

# 高效液相色谱法测定发酵液中生物素含量

黄琴, 丁安子, 宋娟

(湖北工业大学 发酵工程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430068)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定发酵液中生物素的含量。结果表明,样品浓度在 $5\sim 150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,最低检测限为 $0.01\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,精密度的RSD为0.21%,稳定性的RSD为6.6%,发酵液在15 h内检测结果无明显差别,加样回收率在95%~102%之间。该方法简便、快捷、准确、重现性好,可用于发酵液中生物素的含量测定。

**关键词:**生物素;发酵液;高效液相色谱;含量测定

**中图分类号:**O 657.7 Q 563

**文献标识码:**A

**文章编号:**1672-5425(2009)08-0088-03

生物素(Biotin)又称维生素H,是一种水溶性维生素,参与机体三大营养物质的代谢,是动物机体维持正常生理机能所不可缺少的低分子有机物。作为机体中羧化、脱羧和脱氢反应酶系的辅助因子,生物素在碳水化合物、脂类、蛋白质和核酸的代谢过程中发挥着重要作用,除用于治疗人体因缺乏生物素所引起的贫血、脱发、情绪抑郁等症状外,还可用于治疗畜禽因缺乏生物素引起的生长迟缓、皮炎、脱毛等症状<sup>[1]</sup>。随着生物工程技术的发展,人们开始采用发酵法生产生物素,发酵法生产生物素具有工艺简单、原料来源广泛、成本低、安全性高等特点<sup>[2]</sup>。

生物素的测定方法有酶免疫法<sup>[3]</sup>、分光光度法<sup>[4]</sup>、荧光光度法<sup>[5]</sup>、微分脉冲极谱法<sup>[6]</sup>、微生物测定法<sup>[7]</sup>等,均操作繁琐、准确度不高。由于发酵液成分复杂,采用一般的溶剂提取法无法去除干扰组分;而采用高效液相色谱法,样品经过简单的处理就可以进行定量分析。

作者在此采用高效液相色谱法检测发酵液中的生物素含量,该方法至今未见国内有文献报道,为发酵法生产生物素提供了一种可靠、准确的跟踪检测手段。

## 1 实验

### 1.1 试剂与仪器

生物素标准品(含量97%),Sigma公司; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯。

LC-6A型高效液相色谱(包括CTO-6A型色谱柱箱、SIL-6A型自动进样器、SPD-6AV型紫外可见分

光光度计)、色谱柱Symmetry  $\text{C}_{18}$ 柱(4.6 mm×150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、UV-2450型紫外分光光度计,日本岛津;CQ 250型超声波清洗器,上海超声波仪器厂;EBA21型离心机,德国HETTICH公司。

### 1.2 色谱条件

流动相采用甲醇-pH值2.5磷酸缓冲溶液(14:86),使用前经超声波脱气后用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜抽滤。色谱条件为:流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量20  $\mu\text{L}$ ,柱温 $35\ ^\circ\text{C}$ ,检测波长210 nm。

### 1.3 标准品溶液的配制

精密称取适量生物素标准品,加无水乙醇定容至50 mL,超声波脱气后用滤膜过滤,即得 $150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准品贮备液。

### 1.4 供试品溶液的配制

取发酵液25 mL,水浴浓缩至10 mL后加入25 mL乙醇,振荡,离心后取上清液水浴浓缩至10 mL;再加入25 mL乙醇,振荡,离心后取上清液水浴浓缩至10 mL;继续加乙醇25 mL,振荡,离心后取上清液水浴蒸干,用流动相溶解定容至25 mL,离心,过滤,即得供试品溶液。

### 1.5 线性实验

将标准品贮备液稀释成 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $150\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度,每个浓度取20  $\mu\text{L}$ 进样分析,按色谱条件进行测定,每个样品进样5次。

### 1.6 精密度实验

将标准品贮备液稀释至一定浓度,按色谱条件进

收稿日期:2009-03-19

作者简介:黄琴(1979-),女,湖北咸宁人,实验师,研究方向:生物活性成分的分离纯化与分析检测。E-mail:hqinfly@163.com。

行测定,连续进样 5 次。

### 1.7 稳定性实验

取提取后的发酵液 4 份,其中 2 份分别在 3 h、6 h、9 h、12 h、15 h 按色谱条件测定生物素含量,另外 2 份每隔 2 d 测定生物素含量。

### 1.8 加样回收率实验

精密称取已知生物素含量的发酵液 4 份,分别加入  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准品溶液 1.0 mL,定容。按色谱条件进行测定,重复测定 5 次。

### 1.9 供试品中生物素含量的测定

取供试品溶液  $20 \mu\text{L}$ ,采用外标法按色谱条件进行定量测定,重复测定 5 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的确定

#### 2.1.1 流动相的选择

分别采用乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸缓冲溶液为流动相进行高效液相色谱分析。结果表明,以甲醇-水为流动相时,生物素与甲醇几乎同时出峰;以乙腈-水为流动相时,不同浓度的乙腈对生物素的分离效果均不理想,即使在水与乙腈的体积比为 95:5 的条件下,依然达不到合适的分离度(有机溶剂的含量小于 5%时,对水溶性色谱柱有损伤);以甲醇-磷酸缓冲溶液为流动相时,当磷酸缓冲溶液 pH 值  $\leq 2.5$  时,标准品保留时间延长;当 pH 值  $\geq 2.5$  时,色谱峰形对称性变差,峰形拖尾严重;当 pH 值 = 2.5 时可以达到很好的分离效果。因此,选择甲醇-pH 值 2.5 磷酸缓冲溶液为流动相。

以甲醇-pH 值 2.5 磷酸缓冲溶液为流动相,标准品的保留时间为 31.501 min,分离度为 1.663,理论塔板数为 7881。标准品和供试品的高效液相色谱图见图 1。

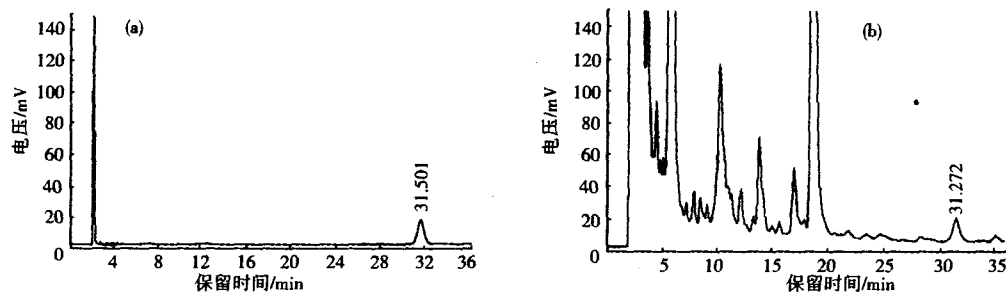


图 1 标准品(a)和供试品(b)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard(a) and sample(b)

从图 1 可以看出,虽然发酵液成分繁多,但是生物素与其它成分得到了很好的分离。供试品与标准品相比,生物素的保留时间有所漂移,为 31.272 min,这可能是由于操作过程中没有控制室温的缘故。

#### 2.1.2 柱温的确定

柱温对分离的影响较大。实验发现,当柱温低于  $35^\circ\text{C}$  时,生物素与杂质不能完全分离;而当柱温为  $35^\circ\text{C}$  时,生物素与其它杂质分开,而且得到了较好的分离。故选择  $35^\circ\text{C}$  作为分离柱温。

### 2.2 样品处理方法的确定

发酵液成分复杂,其中含有蛋白质、氨基酸、碳水化合物和各种维生素等,如果不进行处理,杂质峰将无法和检测峰分离,而过多杂质的存在也会污染色谱柱。由于生物素在乙醇中的溶解度较好,而蛋白质、碳水化合物和氨基酸在乙醇中的溶解度较小,所以本实验以乙醇作为提取剂多次离心处理,将蛋白质等杂质完全去除。

### 2.3 线性实验和精密度实验

以标准品 5 次进样峰面积的平均值  $A$  对浓度  $c$  进行线性回归,拟合线性方程为  $A = 12882.04c - 562905$ ,  $R = 0.9988$ 。表明在  $5 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

$S/N$ (信噪比) = 3 时,测得标准品的检测限为  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

以峰面积计算精密度,相对标准偏差(RSD)为 0.21%。

### 2.4 稳定性实验(表 1、表 2)

表 1 供试品 15 h 内的稳定性  
Tab. 1 The stability of samples in 15 h

| 供试品 | 峰面积    |        |        |        |        | RSD/% |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|     | 3 h    | 6 h    | 9 h    | 12 h   | 15 h   |       |
| 1   | 80 342 | 80 875 | 79 541 | 81 884 | 79 325 | 6.6   |
| 2   | 80 561 | 79 887 | 81 423 | 77 500 | 78 478 | 1.5   |

表 2 供试品 7 d 内的稳定性  
Tab. 2 The stability of samples in 7 days

| 供试品 | 峰面积    |        |        |        |
|-----|--------|--------|--------|--------|
|     | 1 d    | 3 d    | 5 d    | 7 d    |
| 3   | 80 342 | 78 640 | 79 101 | 46 650 |
| 4   | 80 561 | 81 522 | 77 420 | 37 541 |

从表 1 可以看出,发酵液在提取后 15 h 内含量不会发生显著变化,保持稳定(RSD<10%)。从表 2 可以看出,在室温下,随着天数的增加,生物素含量逐渐降低。实验中 7 d 内便可观察到提取液变浑浊,可能是发酵液变质或长菌。所以发酵液在 15 h 内检测,结果无明显差别。

### 2.5 加样回收率实验(表 3)

表 3 加样回收率实验结果  
Tab. 3 The result of recovery experiment

| 供试品 | 已知含量          | 加入量           | 测定值           | RSD  | 回收率 |
|-----|---------------|---------------|---------------|------|-----|
|     | $\mu\text{g}$ | $\mu\text{g}$ | $\mu\text{g}$ | %    | %   |
| 1   | 79.542        | 20            | 101.53        | 2.6% | 102 |
| 2   | 78.513        | 20            | 96.54         | 2.1% | 98  |
| 3   | 70.412        | 20            | 85.89         | 1.2% | 95  |
| 4   | 68.873        | 20            | 85.32         | 1.7% | 96  |

从表 3 可以看出,RSD 为 1.2%~2.6%,加样回收率在 95%~102%之间。

### 2.6 供试品的测定结果

测定结果显示,发酵液中生物素含量为 79.75  $\mu\text{g}$

$\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3 结论

采用高效液相色谱法测定发酵液中生物素含量。确定色谱条件为:色谱柱为 Symmetry  $\text{C}_{18}$ ,流动相为甲醇-pH 值 2.5 磷酸缓冲溶液(14:86),检测波长为 210 nm,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。生物素在 5~150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好,最低检测限为 0.01  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,精密实验 RSD 为 0.21%,稳定性实验 RSD 为 6.6%,发酵液在 15 h 内检测结果无明显差异,加样回收率在 95%~102%之间。为发酵法生产生物素提供了可靠的分析检测方法。

#### 参考文献:

- [1] 张西峰,张炜炜,杨明明,等.生物素生物合成的研究[J].生物技术,2006,16(4):82-84.
- [2] Höller Ulrich, Wachter Frédérique, Wehrli Christof, et al. Quantification of biotin in feed, food, tablets, and premixes using HPLC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 831(1-2):8-16.
- [3] Kim B, Buckwalter J M, Meyerhoff M E. Adapting homogeneous enzyme-linked competitive binding assays to microtiter plates[J]. Anal Biochem, 1994, 218(1):14-19.
- [4] GB/T 17778-1999. 预混料中 d-生物素的测定——分光光度计法[S].
- [5] 王福荣,张琳,俞津婷.生物素测定法的研究[J].中国酿造,1994,(1):17-19.
- [6] 湛英武,陈静,陈启明,等.生物素的微分脉冲极谱行为及其测定[J].分析测试学报,1998,17(5):69-71.
- [7] 石磊,杨晓莉,王国栋,等.食物和饲料中生物素的测定方法[J].营养学报,2002,24(2):181-184.

## Determination of Content of Biotin in Fermentation Liquid by HPLC

HUANG Qin, DING An-zi, SONG Juan

(Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:** Content of biotin in fermentation liquid was determined with high performance liquid chromatography (HPLC). It showed a good linear relationship when the sample concentration was within the range of 5~150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the minimum detective limitation was 0.01  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the relative standard deviation (RSD) of stability experiment was 6.6% and the relative standard deviation (RSD) of accuratal experiment was 0.21%. When the fermentation liquid was determined in 15 hours, the obtained results had no obvious difference. The recovery rate was within the range of 95%~102%. The method is convenient, rapid and accurate with good repeatability, which can be used for determination of biotin content in fermentation liquid.

**Keywords:** biotin; fermentation liquid; high performance liquid chromatography(HPLC); content determination