



# 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 氰钴胺

(征求意见稿)

201×-××-××发布

201×-××-××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 氰钴胺

### 1 范围

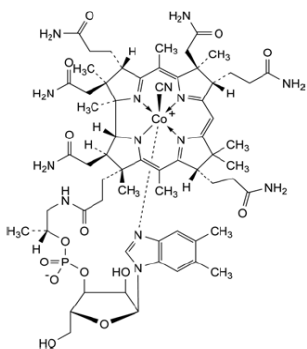
本标准适用于以微生物发酵生成含钴胺素的发酵液，经转化和结晶得到的食品营养强化剂氰钴胺。

### 2 分子式、结构式和相对分子质量

#### 2.1 分子式

氰钴胺： $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$

#### 2.2 结构式



#### 2.3 相对分子质量

氰钴胺：1355.38（按 2016 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	暗红色	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	结晶状颗粒或粉末	

#### 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
氰钴胺含量（以干基计），w/%	96.0~102.0	附录 A 中 A.4
干燥减量，w/%	≤ 12	附录 A 中 A.5
有关物质，w/%	≤ 2.0	附录 A 中 A.6
丙酮/mg/kg	≤ 5000	附录 A 中 A.7
铅(Pb) /mg/kg	≤ 1.0	GB 5009.12 第一法
总砷(以 As 计) /mg/kg	≤ 1.0	GB 5009.11 第一篇第二法
需氧菌总数，w/(cfu/g)	≤ 1000	附录 A 中 A.8

霉菌和酵母菌总数, $w$ /(cfu/g) $\leq$	100	附录 A 中 A.9
注: 商品化的氰钴胺(维生素 B <sub>12</sub> ) 产品应以符合本标准的氰钴胺为原料, 可添加用于加工、贮存、标准化、溶解等工艺目的的麦芽糊精、柠檬酸钠、柠檬酸、甘露醇、磷酸氢钙等食品原料和食品添加剂。		

## 附录 A

## 检验方法

## A.1 安全提示（或警示）

本标准的检验方法中使用的部分试剂具有毒性或者腐蚀性，操作时应采取适当的安全和防护措施。

## A.2 一般规定

本标准除另有规定外，所用试剂的纯度应为分析纯，所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，应按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备，实验用水应符合GB/T 6682中三级水的规定。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 试剂和材料

A.3.1.1 丙酮。

A.3.1.2 三氯甲烷。

A.3.1.3 乙醚。

A.3.1.4 盐酸。

A.3.1.5 乙酸钠。

A.3.1.6 溴化钾。

A.3.1.7 氟化钠。

A.3.1.8 硫酸氢钾。

A.3.1.9 次磷酸。

A.3.1.10 酚酞指示剂。

A.3.1.11 乙酸(1 mol/L)。

A.3.1.12 氢氧化钠溶液 (100 g/L)：称取10 g氢氧化钠，加水溶解并定容至100 mL。

A.3.1.13 氢氧化钠溶液(20 g/L)：称取1 g氢氧化钠，加水溶解并定容至50 mL。

A.3.1.14 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠溶液 (2 g/L)：称取0.1 g 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠，缓缓加水溶解并定容至50 mL。

A.3.1.15 硫酸溶液(1+7)：取70 mL水，缓缓注入10 mL硫酸，混匀。

A.3.1.16 硫酸亚铁铵饱和溶液：称取42 g六水合硫酸亚铁铵，加水溶解并定容至100 mL。

## A.3.2 仪器和设备

A.3.2.1 坩埚。

A.3.2.2 蒸馏装置。

A.3.2.3 紫外-可见分光光度计。

## A.3.3 鉴别方法

## A.3.3.1 溶解性

略溶于水和乙醇，不溶于丙酮、三氯甲烷或乙醚。

## A.3.3.2 紫外鉴别

准确称取30 mg试样于1000 mL容量瓶中，用水定容至刻度，采用紫外-可见分光光度计测定，在吸收谱上应出现最大峰278±1 nm、361±1 nm和550±2 nm。361 nm波长处的吸光度与278 nm波长处的吸光度的比值应为1.70~1.90。361 nm波长处的吸光度与550 nm波长处的吸光度的比值应为3.15~3.40。

#### A. 3. 3. 3 钴原子鉴别

取约1 mg试样，加硫酸氢钾约50 mg，置坩埚中，灼烧至熔融，放冷，用玻璃棒捣碎，加3 mL水，煮沸使溶解，加酚酞指示剂1滴，混匀，滴加氢氧化钠溶液(A.3.1.12)至显淡红色后，加500 mg乙酸钠、0.5 mL乙酸(A.3.1.11)和0.5 mL 1-亚硝基-2-萘酚-3,6-二磺酸钠溶液(A.3.1.14)，立即显现红色或橙红色，加盐酸0.5 mL，煮沸1分钟，颜色应不消失。

#### A. 3. 3. 4 氰离子鉴别

移取约5 mg氰钴胺试样于盛有5 mL水的50 mL蒸馏烧瓶中，蒸馏烧瓶连接一个短的、水冷却的垂直冷凝装置，冷凝装置出口端浸入到盛有1 mL氢氧化钠溶液(A.3.1.13)的测试管中。样品溶解于蒸馏烧瓶中后，加入2.5 mL次磷酸，连接好冷凝装置，缓慢加热煮沸10 min，收集1 mL蒸馏液于测试管中。测试管中加入4滴冷的、硫酸亚铁铵饱和溶液(A.3.1.16)，轻摇，加入30 mg氟化钠，加热至沸腾，立即加入几滴硫酸溶液(A.3.1.15)至溶液变澄清，再加入3~5滴硫酸溶液，数分钟内溶液变成蓝色至蓝绿色。

#### A. 3. 3. 5 红外鉴别

将溴化钾压片试样的谱图与氰钴胺标准品谱图（见附录B中B.1）比较，两者应基本一致。

### A. 4 氰钴胺含量

#### A. 4. 1 仪器和设备

分光光度计。

#### A. 4. 2 分析步骤

精确称取约0.025 g（精确至0.1 mg）干燥试样于1000 mL容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀得到试样溶液。用紫外可见分光光度计测定。以水作空白，采用1 cm比色皿在361 nm处测定试样溶液吸光度值。

#### A. 4. 3 结果计算

氰钴胺含量（以干基计）的质量分数  $w_1$  按式（A.1）计算。

$$w_1 = \frac{A}{207} \times \frac{V}{m} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$A$ ——氰钴胺紫外吸光值；

207——氰钴胺的标准百分吸收系数 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )；

$V$ ——试样定容体积，单位为毫升(mL)；

$m$ ——试样量(以干基计)，单位为克(g)；

实验结果以平行测定结果的算术平均值为准，保留一位小数。

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的2.0%。

### A. 5 干燥减量

#### A. 5. 1 方法原理

干燥减量是指试样在105℃温度下干燥后，失去水分及其他挥发性物质的质量与试样质量之比，用百分数表示。

#### A. 5. 2 仪器和设备

A. 5. 2. 1 天平：感量0.0001 g。

A. 5. 2. 2 称量瓶。

A. 5. 2. 3 真空干燥箱。

### A. 5. 3 分析步骤

称取50 mg (精确至0.0001 g) 试样，置于已干燥恒重（105℃，30 min）的称量瓶中。将试样在称量瓶中均匀铺开。在105℃、真空压力低于2.67KPa条件下干燥至恒重。将称量瓶置于干燥器中冷却至室温，称量。

### A. 5. 4 结果计算

试样干燥减量的质量分数  $w_2$  按式 (A.2) 计算：

$$w_2 = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \% \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

$m_1$ ——干燥前带有样品的称量瓶质量，单位为克(g)；

$m_2$ ——干燥后带有样品的称量瓶质量，单位为克(g)；

$m_0$ ——干燥后称量瓶的质量，单位为克(g)。

计算结果保留 2 位有效数字。

取平行测定结果的算术平均值为测定结果，两次平行测定结果的绝对差值不大于 1.0%。

## A. 6 有关物质

### A. 6. 1 方法原理

试样用流动相溶解后，采用液相色谱仪检测，峰面积比较法定量。

### A. 6. 2 试剂和材料

A. 6. 2. 1 氯胺T。

A. 6. 2. 2 甲醇。

A. 6. 2. 3 磷酸氢二钠。

A. 6. 2. 4 磷酸。

A. 6. 2. 5 盐酸。

A. 6. 2. 6 磷酸氢二钠溶液：0.028 mol/L。称取10.03 g十二水合磷酸氢二钠，加水溶解并定容至1000 mL。

A. 6. 2. 7 盐酸溶液：0.05 mol/L。取4.5 mL盐酸，加水至1000 mL，混匀。

A. 6. 2. 8 氯胺T溶液：0.1 %。量取0.1 g氯胺T，加水溶解并定容至100 mL。

### A. 6. 3 仪器和设备

高效液相色谱仪

### A. 6. 4 分析步骤

A. 6. 4. 1 试样溶液：称取试样10 mg于10 mL容量瓶中，用流动相溶解并定容至刻度，混匀。

A. 6. 4. 2 对照溶液：精密量取1 mL试样溶液于100 mL量瓶中，用流动相稀释至刻度，混匀。

A. 6. 4. 3 系统适用性溶液：称取试样25 mg于25 mL容量瓶中，加10 mL水溶解样品，加入5 mL 0.1%氯胺T溶液、0.5 mL 0.05mol/L盐酸溶液，用水稀释至刻度，混匀，静置5分钟。准确量取1mL上述溶液于10 mL量瓶中，用流动相稀释至刻度，混匀。

A. 6. 4. 4 灵敏度溶液：准确量取1 mL对照溶液于10 mL容量瓶中，用流动相稀释至刻度，混匀。

### A. 6. 5 参考色谱条件

色谱柱：C<sub>18</sub>色谱柱（柱长250mm，内径4.6mm，粒径5μm），或其它等效色谱柱。

流动相：取260 mL甲醇和740 mL磷酸氢二钠溶液（A.6.2.6）混匀，用磷酸调节pH值至3.5。

柱温：25℃。

检测器波长：361 nm。

进样量：10 μL。

运行时间：氰钴胺主峰保留时间的3倍

#### A. 6. 6 系统适用性试验

采用新制备的溶液，且避免强光照射。按照液相色谱仪操作规程操作，取系统适用性溶液(A.6.4.3)和灵敏度溶液(A.6.4.4)分别注入液相色谱仪中，观察色谱图。

系统适用性溶液中应出现氰钴胺峰与一个降解产物峰（相对保留时间约为1.4），二者的分离度应大于2.5，灵敏度溶液中主峰的信噪比应大于3。

#### A. 6. 7 测定

系统适用性合格后再进行试样检测。依次注入试样溶液(A.6.4.1)、对照溶液(A.6.4.2)进行测定。

#### A. 6. 8 结果计算

试样中有关物质的含量  $w_3$  (%) 按式 (A.3) 计算：

$$w_3 = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \dots \dots \dots (A.3)$$

式中： $A_1$ —试样溶液除主峰以外的所有杂质峰面积之和。

$A_2$ —对照溶液主峰面积。

#### A. 6. 9 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. 7 丙酮

#### A. 7. 1 试剂和材料

丙酮：色谱纯。

#### A. 7. 2 仪器和设备

气相色谱仪：配有氢火焰离子化检测器（FID）和顶空进样器。

#### A. 7. 3 参考色谱条件

A. 7. 3. 1 色谱柱：毛细管柱（柱长60 m，内径0.32 mm，膜厚1.6 μm，固定液为6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷），或其它等效色谱柱。

A. 7. 3. 2 载气：氮气（纯度大于99.99%）。

A. 7. 3. 3 载气流量：1.5 mL/min。

A. 7. 3. 4 柱温：40℃保持10min后，以20℃/min的速率升温至240℃，保持2min。

A. 7. 3. 5 进样口温度：140℃。

A. 7. 3. 6 检测器温度：250℃。

A. 7. 3. 7 检测器气体流量：空气：400 mL/min；氢气：60 mL/min；尾吹气：25 mL/min。

A. 7. 3. 8 进样量：1.0 mL。

A. 7. 3. 9 分流比：1:50。

#### A. 7. 4 参考顶空条件

A. 7. 4. 1 顶空瓶平衡温度：80℃。

A. 7. 4. 2 平衡时间：45 min。

A. 7. 4. 3 定量环温度：90℃。

A. 7. 4. 4 传输线温度：100℃。

#### A. 7. 5 分析步骤

##### A. 7. 5. 1 空白溶液制备

移取5.0 mL水，置于顶空瓶中，迅速压紧瓶盖。

##### A. 7. 5. 2 标准溶液制备

称取0.1 g丙酮(精确至0.001g)于已预加80 mL水的100 mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，得到1000 mg/L的丙酮标准储备液。吸取适量的丙酮标准储备液于10 mL容量瓶中，用水配制成10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L的丙酮标准使用溶液、取上述系列溶液各5.0 mL，分别置于顶空瓶中，迅速压紧瓶盖。

##### A. 7. 5. 3 试样溶液制备

称取试样0.1 g (精确至0.001 g)于10 mL容量瓶中，用水溶解后定容至刻度，摇匀。移取该溶液5.0 mL置于顶空瓶中，迅速压紧瓶盖，备用。

##### A. 7. 5. 4 测定

在参考条件下 (A.7.3 和 A.7.4)，分别对空白溶液、标准系列溶液和试样溶液进行测定，记录丙酮的峰面积值。标准谱图参见附录 C 中图 C.1。以标准系列溶液色谱图中丙酮的峰面积为 Y 轴，以对应溶剂浓度(mg/L)为 X 轴，绘制标准曲线，得到丙酮标准曲线。根据试样溶液色谱图中丙酮的峰面积值，从标准曲线求得试样溶液中丙酮的浓度(mg/L)。

#### A. 7. 6 结果计算

试样中丙酮的含量  $w_4$  (mg/kg) 按式 (A.4) 计算：

$$w_4 = \frac{c \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (A.4)$$

式中：

$c$ ——从标准曲线求得的试样溶液中丙酮的浓度，单位为毫克每升(mg/L)。

$V$ ——试样溶液的体积，单位为毫升(mL)。

$m$ ——试样的质量，单位为克(g)。

#### A. 7. 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. 8 需氧菌总数

#### A. 8. 1 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

A. 8. 1. 1 恒温培养箱：30~35℃。

A. 8. 1. 2 恒温水浴箱：45℃±1℃。

A. 8. 1. 3 天平：感量为0.1 g、0.01 g。

A. 8. 1. 4 均质器或振荡器。

A. 8. 1. 5 无菌吸管：1 mL(具0.01 mL 刻度)、10 mL(具0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。

A. 8. 1. 6 无菌培养皿：直径90 mm。

A. 8. 1. 7 pH 计或pH 比色管或精密pH 试纸。

A. 8. 1. 8 放大镜或/和菌落计数器。

#### A. 8. 2 培养基和试剂



A. 8. 2. 1 胰酪大豆胨琼脂培养基: 胰酪胨 15.0 g, 大豆木瓜蛋白酶水解物 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1000 mL。除琼脂外, 取上述成分, 混合, 微温溶解, 调节pH使灭菌后在25℃的pH值为7.3±0.2, 加入琼脂, 加热溶化后, 摇匀, 分装, 121℃ 高压灭菌15 min。

A. 8. 2. 2 pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液: 取磷酸二氢钾3.56 g, 无水磷酸氢二钠5.77 g, 氯化钠4.30 g, 蛋白胨1.00 g, 加蒸馏水 1000 mL, 微温溶解, 滤清, 分装, 121℃ 高压灭菌15 min。

A. 8. 2. 3 pH7.2磷酸盐缓冲液: 贮存液: 称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中, 用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2, 用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。稀释液: 取贮存液1.25 mL, 用蒸馏水稀释至1000 mL, 分装于适宜容器中, 121℃ 高压灭菌15 min。

### A. 8. 3 操作步骤

#### A. 8. 3. 1 样品的制备和稀释

一般应随机抽取不少于2个最小包装的样品, 在无菌操作下, 混合, 取10 g进行检验。用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或pH 7.2 磷酸盐缓冲液, 稀释制成1:10样品匀液。若需要, 调节稀释液pH值至6~8。根据估计样品污染程度, 用同一稀释液将样品匀液进一步10倍系列稀释。

取样品匀液1 mL, 置于直径90 mm的无菌平皿中, 每个稀释度做两个平皿。同时, 分别吸取1 mL空白稀释液加入两个无菌平皿内作为空白对照。及时倾注入15~20 mL冷却至45℃的胰酪大豆胨琼脂培养基(可放置于45℃±1℃恒温水浴箱中保温), 混匀, 待凝固。

#### A. 8. 3. 2 培养和计数

将胰酪大豆胨琼脂培养基平板倒置在30~35℃培养3~5天, 观察菌落生长情况。点计平板上生长的所有菌落数, 计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后, 计算个稀释度的平均菌落数, 按菌数报告规则报告。若同稀释度两个平板的菌落数平均值不小于15, 则两个平板的菌落数不能相差1倍或以上。

### A. 8. 4 结果与报告

需氧菌总数测定宜选取平均菌落数小于300 cfu的稀释度, 作为菌数报告的依据。取最高的平均菌落数, 计算1 g样品中所含的菌落数, 取两位有效数字报告。如各稀释度的平板均无菌落生长, 或仅最低稀释度的平板有菌落生长, 但平均菌落数小于1时, 以<1乘以最低稀释倍数的值报告菌数。若空白对照上有菌落生长, 则此次检测结果无效。

## A. 9 霉菌和酵母菌总数

### A. 9. 1 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下:

A. 9. 1. 1 恒温培养箱: 20~25℃。

A. 9. 1. 2 恒温水浴箱: 45℃±1℃。

A. 9. 1. 3 天平: 感量为0.1 g、0.01 g。

A. 9. 1. 4 均质器或振荡器。

A. 9. 1. 5 无菌吸管: 1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器及吸头。

A. 9. 1. 6 无菌培养皿: 直径90 mm。

A. 9. 1. 7 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

A. 9. 1. 8 放大镜或/和菌落计数器。

### A. 9. 2 培养基和试剂

A. 9. 2. 1 沙氏葡萄糖琼脂培养基: 动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物 10.0 g, 葡萄糖 40.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1000 mL。除葡萄糖、琼脂外, 取上述成分, 混合, 微温溶解, 调节pH使灭菌后在25℃的pH值为5.6±0.2, 加入琼脂, 加热溶化后, 再加入葡萄糖, 摇匀, 分装, 121℃ 高压灭菌15 min。

A.9.2.2 pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液：取磷酸二氢钾3.56 g，无水磷酸氢二钠5.77 g，氯化钠4.30 g，蛋白胨1.00 g，加蒸馏水1000 mL，微温溶解，滤清，分装，121 °C 高压灭菌15 min。

A.9.2.3 pH7.2磷酸盐缓冲液：贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌15 min。

### A.9.3 操作步骤

#### A.9.3.1 样品的制备和稀释

一般应随机抽取不少于2个最小包装的样品，在无菌操作下，混合，取10 g进行检验。用pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或pH 7.2 磷酸盐缓冲液，稀释制成1:10 样品匀液。若需要调节稀释液pH 值至6~8。根据估计样品污染程度，用同一稀释液将样品匀液进一步10 倍系列稀释。

取样品匀液1 mL，置于直径90 mm 的无菌平皿中，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作为空白对照。及时倾注入15~20 mL 冷却至45°C的沙氏葡萄糖琼脂培养基（可放置于45°C±1°C恒温水浴箱中保温），混匀，待凝固。

#### A.9.3.2 培养和计数

将沙氏葡萄糖琼脂培养基平板倒置在20~25°C培养5~7天，观察菌落生长情况。点计平板上生长的所有菌落数，计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后，计算个稀释度的平均菌落数，按菌数报告规则报告。若同稀释度两个平板的菌落数平均值不小于15，则两个平板的菌落数不能相差1倍或以上。

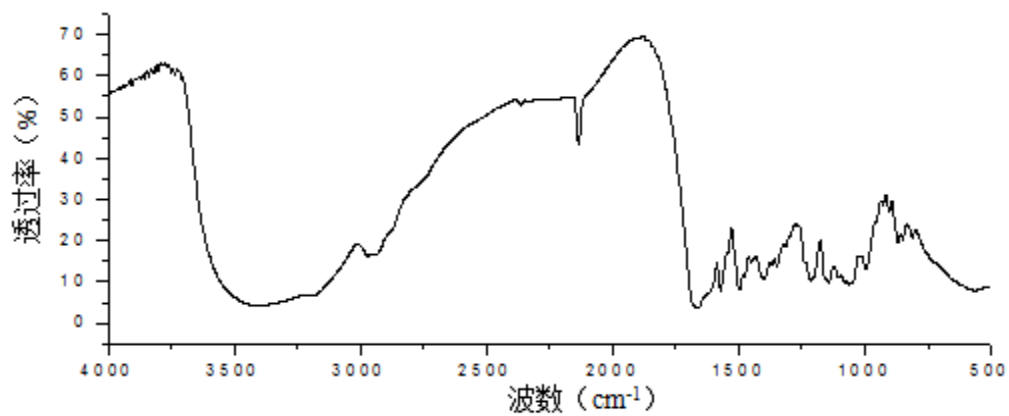
### A.9.4 结果与报告

菌数报告规则。霉菌和酵母菌总数测定宜选取平均菌落数小于100 cfu 的稀释度，作为菌数报告的依据。取最高的平均菌落数，计算1g 样品中所含的菌落数，取两位有效数字报告。如各稀释度的平板均无菌落生长，或仅最低稀释度的平板有菌落生长，但平均菌落数小于1时，以<1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

## 附录 B

## 氰钴胺标准品红外光谱图

氰钴胺标准品的红外光谱图如图 B.1 所示。

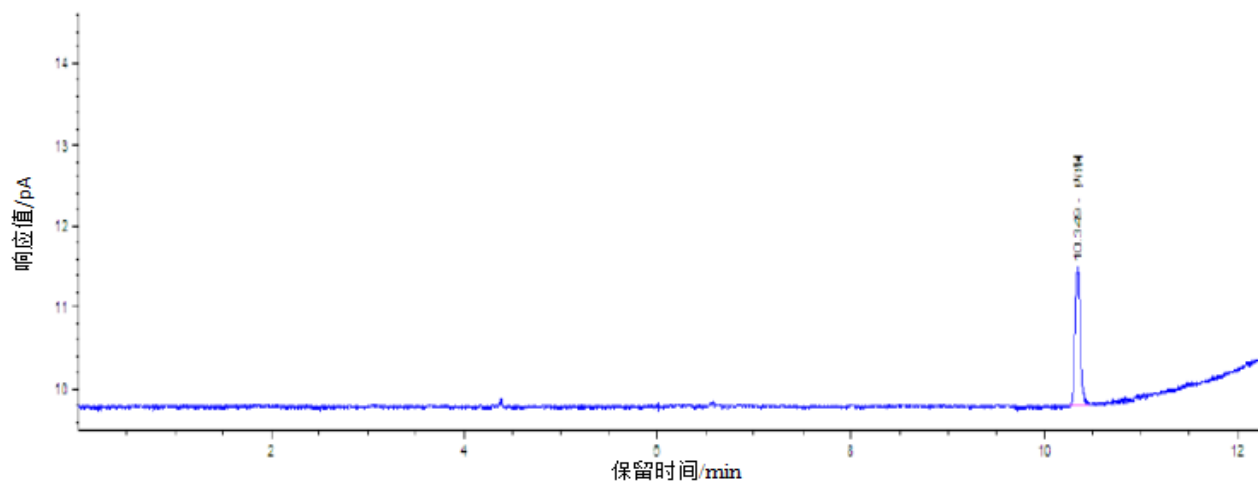


图B.1 氰钴胺标准品红外光谱图

## 附录 C

## 丙酮气相色谱图

丙酮的参考气相色谱图如图C.1所示。



图C.1 丙酮气相色谱图