

团体标准

T/BPSPAXXXX-2022

食品营养强化剂

天然化叶酸

Food nutritional fortification substances

Naturalization folate

(征求意见稿)

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 实施

北京民营科技促进会 发布

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这些专利的责任。

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、中卫安（北京）认证中心、北京华夏产业经济研究院、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、连增林、成永之

食品营养强化剂 天然化叶酸

1 范围

本文件规定了天然化叶酸的术语和定义、技术要求、原料要求、生产环境要求、检验规则、标识、包装、运输和贮存。

本文件适用于以叶酸和氯化钙为原料，经还原、环合、拆分、成盐等工艺制得的食品营养强化剂天然化叶酸。

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，其最新的版本（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 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 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》

《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品添加剂的公告（2017 年 第 13 号）》

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

指产品为天然叶酸的关键成分6S-甲基四氢叶酸的钙盐，以叶酸和氯化钙为原料，经还原、环合、拆分、成盐等工艺制得。生产过程中不使用重金属催化剂、甲醛及苯磺酸等存在安全隐患的加工助剂，严格控制产品杂质限度，从而达到或者接近天然叶酸的安全水平，是活性叶酸的迭代升级产品。

3.2

活性叶酸 Active folate

指产品分子结构是6S-5-甲基四氢叶酸，是叶酸的活性形式，不需要代谢，可以直接被人体吸收和利用。

3.3

天然叶酸 Folate

也叫膳食叶酸，膳食叶酸的主要成分是 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。

4 原料要求

4.1 生产用水

应符合 GB 5749 的规定。

4.2 叶酸

应符合 GB 15570 的规定。

4.3 氯化钙

应符合 GB 1886.45 的规定。

4.4 加工助剂

不得使用含有铅、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。

5 产品要求

5.1 感官指标

感官指标应符合表 1 的规定。

表1 感官指标

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	

5.2 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
6S-5-甲基四氢叶酸（以干基计）/（w/%）		89.0~95.0	附录 A 中 A.4
水分/（w/%）		6.0~17.0	GB 5009.3—2016 第四法
钙含量（以干基计）/（w/%）		7.0~8.5	GB 5009.92—2016 第二法
相关物质	JK12A ^a /（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
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		0.5g 试样，在 25±2℃ 的 100mL 水中 2 分钟内溶解	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）		不得检出	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
镉（Cd）/（mg/kg）		≤ 0.5	GB 5009.15
汞（Hg）/（mg/kg）		≤ 0.1	GB 5009.17
^a JK12A 的化学名为：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)			

5.3 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

6 生产环境要求

6.1 生产环境卫生指标应符合 GB 14881 及以下要求，其中：

- a) 生产车间空气中菌落总数≤1500 CFU/m³；
- b) 直接接触未包装产品的工作台表面菌落总数≤20 CFU/cm²，并不得有致病菌；
- c) 直接接触未包装产品的工人手表面菌落总数≤200 CFU/只手或手套，并不得检出致病菌。

6.2 消毒要求

生产过程消毒要求应符合 GB/T 19538 的相关要求。

7 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。

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 致病菌（沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌）每月提供一次检验报告。
- 8.1.3 出厂检验项目为第 5 章规定的除基因毒性杂质、重金属以外的所有项目。

8.2 型式检验

- 8.2.1 型式检验项目为第 5 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 感官质量按照检验量的 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 检验项目有一项（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；如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 标识、包装、运输和贮存

9.1 标识

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 等相关标准法规的规定。

9.2.2 产品外包装为瓦楞纸箱应符合 GB/T 6543 的规定。

9.2.3 包装要牢固、防潮、整洁、美观、无异气味，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 运输途中应注意防潮，防雨，防曝晒。

9.3.4 严禁与有毒、有害、有异味、易污染的物品混装混运，装运时要轻拿、轻放、轻装、轻卸。

9.4 贮存

在贮运过程中，必须防止曝晒雨淋，严禁与有毒或有异味的物品混贮、混运。贮存于阴凉、干燥、通风的仓库中，不得露天堆放。

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，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 红外光谱定性分析方法通则进行，要求与标准品图谱一致。6S-5-甲基四氢叶酸钙对照红外光谱图见附录 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 32g 氢氧化钠，加水溶解，并定容至 100mL，摇匀备用。

A.4.1.9 磷酸盐缓冲溶液：称取约 7.80g 二水合磷酸二氢钠，精确至 0.0001g，置于 1000mL 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 μ m；或其他等效的色谱柱。

A.4.3.2 流动相：流动相 A：用氢氧化钠溶液调节缓冲盐溶液 pH 至 6.5。

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.4.3.3 流速：1.1 mL/min。

A.4.3.4 检测波长：280 nm。

A.4.3.5 进样量：10 μ L。

A.4.3.6 柱温：32℃。

A.4.3.7 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 15mg 碳酸氢钠，15mg 碳酸钠，精确至 0.0001g，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 1mL，置另一个 100mL 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 0.0001g，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 25mgDL-5-甲基四氢叶酸钙标准品，精确至 0.0001g，置于 50mL 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 25mg 试样，精确至 0.0001g，置于 50mL 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 2min 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.2 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：

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

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

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

式中:

- A_u ——试样中主峰峰面积;
 W_5 ——标准品的质量,单位为毫克(mg);
 P ——标准品的质量分数, 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, %;
 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 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_3 ,按式(A.3)计算:

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

式中:

- A_i ——试样中相应各杂质峰面积;
 A_s ——标准品主峰的峰面积;
 W_5 ——标准品的质量,单位为毫克(mg);
 W_u ——试样的质量,单位为毫克(mg);
 W ——试样中水分的质量分数, %;
 P ——标准品的质量分数, 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) ($M_1=459.46$);
 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 ,按式(A.4)计算:

$$w_4 = \sum w_3 \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

- w_3 ——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 32g，用水溶解并稀释至 100mL。

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 0.0001g，置于 1000mL 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 5μm；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 μL。

A.6.3.6 柱温：40℃。

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 0.0001g，置于 50mL 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 0.0001g，置于 100mL 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 1.0mL 标准溶液，置于 50mL 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。参考图 B.4D-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_5 ，按式（A.5）计算：

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

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 0.3g 试样，精确至 0.0001g，置于 200mL 烧杯中，加 75mL 水。将烧杯置于蒸汽浴中加热。加 1mL 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 ，按式 (A.6) 计算：

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

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，30m×0.32mm，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：1.3mL/min。

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

A.8.3.5 汽化温度：180℃。

A.8.3.6 检测器温度：250℃。

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℃。

A.8.4.2 定量环温度：95℃。

A.8.4.3 传输线温度：105℃。

A.8.4.4 试样加热时间：30min。

A.8.5 分析步骤

A.8.5.1 标准溶液的制备

称取约 1g 乙醇标准品，精确至 0.0001g，置于 100mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀。

精密量取 10mL 上述溶液，置于 100mL 容量瓶中，加水定容，混匀。精密量取 5mL 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 1g 试样，精确至 0.0001g，置于顶空瓶中，精密量取 5mL 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_7 ，按式（A.7）计算：

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

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

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 0.5g 试样，精确至 0.0001g，置于 250mL 具塞锥形瓶中，加入 100mL $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 的水，震荡 2min 内溶解。

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、苯磺酸异丙酯对照品。

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 4.6×250mm，5 μm

A.10.3.2 流动相：水-乙腈（50:50）

A.10.3.3 检测波长：217nm

A.10.3.4 柱温：30℃

A.10.3.5 进样量：20 μL

A.10.3.6 流速：1mL/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 20mg，精密称定，置 20mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀。

A. 10. 4. 2 对照品溶液的制备

临用新制。取苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯各约 15mg，精密称定，置 10mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 0.2mL，置 100mL 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对照品溶液各 20 μ L，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：

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

式中：

A_i ——为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_i ——为供试品称样量，mg；

A_s ——为对照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 ——为苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯对照品的称样量，mg；

F ——为苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯对照品的含量；

V_s ——为苯磺酸甲酯、苯磺酸乙酯和苯磺酸异丙酯对照品稀释倍数；

V_i ——为供试品的稀释倍数。

A. 11 铂的测定

A. 11. 1 试剂和材料

A. 11. 1. 1 硝酸。

A. 11. 1. 2 盐酸。

A. 11. 1. 3 异丙醇，色谱级。

A. 11. 1. 4 超纯水。

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 ICP-MS 条件

表 A.4 ICP-MS 条件

参数	数值	参数	数值
RF 功率 (W)	1550	雾化室冷却温度 (° C)	2. 7
等离子体气流速 (L/min)	14	Dwell Time (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
内标管内径 (mm)	0. 508	样品管内径 (mm)	0. 508

A. 11. 4 分析步骤

A. 11. 4. 1 稀释剂的制备

稀释剂 1 (2% HNO_3 +1% HCl)：量取 40mL 浓硝酸，及 20mL 浓盐酸，加水稀释至 2000mL，摇匀。

稀释剂 2 (含 0.1% Au 的 2% HNO_3)：量取 40mL 浓硝酸，加 2.0mL Au 标准溶液，加水稀释至 2000mL，摇匀。

稀释剂 3（含 0.1%Au 的超纯水）：取超纯水 2000mL，加 2.0mL Au 标准溶液，摇匀。

A. 11. 4. 2 内标溶液的制备

内标溶液 1（Sc: 10000ng/mL、In: 10000ng/mL、Bi: 10000ng/mL、Ge: 10000ng/mL）：精密移取 0.10mL Sc 元素标准溶液、0.10mL In 元素标准溶液、0.10mL Bi 元素标准溶液和 0.10mL Ge 元素标准溶液至 10mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

内标溶液 2（Sc: 50ng/mL、In: 50ng/mL、Bi: 50ng/mL、Ge: 50ng/mL）：精密移取 1.00mL 内标溶液 1 及 10mL 异丙醇至 200mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

内标溶液 3（Sc: 10000ng/mL、In: 10000ng/mL、Bi: 10000ng/mL、Ge: 10000ng/mL）：精密移取 0.10mL Sc 元素标准溶液、0.10mL In 元素标准溶液、0.10mL Bi 元素标准溶液和 0.10mL Ge 元素标准溶液至 10mL 量瓶中，用稀释剂 2 稀释至刻度，摇匀。

内标溶液 4（Sc: 50ng/mL、In: 50ng/mL、Bi: 50ng/mL、Ge: 50ng/mL）：精密移取 1.00mL 内标溶液 3 至 200mL 量瓶中，用稀释剂 2 稀释至刻度，摇匀。

A. 11. 4. 3 储备溶液的制备

储备溶液-1（Pt: 5000ng/mL）：精密移取 0.50mL Pt 元素标准溶液至 100mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

A. 11. 4. 4 线性溶液的制备

线性溶液 1（Pt: 20ng/mL）：精密移取 0.10mL 储备溶液-2 至 25mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

线性溶液 2（Pt: 50ng/mL）：精密移取 0.25mL 储备溶液-2 至 25mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

线性溶液 3（Pt: 100ng/mL）：精密移取 0.50mL 储备溶液-2 至 25mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

线性溶液 4（Pt: 150ng/mL）：精密移取 0.75mL 储备溶液-2 至 25mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

线性溶液 5（Pt: 200ng/mL）：精密移取 1.00mL 储备溶液-2 至 25mL 量瓶中，用稀释剂 1 稀释至刻度，摇匀。

A. 11. 4. 5 供试品溶液的制备

取本品约 100mg，精密称定，置 10mL 量瓶中，加稀释剂 1 溶解并稀释至刻度，摇匀。

A. 11. 4. 6 测定

取供试品溶液、线性溶液进样分析，按标准曲线法计算各元素含量。

A. 11. 4. 7 结果计算

元素铂的含量 W_9 计算，按式（A.9）计算：

$$W_9 = \frac{(A_{\text{样}} - \text{标准曲线截距}) \times V_{\text{供}}}{\text{标准曲线斜率} \times W_{\text{样}}} \times 100\% \quad \text{..... (A9)}$$

式中：

$A_{\text{样}}$ ——为供试品溶液的响应值；

$W_{\text{样}}$ ——为供试品的称样量，mg；

$V_{\text{样}}$ ——为供试品的稀释体积，mL。

附录 B

(资料性)

6S-5-甲基四氢叶酸钙红外光谱图、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、基因毒性杂质色谱图

B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙红外参考光谱图

6S-5-甲基四氢叶酸钙红外参考光谱图见 B.1。

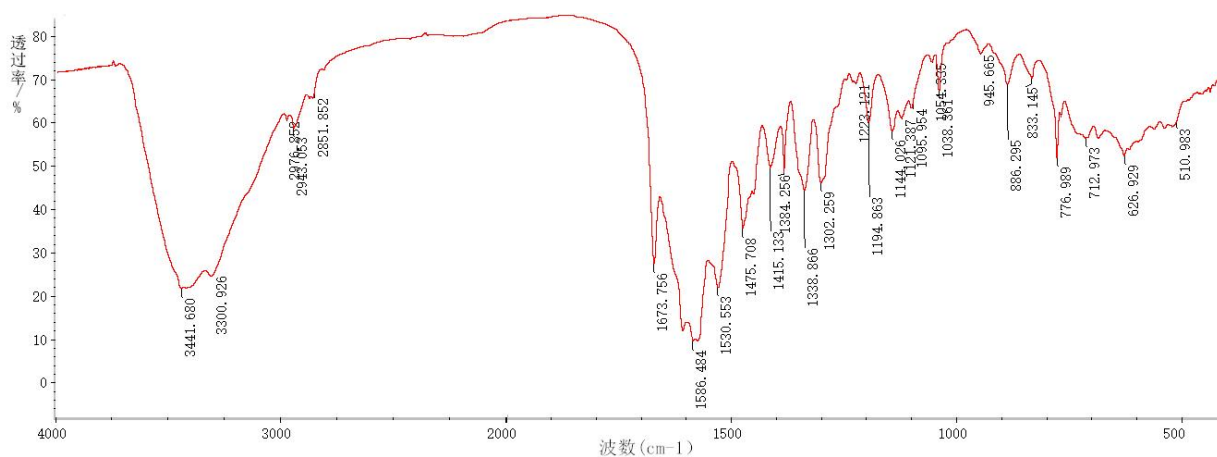


图 B.1 6S-5-甲基四氢叶酸钙对照品红外参考光谱图

B.2 6S-5-甲基四氢叶酸钙含量测定典型高效液相色谱图

6S-5-甲基四氢叶酸钙含量测定典型高效液相色谱图见图 B.2。

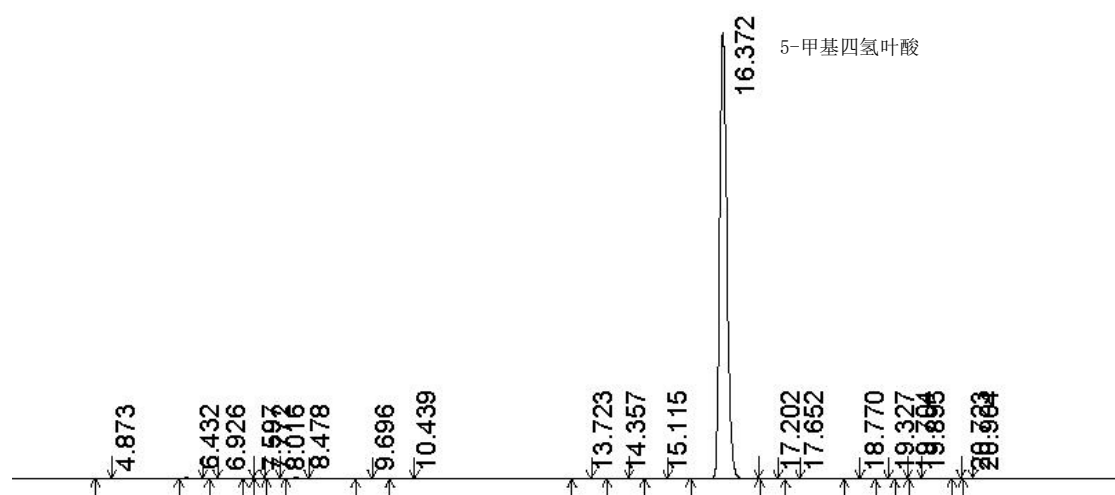


图 B.2 6S-5-甲基四氢叶酸钙含量测定典型高效液相色谱图

B.3 6S-5-甲基四氢叶酸钙中相关物质测定高效液相色谱图

6S-5-甲基四氢叶酸钙中相关物质测定高效液相色谱图见图 B. 3。

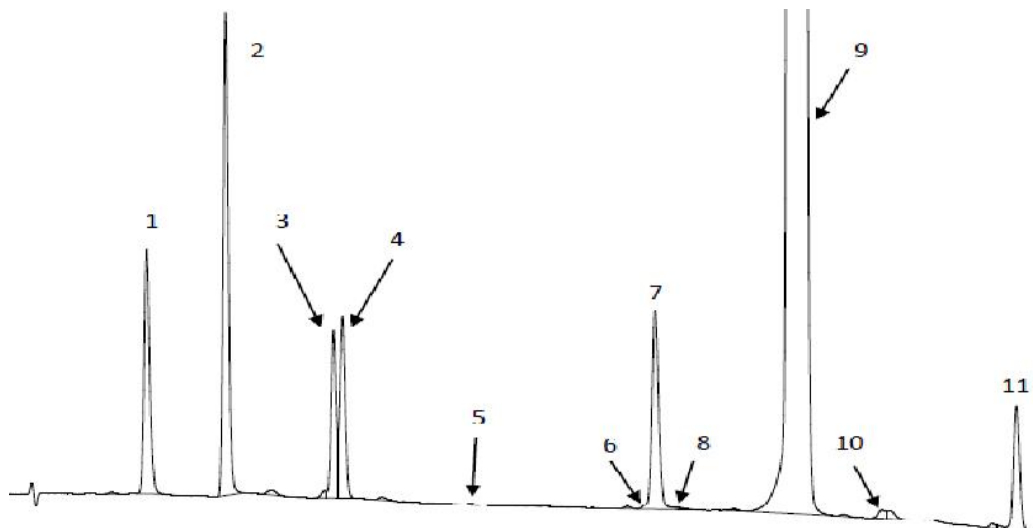


图 B.3 DL-5-甲基四氢叶酸钙 USP 标准品系统适用性高效液相色谱图原图

其中：

- 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-甲氨基四氢叶酸

B.4 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. 4。

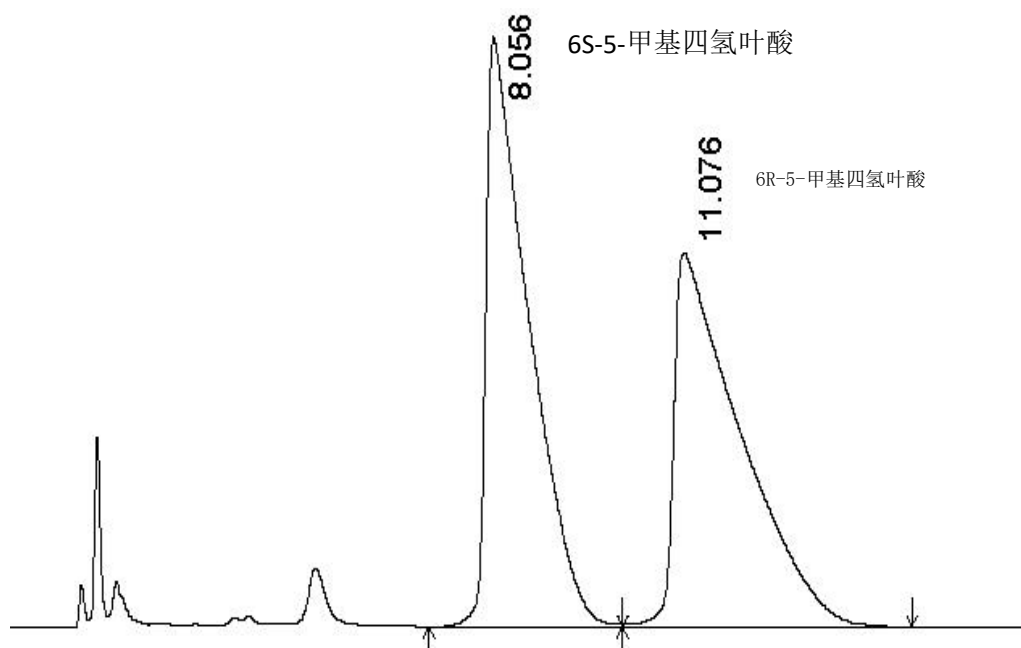


图 B.4 D-5-甲基四氢叶酸（6R-5-甲基四氢叶酸）参考色谱图

B.5 基因毒杂质的色谱图

基因毒杂质的色谱图见图 B. 5、B. 6。

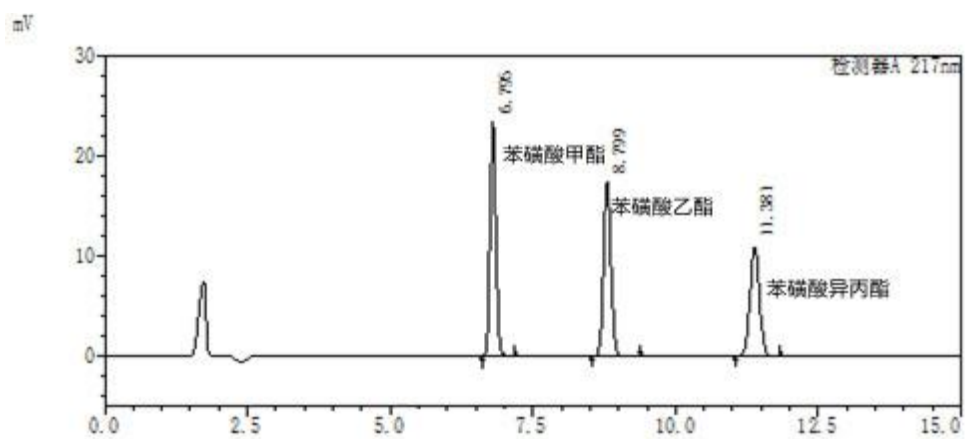


图 B.5 对照品溶液色谱图

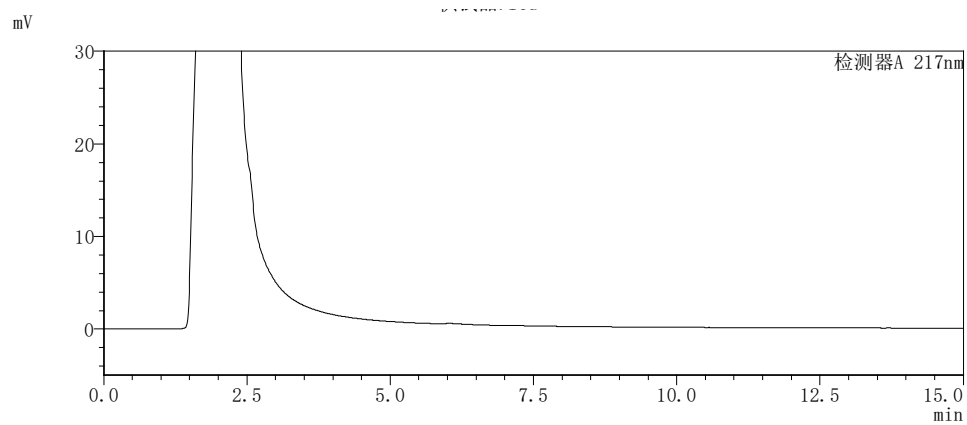


图 B.6 供试品溶液色谱图