

文章编号:1004-4280(2011)02-0015-04

## 常用生物素测定方法的简介

王欣,王燕,高晓娟,杨平平\*

(山东轻工业学院食品与生物工程学院,山东 济南,250353)

**摘要:**生物素作为B族类维生素,在机体代谢、医药、化学等工业已经广泛应用,生物素测定方法的研究也取得了迅速发展。根据最近的一些文献报道,本文对这几种方法的应用实例、适用范围、优缺点等做了简单介绍,提出了适用条件的选择,使得人们能够根据其实验要求,更好的选择理想的检测方法。文章还对生物素检测新方法进行了展望。

**关键词:**生物素;研究;测定方法

**中图分类号:**Q939.9 **文献标识码:**A

### Introduction of Biotin Determination Methods

Wang Xin, Wang Yan, Gao Xiao-juan, Yang Ping-ping\*

(School of Food and Biological Engineering, Shandong Polytechnic University,  
Jinan 250353, China)

**Abstract:** As a kind of B-complex vitamins, biotin has been widely used in metabolism, pharmaceutical, chemistry and so on, the research of biotin determination also made a rapid progress. According to recent literature, a brief introduction of the approaches of application, scope, advantage and disadvantage was made in this paper. The choice of appropriate conditions was put forward in order to make people choose better examination approach according to experiment requirement. Finally the perspective of new method of biotin research was carried out in this paper.

**Key words:** biotin; research; determination method

## 0 引言

近几年,生物素的发展越来越多的受到人们的关注。生物素检测方法的研究,更是成为很多行业的研究焦点。生物素的测定方法众多,但作用原理、检测时效、针对范围各不相同。所以,在实际应用中,针对自身研究需要选择恰当的生物素测定方法至关重要。这不仅需要以现有的实验条件为基础,还要根据实验目的和对原料中生物素含量的估计以及操作人员对实验流程的熟识度来进行选择,已达

到准确、快速解决生产及实验问题的目的。

## 1 常用生物素检测方法进展

在众多生物素测定方法中选择适宜方法,对生产研究意义重大。微生物法、高效液相色谱法、自动浊度分析仪法、荧光法、酶联免疫法以及毛细管电泳法是目前生物素测定方法中应用较为普遍的方法,也是在应用中常被选择的方法。随着检测技术的提高以及对检测结果精细度要求的提高,这些较为传统的方法也在适应现代检测技术的发展中有了新的

收稿日期:2010-11-01

基金项目:山东大学微生物技术国家重点实验室开放课题。

作者简介:王欣(1985-),女,山东济南市人,山东轻工业学院在读硕士。研究方向:生物制药。

通讯作者:杨平平,男,博士,教授, E-mail:jiangnanypp@163.com.

提高与改进。根据最近的一些文献报道,文章对这几种方法的应用实例、适用范围、优缺点等做了简单介绍。

### 1.1 微生物法

微生物生长圈法可以成为检测复杂有机样品中生物素含量的一种简便方法,如若得出较好的生物素浓度与菌体生长量之间的关系,就能为工业生产提供很好的指导作用。

王丽丽<sup>[1]</sup>等人用生物素缺陷型菌株进行试验,探讨生物素与菌体生长量的直接对应关系。试验采用滤纸片法,检测标准生物素生长圈直径大小校正回归方程并根据生物素浓度与生长圈直径之间的关系图,确定了生长圈直径为1.0~2.0 cm,检测结果最为精确。郑巍振<sup>[2]</sup>等人,以产氨短杆菌为指示菌,采用向牛津杯中添加标准生物素的方法绘制生物素标准曲线。生物素浓度范围取15~90 μg/L,准确率较好。此方法可用于饲料生物素等含量的测量,具有操作简单、重复性好、灵敏度高、抗杂质干扰等特点,为微生物法检测生物素含量提供了一种新的选择,也可为那些采用一般理化方法检测困难,但可以为微生物生长因子的活性物质的定量检测提供参考。而微生物法中的液体培养管法利用检测生物素标样吸光度值的方法绘制生物素标准曲线,在操作中更为简便。汤水平<sup>[3]</sup>等人,采用液体培养管法测定了婴幼儿配方乳粉中游离生物素的含量。试验利用植物乳杆菌对生物素有很高灵敏性的特异性,通过其生长情况来测定出乳粉中游离生物素的含量。样品通过0.3 mol/L 硫酸溶液酸化处理,进行测定即可得出良好的测定结果。基本流程:配制生物素标准溶液若干→以试管盛装→铝箔纸盖口→高温灭菌→毛细管滴加菌悬液(1d)→培养→于550 nm检测吸光度→绘制生物素标准曲线图。结果显示生物素在0.1~0.6 ng/mL时呈良好线性关系,加标平均回收率在102.15%~102.28%。本实验的重现性好,方法简便,检测数量级为微克级,为食品工业测定游离生物素做了指导。

从以上实验看出,微生物法都是基于细菌的培养及绘制生物素标准曲线法进行生物素测定的。此法的局限性在于虽然灵敏性较高,但是由于大多数菌株都不是专一性的,因此会带来较大的检测误差,并且整个操作流程费时、费力,需18~24 h的细菌培养来处理样品<sup>[4]</sup>。

## 1.2 高效液相色谱(HPLC)法

### 1.2.1 HPLC法

HPLC法因测速快、分辨率高等特点,而成为生物素测定的首选方法。刘加庆<sup>[5]</sup>等人于在215 nm下,利用磷酸二氢钾/乙腈=9/1的流动相,获得生物素较好的峰形和滞留时间。此法的局限性在于所被测定的原料中,生物素含量不能太少,这使得HPLC法在测定生物素含量的应用上欠缺高灵敏性。肖晶<sup>[6]</sup>等人,把HPLC法应用于保健食品中生物素含量的测定,使用Hypersil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈/磷酸二氢钾为流动相于200 nm下检测,分析检出极限为0.5 mg/kg。实验关键为样品的生物素提取,采用水、甲醇、流动相3种提取剂进行分析。此方法适用于市售的一般片、粉、胶囊、口服液试剂,但不适用于某些成分复杂、含油脂、色素较多、杂质干扰大的保健食品。根据被测样品所含成分的不同发展的反向高效液相色谱法已经应用于发酵、乳品等行业的检测。蒲跃进<sup>[7]</sup>等人利用该法测定了发酵液中生物素含量。流程:发酵液→100℃水浴1 h→离心→以安捷伦 Zorbax SB-C18(4.6 cm×250 cm,5 μm)为色谱柱,215 nm→柱层析。此方法获得的生物素吸收峰面积与质量浓度的线性相关系数达0.9999,测定结果较为可靠。

### 1.2.2 超高效液相色谱-质谱联用

结合超高效液相色谱和质谱的优点建立的超高效液相色谱-质谱联用的检测方法,克服了单纯HPLC法灵敏度比较低,对于一些生物素含量比较低的样品不能检测的缺点,使得其应用范围更为广泛。刘进玺<sup>[8]</sup>等人通过对生物素标准样品的测定,以生物素的质量浓度和峰面积为纵横坐标,绘制线性关系曲线。测得生物素在0.010~5.000 μg/mL范围内线性良好。样品通过超声提取并通过0.45 μm滤膜后待测。以Acquity UPLC BEH C18柱(2.1×50 mm,1.7 μm)为色谱柱分离,以电喷雾电离串联质谱在正离子选择反应监测(SRM)模式下进行测定。流动相为V(乙腈):V(0.1%甲酸)=15:85,流速为0.2 mL/min,色谱柱温度为40℃,进样量为2 μL;定量离子为227.1,定性离子为227.1、97.1、123.0,二级碰撞室内对应的碰撞能量分别为:11、22、37 V。该方法检测极限0.2 mg/kg。

由以上具体实验可以看出HPLC法结合质谱法联用,可达到灵敏度高、试样供试范围广的实用优点。但与微生物法相比,HPLC法对样品的前处理要求较高,复杂化了前期人工处理样品的工序。

### 1.3 自动浊度微生物分析仪法

自动浊度微生物分析仪通过对样品进行自动稀

释、自动检测标样和样品中的菌体生长浊度间接测定出样品中的生物素含量。黎旭茹<sup>[9]</sup>等人基于植物乳杆菌标准菌株的繁殖强度与溶液中生物素含量呈现线性关系的原理,利用分光光度计准确定量测定了维生素营养片剂中的痕量生物素。流程:650 nm下测定标准生物素曲线→制作标准样品管→接种供试菌 35 °C 培养 18 h→检测吸光度→对比标准曲线→生物素含量。试验中应注意油脂与残留生物素的影响,保持试验器皿清洁。

此法适合生产企业的批量质量控制和检测<sup>[10]</sup>,也适用于准确测定多种维生素营养片剂中生物素的含量,已被营养保健食品生产企业采用于日常质量控制和检验,并且这是一种可以达到痕量级的生物素检测方法。

#### 1.4 荧光分光光度法

荧光分光光度法测定生物素检出量可达  $10^{-6}$  级甚至  $10^{-9}$  级,可供微量分析。但此方法对供分析试样要求高,试样应无色、无浑浊。而且,由于荧光分析法测定生物素是基于色氨酸荧光,高色氨酸含量将对检测有影响,所以此法不适用于生物材料的生物素检测。王福荣<sup>[11]</sup>等人,应用于谷氨酸发酵研究,通过对生物素试样离心、上清经 D4006 大孔吸附树脂处理除杂后,用分光光度法测定了生物素含量。生物素回收率达 90%,检测灵敏度为 1 ng/mL,测定范围为 5 ~ 40 ng/mL。

荧光分光光度法测定生物素含量较简便,每个试样只需几分钟左右,可用 96 孔板做同步测定。但需要掌握好试样的反应时间。由于其原理是基于生物素与亲和素的结合,亲和素的市场造价较高,所以虽然其检测方法简便,但推广还有待进一步发展。

#### 1.5 酶联免疫法

与 HPLC 法相比,酶联免疫法省去了样品繁琐的前处理过程,更适合于成分较为复杂难于分离处理的样品检测。徐幼平<sup>[12]</sup>等用该法测定微生物发酵液中生物素的含量,流程:聚苯乙烯微孔板包被生物素→过夜洗涤→牛血清封闭液 37 °C 反应→PBST 洗涤→加样 37 °C 反应 30 min→加一定浓度的 HRP - BSABNHS 交联物→37 °C, 30 min 反应→邻苯二胺显色。杨红<sup>[13]</sup>发展了一种测定基因转殖酵母菌培养液中生物素酶联免疫法。酶标板先用猪肺炎支原体包被,再依次用兔抗猪肺炎支原体抗血浆、羊抗兔 IgG - 生物素温育形成固态生物素,同溶液中的生物素竞争有限量的链霉亲和素 - HRP。该法检测限为 83 ng · L<sup>-1</sup>,比文献报告的最低测定浓度小

1000 倍。本实验重点在于选择猪肺炎支原体作包被蛋白,提高了该法结果的精确度和准确度,可供测定其它介质中生物素的参考。

酶联免疫法的简便性跟准确性尤为突出,选择更廉价、准确度高的包被蛋白,有助于酶联免疫法的推广与发展。

#### 1.6 毛细管电泳(CE)法与毛细管电色谱(CEC)法

毛细管电泳(CE)是近年来发展最快的分析方法之一。其仪器较简单,造价更低,已广泛地应用于小分子、小离子、多肽及蛋白质的分离分析研究。Schiewe 等人用毛细管区带电泳法测定了生物素的含量。实验采用装有熔融硅毛细管和圆柱状二极管阵列检测器的 Hewlett - Packard<sup>3D</sup> CE 系统,将标样溶解到 2 倍水中,经滤膜抽滤后进行检测。检测条件为 -30 kV、25 °C,检测极限为 3.37 μg/mL<sup>[14]</sup>。

毛细管电色谱(CEC)技术结合了 CE 电渗流驱动的高效性和 HPLC 溶质保留的高选择性。激光诱导荧光检测器(LIF)是目前检测方法中灵敏度最高的一种方法,其浓度检出限为  $10^{-10}$  ~  $10^{-12}$  mol/L。CE 与 LIF 联用意味着可以使用小内径外加高电场强度的毛细管,获得高的分离效率;同时也可以处理更小量样品,使高效、快速分离技术成为超痕量样品分离检测的有力工具。Thomas 等采用在线免疫亲和电色谱(IACEC)选择性富集了异硫氰酸荧光素(FITC)衍生化的生物素,经过洗脱后通过 CE - LIF 实现检测,从而建立了 IACEC - CE - LIF 定量分析 FITC - 生物素的新方法,显示出具有良好的灵敏度和重现性。毛细管电色谱与各种检测器的联用,满足了生产实际中的检测要求,为生物素检测方法的发展提供了强有力的空间<sup>[14]</sup>。

## 2 生物素测定方法展望

微分脉冲伏安法也是一种近年来发展很快的生物素测定方法。谌英武<sup>[15]</sup>等利用微分脉冲阳极伏安法研究了生物素的电化学性质。该实验室用金电极作为工作电极,在 pH 3.59 的 HAc - NaAc 介质中,生物素的峰电位为 0.46 V,生物素浓度在  $1.0 \times 10^{-6}$  ~  $2.0 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内与峰高呈线性关系<sup>[16]</sup>。

质谱法多与其它方法连用,色 - 质联用是目前用于测定生物素的最常用的方法,尤其广泛应用于食品工业。应用质谱,可以解决食品工业中单用色谱无法检测的难题,使得检测问题从定性的角度上

得以解决。Hikako Yomota 和 Yukiko Ohnishi 将生物素经过 2-硝基苯胍衍生后,再经高效液相色谱-电喷雾质谱联用后检测极限可达 pmol 水平<sup>[17]</sup>。

气相色谱(GC)法应用于生物素研究的报道不多,商允鹏<sup>[18]</sup>等人对 GC 法做了总结,即生物素由于自身熔点高而难于被气化使得生物素在测定中要转化为易挥发的硅烷。Gaudiano<sup>[19]</sup>测定药物制剂中生物素含量,将生物素转化为亚硝基生物素,经氯仿萃取、硫酸铵盐析、提纯后与双乙酰胺、三甲基氯硅烷所用并用 22 烷作内标得出了较好的结果。可见,此法对生物素的烷基化过程使得测定样品的前处理过程较为复杂,不适合工业化应用。

### 3 生物素测定方法的评价

生物素检测方法繁多,生产实践中,要根据具体实验环境跟条件选择适当的方法进行测定。微生物法是应用比较普遍的生物素测定方法且其所需成本也较低,但此法要求需要有稳定的试验菌株,且耗时长,不适合产品周期短的工厂适用;HPLC 法是现在许多工厂应用较多的方法,如果有较完整的前期样品处理方案,将会使其应用更为稳定快速。但是其仪器设备造价过高,样品的前处理复杂,不适复杂样品的生物素测定;1.3~1.5 的方法与 HPLC 法的共同点是都借助高精密的仪器来进行后期的样品测定,其特点为前期样品处理量大,后期检测较为方便简单<sup>[20]</sup>;EC 法的检测方法较为简便,其突出特点是不需要对样品进行繁琐的预处理,而且 EC 法发展的趋势是可以与更多的反应器联用,如质谱、荧光反应器等,可以结合实验要求与样品的特点更有针对性的进行检测,提高检测的灵敏度与稳定性,具有广阔的发展空间。

#### 参考文献:

[1] 王丽丽,仪宏,王瑞果,等.微生物生长法检测生物素含量方法的研究[J].中国调味品,2008,3(2):58-60.

- [2] 郑巍振,裘娟萍,赵春田,等.一种简捷的生物素测定方法[J].食品与发酵工业,2009,35(10):135-137.
- [3] 汤水平,李冰,彭灿,等.微生物法测定婴幼儿配方乳粉中游离生物素含量的研究[J].食品与机械,2008,24(5):96-98.
- [4] 李兰.高效液相色谱电化学检测维生素预混料中生物素含量[J].国外畜牧学:饲料,1998,22(4):26-27.
- [5] 刘加庆,周丽,田勇.HPLC 检测生物素的方法研究[J].发酵科技通讯,2008,37(2):17-20.
- [6] 肖晶,杨大进,张馨之.高效液相色谱法测定保健食品中的生物素[J].中国食品卫生杂志,2006,18(3):234-236.
- [7] 蒲跃进,周占琴,杨明明,等.利用反相高效液相色谱法测定发酵液中的生物素含量[J].西北农林科技大学学报,2007,35(5):73-76.
- [8] 刘进玺,钟红舰,董小海,等.超高效液相色谱-质谱联用测定维生素预混合饲料中生物素含量[J].分析实验室,2010,29(7):62-64.
- [9] 黎旭茹,张沁,刘春丽.应用自动浊度微生物分析仪测定维生素片剂中的生物素[J].广州医药,2006,37(6):57-60.
- [10] 杨大进,方从容.进口保健食品中维生素检测方法现状及展望[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):62-65.
- [11] 王福荣,张琳,俞津婷.生物素测定法的研究[J].中国酿造,1994,28(1):17-19.
- [12] 徐幼平,陈正贤,吴建祥,等.微生物发酵液中生物素含量的 ELISA 测定.微生物学通报,2000,27(1):47-50.
- [13] YANG Hong. A Sensitive Competitive ELISA Determination of Biotin in Transformed Yeast Culture Media [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences 2003,12(4):201-206.
- [14] 林子俺,庞纪磊,黄慧,等.毛细管电色谱联用技术的研究进展[J].色谱,2010,28(3):273-283.
- [15] 湛英武,陈静.微分脉冲伏安法测定生物素[J].分析实验室,1997,16(6):54-56.
- [16] 湛英武.可还原的微分脉冲伏安行为及测定[J].武汉化工学院学报,1989,4(1):26-262.
- [17] 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.
- [18] 商允鹏,张志国,韩建春,等.食品中生物素分析方法现状及发展趋势[J].中国乳品工业,2009,37(6):35-37.
- [19] D ELA. Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins [J]. New York: Marcot Dekoker, 1985:447.
- [20] 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,1994,31(3):47-49.