

婴幼儿配方乳粉中维生素 B₁ 前处理方法的优化及评估

吕晨, 郭恒, 姜连阁*

(黑龙江省药品检验研究中心, 哈尔滨 150000)

摘要: **目的** 优化维生素 B₁ 测定中酸水解过程, 评估酶解过程所用酶的种类。 **方法** 对样品分别用高压灭菌和沸水浴 2 种方法进行水解, 比较 2 种方法测得的维生素 B₁ 含量; 并在酶解时对加入酶的种类进行考察, 评估对检测结果的影响。 **结果** 2 种水解方法的测定结果无显著性差异, 方法回收率为 86.0%~94.6%; 加入酸性磷酸酶会导致维生素 B₁ 含量明显降低。 **结论** 沸水浴法可用于维生素 B₁ 的含量测定, 方法快速、可批量检测。酶解过程中酸性磷酸酶的加入对实验结果影响的评估也对日后进行多种维生素检测方法的整合提供了技术参考。

关键词: 维生素 B₁; 婴幼儿配方乳粉; 水解; 酶解

Optimization and evaluation of the pretreatment conditions of vitamin B₁ in infant formula milk powder

LV Chen, GUO Heng, JIANG Lian-Ge*

(Heilongjiang Institute for Drug control, Harbin 150000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the acid hydrolysis process in vitamin B₁ determination and to evaluate the type of enzyme used in the enzymatic hydrolysis process. **Methods** The samples were hydrolyzed by high pressure sterilization and boiling water bath respectively and the content of vitamin B₁ measured by the two methods was compared. During the enzymatic hydrolysis, the types of enzymes added were investigated and the influence on the detection results was evaluated. **Results** There was no significant difference between the results of the two hydrolysis methods, and the method recovery rate was 86.0%–94.6%. The addition of acid phosphatase resulted in a significant decrease in vitamin B₁ content. **Conclusion** The boiling water bath method can be used for the determination of vitamin B₁ content, and the method is rapid and can be used for batch detection. The evaluation of the effect of acid phosphatase addition on the experimental results during the enzymatic hydrolysis also provided a technical reference for the integration of multi-vitamin detection methods in the future.

KEY WORDS: vitamin B₁; infant formula milk powder; hydrolysis; enzymatic hydrolysis

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1601904-02)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFC1601904-02)

*通信作者: 姜连阁, 主任药师, 主要研究方向为食品及相关产品检测。E-mail: jiangliange@sina.com

*Corresponding author: JIANG Lian-Ge, Chief Pharmacist, Heilongjiang Institute for Drug Control, No.149, Dongdazhi Street, Nangang District, Harbin 150000, China. E-mail: jiangliange@sina.com

0 引言

维生素 B₁ 又称硫胺素(C₁₂H₁₆N₄OS·HCl), 是一种由嘧啶环和噻唑环通过亚甲基结合而成的水溶性维生素, 为白色结晶或结晶性粉末, 常存在于谷物、畜禽肉、豆制品中^[1-2]。维生素 B₁ 在人体生长发育过程中起着非常重要的作用, 通常以辅酶的形式参与糖的分解代谢, 并有保护神经系统的作用^[3-4], 还能促进肠胃蠕动、增加食欲、促进成长^[5]。维生素 B₁ 无法自身主动合成, 只能从日常饮食中摄取, 故成为婴幼儿喂养阶段配方奶粉必须添加的营养成分之一^[6]。因此, 测定婴幼儿配方乳粉中维生素 B₁ 的含量非常重要。

目前, 维生素 B₁ 的检测方法主要有荧光分光光度法^[7-8]、高效液相色谱法^[9-13]、液相色谱串联质谱法^[14-15]等, 其中, 以高效液相色谱法最为常用。以 GB 5009.84—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B₁ 的测定》^[16]为例, 样品需经过水解、中和、酶解、衍生化等步骤后, 进行检测。其中水解的过程, 是在高压灭菌锅中进行, 考虑到高压灭菌锅属于高压仪器, 需要专业人员进行操作, 且升温降温时间较长, 不便于提高实验效率及批量检验。因此, 本研究对样品进行沸水浴水解的方法, 并与高压灭菌水解方法的提取效果做对比, 对前处理方法中水解过程进行了优化, 使其能够更加快速、批量的进行检测。在日常检验过程中, 本研究发现按照国标方法, 维生素 B₁ 与维生素 B₂ 的前处理方法可以整合, 以达到提高检测效率的目的。但在一些婴配粉中, 会加入核黄素磷酸盐作为维生素 B₂ 的营养强化剂, 此时在前处理的酶解过程中需加入酸性磷酸酶, 因此, 本研究还考察了酸性磷酸酶对维生素 B₁ 测定结果的影响, 以期对日后不同的婴配粉基质中多种维生素检测方法的整合提供技术参考。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪配荧光检测器(美国安捷伦公司); Waters Symmetry[®]C₁₈ 色谱柱(美国 Waters 公司); ML3002 电子天平(瑞士梅特勒公司); 电热板(德国 IKA 公司); 恒温水浴摇床(德国 GFL 公司)。

维生素 B₁ 标准品(盐酸硫胺素, 纯度: 97%, 中国食品药品检定研究院)。

甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 淀粉酶(酶活 1500 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活 1500~10000 U/g)、酸性磷酸酶(酶活 500~3000 U/g)(美国 Sigma 公司); 盐酸、铁氰化钾、氢氧化钠、无水乙酸钠、冰乙酸、正丁醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

婴幼儿配方乳粉及普通乳粉购于哈尔滨某超市。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

维生素 B₁ 标准储备液的配制: 称取 0.01156 g 盐酸硫胺素标准品(纯度 97%)于 50 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol/L 盐酸溶解并定容至刻度, 配制成为 224.26 μg/mL 的盐酸硫胺素标准储备液, 相当于硫胺素浓度为 200.0 μg/mL。

盐酸溶液(0.1 mol/L): 吸取 8.5 mL 盐酸, 加水稀释至 1000 mL, 摇匀。

碱性铁氰化钾溶液: 将 5 mL 铁氰化钾溶液(质量浓度为 20 g/L)与 200 mL 氢氧化钠溶液(100 g/L)混合, 摇匀。

乙酸钠溶液(0.05 mol/L): 称取 6.80 g 乙酸钠, 加 900 mL 水溶解, 用冰乙酸调节 pH 到 4.0~5.0 之间, 加水定容至 1000 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后使用。

混合酶溶液 1: 称取 1.76 g 木瓜蛋白酶、1.27 g 淀粉酶, 加水定容至 50 mL, 涡旋, 使呈混悬状液体, 冷藏保存。

混合酶溶液 2: 称取 1.76 g 木瓜蛋白酶、1.27 g 淀粉酶、1 g 酸性磷酸酶, 加水定容至 50 mL, 涡旋, 使呈混悬状液体, 冷藏保存。

1.2.2 样品前处理

①试液提取

称取 4 g(精确至 0.01 g)试样于 250 mL 锥形瓶中, 加入 60 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液, 摇匀, 塞上软制塞子, 进行酸水解过程。其中沸水浴法用电热板加热至水沸腾, 将样品放入其中保持 30 min, 高压灭菌法是将样品放入高压灭菌锅中 121 °C 保持 30 min。水解结束后待冷却后, 用 pH 计指示, 用 2.0 mol/L 乙酸钠溶液调节 pH 至 4.0 左右, 加入 2.0 mL 混合酶溶液, 摇匀后, 置于 37 °C 恒温水浴酶解过夜。将酶解液全部转移至 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 过滤, 取上清液备用。

②试液衍生化

吸取 2 mL 滤液于 15 mL 离心管中, 加入 1 mL 碱性铁氰化钾溶液, 混匀后, 加入 2 mL 正丁醇, 涡旋混匀后静置分层, 吸取正丁醇相, 经 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 滤液进样分析。

另取 2 mL 标准工作液, 与试液同步进行衍生化。

1.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry[®]C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 乙酸钠: 甲醇=65:35(V/V); 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C; 荧光检测器检测波长: 激发波长: 375 nm, 发射波长: 435 nm。

1.2.4 统计学分析

用 SPSS 软件进行统计学分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著; $P > 0.05$, 差异不显著。

2 结果与分析

2.1 方法的标准曲线线性范围

配制质量浓度分别为: 0.05、0.1、0.2、0.5、1 μg/mL 的维生素 B₁ 标准工作液, 按照 1.2.2 的方法衍生化后, 用高效液相色谱进行分析, 以浓度-峰面积绘制标准曲线, 方程为: $Y=31.159X+0.2408$, 线性回归系数为: 0.9995。结果表明, 在 0.05~1 μg/mL 的测定范围内, 测得的峰面积与浓度呈良好的线性关系。标准曲线见图 1。

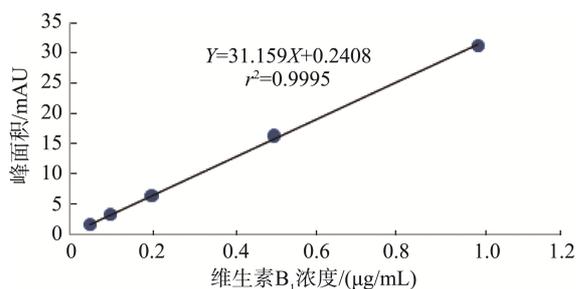


图1 方法标准曲线

Fig.1 Standard curve of the method

2.2 水解条件的优化

本研究选取 2 组样品, 其中一组样品于高压灭菌锅中 121 °C 保持 30 min 进行水解, 另一组置于沸水浴中水解 30 min, 测定维生素 B₁ 的含量, 结果见表 1。同时以普通乳粉为基质, 在 0.15 和 0.4 μg/mL 2 个水平加标浓度下进行回收率的测定, 结果见表 2。

表 1 2 种水解方法测得的样品中维生素 B₁ 的含量(mg/100 g)
Table 1 The content of vitamin B₁ in samples by the two hydrolysis(mg/100 g)

| 样品 | 国标方法测定量 | 沸水浴测定量 |
|-------|---------|--------|
| 1 | 1.037 | 1.174 |
| 2 | 1.063 | 1.146 |
| 3 | 1.060 | 1.076 |
| 4 | 1.047 | 1.077 |
| 5 | 1.072 | 1.066 |
| 平均值 | 1.056 | 1.108 |
| RSD/% | 1.31 | 4.41 |

结果显示: 利用沸水浴水解 30 min 测得的样品中维生素 B₁ 的含量与国标方法基本一致, 经统计学分析, 2 种方法测得的维生素 B₁ 的含量无显著性差异($F=5.245$,

$P=0.051$)。平行样品间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 5, 且经优化的方法, 2 个水平维生素 B₁ 回收率分别为: 96.3%和 91.4%, 可以满足实验需求。

表 2 2 种水解方法测得的维生素 B₁ 回收率(%)
Table 2 The recovery of vitamin B₁ in the two hydrolysis(%)

| 加标浓度/(μg/mL) | 高压灭菌水解 | 沸水浴 |
|--------------|--------|------|
| 0.15 | 90.1 | 96.3 |
| 0.40 | 84.3 | 91.4 |

2.3 方法回收率的测定

按照优化好的方法, 以普通乳粉作为基质, 分别做 0.05、0.1、0.2 μg/mL 3 个加标浓度水平的回收率, 每个水平做 3 个平行。测得此方法的回收率为: 86.0%~94.6%, 满足实验需求, 结果见表 3。

表 3 方法回收率
Table 3 The recovery of the method

| 添加浓度/(μg/mL) | 平均回收率/% | RSD/% |
|--------------|---------|-------|
| 0.05 | 94.6 | 0.11 |
| 0.1 | 86.0 | 0.94 |
| 0.2 | 93.9 | 4.11 |

2.4 酶解条件的评估

本研究测定了市售 2 种婴幼儿配方乳粉, 并将婴幼儿配方乳粉样品分为 2 组, 其中一组加入淀粉酶、木瓜蛋白酶、酸性磷酸酶; 另一组仅加入淀粉酶和木瓜蛋白酶。分别测定 2 组样品维生素 B₁ 的含量, 每个样品做 4 个平行, 同时以普通乳粉为基质, 测定 2 种混合酶存在的情况下的回收率。样品的测定结果见表 4, 回收率测定结果见表 5。

结果显示: 在酶解时加入酸性磷酸酶, 2 种乳粉样品测得的样品中维生素 B₁ 含量明显偏低, 并且平行测定结果显示, 多个样品之间的标准偏差较大, 分别为 19.3%和 16.5%; 说明在酸性磷酸酶存在的情况下, 维生素 B₁ 可能会发生降解, 并且多个样品测出的数值标准偏差较大, 说明维生素 B₁ 的降解程度不同。同时, 回收率实验显示, 加入酸性磷酸酶后, 维生素 B₁ 的回收率仅为 40.3%~54.6%, 无法满足实验要求; 而酶解时未加酸性磷酸酶的样品回收率为 88.1%~95.1%, 满足实验要求。由此可见, 酸性磷酸酶可能会导致维生素 B₁ 大幅度的降解, 因此, 在测定维生素 B₁ 时, 应避免酸性磷酸酶的引入。

表 4 2 种酶解方法测得的样品中的维生素 B₁ 含量(mg/100 g)
Table 4 The content of vitamin B₁ in the samples by the two enzymatic methods(mg/100 g)

| 样品 | 酶解方式 | 1 | 2 | 3 | 4 | 平均值 | RSD/% |
|------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 样品 1 | 加入酸性磷酸酶 | 0.1887 | 0.1542 | 0.1249 | 0.1312 | 0.1498 | 19.3 |
| | 未加酸性磷酸酶 | 0.5212 | 0.5188 | 0.5290 | 0.5133 | 0.5206 | 1.25 |
| 样品 2 | 加入酸性磷酸酶 | 0.0303 | 0.0288 | 0.0323 | 0.0216 | 0.0282 | 16.5 |
| | 未加酸性磷酸酶 | 0.7522 | 0.7436 | 0.7572 | 0.7457 | 0.7500 | 0.83 |

表 5 2 种酶解方法测得的维生素 B₁ 回收率
Table 5 The recovery of vitamin B₁ by the two enzymatic methods

| 加标浓度/(μg/mL) | 加入酸性磷酸酶回收率/% | 未加酸性磷酸酶回收率/% |
|--------------|--------------|--------------|
| 0.2 | 40.3 | 88.1 |
| 0.3 | 54.6 | 95.1 |
| 平均回收率/% | 47.5 | 91.6 |

3 结论与讨论

本研究利用沸水浴水解方法代替高压灭菌水解,测得的维生素 B₁ 含量与国标方法无显著性差异,经过优化后的方法可以有效地缩短水解时间,实现批量检测,也避免了高压灭菌锅必须由专人进行操作而带来的不便,大大的提高了检测效率,且方法回收率为 86.0%~94.6%,满足实验要求,可以用于日常检验中。

由于国标方法维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的前处理方法相同,因此在日常检验中,可以将两者整合,但对于部分婴配粉,维生素 B₂ 是以核黄素磷酸盐作为营养强化剂加入的,此时前处理需要加入酸性磷酸酶进行酶解,因此本研究考察了酸性磷酸酶的加入对维生素 B₁ 含量的影响,结果显示酸性磷酸酶会导致维生素 B₁ 不同程度的降解。因此,若在日常检验中,对于以核黄素磷酸盐形式添加的婴配粉,需要加入酸性磷酸酶酶解时,建议检测 2 种维生素时,应避免在前处理过程进行整合,以保证维生素 B₁ 测定结果的准确。此研究结果也为日后多种维生素检测方法的整合提供了技术参考。

参考文献

- 王帅帅. HPLC 法快速测定婴幼儿配方奶粉中维生素 B₁ [J]. 食品工业, 2017, 38(4): 304-306.
WANG SS. Study on rapid determination of vitamin B₁ in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. Food Ind, 2017, 38(4): 304-306.
- 王柳玲, 黄伟乾, 吴国辉, 等. 高效液相色谱-荧光法与高效液相色谱-二极管阵列法测定食品中维生素 B₁ 含量的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1007-1012.
WANG LL, HUANG WQ, WU GH, *et al.* Comparison of the determination of vitamin B₁ content in the food by high performance liquid chromatography -fluorescence method and high performance liquid chromatography-diode array method [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(5): 1007-1012.
- PAUL J, THORNALLEY. The potential role of thiamine(vitamin B₁) in diabetic complications [J]. Curr Diabetes Rev, 2005, (1): 287-298.
- JACK R, COOPER, JONATHAN H. The role of thiamine in nervous tissue [J]. Neurochem Res, 1979, (4): 223-239.
- 陆瑞芳. 水溶性维生素的生理作用和需求[J]. 上海医药, 1994, (11): 17-18.
LU RF. Physiological function and requirement of water soluble vitamins [J]. Shanghai Med Pharm J, 1994, (11): 17-18.
- STROHM D, BECHTHOLD A, ISIK N, *et al.* Revised reference values for the intake of thiamin(vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂) and niacin [J]. Nfs J, 2016, 3(C): 20-24.
- 王益林, 韦月早, 莫利书, 等. 荧光光度法测定花生和黄豆中的维生素 B₁ [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2009, 34(1): 60-62, 72.
WANG YL, WEI YZ, MO LS, *et al.* Fluorimetric determination of vitamin B₁ in peanut and soybean [J]. J Guangxi Univ: Nat Sci Ed, 2009, 34(1): 60-62, 72.
- 黄旭, 贾宏新, 李辉. 荧光分光光度法测定营养素补充剂中硫胺素含量的测量不确定度评定[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 174-178.
HUANG X, JIA HX, LI H. Evaluation of the uncertainty of measurement for determination of thiamine content in nutritional supplements by fluorescence spectrophotometry [J]. Food Sci, 2015, 36(10): 174-178.
- 傅红雪, 陈万勤, 刘柱, 等. 3 种前处理-HPLC 法测定婴幼儿配方食品中维生素 B₁ [J]. 食品工业, 2020, 41(4): 281-284.
FU HX, CHEN WQ, LIU Z, *et al.* Comparative study on 3 pretreatment methods for HPLC determination of vitamin B₁ in formula foods for infants and young children [J]. Food Ind, 2020, 41(4): 281-284.
- 张隆龙, 王海燕, 胡越, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中的维生素 B₁、维生素 B₂ [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 129-134.
ZHANG LL, WANG HY, HU Y, *et al.* Determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in infant milk powder by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 129-134.
- 陈曦娟. 反相高效液相色谱法检测维生素 B₁ 片中维生素 B₁ 含量的分析[J]. 内蒙古医学杂志, 2018, 50(11): 1281-1283.
CHEN XJ. Determination of vitamin B₁ in vitamin B₁ tablets by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Inner Mongol Med J, 2018, 50(11): 1281-1283.
- 刘正, 刘亚兵, 李婧, 等. 高效液相色谱法测定配方奶粉和乳饮料中维生素 B₁、B₂ 的研究[J]. 农业科技与信息, 2018, (23): 46-48, 54.

- LIU Z, LIU YB, LI J, *et al.* Determination of vitamin B₁ and B₂ in formula milk powder and milk beverage by HPLC [J]. *Agric Sci Technol Inform*, 2018, (23): 46–48, 54.
- [13] 黄伟志, 黄桂东, 钟先锋. 高效液相色谱法测定功能性饮料中维生素B₁、维生素B₂含量[J]. *食品研究与开发*, 2019, (24): 191–197.
- HUANG WZ, HUANG GD, ZHONG XF. Determination of vitamins B₁ and vitamins B₂ in energy drinks by high performance liquid chromatography [J]. *Food Res Dev*, 2019, (24): 191–197.
- [14] 陶保华, 黄焘, 赖世云, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法同时测定人乳中的硫胺素、核黄素、烟酰胺、泛酸和吡哆醛[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(7): 2087–2094.
- TAO BH, HUANG T, LAI SY, *et al.* Determination of thiamin, riboflavin, nicotinamide, pantothenic acid and pyridoxal in human milk by UPLC-MS/MS [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(7): 2087–2094.
- [15] 莫彩娜, 杨曦, 黄智成. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定配合饲料中维生素B₁和维生素B₂[J]. *理化检验-化学分册*, 2015, (9): 1316–1319.
- MO CN, YANG X, HUANG ZC. Simultaneous determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in compound feedstuff by HPLC-MS/MS [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2015, (9): 1316–1319.
- [16] GB/T 5009.84—2016 食品安全国家标准 食品中维生素B₁的测定[S].
GB/T 5009.84—2016 National food safety standard-Determination of vitamin B₁ in food [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介

吕晨, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测。

E-mail: lvchen198763@163.com

姜连阁, 主任药师, 主要研究方向为食品及相关产品检测。

E-mail: jiangliange@sina.com