



SPE-HPLC法检测婴幼儿配方乳粉中生物素的质量分数

商允鹏^{1a}, 张志国², 韩建春^{1a}, 生庆海^{1b}

(1. 东北农业大学 a. 食品学院; b. 国家乳业工程技术研究中心, 哈尔滨 150030; 2. 河北省乳业工程技术研究中心, 石家庄 050071)

摘要:建立了灵敏有效的测定婴幼儿配方乳粉中生物素质量分数的方法,用盐酸在超声波条件下除去蛋白质提取出生物素后,使用HyperSep C18固相萃取柱进行纯化、浓缩。采用荧光检测器,柱前PDAM衍生剂衍生,色谱柱为BDS HYPERSIL C18(250×4.6 mm i.d. 5 μm),柱温为50℃,检测波长:Ex为340 nm,Em为395 nm。流动相流速1 mL/min。标准曲线相关系数为0.9996;回收率为83.0%~101.5%之间;7次样品测定SD为0.45,RSD为2.35%。

关键词:生物素;固相萃取;反相高效液相色谱;婴幼儿配方乳粉

中图分类号:TS252.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-2230(2009)02-0053-04

Determination of biotin in infant formula milk powder by SPE-HPLC

SHANG Yun-peng^{1a}, ZHANG Zhi-guo², HAN Jian-chun^{1a}, SHENG Qing-hai^{1b}

(1. Northeast Agricultural University a. The Food Science and Engineering; b. National Dairy Engineering & Technology Research Center, Harbin 150030, China; 2. Hebei Dairy Engineering and Technology Research Center, Shijiazhuang 050071, China)

Abstract: A sensitive and reliable method was developed for the determination of biotin in infant formula milk powder. HCl was added into infant formula milk powder to move protein in ultrasonic wave condition and after solid-phase extraction (SPE) clean-up and concentration with HyperSep C18. Fluorescence detector, BDS HYPERSIL C18 (250×4.6 mm i.d. 5 μm) column and derivation pre-column was used PDAM with column temperature 50 °C, was measured fluorometrically at the excitation and fluorescence wavelengths of 340 and 395 nm and speed of mobile phase 1.0 mL/min. The relative coefficient was 0.9996, the recovery 83.0%~101.5%; the SD in 7 samples by testing was 0.45 and RSD=2.35%.

Key words: biotin; solid phase extraction; RP-HPLC; infant formula milk powder

0 引言

生物素(biotin)又称维生素B7,维生素H,作为羧化、脱羧和脱氢反应酶系的辅助因子,参与机体三大营养物质的代谢,是动物机体不可缺少的重要的营养物质^[1]。它是一种环状有如尿素的化学物质,具有一硫酚(Thiophene)的结构环,此种化学物质有八种同分异构体,但也只有右旋生物素(d-biotin)存在于自然界中,具有维生素的功能^[2]。

目前,检测生物素普遍采用微生物法,它是通过植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)生长状况来测定

游离生物素的质量分数。化学方法国外已有报道,如生物素与4-二甲基-氨基肉桂醛反应或被碘酸钾氧化后,经紫外分光光度计测定生物素的质量分数^[3,4]。近几年,高效液相色谱法也逐步发展起来,国内、外也有相关报道。目前最好的液相检测方法有液-质联用技术(LC-MS-ESI)^[5,6]和荧光检测技术等。通常所用的衍生剂有4-溴-甲基-7-甲氧基香豆素^[7],OPA^[8],2-硝基苯胍^[9]等。本研究选用了稳定性好的苈基重氮甲烷(PDAM)作为衍生剂^[10]。同时针对婴幼儿配方乳粉基质复杂,生物素含量少的特点,引入了固相萃取技术进行纯化、富集,并对生物素的提取、分离和鉴定等条件进行了摸索,建立了一套有效的分离、鉴定方法。

1 实验

1.1 材料

收稿日期:2008-07-15

作者简介:商允鹏(1982-),男,硕士研究生,研究方向为农产品加工及贮藏工程。

通讯作者:生庆海

婴儿配方乳粉。生物素标准品,浓盐酸(优级纯),浓硫酸(优级纯),亚铁氰化钾(优级纯),乙酸锌(优级纯),乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯)。实验所用水均为去离子水。

1.3 仪器

Agilent1100高效液相色谱仪(FLD),HyperSep C₁₈固相萃取柱,固相萃取仪,超声波振荡器,Millipore超纯水处理装置,DSY-III氮吹仪,pH计等。

1.4 方法

1.4.1 样品的处理

准确称取5.0 g配方奶粉,用适量的温水溶解于50 mL容量瓶中,置于超声波振荡器中超声10 min,然后加入0.8 mL浓度为0.1 mol/L的HCl,用水定容至刻度,摇匀,离心,过滤至锥形瓶中。取5 mL的滤液过固相萃取柱,洗脱液收集在带盖的试管中,经氮吹仪吹干后用0.5 mL水溶解,加入0.5 mL质量浓度为1 g/L的PDAM衍生剂(0.1 g的PDAM溶解于100 mL的乙腈),盖紧瓶盖,置于40 °C水浴中,反应60 min。立即冷却到室温后经0.45 μm滤膜过滤,取20 μL上机检测。

1.4.2 固相萃取处理

选用HyperSep C₁₈固相萃取柱(500 mg, 6 mL)。将固相萃取柱置于固相萃取仪上,调节压力阀,控制流速在每秒钟一滴。洗脱程序:10 mL的甲醇对柱进行活化,10 mL的水保持柱的平衡,5 mL浓度为0.01 mol/L醋酸增加对生物素的吸附能力。然后将5 mL的样品滤液转移到柱内。当全部物质流过柱后,用5 mL浓度为0.01mol/L醋酸和1mL水除杂,最后用10 mL体积分数为100%的甲醇洗脱,用氮吹仪吹干。

1.5 标准工作液

贮备液的制备(100 mg/L):准确称取10.0 mg的生物素标准品,用去离子水定溶于100 mL的容量瓶中,放置在0~4 °C的冰箱中备用。

标准工作液①(10 mg/L):准确吸取10 mL生物素贮备液(100 mg/L)于100 mL容量瓶中,用去离子水定容,放置在0~4 °C的冰箱中备用。

1.6 色谱条件

色谱柱:BDS HYPERSIL C18 (250×4.6 mm i.d. 5 μm);柱温为50 °C;检测器为荧光检测器,检测波长:Ex为340 nm,Em为395 nm。流动相为水(A):乙腈(B)梯度洗脱(洗脱程序见表1)。流速1 mL/min。用0.45 μm有机微孔滤膜过滤,进样量20 μL。

表1 生物素梯度洗脱程序

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	流速/(mL·min ⁻¹)	梯度曲线
0.00	60	40	1.0	6
13.00	50	50	1.0	6
15.00	50	50	1.0	6
30.00	35	65	1.0	6
35.00	0	100	1.0	11

注:11 即时变化,6 线性变化。

2 结果与讨论

2.1 生物素的标准曲线

标准曲线制作:分别吸取0.25,0.5,1,1.5,2,3 mL的标准工作液①,用去离子水定溶于50 mL容量瓶中,配制成质量浓度为50,100,200,300,400,600 μg/L的标准工作液进行分析,现用现配。以峰高、质量浓度为纵、横坐标绘制标准曲线(图1),依据标准曲线确定线性范围并进行定量分析。线性回归方程:线性范围为25~300μg/L;线性回归方程 $y=0.2745x+0.4608$;相关系数 $R^2=0.9996$;检出限为25 μg/L。

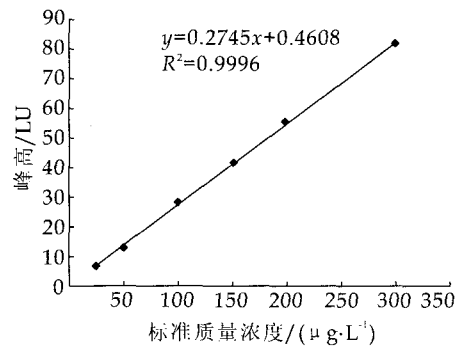


图1 生物素标准曲线

2.2 回收率

准确称取3组婴儿配方乳粉,分别添加不同浓度的生物素,每组3个平行,按1.4节方法处理样品,进样检测,结果如表2所示。

表2 回收率实验结果

成分	理论加入值/μg	实际测定值/μg	回收率/%	平均回收率/%
生物素	1.0	1.02	102.0	101.3
	1.0	0.96	95.9	
	1.0	1.06	106.0	
	1.5	1.47	97.8	95.0
	1.5	1.29	85.8	
	1.5	1.52	101.5	
	2.0	1.87	93.5	
	2.0	1.92	96.0	
	2.0	2.01	100.5	

2.3 精密度

对同一种添加生物素的婴幼儿配方乳粉进行7次测定,处理方法用1.4,结果如表3所示。

由表3经统计分析表明,测定结果的重现性较好,相对标准偏差为2.35%,测定结果稳定。由此可见,本方法用于实验室检测比较稳定。

2.4 提取方法

2.4.1 沉淀蛋白

由于生物素本身稳定的pH值范围在5~8之间,强酸、强碱、强氧化剂均对生物素产生破坏,所以从婴儿配方乳粉中提取生物素,关键是在不破坏生物素的前提下尽可能的将乳粉中蛋白质除去。通常除蛋白的试剂有三氯乙酸、高氯酸等;盐酸、硫酸等;亚铁氰化钾

表3 精密度实验结果

样品编号	样品中生物素质量分数/ μg (每100g中)
1	18.47
2	18.80
3	19.15
4	19.78
5	19.25
6	19.13
7	19.61
X	19.17
SD	0.45
RSD	2.35%

和乙酸锌,甲醇、丙酮等。三氯乙酸、高氯酸的酸性和氧化性太强,会对生物素造成破坏,使其氧化变成亚砷类物质,所以不能用其沉淀蛋白。乙酸锌-亚铁氰化钾除蛋白效果比较好,但是二者结合形成白色络合物的同时也会和一部分生物素结合,导致检测值偏低。生物素可以溶解在甲醇中,所以用甲醇去除蛋白的效果较好,生物素不会被破坏,但是同浓度为0.1 mol/L的HCl除蛋白方法相比操作复杂,步骤多,增大了人为误差。结果表明,浓度为0.1 mol/L的HCl除蛋白效果最佳(视样品的不同调整HCl的加入量),回收率高、重现性好。不同沉淀剂沉淀蛋白的比较如表4所示。

表4 不同沉淀剂沉淀蛋白的比较

蛋白沉淀剂	生物素质量分数/ μg (每100g中)
三氯乙酸	未检出
高氯酸	未检出
亚铁氰化钾和乙酸锌(1:1)	17.6
甲醇	18.2
浓度0.1 mol/L的HCl(0.8 mL)	19.17

2.4.2 固相萃取

测定婴儿配方乳粉中的生物素,由于质量分数低、样品复杂给样品处理带来了较大的困难,使用固相萃取进行样品的富集和净化是很好的途径,本试验采用HyperSep C_{18} 固相萃取柱进行浓缩、纯化,这一方法不仅能减少衍生剂的用量,节约成本,而且还能有效的减少杂质对峰分离的影响。影响固相萃取效果的因素主要是除杂试剂的选择和洗脱液体积大小的确定。依据生物素的结构和弱极性的特点,选用了低浓度的酸作为除杂试剂,如浓度为0.01 mol/L的HCl和0.01 mol/L醋酸进行除杂处理。结果表明,用醋酸的效果明显好于HCl,检测值和回收率均比HCl处理的高,因此选用浓度为0.01 mol/L醋酸除杂。除杂试剂和洗脱试剂的用量会对回收率产生直接的影响。除杂试剂用量与回收率的关系如图2所示;洗脱试剂用量与回收率的关系如图3所示。

由图3和图4可以看出,随着醋酸用量的增加回收率先增加后减小,是因为当醋酸用量少时,杂质去除

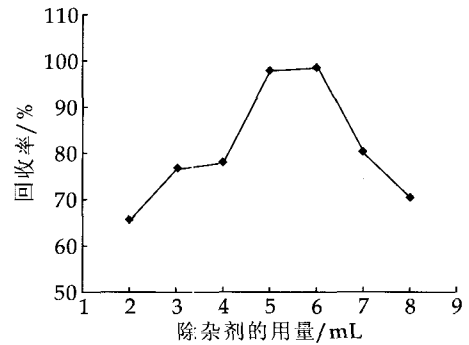


图2 除杂剂用量与回收率的关系

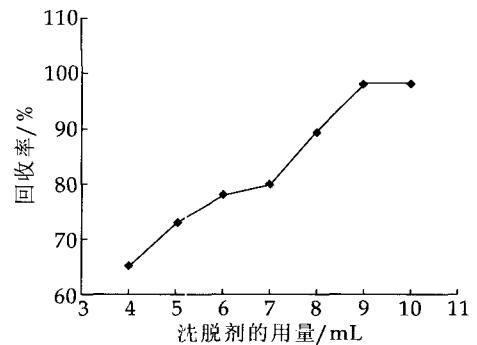


图3 洗脱剂用量与回收率的关系

不完全,衍生不完全,杂峰较多,分离度降低,致使回收率变低,但是当醋酸用量大于5 mL时也会把一部分生物素洗脱下来。所以最佳除杂剂用量为5 mL。随着洗脱剂甲醇用量的增加,回收率呈增长趋势,大于、等于9 mL时回收率趋于稳定,因此为了洗脱更完全、稳定性更好,确定洗脱剂甲醇的用量为10 mL。

2.5 色谱方法

2.5.1 检测波长的确定

一般荧光化合物在230 nm处有吸收,设定激发波长为230 nm做线扫描发射光谱(多-发射模式),然后设定测定时得到的最大发射波长,再进行多-激发波长扫描(多-激发模式),以便确定最佳激发、发射波长。最终得到稳定的最大吸收波长为 $E_x=340\text{ nm}$, $E_m=395\text{ nm}$ 。

2.5.2 色谱柱的选择

色谱柱是样品中各组分进行有效分离的心脏,虽然有资料用正向色谱柱进行样品中生物素的测定,但是针对婴儿乳粉基质的复杂性和生物素含量少的特点,正向色谱柱不能有效的分离样品中的生物素。本研究选用了BDS HYPERSIL C_{18} (250×4.6 mm i.d. 5 μm)、BDS HYPERSIL C_{18} (150×4.6 mm i.d. 5 μm)和ODS HYPERSIL C_{18} (250×4.6 mm i.d. 5 μm)色谱柱进行分析,测定结果显示BDS HYPERSIL C_{18} (250×4.6 mm i.d. 5 μm)色谱柱的分离度最好,既能准确的定性,又能精确的定量;其次是ODS HYPERSIL C_{18} (250×4.6 mm i.d. 5 μm)色谱柱;分离度最差的是BDS HYPERSIL C_{18} (150×4.6 mm i.d. 5 μm)色谱柱,分析

原因是,色谱柱短理论踏板数低,难以将复杂的基质进行有效的分离,因此本试验确定用BDS HYPERSIL C₁₈(250×4.6 mm i.d. 5 μm)色谱柱进行样品分析。

2.5.3 流动相和分离温度的确定

流动相对分析结果的影响因素主要是其组成、pH值和流速,适合的分温度也有助于提高分离效率。衡量分离条件的优劣,最常用的是分离度(R表示相邻两峰分开的距离与平均峰宽的比值)。结果表明等度洗脱不能有效的将生物素分离,分离度 $R < 1$,而采用梯度洗脱后, $R > 1.5$ 达到了峰的完全分离。增大盐浓度和提高pH值对分离度没有产生明显的影响。

温度对分离度的影响,在固定流动相组成、流速、进样量及其它色谱条件的情况下,考察温度对分离度的影响,结果如表5所示。由表5可以看出,在25~60℃

表5 温度对分离度的影响

温度/℃	分离度R	温度/℃	分离度R
25	0.45	50	1.64
30	0.53	60	1.67
40	0.87		

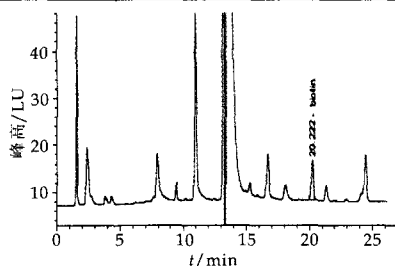


图4 生物素标样色谱图

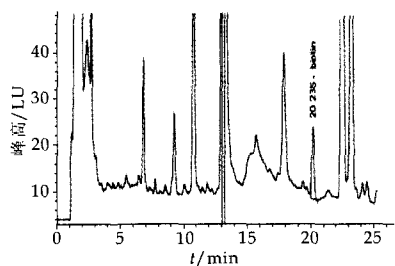


图5 生物素样品色谱图

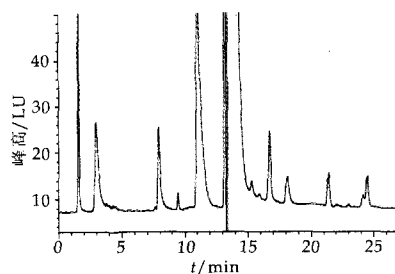


图6 空白色谱图

温度范围内,随着温度的升高,分离因子和分离度趋于增大。温度在50℃和60℃时分离度 $R > 1.5$,说明在其两侧无其他峰干扰,完全分离,达到了很好的分离效果,满足了检测要求,考虑到高温对色谱柱使用寿命的影响,确定温度在50℃。生物素标样色谱图如图4

所示;生物素样品色谱图如图5所示;空白样色谱图如图6所示。

3 结论

建立了反相高效液相色谱、荧光检测器测定婴儿配方乳粉中生物素的方法。该方法具有方便、准确、灵敏度高、精密度好等优点;生物素提取采用盐酸沉淀蛋白,固相萃取技术进行纯化及浓缩,确保最大限度的去除杂质,减少衍生剂的用量,减少在色谱分析检测过程中出现的杂质峰的干扰,提高分离度;液相色谱条件上采用了BDS柱,有更宽的pH值范围;流动相是乙腈和水,梯度洗脱程序如表1所示,流速为1 mL/min,荧光检测波长为 $E_x = 340 \text{ nm}$; $E_m = 395 \text{ nm}$;标准曲线的回归方程为 $y = 0.2745x + 0.4608$, $R^2 = 0.9996$ 。线性范围为25~300 μg/L。方法回收率在83.0%~101.5%之间,精密度为2.35%,达到了检测要求。

参考文献:

- [1] 黄兴国. 生物素及其营养作用[J]. 饲料博览, 2003(7):17-19.
- [2] 刘学剑. 生物素的生理功能及其应用进展 [J]. 饲料博览, 2000(7): 34-35.
- [3] AHMED J, VERMA K K. Determination of d-Biotin at The Microgram Level[J]. Talanta, 1979 (26):1025 - 1026.
- [4] CHANG Y S, WU C H, CHANG R J, et al. Determination of Biotin Concentration by a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method[J]. J Biochem. Biophys, 1994 (29):321 - 329.
- [5] HILLER U, WACHTER F, WEHRLI C, et al. Quantification of Biotin in Feed, Food, Tablets, and Premixes Using HPLC - MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2006 (831):8 - 16.
- [6] KAMATA K, HAGIWARA T, TAKAHASHI M, et al. Determination of Biotin in Multivitamin Pharmaceutical Preparations by High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection [J]. Journal of Chromatography, 1986, (356):326 - 330.
- [7] STEIN J, HAHN A, LEMBCKE B, et al. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biotin in Biological Materials after Crown Ether-Catalyzed Fluorescence Derivatization with Panacyl Bromide[J]. Analytical Biochemistry, 1992, (200):89 - 94.
- [8] SHUKO N, KUNIHIRO K, MOTOHIRO N. Fluorescence Detection of Biotin Using Post-column Derivatization with OPA in High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, (16):1 357-1 362.
- [9] CHIKAKO Y, YUKIKO O. Determination of Biotin Following Derivatization with 2-nitrophenylhydrazine by High-performance Liquid Chromatography with on-line UV Detection and Electro-spray-ionization Mass Spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, (1142): 231-235.
- [10] TSUGUCHIKA Y, ATSUHIRO R, CHIE N. Liquid Chromatographic Determination of Biotin by Using 1-pyrenyldiazomethane as a Pre-column Florescent Labeling Reagent[J]. Journal of Chromatography, 1988, (456):421-426.