

分子荧光光度法测定动物源性食品中的维生素 B₂

赵士聪^{1,2}, 陈娟娟^{1,2}, 武亭亭^{1,2*}

(1. 国家副食品质量检验检测中心, 国贸食品科学研究院有限公司, 北京 102209;
2. 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209)

摘要: **目的** 改进并建立用于测定动物源性食品中维生素 B₂ 含量的分子荧光光度法。**方法** 以五花肉、鸡肉、猪肝、牛肾为研究对象, 参考 GB 5009.85—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B₂ 的测定》, 进一步简化实验过程、优化实验条件, 分析检测过程中影响结果的多种因素, 如 pH、光照强度、连二亚硫酸钠对荧光猝灭的作用, 提高动物源性食品中维生素 B₂ 测定方法的准确性。**结果** 确定了 pH 6.5 时荧光强度最大, 随着光照强度增强及光照时间加长荧光强度逐渐降低, 5 h 后维生素 B₂ 基本分解完全。维生素 B₂ 在 0~10 μg 浓度范围内线性良好, $r^2=0.9993$, 检出限为 0.004 mg/100 g, 定量限为 0.02 mg/100 g; 加标回收率范围在 90%~100%。平行样品测定结果的相对标准偏差小于 6%。**结论** 该方法准确、设备简单、成本低廉, 可以满足基层实验室对动物源性食品中维生素 B₂ 的测定需求。**关键词:** 维生素 B₂; 分子荧光光度法; 动物源性食品; 荧光猝灭

Molecular fluorescence spectrophotometry for the determination of vitamin B₂ in animal derived foods

ZHAO Shi-Cong^{1,2}, CHEN Juan-Juan^{1,2}, WU Ting-Ting^{1,2*}

(1. National Non-Staple Food Quality Inspection and Testing Center, International Trade Food Science Research Institute Co., Ltd., Beijing 102209, China; 2. Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China)

ABSTRACT: Objective To improve and establish a molecular fluorescence spectrophotometry method for determining the content of vitamin B₂ in animal derived foods. **Methods** Using pork belly, chicken, pig liver, and cow kidney as research objects, and referring to GB 5009.85-2016 *National Standard of Food Safety—Determination of Vitamin B₂ in Foods*, further simplified the experimental process, optimize experimental conditions, analyzed various factors that affect the results during the detection process, such as pH, light intensity, and the effect of sodium hydrosulfite on fluorescence quenching, improved the accuracy of the method for determining vitamin B₂ in animal derived foods. **Results** The maximum fluorescence intensity was determined at pH 6.5. As the light intensity increased and the light duration increased, the fluorescence intensity gradually decreased. After 5 hours, vitamin B₂ basically decomposed completely. Vitamin B₂ exhibited good linearity within the range of 0~10 μg, with $r^2=0.9993$; the limit of detection was 0.004 mg/100 g, and the limit of quantification was 0.02 mg/100 g. The recovery rates for spiking ranged from 90%~100%. The relative standard deviation of parallel sample determination results was less than 6%. **Conclusion** This method is accurate, simple in equipment, and cost-effective, and can meet the needs of grassroots laboratories for the determination of vitamin B₂ in animal derived foods.

KEY WORDS: vitamin B₂; molecular fluorescence spectrophotometry; animal derived foods; fluorescence quenching

0 引言

维生素 B₂ 是一种含有核糖醇侧链的异咯嗪衍生物, 为黄褐

色针状晶体, 又称核黄素^[1-2], 微溶于水, 溶于水后呈绿色荧光^[3], 味苦, 有轻微气味^[4]。维生素 B₂ 在人体内主要参与生物氧化与能量代谢, 有助于保护 DNA 免于受损, 可提高机体对蛋白质

* 通信作者: 武亭亭, 硕士, 主要研究方向: 食品质量与安全检测。E-mail: wutingting@cofco.com

*Corresponding author: WU Ting-Ting, Master, National Non-Staple Food Quality Inspection and Testing Center, International Trade Food Science Research Institute Co., Ltd., Beijing 102209, China. E-mail: wutingting@cofco.com

的利用率,促进发育和细胞的再生^[5-7],维护皮肤和细胞膜的完整性。同时维生素B₂参与细胞的生长代谢,是机体组织代谢和修复的必需营养素。人体缺乏维生素B₂,会引起口角炎、唇炎、舌炎、眼角膜炎^[7]等表皮组织病变。国民营养健康调查显示,我国居民的每日膳食维生素B₂摄入量介于0.8~0.9 mg^[8],主要存在于乳类、蛋类、肉类以及动物内脏中^[9-11],因此准确检测动物源食品中的维生素B₂至关重要。

维生素B₂的测定方法多样,包括紫外分光光度法^[12]、高效液相色谱法^[13-17]、电化学法^[18]、示波极谱法^[19]、荧光法^[20-21]以及毛细管电泳法^[22]。其中,液相色谱法、电化学法和电泳法等技术要求较高的方法,对实验设备和操作者的技能都有较高标准;而紫外分光光度法灵敏度及抗干扰性能存在不足。目前实验室通常使用GB 5009.85—2016《食品安全国家标准 食品中维生素B₂的测定》中的分子荧光法,该标准方法为我国广大食品检测机构和从业人员提供了良好的技术规范,但实际操作过程复杂、效率低,难以满足批量检测需求。

本研究基于GB 5009.85—2016标准,通过在pH 6.5的酸性条件下稳定维生素B₂,采用酸水解法直接提取,避免使用硅镁吸附剂过柱洗脱等复杂操作,简化实验步骤,为批量样品的检测提供了参考和选择。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

盐酸、氢氧化钠、高锰酸钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);冰乙酸、连二亚硫酸钠(分析纯,西陇化工股份有限公司);木瓜蛋白酶(100 U/mg)、 α -淀粉酶(≥ 2000 U/mg,阿拉丁生化科技股份有限公司);硅镁吸附剂(60~80目,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

RF-5301PC分子荧光光度计(日本岛津公司);PHS-3C酸度计(上海精密科学仪器有限公司);MS204S电子天平(感量0.001 g,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);MJ-250 I霉菌培养箱(上海一恒科技有限公司);BXM-30R立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

维生素B₂标准储备液:将维生素B₂标准品置于装有五氧化二磷的干燥器中,进行24 h的干燥处理。处理后,准确称量10 mg的维生素B₂标准品,加入2 mL盐酸溶液(1:1, V:V)溶解,立即用水转移并定容至100 mL棕色玻璃容器中。

维生素B₂中间液:准确吸取10 mL维生素B₂标准储备液,用水稀释并定容至100 mL,即中间液。

维生素B₂使用液:准确吸取10 mL维生素B₂标准中间液,用水定容至100 mL,此溶液每毫升相当于1.000 μ g维生素B₂,即标准工作使用液。

1.3.2 试样制备

酸水解:取样品250 g用组织捣碎机将样品打碎,装入棕色磨口瓶中密封,避光保存。称取5.0 g均质后的试样于100 mL具塞锥形瓶中,加入50 mL 0.1 mol/L的盐酸溶液,混匀,塞好瓶塞,放入121°C高压灭菌锅内灭菌30 min后冷却至室温,用氢氧化钠溶液调pH至6.5。

酶解:加入2 mL木瓜蛋白酶与 α -淀粉酶的混合溶液,摇匀后,置于37°C培养箱中过夜酶解,冷却至室温,转移到100 mL容量瓶,定容,过滤。

纯化:吸取试样提取液10.00 mL,于25 mL的比色管中,加1.0 mL冰乙酸混匀。加1.0 mL 30 g/L高锰酸钾溶液,摇匀,放置2 min,滴加3%过氧化氢溶液至高锰酸钾的颜色褪去为止,剧烈振摇,排除多余的氧气,定容。

1.3.3 试样测定

在激发光波长440 nm,发射光波长530 nm,测定样液的荧光值,待试样管荧光值测量后,向管中加入20 mg连二亚硫酸钠,立即混匀,在20 s内测定荧光值即为样品的空白值。

1.3.4 标准工作曲线的制备

分别精确吸取维生素B₂标准使用液0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mL(相当于0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 μ g维生素B₂),于25 mL的比色管中,加水至10 mL。加1.0 mL冰乙酸,1.0 mL 30 g/L高锰酸钾溶液,摇匀,放置2 min,滴加3%过氧化氢溶液至高锰酸钾的颜色褪去为止,剧烈振摇,排除多余的氧气,定容。设置激发光波长440 nm,发射光波长530 nm,测定样液的荧光值,以浓度为横坐标、荧光强度为纵坐标作图。

1.4 数据处理

采用Excel 2021和Origin 8.5软件分别进行检测数据提取、结果计算、图表制作和图谱绘制。实际样品平行测定6次,测定结果以平均测定值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 条件优化

2.1.1 最佳激发波长和发射波长的选择

配制质量浓度为1.5 μ g/mL的维生素B₂溶液,根据荧光光谱产生的作用机制,其发射峰的位置不随激发波长的变化而变化,从而确定发射波长,再由确定的发射波长反扫描激发波长,进而确定最佳激发波长,结果见图1。由图1可知激发峰在波长440 nm处达到峰值,发射峰在波长为530 nm处达到峰值,荧光强度与维生素B₂的浓度在一定范围内成正比,因此维生素B₂

在 440 nm 激发波长和 530 nm 发射波长处测定的荧光强度最高、灵敏度好, 选用此激发、发射波长条件。

2.1.2 pH 对维生素 B₂ 的影响

配制质量浓度为 1.0 μg/mL 的维生素 B₂ 溶液, 通过调节溶液 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 时, 测定其荧光强度, 并做荧光强度与 pH 的关系图, 见图 2, 维生素 B₂ 的荧光强度随 pH 的变化呈现特定的趋势。在 pH 从 4.0 增至 6.0 时, 荧光强度保持相对稳定。当 pH 由 6.0 进一步提高至 6.5, 荧光强度显著增强, 并在 pH 6.5 时达到峰值。然而, 当 pH 超过 6.5, 继续升高至 9.0 时, 荧光强度则随着 pH 的增加而逐渐减弱。pH 对维生素 B₂ 的影响分析表明, 维生素 B₂ 在碱性条件下更易分解, 而在酸性环境中则相对稳定。因此, 将样品溶液的 pH 调节至 6.5 作为最佳条件。

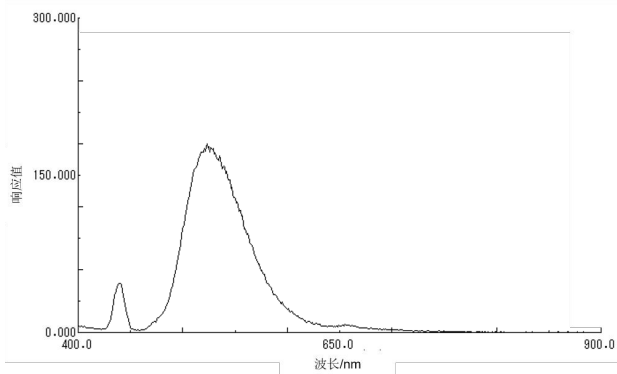


图 1 维生素 B₂ 激发波长和发射波长选择

Fig.1 Selection of excitation and emission wavelengths for vitamin B₂

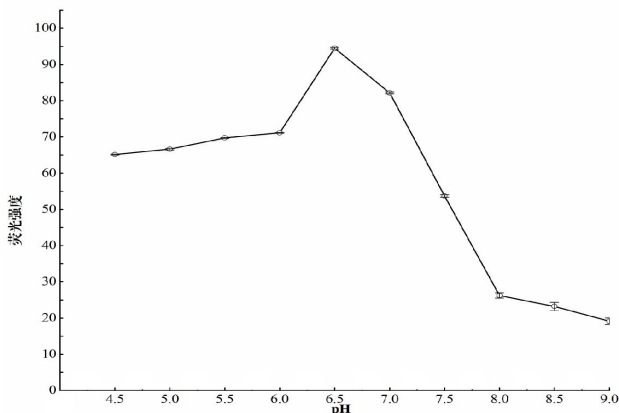


图 2 pH 对维生素 B₂ 影响

Fig.2 Effects of pH on vitamin B₂

2.1.3 光照强度和照射时间的影响

配制质量浓度为 1.000 μg/mL, pH 6.5 的维生素 B₂ 溶液, 将溶液分别放置于冷藏避光、室温避光、室温日光、100 W 灯照 4 种环境条件下, 选择激发波长 440 nm, 每隔 0.5 h 测定溶液的荧光强度, 结果见图 3。

光照强度对维生素 B₂ 分解速率具有显著影响, 如图 3 所

示, 在 0.5 h 内, 维生素 B₂ 的分解速率在所有光照条件下均较为缓慢, 且未产生显著差异。当时间延长至 5.0 h, 不同光照条件下的维生素 B₂ 荧光强度出现明显变化。特别是在室温日光和 100 W 灯泡照射下, 维生素 B₂ 的荧光强度显著下降, 表明其分解速率加快。经过 5.0 h, 荧光强度几乎降至零, 表明维生素 B₂ 几乎完全分解。相比之下, 在冷藏避光和室温避光条件下, 维生素 B₂ 的荧光强度在 5.0 h 内保持相对稳定。实验结果表明, 维生素 B₂ 对光照非常敏感, 容易在光照条件下分解。因此, 样品测定时应选择避光条件或检测时间控制在 0.5 h 以内, 避免维生素 B₂ 分解导致测定结果偏低。

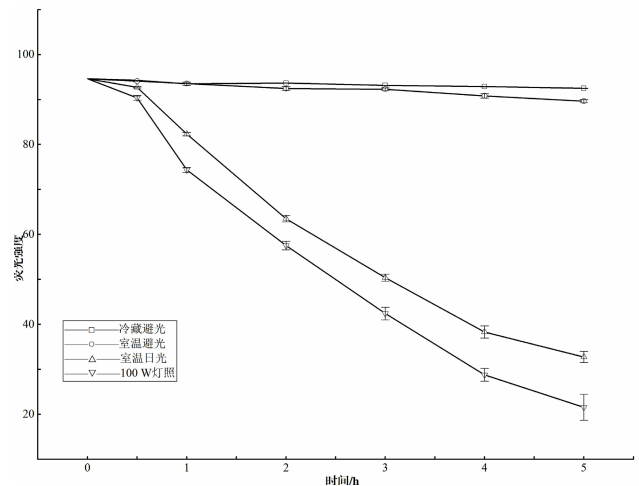


图 3 光照强度和照射时间对维生素 B₂ 影响

Fig.3 Effects of light intensity and time on vitamin B₂

2.1.4 连二亚硫酸钠用量确定

连二亚硫酸钠对维生素 B₂ 的荧光有猝灭作用。配制质量浓度为 1.000 μg/mL 的维生素 B₂ 溶液, 分别加入 0、5.0、15.0、20.0、25.0 mg 的连二亚硫酸钠, 如图 4 所示, 随着连二亚硫酸钠用量增加, 维生素 B₂ 产生的荧光响应值逐渐降低, 当加入量达到 20 mg 时, 荧光值基本降到最低, 荧光发射完全猝灭。因此使用 20 mg 连二亚硫酸钠作为猝灭剂能够满足方法要求。

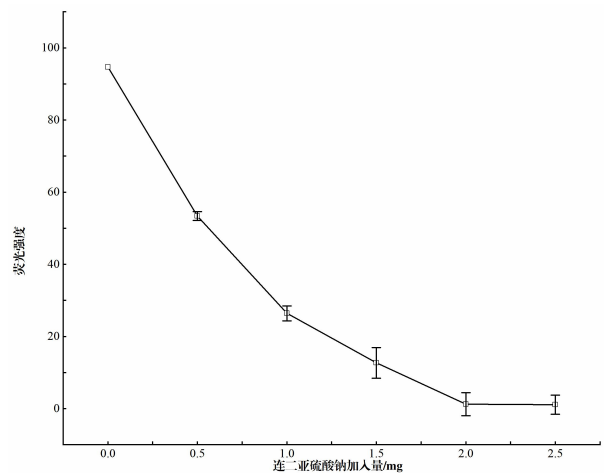


图 4 连二亚硫酸钠添加量对维生素 B₂ 影响

Fig.4 Effects of sodium bisulfite addition on vitamin B₂

2.2 方法学验证

2.2.1 线性范围

以标准系列荧光值为纵坐标 (Y), 标准液浓度为横坐标 (X), 建立标准工作曲线, 维生素 B_2 浓度在 0~10 μg 范围内与荧光强度呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y=89.503X+6.9446$, 线性相关系数为 0.9993。

2.2.2 检出限、定量限

国际纯粹与应用化学联合会将方法检出限定义为一定置信水平下检出分析物或组分的最小量或最低浓度, 在实际操作中, 通过多次空白试验 (测定次数 $n \geq 20$) 求得背景响应的标准差, 以三倍的空白标准差所对应的质量或浓度作为检出限的估计值。依据 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》, 方法的定量限按公式 $DL=3S/b$ 计算 (DL : 定量限, S : 平行测定 20 次空白值的标准偏差, b : 标准曲线斜率)。本方法当取样品量 5 g, 定容 100 mL 时, 维生素 B_2 的检出限为 0.004 mg/100 g, 定量限为 0.02 mg/100 g。

2.2.3 精密度

本研究分别以五花肉、鸡肉、猪肝、牛肾为测定对象, 每种样品平行测定 6 次, 计算维生素 B_2 的平均值和相对标准偏差, 结果如表 1 所示。根据 GB/T 27404—2008 的相关规定, 被测组分含量在 0.1 mg/100 g 和 1 mg/100 g 浓度水平, 其相对标准偏差分别要求控制在 11% 和 7.5% 以内。本方法中五花肉、鸡肉、猪肝、牛肾样品维生素 B_2 测定值的相对标准偏差分别为 3.2%、5.9%、0.4%、0.8%, 结果符合 GB/T 27404—2008 中对检测方法确认精密度的技术规范要求。

2.2.4 准确度

对五花肉、鸡肉、猪肝、牛肾 4 种样品分别进行 3 个不同浓度水平 (低、中、高) 的加标回收率实验, 数据见表 2。结果显示, 在不采用硅镁吸附剂进行过柱净化操作的情况下, 通过在 pH 6.5 的酸性条件下直接提取动物源食品中的维生素 B_2 , 检测方法回收率在 97.0%~98.2%, 回收率相对标准偏差不大于 1.1%, 回收率良好, 能够满足实际样品检测要求。

表 1 维生素 B_2 测定精密度实验结果

Table 1 Experimental results of precision measurement for vitamin B_2

样品名称	测定结果(mg/100 g)						平均值	相对标准偏差(%)
	1	2	3	4	5	6		
五花肉	0.157	0.162	0.159	0.167	0.154	0.166	0.16	3.2
鸡肉	0.089	0.091	0.096	0.083	0.095	0.085	0.09	5.9
猪肝	2.063	2.072	2.067	2.061	2.078	2.073	2.07	0.4
牛肾	0.825	0.834	0.827	0.837	0.840	0.830	0.83	0.8

表 2 维生素 B_2 测定加标回收率实验结果

Table 2 Experimental results of vitamin B_2 determination with spiked recovery rate

样品名称	试样本底值(mg/100 g)	取样量(g)	试样中维生素 B_2 含量(μg)	添加量(μg)	实测值(μg)	回收率(%)	回收率平均值(%)	相对标准偏差(%)
五花肉	0.16	5.0312	8.05	10	17.88	98.3	97.4	0.8
		5.0085	8.01	50	56.61	97.2		
		5.0204	8.03	80	85.47	96.8		
鸡肉	0.09	5.5512	5.00	10	14.78	97.8	97.9	0.2
		5.5126	4.96	50	54.01	98.1		
		5.5110	4.96	80	83.28	97.9		
猪肝	2.07	2.0213	41.84	10	51.71	98.7	98.2	0.7
		2.0112	41.63	20	61.13	97.5		
		2.0132	41.67	50	90.82	98.3		
牛肾	0.83	2.1012	17.44	10	27.06	96.2	97.0	1.1
		2.0175	16.75	30	46.18	98.1		
		2.0065	16.65	50	65.00	96.7		

3 结论

在当前食品检测领域, GB 5009.85—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B_2 的测定》中推荐的分子荧光法虽然准确,

但其操作过程复杂且效率低下, 难以满足批量检测的需求。本文在 GB 5009.85—2016 的基础上, 通过避免使用硅镁吸附剂进行过柱洗脱, 简化了操作流程。系统地探究了维生素 B_2 在检测过程中受光照强度和酸度的影响, 发现在 pH 6.5 的酸性条件下,

维生素 B₂ 的荧光特性最为显著, 荧光强度达到最大。同时, 维生素 B₂ 在光照下容易分解, 样品测定时需采用避光条件。此外, 利用连二亚硫酸钠对维生素 B₂ 荧光的猝灭作用, 以 4 种动物源性食品为例进行了测定, 方法精密度在 0.8%~5.9%, 回收率在 97.0%~98.2%, 检出限为 0.004 mg/100 g, 定量限为 0.02 mg/100 g, 均满足实验要求。结果表明, 所建方法操作简便、结果可靠、灵敏度高, 可为批量样品结果检测提供有效的参考。

参考文献

- [1] 于瑞敏, 向鸿, 曹德康, 等. 某集训部队维生素 B₂ 营养状况调查[J]. 现代预防医学, 2006, 33(01): 89-90.
- [2] 王妙云, 叶蔚云, 蒋翠萍, 等. 光黄素荧光法测定食物中的核黄素[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(03): 333-335.
- [3] 汪多仁. 核黄素的开发与应用进展[J]. 发酵科技通讯, 2008, 37(03): 21-22.
- [4] 尤甲甲. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成核黄素[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [5] 黄伟乾, 许丽珠, 王柳玲, 等. 维生素 B₂ 的定量方法—高效液相色谱法同时测定核黄素和核黄素-5'-磷酸钠的分析研究[J]. 广东化工, 2016, 43(11): 259-260, 249.
- [6] 刘秀玲, 王俐, 姜春花, 等. 硫酸素和核黄素对 H₂O₂ 诱导的 DNA 氧化损伤的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2009, 29(09): 1049-1052.
- [7] 李俊霖, 边祥雨, 姚站馨, 等. 膳食核黄素参考摄入量国内外研究进展[J]. 营养学报, 2022, 44(06): 530-533.
- [8] 翟凤英. 中国居民膳食结构与营养状况变迁的追踪研究[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [9] 丰崇福, 张克荣, 崔世勇, 等. 示波极谱法测定食品中的核黄素[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(03): 259-262.
- [10] 唐祝兴, 王巧玲. 毛细管电泳—安培检测法测定中药黄独中的四种活性成分[J]. 沈阳理工大学学报, 2010, 29(02): 40-43.
- [11] 刘双. 代谢工程改造大肠杆菌 LS02T 高产核黄素及黄素辅酶[D]. 天津: 天津大学, 2021.
- [12] 蒲玲玲, 韦京豫, 王宇平, 等. 高效液相色谱法测定肝组织中核黄素含量[J]. 中华临床营养杂志, 2009, 17(05): 231-234.
- [13] 肖坤, 袁松. 荧光分光光度法快速测定饮料中的核黄素[J]. 检测与分析杂志, 2004, (02): 47-48.
- [14] 韦京豫, 郭长江, 杨继军, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆和全血中核黄素的含量[J]. 色谱, 2003, 21(04): 375-377.
- [15] 许丽珠, 李秀英, 洗燕萍, 等. 涡旋辅助分散液液微萃取悬浮固化/高效液相色谱法测定水样中 7 种萘二酚[J]. 分析测试学报, 2015, 34(08): 923-927.
- [16] 李静, 蔡旭升, 郭倩倩, 等. HPLC 法测定维生素 B₂ 片的含量[J]. 中国医药指南, 2011, 9(18): 54-55.
- [17] 常相娜, 黄荣清, 王正平, 等. B 族维生素测定方法研究进展[J]. 科学技术与工程, 2004, 4(04): 312-316.
- [18] 杨培慧, 周志军, 冯德雄, 等. 玻碳电极吸附循环伏安法测定维生素 B₂ [J]. 暨南大学学报: 自然科学, 2001, 22(05): 93-97.
- [19] 李崇福, 张克荣, 崔世勇, 等. 示波极谱法测定食品中的核黄素[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(03): 259.
- [20] 刘红河, 涂卫东, 黎源倩. 流动注射—二极管阵列检测分光光度法测定食品中的硫酸素和核黄素[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(05): 551-552.
- [21] 罗仁才, 黄磊, 王正, 等. 光黄素荧光法测定尿中核黄素的研究[J]. 营养学报, 2004, 26(05): 74-77.
- [22] 唐祝兴, 王巧玲. 毛细管电泳—安培检测法测定中药黄独中的四种活性成分[J]. 沈阳理工大学学报, 2010, 29(02): 40-43.

作者简介



赵士聪, 助理工程师, 主要研究方向: 食品质量与安全检测。



武亭亭, 硕士, 主要研究方向: 食品质量与安全。