

食物中维生素 B2（核黄素）的测定方法

硅镁吸附剂净化荧光法

1. 原理

核黄素在 440~500nm 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。利用硅镁吸附剂对核黄素的吸附作用去除样品中的干扰荧光测定的杂质，然后洗脱核黄素，测定其荧光强度。试液再加入低亚硫酸钠（Na₂S₂O₄），将核黄素还原为无荧光的物质，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。

2. 方法来源

参照 GB12391-1990 本方法适用于食物及饲料中核黄素的测定。

3. 仪器

- 1) 高压消毒锅
- 2) 电热恒温培养箱
- 3) 核黄素吸附柱
- 4) 荧光分光光度计。

4. 试剂

试验用水为蒸馏水。试剂不加说明者为分析纯。

4.1 硅镁吸附剂：60~100 目，sigma 公司产品。

4.2 2.5mol/L 无水乙酸钠溶液。

4.3 10%木瓜蛋白酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

4.4 10%淀粉酶：用 2.5mol/L 乙酸钠溶液配制。使用时现配制。

4.5 0.1 mol/L 盐酸

4.6 1 mol/L 氢氧化钠

4.7 0.1 mol/L 氢氧化钠

4.8 20%(w/v)低亚硫酸钠溶液：此液用时现配。

4.9 洗脱液：丙酮+冰醋酸+水（5+2+9）

4.10 0.04% 溴甲酚绿指示剂

4.11 3%（v/v）高锰酸钾溶液：

4.12 3%(v/v)过氧化氢溶液：

4.13 核黄素标准液的配制：（纯度>98% sigma 公司）。

A) 核黄素标准储备液：（25μg/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 小时后，准确称取 50mg，置于 2L 容量瓶中，加入 2.4mL 冰乙酸和 1.5mL 水。将容量瓶置于温水中摇动，待其溶解，冷却至室温，稀释至 2L，移至棕色瓶中，加少许甲苯复盖于溶液表面，于冰箱中保存。

B) 核黄素标准使用液：吸取 2.00mL 核黄素标准储备液，置于 50ml 棕色容量瓶中，用水稀释至刻度。避光，贮于 4℃ 冰箱，可保存一周。此溶液每毫升相当于 1.00μg 核黄素。

5. 操作步骤

整个操作过程需避光进行。

5.1 样品提取

1) 水解：称取 2~10g 样品（约含 10~200μg 核黄素）于 100ml 三角瓶中，50mL 0.1mol/L 盐酸，搅拌直到颗粒物分散均匀。用 40ml 瓷坩埚为盖扣住瓶口，于 121℃ 高压水解样品 30min。水解液冷却后，滴加 1mol/L 氢氧化钠，用 0.04% 溴甲酚绿作外指示剂调至 pH 为 4.5。

2) 酶解

上海洪纪仪器设备有限公司

A) 含有淀粉的水解液：加入 3ml10% 淀粉酶溶液，于 37~40℃ 保温约 16h。

B) 含高蛋白的水解液：加 3ml10% 木瓜蛋白酶溶液，于 37~40℃ 约 16h。

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

5.3 氧化去杂质：视样品中核黄素的含量取一定体积的样品提取液及核黄素标准使用液（约含 1~10 μ g 核黄素）分别于 20ml 的带盖刻度试管中，加水至 15ml。各管加 0.5ml 冰乙酸，混匀。加 3% 高锰酸钾溶液 0.5ml，混匀，放置 2min，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褪掉。剧烈振摇此管，使多余的氧气逸出。

5.4 核黄素的吸附和洗脱

A) 核黄素吸附柱：硅镁吸附剂约 1g 用湿法装入柱，占柱长 1/2~2/3（约 5cm）为宜（吸附柱下端用一团脱脂棉垫上），勿使柱内产生气泡，调节流速约为 60 滴/min。

B) 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 20ml 热水洗去样液中的杂质。然后用 5.00ml 洗脱液将样品中核黄素洗脱并收集于一带盖 10ml 刻度试管中，再用水洗吸附柱，收集洗出之液体并定容至 10ml，混匀后待测荧光。

6. 测定

A) 于激发光波长 440nm，发射光波长 525nm 测量样品管及标准管的荧光值。

B) 待样品及标准的荧光值测量后，在各管的剩余液（约 5~7ml）中加 0.1ml20% 低亚硫酸钠溶液，立即混匀，在 20s 内测出各管的荧光值，作为各自的空白值。

7. 计算

$$(A-B) \times S \ 100$$

$$X = \frac{A-B}{C-D} \times f \times \frac{1000}{m}$$

$$(C-D) \times m \ 1000$$

式中：X--样品中含核黄素的量，mg/100g；

A --样品管荧光值；

B --样品管空白荧光值；

C --标准管荧光值；

D --标准管空白荧光值；

f --稀释倍数；

m --样品的质量，g；

S --标准管中的核黄素含量， μ g；

100

--将样品中核黄素量由 μ g/g 折算成 mg/100g 的折算系数。

1000

注：1. 标准曲线由 0.01 μ g 至 20 μ g 间，呈良好的线形关系，所以每次测定样品的同时，测定与样品含量相近的标准即可。

2. 氧化去杂质，加入高锰酸钾的量不宜过多，以避免加入双氧水的量大，产生气泡，影响核黄素的吸附及洗脱。