

中华人民共和国农业行业标准

《禽蛋中叶酸总量测定液相色谱-串联质谱法》

(公开征求意见稿)

编制说明

起草单位:

XXXX

XXXX

XXXX

XXXX

XXXX

目 录

一、工作简况	1
(一) 任务来源	1
(二) 制定背景	1
(三) 编写单位和编写人员与分工	2
(四) 主要工作过程	3
1 成立标准编制小组	3
2 查询国内外相关标准和文献资料	4
3 确定标准制定技术路线, 制定原则	4
4 进行论证实验, 确定方法主要试验技术内容制定的合理性	4
5 编写标准征求意见稿	4
6 组织方法验证	4
7 定向征求意见	4
8 编写标准预审稿	5
9 组织标准预审	5
二、标准编制原则和确定标准主要内容	6
(一) 标准编制原则	6
(二) 主要技术内容及其确定依据	6
1 多形态叶酸总量测定方案的确定	6
2 不同形态叶酸的转化条件优化	7
3 实际样品中叶酸总量测定方案的确定	9
4 标准品的选择及转化效率的验证	10
5 色谱条件确定	11
6 质谱条件的优化	13
7 样品的选择和制备	13

8 提取条件和净化方式的优化	14
(三) 方法技术验证和评估	16
1 方法的线性和范围	16
2 方法的检出限和定量限	16
3 标准工作液稳定性的考察	19
4 基质效应	20
5 方法的回收率和精密度	21
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益	24
(一) 试验验证的分析和综述报告	24
(二) 技术经济论证、预期的十齐效益、社会效益和生态效益	24
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	24
五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因；	25
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系	25
七、重大分歧意见的处理经过和依据	26
八、涉及专利的有关说明	26
九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	26
十、其他应当说明的事项	26
参考文献	27

《禽蛋中叶酸总量测定液相色谱-串联质谱法》

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司下达的 2023 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知（农质标函〔2023〕51 号），XXXX 承担了《禽蛋中叶酸总量的测定 液相色谱-质谱联用法》（项目编号：NYB-23051）农业标准制定工作，XXX 为项目主持人，该标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

（二）制定背景

叶酸是由喋啶、对氨基苯甲酸和谷氨酸残基组成的一类水溶性 B 族维生素，是人体生长发育必需的微量元素之一，在胚胎发育、人体生长、新陈代谢等过程中发挥重要作用。由于人体不能合成叶酸，缺乏叶酸会引起贫血和发育迟缓等疾病，孕妇缺乏叶酸会导致婴儿神经管畸形、宫内发育迟缓、早产、心脏缺陷等异常。由此可见，叶酸对人体生长发育至关重要，而精确检测和评估日常饮食及体内叶酸含量，是进行日常营养合理搭配，重点人群营养强化以及保障人体生命健康的重要前提。

目前，全球有 50 多个国家实施叶酸强化政策，但常用的叶酸补充剂大多是氧化型的合成叶酸，过量摄入对人体不利，且亚甲基四氢叶酸还原酶多态性人群不能有效地将其转化为有生物活性的 5-甲基四氢叶酸形式，无法高效利用。禽蛋作为日常食谱中高频使用的食物，不同禽蛋叶酸含量不同，大约在 0.5ug/g 至 6ug/g。通过禽类生产动物的体内转化，将单一氧化型叶酸转化为具有生物活性的多形态叶酸，实现以禽蛋载体的叶酸强化。现阶段叶酸强化禽蛋的相关产品标准正在制定中，已发布的《叶酸生物营养强化鸡蛋》的农业行业标准对叶酸含量进行了限定，即大于 120ug/100g。因此，开展禽蛋中叶酸形态检测标准相关研究，实现不同形态叶酸总含量的精准测定，并便于畜禽产品质量控制和评价，对规范富叶酸禽蛋产品的质量，改善我国居民膳食叶酸水平具有重要意义。

叶酸及其代谢物主要包括叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸、5,10

亚甲基-四氢叶酸，5-10 次甲基-四氢叶酸，5-甲酰四氢叶酸、10-甲酰四氢叶酸等多种还原状态的衍生物。目前测定叶酸方法主要包括微生物法、高效液相色谱法、气相色谱法和液质联用法。《国家食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》（GB 5009.211-2022）规定了食品中叶酸的测定，该方法校准范围窄，分析周期长，受杂菌污染和培养基固体颗粒影响，导致定量结果不精确。色谱法测定叶酸是现在广泛使用的测定方法，如《饲料中叶酸的测定 高效液相色谱法》（NY/T 2895-2016），《添加剂预混合饲料中烟酸与叶酸的测定 高效液相色谱法》（GB/T 17813-2018）等，主要包括叶酸提取、提取物的净化和液相检测三个步骤。这些现行标准仅规定测定氧化型叶酸，不适用具有生物活性叶酸的定量；同时这些标准的测定对象为饲料，饲料添加剂和食品，其样品基质背景与高蛋白、高脂肪的禽蛋基质相差极大，因此，不宜直接引用和采用。《ISO: 婴儿配方奶粉和成人营养品 三酶提取和超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）测定总叶酸含量》使用液相色谱-质谱法，规定了叶酸，5-甲基四氢叶酸，5-甲酰四氢叶酸三种叶酸的总量，缺少四氢叶酸、5-10 次甲基-四氢叶酸，5-10 亚甲基-四氢叶酸等的测定。

针对以上检测困难和不足，多个国内外研究机构开展了不同形态叶酸的检测方法研究，如使用液质联用法测定玉米、血清及不同组织中的多种形态叶酸的含量。由于四氢叶酸、5,10 亚甲基-四氢叶酸，5-10 次甲基-四氢叶酸等叶酸在提取过程中容易发生氧化，如四氢叶酸在溶液中的半衰期仅有 30 分钟；同时 5-10 次甲基-四氢叶酸、5-甲酰四氢叶酸和 10-甲酰四氢叶酸三者之前存在非酶促的相互转化，导致最终定量结果不准确。在已报道的不同类型叶酸分析方法中，需要使用对应的标准品进行定量分析，而现有国内外市售的标准品种类有限，且价格非常昂贵。同时由于部分形式的叶酸不稳定导致配置标准品母液难以储存，进一步增加实验室运行成本。因此，需要规范一种稳定、简易和高效的测定叶酸含量的方法以解决以上问题。

（三）编写单位和编写人员与分工

本标准由 XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX 共五家单位共同制定和编写。标准制定主要编写人员有 XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX，XXX。任务分工见表 1。

表 1. 主要编写人员信息及任务分工

姓名	工作单位	职务/职称	项目分工
XXX	XXXX	高级实验师	项目主持人，负责项目全面工作
XXX	XXXX	研究员	统筹规划标准研制进度及技术指导
XXX	XXXX	高级畜牧师	资料收集、撰写标准文本
XXX	XXXX	研究员	撰写编制说明
XXX	XXXX	副研究员	生产调研、资料收集
XXX	XXXX	助理研究员	负责叶酸转化条件优化
XXX	XXXX	科研助理	负责叶酸检测质谱方法建立
XXX	XXXX	研究员	检测方法研究、文本和编制说明修改完善
XXX	XXXX	助理研究员	负责禽蛋的收集
XXX	XXXX	助理研究员	负责验证样品的制备
XXX	XXXX	科研助理	负责方法学验证
XXX	XXXX	经理	生产调研
XXX	XXXX	工程师	负责质谱技术咨询

（四）主要工作过程

1 成立标准编制小组

2023年4月，XXXX接到《禽蛋中叶酸总量的测定 液相色谱-质谱联用法》农业标准制定任务后，组织XXXX，XXXX，XXXX和XXXX对该标准的具体工作进行了认真

研究，确定了总体工作方案，并成立了标准制定工作组，制定工作计划，落实人员与分工（具体见表1）。

2 查询国内外相关标准和文献资料

2023年5月-6月，本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定的指导思想，形成了开题报告和标准草案，并制定了初步的实验方案。

3 确定标准制定技术路线，制定原则

2023年7月，召开了标准开题论证会，会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

4 进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性

2023年8月-2024年3月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，对叶酸转化条件、提取、净化和仪器测定方法进行优化。开展标准曲线、检出限、准确度和精密度等技术内容的验证。

5 编写标准征求意见稿

2024年4月，对方法研究过程中出现的问题和困难，标准工作组进行了认真研究和分析，并得以解决。完善了方法的准确性和可靠性，在此基础上完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。

6 组织方法验证

2024年5-7月，组织3家检测单位，对标准中制定的技术指标等内容进行验证。汇总相关验证数据后，通过检验的验证数据进行汇总，编写数据汇总报告和统计汇总报告。

7 定向征求意见

2024年8月，发函各单位对标准征求意见包括但不限于农产品质检机构和生产企业，共发函25位专家，收到回函23份（表2），收到意见107条，采纳91条，部分采纳或不采纳16条，形成《征求意见汇总表》。

表2 征求意见单位

序号	单位名称	备注
1	山东省畜产品质量安全中心	/
2	湖北省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
3	江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所	/
4	江苏省家禽科学研究所	2份

5	陕西秦云农产品检验检测股份有限公司	/
6	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
7	新希望六和饲料股份有限公司	/
8	中国农业大学	/
9	内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司	/
10	北京市食品检验研究院	/
11	中国农业科学院蜜蜂研究所	2 份
12	农业农村部食物与营养发展研究所	/
13	北京市疾病预防控制中心	/
14	河南省农畜水产品检验技术研究院	/
15	江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所	/
16	云南省兽药饲料检测所	/
17	四川威尔检测技术股份有限公司	/
18	武汉新华扬生物股份有限公司	/
19	中国农业科学院生物技术研究所	/
20	北京市兽药饲料检测中心	/
21	黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	/

8 编写标准预审稿

2024 年 9 月，根据收集到的专家意见，对标准内容进行了修改完善，在此基础上编写完成了《禽蛋中叶酸总量的测定 液相色谱质谱联用法》标准文本和编制说明的预审稿。

9 组织标准预审

2024 年 11 月 21 日，标准起草组组织召开了标准预审会，邀请郑小平、郑百芹、李俊玲、许文涛、单吉浩、牟玉莲、许晓敏 7 位专家，对标准预审稿进行了认真审查。在听取标准起草组汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下主要修改意见：1. 建议标准名称修改为“禽蛋中叶酸总量测定液相色谱-串联质谱法”2. 范围第二段修改为“本文件适用于禽蛋中叶酸总量(以叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基-四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和 5,10-次甲基四氢叶酸之和计)的测定。分别描述 5-甲基-10-甲基四氢叶酸、5-甲酰-10-甲基四氢叶酸的定量限和检测限，并在编制说明中进一步补充相关数据。3. 增加水分含量测定方法，试验数据折算为蛋液中总叶酸含量。4. 根据试验数据，将精密度调整为 15%。5. 在编制说明中补充以下内容: 1 倍定量限回收率数据;列表表述不同结构叶酸的转化效率;补充 1 份验证报告。6. 按 GB/T 1.1 和 GB/T 20001.4 的要求进一步规范标准文本。专家组一致同意审查通过，建议标准起草单位按照上述意见进一步修改后形成公开征求意见稿，报全国畜

牧业标准化技术委员会秘书处。预审意见汇总处理表附件 1。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

（一）标准编制原则

本标准遵循以下原则：

——测定方法的准确性：严格控制测定方法的准确性和精密度，确保测定结果准确无误。

——测定方法的检出限：能够满足禽蛋中叶酸含量的检测要求。

——测定方法的可操作性：便于标准的使用者操作，有良好的重现性。

——标准的先进性：标准文本的技术水平达到国内同类标准的先进水平。

确定标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的依据主要是 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》。

（二）主要技术内容及其确定依据

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 中规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

1 多形态叶酸总量测定方案的确定

叶酸是叶酸及其衍生物在内的一类化合物的总称，其中包括叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、10-甲酰基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和 5,10-次甲基四氢叶酸等^[1]。在植物果实、种子和叶片中，叶酸及其衍生物以多聚谷氨酸的形式存在，而在禽蛋中主要以单谷氨酸的形式存在。果蔬、玉米和禽蛋中的叶酸营养价值常使用总叶酸含量来评估，在禽蛋中 5-甲基四氢叶酸是主要的叶酸形态，约占总叶酸的 90%。现有的叶酸测定方法有微生物法，或分别测量以上各种形态的叶酸，然后累加获得总叶酸含量。由于四氢叶酸、10-甲酰基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸稳定性差，在短时间内快速降解和转化，导致定量结果不准确^[2]。通过查阅文献和实验证实，使用甲醛和氰基硼氢化钠可将禽蛋中的多种形态的叶酸转化成 5-甲基-10-甲基四氢叶酸。因此，测定 5-甲基-10 甲基四氢叶酸的含量，即可获得禽蛋中约叶酸总含量。

2 不同形态叶酸的转化条件优化

影响转化效率的因素主要有酸度的浓度、氰基硼氢化钠浓度、甲醛浓度、转化时间等。因此，为了使转化效率最大化，本标准选择浓度为 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的叶酸、5-甲基四氢叶酸、5-甲酰四氢叶酸、10-甲酰叶酸四种标准品,从酸度浓度、氰基硼氢化钠浓度、甲醛浓度、时间四个方面优化转化反应条件。

(1) 酸度浓度对转化反应的影响

酸度的浓度以及类型对于转化反应有较大的影响。根据图 1 结果所示，通过比较了甲酸与乙酸两种类型以及浓度，可以看出当甲酸浓度为 1% 时，叶酸、5-甲基四氢叶酸的转化产物最高。当乙酸浓度为 1% 时，叶酸，5-甲基四氢叶酸的转化产物较低且有未转化完全的底物存在。当酸度的浓度过高时叶酸、5-甲基四氢叶酸的转化产物并未随着酸度的增加而增加，反而降低。因此最终选择转化条件酸的类型为甲酸，浓度为 1%。

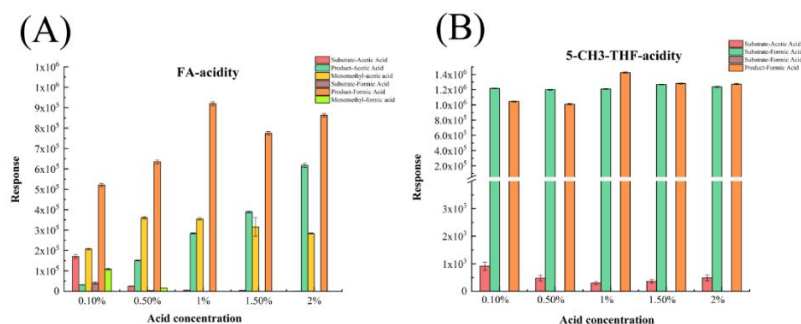


图 1 酸度浓度对转化反应的影响

(2) 氰基硼氢化钠浓度对转化反应的影响

良好的还原剂可以有效地减少反应时间从而提高实验效率。氰基硼氢化钠的浓度对转化反应的影响如图 2 所示，通过实验可知叶酸在氰基硼氢化钠的浓度为 20mM 时有未转化底物和单甲基化的产物的存在，当浓度为 30mM 时转化产物的量最高且没有底物和单甲基化产物的存在，当浓度达到 40-50mM 时转化产物随着浓度的增加而降低，因此根据转化结果确定氰基硼氢化钠的浓度为 30mM。

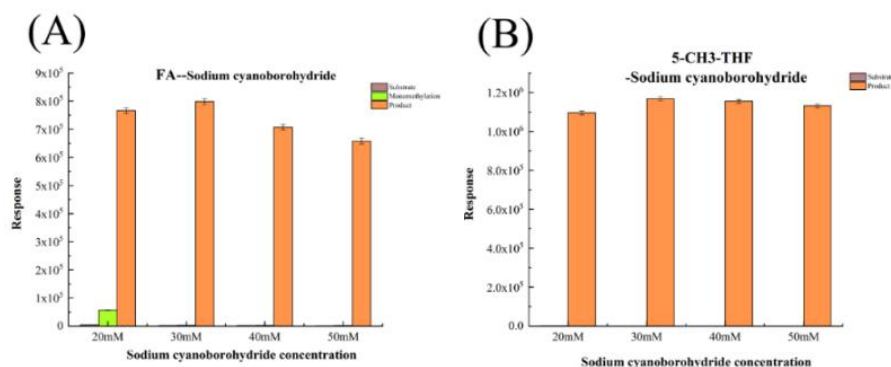


图 2 氰基硼氢化钠浓度对转化反应的影响

(3) 甲醛浓度对转化反应的影响

甲醛作为甲基化试剂，也很大程度上影响着转化甲基化程度。实验结果如图 3 所示，叶酸在甲醛浓度为 0.1% 时存在未转化的底物以及单甲基化中间产物，转化率较低。当甲醛浓度达到 0.2% 时，转化产物值最高且没有底物与单甲基化产物的存在，随着甲醛浓度的不断增加产物反而不断降低。5-甲基四氢叶酸在甲醛浓度为 0.1%~0.4% 均未有未转化的底物，当甲醛浓度为 0.2% 转化产物值最高。随着甲醛浓度再增加，转化产物降低。因此，根据转化结果确定甲醛浓度为 0.2%。

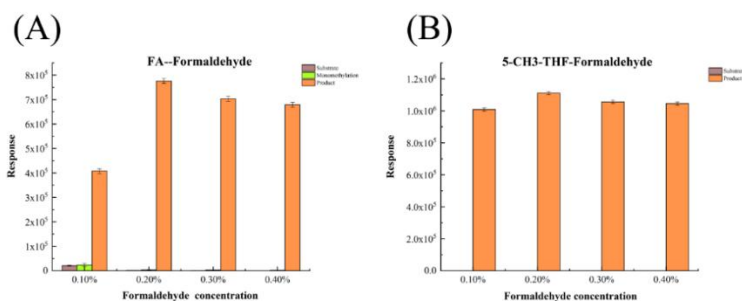


图 3 甲醛浓度对转化反应的影响

(5) 反应时间对转化反应的影响

转化时间的长短对转化效率有较大的影响，转化时间较长容易产生过甲基化，转化时间较短会使转化不充分从而影响转化效率。因此要选择转化效率最佳的时间为最终转化时间。实验结果如图 4 所示，叶酸在转化时间为 0min 时基本未转化，有少量单甲基化产物，转化产物随着转化时间的增加而不断增加。在转化时间达到 60min 时转化产物结果最高且没有底物的存在。随着转化时间的不断增加，转化产物不断增高，底物不断减少，当转化时间为 60min 时转化产物的值达到最高，且底物被完全转化。因此根据实验结果确定转化时间为 60min。

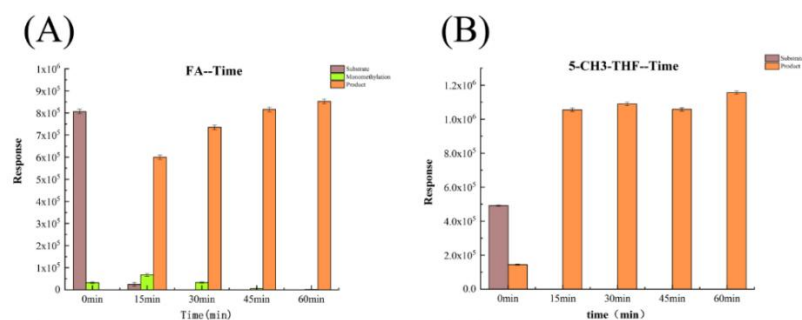


图 4 转化时间对转化反应的影响

3 实际样品中叶酸总量测定方案的确定

考虑测定实际样本时，样品中含有大量消耗甲醛的氨基和消耗氰基硼氢化钠的双键和易氧化的官能团，用纯标准品的优化的条件可能不适用测定实际样本，因此进一步评估酸、氰基硼氢化钠和甲醛浓度。结果证实酸的最优浓度与标准品优化的浓度一致，1%时效果最佳（如图 4）。而实际样品测定时，均需要提高氰基硼氢化钠和甲醛浓度才能达到最优的转化效果，对应的氰基硼氢化钠和甲醛浓度分别 60mM 和 0.4%（图 6 和图 7）。

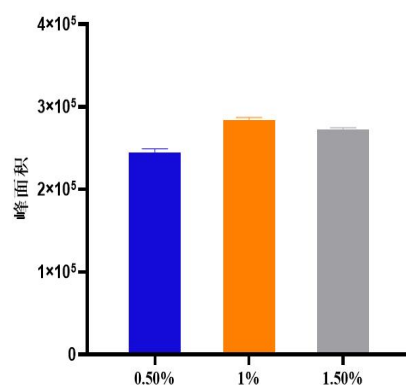


图 5 酸度对转化反应的影响

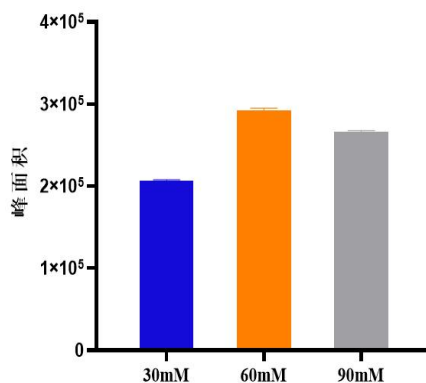


图 6 氰基硼氢化钠浓度对转化反应的影响

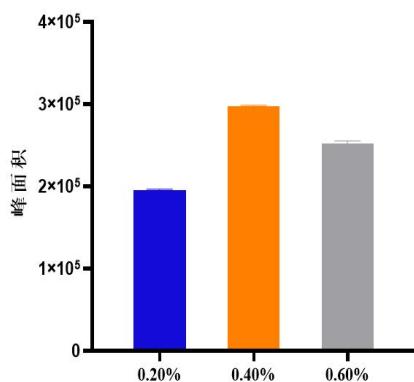


图 7 甲醛浓度对转化反应的影响

4 标准品的选择及转化效率的验证

(1) 标准品的选择

根据本标准的实验原理，通过定量多形态叶酸的转换产物，实现禽蛋中的总叶酸定量。叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和5,10-次甲基四氢叶酸转化产生均可产生5-甲基-10-甲基四氢叶酸，由于以上不同形态的叶酸稳定性不一样（图8），本标准选取5-甲基四氢叶酸标准品作为5-甲基-10-甲基四氢叶酸反应底物。

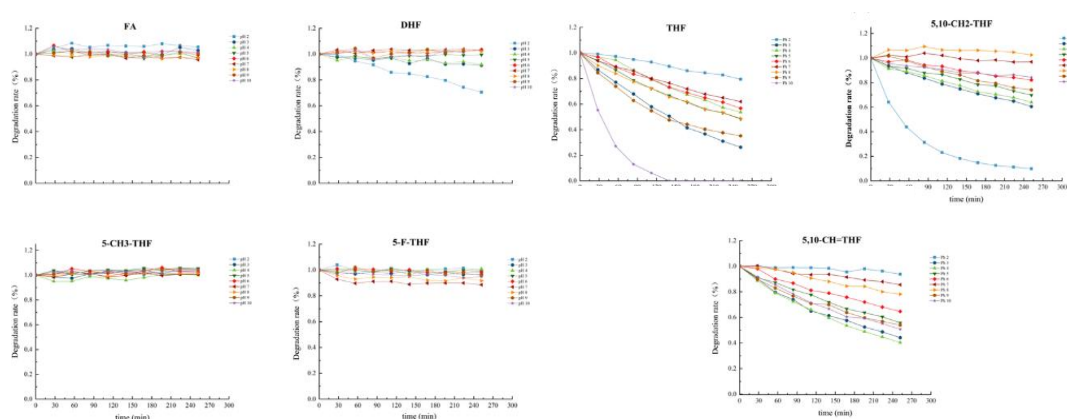


图 8 不同形态叶酸的稳定性评估结果

(2) 转化效率的验证

为保证六种不同形态叶酸标准品到转化产物过程准确可控，进行了转化效率的验证实验，移取已知浓度的叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和5,10-次甲基四氢叶酸标准品，按已确定的转化条件分别进行反应，测得转化后的产物5-甲基-10-甲基四氢叶酸的浓度(A)，已知转化前各标准品浓度(B)，通过转化效率计算公式 $A/B \times 100\%$ （见表3）得到转化效率，结果表明六种不同形

态的叶酸转化效率均 > 98%。

表 3 不同形态叶酸的转化效率

不同形态叶酸	转化产物	转化效率 (%)
叶酸		98.46
二氢叶酸		99.27
四氢叶酸	5-甲基-10-甲	98.02
5-甲基四氢叶酸	基四氢叶酸	99.99
5,10-亚甲基四氢叶酸		98.67
5,10-次甲基四氢叶酸		99.46

5 色谱条件确定

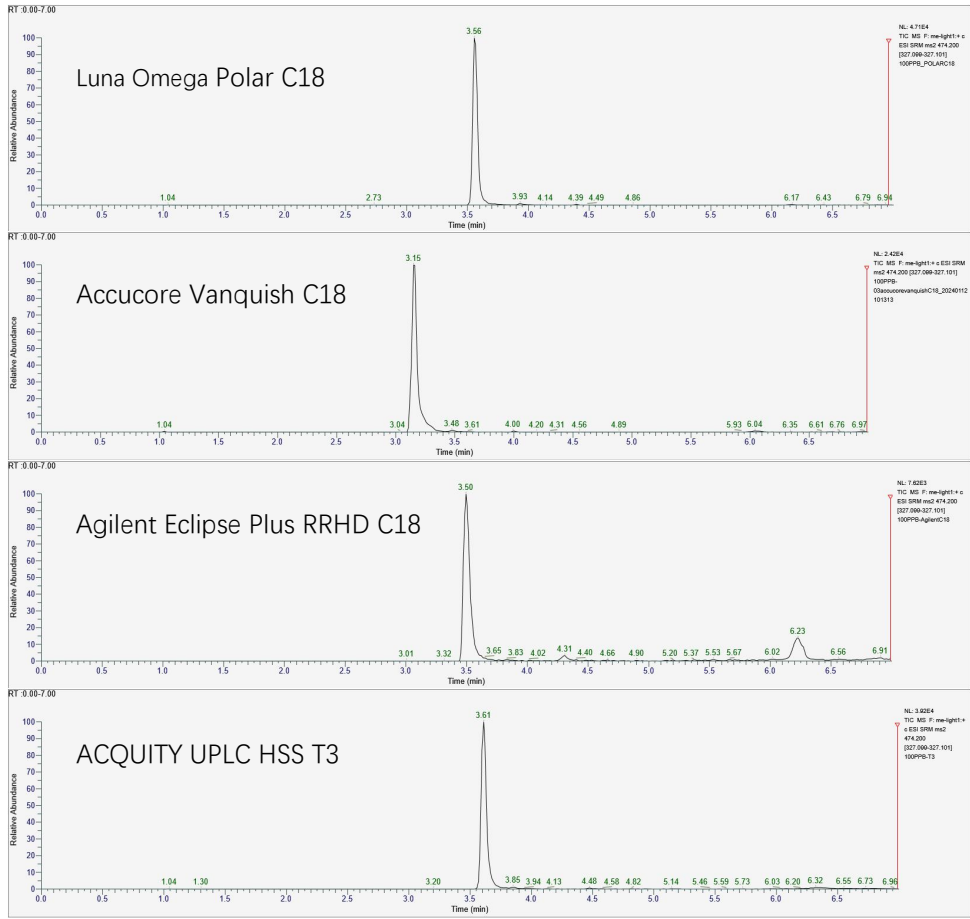


图 9 不同色谱柱分离不同形式叶酸转化产物效果比较

取 100 ng/mL 的 5-甲基-10-甲基四氢叶酸转化产物，用于色谱和质谱采集条件的优化。选择了 Accucore Vanquish C18 (2.1×100 mm, 1.5μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8μm)、和 Luna Omega Polar C18 (2.1×100 mm, 1.6μm)、

Eclipse Plus C18 RRHD (2.1×100 mm, 1.8μm) 四种色谱柱,使用(A: 水+0.1%甲酸, B: 乙腈+0.1%甲酸)的流动相,对转化产物进行分离。结果表明(图 9),除了 Accucore Vanquish C18 色谱柱稍有拖尾现象,其他三种色谱柱均能有效分离三种化合物,目标物出峰时间及峰型差异不大。综合考虑同样色谱条件下的色谱柱压力和色谱峰形,最终选用 Luna Omega Polar C18 色谱柱进行本次检测方法的开发。

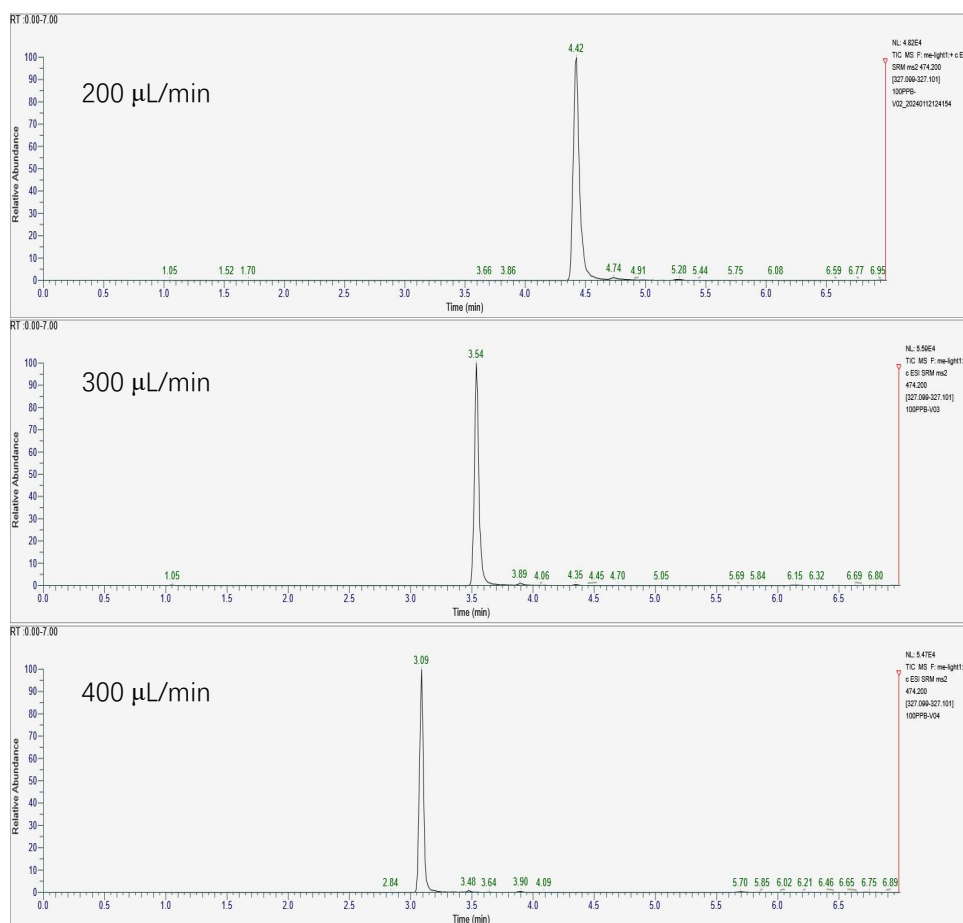


图 10 不同流速下叶酸转化产物分离效果比较

进一步评估不同的流速对目标化合物的分离度和色谱峰形的影响,结果如图 10 显示,随着流速增加,目标化合物出峰时间提前,峰宽变窄,因此 400 μL/min 的流速分离优于 200 μL/min 和 300 μL/min,综合考虑目标物分离和分析时间,选择流动相流速为 400 μL/min。最终液相梯度洗脱程序见表 4。

表 4 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	98	2
1.0	98	2
4.5	50	50
5.5	5	95
6.0	5	95
6.1	98	2
8.0	98	2

6 质谱条件的优化

本标准采用多重离子监测的采集模式实现对转化产物的精确定量。首先根据 5-甲基-10-甲基四氢叶酸产物的电离特性，选择正离子模式对三种产物的一级质谱和二级质谱进行采集（图 11），通过分析一级质谱图，确定母离子峰后,通过分析二级质谱图，确定每个产物的子离子。

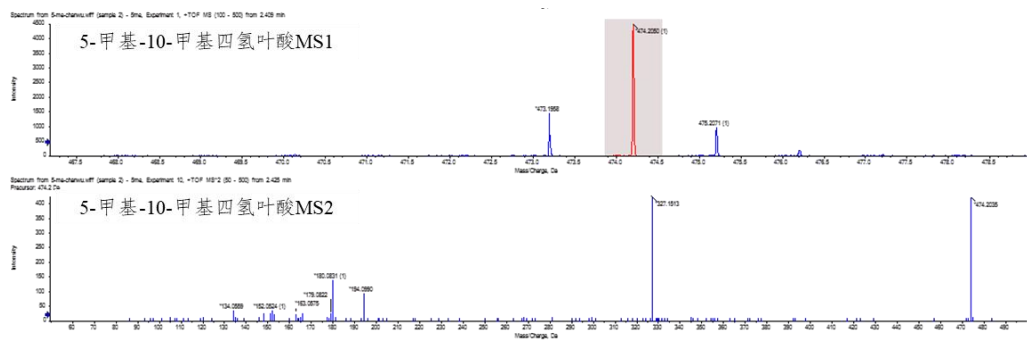


图 11 转化产物的一级母离子和二级碎片离子质谱图

随后对每个离子对的最优碰撞能量进行优化，最后获得最佳质谱参数如下表 5。在 ThermoFisher Altis Plus 离子源参数为：ESI 电压 3800 V，鞘气为 35Arb，辅助气体为 10 Arb，离子传输管温度为 300℃。

表5 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
5-甲基-10-甲基-四氢叶酸	474.2	194.1	34
		327.1*	20

注：带 “*” 为定量离子对。

7 样品的选择和制备

在禽蛋中，鸡蛋的叶酸含量和富集规律研究最多。普通鸡蛋中总叶酸大概在 34

$\mu\text{g/枚}$ ，富叶酸鸡蛋的含量可达 $116\mu\text{g/枚}$ 。叶酸在禽蛋中主要存在于蛋黄中，考虑检测时蛋黄和蛋清分离效果对定量有影响，日常对禽蛋的食用也多以整个禽蛋为饮食单位，本标准选择使用全蛋（包括蛋清和蛋黄）进行制样。个体较小的禽蛋，如鹌鹑蛋、鸽子蛋等将多枚蛋液混合成一个样品进行检测。在前期样品处理时发现直接使用蛋液进行定量，由于蛋清和蛋液混合不均匀及蛋液在离心管等器皿上沾附等因素，导致定量其重现性较差(表 6)。而将蛋清和蛋黄在烧杯中充分搅拌混匀后，使用冷冻干燥仪进行干燥后进行检测，可以提高定量结果的稳定性。真空干燥后大块的蛋粉再次使用研钵碾碎和混匀，保证蛋清和蛋白的充分混匀，并使用 0.425mm 孔径的分析筛。通过称量冻干前蛋液和冻干后蛋粉的质量，可以换算到禽蛋中叶酸的含量。

表 6 蛋液和蛋粉中总叶酸定量重现性分析

样品类型	重复 2 (ng/g)	重复 2 (ng/g)	重复 3 (ng/g)	重现性 (%)
蛋液	1069.76	1479.35	1249.35	16.21
蛋粉	1176.72	1259.21	1253.26	3.74

8 提取条件和净化方式的优化

(1) 提取条件优化

充分提取样品中的各种形态的叶酸，并避免在提取过程中叶酸降解和转化是准确测定叶酸含量的前提。由于四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和 5,10-次甲基四氢叶酸极其不稳定，在提取和净化过程中降解严重。而将四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和 5,10-次甲基四氢叶酸转化成 5-甲基-10 甲基四氢叶酸后，产物的稳定性得到显著提升（图 12）。因此本标准先将禽蛋冻干粉中的叶酸转化为稳定产物，然后再提取转化产物用于后续的定量。

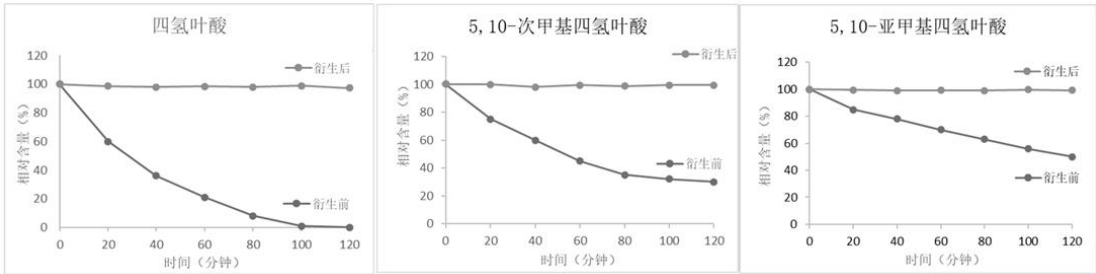


图 12 衍生前后稳定性比较

为了充分提取转化后的产物，首先比较了不同三种提取方式对产物的提取效率的影响。向 0.5g 蛋粉中加入 5ml 衍生剂（含氰基硼氢化钠 60mM，甲醛 0.4%，甲酸 1%，

80%甲醇水)，充分涡旋后 30℃反应 60 分钟，转化结束后分别使用以下三种方式进行处理和提取。方法 1：转化结束后通过干燥除去甲醛终止反应，并用磷酸盐缓冲液提取，进行下一步净化；方法 2：转化结束后通过干燥除去甲醛终止反应，并用 80% 甲醇提取，进行下一步净化；方法 3：转化结束直接离心取上清，在进行下一步净化。通过比较三种转化产物的信号强度，结果证实使用方法 3 提取的效果最优（图 13）。

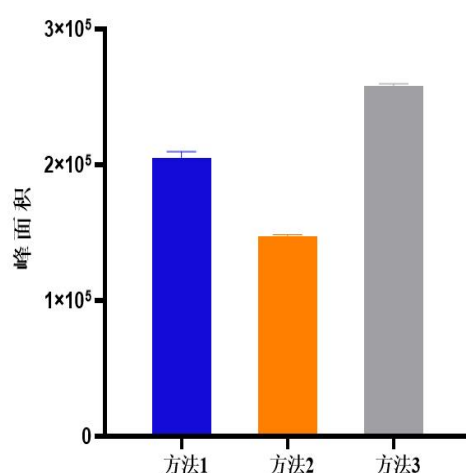


图 13 不同处理方法的提取效果比较

方法 1 考虑不同类型的叶酸和衍生后的产物水溶性较好，且已有文献中测定果蔬类等植物样品中叶酸时，多数使用磷酸盐缓冲液提取，因此设计了使用磷酸盐缓冲液提取的转化产物。但是由于蛋粉中含有大量的蛋白质和脂质，尤其是脂质不易溶于磷酸盐缓冲液，导致提取溶液含有大量的悬浮物且无法通过离心去除，这也是使用磷酸缓冲液提取时效果不好的主要原因。方法 2 使用 80% 的甲醇可充分溶解样品中的脂质而蛋白质不被提取，提高样品净化操作的便利，但是转化产物使用 80% 的甲醇溶液提取的效率不高。方法 3 反应终止后直接用于后续的净化，减少了样品干燥的步骤，减少了再次提取的损失，提高了提取效率。

（2）样品的净化

由于蛋粉中含有高含量的磷脂、甘油三酯和胆固醇等脂溶性化合物，而酯类物质会影响质谱信号的响应，同时也会给质谱带来污染。因此我们尝试了二氯甲烷液-液萃取，Captiva EMR-Lipid 和 Cleanert® PEP 三种不同净化方法。Cleanert® PEP 是基于反相吸附原理，杂质在低有机相穿透除去，叶酸转化产物使用高有机相洗脱。EMR-Lipid 可以定向吸附磷脂，而叶酸转化产物则流穿固相萃取柱。使用以上三种方式净化转化后的提取液，结果证实使用二氯甲烷液液萃取净化效果最佳，且经济实惠

(图 14)。

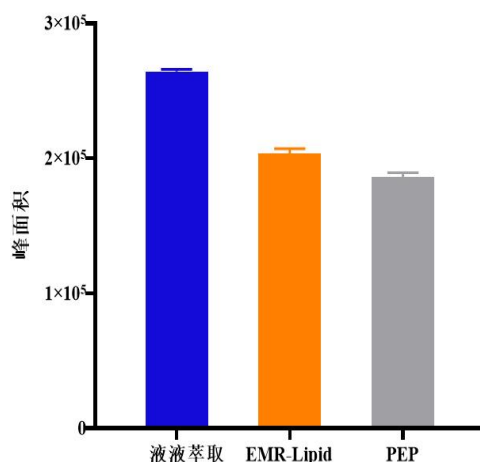


图 14 不同固相萃取柱净化后质谱响应比较

最后，我们确定了禽蛋中的叶酸样品前处理方法为：向 0.5g 蛋粉中加入 5ml 衍生剂（含氰基硼氢化钠 60mM，甲醛 0.4%，甲酸 1%，80%甲醇水），充分涡旋后置于 30℃ 水浴锅中，反应 60 分钟。反应结束后，8 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至 10 mL 容量瓶；固体不溶物用 5 mL 80%甲醇溶液重复提取一次，合并两次上清液并定容。取 5ml 定容后的提取液，依次加入 2ml 水和 1ml 二氯甲烷，充分震荡萃取后 5 000 r/min 离心 3min，弃去萃取液下层二氯甲烷有机相，剩余水相加入 1ml 二氯甲烷再次萃取。取上层水相至 10 mL 容量瓶，使用 80%甲醇定容，过 0.22 μm 微孔滤膜后进行 LC-MS 测定。

（三）方法技术验证和评估

1 方法的线性和范围

精确量取 5-甲基四氢叶酸的标准工作液，用 80%甲醇溶液将其稀释浓度为 20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的标准曲线系列工作溶液，在优化的色谱和质谱参数下进行测定，以各组分的峰面积对其质量浓度绘制标准曲线，在 20-1000ng/ml 范围内，标准缺陷的线性方程为 $y=1881x-12990$ ，线性相关系数为 0.9982。

2 方法的检出限和定量限

本实验选择鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鸽子蛋和鹌鹑蛋为考察对象。由于禽蛋中都含有叶酸，难以找到空白基质，因此本标准验证检出限和定量限时，使用氘代氰基硼氢化

钠替代氰基硼氢化钠，使用甲醛-d2 替代甲醛，按照优化的转化条件将内源性的不同类型的叶酸消耗掉，再在上述禽蛋样品中添加一定浓度的目标物对照品，按照本标准方法进行试验。由于氘代氰基硼氢化钠和甲醛-d2 将内源叶酸转化后的转化产物和使用氰基硼氢化钠和甲醛转化的产物分子量具有 3Da 的质量差异，不影响后添加叶酸衍生和质谱定量分析。分别向制备好的空白样品添加叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和 5,10-次甲基四氢叶酸不同类型叶酸，测定转化产物的信噪比，依据 3 倍的信噪比为检出限，10 倍的信噪比为定量限的原则，每种叶酸的检测限均为 20ng/g，定量限均为 50 ng/g（表 7）。

表 7 不同叶酸底物的检测限和定量限

类型	定性限 (ng/g)	定量限 (ng/g)
叶酸	20	50
二氢叶酸	20	50
四氢叶酸	20	50
5-甲基四氢叶酸	20	50
5,10-亚甲基四氢叶酸	20	50
5,10-次甲基四氢叶酸	20	50

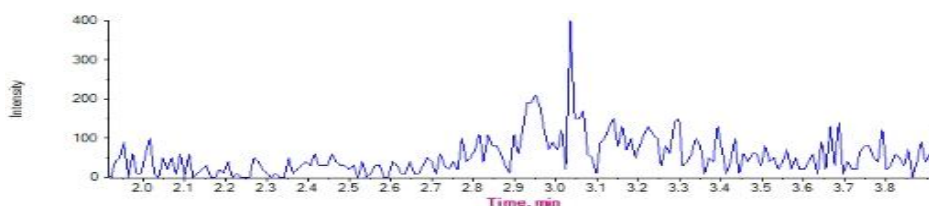


图 15 空白样品特征离子质量色谱图

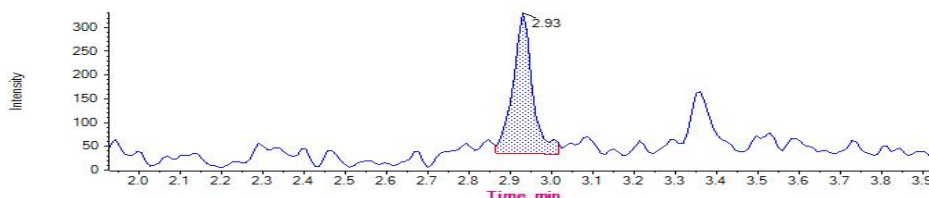


图 16 叶酸检出限添加量特征离子质量色谱图

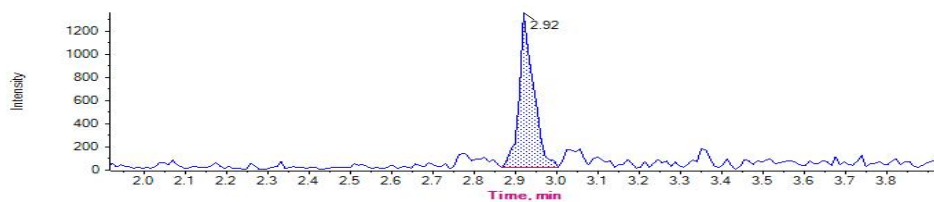


图 17 叶酸定量限添加量特征离子质量色谱图

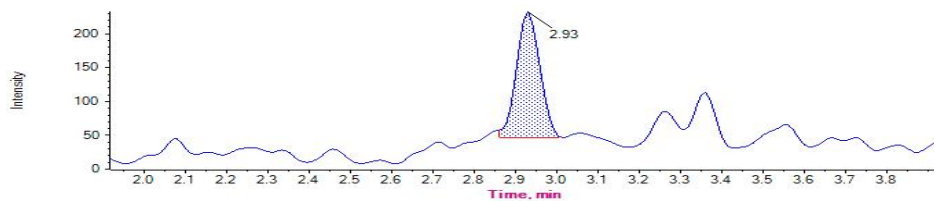


图 18 二氢叶酸检出限添加量特征离子质量色谱图

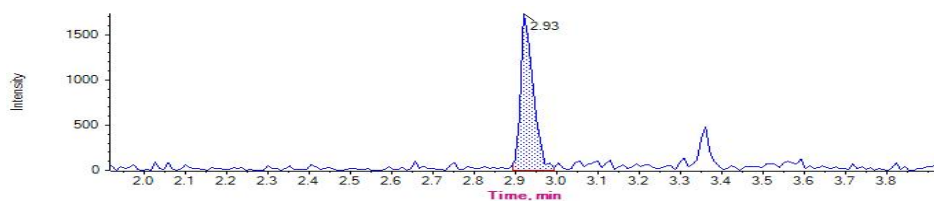


图 19 二氢叶酸定量限添加量特征离子质量色谱图

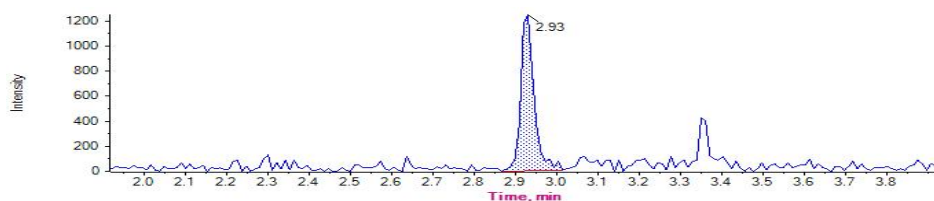


图 20 四氢叶酸检出限添加量特征离子质量色谱图

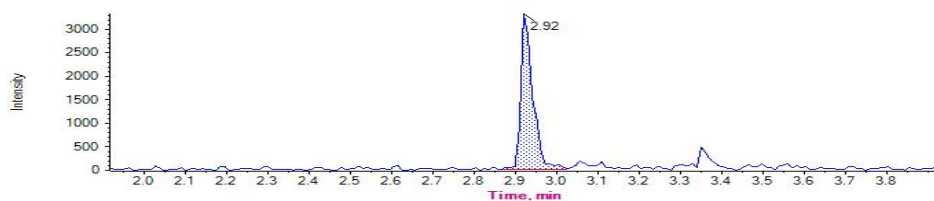


图 21 四氢叶酸定量限添加量特征离子质量色谱图

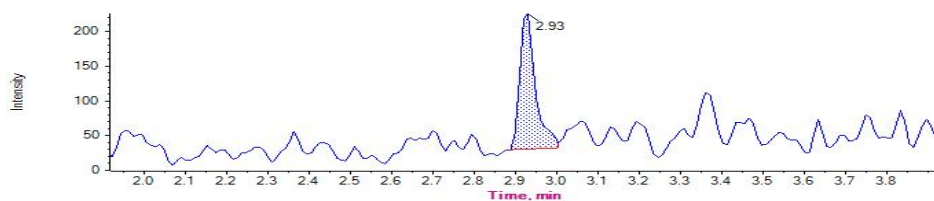


图 22 5-甲基四氢叶酸检出限添加量特征离子质量色谱图

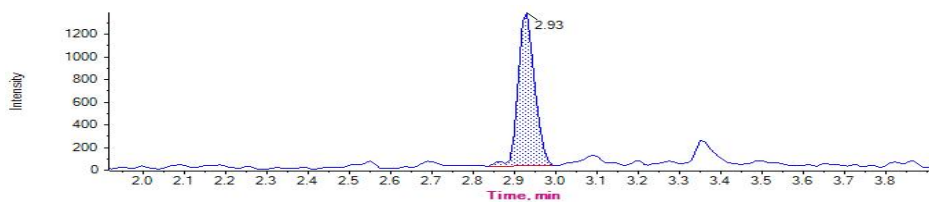


图 23 5-甲基四氢叶酸定量限添加浓度特征离子质量色谱图

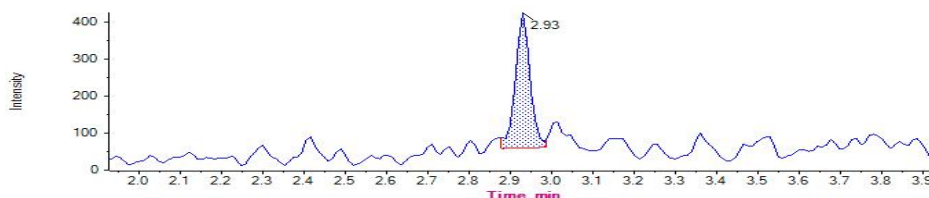


图 24 5,10-亚甲基四氢叶酸检出限添加量特征离子质量色谱图

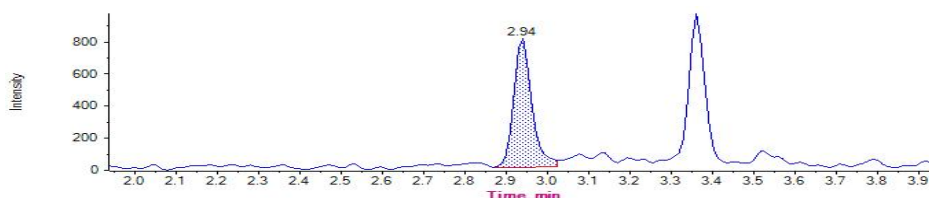


图 25 5,10-亚甲基四氢叶酸定量限添加量特征离子质量色谱图

3 标准工作液稳定性的考察

取配制好的标准品贮备溶液 (1mg/mL)， -18°C 以下保存 6 个月，期间分别在 0，60，180 天取出，配制成对照品中间溶液 ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)，再稀释至 10 ng/mL 进样分析。每次考察时，用标准品固体重新配置 10 ng/mL 的标准品，用于校正因仪器状态变化所导致的峰面积的差异。校正后的色谱峰面积为纵轴，保存天数为横轴。实验结果如图 31 所示，表明标准品物的贮备溶液 (1mg/mL) 在 -18°C 以下保存 6 个月内稳定。

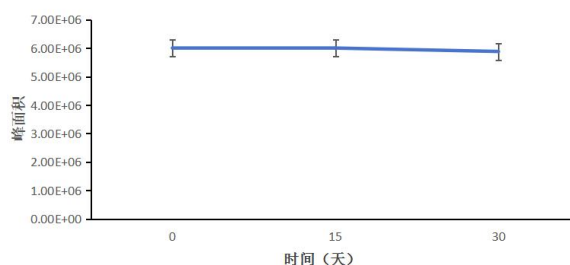


图 26 标准品贮备液的稳定性评估

进一步评估对照品中间溶液 ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) 在 4°C 下保存 2 个月是否稳定，分别在 0, 15, 30, 45 和 60 天取样，再稀释至 10 ng/mL 进样分析。用于校正因仪器状态变化

所导致的峰面积的变化，校正后的色谱峰面积为纵轴，保存天数为横轴，证实在 4℃ 的条件下，中间液 2 个月内稳定不变，结果如图 27 所示。

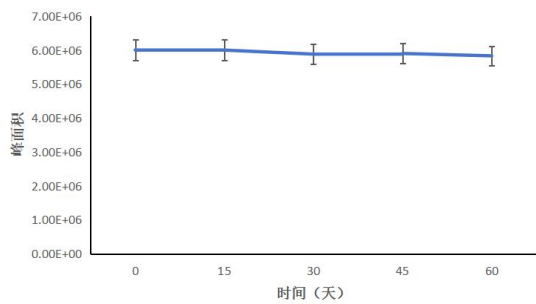


图 27 标准品中间液的稳定性评估

4 基质效应

选择预处理好的鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鸽子蛋和鹌鹑蛋样品作为空白基质，按照方法的前处理步骤处理后添加标准中间液，配制成浓度为 50 ng/mL 的基质添加样品，测得响应值 B。用甲醇配制的同浓度的标准品溶液，测得响应值 A。通过基质效应计算公式 $ME\% = \text{响应值 B} / \text{响应值 A} \times 100\%$ （表 8），该方法中基质效应为 90.21~113.61%，因此认为净化后的基质效应较小，本方法可采用溶剂标准品外标法进行定量。典型离子色谱图见图 28-33。

表 8 不同禽蛋基质中转化产物的基质效应

化合物	鸡蛋 (%)	鸭蛋 (%)	鹅蛋 (%)	鸽蛋 (%)	鹌鹑蛋 (%)
5-甲基-10-甲基四氢叶酸	93.76	108.52	102.84	96.55	99.33

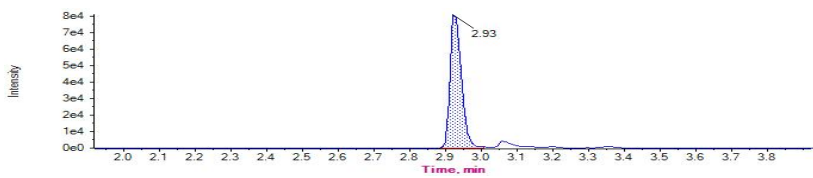


图 28 甲醇溶液中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

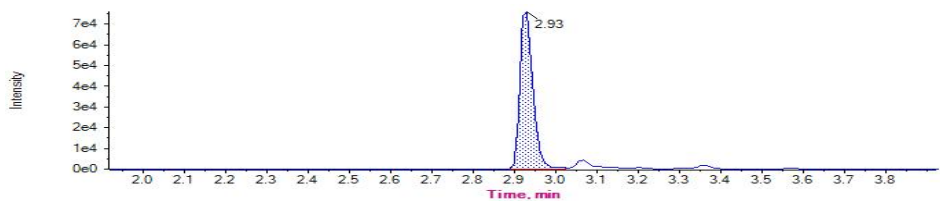


图 29 鸡蛋基质中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

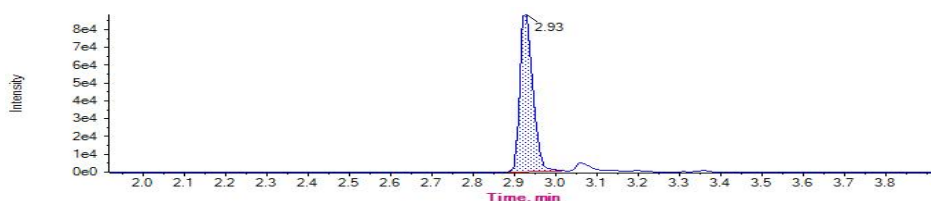


图 30 鸭蛋基质中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

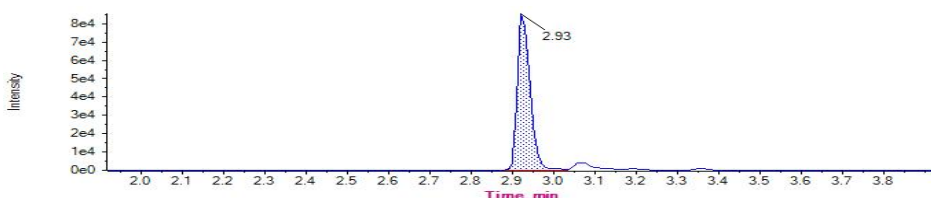


图 31 鹅蛋基质中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

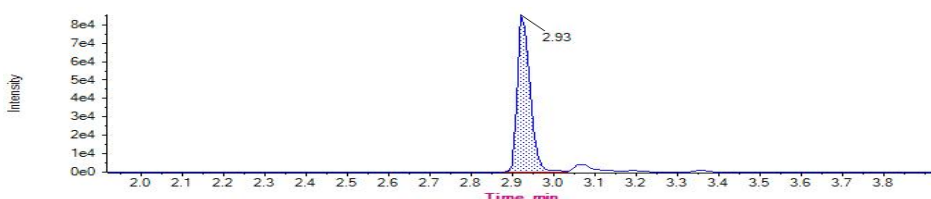


图 32 鸽子蛋基质中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

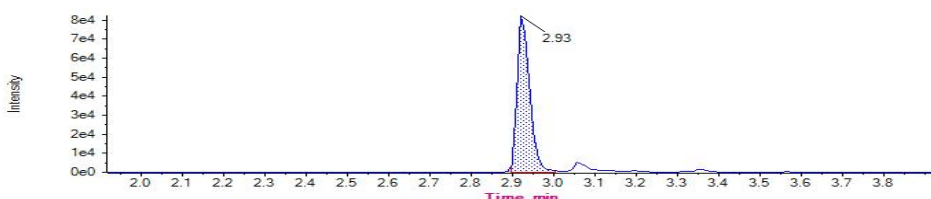


图 33 鹌鹑蛋基质中特征离子质量色谱图（进样浓度 50 ng/mL）

5 方法的回收率和精密度

在确定样品预处理方法后，选择鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鸽子蛋和鹌鹑蛋五类样品作为测试对象。分别添加 1 倍、3 倍和 10 倍定量限（50ng/g、150 ng/g 和 500ng/g）的 5-甲基四氢叶酸标准品进行添加回收实验。每批次内同一浓度做 3 次平行实验，共重复 3 批次。结果见表 9-11。结果证实本方法在不同禽蛋基底背景下，回收率和稳定性基本一致。不同添加浓度的回收率在 82.28%-100.47%之间，日内 RSD 在 1.44%-10.21%之间；日间 RSD 在 2.61%-9.38%之间，符合方法学要求。

样品	批次	重复 1 (ng/g)	重复 2 (ng/g)	重复 3 (ng/g)	平均回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
鸡蛋	批次 1	46.7	47.1	48.9	95.13	2.46	4.66
	批次 2	43.5	43.7	46.2	88.93	3.38	
	批次 3	43.3	45.2	42.7	87.47	2.98	
鸭蛋	批次 1	50.1	49.2	48.2	983.3	1.93	4.64
	批次 2	49.4	51.1	50.2	1004.7	1.69	
	批次 3	45.6	48.6	44.2	922.7	4.87	
鹅蛋	批次 1	44.5	44.1	47.2	90.53	3.73	5.94
	批次 2	50.1	49.4	51.4	100.60	2.02	
	批次 3	47.2	43.6	48.9	93.13	5.81	
鸽子蛋	批次 1	47.6	49.8	52.1	99.67	4.52	5.93
	批次 2	47.1	48.2	51.1	97.60	4.23	
	批次 3	42.4	46.3	47.8	91.00	6.13	
鹌鹑蛋	批次 1	42.4	43.1	46.4	87.93	4.86	4.34
	批次 2	45.4	43.7	42.8	87.93	3.00	
	批次 3	47.8	46.9	45.3	93.33	2.71	

表 9 不同禽蛋添加 50ng/g 的回收率及精密度

表 10 不同禽蛋添加 150ng/g 的回收率及精密度

样品	批次	重复 1 (ng/g)	重复 2 (ng/g)	重复 3 (ng/g)	平均回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
鸡蛋	批次 1	134.1	138.2	134.7	90.43	1.61	2.61
	批次 2	136.4	130.7	133.7	89.03	2.14	
	批次 3	133.7	142.7	138.8	92.23	3.26	
鸭蛋	批次 1	130.4	128.4	138.5	88.27	4.02	2.71
	批次 2	138.9	133.7	136.7	90.93	1.93	
	批次 3	138.2	134.4	135.3	90.63	1.44	
鹅蛋	批次 1	141.3	123.8	138.9	89.77	7.07	4.75
	批次 2	140.6	131.3	138.6	91.20	3.59	
	批次 3	145.8	135.9	133.4	92.23	4.75	
鸽子蛋	批次 1	137.6	136.4	128.7	89.47	3.58	3.96
	批次 2	138.6	132.3	138.5	90.97	2.63	
	批次 3	135.6	123.5	139.2	88.46	6.17	
鹌鹑蛋	批次 1	138.6	133.7	144.6	92.63	3.95	2.71
	批次 2	135.6	132.9	139.2	90.60	2.32	
	批次 3	139.2	133.8	136.7	91.03	1.98	

表 11 不同禽蛋添加 500ng/g 的回收率及精密度

样品	批次	重复 1 (ng/g)	重复 2 (ng/g)	重复 3 (ng/g)	平均回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
鸡蛋	批次 1	452.4	472.1	432.7	90.48	4.35	3.88
	批次 2	461.3	459.2	441.9	90.83	2.34	
	批次 3	482.4	429.1	461.8	91.55	5.87	
鸭蛋	批次 1	489.2	467.2	432.7	92.61	6.15	5.67
	批次 2	479.2	462.4	492.1	95.58	3.12	
	批次 3	421.6	472.5	500.2	92.95	8.58	
鹅蛋	批次 1	443.7	472.4	483.6	93.31	4.41	4.65
	批次 2	468.2	492.5	481.6	96.15	2.53	
	批次 3	482.5	483.9	425.7	92.81	7.16	
鸽子蛋	批次 1	423.7	469.2	382.5	85.03	10.21	9.38
	批次 2	472.5	382.4	492.4	89.82	13.05	
	批次 3	461.3	482.4	472.5	94.41	2.277	
鹌鹑蛋	批次 1	381.3	423.7	429.2	82.28	6.37	7.26
	批次 2	482.6	421.8	442.6	89.80	6.88	
	批次 3	452.1	482.2	424.9	90.61	6.33	

(三) 实际样品检测

从互联网和超市购买鸡蛋、富叶酸鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋、鸽子蛋、鸵鸟蛋和鹧鸪蛋等共 10 种不同类型的禽蛋中, 采用本文的方法测定的叶酸总量, 每批次取 3 枚蛋进行检测, 结果见表 12。在不同禽蛋间总叶酸含量在 500-6000ng/g 范围, 其中 鹌鹑蛋叶酸含量最高, 鸵鸟蛋含量最低。富叶酸鸡蛋中叶酸总量高达 3899.78ng/g, 是普通鸡蛋的 2 倍。以上结果证实本标准中的灵敏度等技术指标均能满足不同禽蛋实际样品的检测需求。

表 12 实际样品检出情况

样品	总叶酸 (ng/g)	样品	总叶酸 (ng/g)	样品	总叶酸 (ng/g)
普通鸡蛋-1	1268.76	神州一号 鹌鹑蛋-1	3400.48	小鸽子蛋-1	1902.49
普通鸡蛋-2	1240.04	神州一号 鹌鹑蛋-2	3183.36	小鸽子蛋-2	2077.40
普通鸡蛋-3	1305.23	神州一号 鹌鹑蛋-3	3333.68	小鸽子蛋-3	2043.25
鹧鸪蛋-1	724.62	鸵鸟蛋-1	195.60	鹌鹑蛋-1	3724.01
鹧鸪蛋-2	723.71	鸵鸟蛋-2	193.32	鹌鹑蛋-2	3606.60
鹧鸪蛋-3	690.01	鸵鸟蛋-3	197.69	鹌鹑蛋-3	3980.09
鸭蛋-1	1960.15	富叶酸鸡蛋-1	2117.43	大鸽子蛋-1	1240.19
鸭蛋-2	2115.37	富叶酸鸡蛋-2	2384.81	大鸽子蛋-2	1332.31
鸭蛋-3	2053.23	富叶酸鸡蛋-3	2255.38	大鸽子蛋-3	1509.24
鹅蛋-1	1638.92	鹅蛋-2	1972.01	鹅蛋-3	1656.16

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

(一) 试验验证的分析和综述报告

本方法分别在新疆畜牧科学院畜牧业标准化研究所，北京市兽药饲料检测中心和中国农业科学院饲料研究所 3 家检测实验室进行重现验证试验。分别向鸡蛋和鸽子蛋添加 50ng/g、150ng/g 和 500ng/g 三个浓度水平进行重现验证试验，每个浓度水平进行 3 次重复试验。三家验证结果在 2-1000ng/mL 范围，线性相关性均大于 0.99，回收率在 82.28%-100.47%之间，日内精密度在 1.44%-10.21%之间；日间精密度在 2.61%-9.38%之间，方法检出限、定量限可达标准文本规定的水平。符合 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的要求。根据对方法精密度评估和验证，确定两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

(二) 技术经济论证、预期的经济效益、社会效益和生态效益

本文件为检测方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文的八项要求之一。本文件补充了禽蛋中叶酸总含量标准的空白，为叶酸含量的检测和营养价值评定提供了技术支撑，符合我国畜牧行业发展及农产品质量安全和监管的需要。文本在结构上严谨合理，内容编排、层次划分符合逻辑，参数设置及实验方法合理，适合在国内不同层次的检测机构中推广。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

现行叶酸含量检测的国际和国内标准四项（表 8）。食品中叶酸测定的国家标准通过测定微生物在培养基的浊度间接测定叶酸含量，其他的国内标准只适用于饲料中的叶酸含量分析。国际标准（ISO 20631: 2024）使用液质，测定叶酸，5-甲基四氢叶

酸，5-甲酰四氢叶酸三种叶酸的含量。本文件将样品转化后，使用液相色谱-质谱联用法实现7种叶酸总量的测定，其检测灵敏度和叶酸的种类均优于现有标准。

表 8 现行国际和国内标准比较

标准名称	检测方法	叶酸类型	样品	定量限
《禽蛋中叶酸总量的测定 液相色谱质谱联用法》本标准	液相色谱-质谱法	叶酸，5-甲基四氢叶酸，5-甲酰四氢叶酸、四氢叶酸等7种叶酸	禽蛋	50ng/g
《国家食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》（GB 5009.211-2022）	微生物法	叶酸	食品	1μg/100g
《饲料中叶酸的测定 高效液相色谱法》（NY/T 2895-2016）	高压液相法	叶酸	饲料	0.3mg/kg
《添加剂预混合饲料中烟酸与叶酸的测定 高效液相色谱法》（GB/T 17813-2018）	高压液相法	叶酸	饲料	50mg/kg
婴儿配方奶粉和成人营养品 三酶提取和超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）测定总叶酸含量（ISO 20631:2024）	液相色谱-质谱法	叶酸，5-甲基四氢叶酸，5-甲酰四氢叶酸	配方奶粉和营养品	—

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因；

本标准修订不涉及国际标准的采用，也不涉及版权。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集调研了国内外相关信息资料，组织行业内各位专家对标准内容的制定，进行了详细研讨，并达成统一制定方案。无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

标准的制定过程并未涉及相关专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

1 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本。这是保证新标准贯彻实施的基础。

2 发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

3 实施的过渡期宜定为 6 个月。

十、其他应当说明的事项

本文件没有其他应予说明的事项。

参考文献

1. Golja, M.V., et al. *Simultaneous quantification of intracellular concentrations of clinically important metabolites of folate-homocysteine cycle by LC-MS/MS*. Analytical Biochemistry, 2020. **605**.
2. Wusigale and L. Liang, *Folates: Stability and interaction with biological molecules*. Journal of Agriculture and Food Research, 2020. **2**.