

液相色谱法测定生物素

赵小阳 李 兰 虞哲高 杨金枢

一、前言

生物素又称维生素 H，是一种含硫元素的环状化合物。其有多种同分异构体，其中，右旋异构体 D-生物素存在于自然界，并具有维生素活性。生物素是人们在研究酵母及其微生物成长素的过程中发现的。作为成长素，其在动物营养中需要量很少，但对生物的生理功能是不可替代的，参与动物体内主要代谢过程（脂肪、蛋白质、核酸及糖类代谢），还作为辅酶成分参与其他营养物质的代谢过程，是畜禽正常生长、饲料转化、繁殖所必需的。生物素缺乏，可造成动物生长缓慢，食欲不振，因此，是备受关注的维生素添加剂。

生物素属于水溶性 B 族维生素，有较好的稳定性，强酸、强碱、紫外线、高温可使其分解。2%D-生物素作为饲料添加剂多年来被广泛使用，有喷雾型和稀释型两种剂型。喷雾型生物素是将生物素均匀地分布在一种水溶性的基质内经过喷雾干燥而成，均匀度好，市场用量较多，要进行含量分析，必须先把颗粒打开使生物素释放出来，因此，用溶剂萃取后再比色的方法是无法测得生物素含量的。稀释型生物素是将生物素的细粉用粉状载体直接稀释而成，可以直接用溶剂萃取。用分析喷雾型生物素的方法可以适用于稀释型的产品，但是，分析稀释型生物素的方法不一定能用于喷雾型的生物素产品。本文主要介绍了用反相高效液相色谱法测定生物素的分析方法。

二、实验部分

(一) 试剂和溶液

1. 乙腈：色谱纯。
2. 三氟乙酸。
3. 盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 3.0 \text{ mol/L}$ ，量取 250

mL 盐酸于 1 000 mL 容量瓶中，用水稀释定容至刻度。

4. 0.05% 三氟乙酸溶液：浓度为 0.05%（体积分数），移取 0.50 mL 三氟乙酸于 1 000 mL 容量瓶中，用超纯水定容至刻度。

5. 提取剂：0.05% 三氟乙酸溶液 + 乙腈 = (75+25)。

6. D-生物素对照品：D-生物素含量 $\geq 99.0\%$ 。

7. D-生物素标准贮备溶液：称取约 100 mg D-生物素对照品，置于 50 mL 的容量瓶中，用提取剂溶解，并稀释定容至刻度，摇匀。该标准贮备液每毫升含生物素 2.0 mg。

8. D-生物素标准工作液：准确吸取 D-生物素标准贮备液 1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，用提取剂稀释定容至刻度，摇匀。该标准工作液每毫升含生物素 200 μg 。

(二) 仪器和设备

1. 超声波水浴。
2. 超纯水装置。
3. 高效液相色谱仪，带紫外可调波长检测器（或二极管矩阵检测器）。

(三) D-生物素含量的测定

1. 试样溶液的制备：准确称取试样约 0.500 0 g（准确至 0.000 1 g），置于 50 mL 的容量瓶中，加约 40 mL 提取剂溶液，在超声波水浴中超声提取 15 min，冷却到室温，用提取剂溶液定容至刻度，混匀，溶液过 0.45 μm 滤膜，供高效液相色谱仪分析，色谱图见图 1。

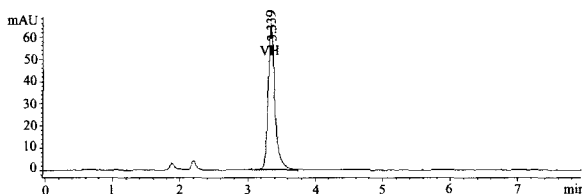


图 1 生物素色谱图

2. 色谱条件: (1) 固定相: C18 柱, 内径 4.6 mm, 长 250 mm, 粒度 3 μm。 (2) 流动相: 0.05% 三氟乙酸溶液+ 乙腈 = (75+25)。 (3) 流速: 1.0 mL/min。 (4) 检测器: 紫外可调波长检测器 (或二极管矩阵检测器), 检测波长 210 nm。 (5) 进样量: 20 μL。

3. 结果计算: 试样中 D-生物素 (C₁₀H₁₆N₂O₃S) 含量 X 以质量分数 (%) 表示, 按式 (1) 计算:

$$X = \frac{P_i \times C \times 50}{P_s \times m} \times 10^{-6} \times 100 \quad (1)$$

式中:

P_i——试样溶液峰面积;

C——D-生物素标准工作液浓度, 单位为微克每毫升 (μg/mL);

50——试样溶液稀释倍数;

P_s——D-生物素标准工作液峰面积;

m——试样质量, 单位为克 (g)。

4. 生物素不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系: 分别吸取 D-生物素标准贮备溶液 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL, 用流动相稀释定容至 10 mL, 浓度分别为: 50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 μg/mL, 进样 20 μL 至 HPLC。标准曲线见图 2。回归系数为 0.99976, 当生物素的浓度在 50.00~800.00 μg/mL 范围内时, 浓度和峰面积之间存在很好的线性。

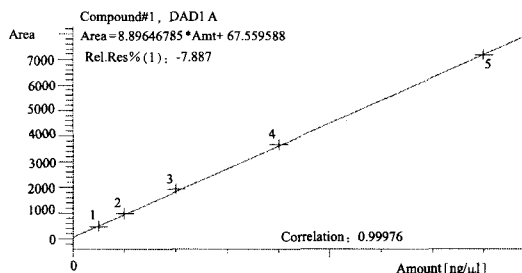


图 2 生物素标准溶液工作曲线

5. 生物素检验结果与标示量对比 (准确度): 选取不同厂家 (生产工艺不同)、不同批号的产品, 按照本方法确定的实验条件进行含量的测定, 结果 (见表 1) 表明, 按照本方法测定样品含量, 均为样品标示量的 99% 以上。

6. 方法精密度 (重复性): 选取同一生物素饲料添加剂样品, 按照本方法确定的条件进行重复实验, 制备 5 份溶液, 测试生物素的含量。测定结果 (见表 2) 表明, 对于同一样品, 重复测定 5 次, 其变异系数 (CV) 为 1.5%。

7. 同一分析者对同一试样同时两次平行测定

结果相对偏差: 选择不同产品做两次平行测定。测定结果 (见表 3) 表明, 本方法两次平行测定结果相对偏差均小于 5.0%。

表 1 不同厂家的产品含量检验结果与标示量对比 %

样品代号	生物素含量 检验结果	生物素 标示量	测定量占标示 量百分比
1	2.04	2.00	102
2	2.03	2.00	102
3	2.09	2.00	104
4	2.06	2.00	103
5	2.23	2.00	112
6	2.23	2.00	112
7	2.27	2.00	114
8	2.18	2.00	109
9	2.20	2.00	110
10	2.18	2.00	109
11	1.98	2.00	99
12	2.00	2.00	100

表 2 同一样品重复测定 5 次结果 %

测定次数	生物素含量
1	2.16
2	2.14
3	2.18
4	2.20
5	2.22

表 3 不同产品两次平行测定结果相对偏差 %

样品代号	生物素含量	相对偏差
1	2.02	±1.9
	2.10	
2	2.26	±1.3
	2.20	
3	2.31	±1.8
	2.23	
4	2.20	±0.2
	2.19	
5	1.95	±2.3
	2.04	

三、结果与讨论

本文采用峰面积外标法对生物素定量测定, 实验结果表明, 2%D-生物素含量测定结果最小值为 1.99%, 最大值为 2.27%, 本方法适用于不同生产工艺合成的饲料添加剂 2%D-生物素的测定。

2008年发布的农业国家标准名目

编者按：本刊今年第1~2期选登了国家质量监督检验检疫总局2008年发布的第1号至第10号国家标准批准发布公告中与农业有关的国家标准名目，本期继续刊出2008年第10号至第12号公告中与农业有关的国家标准名目，以飨广大读者。

序号	标准号	标准名称	代替标准号	实施日期
1	GB/T 22104-2008	土壤质量 氟化物的测定 离子选择电极法		2008-10-1
2	GB/T 22105.1-2008	土壤质量 总汞、总砷、总铅的测定 原子荧光法 第1部分：土壤中总汞的测定		2008-10-1
3	GB/T 22105.2-2008	土壤质量 总汞、总砷、总铅的测定 原子荧光法 第2部分：土壤中总砷的测定		2008-10-1
4	GB/T 22105.3-2008	土壤质量 总汞、总砷、总铅的测定 原子荧光法 第3部分：土壤中总铅的测定		2008-10-1
5	GB/T 22109-2008	地理标志产品 政和白茶		2008-10-1
6	GB/T 22110-2008	食品中反式脂肪酸的测定 气相色谱法		2009-1-1
7	GB/T 22111-2008	地理标志产品 普洱茶		2008-12-1
8	GB/T 4928-2008	啤酒分析方法	GB/T 4928-2001	2009-6-1
9	GB 6142-2008	禾本科草种子质量分级	GB 6142-1985	2009-1-1
10	GB 4143-2008	牛冷冻精液	GB/T 4143-1984	2009-1-1
11	GB 4853-2008	食品级白油	GB 4853-1994	2009-1-1
12	GB/T 22141-2008	饲料添加剂 复合酸化剂通用要求		2008-10-1
13	GB/T 22142-2008	饲料添加剂 有机酸通用要求		2008-10-1
14	GB/T 22143-2008	饲料添加剂 无机酸通用要求		2008-10-1
15	GB/T 22144-2008	天然矿物质饲料通则		2008-10-1

鉴别D-型、L-型或DL消旋生物素，我们首先采用提纯方法，根据生物素在常温水微溶的特性，用0.1 mol/L的盐酸溶液洗涤并除去2%生物素样品中的辅料，得到提纯的纯生物素。该生物素烘干后，用4 g/L的氢氧化钠溶液溶解，用于旋光测试，旋光值应在89~93附近。但是，目前2%生物素的辅料有糊精和淀粉。通过实验，以淀粉做辅料的生物素加入盐酸后呈粘糊状，用离心和抽滤的方法，都无法得到纯生物素，该方法只适用于用糊精做辅料的生物素的鉴别。采用离子交换树脂净化萃取方法，该方法同样不适用于以淀粉为辅料的2%生物素，样品吸附在柱上用0.1 mol/L的盐酸溶液无法淋洗下来，用4 g/L的氢氧化钠溶液淋洗后，测旋光值很小，该方法也不适用。按照欧洲药

典或美国药典旋光法鉴别纯生物素的方法，因不同厂家产品辅料的比例无法确定，因此空白样品浓度无法确定，该方法也不适用。

生物素具有3个手性中心，合成工艺属不对称合成，其工艺路线长，有十几步化学反应，对反应的要求高，生产难度大。由于D-生物素生产工艺复杂，从技术上分析，要生产出L-型或DL消旋的生物素，几乎需要重新开发同等复杂的合成路线与生产装置，目前市场上还未发现存在L-生物素或消旋的生物素，因此，2%D-生物素的鉴别方法可用液相色谱保留时间定性。（作者单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 北京100081）