团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》（征求意见稿）编制说明

一、项目来源、起草单位、主要起草人

根据《广西标准化协会关于下达2024年第十八批团体标准制修订项目计划的通知》（桂标协〔2024〕130号）文件精神，由广西粮食行业协会提出，由广西壮族自治区农业科学院、广西标准化协会、广西壮族自治区产品质量检验研究院等单位共同起草的团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》（项目编号：2024-1802）获批立项。

为高质量编制团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》，成立标准起草小组并进行如下分工：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **姓名** | **职务/职称** | **从事专业** | **工作单位** | **责任分工** |
| 覃国新 | 高级工程师 | 食品检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 统筹规范编制工作，组织人员进行规范发布后的宣贯培训 |
| 韦宇宁 | 高级农艺师 | 检验检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 指导规范文本及编制说明编写，质量控制 |
| 李惠玲 | 高级工程师 | 检验检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 对规范实施情况进行总结分析，不断对规范提出修正意见 |
| 何洁 | 高级工程师 | 食品检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 吉日文 | 高级工程师 | 食品检验 | 广西壮族自治区产品质量检验研究院 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 王海军 | 高级工程师 | 检验检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 周其峰 | 高级农艺师 | 检验检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 陈泳锨 | 工程师 | 食品检测 | 广西壮族自治区农业科学院 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 黄林华 | 高级工程师 | 标准化 | 广西标准化协会 | 负责起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |
| 司露露 | 高级工程师 | 食品安全检测 | 南宁海关技术中心 | 协助起草规范草案，征求意见稿和规范编制说明，送审稿及编制说明的编写工作 |

二、项目背景及目的意义

叶酸（Folic acid）化学名为蝶酰谷氨酸，又被称为维生素B9，是一种水溶性维生素物质。研究表明，叶酸对人体健康具有非常重要作用，人体维持正常的细胞分裂、增值及组织的生长发育都需要充足的叶酸。叶酸缺乏不仅会引起巨幼红细胞性贫血，还可能导致急性心肌梗塞、动脉硬化和脑中风。由于叶酸缺乏是影响居民健康的一个全球性问题，因此许多国家推广叶酸强化食品，以此来改善人们的叶酸水平，然而过量摄入人工合成叶酸会对人体造成毒害。近年来研究发现当人工合成叶酸的日摄入量超过1000微克时，会影响由维生素B12缺乏引起的贫血和神经病的诊断，同时潜在促进肿瘤生长的风险。因此，通过食物补充天然叶酸，是解决叶酸缺乏问题的重要方法之一。

谷子又名粟，去壳后称为小米。小米富含碳水化合物、蛋白质、氨基酸、维生素以及钙、铁、锌等微量元素，是很好的食疗保健作用，是病人、孕产妇和婴幼儿的首选食物之一。其中小米叶酸含量与品种和产地环境密切相关，因此研究建立小米中叶酸含量的测定方法，快速掌握小米叶酸含量，揭示不同品种不同产地小米叶酸含量，确定小米叶酸在主要粮食及果蔬叶酸中的地位，对于谷子生产区域规划及培育高叶酸含量谷子品种具有重要意义。

近年来，人们对不同产品叶酸含量的检测方法进行了系统研究，建立了多种叶酸提取和检测手段，不同产品叶酸含量的检测方法各不相同。目前对叶酸检测方法的研究主要集中在微生物法与高效液相色谱法、国标微生物法与试剂盒法等。每种方法均有其相应的使用范围和优缺点，主要是根据检测样品的种类来选择。微生物法目前主要应用于婴幼儿食品和乳品中叶酸的检测, 在其他食品类别中报道较少,仅测定了即食食品的叶酸含量、研究了蚕豆的不同品种在不同加工方式下叶酸的变化。所以，建立小米中叶酸检测的方法尤为必要。

国家标准《GB 5009.211-2022 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》是现行有效的叶酸检测标准，该标准属于微生物法，其主要过程为：在无菌操作条件下，将活化好的菌液和待测样品加入预先准备好的叶酸测定用培养基中，经过一段时间培养，培养液的浑浊度与叶酸含量之间呈线性关系，最后用紫外分光光度计在540nm波长处测定培养液的吸光值，从而计算出待测样品中叶酸的含量。微生物法所用仪器设备简单，但存在实验周期长、操作步骤繁琐、结果重复性较差等不足。当前国内外无小米中叶酸测定的相关标准，因此，研究建立适合小米叶酸含量检测的方法标准迫在眉睫。

通过制定团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》，规范小米中叶酸测定的各环节技术，对提高小米中叶酸的测定技术水平具有重要意义。

三、项目编制过程

**（一）成立标准编制工作组**

团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》项目任务下达后，广西壮族自治区农业科学院牵头组织成立了标准编制工作组，制定了标准编写方案，明确任务职责，确定工作技术路线，开展标准研制工作，具体由广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西标准化协会相关人员配合。

**（二）收集整理文献资料**

标准编制工作组收集了国内有关小米中叶酸的测定的相关技术文献资料。主要有：

GB 5009.211-2022 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定

**（三）研讨确定标准主体内容及特色创新点**

标准编制工作组在对收集的资料进行整理研究之后，标准编制工作组召开了标准编制会议，对标准的整体框架结构进行了研究，并对标准的关键性内容进行了初步探讨。经过研究，标准的主体内容确定为小米中叶酸的测定的原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤、精密度、定量限。

本标准的特色创新点：

1.流程简化与效率提升：采用“直接浸提”法，省去酶解、净化等复杂步骤，前处理时间大幅缩短，更适用于快速检测。

2.操作精细化与标准化：对称样量、定容体积、浸提时间等进行精确量化规定，确保了方法的重现性和准确性。

**（四）调研及形成草案、征求意见稿**

2024年7月——2025年6月，在前期工作的基础之上，通过理清逻辑脉络，整合已有的参考资料中有关小米中叶酸测定的要求，并结合小米中叶酸测定实际要求的基础上，按照简化、统一等原则编制完成团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》（草案）。

2025年7月——11月，标准编制工作组对前期的研究和数据进了整理并结合前期技术咨询会、征求意见会的内容针对小米中叶酸的测定进行多次讨论、研究，最终形成团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》（征求意见稿）和编制说明。

四、标准制定原则

**（一）实用性原则**

本文件是在充分收集相关资料和文献，分析小米中叶酸的测定当前现状，调研小米中叶酸的分析方法情况，在现有国家、行业标准相关毒物测定方法要求的基础上，结合多年经验而总结起草的。符合当前使用液相色谱-串联质谱法测定小米中叶酸的方向与需求，有利于行业的长远发展，具有较强的实用性和可操作性。

**（二）协调性原则**

本文件编写过程中注意了与小米中叶酸的测定相关法律法规的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。

**（三）规范性原则**

本文件严格参照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》的要求和规定编写本标准的内容，保证标准的编写质量。

**（四）前瞻性原则**

本文件在兼顾当前区内采用液相色谱-串联质谱法测定小米中叶酸现实检验情况的同时，还考虑到了小米中叶酸的测定方法快速发展的趋势和需要，在标准中体现了个别特色性、前瞻性和先进性条款，作为对小米中叶酸的测定的指导。

五、标准主要章节内容及确定依据

团体标准《小米中叶酸的测定 高效液相色谱法》主要内容包括原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤、精密度、定量限。

**一、原理**

原理主要参考《GB 5009.211-2022 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》、《高效液相色谱法检测药物和食物中的叶酸[J]》、《高效液相色谱法测定豆类和谷物中叶酸的含量[J]》等文献资料，经起草单位试验总结得出：试样中叶酸用碳酸钠溶液提取，采用高效液相色谱仪分离，紫外检测，外标法定量。

**二、试剂和材料**

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的要求。本章节根据起草单位试验验证总结得出。

用到的试剂有：甲醇（色谱纯）、碳酸钠、磷酸二氢钾（优级纯）、氢氧化钾。

溶液配制：

1.碳酸钠溶液（0.1 moL/L）：称取碳酸钠5.3 g，用水溶解，定容至500 mL，混匀。

2.氢氧化钾溶液（0.1 moL/L）：称取氢氧化钾2.81 g，用水溶解，定容至500 mL，混匀。

3.磷酸二氢钾溶液（0.05 moL/L）：称取磷酸二氢钾6.8 g，用850 mL水溶解，加入约70 mL氢氧化钾溶液,调节PH=6.3，水定容至10 000 mL，摇匀。

4.叶酸标准品（C19H19N7O6，CAS号：59-30-3）：纯度≥98.0%。

5.叶酸标准储备溶液：用感量0.0001 g天平准确称取0.01 g叶酸标准品，置于10 mL棕色容量瓶中，加入碳酸钠溶液，溶解，定容至刻度，摇匀。该标准储备液叶酸含量为1 000 mg/L，2 ℃～8 ℃保存，有效期6个月。

6.叶酸标准工作溶液：吸取1.0 mL标准储备液（5.2.5）于10 mL容量瓶中，用碳酸钠溶液（5.2.1）定容至刻度，配得叶酸标准中间液（100 mg/L）。分别吸取0.02 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL和5.0 mL标准中间溶液（100 mg/L）于10 mL容量瓶中，用碳酸钠溶液（5.2.1）定容至刻度，配得叶酸的质量浓度为0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L和50 mg/L的标准工作液，可根据实际样品溶液的浓度适当调整标准工作液浓度。临用现配。

**材料：**容量瓶（10 mL、50 mL、500 mL、1000 mL）、微孔滤膜（孔径0.22 μm，水相系）、40目筛网（孔径0.425 mm）。

**三、仪器设备**

天平（感量0.0001 g、感量0.001 g）、移液枪（20 μL、200 μL、500 μL）、量筒（100 mL、1 000 mL）、离心机（转速不低于6 000 r/min）、粉碎机、高效液相色谱仪：配紫外可调波长检测器（或二极管矩阵检测器）。

**四、试验步骤**

**1.试样制备：**随机取小米样品500 g,经粉碎机粉碎后使其全部通过0.425 mm的标准网筛，混匀，放入聚乙烯瓶或袋中，2 ℃～8 ℃避光保存。

2.**称取试样：**1.0 ～2.0 g（精确至0.001g），置于20 mL棕色容量瓶中，加入15 mL碳酸钠溶液，浸提2 h，期间摇动2～3次，用碳酸钠溶液定容至刻度，摇匀。取少量提取液于离心机上5 000 r/min离心5 min，取上清液过 0.22μm微孔滤膜，待测定。

**3.条条件优化**

**3.1 液相色谱条件**

实验考察了甲醇-水、甲醇-磷酸（0.1%）、甲醇-磷酸二氢钾溶液（0.05moL/L）等流动相对目标化合物保留行为的影响，结果表明当采用纯水作为流动相时，目标化合物峰形较宽并带有明显拖尾现象且分离度较差；当水相中添加了磷酸后，目标化合物的色谱峰峰形有了较大改善；仅当水相中添加了磷酸二氢钾后，获得最佳色谱峰型及分离度。因此，选择甲醇-磷酸二氢钾溶液（0.05moL/L）作为流动相。同时考察了30℃、35℃、40℃不同柱温对出峰时间的影响，根据出峰时间和峰型，选择35℃作为液相色谱柱温。最终确定仪器参考条件为：

——色谱柱；C18柱(250 mm×4.6 mm，5 µm)，或性能相当；

——流动相：V[磷酸二氢钾溶液（5.2.3）]：V[甲醇（5.1.1）]=90：10（体积比）；

——流速：1.0 mL/min；

——柱温：35 ℃；

——进样量：10L；

——检测波长：285 nm。

**3.2 提取溶剂**

实验考察了水、磷酸二氢钾溶液、不同碳酸钠溶液（0.01 mol/L、0.05 mol/L、0.1 mol/L、0.15 mol/L、0.2 mol/L）提取目标化合物叶酸，并通过HPLC法对不同提取溶剂所得提取液中叶酸含量的测定来比较提取效果。实验发现，在同一实验条件下，碳酸钠溶液的提取效果最好，且当碳酸钠水溶液为0.1 mol/L时，提取效果最佳（如表1-1所示）。因此，选择0.1 mol/L的碳酸钠溶液作为提取溶剂。

表1-1 不同提取溶剂

|  |  |
| --- | --- |
| 提取溶剂 | 测定结果/mg/kg |
| 水 | 3.853 |
| 磷酸二氢钾溶液（0.1mol/L） | 4.018 |
| 碳酸钠溶液（0.01mol/L） | 7.439 |
| 碳酸钠溶液（0.05mol/L） | 9.853 |
| **碳酸钠溶液（0.1 mol/L）** | **10.602** |
| 碳酸钠溶液（0.15mol/L） | 10.103 |
| 碳酸钠溶液（0.2 mol/L） | 8.345 |

**3.3 料液比**

实验考察了不同料液比（1：15、1：20、1：25、1：30、1：40、1：50）对目标化合物叶酸的提取效果。结果表明，随着料液比比例增大，提取所得叶酸含量先增大后逐渐减少，当料液比为1：20时，提取效果最佳（如图1-1所示），因此，最终选择料液比为1：20。

图1-1 料液比

**3.4 提取时间**

提取时间对目标化合物的提取效果有一定的影响，实验考察了不同提取时间（0.5 h、1 h 、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h）对叶酸的提取效果。实验发现，随着提取时间的增大，叶酸的提取效果先增大后逐渐减少（如图1-2所示），当提取时间为2 h 时， 提取效果最佳，因此，最终选择提取时间为2 h。

图1-2 提取时间

**3.5 提取温度**

不同浸提温度对目标化合物的提取效果有一定的影响，实验考察了不同温度（25 ℃、30 ℃ 、40 ℃、50 ℃、60 ℃、80 ℃）对叶酸的提取效果。实验发现，随着提取温度的增大，叶酸的提取效果先增大后逐渐减少（如图1-3所示），当提取温度为30 ℃ 时， 效果最佳，因此，最终选择提取温度为30 ℃。

图1-3 提取温度

**3.6 标准曲线制作**

分别取叶酸标准储备液（1000 mg/L）0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0 mL，用碳酸钠溶液（0.1 moL/L）稀释定容至10 mL，配制得到0.2、0.5、1、2 、5、10 、20 和50 mg/L 系列的标准工作液。按3.1仪器参考条件进行 HPLC 测定。以峰面积（Y）与对照品质量浓度 （X，mg/L）进行线性回归，绘制标准曲线（如图1-4所示），在含量0.2~50 mg/L范围内呈线性关系，相关系数为0.9999。

图表

AI 生成的内容可能不正确。

图1-4 标准曲线

**3.7 色谱分析。**分别将标准溶液和试样溶液，注入液相色谱仪中，以样品溶液峰面积与标准溶液峰面积比较定量，色谱图见下图1-5。被测样品溶液中目标叶酸色谱峰的保留时间与相应标准溶液的色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内。

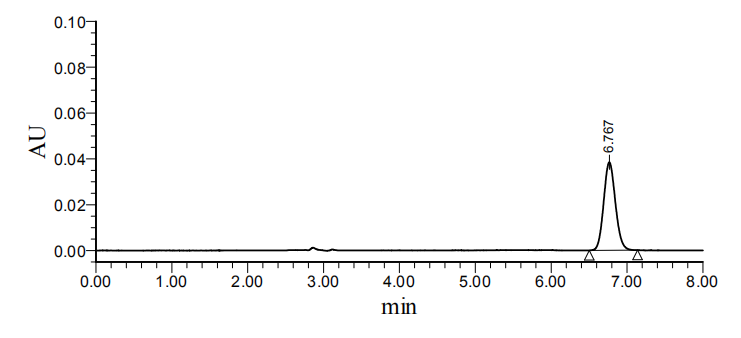


图1-5 叶酸标准溶液（10 mg/L）的液相色谱图

**结果计算：**

按公式：X=(P×V)/M×100/(1000)，计算试样中叶酸的含量：

式中：

X ——试样中叶酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

P ——根据标准曲线计算得到的试样中叶酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样溶液的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

M ——试样质量，单位为克（g）；

100 ——换算为100 g样品中含量的换算系数；

1 000 ——将浓度单位为g/mL换算为mg/mL的换算系数。

**五、实验室间方法确认**

根据GB5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》验证要求，选择3家实验室进行实验室间方法确认，确认方法的“检出限与定量限”、“正确度与精密度”、“再现性精密度”、“稳定性”。

**1.检出限与定量限**

采用信噪比法估算检出限。向空白样品添加标准溶液，使样品溶液中叶酸酸浓度为0.2 mg/100g，连续测定6次，得到色谱峰信噪比。用信噪比均值计算空白样信噪比为3时的添加浓度为估算检出限；以3倍检出限作为估算定量限。经三家单位试验验证，验证结果见表1。最后将检出限定为0.07 mg/100 g，定量限定为0.2 mg/100 g。

表1 检出限与定量限

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 验证单位 | 样品编号 | S/N | S/N均值 | 检出限（mg/100g） | 定量限（mg/100g） |
| 广西壮族自治区农业  科学院 | C-1 | 8.52 | 8.35 | 0.072 | 0.22 |
| C-2 | 9.20 |
| C-3 | 8.46 |
| C-4 | 7.42 |
| C-5 | 8.23 |
| C-6 | 8.25 |
| 广西壮族自治区产品  质量检验研究院 | C-1 | 7.74 | 8.43 | 0.071 | 0.210 |
| C-2 | 8.72 |
| C-3 | 7.71 |
| C-4 | 8.50 |
| C-5 | 8.64 |
| C-6 | 9.30 |
| 南宁海关技术中心 | C-1 | 7.93 | 8.77 | 0.068 | 0.20 |
| C-2 | 8.43 |
| C-3 | 8.75 |
| C-4 | 8.60 |
| C-5 | 9.20 |
| C-6 | 9.71 |

**2.正确度与精密度验证**

1）在标准曲线范围内对叶酸样品分别进行低、中、高三个浓度级别的加标回收试验，并重复测定每个级别加标样品6次以评价方法精密度。经三家单位验证实验，得到本标准方法的回收率范围：95.7%～104.6% ，重复性相对标准偏差范围：0.55%～6.45%。满足GB5009.295-2023对回收率（80%～110%）与重复性相对标准偏差（≤10%）的要求。验证结果详见表2。

表2 回收率与精密度

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 验证单位 | 样品编号 | 加标浓度（mg/100g） | 实测浓度（mg/100g） | 回收率 (%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
| 广西壮族自治区农业科学院 | C1-1 | 0.4 | 0.4355 | 108.9 | 104.6 | 4.71 |
| C1-2 | 0.4267 | 106.7 |
| C1-3 | 0.3934 | 98.4 |
| C1-4 | 0.4371 | 109.3 |
| C1-5 | 0.4232 | 105.8 |
| C1-6 | 0.3943 | 98.6 |
| C2-1 | 4 | 4.3144 | 107.9 | 100.9 | 5.31 |
| C2-2 | 4.0583 | 101.5 |
| C2-3 | 3.762 | 94.0 |
| C2-4 | 4.107 | 102.7 |
| C2-5 | 3.8055 | 95.1 |
| C2-6 | 4.1712 | 104.3 |
| C3-1 | 40 | 40.4164 | 101.0 | 100.7 | 0.44 |
| C3-2 | 39.9384 | 99.8 |
| C3-3 | 40.3718 | 100.9 |
| C3-4 | 40.3696 | 100.9 |
| C3-5 | 40.2204 | 100.6 |
| C3-6 | 40.3173 | 100.8 |
| 广西壮族自治区产品质量检验研究院 | C1-1 | 0.4 | 0.4159 | 104.0 | 102.6 | 3.84 |
| C1-2 | 0.3938 | 98.4 |
| C1-3 | 0.4281 | 107.0 |
| C1-4 | 0.3921 | 98.0 |
| C1-5 | 0.4269 | 106.7 |
| C1-6 | 0.4063 | 101.6 |
| C2-1 | 4 | 3.8746 | 103.99 | 101.1 | 3.03 |
| C2-2 | 3.8746 | 102.3 |
| C2-3 | 3.8746 | 104.0 |
| C2-4 | 3.8746 | 97.7 |
| C2-5 | 3.8746 | 96.9 |
| C2-6 | 3.8746 | 101.9 |
| C3-1 | 40 | 39.1938 | 98.0 | 95.7 | 3.43 |
| C3-2 | 39.4192 | 98.5 |
| C3-3 | 37.0026 | 92.5 |
| C3-4 | 39.2639 | 98.2 |
| C3-5 | 38.5205 | 96.3 |
| C3-6 | 36.3184 | 90.8 |
| 南宁海关技术中心 | C1-1 | 0.4 | 0.4335 | 108.4 | 103.4 | 6.45 |
| C1-2 | 0.438 | 109.5 |
| C1-3 | 0.3734 | 93.4 |
| C1-4 | 0.3884 | 97.1 |
| C1-5 | 0.4177 | 104.4 |
| C1-6 | 0.4309 | 107.7 |
| C2-1 | 4 | 4.2464 | 106.2 | 99.6 | 5.29 |
| C2-2 | 4.0149 | 100.4 |
| C2-3 | 3.7062 | 92.7 |
| C2-4 | 4.0635 | 101.6 |
| C2-5 | 3.7572 | 93.9 |
| C2-6 | 4.1144 | 102.9 |
| C3-1 | 40 | 40.1224 | 100.3 | 99.5 | 0.55 |
| C3-2 | 39.4989 | 98.7 |
| C3-3 | 39.7905 | 99.5 |
| C3-4 | 39.9156 | 99.8 |
| C3-5 | 39.6099 | 99.0 |
| C3-6 | 39.8017 | 99.5 |

2）再现性精密度

三家验证实验室分别对小米中叶酸样品验证低、中、高3个浓度值样品。结果的再现性相对标准偏差为1%～10%，符合GB 5009.295对再现性相对标准偏差的要求（≤15%）。结果详见表4。

表4 再现性精密度结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 结果（mg/100g） | | | RSD |
| 广西农科院 | 广西质检院 | 南宁海关 |
| C-1 | 0.418 | 0.411 | 0.414 | 0.85 |
| C-2 | 4.036 | 4.046 | 3.984 | 0.83 |
| C-3 | 40.272 | 38.286 | 39.79 | 2.62 |

六、国内外同类标准制修订情况及与法律法规、强制性标准关系

经查阅，国内尚未制定与“小米中叶酸检测”有关的标准。本标准的内容与现行的法律、法规及强制性标准无冲突，标准的编写符合GB/T 1.1-2020的要求。

九、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准研制过程中无重大分歧意见。

十、自我承诺

本标准内容与各项指标不低于强制性标准要求。

团体标准《小米中叶酸的测定

液相色谱-串联质谱法》标准编制工作组

2025年11月18日