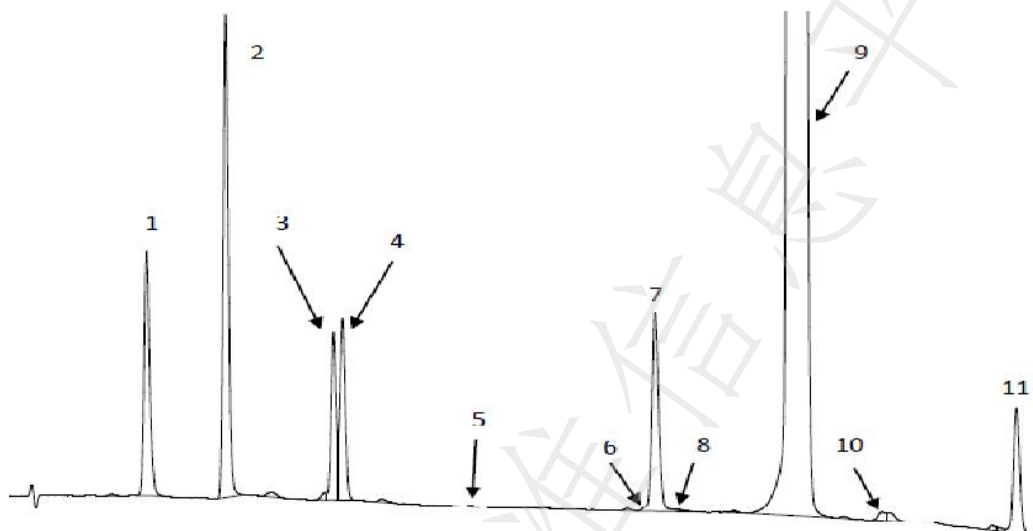


图 B.2 6S-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图

B.3 6S-5-甲基四氢叶酸钙中相关物质参考色谱图

见图 B.3。



标引序号说明：

- 1——对氨基苯甲酰谷氨酸；
- 2——JK12A；
- 3——D-吡嗪-s-三嗪衍生物；
- 4——L-吡嗪-s-三嗪衍生物；
- 5——四氢叶酸；
- 6——7,8-二氢叶酸；
- 7——叶酸；
- 8——5,10-亚甲基四氢叶酸；
- 9——5-甲基四氢叶酸；
- 10——5-甲基四氢蝶酸；
- 11——N₂-甲基四氢叶酸。

图 B.3 6S-5-甲基四氢叶酸钙中相关物质参考色谱图

B.4 D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)参考色谱图

见图 B.4。

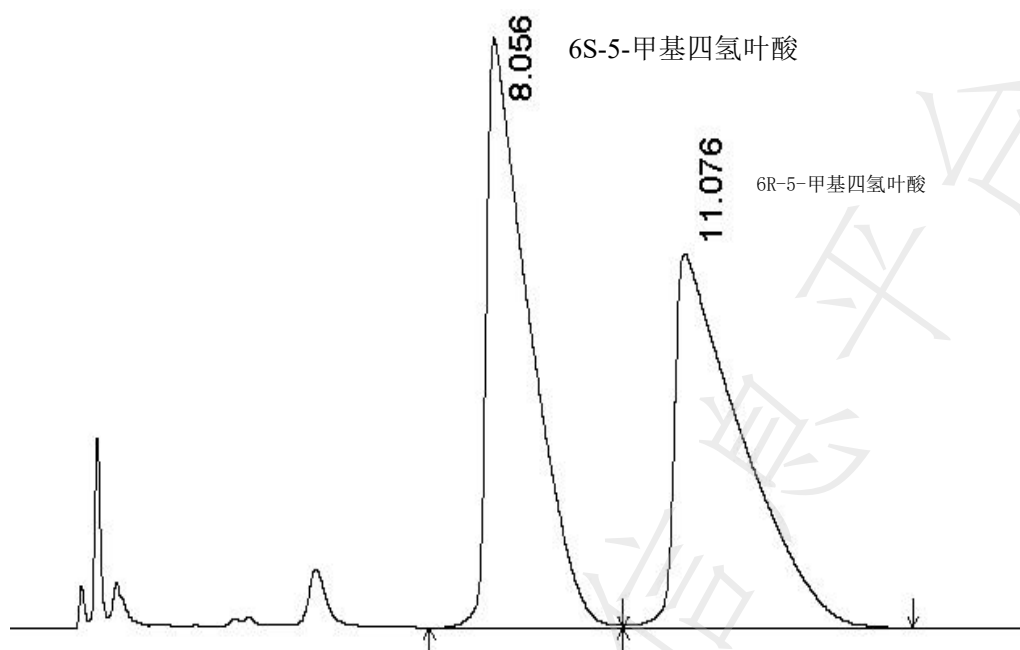


图 B.4 D-5-甲基四氢叶酸（6R-5-甲基四氢叶酸）参考色谱图

B.5 基因毒杂质的色谱图

见图 B.5、B.6。

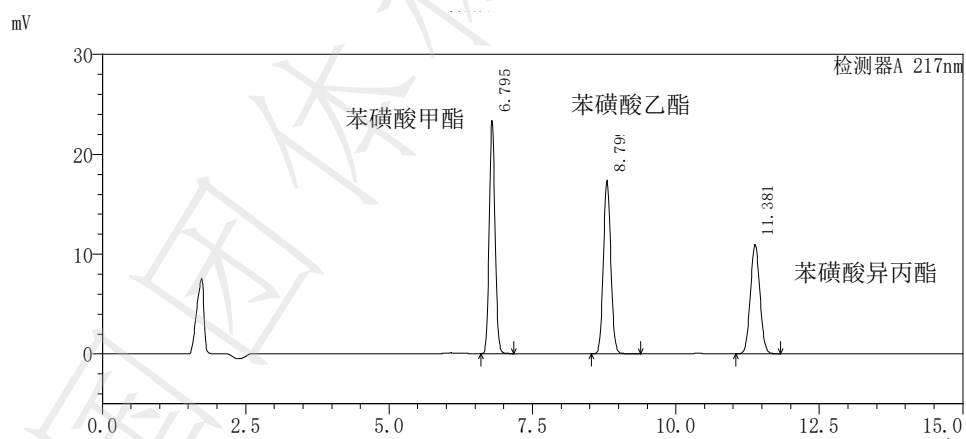


图 B.5 对照品溶液色谱图

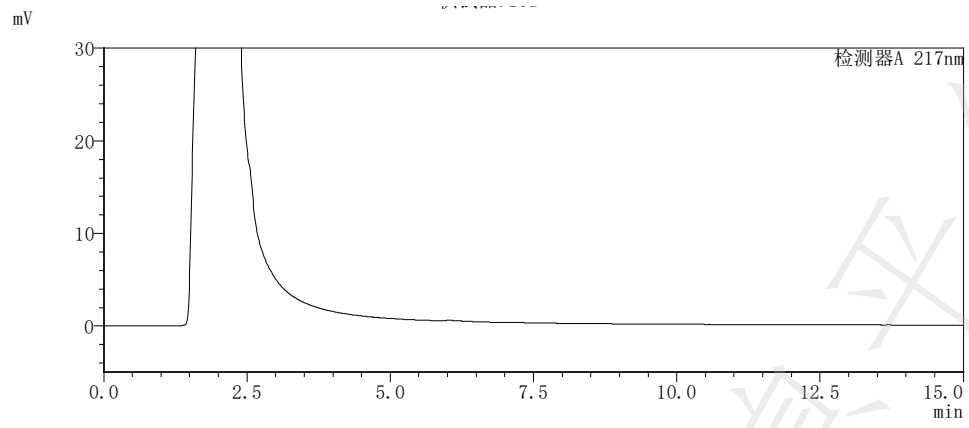


图 B.6 供试品溶液色谱图

参 考 文 献

- [1] 《关于食品营养强化剂新品种6S-5-甲基四氢叶酸钙以及氮气等8种扩大使用范围的食物添加剂的公告（2017年 第13号）》
-

全国团体标准信息平台