

食品中生物素分析方法现状及发展趋势

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:介绍了常用分析方法在生物素分析中的应用,包括:滴定分析法、分光光度法、薄层色谱法、微生物法、气相色谱法、高效液相色谱法、质谱分析法、免疫分析法等,以及各种方法的适用范围和优缺点。评述了生物素分析的现状与进展。

关键词:生物素;维生素H;检测方法;发展趋势

中图分类号:TS207.3 文献标识码:B 文章编号:1001-2230(2009)06-0035-03

Research progress in analysis methods of biotin in food

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

(1. Northeast Agriculture 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: It is introduced the analytical methods which are applied in the determination of Biotin, including titration analysis, spectrophotometric methods, thin layer chromatography, the microbiological method, gas chromatography, high pressure liquid chromatography, mass spectrograph analysis, immunity analysis and so on. The area of application and advantage and disadvantage of these methods are talked about. The situation and development of the analysis of biotin is discussed.

Key words: Biotin; Vitamin H; the method of determination; development tendency

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。自Bateman(1916)和Boas(1927)发现生蛋清的毒性后, 生物素才作为一种保护因子被分离出来^[1]。生物素是一个脲基环含有一个硫原子和一条戊酸的侧链, 现已知有8种异构体, 天然存在的仅有d-生物素, 并且有活性。生物素为无色的针状结晶, 极易溶于热水, 微溶于冷水, 能溶于甲醇, 但不溶于其它有机溶剂。对热稳定, 强酸、强碱和氧化剂可使其破坏, 紫外线也可使其逐渐破坏。体内生物素主要储存在于肝脏中, 血液中含量较低。

目前, 生物素已广泛应用于医药、家禽、家畜的饲料添加剂方面, 亦有在运动员饮料、婴儿配方食品及乳粉和其他保健食品中添加生物素。由于生物素的功

能越来越受到重视, 所以有关食品中生物素含量的分析方法的研究也取得了较快的进展。下面就食品中的生物素分析方法作以介绍^[2]。

1 生物素分析方法研究现状

1.1 微生物法

微生物法检测生物素具有专一性强, 灵敏度高的特点。在实验室中已用微生物法分析测定了全世界1600多种饲料样品中的生物素含量^[3]。我国国家标准(GB/T 5413. 19-1997)等同采用AOAC中的方法, 用微生物法来检测婴幼儿配方食品和乳粉中的生物素, 它是通过植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)生长状况来测定游离生物素含量的。生物素对于*Lactobacillus plantarum*(ATCC 8014)的正常生长是一种必需的营养素, 在一定生长条件下, *Lactobacillus plantarum*的生长与繁殖速度与溶液中生物素的含量成一定的线性关系, 通过利用浊度法或光密度法测定细菌生长和繁殖的强度可间接地测定出食物样品中的生物素含量。最低检出限为0.003 ng。这种方法虽然灵敏度高, 但检测周期长, 试验条件要求高, 与仪器分析相比需要更多的人力、物力, 而且菌种保存困难。尽管微生物法得到更

收稿日期: 2008-11-13

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

通讯作者: 韩建春

好的改进,但仍因重复性差,操作复杂而不能得到广泛使用。

1.2 滴定分析法

滴定分析法测定生物素主要有酸碱滴定法、氧化还原滴定法以及荧光滴定法。

(1)酸碱滴定法:简单可靠,在美国药典(USP)中作为一种生物素含量测定的指定方法^[9]。但是该法主要用于高纯度的生物素纯度测定。

(2)氧化还原滴定法:根据所用氧化剂的不同有KIO₃法^[10]、过氧化氢法、氯胺-T法等。氧化还原法在生物素分析中得到广泛应用,但该方法主要是用于生物素纯度较高的样品的测定。

(3)荧光滴定法:根据生物素与抗生物素蛋白结合而使抗生物素蛋白的荧光淬灭,可用于生物素和抗生物素蛋白的测定。抗生物素蛋白溶液用标准生物素溶液滴定,滴定到荧光不再降低即为终点。未知浓度的生物素也可用标准的抗生物素蛋白溶液测定^[9]。适合于基质比较简单的生物素样品的测定。

1.3 分光光度法^[9]

分光光度法是将待测生物素样品的谱图与标准品对照,根据图谱是否一致来测定样品中生物素的含量,具有较高灵敏度,但需要样品中生物素的纯度较高,一般在mg级以上。

Ahmed利用生物素与高碘酸钾反应,能定量生成碘酸钾,而碘酸钾能与碘化钾反应生成碘,利用碘本身的颜色在351 nm处用分光光度计测定,就可得到生物素含量。

Timar等人研究过活性污泥中的生物素的比色测定,将真空干燥过的污泥酸解,水解蒸发,干扰物质用TLC法除去,生物素与对二甲氨基肉桂醛反应,生成橙红色络合物,然后在533 nm测量其吸光度,便可得到生物素的含量,该法重现性为89%,但这种方法只适用于基质简单,生物素含量高的样品。

Ben-Hur等人将抗生物素蛋白先与涂覆了生物素的微纤维玻板作用,板上残余游离生物素再与生物素激酶作用,则能水解出一种有色化合物进行比色测定。该法可测定抗生物素蛋白与生物素的含量。

1.4 气相色谱法

GC法在生物素的测定中的文献报道不多,可能是因为生物素在232~233 °C时熔融并分解,使其难于气化。为此,在测定中要将生物素转化为易挥发的硅烷:例如De Leen-heer^[7]采用2%OV-17柱,用双乙酰胺(BSA)和三甲基氯硅烷(TMCS)将生物素硅烷化后测定。Gaudiano^[8]测定药物制剂中生物素(1985),是将生物素转化为亚硝基生物素,用氯仿萃取后用40%硫酸胺盐析,再用TLC法进行提纯,经提纯后的亚硝基生物素与BSA、TMCS所用,形成硅烷后用22烷作内标,进行分析。

1.5 薄层色谱法

TLC法是一种简便、快速、灵敏的分离分析方法。五、六十年代,该法由于仪器自动化程度差,分辨率和

重现性不足而只能作为定性和半定量分析。随着科学技术的发展,目前TLC法已进入了分离高效化、定量仪器化、数据处理自动化的阶段。TCL法可谓是高效液相色谱法的前身,为其提供了基础理论^[9]。

1.6 高效液相色谱法

高效液相色谱法根据使用检测器的不同可分为荧光检测器法和紫外检测器法两种。而荧光检测器分析需要衍生试剂对生物素进行衍生处理,这样就有了柱前衍生和柱后衍生之分。根据不同样品的性质以及生物素的含量来选择适合于样品的检测方法。紫外检测与荧光检测相比检出限相对低一些^[10],所以对于生物素含量高、基质简单的样品来说可以用紫外检测;生物素含量低,而且基质复杂的样品则多用于荧光检测。由于生物素本身不发荧光,普通的紫外检测器又无法检测到很低的含量,所以,用荧光衍生剂将其衍生化,使其衍生物带荧光,提高检出限是检测痕量生物素的有效方法。国外在这方面的检测技术要比国内的成熟许多,国外五、六十年代就开始这方面的研究了,并取得了显著的成就。由于生物素本身的结构含有二级氨和羧基,当受到氧化剂氧化时,-C-N-键断裂,又可以形成一级氨,所以,根据这些官能团可以选用的衍生剂主要有:邻苯二甲醛(OPA)^[11]、2-硝基苯肼(2-nitrophenylhydrazine)^[12]、苄基重氮甲烷(PDAM)^[13]、异硫氰酸荧光素-抗生物素蛋白(streptavidin-FITC)^[14]、异硫氰酸荧光素-卵白素(Avidin-FITC)^[15]、二甲氨基肉桂醛等。

1.7 质谱分析法

目前检测生物素的质谱分析法大都与其它方法联用,其中色-质联用技术是近年来检测生物素含量常用的方法。因为有些食品基质比较复杂,单一的色谱法无法进行检测,这样引入质谱技术就可以从定性的角度更好的解决这个问题。色-质联用法分析速度快、前处理简单,灵敏度高,进样量少,既可以定性,又可以定量。Chikako Yomota和Yukiko Ohnishi^[12]将生物素经过2-硝基苯肼(2-nitrophenylhydrazine)衍生后,再经高效液相色谱-电喷雾质谱联用检测,其检出限可达到pmol水平。

2 生物素分析方法的发展趋势

综上所述,目前对于食品中生物素的检测方法主要以仪器分析法为主,检测范围通常在μg级以上。但有的食品中生物素的含量只在ng级,而且基质复杂,对于这样的食品目前所应用的仪器分析方法无法进行检测。随着仪器的创新和检测条件的不断改进,现在适合于检测低含量生物素样品的方法也取得了很大进展,虽然这些方法都处在研究发展阶段,但为今后痕量生物素样品的检测开辟了新的道路。

由于化学发光分析器具有高灵敏度(检出限可达10⁻⁹~10⁻⁷ mol/L)和宽的线性范围(3~6个数量级),已成为现代痕量分析的一个十分活跃的研究和应用领域,因此对痕量生物素的分析展示出它特殊的优越性。

免疫分析法作为一种测定生物素的新型有效的方法,近年来获得迅速发展,并投入商品化应用,如全自动免疫分析仪等。它是基于抗体与抗原之间的高选择性反应而建立起来的一种生物化学分析法。具有很高的选择性和很低的检出限。免疫分析法分为荧光免疫法、发光免疫法、酶联免疫法(ELISA)及电化学免疫法等非放射性免疫法和放射免疫法。其中国外学者已经用酶联免疫法对痕量生物素样品进行检测,基质简单的样品的检出限为1 pg/mL,而基质复杂的样品的检出限也可达到5 pg/mL^[6]。

生物传感器也是一种新发展起来的检测生物素的方法。Ikariyama等人报道了生物素亲和传感器的组成及测定原理。它是由一只Cl₂型氧电极,在氧电极上放置一层聚合物膜就构成了生物传感器。只是在该聚合物膜上固定了HABA和标记过的过氧化氢酶抗生物素蛋白络合物。由于聚合物膜上的HABA-Avidin络合物容易解离,当传感器放入含生物素的溶液时,抗生物素蛋白便解离下来并与溶液中的生物素形成稳定的络合物。而仍然留在膜上的过氧化氢酶在溶液中还原过氧化氢,生成的氧被氧电极检测到,用电位法测得其电位值,便可得到生物素的浓度。过氧化氢酶作为酶放大器,能灵敏地检测到 $4 \times 10^{-9} \sim 4 \times 10^{-7}$ mol/L的生物素。

总之,生物素分析方法众多,除原理不同外,检测结果的意义也有所不同。涉及诸多分析领域技术的应用,他们各具特色,各有其使用范围。而生物素分析技术仍然处在发展阶段之中,对生物素分析技术的进一步研究以及开发更新的高灵敏度的分析方法,是今后生物素分析研究工作的一个重要任务。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李富伟,袁纛.生物素的应用[J].中国饲料,1993, 23(15): 35-39.
- [3] 殷晓红,杨金宝,张潇宇,等.婴儿配方食品中生物素测定[J].中国乳品工业, 2002, 30(5): 117-119.
- [4] AHMED J, VERMA K K. Determination of d-Biotin at The Microgram Level[J]. Talanta, 1979 (26): 1025 - 1026.
- [5] 王福荣,俞津婷,张琳.利用异硫氰酸荧光素标记亲合素荧光法测定生物素含量[J].氨基酸和生物资源, 1994(03): 47-49.
- [6] 刁立兰,王燕,李秀珍.生物素测定方法的分析[J].山东食品发酵, 2007. 2(145): 47-50.
- [7] DE L A. Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins [J], New York:Marcol Dekoker, 1985:447.
- [8] GAUDIANO A. Ann Ist Super Sanita. 1977, 13(4): 783.
- [9] 湛英武,陈静.生物素的分析方法[J].化学世界, 1997, 38 (3): 118.
- [10] ZERZANOVA A. Using of HPLC Coupled With Coulometric Detector for The Determination of Biotin in Pharmaceuticals [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007, (45): 730-735.
- [11] NOJIRI S, KAMATA K, NISHIJIMA M. Fluorescence Detection of Biotin Using Post-column Derivatization With OPA in High Performance Liquid Chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1998, (16): 1357-1362.
- [12] YOMOTA C, OHNISHI Y. 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.
- [13] YOSHIDA T, RETAKE A, NAKAI C. Liquid Chromatographic Determination of Biotin by Using 1-pyrenyldiazomethane as a Pre-column Florescent Labeling Reagent [J]. Journal of Chromatography, 1988, (456): 421-426.
- [14] LAHEA S, NDAWA S. Determination of Biotin in Foods by High-performance Liquid Chromatography with Post-column Derivatization and Fluorimetric Detection[J]. Food Chemistry, 1999, (65): 253-258.
- [15] STAGGSA C G, SEALEYA W M, MCCABEB B J, et al. Determination of the Biotin Content of Select Foods Using Accurate and Sensitive HPLC/Avidin Binding[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004(17): 767-776.
- [16] CHANG Y S, WU C H, CHANG R J, et al. Determination of Biotin Concentration by a Competitive Enzy-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Method[J]. J Biochem Biophys Methods, 1994, (29): 321-329.