

ICS 67.100.10

C



中华人民共和国食品安全国家标准

GB××××—××××

代替GB/T 5413.12—1997

婴幼儿食品和乳品中维生素B₂的测定

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

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素B₂的测定》。

本标准与GB/T 5413.12-1997相比，主要变化如下：

- 方法名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素B₂的测定》。
- 取消了原标准方法一（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（资料性附录）标样和样品的液相色谱图。

本标准附录A为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

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。

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。

本标准的定量限为0.05mg/100g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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: 462nm, Em: 522nm）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 无水乙酸钠。

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

4.7 0.01 mol/L 盐酸溶液：吸取 0.1 mol/L 盐酸溶液（4.6）50 mL，用水稀释并定容至 500 mL。

4.8 0.05 mol/L 乙酸钠溶液：称取 4.10 g 无水乙酸钠（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 0.45μm 微孔滤膜过滤。

4.9 2.0 mol/L 乙酸钠溶液：称取 16.61 g 无水乙酸钠（4.2），用水溶解并定容至 100 mL。

4.10 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。现配现用。

4.11 标准溶液

4.11.1 250 μg/mL 维生素 B₂ 标准储备溶液。

精确称取 0.0250 g 维生素 B₂标准品（4.5），加入盐酸（4.1）2 mL，超声溶解后，立即用水转移并定容至 100 mL。于棕色玻璃容器中在 4℃ 冰箱贮存，保存期为 3 个月。

4.11.2 维生素 B₂ 标准中间液。

准确吸取 4.00 mL 标准储备液（4.11.1），用水稀释并定容至 100 mL，此溶液中维生素 B₂浓度为 10μg/mL。现配现用。

4.11.3 维生素 B₂ 标准工作液。

分别吸取维生素 B₂ 标准中间液（4.11.2）0、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mL，用水溶解并定容至 100 mL。该标准系列浓度分别为 0、0.05、0.10、0.20、0.5、1.00 μg/mL。现配现用。

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。
- 5.4组织捣碎机。

6 分析步骤

6.1 试样的处理

准确称取 5.0~10.0 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 5μg 以上）于 100 mL三角瓶中，加 60 mL 0.1 mol/L盐酸溶液（4.6），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（4.9）调 pH 值至 4.0 左右，加入 2.0 mL混合酶液（4.10），摇匀后，置于37℃的培养箱中过夜；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滤膜过滤，取滤液备用。操作过程中避免强光照射。

6.2 测定

6.2.1 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈反相色谱柱（dp 5 μm，25 cm×4.6 mm）或相当者。

流动相：0.05 mol/L 乙酸钠溶液（4.8）：甲醇（4.4）= 65:35（V/V）。

（注：根据不同色谱柱和分离效果，可以调节流动相比例。）

流速：1.00 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（4.11.3）依次按上述推荐色谱条件上机测定，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

将试液按上述推荐色谱条件上机测定，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 结果计算和表示

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

式中：

X——试样中维生素B₂的含量（以核黄素计），mg/100g；

c——试液的进样浓度，μg/mL；

V——试样定容容积，mL；

m——试样质量，g。

在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，结果保留小数点后 2 位

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%。

附录 A
(资料性附录)
标样和样品的液相色谱图

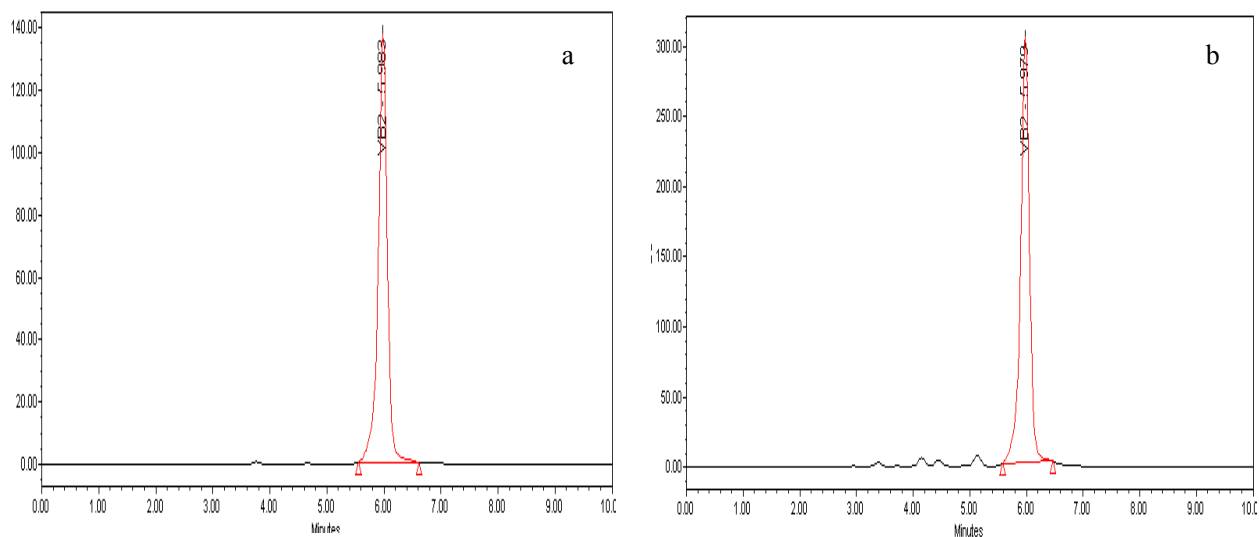


图 A.1 液相色谱图
(a、标样色谱图 b、样品色谱图)