



中华人民共和国国家标准

GB 28301—2012

食品安全国家标准

食品添加剂 核黄素 5'-磷酸钠

2012-04-25 发布

2012-06-25 实施

中华人民共和国卫生部 发布

食品安全国家标准

食品添加剂 核黄素 5'-磷酸钠

1 范围

本标准适用于以核黄素为原料，经磷酸化、中和、精制等步骤生产的食品添加剂核黄素 5'-磷酸钠。

2 分子式和相对分子质量

2.1 分子式



2.2 相对分子质量

514.36（按 2007 年国际相对原子质量）

3 技术要求

3.1 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	橙黄色	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
状态	结晶性粉末	

3.2 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
核黄素（ $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ ）含量，w/%	73.0~79.0	附录 A 中 A.3
比旋光度 $\alpha_m(25^\circ\text{C},\text{D})/[(^\circ)\cdot\text{dm}^2\cdot\text{kg}^{-1}]$	+37.0~+42.0	附录 A 中 A.4
pH	5.0~6.5	附录 A 中 A.5
干燥减量，w/%	≤ 7.5	附录 A 中 A.6
灼烧残渣，w/%	≤ 25.0	附录 A 中 A.7
游离磷酸，w/%	≤ 1.0	附录 A 中 A.8
游离核黄素，w/%	≤ 6.0	附录 A 中 A.9
核黄素二磷酸盐，w/%	≤ 6.0	附录 A 中 A.9
铅（Pb）/（mg/kg）	≤ 2.0	GB 5009.12

附 录 A

检验方法

A.1 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—2008中规定的三级水。试验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、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.2 鉴别试验

A.2.1 试剂和材料

A.2.1.1 盐酸溶液：取盐酸1 mL，用水稀释至3 mL。

A.2.1.2 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠1 g，加水溶解并稀释至25 mL。

A.2.2 鉴别方法

称取约 1.5 mg 试样，加 100 mL 水溶解，此为试样液。试样液在透射光下显淡黄绿色，并有强烈的黄绿色荧光。取试样液 25 mL，加入 0.5 mL 盐酸溶液，荧光消失；另取试样液 25 mL，加入 0.1 mL 氢氧化钠溶液，荧光消失。

A.3 核黄素（ $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ）含量的测定

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 冰乙酸。

A.3.1.2 乙酸钠溶液：14 g/L。

A.3.2 仪器和设备

分光光度计。

A.3.3 分析步骤

避光操作。称取约 100 mg 样品，精确至 0.0001 g，置于 500 mL 容量瓶中，加 1 mL 冰乙酸和 75 mL 水。待样品溶解后，用水稀释至刻度，摇匀。精确量取 10 mL，置于 100 mL 容量瓶中，加入 7 mL 乙酸钠溶液，用水稀释至刻度，摇匀。以水作空白，用光程为 1 cm 的比色杯，在 444 nm 波长处测定样品溶液的吸光度。核黄素的吸光系数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ）以 328 计。

A.3.4 结果计算

核黄素含量以核黄素的质量分数 w_0 计，数值以%表示，按公式（A.1）计算：

$$w_0 = \frac{50 \times A}{328 \times m \times (1 - w_1)} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

50——稀释倍数；

A ——样品溶液的吸光度值；

m ——样品质量的数值，单位为克（g）；

w_1 ——实测样品干燥减量的数值，%。

实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与算术平均值的比值不大于 1.0 %。

A.4 比旋光度的测定

A.4.1 试剂和材料

盐酸溶液：取盐酸27.0 mL，用水稀释、定容至50 mL。

A.4.2 仪器和设备

旋光仪，精度 $\pm 0.01^\circ$ 。

A.4.3 分析步骤

避光操作。称取 0.75 g（以无水产品计）样品，精确至 0.0001 g，置于 50 mL 容量瓶中，加盐酸溶液溶解并稀释至刻度，在 15 min 内、 $25\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下用旋光仪测定比旋光度。

A.4.4 结果计算

比旋光度 $\alpha_m(25\text{ }^\circ\text{C}, D)$ 数值以 $(^\circ)\cdot\text{dm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ 表示，按公式 (A.2) 计算：

$$\alpha_m(25^\circ\text{C}, D) = \frac{\alpha}{l\rho_a} \cdots \cdots \cdots \quad (\text{A.2})$$

式中：

α ——测得的旋光角，单位为度 ($^\circ$)；

l ——旋光管的长度，单位为分米 (dm)；

ρ_a ——样品溶液的浓度，单位为克每毫升 (g/mL)。

实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与算术平均值的比值不大于 1.0 %。

A.5 pH的测定

A.5.1 仪器和设备

酸度计，精度 ± 0.01 。

A.5.2 分析步骤

称取 1.0 g 样品，精确至 0.0001 g，置于 200 mL 清洁干燥的烧杯中，加水 100 mL 溶解，在 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 下用酸度计测定其 pH。

A.5.3 结果计算

实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与算术平均值的比值不大于 1.0 %。

A.6 干燥减量的测定

A.6.1 仪器和设备

恒温真空干燥箱。

A.6.2 分析步骤

称取约 2 g 样品，精确至 0.0001 g，置于已干燥至恒重的称量瓶中，于 $100\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 、0.01 MPa 下干燥 5 h，然后置于干燥器中冷却至室温，称重。

A.6.3 结果计算

干燥减量以质量分数 w_1 计，数值以%表示，按公式 (A.3) 计算：

$$w_1 = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100\% \cdots \cdots \cdots \quad (\text{A.3})$$

式中：

m_1 ——干燥前样品和称量瓶质量的数值，单位为克 (g)；

m_2 ——干燥后样品和称量瓶质量的数值，单位为克 (g)；

m_3 ——干燥前样品质量的数值，单位为克 (g)。

实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与

算术平均值的比值不大于 1.0 %。

A.7 灼烧残渣的测定

A.7.1 仪器和设备

高温炉。

A.7.2 分析步骤

称取约 1 g 样品，精确至 0.001 g，置于已在 600 °C ~ 700 °C 下灼烧至恒重的坩埚中，缓缓加热至样品完全碳化。将碳化的样品冷却，用 0.5 mL 的硫酸润湿残渣，继续加热至硫酸蒸汽逸尽，并在 600 °C ~ 700 °C 的高温炉中灼烧至恒重。

A.7.3 结果计算

灼烧残渣以质量分数 w_2 计，数值以 % 表示，按公式 (A.4) 计算：

$$w_2 = \frac{m_4 - m_5}{m_6} \times 100\% \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

m_4 ——残渣和空坩埚质量的数值，单位为克 (g)；

m_5 ——空坩埚质量的数值，单位为克 (g)；

m_6 ——样品质量的数值，单位为克 (g)。

实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与算术平均值的比值不大于 1.0 %。

A.8 游离磷酸的测定

A.8.1 试剂和材料

A.8.1.1 标准磷酸盐溶液：精确称取 105 °C 干燥 2 h 的磷酸二氢钾 0.22 g，置于 1000 mL 容量瓶中，加适量的水溶解，并稀释至刻度，摇匀，临用时再稀释 5 倍。

A.8.1.2 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 溶液：70 g/L。

A.8.1.3 硫酸溶液：3.75 mol/L。

A.8.1.4 酸性钼酸铵溶液：将 25 mL 钼酸铵溶液用水稀释至 200 mL，然后缓缓加入 25 mL 硫酸溶液，摇匀。

A.8.1.5 硫酸亚铁溶液：精确称取 10.0 g 的硫酸亚铁，置于 100 mL 容量瓶中，加适量的水和 2 mL 的硫酸溶液溶解，并稀释至刻度，摇匀。

A.8.2 仪器和设备

紫外-可见分光光度计。

A.8.3 分析步骤

A.8.3.1 样品溶液的制备

精确称取 300.0 mg 样品（按无水品计），置于 100 mL 容量瓶中，加适量的水溶解，并稀释至刻度，摇匀。

A.8.3.2 测定

精确量取标准磷酸盐溶液和样品溶液各 10.0 mL，分别置于 50 mL 的锥形瓶中，然后向各锥形瓶中加入 10.0 mL 酸性钼酸盐溶液和 5 mL 硫酸亚铁溶液，混匀，以 10.0 mL 水、10.0 mL 酸性钼酸盐溶液和 5 mL 硫酸亚铁溶液组成的混合液为空白，用光程为 1 cm 的比色杯，在 700 nm 波长处测定各锥形瓶中溶液的吸光度。样品溶液的吸光度不得大于标准溶液的吸光度。

A.8.4 结果计算

实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与算术平均值的比值不大于 1.5 %。

A.9 游离核黄素和核黄素二磷酸盐的测定

A.9.1 试剂和材料

A.9.1.1 KH_2PO_4 溶液：0.054 mol/L。

A.9.1.2 甲醇：色谱纯。

A.9.1.3 核黄素标准品：核黄素含量不低于99.0%（质量分数）。

A.9.1.4 核黄素5'-磷酸钠标准品：核黄素含量不低于74.0%（质量分数）。

A.9.2 仪器和设备

高效液相色谱仪，配荧光检测器（激发波长 440 nm；发射波长 470 nm）。

A.9.3 参考色谱条件

A.9.3.1 色谱柱：C18柱，3.9 mm×300 mm，或其他等效的色谱柱。

A.9.3.2 流动相：按 KH_2PO_4 溶液：甲醇=85：15（体积比）配制，混合均匀后，用0.45 μm滤膜过滤，超声脱气后备用。

A.9.3.3 柱温：室温。

A.9.3.4 流动相流速：2.0 mL/min。

A.9.3.5 进样量：100 μL。

A.9.4 分析步骤

A.9.4.1 系统适应性溶液的制备

溶解 100 mg 核黄素 5'-磷酸钠标准品于水中，使其质量浓度为 2.0 mg/mL，加入等体积的流动相，混匀。吸取 8 mL，用流动相稀释至 50 mL，混匀备用。

A.9.4.2 标准溶液的制备

精确称取 60.0 mg 核黄素标准品于 250 mL 容量瓶中，小心加入 1 mL 盐酸溶解，用水稀释至刻度，混匀。用移液管吸取 4 mL 的核黄素溶液于 100 mL 容量瓶中，用流动相稀释至刻度，混匀备用。

A.9.4.3 样品溶液的制备

精确称取 100.0 mg 样品于 100 mL 容量瓶中，加 50 mL 水溶解，用流动相稀释至刻度，混匀。用移液管吸取 8 mL 溶液于 50 mL 容量瓶中，用流动相稀释至刻度，混匀备用。

A.9.4.4 系统适应性要求

取适量系统适应性溶液注入色谱仪中进行色谱分析。核黄素4'-单磷酸盐和核黄素5'-单磷酸盐之间的分离度应不低于1.0；核黄素5'-单磷酸盐两次重复进样的相对标准偏差不大于1.5%。

核黄素5'-单磷酸盐的保留时间约为20 min~25 min。各组分的近似相对保留时间如表A.1所示。

表 A.1 各组分的近似相对保留时间

组分	相对保留时间
核黄素 3',4'-二磷酸盐	0.23
核黄素 3',5'-二磷酸盐	0.39
核黄素 4',5'-二磷酸盐	0.58
核黄素 3'-单磷酸盐	0.70
核黄素 4'-单磷酸盐	0.87
核黄素 5'-单磷酸盐	1.00
核黄素	1.63

A.9.4.5 测定

分别将等体积（约 100 μL）的标准溶液、样品溶液和系统适应性溶液注入色谱仪中进行色谱分析，记录色谱图，分别测量标准溶液和样品溶液色谱图中的峰响应值。通过比对系统适应性溶液色谱图中色谱峰的保留时间，确定样品溶液色谱图中待测的峰。

A.9.5 结果计算

游离核黄素含量以游离核黄素的质量分数 w_3 计，数值以%表示，按公式 (A.5) 计算：

$$w_3 = 625 \times w_s \times \frac{P_F}{P_S} \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

625——样品的稀释倍数；

w_s ——标准溶液中核黄素浓度的数值，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；

P_F ——样品溶液色谱图中核黄素的峰响应值；

P_S ——标准溶液色谱图中核黄素的峰响应值；

核黄素二磷酸盐含量以核黄素二磷酸盐的质量分数 w_4 计，数值以%表示，按公式 (A.6) 计算：

$$w_4 = 625 \times w_s \times \frac{P_D}{P_S} \dots\dots\dots (A.6)$$

式中：

625——样品的稀释倍数；

w_s ——标准溶液中核黄素浓度的数值，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；

P_S ——标准溶液色谱图中核黄素的峰响应值；

P_D ——样品溶液色谱图中三种核黄素二磷酸盐峰的总响应值。

实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与算术平均值的比值不大于 1.5 %。