

# 生物素测定方法的应用现状

刁立兰 李秀珍 王 燕

生物素,又称维生素H,是一种水溶性B族维生素。生物素的测定方法很多,早在20世纪40年代,国外就报道了利用微生物法测定生物素的含量。随着科学技术的发展,国内外报道了许多新的测定方法,主要有同位素稀释法、比色测定法、荧光测定法、化学发光法、薄层色谱法、气相色谱法、高压液相色谱法、滴定分析法、极谱法、动力学电位法、蛋白质藕合法、竞争藕合-化学发光法、酶标记竞争藕合法,此外,还有薄层层析法、毛细管电泳法、动物试验法、ELISA法、微分脉冲伏安法等方法。本文就近年来常用的测定方法的应用情况作一介绍,希望对生物素的分析研究工作有所帮助。

## 1 生物素的测定方法

### 1.1 微生物法

在生物素的测定方法中,微生物法是最为灵敏和应用最为广泛的,主要用于生物素的微量检测。其原理是在一定条件下,生物素的浓度与菌体的生长量呈线性关系,生物素浓度与菌体的生长量及生长速度成正比。微生物法可灵敏地检测出具有生物活性的生物素,这是微生物法区别于其它方法的最大特点。但由于其它营养物质能影响微生物的生长,进而影响分析结果,所以该法不具有高准确性。

殷晓红等用微生物法测定婴儿配方食品中生物素含量,方法重现性好,变异系数为3.34%,平均回收率为97%,回收率范围为88.5%~110.0%。石磊等用微生物法测定食物和饲料中生物素的含量,灵敏度达0.03 ng,样品回收率在93.4%~104.6%之间,相对标准偏差为3.1%~4.1%,测定结果准确、可靠。

### 1.2 高压液相色谱(HPLC)法

HPLC法的原理是根据被分离组分在流动相和固定相之间的各种微观作用的差异进行的。当混合物中的各组分随流动相移动时,在流动相和固定相之间进行反复多次分配,这样就使结构或性质不同的组分在移动速度上产生了差异,从而得到了分离。

刁立兰,山东轻工业学院食品与生物工程学院,250353,济南。

李秀珍、王燕(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-05-09

肖晶等用HPLC法测定保健食品中的生物素含量,检出极限为0.5 mg/kg,回收率在87%~102%之间。余林梁等用该法测定饲料中的生物素含量,其相对标准偏差为1.56%~3.46%,方法回收率在92%~102%之间。杨明远等用高效液相色谱法测定生物素等6种水溶性维生素含量,试验对每一样品平行测定6次,并对样品进行加标回收试验,相对标准偏差分别 $\leq 4.5%$ ,回收率均为92.0%~102.0%。邓富良等用HPLC法测定注射用水溶性维生素中的生物素含量,检测限为0.5 ng (20  $\mu$ l),线性范围为0.25~25.14  $\mu$ g/ml,平均回收率在99.35%以上。

采用HPLC法测定生物素含量,方法简便、快速、灵敏度高、重复性好、适应性好,但对某些成分复杂、色素较多、杂质干扰大的样品,不宜用该法检测。

### 1.3 生物传感器法

生物传感器法是利用酶放大技术应用于生物素测定的方法。Ikariyama Y等报道了1种由Clark型氧电极构成的生物传感器,检测极限达 $4 \times 10^{-9}$ ~ $4 \times 10^{-7}$  mol/l。F.Delgado Reyes等报道了1种基于生物素-链球菌抗生物素蛋白非共价相互作用的生物传感器。用该法测定天然果汁和药物中的生物素含量,方法回收率在88.1%~104.8%。J.M.Fernandez Romero等报道了1种亲和力传感器,它的原理是通过不同种类物质竞争亲和力的分析来测定低分子量化合物,该法检测极限为0.03  $\mu$ g/l,线性范围为0.045~2  $\mu$ g/l。

生物传感器法灵敏度高、方法简单,并且可以在短时间内对大量样品进行分析;缺点是不能很好的区分生物素和生物素的代谢物。

### 1.4 毛细管电泳(CE)法

毛细管电泳法是以高压电场为驱动力、以毛细管为分离通道,依据试样中各组分间淌度和分配行为上的差异实现分离。毛细管电泳法具有操作简便、分离速度快、灵敏度高( $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$  mol/l)、成本低、样品用量少(只需0.001~0.050 L)、无需引入有机溶剂、易于实现全程自动化等优点。但其难点在于样品的微量制备、电渗的控制、重复性差、定性定量困难。另外,毛细管电泳填充物的效果对分析结果有很大的影响。

J.Schiewe等用毛细管区带电泳法测定生物素,试验采用装有600(515) mm $\times$ 0.05 mm[全长(检测器长) $\times$ 半径]熔融硅毛细管和圆柱状二极管阵列检测器的

Hewlett-Packard 3DCE 系统,将标样溶解到 2 倍体积的水中,0.2  $\mu\text{m}$  滤膜抽滤,在峰电位-30 kV、温度 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8.0 磷酸盐缓冲液条件下进行,其检测极限为 3.37  $\mu\text{g/ml}$ ,线性范围为 3~200  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 1.5 荧光法

荧光法测定生物素的原理是利用生物素与异硫氰酸荧光素抗生物素蛋白反应,引起荧光强度增加,生物素浓度与荧光强度增加有一定的定量关系,用标准曲线法可求得试样中生物素的浓度,检出量可达  $10^{-6}$  级,甚至  $10^{-9}$  级,可用于微量分析。荧光法分析生物素是基于色氨酸荧光,但如果色氨酸含量高,测定结果则会受到影响,所以该方法不适合于生物性材料的生物素检测。荧光法测定生物素灵敏度高,方法简便、快速,但对供分析用试样要求甚高,试液应无色、无浑浊。

王福荣等将该法用于谷氨酸生产中生物素的测定,检测灵敏度为 1  $\text{ng/ml}$ ,测定范围为 5~40  $\text{ng/ml}$ 。王福荣等用该法测定玉米浆中生物素含量,经大孔吸附树脂处理,脱杂、脱色后测定,生物素回收率达 90%。利用荧光检测器检测生物素,通常要在样品中加入荧光剂进行衍生化处理,如人体血浆中生物素用 9-蒽基重氮甲烷衍生,可检测到人体血浆中生物素浓度范围为  $2.2\times 10^{-8}$ ~ $2.7\times 10^{-7}$   $\text{mol/l}$ 。

### 1.6 酶联免疫法

酶联免疫法(ELISA 法)测定原理基于抗原-抗体反应。目前,该法已广泛应用于各种生物大分子(如细菌、病毒及蛋白质等)、小分子(半抗原)物质等的检测。由于生物素和亲和素的结合反应快而专一,由此建立的 ELISA 法具有高度的特异性和准确度。采用 ELISA 法测定发酵液中生物素含量,对样品不需要作任何预处理,结果不受其它成分的干扰。该法操作简便,结果准确,且重复性好,特别适合于样品量多的测定。

徐幼平等用该法测定微生物发酵液中生物素的含量,方法回收率保持在 93%左右。杨红用 ELISA 法测定基因转殖酵母菌发酵液中的生物素含量,检出限为 83  $\text{ng/l}$ ,加权平均回收率为 101.3%。

### 1.7 微分脉冲伏安法

微分脉冲伏安法的电极反应机理是依据生物素阴离子的吸附作用很强,在其吸附过程中,化学因素比静电作用更强,这种化学因素涉及金属电极表面与阴离子之间的共价力,这种共价力来自于电极表面金属中的电子轨道共享离子的孤对电子。生物素分子中含有 N、S、O 等原子,这些原子上的孤对电子与金属电极表面结合,从而产生强烈的吸附作用。将本法应

用于含生物素样品的分析,可以不经分离,直接测定。

湛英武等利用微分脉冲阳极伏安法研究了生物素的电化学性质,用金属电极作工作电极,在 pH 值 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  $1.0\times 10^{-6}$ ~ $2.0\times 10^{-5}$   $\text{mol/l}$  范围内与峰高呈线性关系。湛英武等用微分脉冲伏安法测定鸡肝中生物素含量,用滴汞电极作工作电极,在 0.1  $\text{mol/l}$  LiCl 底液中生物素峰电位为 -1.50 V,生物素浓度在 5.28~87.7  $\mu\text{mol/l}$  范围内与峰高呈线性关系,回收率达 89.9%。

## 2 生物素测定方法的新进展

Mishra S 等用络合物分析法测定尿中生物素含量,该法依据链球菌抗生物素蛋白过氧化物酶对固定生物素或标准液或样品中可溶性生物素的竞争,固定的生物素蛋白过氧化物酶用四甲基对二氨基联苯在 450 nm 处进行检测。该法灵敏、简单、快速,而且可以全部自动化。

Janos Zemleni 等用 HPLC 法或抗生物素蛋白络合物分析法测定人类尿液中的生物素及其代谢物含量,通过分析人类尿液中生物素及其代谢物含量可估计出生物素在人体内的利用率。

Ulrich Holler 等用 HPLC-MS/MS 法来测定饲料、食品、药片中生物素的含量,根据生物素浓度的 HPLC-MS/MS 法分为 A、B 两种方法,方法 A 用于测定高浓度生物素(>10  $\text{mg/kg}$ ),方法回收率达 95.5%;方法 B 用于低生物素浓度的测定(<10  $\text{mg/kg}$ ),方法回收率低于 90%。

黎旭茹等用自动浊度微生物分析仪测定维生素片剂中的生物素含量,建立了应用自动浊度微生物分析仪定量测定多种维生素营养片剂中生物素含量的方法。方法应用自动浊度微生物分析仪对样品进行自动稀释,自动检测标准溶液和样品溶液中的菌体生长浊度,通过测定细菌生长和繁殖强度间接地测定出样品中的生物素含量。该法的线性范围为 0.05~0.9  $\text{ng/ml}$ ,曲线相关系数为 0.997 2,精密密度为 3.75%,回收率平均值为 102.37%。表明该方法操作简单、灵敏度高、处理量大,适合生产企业的批量质量控制和检测。

综上所述,生物素的测定方法众多,且各具特色,各有其适用范围,因此根据具体需要选择较佳的测定方法。目前,生物素的分析工作仍处于发展阶段,对生物素分析方法的进一步研究和开发灵敏度更高、方法更简单、应用范围更广的分析方法,是今后生物素分析研究工作的一个首要任务。

(参考文献 22 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, [snowyan78@tom.com](mailto:snowyan78@tom.com))