



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—×××××

食品安全国家标准

食品营养强化剂 (6S)-5-甲基四氢叶酸, 氨基葡萄糖盐

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

食品安全国家标准

食品营养强化剂 (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐

1 范围

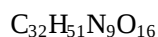
本标准适用于以叶酸为原料，经甲基化、盐化、结晶、冻干等工艺制得食品营养强化剂(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐。

2 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

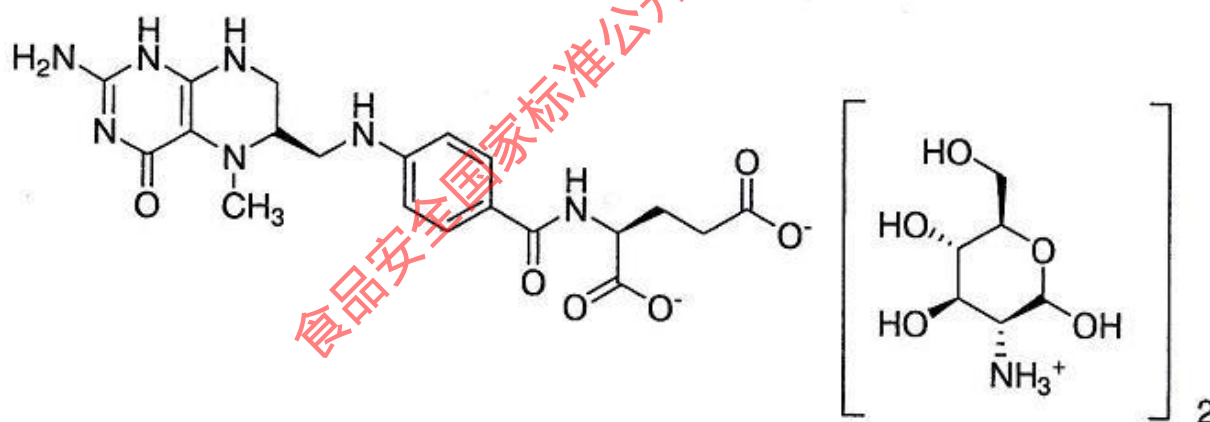
2.1 化学名称

N-[4-[[[(6S)-2-氨基-1,4,5,6,7,8-六氢-5-甲基-4-氧代-6-蝶啶]甲基]氨基]苯甲酰]-L-谷氨酸，氨基葡萄糖盐

2.2 分子式



2.3 结构式



2.4 相对分子质量

817.80（无水物）（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 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色 泽	乳白色至淡棕色	取适量试样置于洁净、干燥的白瓷盘中，在自然光线下观察其色泽、状态，嗅其气味
状 态	粉末，无肉眼可见杂质	
气 味	无异臭	

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，氨基葡萄糖盐 (以干基计)，w/%	96.0~105.0	附录 A 中 A.4
(6S)-5-甲基四氢叶酸（以干基计）， w/%	54.0~59.0	附录 A 中 A.4
氨基葡萄糖（以干基计），w/%	34.0~46.0	附录 A 中 A.5
非对映异构体（(6S)-5-甲基四氢叶 酸），% $\geq$	99.0	附录 A 中 A.6
水分，w/% $\leq$	8.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
灰分，w/% $\leq$	0.2	GB 5009.4
杂 质	总杂质，w/% $\leq$	附录 A 中 A.7
	4-氨基苯甲酰谷氨酸（ABGA）， w/% $\leq$	
	4 α -羟基-5-甲基四氢叶酸 （HOMeTHFA），w/% $\leq$	
	（6S）-吡嗪-s-三嗪衍生物 [（6S）-Mefox]，w/% $\leq$	
	5-甲基四氢蝶酸（MeTHPA）， w/% $\leq$	
总砷（以 As 计）/（mg/kg） $\leq$	2.0	GB 5009.11 或 GB 5009.76
铅（Pb）/（mg/kg） $\leq$	2.0	GB 5009.12 或 GB 5009.75
镉（Cd）/（mg/kg） $\leq$	1.0	GB 5009.15
总汞（以 Hg 计）/（mg/kg） $\leq$	0.1	GB 5009.17

附录 A

检验方法

A.1 安全提示

本标准中使用的部分试剂具有毒性或腐蚀性，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，要在通风橱中进行。

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、杂质测定用标准溶液、制剂及其制品，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。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.3 鉴别试验

A.3.1 红外吸收光谱法

采用溴化钾压片法，按照GB/T 32199进行试验，试样的红外光吸收图谱应与对照品的图谱一致（对照品图谱见图B.1）。

A.4 (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐和(6S)-5-甲基四氢叶酸（以干基计）的测定

A.4.1 方法提要

试样用水溶解后，采用液相色谱分离，紫外检测器或其他等效检测器检测，标准单点法定量。

A.4.2 试剂和材料

A.4.2.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.4.2.2 乙腈：色谱纯。

A.4.2.3 磷酸二氢钾。

A.4.2.4 氢氧化钾。

A.4.2.5 (6S)-5-甲基四氢叶酸钙标准品：纯度 $\geq 98.0\%$ ，CAS 号：151533-22-1，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.4.2.6 氢氧化钾溶液：20 g/100 mL。称取 20 g 氢氧化钾，加水溶解，并定容至 100 mL。

A.4.2.7 磷酸二氢钾溶液（pH6.5）：称取约 6.80 g 磷酸二氢钾，精确至 0.0001 g，加水 900 mL 溶解，用氢氧化钾溶液调节 pH 至 6.5，加水定容至 1000 mL。摇匀，过滤并超声后备用。

A.4.2.8 磷酸二氢钾-乙腈溶液（pH8.0）：称取约 4.08 g 磷酸二氢钾，精确至 0.0001 g，加水 600 mL 溶解，与 350 mL 乙腈混合，用氢氧化钾溶液调节 pH 至 8.0，加水定容至 1000 mL。摇匀，过滤并超声后备用。

A.4.3 仪器和设备

A.4.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外吸收检测器，或其他等效的检测器。

A.4.3.2 电子天平：感量 0.0001 g。

- A.4.3.3 酸度计。
- A.4.3.4 超声波清洗器。
- A.4.4 色谱参考条件
- A.4.4.1 色谱柱：C₁₈ 柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm；或其他等效的色谱柱。
- A.4.4.2 流速：1.0 mL/min。
- A.4.4.3 检测波长：280 nm。
- A.4.4.4 柱温：25 ℃。
- A.4.4.5 进样量：10 μL。
- A.4.4.6 流动相：流动相A：磷酸二氢钾溶液(pH6.5)(A.4.2.6),流动相B：磷酸二氢钾-乙腈溶液(pH8.0)(A.4.2.7)，采用梯度洗脱，梯度洗脱程序如表A.1所示。

表 A.1 梯度程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
15	60	40
17	30	70
22	30	70
31	100	0
36	100	0

A.4.5 分析步骤

A.4.5.1 标准溶液的制备

称取0.0433 g的(6S)-5-甲基四氢叶酸钙标准品(相当于0.040 g(6S)-5-甲基四氢叶酸)，精确至0.0001g，置于100 mL容量瓶中，先用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20 ℃环境下(在超声浴中放入冰块)超声2 min，经0.45 μm滤膜过滤后立即进样。

A.4.5.2 试样溶液的制备

称取约0.070 g试样，精确至0.0001 g，置于100 mL容量瓶中，先用少量水溶解，再用水稀释至刻度，摇匀。所得溶液在低于20 ℃环境下(在超声浴中放入冰块)超声2 min，经0.45 μm滤膜过滤后立即进样。平行配制两份。

注1：溶液均需现配现用，不得长时间存放。

A.4.5.3 系统适用性试验

按照以下步骤执行系统适用性试验。使用带冷却功能的自动进样器，设置温度低于8℃；若使用不带冷却功能的进样器，进样前需将溶液在2℃~8℃下储存。进行六次标准溶液进样，计算表A.2参数。

表 A.2 系统适用性试验参数

参数	限值
RSD（峰面积），% ≤	2.0
RSD（保留时间），% ≤	1.0
拖尾因子 ≤	2
理论塔板数 ≥	40000

A.4.5.4 测定

在A.4.4色谱条件下，将水（不含溶质）注入，按照上述时间运行色谱仪。然后分别对标准溶液和试样溶液进行色谱分析。以保留时间定性，以峰面积定量。(6S)-5-甲基四氢叶酸参考色谱图见图C.1，(6S)-5-甲基四氢叶酸的保留时间(Rt)：约11 min。

注2：分析结束后，使用乙腈和水（65：35）的混合溶液冲洗色谱柱，随后用乙腈和水（65：35）混合溶液封柱。

A.4.6 结果计算

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

$$w_1 = \frac{A_{c1} \times m_{std1} \times T\%}{A_{std1} \times m_{c1} \times (100\% - M)} \times 100\% \quad \text{..... (A.1)}$$

式中：

A_{c1} ——试样溶液色谱图中(6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积；

m_{std1} ——标准品的质量，单位为克（g）；

$T\%$ ——(6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品中(6S)-5-甲基四氢叶酸的质量分数，%；

A_{std1} ——标准溶液色谱图中(6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积；

m_{c1} ——试样的质量，单位为克（g）；

M ——试样中水分的质量分数，%。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 2%。

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

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

式中：

w_1 ——(6S)-5-甲基四氢叶酸（以干基计）的质量分数，单位为百分之百（%）；

M_1 ——(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的摩尔质量，单位为克/摩尔（g/mol）

（ $M_{C_{32}H_{51}N_5O_6}=817.80$ ）；

M_2 ——(6S)-5-甲基四氢叶酸的摩尔质量，单位为克/摩尔（g/mol）（ $M_{C_{20}H_{29}N_7O_6}=459.45$ ）。

A.5 氨基葡萄糖（以干基计）的测定

A.5.1 方法提要

试样用乙腈-水溶液溶解后，采用液相色谱分离，紫外检测器或其他等效检测器检测，标准单点法定量。

A.5.2 试剂和材料

A.5.2.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.5.2.2 乙腈：色谱纯。

A.5.2.3 氢氧化钾。

A.5.2.4 85%磷酸。

A.5.2.5 D-(+)-氨基葡萄糖盐酸盐标准品：摩尔质量 $M_{C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl}=215.63$ g/mol，纯度 $\geq 98.0\%$ ，CAS 号：66-84-2，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.5.2.6 氢氧化钾溶液：20 g/100 mL。称取 20 g 氢氧化钾，加水溶解，并定容至 100 mL。

A.5.2.7 50%乙腈溶液：量取 500 mL 水和 500 mL 乙腈，混匀。

A.5.2 仪器和设备

A.5.2.1 高效液相色谱仪：配备紫外吸收检测器，或其他等效的检测器。

A.5.2.2 电子天平：感量 0.0001 g。

A.5.3 色谱参考条件

A.5.3.1 色谱柱： NH_2 柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm ；或其他等效的色谱柱。

A.5.3.2 流动相：乙腈+水（75+25，体积比）。

A.5.3.3 流速：1.0 mL/min。

A.5.3.4 检测波长：195 nm。

A.5.3.5 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。

A.5.3.6 进样量：10 μL 。

A.5.4 分析步骤

A.5.4.1 氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液的制备

称取0.375 g 氨基葡萄糖盐酸盐标准品，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，加50 mL 50%乙腈溶液溶解后，再用50%乙腈溶液定容至刻度，摇匀，经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。

A.5.4.2 试样溶液的制备

称取0.350 g 试样，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，加50 mL 50%乙腈溶液溶解后，再用50%乙腈溶液定容至刻度，摇匀，经0.45 μm 滤膜过滤后立即进样。

注3：溶液均需现配现用，不得长时间存放。

A.5.4.3 系统适用性试验

氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液进样6次，确定峰面积相对标准差（RSD）、拖尾因子和理论塔板数。合格标准：RSD $\leq$ 2.0%，拖尾因子 $\leq$ 2.0，理论塔板数 $\geq$ 1500。

A.5.4.4 测定

在A.5.3色谱条件下，先注入氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液，根据上述时长进行色谱测定，记录色谱图，另取试样溶液，同法测定。氨基葡萄糖标准溶液的参考色谱图见图C.2。氨基葡萄糖的保留时间(Rt)：约6.2min。

A.5.5 结果计算

氨基葡萄糖盐（以干基计）的质量分数 w_3 ，按公式（A.3）计算：

$$w_3 = \frac{A_{c2} \times m_{std2} \times T\%}{A_{std2} \times m_{c2} \times (100\% - M)} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中：

A_{c2} ——试样溶液色谱图中氨基葡萄糖盐的峰面积；

m_{std2} ——标准品的质量，单位为克（g）；

$T\%$ ——D-氨基葡萄糖盐酸盐标准品中 D-氨基葡萄糖的质量分数，%；

A_{std2} ——标准溶液色谱图中氨基葡萄糖的峰面积；

m_{c2} ——试样的质量，单位为克（g）；

M ——试样中水分的质量分数，%。

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 2%。

A.6 非对映异构体（(6S)-5-甲基四氢叶酸）的测定

A.6.1 方法提要

试样用水溶解后，采用液相色谱分离，紫外检测器或其他等效检测器检测，标准单点法定量。

A.6.2 试剂和材料

A.6.2.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。

A.6.2.2 异丙醇：色谱纯。

A.6.2.3 磷酸二氢钠。

A.6.2.4 氢氧化钠。

A.6.2.5 (6R,S)-5-甲基四氢叶酸钙标准品：纯度 $\geq 98.0\%$ ，CAS 号：26560-38-3，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

A.6.2.6 氢氧化钠溶液：10 g/100 mL。称取 10 g 氢氧化钠，加水溶解，并定容至 100 mL。

A.6.2.7 100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液：精确称取 12.0 g 磷酸二氢钠溶于水，用氢氧化钠溶液将 pH 准确调至 7.0，加水定容至 1 000 mL，过滤并超声。

A.6.3 仪器和设备

A.6.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外吸收检测器，或其他等效的检测器。

A.6.3.2 电子天平：感量 0.1 mg。

A.6.3.3 pH 计。

A.6.3.4 超声波清洗器。

A.6.4 色谱参考条件

A.6.4.1 色谱柱：HSA 手性柱，100 mm $\times$ 4.0 mm，粒径 5 μ m；或其他等效的色谱柱。

A.6.4.2 流动相：异丙醇+100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液（6+94，体积比）。

A.6.4.3 流速：0.7 mL/min，调整流速，使(6S)-5-甲基四氢叶酸保留时间约为4.0 min。

A.6.4.4 检测波长：225 nm。

A.6.4.5 柱温：30 $^{\circ}$ C。

A.6.4.6 进样量：5 μ L。

A.6.4.7 时间：20 min。

A.6.5 分析步骤

A.6.5.1 标准溶液的制备

称取约0.025 g (6R,S)-5-甲基四氢叶酸钙标准品，精确至0.000 1 g，置于100 mL 容量瓶中，用90 mL 水溶解，20 $^{\circ}$ C 超声1 min，用水定容至刻度。移取5 mL该溶液至10 mL 容量瓶中，用流动相定容，经0.45 μ m 滤膜过滤后立即进样。

A.6.5.2 试样溶液的制备

称取约0.035 g 试样，精确至0.0001 g，置于100 mL 容量瓶中，用90 mL 水溶解。20 $^{\circ}$ C 超声1 min，用水定容至刻度。移取5 mL 该溶液至10 mL 容量瓶中，用流动相定容，经0.45 μ m 滤膜过滤后立即进样。

注4：溶液均需现配现用，不得长时间存放。

A.6.5.3 测定

在A.6.4色谱条件下，先注入标准溶液，检查系统适用性。(6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸的分离度应不小于2。另取试样溶液，同法测定。(6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸标准溶液的参考色谱图见图C.3。(6S)-5-甲基四氢叶酸保留时间(Rt)：约4.0 min。(6R)-5-甲基四氢叶酸保留时

间(Rt): 约7.4 min。分离度 R , 按式 (A.4) 计算:

$$R = \frac{1.18 \times (T_2 - T_1)}{W_1 + W_2} \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

T_2 ——相邻两色谱峰中后一峰的保留时间, 单位为分钟 (min);

T_1 ——相邻两色谱峰中前一峰的保留时间, 单位为分钟 (min);

W_1 ——相邻两色谱峰中前一峰的半高峰宽;

W_2 ——相邻两色谱峰中后一峰的半高峰宽;

1.18 ——分离度系数。

A. 6.5 结果计算

非对映异构体(6S)-5-甲基四氢叶酸的含量 w_4 , 按公式 (A.5) 计算:

$$w_4 = \frac{A_S}{A_S + A_R} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.5)$$

式中:

A_S ——试样溶液色谱图中 (6S)-5-甲基四氢叶酸的峰面积;

A_R ——试样溶液色谱图中 (6R)-5-甲基四氢叶酸的峰面积;

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 2%。

A. 7 杂质的测定

A. 7.1 方法提要、试剂和材料、仪器和设备、色谱参考条件及分析步骤同 A.4.1, A.4.2, A.4.3, A.4.4, A.4.5。相关物质参考色谱图见图 C.4。

A. 7.2 单个杂质的参考保留时间见表 A.3。

表 A.3 单个杂质的参考保留时间

相关物质名称	参考相对保留时间 (min)
4-氨基苯甲酰谷氨酸 (ABGA)	3.31
4 α -羟基-5-甲基四氢叶酸 (HOMeTHFA)	4.23
(6S)-吡嗪-s-三嗪衍生物[(6S)-Mefox]	6.18
5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF)	10.98
5-甲基四氢噻吩 (MeTHPA)	12.30

A. 7.3 结果计算

利用试样溶液色谱图计算所有单个杂质的质量分数 X_i , 范围包括除主峰以外的所有色谱峰, 并忽略试样溶液 (0.1%) 色谱图中峰面积为主峰面积 0.05 倍的所有峰。

单个杂质的质量分数 X_i , 按式 (A.6) 计算:

$$X_i = \frac{A_i \times m_{std3} \times T\% \times (RF)_i}{A_{std3} \times m_{c3}} \dots\dots\dots (A.6)$$

式中:

A_i ——试样溶液色谱图中单个杂质的峰面积;

m_{std3} ——标准品的质量, 单位为克 (g);

$T\%$ ——(6S)-5-甲基四氢叶酸钙盐标准品中(6S)-5-甲基四氢叶酸的质量分数 (%);

$(RF)_i$ ——单个杂质的响应因子;

A_{std3} ——标准溶液色谱图中 (6S) 5 甲基四氢叶酸的峰面积;

m_{c3} ——试样的质量, 单位为克 (g);

注 5: 5-甲基四氢叶酸的 RF 为 0.68, 其他单个杂质的 RF 均为 1.00。

总杂质为单个杂质的质量分数相加, 总杂质的质量分数 w_5 , 按式 (A.7) 计算:

$$w_5 = \sum X_i \dots\dots\dots (A.7)$$

式中:

X_i ——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。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 2%。

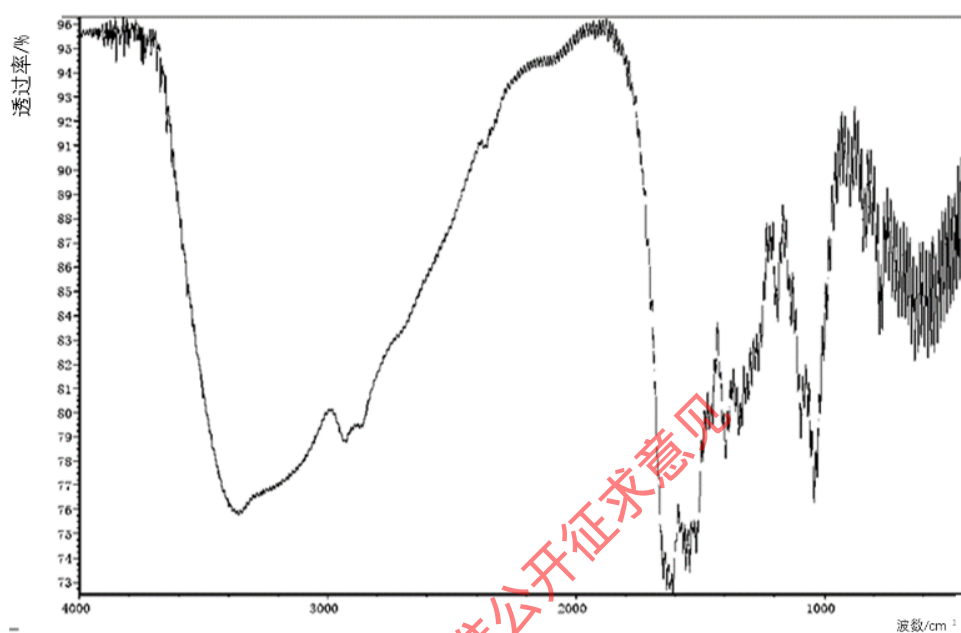
食品安全国家标准公开征求意见稿

附录 B

(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的参考红外光谱图

B.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的参考红外光谱图

(6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐的参考红外光谱图见图B.1。



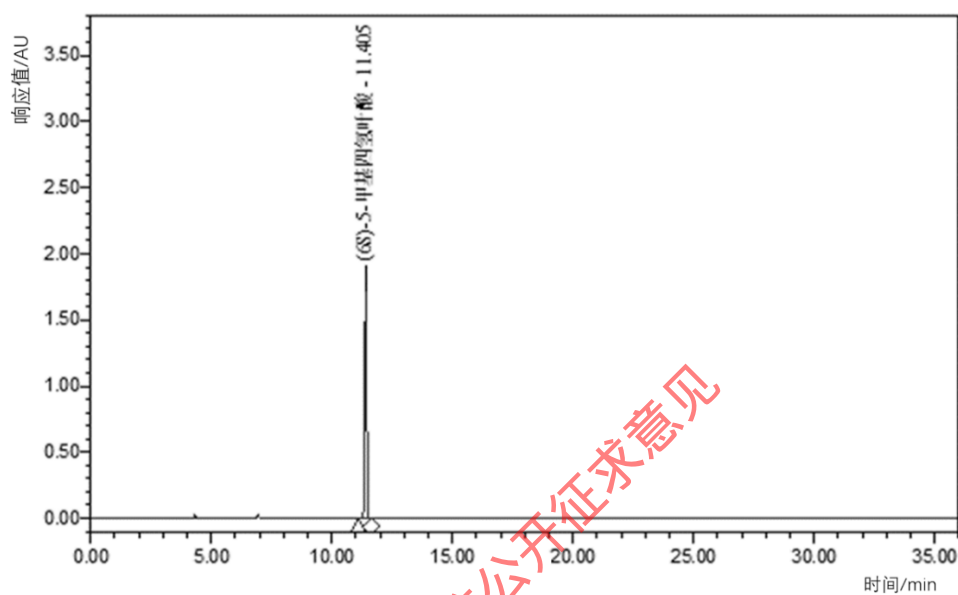
图B.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸，氨基葡萄糖盐参考红外光谱图

附录 C

参考液相色谱图

C.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸的参考液相色谱图

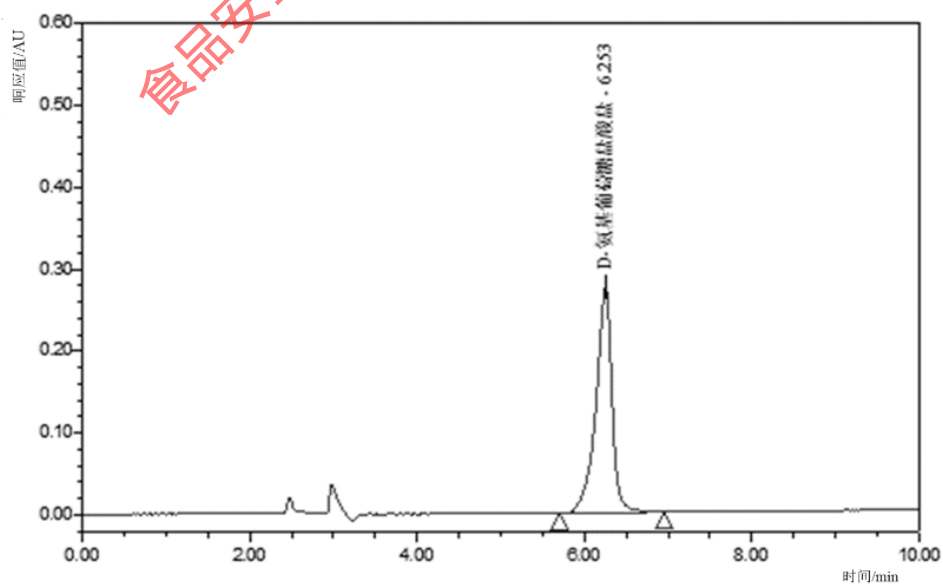
(6S)-5-甲基四氢叶酸的参考液相色谱图见图C.1。



图C.1 (6S)-5-甲基四氢叶酸参考液相色谱图

C.2 氨基葡萄糖盐酸盐的参考液相色谱图

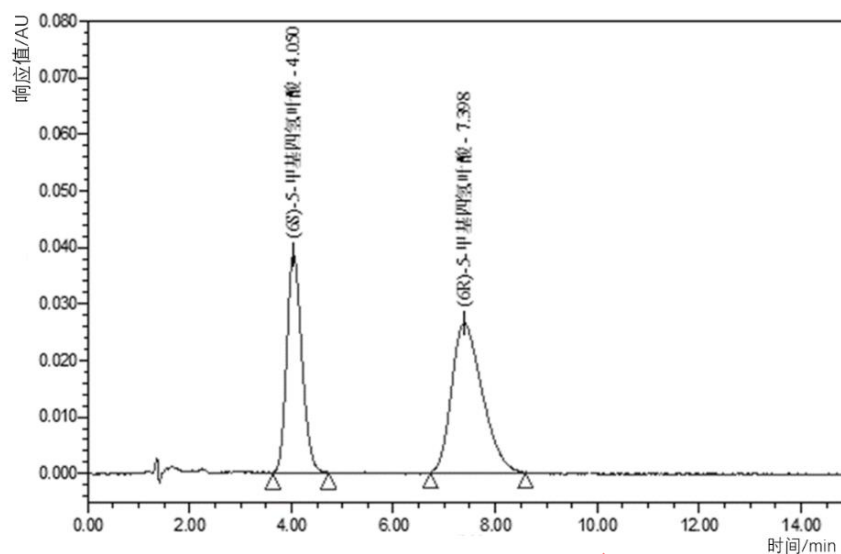
氨基葡萄糖盐酸盐的参考液相色谱图见图C.2。



图C.2 氨基葡萄糖盐酸盐参考液相色谱图

C.3 (6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸的参考液相色谱图

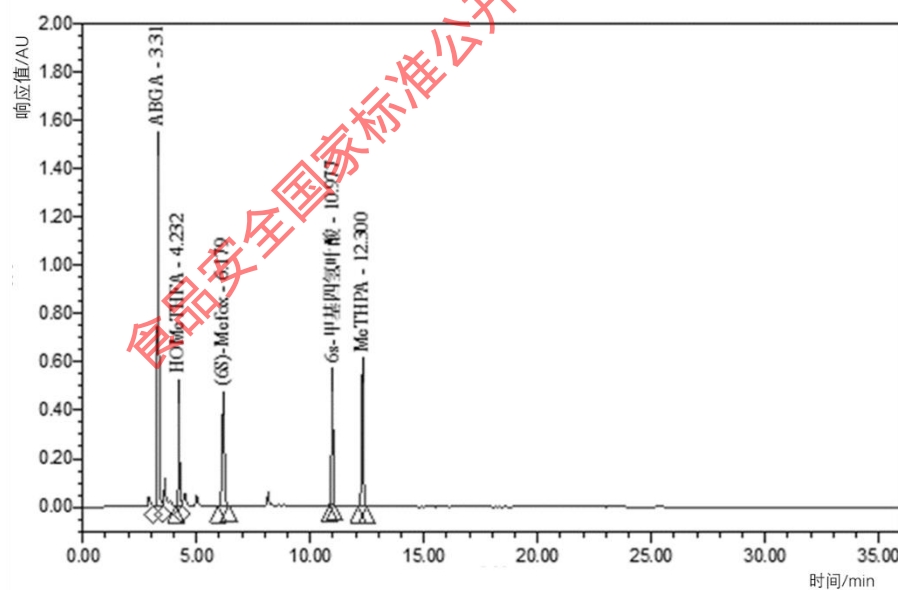
(6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸的参考液相色谱图见图C.3。



图C.3 (6S)-5-甲基四氢叶酸和(6R)-5-甲基四氢叶酸参考液相色谱图

C.4 相关物质的参考液相色谱图

相关物质的参考液相色谱图见图C.4。



图C.4 相关物质参考液相色谱图