

## 实验技术与方法

高峰淀粉酶活性对饮料中维生素B<sub>2</sub>测定结果的影响赵佳伟<sup>1</sup>,松尾雪<sup>2</sup>,富需恒<sup>1</sup>,戴承兵<sup>1</sup>

(1. 上海市疾病预防控制中心,上海 200336;2. 上海大正力保健有限公司,上海 201804)

**摘要:**目的 调查分析高峰淀粉酶来源和酶解参数对饮料中维生素B<sub>2</sub>(核黄素-5'-磷酸钠来源)测定结果的影响。方法 按GB 5009.85—2016对受试样品中维生素B<sub>2</sub>(核黄素-5'-磷酸钠来源)的含量进行检测,考察高峰淀粉酶及其工作条件对检测结果的影响。结果 不同来源的高峰淀粉酶对维生素B<sub>2</sub>(核黄素-5'-磷酸钠来源)的实测结果有明显的差异,实测值与理论值最大相差10倍以上;前处理过程中建议选择酶解时间12 h,酶解pH值6.0~6.5。结论 国标方法检测饮料中维生素B<sub>2</sub>(核黄素-5'-磷酸钠来源)时,预先检测高峰淀粉酶的酶解活性是十分必要的。

**关键词:**维生素B<sub>2</sub>;核黄素-5'-磷酸钠;食品添加剂;高峰淀粉酶;高效液相色谱法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)07-0993-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.07.004

Effect of Taka-diastase on the detection of vitamin B<sub>2</sub> in beveragesZHAO Jiawei<sup>1</sup>, MATSUO Yuki<sup>2</sup>, FU Xuheng<sup>1</sup>, DAI Chengbing<sup>1</sup>

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China;

2. Taisho Co., Ltd. Shanghai, Shanghai 201804, China)

**Abstract: Objective** To investigate and analyze the effect of Taka-diastase used for the detection of vitamin B<sub>2</sub> (source of riboflavin-5'-sodium phosphate) on the results of the tested sample. **Methods** According to the requirements of the national standard method GB 5009.85—2016, Method One, the content of vitamin B<sub>2</sub> (source of riboflavin-5'-sodium phosphate) in the tested sample was determined to investigate the influence of Taka-diastase and its operational conditions on the quantification results. **Results** Taka-diastase from different sources had a major effect on the vitamin B<sub>2</sub> (source of riboflavin-5'-sodium phosphate) measurement results, and the maximum difference between the measured and theoretical values was more than 10 fold. The results indicated that an enzymatic hydrolysis time of 12 h, and pH 6.0—6.5 were optimal. **Conclusion** When the national standard method was used to detect vitamin B<sub>2</sub> (source of riboflavin-5'-sodium phosphate) in beverages, the selection of Taka-diastase had a significant effect on the detection results.

**Key words:** Vitamin B<sub>2</sub>; riboflavin-5'-sodium phosphate; food additives; Taka-diastase; HPLC

饮食中的B族维生素可以调理人体正常功能与代谢活动,其水平与健康成年人的记忆功能有关<sup>[1]</sup>。除了咖啡因、牛磺酸、矿物质等成分之外,B族维生素作为功效成分,也经常添加在功能性能量饮料中<sup>[2]</sup>。有报道称,短期补充B族维生素(5~12周)可以改善老年人的记忆功能<sup>[3]</sup>,在青年人测试亦发现可改善受试对象选择性注意力、审阅能力、工作记忆和主观能动性<sup>[4-5]</sup>。在食品中,维生素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>6</sub>可能以游离形式(硫胺素、核黄素、吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺)和磷酸化形式存在[主要是硫胺素焦磷

酸盐、黄素单核苷酸(Flavin mononucleotide, FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin adenine dinucleotide, FAD)和磷酸吡哆醛],维生素含量检测主要是针对游离形式开展的。

核黄素-5'-磷酸钠(分子式C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>9</sub>P·2H<sub>2</sub>O)是常用的食品添加剂成分,作为食品强化剂、食用黄色素,另外还用于医药,是维生素B<sub>2</sub>的水溶性制剂。法规规定核黄素-5'-磷酸钠中核黄素(分子式C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)含量范围是73.0%~79.0%(w/%)<sup>[6]</sup>,实际检测中通过核黄素磷酸钠的定量检测,理论换算得出样品可转化的核黄素含量。但由于每次合成核黄素磷酸钠的纯度、含水量不尽相同,转换系数无法固定,该方法检测得到的数据并不太准确。能否快速准确地对添加核黄素-5'-磷酸钠的产品进行维生素B<sub>2</sub>含量测定,对营养成分的质量控制有着极

收稿日期:2021-12-17

作者简介:赵佳伟 男 技师 研究方向为食品理化检测

E-mail:zhaojiawei@sdc.sh.cn

通信作者:戴承兵 男 主管技师 研究方向为食品理化检测

E-mail:daichengbing@sdc.sh.cn

其重要的意义。

高效液相色谱法从80年代起就是欧洲标准中检测维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>的官方方法<sup>[7]</sup>,这些方法中,特别注意选择用于从维生素B<sub>2</sub>磷酸酯中释放维生素B<sub>2</sub>的酶<sup>[8]</sup>。我国目前用于检测食品中维生素B<sub>2</sub>含量的国家标准是GB 5009.85—2016,其中,高峰淀粉酶具有磷酸酶活性,可以使磷酸化的维生素B<sub>2</sub>脱磷酸根成为游离形态。国标没有对高峰淀粉酶中磷酸酶的活性进行规定,肉类或奶粉等含有丰富磷酸化维生素B<sub>2</sub>的样品在检测时回收值不理想,但是在利用酸性磷酸酶水解样品后却能够得到令人满意的维生素B<sub>2</sub>回收值<sup>[9]</sup>。既然国标中没有使用磷酸酶,所以有必要先对高峰淀粉酶中磷酸酶的活性进行确认,再进行维生素B<sub>2</sub>检测。

本研究按照GB 5009.85—2016《食品安全国家标准 食品中维生素B<sub>2</sub>的测定》第一法的要求,考察了不同来源的高峰淀粉酶和酶孵育体系pH值、孵育时间对某功能型饮料中维生素B<sub>2</sub>检出值的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

电子天平(感量0.01 mg, Sartorius BP211D),高效液相色谱仪-荧光检测器(Agilent 1290 Infinity II), pH计(Schott Lab 870),涡旋振荡器(德国艾卡IKA Vortex 2),恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂),超纯水装置(美国密理博Millipore Milli-Q)。

一级水,临用时以超纯水系统制备,盐酸(36.0%~38.0%,分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司),冰乙酸(≥99.7%,色谱纯, TEDIA),氢氧化钠(≥96.0%,分析纯,国药集团化学试剂有限公司),三水乙酸钠(≥99.0%,分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司),甲醇(≥99.9%,色谱纯,上海柯灵斯试剂有限公司),木瓜蛋白酶(6 000 U/mg, 国药沃凯),待测高峰淀粉酶(100 U/mg, 分别来自于A、B、C、D四个公司)。

标准物质:维生素B<sub>2</sub>(分子式C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>,分子量376.36,纯度≥98%,CAS号83-88-5, Sigma-Aldrich公司),核黄素-5'-磷酸钠(分子式C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>9</sub>P,分子量478.33,纯度93.15%,CAS号130-40-5,上海阿拉丁生化科技服务有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 受试样品

市售某品牌保健饮料(配方中核黄素-5'-磷酸钠添加量:5.62 mg/100 mL,维生素B<sub>2</sub>理论含量4.11 mg/100 mL),由上海大正力保健有限公司提供。同时提供不含核黄素-5'-磷酸钠的受试样品作

为阴性样品。

#### 1.2.2 样品酶解处理

按照GB 5009.85—2016方法处理四家国内外供应商提供的高峰淀粉酶,酶解pH为6.0,置于37℃培养箱中过夜酶解18 h。

#### 1.2.3 酶解效率

取核黄素-5'-磷酸钠标准储备液用水稀释成浓度分别为1.00、5.00和10.0 mg/100 mL标准溶液。各取1.00 mL按照GB 5009.85—2016方法处理核黄素-5'-磷酸钠标准溶液,酶解pH为6.0,置于37℃培养箱中过夜酶解18 h。

使用的四种高峰淀粉酶分别来自于A、B、C、D四个公司。

酶解效率=(酶解后维生素B<sub>2</sub>含量-本底维生素B<sub>2</sub>含量)/折算核黄素含量×100%。

### 1.3 统计学分析

色谱数据分析采用仪器自带软件Agilent Chem-Station进行处理。所有线性方程、精密度及回收率试验的数据均由WPS Excel 2020处理得出。

## 2 结果

### 2.1 本底维生素B<sub>2</sub>含量的检测

取1.00 mL浓度为10.00 mg/100 mL的核黄素-5'-磷酸钠标准溶液,用水稀释至100 mL,进样测得含维生素B<sub>2</sub>6.04 μg。相应的,1.00 mL浓度分别为5 mg/100 mL和1 mg/100 mL核黄素-5'-磷酸钠标准溶液,本底维生素B<sub>2</sub>含量分别为3.02 μg和0.604 μg。

核黄素-5'-磷酸钠与维生素B<sub>2</sub>的折算系数= $\frac{376.36}{478.33}$ =0.786 8,折算后1.00 mL三种浓度的核黄素-5'-磷酸钠中维生素B<sub>2</sub>含量分别为7.87、39.34、78.68 μg。

### 2.2 不同供应商来源高峰淀粉酶对核黄素-5'-磷酸钠标准溶液的酶解效率

不同来源的高峰淀粉酶酶解核黄素-5'-磷酸钠标准溶液的能力不同,见图1。A、B两公司的高峰淀粉酶,酶解核黄素-5'-磷酸钠标准溶液的效率最高,都在90%以上。C公司的高峰淀粉酶酶解效果较差,D公司的高峰淀粉酶则几乎无法酶解核黄素-5'-磷酸钠,酶解效率仅为5%左右。

### 2.3 高峰淀粉酶在阴性样品中对核黄素-5'-磷酸钠的酶解效率

在阴性样品中添加核黄素-5'-磷酸钠标准储备液,使其浓度分别为1.00、5.00和10.00 mg/100 mL。各取1.00 mL,选择上述实验中酶解效果最好的两种

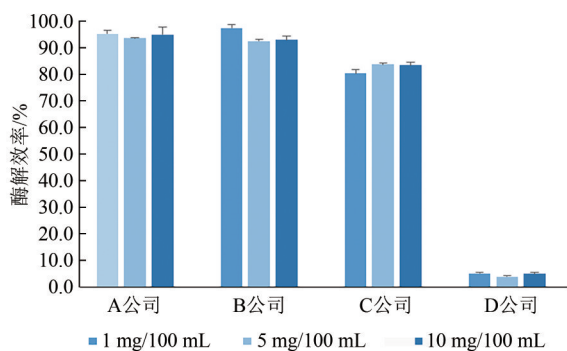


图1 不同来源的高峰淀粉酶对核黄素-5'-磷酸钠标准溶液的酶解效率

Figure 1 Enzymatic hydrolysis efficiency of different sources of Taka-diastase on riboflavin-5-sodium phosphate standard solutions

高峰淀粉酶对其进行酶解,结果见表1-2。结果表明,除去核黄素-5'-磷酸钠之外,受试样品溶液稀释体系对高峰淀粉酶的作用几乎没有影响。

表1 A公司的高峰淀粉酶在阴性样品中对核黄素-5'-磷酸钠的酶解效率

Table 1 Enzymatic hydrolysis efficiency of Taka-diastase from company A on riboflavin-5-sodium phosphate in samples

样品管编号	酶解后核黄素含量/ $\mu\text{g}$	本底核黄素含量/ $\mu\text{g}$	折算核黄素含量/ $\mu\text{g}$	酶解效率/%	平均酶解效率/%
1-1	8.43			99.5	
1-2	8.38	0.60	7.87	98.8	98.5
1-3	8.26			97.3	
2-1	42.00			99.1	
2-2	41.73	3.02	39.34	98.3	98.5
2-3	41.58			98.1	
3-1	83.41			98.3	
3-2	84.11	6.04	78.68	99.2	98.8
3-3	83.85			99.0	

表2 B公司的高峰淀粉酶在阴性样品中对核黄素-5'-磷酸钠的酶解效率

Table 2 Enzymatic hydrolysis efficiency of Taka-diastase from company B on riboflavin-5-sodium phosphate in samples

样品管编号	酶解后核黄素含量/ $\mu\text{g}$	本底核黄素含量/ $\mu\text{g}$	折算核黄素含量/ $\mu\text{g}$	酶解效率/%	平均酶解效率/%
1-1	8.40			99.1	
1-2	8.34	0.60	7.87	98.3	98.4
1-3	8.31			97.9	
2-1	41.86			98.8	
2-2	41.62	3.02	39.34	98.1	98.2
2-3	41.48			97.8	
3-1	84.02			99.1	
3-2	83.52	6.04	78.68	98.4	98.2
3-3	82.54			97.2	

#### 2.4 四家不同供应商来源高峰淀粉酶对受试样品的酶解效果

四家国内外供应商提供的高峰淀粉酶处理受试样品结果如表3、图2所示。

表3 四家不同供应商提供的高峰淀粉酶对样品的酶解效果

Table 3 Influence of Taka-diastase from four different suppliers on the recovery of riboflavin

来源	样品管编号	样品中含量/(mg/100 mL)	平均含量/(mg/100 mL)	相对标准偏差/%
A公司	1	3.77		
	2	3.73	3.73	1.21
	3	3.68		
B公司	1	3.84		
	2	3.69	3.68	4.63
	3	3.50		
C公司	1	2.82		
	2	2.88	2.82	2.13
	3	2.76		
D公司	1	0.35		
	2	0.39	0.37	5.98
	3	0.38		

由图2可知,核黄素的保留时间为4.3~4.4 min,而未被酶解的核黄素-5'-磷酸钠则在3.3 min左右出峰。A公司和B公司的高峰淀粉酶可完全酶解核黄素-5'-磷酸钠,C公司的高峰淀粉酶酶解效果较差,D公司的高峰淀粉酶则几乎无法酶解核黄素-5'-磷酸钠。实验室选择重复性更好的A公司的高峰淀粉酶进行后续实验。

#### 2.5 酶解时间的影响

GB 5009.85—2016中未规定具体酶解时间,仅叙述为“过夜酶解”。过夜酶解通常理解为酶解时间不短于12 h,因此选择12、16和18 h三种酶解时间进行对比试验,根据上述结果选择A公司的高峰淀粉酶酶解,其他实验步骤仍按照GB 5009.85—2016进行。对比酶解12、16和18 h的酶解效果,结果见图3。

结果表明,酶解12 h后,测得的维生素B<sub>2</sub>含量不再有明显变化,认为此时底物已经酶解完全,可根据日常工作时间和工作安排需要选择不少于12 h的任意酶解时间。

#### 2.6 酶解体系pH值的影响

GB 5009.85—2016中酶解pH为6.0~6.5,此范围不明确。因此对比pH 6.0和pH 6.5的酶解效果,根据上述结果选择A公司的高峰淀粉酶酶解,使用1 mol/L氢氧化钠溶液将样品分别调pH至6.0和6.5后,加入酶液,过夜酶解16 h,其他实验步骤仍按照GB 5009.85—2016进行。样品pH值分别为6.0和6.5的酶解结果见表4。

结果表明,6.0和6.5的pH值对实验结果影响较小,且精确调节pH操作较费时,因此实际操作时可自行选择6.0~6.5之间的pH值都可达到完全酶解的效果。

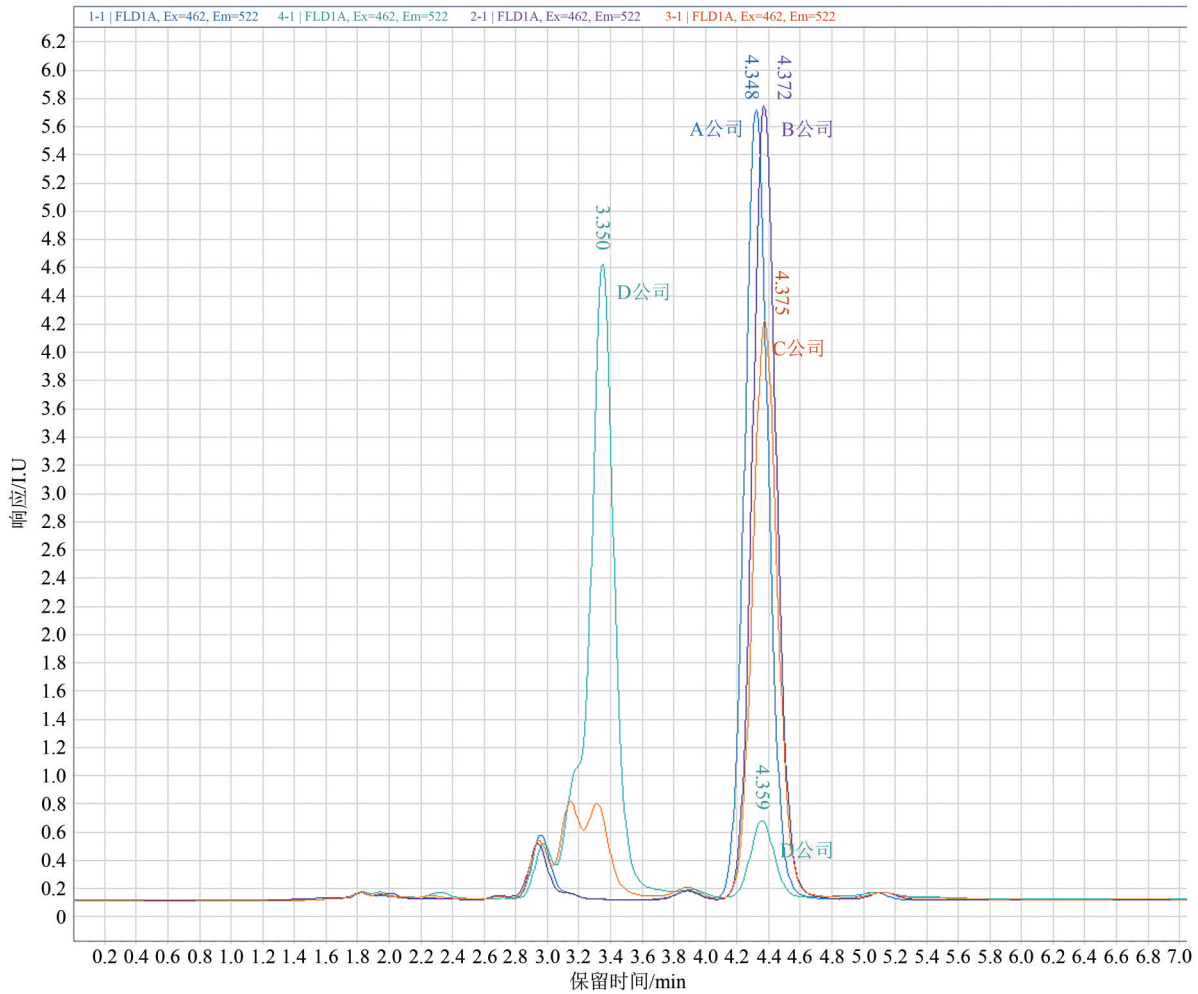


图2 四家不同供应商提供的高峰淀粉酶的酶解效果色谱图

Figure 2 Chromatograms of enzymatic hydrolysis of Taka-diastrase from four different suppliers

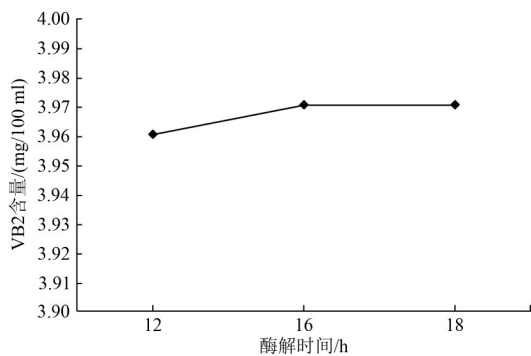


图3 不同酶解时长的酶解效果

Figure 3 Influence of enzymolysis duration on the recovery of riboflavin

表4 不同酶解pH值的酶解效果

Table 4 Influence of pH value conditions on the recovery of riboflavin

pH 值	样品管编号	进样浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	样品中 含量/ ( $\text{mg}/100\text{ mL}$ )	平均含量/ ( $\text{mg}/100\text{ mL}$ )	相对标准 偏差/%
6.0	1	0.391	3.91	3.84	1.52
	2	0.380	3.80		
	3	0.382	3.82		
6.5	1	0.378	3.78	3.75	0.96
	2	0.371	3.71		
	3	0.376	3.76		

表5 线性方程、相关系数以及斜率的相对标准偏差

Table 5 Linear equation, correlation coefficient and relative standard deviation of slope

时间/d	线性方程	$r$	斜率相对标准偏差
1	$y=157.47x+0.138\ 0$	0.999 98	1.30%
2	$y=155.85x+0.350\ 0$	0.999 97	
3	$y=158.66x+0.348\ 2$	0.999 96	
4	$y=157.40x+0.354\ 7$	0.999 96	
5	$y=155.96x+0.291\ 0$	0.999 96	
6	$y=152.83x+0.293\ 0$	0.999 99	

## 2.7 酶解参数确定后的方法学验证试验

### 2.7.1 标准曲线及相关性

将 1.2.3 配制的维生素 B<sub>2</sub> 标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中,测定相应的峰面积。以标准工作液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

分 6 d 制作的 6 条标准曲线的线性方程、相关系数  $r$  以及斜率的相对标准偏差见表 5。标准曲线

稳定性好,可满足维生素 B<sub>2</sub>测定的需求。

2.7.2 检出限、定量限

根据标准曲线最低点时维生素 B<sub>2</sub>的信噪比,配制浓度为 1 ng/mL 的维生素 B<sub>2</sub>标准溶液,进样分析其信噪比。信噪比大于 3 时的浓度为检出限,信噪比大于 10 时的浓度为定量限,结果见表 6。

表 6 标准曲线最低点时维生素 B<sub>2</sub>的信噪比

Table 6 Signal-to-noise ratio of vitamin B<sub>2</sub> at the lowest point of the standard curve

序号	浓度/(ng/mL)	信噪比(S/N)	信噪比(S/N)平均值
1	1.00	36.9	
2	1.00	37.0	36.9
3	1.00	36.7	

由此计算信噪比为 3 时,维生素 B<sub>2</sub>的浓度为 (1.00×3)/36.9=0.08 ng/mL,当取样 1.00 mL 时,按方法处理后,进样 20.0 μL 时,维生素 B<sub>2</sub>的检出限为 0.000 8 mg/100 mL,小于标准文本中规定的 0.02 mg/100 mL,满足维生素 B<sub>2</sub>测定的需求。

信噪比为 10 时,维生素 B<sub>2</sub>的浓度为(1.00×10)/36.9=0.27 ng/mL,当取样 1.00 mL 时,按方法处理后,进样 20.0 μL 时,维生素 B<sub>2</sub>的定量限为 0.0027 mg/100 mL,小于标准文本中规定的 0.05 mg/100 mL,满足维生素 B<sub>2</sub>测定的需求。

2.7.3 精密度

使用同一瓶样品取 6 份,按照 1.2.2 方法处理后,进样分析,计算 6 份样品的相对标准偏差,结果见表 7。6 次测定的相对标准偏差为 1.09%,可以满足维生素 B<sub>2</sub>测定的需求。

表 7 精密度测试结果

Table 7 Results of precisions

测定次数	取样量/mL	样品中含量/(mg/100 mL)	平均含量/(mg/100 mL)	相对标准偏差/%
1	1.00	3.74		
2	1.00	3.82		
3	1.00	3.85		
4	1.00	3.79	3.80	1.09
5	1.00	3.82		
6	1.00	3.76		

2.7.4 准确度

取精密度同一瓶样品,在 1 mL 样品中分别加入折算核黄素浓度为 100 μg/mL 的核黄素-5'-磷酸钠标准溶液 200、400 和 600 μL,混匀。每个浓度各 3 份,按照 1.2.2 方法处理后,进样分析。样品本底含量为精密度实验测得的 3.80 mg/100 mL。回收率结果见表 8。

各加标水平回收率在 90.5%~94.7% 范围内,表明该方法的准确度满足所验证样品中维生素 B<sub>2</sub>含量测定的需求。

表 8 准确度测试结果

Table 8 Results of accuracy

加标量/μg	编号	实测含量/μg	回收率%	平均回收率%
20	1	56.9	94.5	
	2	57.2	96.0	94.7
	3	56.7	93.5	
40	1	74.3	90.8	
	2	74.6	91.5	91.4
	3	74.8	92.0	
60	1	92.2	90.3	
	2	92.5	90.8	90.5
	3	92.2	90.3	

3 讨论

维生素 B<sub>2</sub>大多是以 FMN、FAD 的形式呈现,与蛋白质结合存在于食物中,于吸收前需先降解为游离形式的维生素 B<sub>2</sub>,本文目标检测物核黄素-5'-磷酸钠是 FMN 的钠盐形式,按照 GB 5009.85—2016 的方法要求,需要将其转化为游离形式后,才方便后续用高效液相色谱法或荧光分光光度法检测。饮料中添加的酸稳定性、热稳定性的核黄素-5'-磷酸钠无法通过酸处理或者加热的方法变成游离维生素 B<sub>2</sub><sup>[10]</sup>,只有发挥高峰淀粉酶中的磷酸酶活性才可将磷酸根水解,从而决定了游离维生素 B<sub>2</sub>的最终检测结果。在水溶性维生素的检测方法中,高峰淀粉酶也是常用酶之一<sup>[11]</sup>。

高峰淀粉酶是一种从曲霉属的各种霉菌真菌的菌丝和孢子中获得的酶制剂,由淀粉酶、核糖核酸酶、磷酸酶和蛋白水解酶等组成<sup>[12]</sup>。虽然具有多种酶的水解特性,但高峰淀粉酶主要还是作为淀粉酶来使用的,从其命名即可看出,其淀粉酶活性是麦芽淀粉酶活性的几倍<sup>[13]</sup>。需要注意的是,高峰淀粉酶作为淀粉酶使用时,酶的效力是足够的,但是作为磷酸酶使用时,酶的效力远不及淀粉酶那般强大。高峰淀粉酶属于一种非特异性的降解酶,重复性比较差,本身不足以完全去磷酸化<sup>[14]</sup>,而且不同来源高峰淀粉酶的磷酸酶活性差别极大,在相同活力单位下,磷酸酶活性差异有时可以达到 20 倍以上<sup>[15]</sup>。高峰淀粉酶自身的组成特点可能决定了游离核黄素的最终检测结果。

综上,高峰淀粉酶之磷酸酶活性的强弱及稳定性影响着维生素 B<sub>2</sub>的检测,尤其对于那些含有高水平 FMN 的检测样品,实际检出结果容易与理论值产生较大的差异。本文遵循国标方法规定,高峰淀粉酶的法、用量是固定的,该酶自身磷酸酶活性的强弱及稳定性就对检测结果起到了至关重要的作用,需要在使用之前先考察该酶之磷酸酶活性。结果可以看出,不同来源的高峰淀粉酶,酶解核黄素-5'-磷酸钠的效率不同,而这种酶解效率的差异

直接导致了维生素 B<sub>2</sub> 检测结果的差异。通过使用不同供应商来源的高峰淀粉酶对添加核黄素-5'-磷酸钠的同一样品进行处理后,测得的维生素 B<sub>2</sub> 的含量差异很大,最低检出值(0.37 mg/100 mL)仅为最高检出值(3.73 mg/100 mL)的十分之一,与理论值更是相差 10 倍以上。由此可见,在利用高峰淀粉酶检测含有核黄素-5'-磷酸钠的样品之前,需要先确定其酶解磷酸根的能力。推荐通过酶解核黄素-5'-磷酸钠标准品的方法确定可用来源的酶,因为标准溶液酶解结果(图 1)所显示的酶活差异,与饮料样品维生素 B<sub>2</sub> 检测结果(表 2)的差异一致(A、B 公司来源的酶酶解效率最佳,C、D 公司来源的酶酶解效率欠佳)。

D 公司供应的高峰淀粉酶标注的淀粉酶活力最强,推测其制备工艺含有淀粉酶的纯化流程,而纯化过程可能使磷酸酶的活性减弱,从而使该酶处理过的受试样品中维生素 B<sub>2</sub> 的检出率最低。此外,若国标方法中的工具酶添加磷酸酶一项,也可以有效保证各色样品中维生素 B<sub>2</sub> 检出率的稳定性,但是磷酸酶的价格昂贵,如此会大大提高检测的成本。此外,受试饮料中不含有蛋白质,此处运用的木瓜蛋白酶没有起到酶解功效,反而可能影响高峰淀粉酶的活性,比如 D 公司供应的高峰淀粉酶中恰好含有木瓜蛋白酶的水解基因,因为功能区域被酶解而活性降低,以至于维生素 B<sub>2</sub> 的检出率最低,这个需要进一步的实验加以验证。关于木瓜蛋白酶的影响,意大利科学家<sup>[16]</sup>曾发现,检测凤尾鱼中的维生素 B<sub>2</sub> 时,单纯用高峰淀粉酶的检测结果显示比使用高峰淀粉酶加木瓜蛋白酶的结果要好。

本项研究仅检测了一种功能型饮料,是因为它十分具有代表性:在诸多添加了 B 族维生素的保健功能饮料中,目前仅有它以核黄素-5'-磷酸钠(并非直接添加核黄素)作为维生素 B<sub>2</sub> 的来源。以它作为受试样品并由此引发的对国标方法的探讨,对于肉类、乳制品等天然来源的富含维生素 B<sub>2</sub> 磷酸盐的样品而言,是十分必要和有意义的。在 2018 年,同样参考国标方法,中国疾控系统对乳制品中维生素 B<sub>2</sub> 进行质控考核结果分析,17 家参加实验室中,有 13 家测得值低于指定值,还有 4 家低于允许偏差范围<sup>[17]</sup>,本项研究结果也为这类样品中维生素 B<sub>2</sub> 的检出率提供了探索依据。

对于富含核黄素磷酸盐的样品,高峰淀粉酶影响维生素 B<sub>2</sub> 检出结果的准确性,建议在用国标方法检测时,先考察所使用的高峰淀粉酶对核黄素-5'-磷酸钠标准溶液的酶解能力,确定高峰淀粉酶活性能否满足酶解磷酸根的需求,以确保检测结果的准

确性。

## 参考文献

- [1] BRYAN J, CALVARESI E. Associations between dietary intake of folate and vitamins B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> and self-reported cognitive function and psychological well-being in Australian men and women in midlife[J]. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2004, 8(4): 226-232.
- [2] 许戴佳. 5 品牌维生素添加超适宜摄入量[J]. *消费者报道*, 2014, (5): 27-28.  
XU D J. 5 brand vitamins are added to the super-suitable intake [J]. *China Consumer Reports*, 2014, (5): 27-28.
- [3] DEIJEN J B, VAN DER BEEK E J, ORLEBEKE J F, et al. Vitamin B<sub>6</sub> supplementation in elderly men: Effects on mood, memory, performance and mental effort[J]. *Psychopharmacology*, 1992, 109(4): 489-496.
- [4] HASKELL C F, ROBERTSON B, JONES E, et al. Effects of a multi-vitamin/mineral supplement on cognitive function and fatigue during extended multi-tasking[J]. *Human Psychopharmacology*, 2010, 25(6): 448-461.
- [5] BRYAN J, CALVARESI E, HUGHES D. Short-term folate, vitamin B-12 or vitamin B-6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(6): 1345-1356.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品添加剂 核黄素 5'-磷酸钠: GB 28301—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard-Food additive- Riboflavin-5'-sodium phosphate GB 28301—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [7] ARELLA F, LAHÉLY S, BOURGUIGNON J B, et al. Liquid chromatographic determination of vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in foods [J]. A collaborative study. *Food Chemistry*, 1996, 56(1): 81-86.
- [8] RIZZOLO A, POLESSELLO S. Chromatographic determination of vitamins in foods[J]. *Journal of Chromatography A*, 1992, 624 (1-2): 103-152.
- [9] TANG X, CRONIN D A, BRUNTON N P. A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(8): 831-837.
- [10] HEVAVITHARANA A K. Method for the extraction of riboflavin for high-performance liquid chromatography and application to casein[J]. *The Analyst*, 1996, 121(11): 1671-1676.
- [11] FATIMA Z, JIN X Z, ZOU Y L, et al. Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins [J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1606: 360245.
- [13] RUSHIZKY G W, SOBER H A. Studies on the specificity of ribonuclease T<sub>2</sub>[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238 (1): 371-376.
- [14] SYKES M, CROUCHER J, SMITH R A. Proficiency testing has improved the quality of data of total vitamin B<sub>2</sub> analysis in liquid dietary supplement[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 400(1): 305-310.
- [15] NDAW S, BERGAENTZLE M, AOUDE-WERNER D. Extraction

- procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B<sub>6</sub> in foodstuffs [J]. Food Chemistry, 2000, 71(1): 129-138.
- [16] CAPRIOLI G, SAGRATINI G, VITTORI S, et al. Optimization of an extraction procedure for the simultaneous quantification of riboflavin, nicotinamide and nicotinic acid in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 66: 23-29.
- [17] 孙丽翠, 杜玉萍, 张雪松, 等. 中国疾控系统乳制品中维生素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>质控考核结果分析[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(11): 1552-1555.
- SUN L C, DU Y P, ZHANG X S, et al. Quality control assessment on detections of vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in dairy products for laboratories in disease prevention and control institutions in China [J]. Chinese Journal of Public Health, 2018, 34(11): 1552-1555.

## 《中国食品卫生杂志》顾问及第五届编委会名单

顾 问: 陈君石、黄璐琦、江桂斌、李林、沈建忠、吴清平、Jianghong Meng(美国)、Patrick Wall(爱尔兰)、Samuel Godefroy(加拿大)、Gerald Moy(美国)、Paul Brent(澳大利亚)、Marta Hugas(比利时)、Yukikko Yamada(日本)、Tom Heilandt(德国)、Andreas Hensel(德国)、Christopher Elliott(英国)、Christine Nelleman(丹麦)

主任委员: 卢江

副主任委员: 王竹天、李宁、孙长颢、王涛、谢剑炜、应浩、丁钢强、张峰、张永慧

主 编: 吴永宁

编 委(按姓氏笔画排序)

- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| 丁钢强(中国疾病预防控制中心营养与健康所)  | 应 浩(中国科学院上海营养与健康所)    |
| 于 洲(国家食品安全风险评估中心)      | 张 丁(河南省疾病预防控制中心)      |
| 于维森(青岛市疾病预防控制中心)       | 张 峰(中国检验检疫科学研究院)      |
| 马 宁(国家食品安全风险评估中心)      | 张卫兵(南通市疾病预防控制中心)      |
| 马会来(中国疾病预防控制中心)        | 张立实(四川大学华西公共卫生学院)     |
| 马群飞(福建省疾病预防控制中心)       | 张永慧(广东省疾病预防控制中心)      |
| 王 君(国家食品安全风险评估中心)      | 张旭东(国家卫生健康委员会医院管理研究所) |
| 王 茵(浙江省医学科学院)          | 张剑峰(黑龙江省疾病预防控制中心)     |
| 王 涛(浙江清华长三角研究院)        | 张朝晖(中国海关科学技术研究中心)     |
| 王 硕(南开大学医学院)           | 张惠媛(中国海关科学技术研究中心)     |
| 王 慧(上海交通大学公共卫生学院)      | 张遵真(四川大学华西公共卫生学院)     |
| 王永芳(国家卫生健康委员会卫生健康监督中心) | 陈 波(湖南师范大学化学化工学院)     |
| 王竹天(国家食品安全风险评估中心)      | 陈 颖(中国检验检疫科学研究院)      |
| 王松雪(国家粮食和物资储备局科学研究院)   | 陈卫东(广东省市场监督管理局)       |
| 王晓英(中国动物疫病预防控制中心)      | 邵 兵(北京市疾病预防控制中心)      |
| 计 融(国家食品安全风险评估中心)      | 武爱波(中国科学院上海营养与健康所)    |
| 邓小玲(广东省疾病预防控制中心)       | 赵 舰(重庆市疾病预防控制中心)      |
| 卢 江(国家食品安全风险评估中心)      | 赵云峰(国家食品安全风险评估中心)     |
| 匡 华(江南大学食品学院)          | 赵贵明(中国检验检疫科学研究院)      |
| 朱心强(浙江大学医学院)           | 钟 凯(科信食品与营养信息交流中心)    |

(下转第1020页)