

## 高效液相色谱法测定保健食品中的生物素

肖晶<sup>1</sup> 杨大进<sup>1</sup> 张馨之<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021; 2. 北京工业大学,北京 100022)

**摘要:**为了测定保健食品中的生物素的含量,建立方便可靠的测定方法,采用高效液相色谱法对保健食品中生物素含量进行了测定。使用 Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm ×250 mm,5 μm),以乙腈+0.05 mol/L 磷酸二氢钾(15+85,pH=3.5)为流动相,检测波长 200 nm。方法的加标回收率为 86.8%~106.0%,RSD 为 8.4%,最低检出量为 0.5 mg/kg。该方法简便、准确,有良好的重现性,技术参数指标符合食品理化分析的要求。

**关键词:**营养保健品;色谱法;高压液相;生物素

### Quantitative Determination of Biotin in Health Foods by HPLC

XIAO Jing, YANG Da-jin, ZHANG Xin-zhi

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** A HPLC method was established for the determination of biotin in health foods. The HPLC used Hypersil ODS column, a mixture of CH<sub>3</sub>CN+0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15+85, pH=3.5) as mobile phase and UV detection at 200 nm. The recovery was 86.8%~106.0%, The RSD was 8.4%, the detection limit was 0.5 mg/kg. The method is simple, accurate and reproducible.

**Key word:** Dietary Supplements; Chromatography, High Pressure Liquid; Biotin

生物素即维生素 H 或辅酶 R,是一种水溶性含硫维生素。该物质为无色或白色结晶粉末,熔点为 230~232,易溶于水而不溶于酒精、氯仿及乙醚;具有旋光性,在 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中 $[\alpha]^{22}_D = 92$ ,在 234 nm 紫外区有最大吸收峰,常温下生物素不易被酸、碱、光及空气破坏,对热稳定,可进行高温消毒<sup>[1]</sup>。

虽然人体生物素的需要量很低,但它以羧化酶的辅酶形式微量存在于一切活细胞中,参与蛋白质、脂肪和糖类的代谢,是动物机体维持正常生理机能所必需的维生素之一。

对于生物素的分析,主要采用的方法是微生物法<sup>[2,3]</sup>和高效液相色谱法<sup>[4,5]</sup>,本实验在测定饲料添加剂中生物素含量的高效液相色谱法<sup>[6,7]</sup>的基础上,建立了适用于保健食品中生物素的高效液相色谱法。该方法具有定性、定量准确的优点,技术参数指标符合食品理化分析的要求。

### 1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waters 510,紫外检测器),EB-330H 型电子天平(Shimadzu Japan),B-2200E4 超声波清洗仪(Branson USA),无油真空泵

(Mich USA),水浴锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试剂 生物素对照品由 Sigma 公司提供,甲醇、乙腈为保证试剂,磷酸二氢钾、磷酸等均为分析纯,蒸馏水为重蒸水。

1.3 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS 柱,(5 μm,250 mm ×4.6 mm);流动相:乙腈+0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(15+85),用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调至 pH 值为 3.5;流速 1.0 ml/min;检测波长 200 nm;柱温:室温 25。

1.4 对照品及试样溶液的制备 对照品溶液的制备 精密称取生物素对照品 1.0 g,加流动相稀释至 100 ml,制成每 1 ml 含 1.0 ×10<sup>-2</sup> g 生物素的对照品溶液。

试样溶液的制备 取、,、,、5 种不同剂型的保健食品进行实验,分别为片剂、胶囊、胶丸、粉剂、口服液,试样的前处理如下。

固体试样 取试样研细,精密称取适量(含生物素 5.0 ×10<sup>-5</sup>~5.0 ×10<sup>-4</sup> g),置 25 ml 容量瓶中,加入适量流动相,超声处理 30 min,定容,摇匀,过滤,水浴蒸干,残渣加流动相溶解并转移至 2 ml 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,待上液相色谱仪。

液体试样 精密吸取试样适量,加流动相稀释至 25 ml,摇匀,上液相色谱仪。

作者简介:肖晶 女 硕士



## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件和提取方法的选择 流动相的选择:

对 5 种流动相分离生物素的效果进行了考察,结果如表 1 所示。

表 1 不同的流动相对生物素的分离情况

编号	流动相	保留时间(min)	分离情况
1	甲醇+水(25+75)	2.82	峰形前伸并展宽
2	乙腈+水(15+85)	2.53	峰形前伸并展宽
3	甲醇+0.05 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (25+75,pH=3.5)	9.05	峰形不对称,有拖尾现象
4	乙腈+0.05 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15+85,pH=3.5)	6.80	分离效果最好 基线分离,峰形对称
5	乙腈+0.05 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (12+88,pH=3.5)	12.11	分离效果最好 基线分离,峰形对称

由表 1 可知,乙腈+0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(15+85,pH=3.5)是分离效果最好的流动相,这是因为生物素的化学结构中带有一个-COOH 基团,是弱酸性化合物,若在乙腈+水构成的中性溶液中部分以离子形式存在,极性较弱,因此在色谱柱上几乎无保留,一般都在 3 min 之前出峰且峰形前伸并展宽,为此流动相需为弱酸性,使生物素以分子形式存在,降低极性,增加在色谱柱上的保留值并改善峰形。

2.2 试样提取方法选择 由于生物素易溶于水,故选择水、甲醇、流动相 3 种提取剂进行分析,用水、甲醇溶解超声提取的试样,生物素提取不完全,含量低。用流动相溶解超声提取的试样,生物素提取较完全,提取率达到 80% 以上,效果良好。

2.3 线性关系的考察 精密吸取  $1.0 \times 10^{-2}$  g/ml 的生物素对照品溶液 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 ml 于 50 ml 容量瓶中加流动相稀释至刻度,摇匀,制成如表 2 所示的浓度,各进样 10  $\mu$ l,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积值为纵坐标,生物素含量为横坐标绘制校正曲线,计算的回归方程为:  $y = 54\,528.5x + 9\,157.3$ ,  $r = 0.9992$ ,在  $2.1 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  g/ml 范围内有良好的线性关系。

2.4 本方法最低检出量 0.5mg/kg。

2.5 精密度试验 精密吸取生物素对照品溶液 ( $1.0 \times 10^{-3}$  g/ml) 10  $\mu$ l,重复进样 5 次,测得生物素峰面积的 RSD 为 1.8%。

2.6 稳定性试验

2.6.1 试样提取后,分别每隔 2 h 测定 1 次试样中生物素的含量。结果表明试样、在提取后 10 h 内含量不会发生显著变化,保持稳定(表 2)。

表 2 稳定性考察 峰面积

试样	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	RSD %
13700	14273	12769	12236	11564	8.5	
11357	10623	12030	10233	9996	7.2	

2.6.2 试样提取后,分别每隔 1 d 测定 1 次试样中生物素的含量。结果表明试样中生物素含量随天数的增加而变小,试样很不稳定,一周内便可观察到细丝绒状晶体析出(表 3),所以试样制备好后应尽快进行试验。

表 3 稳定性考察

试样	第 1 天	第 3 天	第 5 天
	13700	10493	9953
	11357	9834	9322

2.7 重现性试验 取试样照上述测定方法提取、测定,平行 5 份,结果生物素峰面积的 RSD 为 8.4% ( $n = 5$ ),表明该方法测定试样中的生物素含量的重现性良好。

2.8 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的生物素试样、  
、  
、  
、  
5.000 g,加入对照品溶液( $2.0 \times 10^{-4}$  g/ml) 1.0、2.0 ml,按上述色谱条件测定,计算回收率,结果(见表 4)表明本法有良好的回收率。

表 4 回收率实验结果

试样	称样量(g)	本底值(mg)	添加标准量(mg)	试验测定总量(mg)	回收率(%)
	5.012	0.170	0.200	0.342	92.4
	5.132	0.174	0.400	0.505	88.0
	5.113	0.087	0.200	0.249	86.8
	5.110	0.087	0.400	0.426	87.5
	4.998	0.205	0.200	0.402	99.3
	5.231	0.214	0.400	0.630	102.6
	5.002	0.185	0.200	0.353	91.7
	4.899	0.181	0.400	0.507	87.3
	10 ml	0.220	0.200	0.416	99.0
	10 ml	0.220	0.400	0.657	106.0

2.9 试样含量测定 对所选试样、  
、  
、  
、  
按“试样溶液的制备”进行处理,精密吸取试样溶

液,按上述色谱条件,每个试样平行测定2次,取平均值。按校正曲线法计算各试样中生物素的含量,

测定结果见表5。生物素标准品及试样( )、( )、( )谱图见图1。

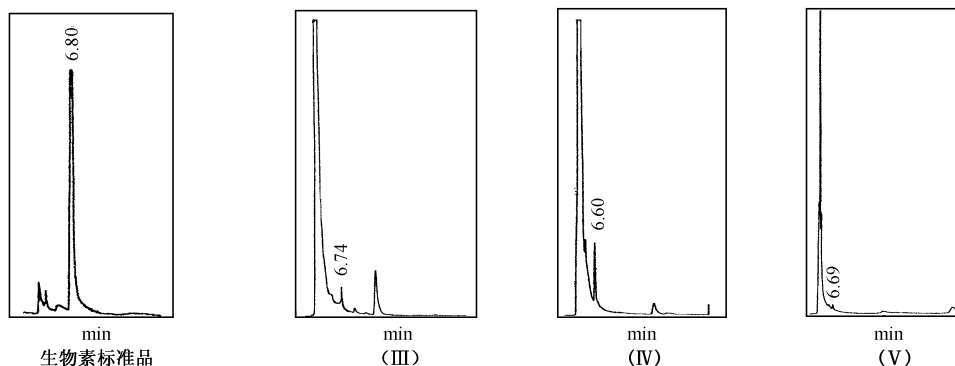


图1 生物素标准品和不同试样( )、( )、( )的色谱图

表5 试样测定结果(n=2)

供试品(剂型)	成分	生物素含量	平均值
供试品(片剂)	维生素C、维生素D、维生素B <sub>2</sub> 、烟酰胺、生物素、维生素B <sub>6</sub> 、	0.033	0.034
	维生素B <sub>12</sub> 、叶酸、泛酸	0.035	
供试品(胶囊)	维生素A、维生素B <sub>1</sub> 、维生素B <sub>2</sub> 、维生素C、维生素E、生物	0.0158	0.017
	素、叶酸、泛酸、锌、铁、硒、铜、镁	0.0182	
供试品(胶丸)	维生素C、烟酰胺、维生素E、维生素B <sub>12</sub> 、生物素、葡聚糖	0.0395	0.041
		0.0425	
供试品(粉剂)	生物素、维生素A、维生素D、维生素B <sub>1</sub> 、维生素B <sub>12</sub>	0.035	0.037
		0.039	
供试品(口服液)	维生素B <sub>6</sub> 、生物素、烟酰胺、叶酸、泛酸、锌、铁、硒	0.021(mg/ml)	0.022(mg/ml)
		0.023(mg/ml)	

对于某些成分复杂、含油脂、色素较多、杂质干扰大的保健食品,不适用该方法检测,可根据紫外分光光度法的谱图参考使用,或采用其它的前处理方法和检测手段来测定。

### 参考文献

[1] Edward Demoll, Willam Shive. Assay for biotin in the presence of dethiobiotin with lactobacillus plantarum [J]. Analytical Biochemistry, 1986, 158: 55-58.  
 [2] 殷晓红, 杨金宝, 张潇宇, 等. 婴儿配方食品中生物素的测定[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 117-119.  
 [3] 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.  
 [4] 李兰. 高效液相色谱电化学检测维生素预混料中生物素的含量[J]. 饲料营养, 1998, 4: 26-27.  
 [5] Ekpe A E. Determination of biotin in multi-vitamin and multimineral tablet by HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 16(8): 1311-1315.  
 [6] 余林梁, 黄晓兰, 吴惠勤. 饲料中生物素的高效液相色谱测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 102-104.  
 [7] 冯建文, 王凤麟. 高压液相色谱法测定生物素方法的探讨[J]. 饲料工业, 2002, 23(7): 34-35.

[收稿日期: 2005-12-07]

中图分类号: R15; O657.72; Q563.7 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2006)03-0234-03