



中华人民共和国国家标准

GB 1903.44—2020

食品安全国家标准

食品营养强化剂 羟钴胺

2020-09-11 发布

2021-03-11 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 羟钴胺

1 范围

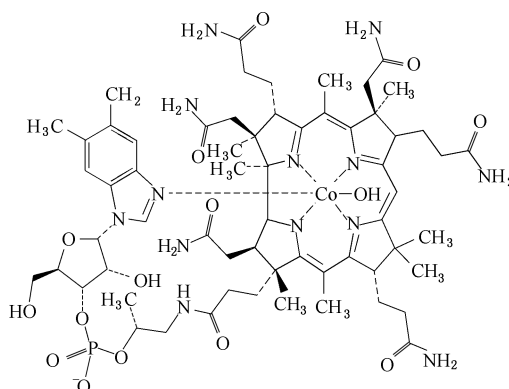
本标准适用于以粘着剑菌(*Ensi fer adhaerens*)发酵法生产,经提纯、干燥制得的食品营养强化剂羟钴胺。

2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式



2.2 结构式



2.3 相对分子质量

1346.38(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	深红色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘中,在自然光线下,观察其色泽和状态
状态	晶体或结晶性粉末	

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
羟钴胺含量(以无水和无溶剂计), $w/\%$	95.0~102.0	附录 A.3
水分, $w/\%$	14.0~18.0	GB 5009.3 卡尔·费休法
有关物质(以无水和无溶剂计), $w/\%$	\leq 4.0	附录 A.4
丙酮, $w/\%$	\leq 0.5	附录 A.5
pH(20 g/L)	8.0~10.0	附录 A.6
铅(Pb)/(mg/kg)	\leq 2.0	GB 5009.75 或 GB 5009.12
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	\leq 2.0	GB 5009.76 或 GB 5009.11

附录 A 检验方法

A.1 一般规定

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验方法中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品,在没有注明其他要求时,均按 GB/T 601、GB/T 602 的规定制备。所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.2 鉴别试验

A.2.1 试剂和溶液

A.2.1.1 溴化钾。

A.2.1.2 焦硫酸钾。

A.2.1.3 盐酸。

A.2.1.4 冰醋酸。

A.2.1.5 乙酸钠。

A.2.1.6 酚酞指示液:0.1 g 酚酞用 95% 的乙醇溶解并定容到 100 mL。

A.2.1.7 氢氧化钠溶液:2 mol/L。称取 40 g 氢氧化钠,用水溶解并定容至 500 mL。

A.2.1.8 醋酸溶液:1 mol/L。移取 58.8 mL 冰醋酸于 1 L 的容量瓶中并用水定容。

A.2.1.9 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠溶液:将 1 g 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠溶于适量水中,转至 100 mL 容量瓶中并用水定容。

A.2.2 红外光谱分析

红外光谱分析按 GB/T 6040—2002 中 5.2.2 执行,试样的红外吸收光谱图应与盐酸羟钴胺的标准谱图一致,盐酸羟钴胺的标准红外光谱图如附录 B 的 B.1 所示。

A.2.3 钴离子鉴别

将 1 mg 羟钴胺和约 50 mg 焦硫酸钾放置于坩埚中,在电热板上逐渐加热,直至固体熔融,冷却,用玻璃棒捣碎,加入 3 mL 水,煮沸直至溶解,加 1 滴酚酞指示液,逐滴滴加氢氧化钠溶液(A.2.1.7)直到粉红色出现,加入 0.5 g 乙酸钠、0.5 mL 醋酸溶液(A.2.1.8)和 0.5 mL 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠溶液(A.2.1.9),立即呈现红色或橘红色。加入 0.5 mL 盐酸,煮沸 1 min,红色或橘红色保持不变。

A.2.4 试样与标准溶液主峰保留时间的比较

在羟钴胺含量项下试验中,试样溶液(A.3.2.9)与标准溶液(A.3.2.8)的主峰保留时间应一致。

A.3 羟钴胺含量(以无水和无溶剂计)测定

A.3.1 方法提要

用高效液相色谱法,在选定的工作条件下,通过色谱柱使样品分离,用紫外吸收检测器或二极管阵

列检测器检测,用外标法定量,计算样品中羟钴胺的含量。

A.3.2 试剂和溶液

A.3.2.1 甲醇:色谱纯。

A.3.2.2 磷酸。

A.3.2.3 磷酸二氢钠。

A.3.2.4 盐酸羟钴胺标准品: CAS 号为 59461-30-2,质量分数大于 95%。

A.3.2.5 磷酸溶液:取 1 mL 磷酸于 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。

A.3.2.6 缓冲液:称取 15.6 g 磷酸二氢钠,溶于水,并定容至 1 000 mL,用磷酸溶液(A.3.2.5)调 pH 至 3.0。

A.3.2.7 稀释液:将甲醇、缓冲液(A.3.2.6)和水按 8 : 10 : 82(体积比)混合均匀。

A.3.2.8 标准溶液:按纯度折算,精密称取适量盐酸羟钴胺标准品,使之含盐酸羟钴胺 0.02 g,精确至 0.000 1 g,用稀释液(A.3.2.7)稀释至 200 mL 容量瓶中,定容作为标准溶液,使用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,需做平行试样。

A.3.2.9 试样溶液:精密称取试样 0.02 g(按水分和溶剂残留之和折算后),精确至 0.000 1 g,用稀释液(A.3.2.7)溶解并定容至 200 mL,作为试样溶液,使用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,需做平行试样。

A.3.3 仪器和设备

A.3.3.1 电子天平,感量为 0.1 mg。

A.3.3.2 高效液相色谱仪。

A.3.4 参考色谱条件

A.3.4.1 检测器:紫外检测器或二极管阵列检测器。

A.3.4.2 检测波长:351 nm。

A.3.4.3 色谱柱:两根极高纯度烷氧基硅胶为填料的整体柱(柱长 10 cm,内径 4.6 mm,大孔 2 μm ,中孔 13 nm)串联或等效柱。

A.3.4.4 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

A.3.4.5 进样量:20 μL 。

A.3.4.6 流动相:A 为甲醇,B 为缓冲液(A.3.2.6),C 为水。梯度洗脱条件见表 A.1。

表 A.1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相		
	A	B	C
0	8%	10%	82%
20	8%	10%	82%
40	40%	10%	50%
45	8%	10%	82%
50	8%	10%	82%

A.3.4.7 流速:2.0 mL/min。

A.3.5 系统适用性

盐酸羟钴胺的保留时间大约为 16 min。

标准溶液(A.3.2.8)色谱峰的拖尾因子应不大于 2.5。

标准溶液(A.3.2.8)连续进样 6 次,主峰面积相对标准偏差(RSD)应不大于 1.0%。

A.3.6 分析步骤

按照液相色谱仪操作规程依法操作,取标准溶液(A.3.2.8)、试样溶液(A.3.2.9)各 20 μ L 注入液相色谱仪中,记录色谱图,按外标法进行计算。

A.3.7 结果计算

羟钴胺的质量分数 w_1 ,数值以%表示,按式(A.1)计算。

$$w_1 = \frac{r_U \times C_{s_1} \times M_{r_1}}{r_{s_1} \times C_U \times M_{r_2}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

r_U ——试样溶液峰面积;

C_{s_1} ——盐酸羟钴胺标准溶液浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

M_{r_1} ——羟钴胺的摩尔质量,1 346.4,单位为克每摩尔(g/mol);

r_{s_1} ——标准溶液峰面积;

C_U ——试样溶液中羟钴胺浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

M_{r_2} ——盐酸羟钴胺的摩尔质量,1 382.8,单位为克每摩尔(g/mol)。

A.3.8 精密度

在重复性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的 2%。

A.4 有关物质(以无水 and 无溶剂计)的测定

A.4.1 试剂和溶液

A.4.1.1 甲醇:色谱纯。

A.4.1.2 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

A.4.1.3 磷酸。

A.4.1.4 缓冲液:称取磷酸二氢钠 15.6 g,经漏斗倒入 1 000 mL 容量瓶中,加少量水溶解,加水至刻度。摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,用 1 : 100 磷酸溶液调 pH 至 3.0,放入超声波水浴中脱气 10 min。

A.4.1.5 试样溶解液:精密量取经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤的水 820 mL,取 100 mL 缓冲液(A.4.1.4)及 80 mL 甲醇进行混合,摇匀,放入超声波水浴中脱气 10 min。

A.4.1.6 系统适用性溶液:0.75 mg/mL。按纯度折算后,精密称取适量盐酸羟钴胺标准品(A.3.2.4),用试样溶解液(A.4.1.5)溶解定容至 50 mL 容量瓶中,使之浓度为 0.75 mg/mL,作为系统适用性溶液。

A.4.1.7 定量溶液:7.5 μ g/mL。分别精密量取系统适用性溶液(A.4.1.6)0.5 mL,用试样溶解液(A.4.1.5)溶解定容至 50 mL 容量瓶中。

A.4.1.8 限度溶液:0.75 μ g/mL。精密量取定量溶液(A.4.1.7)5 mL,用试样溶解液(A.4.1.5)溶解定容至 50 mL 容量瓶中,作为限度溶液。

A.4.1.9 试样溶液:0.75 mg/mL。精密称取试样 0.037 5 g(按水分和溶剂残留之和折算后),用试样溶解液(A.4.1.5)溶解定容至 50 mL 容量瓶中,作为试样溶液。

A.4.2 仪器

A.4.2.1 电子天平,感量为 0.01 mg。

A.4.2.2 高效液相色谱仪,配备二极管阵列检测器或紫外检测器。

A.4.3 参考色谱条件

同 A.3.4。

A.4.4 系统适用性

按照液相色谱仪操作规程依法操作,取系统适用性溶液(A.4.1.6)20 μL 注入液相色谱仪中,记录色谱图,羟钴胺与其最近的杂质之间的峰谷比(与羟钴胺相邻的杂质小峰的峰高/羟钴胺主峰最低点的高度)必须不小于 2.0。

A.4.5 分析步骤

按照液相色谱仪操作规程依法操作,取限度溶液(A.4.1.8)、试样溶液(A.4.1.9)和定量溶液(A.4.1.7)各 20 μL 注入液相色谱仪中,记录色谱图,按外标法进行计算。

获得试样溶液(A.4.1.9)的色谱图,忽略面积小于限度溶液(A.4.1.8)主峰的 0.7 倍的所有峰,将羟钴胺主峰保留时间设定为 1.0,根据杂质峰与羟钴胺主峰相对保留时间记录杂质峰面积并计算其含量。杂质相对保留时间见表 A.2。

表 A.2 有关物质杂质峰相对保留时间

名 称	相对保留时间
B6 羟甲基衍生物	0.45
B5 羟甲基衍生物	0.53
杂质 1	0.70
杂质 2	0.75
杂质 3	0.82
杂质 4	0.93
C8 异构体	1.25
杂质 5	1.37~1.51
氰钴胺	1.90
任一其他杂质	—

A.4.6 结果计算

羟钴胺有关物质的质量分数 ω_2 ,数值以%表示,按式(A.2)计算。

$$\omega_2 = \sum Y_i \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

某种杂质 Y_i 的质量分数按式(A.3)计算。

$$Y_i = \frac{r_i \times C_{s_2} \times M_{r_1}}{r_{s_2} \times C_i \times F \times M_{r_2}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

Y_i ——某种杂质 i 的质量分数,%;

r_i ——试样溶液某个杂质峰面积;

C_{s_2} ——定量溶液中盐酸羟钴胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

- M_{r_1} ——羟钴胺的摩尔质量,1 346.4,单位为克每摩尔(g/mol);
- r_{s_2} ——定量溶液(A.4.1.7)盐酸羟钴胺峰面积;
- C_i ——试样溶液(A.4.1.9)中羟钴胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- F ——试样溶液响应因子,氰钴胺为 0.8,其他杂质为 1.0;
- M_{r_2} ——盐酸羟钴胺的摩尔质量,1 382.8,单位为克每摩尔(g/mol)。

A.4.7 精密度

在重复性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的 10%。

A.5 丙酮含量的测定

A.5.1 方法提要

试样中存在的丙酮在密闭容器中会扩散到气相中,经过一定的时间后可达到气相/液相间浓度的动态平衡,用顶空气相色谱法检测上层气相中丙酮的含量,即可计算出待测试样中丙酮的实际含量。

A.5.2 试剂和溶液

A.5.2.1 丙酮贮备液($1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$):用 $250\ \mu\text{L}$ 微量进样器量取 $0.127\ 5\ \text{mL}$ 丙酮标准($20\ ^\circ\text{C}$ 下丙酮的密度为 $0.790\ \text{g}/\text{cm}^3$),直接注入已预加水约 $80\ \text{mL}$ 的 $100\ \text{mL}$ 容量瓶中(针头必须没入液面以下),再加水至刻度,摇匀,即得。

A.5.2.2 丙酮标准使用液($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$):量取丙酮贮备液(A.5.2.1) $5.00\ \text{mL}$,置于 $100\ \text{mL}$ 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

A.5.2.3 试样溶液:取试样约(50 ± 0.05)mg,置于 $20\ \text{mL}$ 顶空瓶中,精密加入水 $5.0\ \text{mL}$,封瓶,超声使溶解,即得。

A.5.2.4 参比溶液:取试样约(50 ± 0.05)mg,置于 $20\ \text{mL}$ 顶空瓶中,加入 $5.00\ \text{mL}$ 丙酮标准使用液(A.5.2.2),封瓶,超声使溶解,即得。

A.5.3 仪器和设备

A.5.3.1 仪器:气相色谱仪,配顶空进样器和氢火焰离子化检测器。

A.5.3.2 顶空瓶: $20\ \text{mL}$,配备铝盖和不含烃类溶剂残留的丁基橡胶或硅树脂胶隔垫。

A.5.3.3 电子天平,感量为 $0.01\ \text{mg}$ 。

A.5.4 参考色谱条件

A.5.4.1 色谱柱:毛细管柱($30\ \text{m}\times 0.53\ \text{mm}\times 3.0\ \mu\text{m}$,固定液为 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷)或等效柱。

A.5.4.2 柱温: $40\ ^\circ\text{C}$,保持 $13\ \text{min}$ 。

A.5.4.3 检测器温度: $250\ ^\circ\text{C}$;进样口温度: $140\ ^\circ\text{C}$ 。

A.5.4.4 载气: N_2 ;柱流量: $4\ \text{mL}/\text{min}$;空气流量: $400\ \text{mL}/\text{min}$;氢气流量: $60\ \text{mL}/\text{min}$;尾吹气流量: $25\ \text{mL}/\text{min}$;分流比: $2:1$ 。

A.5.4.5 进样方式:顶空进样,进样量 $1.0\ \text{mL}$ 。

A.5.4.6 顶空进样器条件:顶空瓶平衡温度 $80\ ^\circ\text{C}$,平衡时间 $60\ \text{min}$;定量环温度 $100\ ^\circ\text{C}$;传输线温度 $100\ ^\circ\text{C}$ 。

A.5.5 系统适用性试验

试样检测前进行系统适用性试验,以丙酮标准使用液(A.5.2.2)连续进样5次进行重复性测试,并计算其峰面积的相对标准偏差RSD,要求重复性测试的RSD不大于10.0%,同时,记录第一针丙酮标准使用液(A.5.2.2)中丙酮峰的理论板数,理论板数应不小于5000。满足条件后进行试样的正常检测;若不满足,查明原因后继续进行系统适用性测试,合格后再进行试样测试。每进5批试样及检测结束前取丙酮标准使用液(A.5.2.2)进样,与开始5针系统适用性的峰面积及中间每次确认的丙酮标准峰面积一并计算,重复性测试的相对标准偏差RSD不大于10.0%,丙酮标准使用液(A.5.2.2)中丙酮峰的理论板数应不小于5000。若不满足上述条件,则之间的检测数据无效。重新进行系统适用性检测,系统适用性合格后,重新检测,系统适用性48h有效。

A.5.6 分析步骤

系统适用性5针重复性合格后,进1针水样,再依次进2针参比溶液(A.5.2.4)、2针试样溶液(A.5.2.3)。将制备好的参比溶液(A.5.2.4)及试样溶液(A.5.2.3)在80℃下平衡60min,分别取顶空气1.0mL进样,在以上色谱条件下测定,记录色谱图。

A.5.7 结果计算

丙酮的质量分数 w_3 ,数值以%表示,按式(A.4)计算。

$$w_3 = \frac{50 \times 5 \times A}{(A_0 - A) \times m \times 10^6} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

- 50——参比溶液(A.5.2.4)中丙酮标准使用液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- 5 ——参比溶液(A.5.2.4)中丙酮标准使用液的体积,单位为毫升(mL);
- A ——试样溶液峰面积;
- A_0 ——参比溶液峰面积;
- m ——试样质量,单位为克(g)。

A.5.8 精密度

结果不大于100mg/kg时,两个平行试样的绝对差值不应超过20mg/kg;结果大于100mg/kg时,两个平行试样的绝对差值不超过算术平均值的15.0%。

A.6 pH的测定

取试样2.0g,用水溶解,并定容至100mL,其他按GB/T 9724规定测定。

附 录 B
羟钴胺参考红外光谱图和色谱图

B.1 盐酸羟钴胺的标准红外光谱图

见图 B.1。

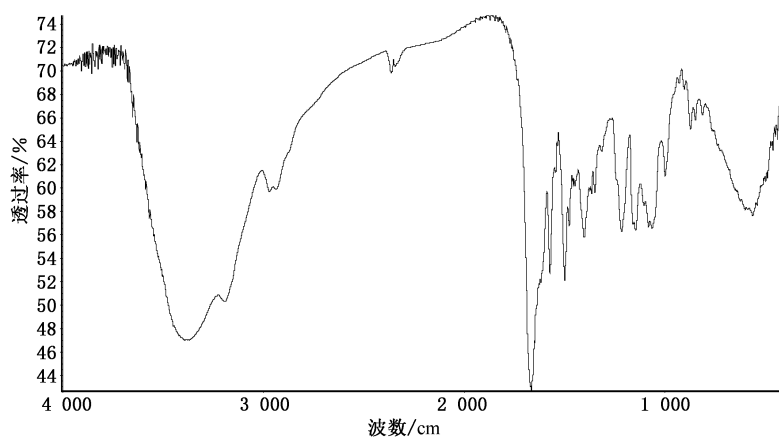


图 B.1 盐酸羟钴胺的标准红外光谱图

B.2 羟钴胺试样参考色谱图

见图 B.2。

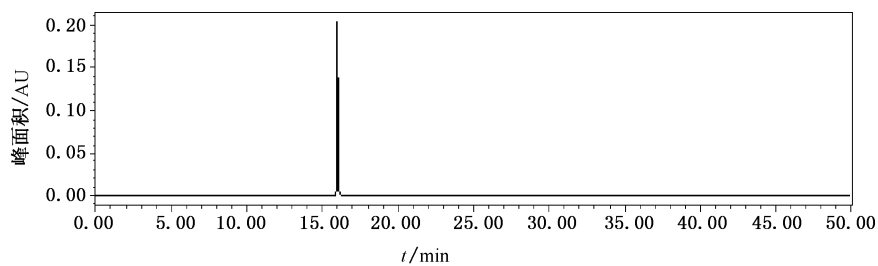
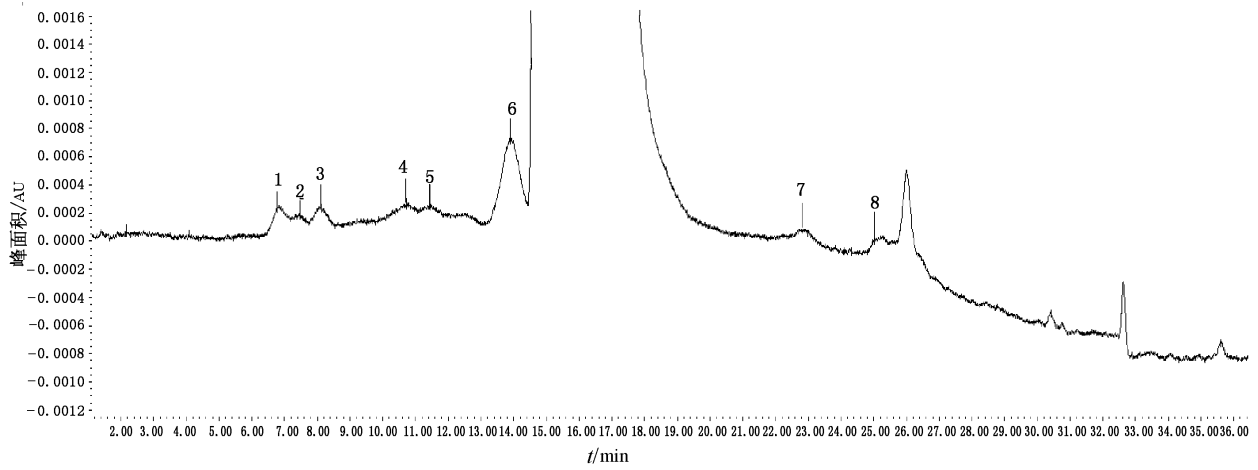


图 B.2 羟钴胺试样参考色谱图

B.3 羟钴胺试样有关物质参考色谱图

见图 B.3。



说明:

- 1——B6 羟甲基衍生物;
- 2——B5 羟甲基衍生物;
- 3——杂质 1;
- 4——杂质 2;
- 5——杂质 4;
- 6——C8 异构体;
- 7——杂质 5;
- 8——氰钴胺。

图 B.3 羟钴胺试样有关物质参考色谱图

B.4 羟钴胺试样丙酮参考色谱图

见图 B.4。

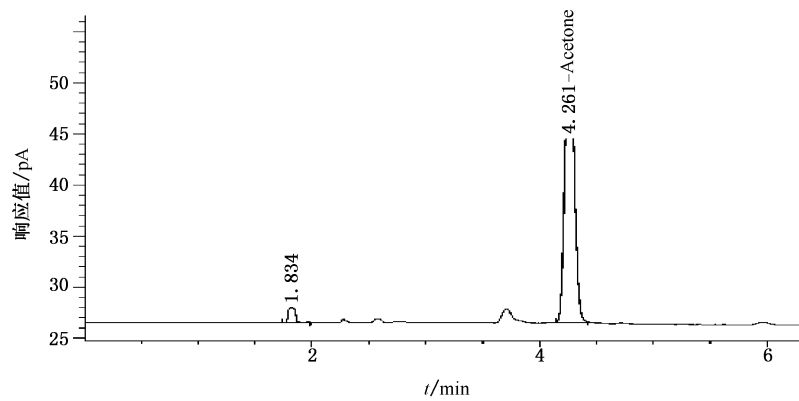


图 B.4 羟钴胺试样丙酮参考色谱图