

## 附件 1

# 食品营养强化剂新品种 6S-5-甲基四氢叶酸钙

英文名称：6S-5-methyltetrahydrofolate calcium

功能分类：食品营养强化剂

### (一) 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（儿童用乳粉和孕产妇用乳粉除外）	2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	以叶酸计
14.06	固体饮料类	600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	

### (二) 质量规格要求

#### 1 范围

本标准适用于以叶酸和氯化钙为原料，经还原、环合、拆分、成盐等工艺制得食品营养强化剂 6S-5-甲基四氢叶酸钙。

#### 2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

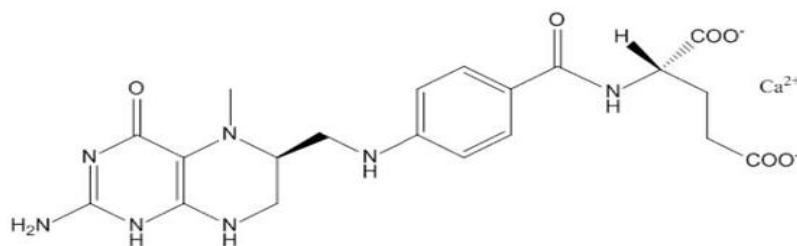
##### 2.1 化学名称

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。

##### 2.2 分子式



##### 2.3 结构式



##### 2.4 相对分子质量

497.5（按2007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	

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	
6S-5-甲基四氢叶酸钙(以干基计), w/%	95.0~102.0	附录 A 中 A.4	
水分, w/%	6.0~17.0	GB 5009.3 第四法	
钙含量(以干基计), w/%	7.0~8.5	GB 5009.92 滴定法	
相关物质	JK12A <sup>a</sup> , w/% ≤	0.1	附录 A 中 A.5
	5-甲基四氢噻吩, w/%	不得检出	
	总杂质, w/% ≤	0.5	
D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)含量, w/% ≤	0.1	附录 A 中 A.6	
重金属(以 Pb 计) / (mg/kg) ≤	20	GB 5009.74	
砷(As) / (mg/kg) ≤	1.5	GB 5009.11	
铅(Pb) / (mg/kg) ≤	1.0	GB 5009.12	
镉(Cd) / (mg/kg) ≤	0.5	GB 5009.15	
汞(Hg) / (mg/kg) ≤	1.5	GB 5009.17	
氯离子(以 Cl 计), w/% ≤	0.5	附录 A 中 A.7	
溶剂残留(乙醇), w/% ≤	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	

<sup>a</sup> 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

3.3 微生物指标

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) ≤	1000	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)	不得检出	GB 4789.4、GB 4789.5、GB 4789.10

## 附录 A 检验方法

### A.1 安全提示

本标准试验方法中使用的部分试剂具有毒性或腐蚀性，按相关操作规定操作，操作时需小心谨慎。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，要在通风厨中进行。

### A.2 一般规定

本标准所用试剂和水，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 6040-2002 红外光谱分析方法通则中 5.3.1 压片法进行，要求与标准品图谱一致。标准图谱见图 B.8。

### A.4 6S-5-甲基四氢叶酸钙含量测定（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：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，摇匀备用。

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 0.0001 g，置于 1000 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： $C_{18}$ 柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5  $\mu$ m；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缓冲盐溶液 pH 至 6.5。

A.4.3.3 流动相 B：按照甲醇溶液：缓冲盐溶液=35：65（V/V）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  $\mu$ L。

A.4.3.7 柱温：32  $^{\circ}$ C。

A.4.3.8 梯度程序：

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 0.0001 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, 此容量瓶需预先加入约 50 mg DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品, 精确至 0.0001 g, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。

##### A.4.4.2 标准溶液的制备

称取约 25 mg DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品, 精确至 0.0001 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。平行配制三份。

##### A.4.4.3 试样溶液的制备

称取约 25 mg 试样, 精确至 0.0001 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。

注: 溶液均需现配现用, 不得长时间存放, 最好 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度不小于 8; 标准溶液配置三份, 每份各进样一针, 三次进样的标准溶液主峰峰面积的相对标准偏差(RSD)应不大于 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, 参考图 B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙色谱图, 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：

$$w_1 = \frac{A_u \times W_s \times P}{A_s \times W_u \times (1 - w)} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

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，g/100 g；
- $A_s$  ——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，%。

### 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.2、B.3、B.4、B.5、B.6。
- 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 结果计算

6S-5-甲基四氢叶酸钙中单个杂质(以干基计)的质量分数  $w_2$ ，按式（A.2）计算：

$$w_2 = \frac{A_i \times W_s \times P \times F \times M_1}{A_s \times W_u \times (1 - w) \times M_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

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，g/100 g；
- $F$  ——单个杂质的响应因子；
- $M_1$  ——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，%；
- $M_2$  ——6S-5-甲基四氢叶酸钙的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）（ $M_2=497.52$ ）。

总杂质的质量分数按式  $w_3$ ，按式（A.3）计算：

$$w_3 = \sum w_2 \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

$w_2$ ——单个杂质的质量分数（%）。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准，按标准要求保留一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 0.0001 g，置于 1000 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×4.6 mm，粒径 5  $\mu\text{m}$ ；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（V/V）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  $\mu\text{L}$ 。

A. 6. 3. 6 柱温：40  $^{\circ}\text{C}$ 。

### A. 6. 4 分析步骤

#### A. 6. 4. 1 标准溶液的制备

称取约 25 mg DL-5-甲基四氢叶酸钙标准品，精确至 0.0001 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 0.0001 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度度不小于 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。参考图 B. 7 D-5-甲基四氢叶酸（6R-5-甲基四氢叶酸）的色谱图，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  $w_4$ ，按式（A.4）计算：

$$w_4 = \frac{A_D}{A_T} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

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 0.0001 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  $w_5$ ，按式（A.5）计算：

$$w_5 = \frac{c \times V \times M}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

$c$ ——硝酸银标准溶液浓度，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一位。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 0.0001 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 0.0001 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. 5 结果计算**

残留溶剂（乙醇）的质量分数为  $w_6$ ，按式（A.6）计算：

$$w_6 = \frac{C_S \times A_T}{C_T \times A_S} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.6)$$

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 0.0001 g，置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 100 mL 25 °C ± 2 °C 的水，震荡 2 min 内溶解澄清。



附录 B

6S-5-甲基四氢叶酸钙、相关物质、D-5-甲基四氢叶酸（6R-5-甲基四氢叶酸）参考色谱图和  
6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图

B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图

6S-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图见图B.1。

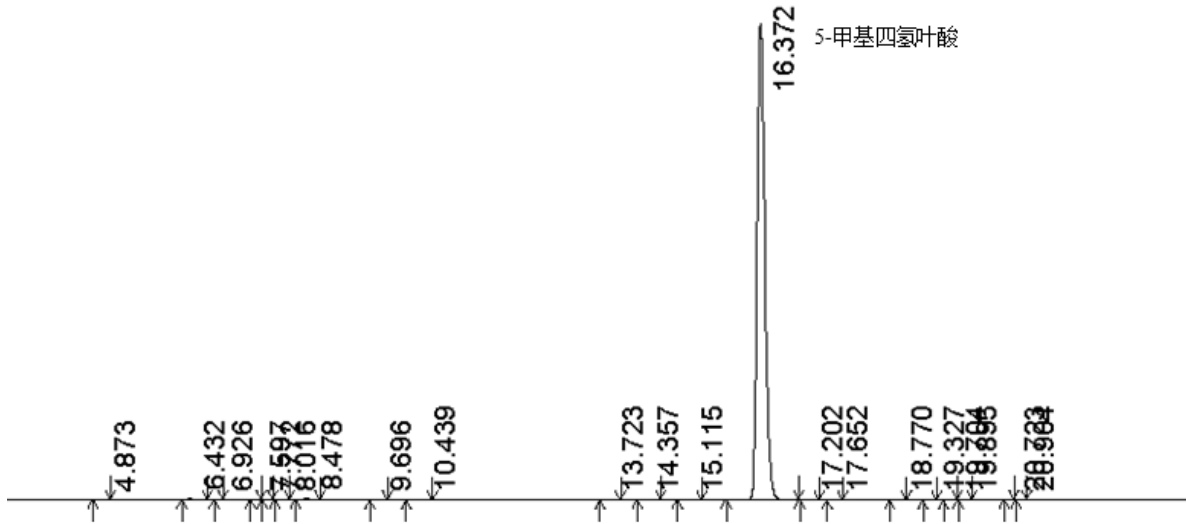


图 B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图

B.2 相关物质的参考色谱图

JK12A 参考色谱图见图 B.2。

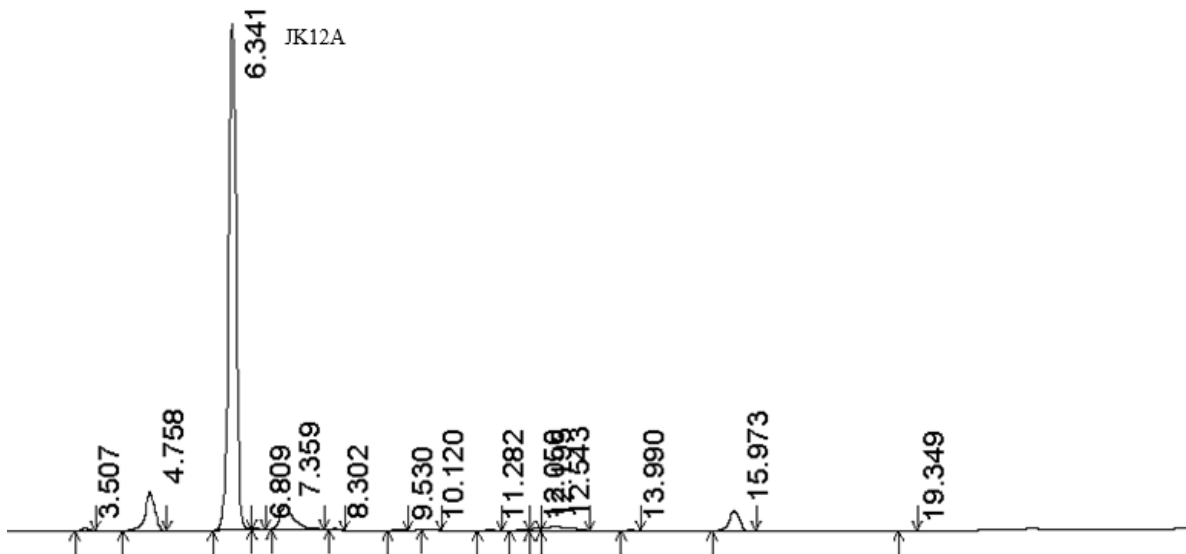


图 B.2 JK12A 参考色谱图

5-甲基四氢蝶酸参考色谱图见图 B.3。

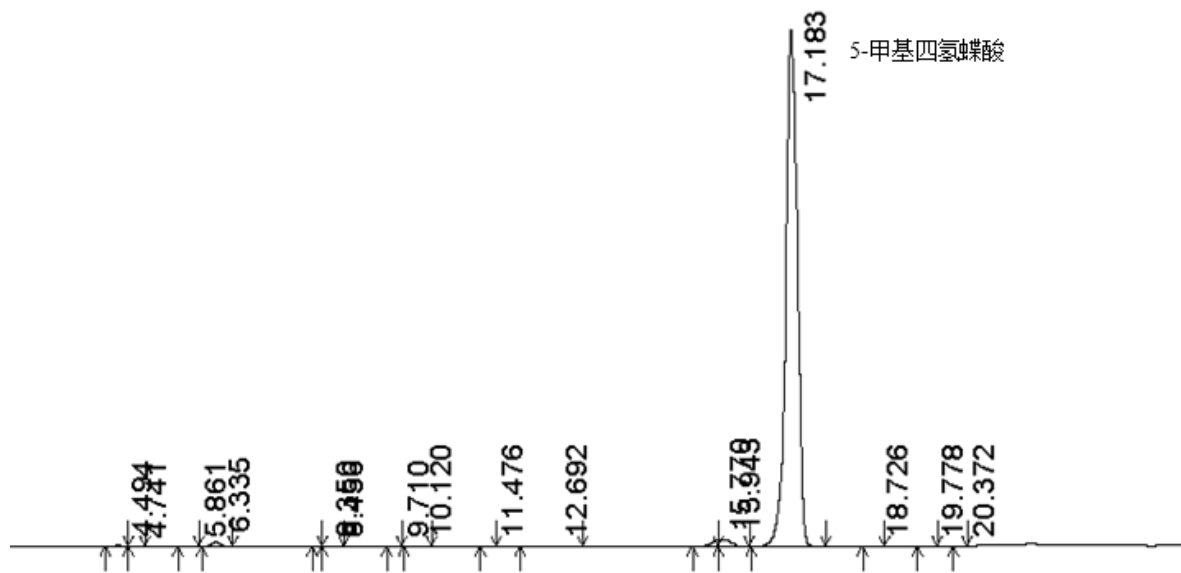


图 B.3 5-甲基四氢蝶酸参考色谱图

叶酸参考色谱图见图 B.4。

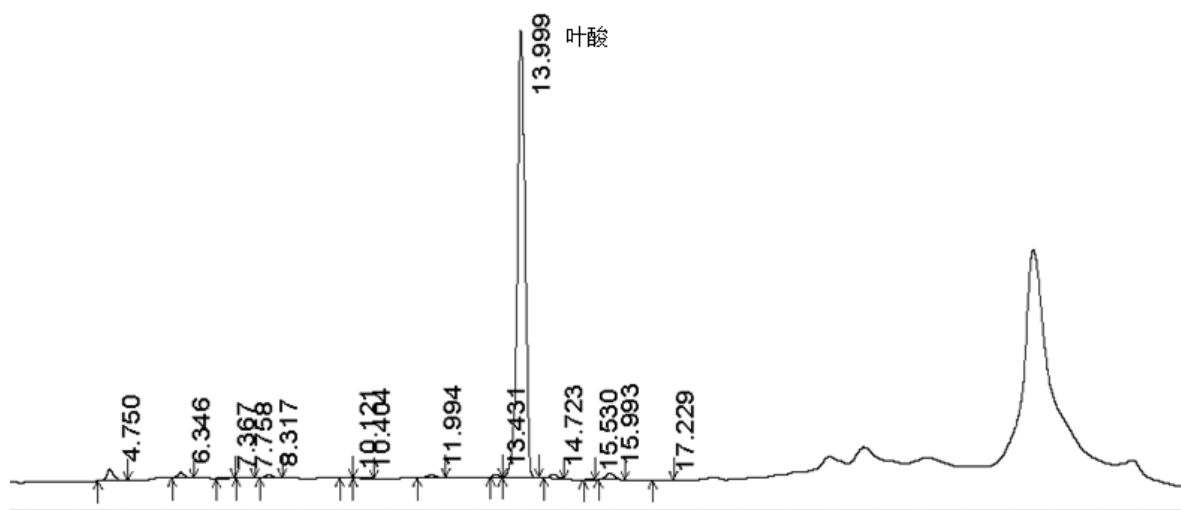


图 B.4 叶酸参考色谱图

对氨基苯甲酰谷氨酸参考色谱图见图 B.5。

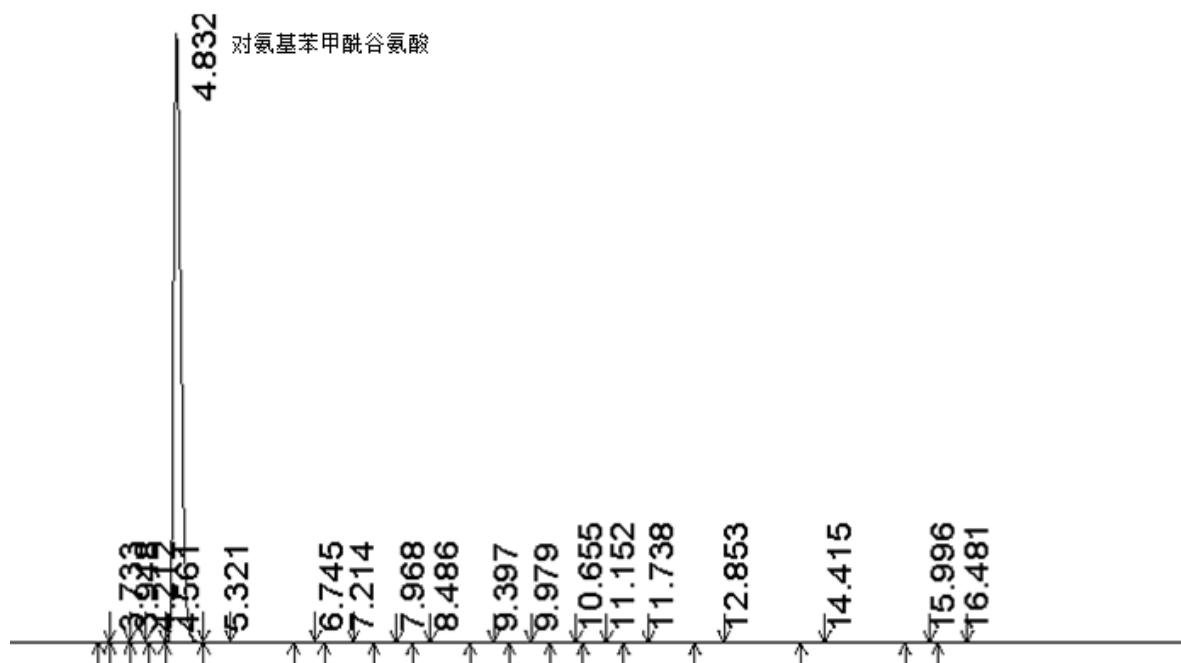


图 B.5 对氨基苯甲酰谷氨酸参考色谱图

DL-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图见图 B.6。

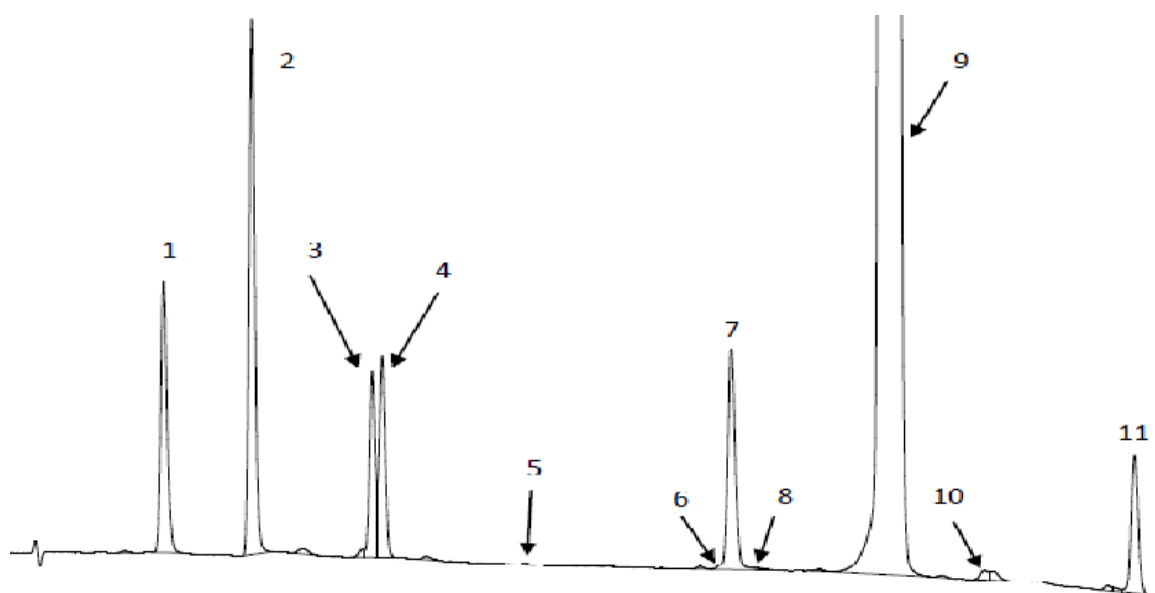


图 B.6 DL-5-甲基四氢叶酸钙参考色谱图

- 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: N<sub>2</sub>-甲氨基四氢叶酸。

### B.3 D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)参考色谱图

D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)参考色谱图见图 B.7。

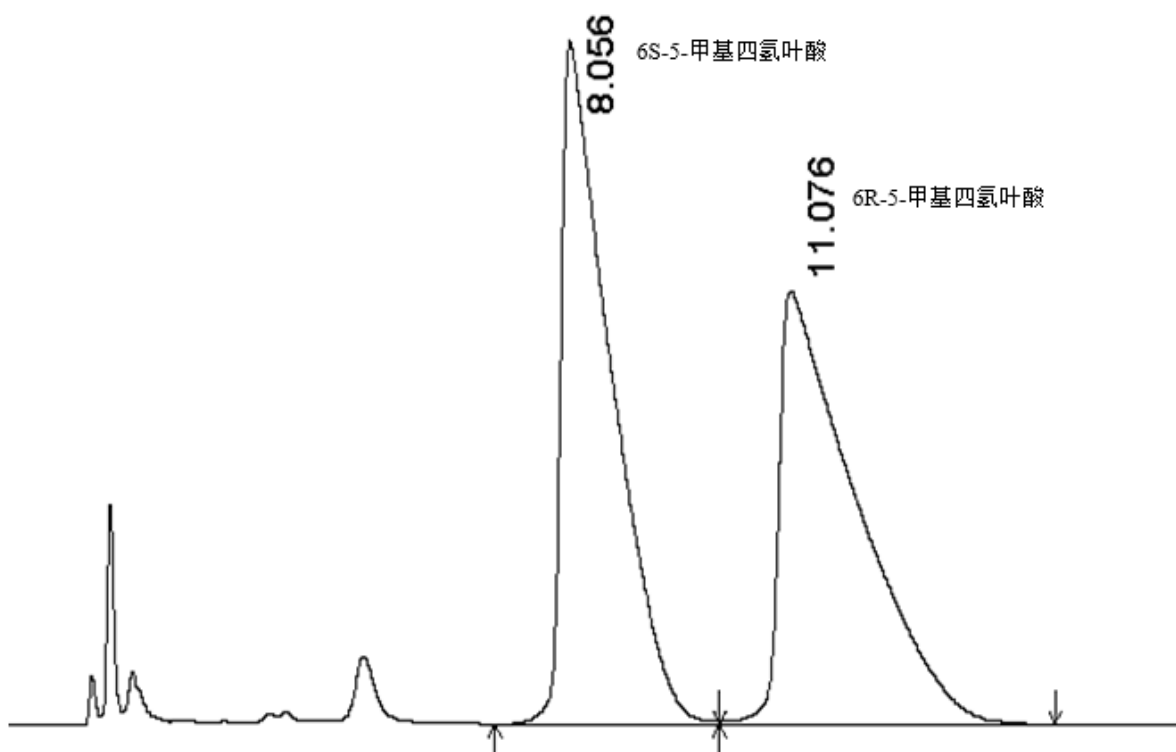


图 B.7 D-5-甲基四氢叶酸(6R-5-甲基四氢叶酸)参考色谱图

#### B.4 6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图

6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图见图 B.8。

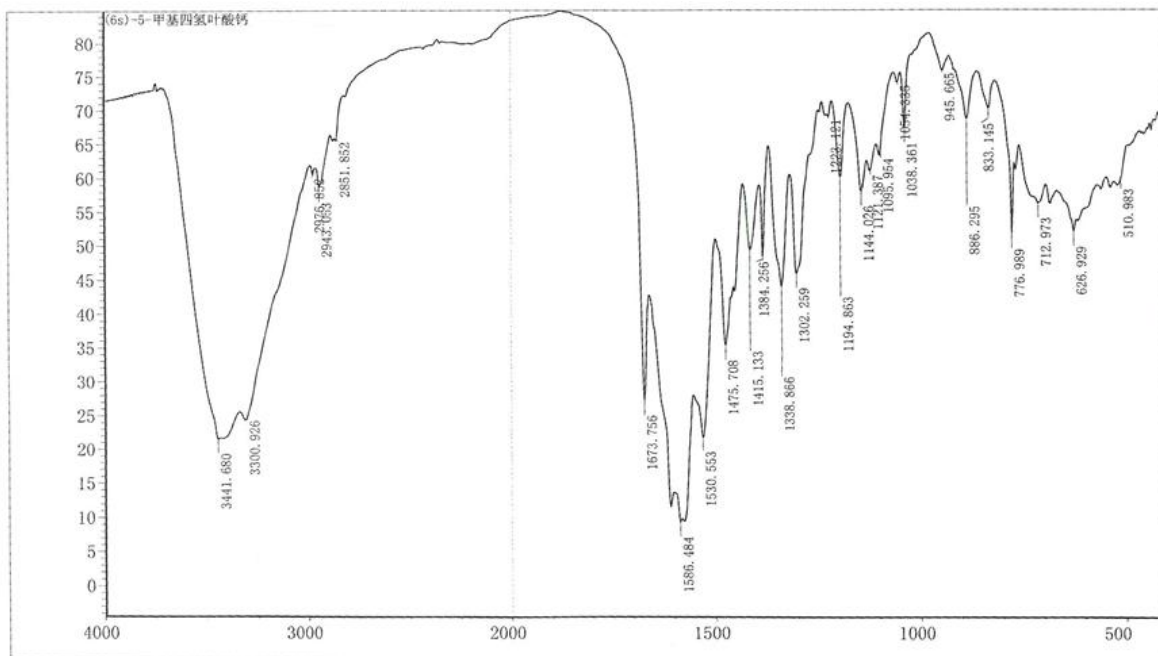


图 B.8 6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图