



中华人民共和国国家标准

GB 5413.12—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 B₂ 的测定

National food safety standard

Determination of vitamin B₂ in foods for infants and young children,

milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 5413.12-1997《婴幼儿食品和乳粉 维生素B₂的测定》。

本标准与GB/T 5413.12-1997相比，主要变化如下：

- 标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B₂的测定》。
- 取消了方法一荧光分光光度法；
- 对原标准的结构进行了修改；
- 混合酶液中增加了酸性磷酸酶，以解决添加核黄素磷酸盐作为维生素B₂强化剂的样品测定；
- 样品处理方法中增加了“避免强光照射”的注意点；
- 外标法定量采用多点标准曲线法；
- 在结果计算时明确样品中维生素B₂含量以核黄素计；
- 增加附录A标准溶液的液相色谱图。

本标准附录A为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413-1985、GB/T 5413.12-1997。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素B₂的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素 B₂ 的测定方法。
本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素 B₂ 的测定。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 原理

试样在稀盐酸环境中恒温水解，酶解，经 C₁₈ 反相色谱柱分离，用荧光检测器（Ex: 462 nm, Em: 522 nm）检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 盐酸。

4.2 三水乙酸钠。

4.3 冰乙酸。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 维生素 B₂（核黄素）标准品：纯度≥99%。

4.6 盐酸（1+1）：量取 100 mL 盐酸（4.1）缓慢倒入 100 mL 水中，混匀。

4.7 盐酸（0.1 mol/L）：吸取 9 mL 盐酸（4.1），溶于 1000 mL 水中。

4.8 盐酸（0.01 mol/L）：吸取 0.1 mol/L 盐酸（4.7）50 mL，用水稀释并定容至 500 mL。

4.9 乙酸钠溶液（0.05 mol/L）：称取 6.80 g 三水乙酸钠（4.2），加 900 mL 水溶解，用冰乙酸调 pH 值至 4.0~5.0，用水定容至 1000 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

4.10 乙酸钠溶液（2.0 mol/L）：称取 27.22 g 三水乙酸钠（4.2），用水溶解并定容至 100 mL。

4.11 混合酶溶液：称取 2.345 g 木瓜蛋白酶（活力单位≥600 U/g）、1.175 g 淀粉酶（活力单位≥4000 U/g）和 1.000 g 酸性磷酸酶（活力单位≥4000 U/g），用水定容至 50 mL。临用前配制。

4.12 标准溶液

4.12.1 维生素 B₂ 标准储备液 (250 μg/mL): 称取 25mg (精确至 0.1 mg) 维生素 B₂ 标准品 (4.5), 加入盐酸 (4.6) 2 mL, 超声溶解后, 立即用水转移并定容至 100 mL。置于棕色玻璃容器中在 0℃~4℃ 冰箱贮存, 保存期为 3 个月。

4.12.2 维生素 B₂ 标准中间液: 准确吸取 4.00 mL 标准储备液 (4.12.1), 用水稀释并定容至 100 mL, 此溶液中维生素 B₂ 浓度为 10 μg/mL。临用前配制。

4.12.3 维生素 B₂ 标准系列工作液: 分别吸取维生素 B₂ 标准中间液 (4.12.2) 0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL, 用水溶解并定容至 100 mL。该标准系列浓度分别为 0.00 μg/mL、0.05 μg/mL、0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.50 μg/mL、1.00 μg/mL。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪, 带有荧光检测器。

5.2 高压灭菌锅。

5.3 pH 计: 精度为 0.01。

5.4 组织捣碎机。

5.5 0.45 μm 微孔水相滤膜。

5.6 天平: 感量 1 mg 和 0.1 mg。

6 分析步骤

6.1 试样的处理

称取 5 g~10 g (精确至 0.01 g) 试样 (如有必要, 将试样放入捣碎机中捣碎; 试样中含维生素 B₂ 5 μg 以上) 于 100 mL 三角瓶中, 加 60 mL 0.1 mol/L 盐酸 (4.7), 充分摇匀, 用棉花塞和牛皮纸封口, 放入高压灭菌锅内, 在 121℃ 下保持 30 min, 待冷却至 40℃ 以下后取出, 轻摇数次; 用 2.0 mol/L 乙酸钠溶液 (4.10) 调 pH 值至 4.0 左右, 加入 2.0 mL 混合酶溶液 (4.11), 摇匀后, 置于 37℃ 培养箱中过夜; 将酶解液转移至 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 用定量滤纸过滤, 取滤液再经 0.45 μm 滤膜 (5.5) 过滤, 取滤液备用。

注: 操作过程应避免强光照射。

6.2 测定

6.2.1 参考色谱条件

色谱柱: C₁₈ 反相色谱柱 (粒径 5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 或同等性能的色谱柱。

流动相: 0.05 mol/L 乙酸钠溶液 (4.9) — 甲醇 (4.4) = 65 + 35。

流速: 1.0 mL/min。

检测波长: 激发波长 462 nm, 发射波长 522 nm。

进样量: 20 μL。

6.2.2 标准曲线绘制

将维生素 B₂ 标准系列工作液 (4.12.3) 依次进行色谱测定 (其标准样品色谱图参见附录 A 中图 A.1), 记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

6.2.3 试液测定

将试液进行色谱测定, 从标准曲线中查得试液相应的浓度。

6.2.4 空白试验

除不加试样外，按上述操作步骤进行。

7 分析结果的表述

试样中维生素B₂的含量按式(1)计算：

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中维生素 B₂ 的含量（以核黄素计），单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c——试液的进样浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

8 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 %。

9 其他

本标准定量限为：当取样量为 10.00 g 时，0.05 mg/100 g。

附录 A
(资料性附录)
维生素 B₂ 标准溶液的液相色谱图

A.1 维生素 B₂ 标准溶液的液相色谱图

维生素 B₂ 标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

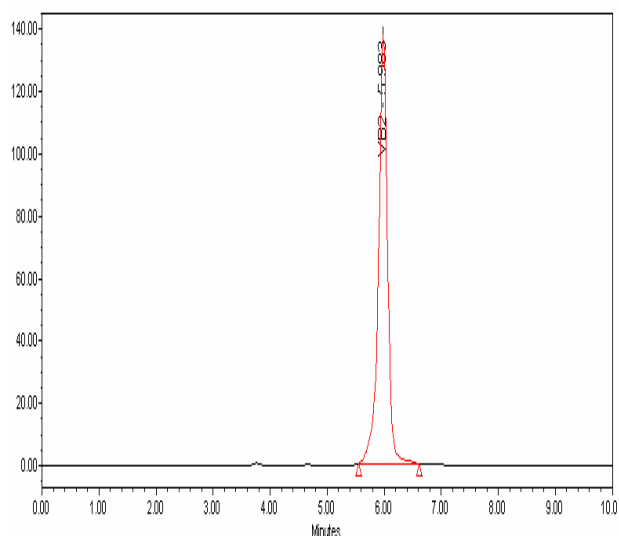


图 A.1 维生素 B₂ 标准溶液的液相色谱图