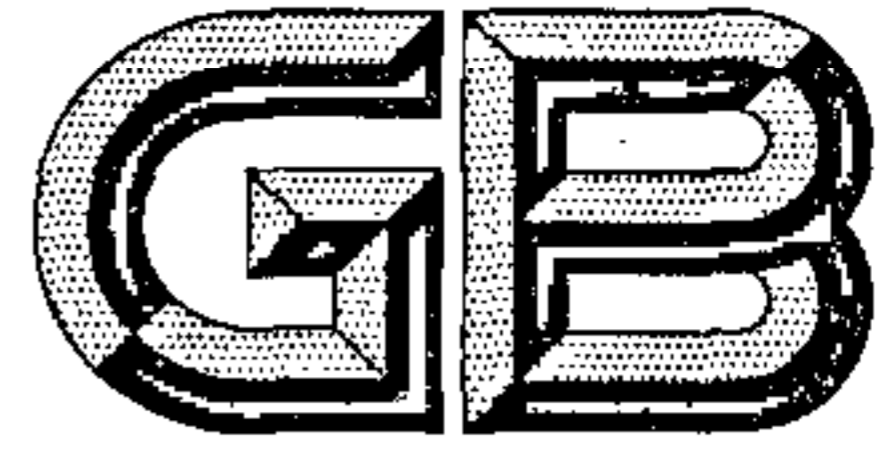


ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.85—2003  
代替 GB/T 12391—1990

---

## 食品中核黄素的测定

Determination of riboflavin in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部  
中国国家标准化管理委员会 发布

615

## 前 言

本标准第一法对应于 AOAC 45.108《食物和维生素制品中核黄素的荧光测定法》(1995 年版)。

本标准与 AOAC 45.1.08 的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB/T 12391—1990《食物中核黄素的测定方法》。

本标准与 GB/T 12391—1990 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中核黄素的测定》；

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所。

本标准主要起草人：王光亚、曲宁、李晶、周瑞华、王竹。

原标准于 1990 年首次发布，本次为第一次修订。

## 食品中核黄素的测定

### 1 范围

本标准规定了食品中核黄素含量的测定方法——微生物法和荧光法。

本标准适用于各类食品中核黄素的测定。

本方法检出限:荧光法为  $0.006 \mu\text{g}$ ;线性范围:荧光法为  $0.1 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g}$ 。

### 第一法 荧光法

### 2 原理

核黄素在  $440 \text{ nm} \sim 500 \text{ nm}$  波长光照射下发生黄绿色荧光。在稀溶液中其荧光强度与核黄素的浓度成正比。在波长  $525 \text{ nm}$  下测定其荧光强度。试液再加入低亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ),将核黄素还原为无荧光的物质,然后再测定试液中残余荧光杂质的荧光强度,两者之差即为食品中核黄素所产生的荧光强度。

### 3 试剂

3.1 硅镁吸附剂:60目~100目。

3.2 2.5 mol/L 乙酸钠溶液。

3.3 木瓜蛋白酶(100 g/L):用 2.5 mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

3.4 淀粉酶(100 g/L):用 2.5 mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

3.5 0.1 mol/L 盐酸。

3.6 1 mol/L 氢氧化钠。

3.7 0.1 mol/L 氢氧化钠。

3.8 低亚硫酸钠溶液(200 g/L):此液用时现配。保存在冰水浴中,4 h 内有效。

3.9 洗脱液:丙酮+冰乙酸+水(5+2+9)。

3.10 溴甲酚绿指示剂(0.4 g/L)。

3.11 高锰酸钾溶液(30 g/L)。

3.12 过氧化氢溶液(3%)。

3.13 核黄素标准液的配制(纯度 98%)

3.13.1 核黄素标准储备液( $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ):将标准品核黄素粉状结晶置于真空干燥器或盛有硫酸的干燥器中。经过 24 h 后,准确称取 50 mg,置于 2 L 容量瓶中,加入 2.4 mL 冰乙酸和 1.5 L 水。将容量瓶置于温水中摇动,待其溶解,冷至室温,稀释至 2 L,移至棕色瓶内,加少许甲苯盖于溶液表面,于冰箱中保存。

3.13.2 核黄素标准使用液:吸取 2.00 mL 核黄素标准储备液,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用水稀释至刻度。避光,贮于  $4^\circ\text{C}$  冰箱,可保存一周。此溶液每毫升相当于  $1.00 \mu\text{g}$  核黄素。

### 4 仪器

4.1 实验室常用设备。

4.2 高压消毒锅。

4.3 电热恒温培养箱。

4.4 核黄素吸附柱:见图 1。

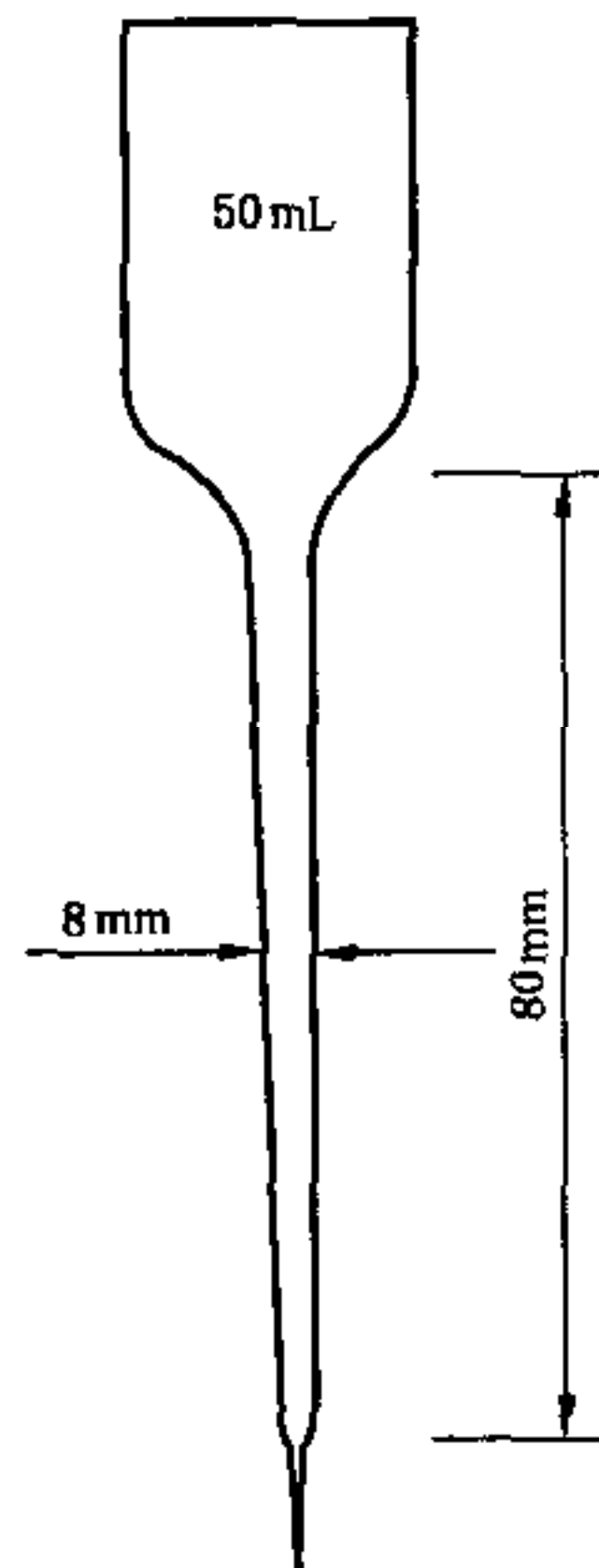


图 1 核黄素吸附柱

4.5 荧光分光光度计。

## 5 分析步骤

整个操作过程需避光进行。

### 5.1 试样提取

#### 5.1.1 试样的水解

准确称取 2 g~10 g 样品(约含 10 μg~200 μg 核黄素)于 100 mL 三角瓶中,加 50 mL 0.1 mol/L 盐酸,搅拌直到颗粒物分散均匀。用 40 mL 瓷坩埚为盖扣住瓶口,置于高压锅内高压水解,10.3 × 10<sup>4</sup> Pa 30 min。水解液冷却后,滴加 1 mol/L 氢氧化钠,取少许水解液,用 0.4 g/L 溴甲酚绿检验呈草绿色,pH 为 4.5。

#### 5.1.2 试样的酶解

5.1.2.1 含有淀粉的水解液:加入 3 mL 10 g/L 淀粉酶溶液,于 37℃~40℃保温约 16 h。

5.1.2.2 含高蛋白的水解液:加 3 mL 10 g/L 木瓜蛋白酶溶液,于 37℃~40℃保温约 16 h。

#### 5.1.3 过滤

上述酶解液定容至 100.0 mL,用干滤纸过滤。此提取液在 4℃冰箱中可保存一周。

### 5.2 氧化去杂质

视试样中核黄素的含量取一定体积的试样提取液及核黄素标准使用液(约含 1 μg~10 μg 核黄素)分别于 20 mL 的带盖刻度试管中,加水至 15 mL。各管加 0.5 mL 冰乙酸,混匀。加 30 g/L 高锰酸钾溶液 0.5 mL,混匀,放置 2 min,使氧化去杂质。滴加 3% 双氧水溶液数滴,直至高锰酸钾的颜色退掉。剧烈振摇此管,使多余的氧气逸出。

### 5.3 核黄素的吸附和洗脱

5.3.1 核黄素吸附柱:硅镁吸附剂约 1 g 用湿法装入柱,占柱长 1/2~2/3(约 5 cm)为宜(吸附柱下端用一小团脱脂棉垫上),勿使柱内产生气泡,调节流速约为 60 滴/min。

5.3.2 过柱与洗脱:将全部氧化后的样液及标准液通过吸附柱后,用约 20 mL 热水洗去样液中的杂质。然后用 5.00 mL 洗脱液将试样中核黄素洗脱并收集于一带盖 10 mL 刻度试管中,再用水洗吸附柱,收集洗出之液体并定容至 10 mL,混匀后待测荧光。

#### 5.4 标准曲线的制备

分别精确吸取核黄素标准使用液 0.3, 0.6, 0.9, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mL (相当于 0.3, 0.6, 0.9, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0  $\mu\text{g}$  核黄素) 或取与试样含量相近的单点标准按核黄素的吸附和洗脱 (5.3) 步骤操作。

#### 5.5 测定

5.5.1 于激发光波长 440 nm, 发射光波长 525 nm, 测量试样管及标准管的荧光值。

5.5.2 待试样及标准的荧光值测量后, 在各管的剩余液 (约 5 mL~7 mL) 中加 0.1 mL 20% 低亚硫酸钠溶液, 立即混匀, 在 20 s 内测出各管的荧光值, 作各自的空白值。

### 6 结果计算

见式(1)。

$$X = \frac{(A-B) \times S}{(C-D) \times m} \times f \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$X$ ——试样中核黄素的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100 g);

$A$ ——试样管荧光值;

$B$ ——试样管空白荧光值;

$C$ ——标准管荧光值;

$D$ ——标准管空白荧光值;

$f$ ——稀释倍数;

$m$ ——试样质量, 单位为克 (g);

$S$ ——标准管中核黄素质量, 单位为微克 ( $\mu\text{g}$ );

$\frac{100}{1\,000}$ ——将试样中核黄素含量由微克每克 ( $\mu\text{g/g}$ ) 换算成毫克每百克 (mg/100 g) 的系数。

计算结果表示到小数点后两位。

### 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得超过算术平均值的 10%。

## 第二法 微生物法

### 8 原理

某一种微生物的生长 (繁殖) 必需某些维生素。例如干酪乳酸杆菌 (*Lactobacillus casei*, 简称 *L. C.*) 的生长需要核黄素, 培养基中若缺乏这种维生素该细菌便不能生长。在一定条件下, 该细菌生长情况, 以及它的代谢物乳酸的浓度与培养基中该维生素含量成正比, 因此可以用酸度及混浊度的测定法来测定试样中核黄素的含量。

### 9 试剂

9.1 冰乙酸。

9.2 甲苯。

9.3 无水乙酸钠。

9.4 乙酸铅。

9.5 氢氧化铵。

- 9.6 干酪乳酸杆菌(*Lactobacillus casei* ATCC 7469)。
- 9.7 盐酸:0.1 mol/L。
- 9.8 氢氧化钠溶液:1 mol/L 和 0.1 mol/L。
- 9.9 0.9 g/L 氯化钠溶液(生理盐水):使用前应进行灭菌处理。
- 9.10 核黄素标准储备液(25 μg/mL):将标准品核黄素粉状结晶置于真空干燥器或盛有硫酸的干燥器中。经过 24 h 后,准确称取 50 mg,置于 2 L 容量瓶中,加入 2.4 mL 冰乙酸和 1.5 L 水。将容量瓶置于温水中摇动,待其溶解,冷至室温,稀释至 2 L,移至棕色瓶内,加少许甲苯盖于溶液表面,于冰箱中保存。
- 9.11 核黄素标准中间液(10 μg/mL):准确吸取 20 mL 核黄素标准储备液,加水稀释至 50 mL。
- 9.12 核黄素标准使用液(0.1 μg/mL):准确吸取 1.0 mL 中间液于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。每次分析要配制新标准使用液。
- 9.13 碱处理蛋白胨:分别称取 40 g 蛋白胨和 20 g 氢氧化钠于 250 mL 水中。混合后,放于 37℃ ± 0.5℃ 恒温箱内,24 h~48 h 后取出,用冰乙酸调节 pH 6.8,加 14 g 无水乙酸钠(或 23.2 g 含有 3 分子结晶水的乙酸钠),稀释至 800 mL,加少许甲苯盖于溶液表面,于冰箱中保存。
- 9.14 胱氨酸溶液(1 g/L):称取 1 g L-胱氨酸于小烧杯中。加 20 mL 水,缓慢加入约 5 mL~10 mL 盐酸,直至其完全溶解,加水稀释至 1 L,加少许甲苯盖于溶液表面。
- 9.15 酵母补充液:称取 100 g 酵母提取物干粉于 500 mL 水中,称取 150 g 乙酸铅于 500 mL 水中,将两溶液混合,以氢氧化铵调节 pH 至酚酞呈红色(取少许溶液检验)。离心或用布氏漏斗过滤,滤液用冰乙酸调节 pH 至 6.5。通入硫化氢直至不生沉淀,过滤,通空气于滤液中,以排除多余的硫化氢。加少许甲苯盖于溶液表面,于冰箱中保存。
- 9.16 甲盐溶液:称取 25 g 磷酸氢二钾和 25 g 磷酸二氢钾,加水溶解,并稀释至 500 mL。加入少许甲苯以保存之。
- 9.17 乙盐溶液:称取 10 g 硫酸镁(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O),0.5 g 硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)和 0.5 g 硫酸锰(MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O)加水溶解,并稀释至 500 mL,加少许甲苯以保存之。
- 9.18 基本培养储备液:将下列试剂混合于 500 mL 烧杯中,加水至 450 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8,用水稀释至 500 mL。

碱处理蛋白胨	100 mL
0.1%胱氨酸溶液	100 mL
酵母补充液	20 mL
甲盐溶液	10 mL
乙盐溶液	10 mL
无水葡萄糖	10 g

- 9.19 琼脂培养基:将下列试剂混合于 250 mL 三角瓶中,加水至 100 mL,于水浴上煮至琼脂完全溶化,用 1 mol/L 盐酸趁热调节 pH 至 6.8。尽快倒入试管中,每管 3 mL~5 mL,塞上棉塞,于高压锅内 6.9 × 10<sup>4</sup> Pa 压力下灭菌 15 min,取出后直立试管,冷至室温,于冰箱中保存。

无水葡萄糖	1 g
乙酸钠(NaAc · 3H <sub>2</sub> O)	1.7 g
蛋白胨	0.8 g
酵母提取物干粉	0.2 g
甲盐溶液	0.2 mL
乙盐溶液	0.2 mL
琼脂	1.2 g

- 9.20 0.4 g/L 溴甲酚绿指示剂:称取 0.1 g 溴甲酚绿于小研钵中,加 1.4 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液

研磨。加少许水,继续研磨,直至完全溶解。用水稀释至 250 mL。

9.21 0.4 g/L 溴麝香草酚蓝指示剂:称取 0.1 g 溴麝香草酚蓝于小研钵中,加 1.6 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液研磨。加少许水,继续研磨,直至完全溶解。用水稀释至 250 mL。

## 10 仪器与设备

10.1 实验室常用设备。

10.2 电热恒温培养箱。

10.3 离心沉淀机。

10.4 液体快速混合器。

10.5 高压消毒锅。

## 11 菌种的制备与保存

11.1 储备菌种的制备:以 L.C. 纯菌种接入 2 个或多个琼脂培养基管中。在  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中保温 16 h~24 h。贮于冰箱内,至多不超过 2 周,最好每周移种一次。保存数周以上的储备菌种,不能立即用于制备接种液,一定要在使用前每天移种一次,连续 2 d~3 d 方可使用,否则生长不好。

11.2 种子培养液的制备:取 5 mL 核黄素标准使用液和 5 mL 基本培养储备液于 15 mL 离心管混匀,塞上棉塞,于高压锅内,在  $6.9 \times 10^4$  Pa 压力下灭菌 15 min。每次可制备 2 管~4 管。

## 12 分析步骤

因核黄素易被日光和紫外线破坏,故一切操作要在暗室内进行。

### 12.1 接种液的制备

使用前一天,将菌种由储备菌种管中移入已消毒的种子培养液中,同时制做两管。在  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  保温 16 h~24 h。取出后离心 10 min(3000 r/min),以无菌操作方法倾去上部液体,用已消毒的生理盐水淋洗两次,再加 10 mL 消毒生理盐水,在液体快速混合器上振摇试管,使菌种成混悬体。将此液倾入已消毒的注射器内,立即使用。

### 12.2 试样的制备

12.2.1 将用磨粉机、研钵磨成粉末或用打碎机打成匀浆。

12.2.2 称取约含  $5 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g}$  的核黄素试样(谷类约 10 g,干豆类约 4 g,肉类约 5 g),加入 50 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液,混匀。置于高压锅内,在  $10.3 \times 10^4$  Pa 压力下水解 30 min。

12.2.3 冷至室温,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.6(取少许水解液,用溴甲酚绿检验,溶液呈草绿色即可)。

12.2.4 加入淀粉酶或木瓜蛋白酶,每克试样加入 20 mg 酶。在  $40^{\circ}\text{C}$  恒温箱中过夜,大约 16 h。

12.2.5 冷至室温,加水稀释到 100 mL,过滤。对于脂肪量高的食物,可用乙醚提取,以除去脂肪。

### 12.3 标准管的制备

三组试管中每管各加核黄素标准使用液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL,每管加水至 5 mL,再每管加 5 mL 基本培养储备液混匀。

### 12.4 试样管的制备

12.4.1 吸取试样溶液 5 mL~10 mL,置于 25 mL 具塞试管中,用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 6.8(取少许溶液,用溴麝香草酚蓝检验),加水稀释至刻度。

12.4.2 取两组试管,各加试样稀释液(12.4.1)1、2、3、4 mL,每管加水至 5 mL,每管再加 5 mL 基本培养储备液混匀。

### 12.5 灭菌

将以上试样管和标准管全部塞上棉塞,置于高压锅内,在  $6.9 \times 10^4$  Pa 压力下灭菌 15 min。

12.6 接种和培养

12.6.1 待试管冷至室温,在无菌操作条件下接种,每管加一滴接种液(12.1),接种时注射器针头不要碰试管壁,要使接种液直接滴在培养液内。

12.6.2 置于 37℃±0.5℃ 恒温箱中培养约 72 h,培养时每管必须在同一温度。培养时间可延长 18 h 或减少 12 h。必要时可在冰箱内保存一夜再滴定。若用混浊度测定法,以培养 18 h~24 h 为宜。

12.7 滴定

将试管中培养液倒入 50 mL 三角瓶中,加 0.01 g/L 溴麝香草酚蓝溶液 5 mL,分两次淋洗试管,洗液倒至该三角瓶中,以 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定,终点呈绿色。以第一瓶的滴定终点作为变色参照瓶,约 30 min 后再换一参照瓶,因溶液放置过久颜色变浅。

12.8 标准曲线的绘制

用标准核黄素溶液的不同浓度为横坐标及在滴定时所需 0.1mol/L 氢氧化钠的毫升数为纵坐标,绘制标准曲线。

13 结果计算

见式(2)。

$$X = \frac{c \times V}{m} \times F \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- X——试样中核黄素含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- c——以曲线查得每毫升试样中核黄素含量,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V——试样水解液定容总体积,单位为毫升(mL);
- F——试样液的稀释倍数;
- m——试样质量,单位为克(g);

$\frac{100}{1\,000}$ ——试样含量由微克每克(μg/g)换算成毫克每百克(mg/100 g)的系数。

计算结果表示到小数点后第二位。

14 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得超过算术平均值的 10%。