

【化学测定方法】

营养强化剂类保健食品中生物素含量的测定

陈金东 韩素平 李蔚

(山东省疾病预防控制中心理化检验所 济南 250014)

【摘要】 目的: 采用 HPLC 测定营养强化剂类保健食品中生物素的含量。方法: 样品采用水溶剂超声波提取方法, 以 Symmetry Shield RPC₁₈ 柱为固定相, 乙腈: 0.05% 三氟乙酸水溶液 (pH = 2.5) 为流动相, 检测波长为 201 nm。结果: 生物素与其它杂质均能达到基线分离, 其色谱峰形好。生物素的浓度在 2.0 μg/ml ~ 40.0 μg/ml 时与峰面积成良好的线性关系 ($Y = -666 + 1.02 \times 10^5 X$, $r = 0.9999$), 平均回收率为 94.5% ~ 105%, 方法精密度的 RSD 为 1.93% 和 1.47% ($n = 6$)。结论: 所用方法简便, 准确, 重复性好, 适用于营养强化剂类保健食品中生物素的测定。

【关键词】 生物素; 高效液相色谱法; 营养强化剂; 保健食品

【中图分类号】 R151.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1004 - 8685(2011)09 - 2160 - 02

Determination of biotin in health - care food of nutrition enhancers

CHEN Jin - dong, HAN Su - ping, LI Wei

(Institute for Physical and Chemical Inspection, Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China)

【Abstract】 Objective: To determine the level of biotin in health - care food of nutrition enhancers by high performance liquid chromatography. **Methods:** The samples were extracted by ultrasonic wave. The stationary phase was a Symmetry Shield RPC₁₈ column and the mobile phase was 0.05% trifluoroacetic acid solution (pH 2.5). The detective wavelength was set at 201 nm. **Results:** Baseline separation was achieved for biotin and well - shaped chromatograph peak was obtained in the experiment. The calibration curve were linear over the range of 2.0 μg/ml ~ 40.0 μg/ml ($Y = -666 + 1.02 \times 10^5 X$, $r = 0.9999$). The average recoveries ranged from 94.5% to 105% and the relative standard deviations (RSD) were evaluated to be 1.93% and 1.47% ($n = 6$). **Conclusion:** The proposed method has the advantages of simple, convenient, accurate and good repeatability. It was suitable for the determination of biotin in health - care food of nutrition enhancers.

【Key words】 Biotin; High performance liquid chromatography; Nutrition enhancers; Health - care food

维生素 H 又称生物素、辅酶 R, 是水溶性维生素, 也属于维生素 B 族。它是合成维生素 C 的必要物质, 是脂肪和蛋白质正常代谢不可或缺的物质, 它是一种维持人体自然生长和正常人体机能所必须的水溶性维生素, 也是维持正常成长、发育及健康必要的营养素, 无法经由人工合成。生物素极微溶于水及乙醇, 不溶于其它常见的有机溶剂。在中等强度的酸及中性溶液中可稳定数日, 在碱性溶液中稳定性较差。在普通温度下相当稳定, 但高温和氧化剂可使其丧失活性。文献报道生物素的测定方法有微生物测定法^[1]、微分脉冲极谱法^[2]、荧光光度法^[3]等, 这些方法操作繁琐、准确度不高。已有文献报道高效液相色谱法测定发酵液^[4]、注射液中生物素^[5]的含量, 但尚无保健食品中生物素的含量测定方法报道。

1 仪器与试剂

Waters 2695 Alliance 液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器; Empower 色谱工作站; 超声波清洗器 (Elma 公司); 生物素对照品 (中国生物制品检定所, 含量 ≥ 99%); 甲醇 (色谱纯,

Merck 公司); 二乙三胺五乙酸 (DTPA) (分析纯); 三氟乙酸 (分析纯); 氢氧化钠 (分析纯); 超纯水。

1.1 方法

1.1.1 色谱条件及系统使用性

色谱柱: Symmetry Shield RPC₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 5 μm)

流动相: 乙腈: 0.05% 三氟乙酸水溶液 (用氢氧化钠稀溶液调节 pH 至 2.5) = 15: 85

流速: 1.0 ml/min

进样体积: 20 μl

检测波长: 201 nm

1.1.2 样品的制备

1.1.2.1 多种维生素复合样品 称取试样 2.0 g 于 25 ml 容量瓶中, 加水约 20 ml, 超声波提取 20 min, 冷却后用水定容至刻度, 摇匀, 离心, 上清液过 0.45 μm 滤膜。

1.1.2.2 含矿物质的维生素复合样品 称取试样 2.0 g 于 25 ml 容量瓶中, 加入 0.05 g DTPA, 加水约 20 ml, 超声波提取 20 min, 冷却后用水定容至刻度, 摇匀, 离心, 上清液过 0.45 μm 滤膜。

【作者简介】 陈金东 (1964 -), 男, 学士, 主任技师, 主要从事食品理化检验研究。

2 结果

2.1 标准曲线的制备

精密称取生物素对照品 10.0 mg,加水溶解,定容至 10.0 ml,作为对照品储备液。经过逐级稀释配制 2.0 μg/ml、5.0 μg/ml、10.0 μg/ml、20.0 μg/ml、40.0 μg/ml 的标准系列。以浓度对峰面积作标准曲线,回归得到线性方程为 $Y = -666 + 1.02 \times 10^5 X$ 相关系数 $r = 0.9999$,因此生物素在 2.0 μg/ml ~ 40.0 μg/ml 浓度范围内线性相关良好。

2.2 精密度实验

取浓度为 10.0 μg/ml 的对照品溶液,注入液相色谱仪,重复测定 6 次,峰面积 RSD 为 0.32%。

2.3 重复性实验

分别取维生素复合片、多种矿物质维生素复合片,按 1.1.2 项制得样品待测溶液,各六份,按 1.1.1 项色谱条件检测,生物素平均含量分别为 9.10 mg/100 g 和 8.46 mg/100 g, RSD 分别为 1.93%、1.47%。

表 1 重复性实验结果 (n=6)

样品名称	测定结果 (mg/100 g)	平均值 (mg/100 g)	RSD (%)
维生素复合片	9.08 9.13 9.27 ,	9.10	1.93
	8.81 9.28 9.01		
含矿物质多种	8.36 8.60 8.53	8.46	1.47
维生素复合片	8.22 8.45 8.59		

2.4 回收率试验

在样品中加入高低两种对照品适量,按 1.1.2 项制备样品溶液,按 1.1.1 项色谱条件检测,计算加标回收率,结果见表 2。

表 2 回收率实验 (n=6)

本底值 (mg)	加标量 (mg)	回收率 (%)
0.182	0.20	94.5
0.182	0.20	98.6
0.182	1.00	98.3
0.182	1.00	105

3 讨论

3.1 色谱条件的确定

3.1.1 流动相的选择 尝试了乙腈/水、甲醇/水、乙腈/磷酸缓冲液等各种流动相,结果表明以甲醇/水为流动相,生物素没有保留,以乙腈/水、乙腈/磷酸缓冲液为流动相,生物素与杂质无法达到基线分离,以乙腈、三氟乙酸溶液 (pH=2.5) 为流动相时,分离效果较好。综合考虑保留时间及分离度及流动相成分的简易,选择乙腈、三氟乙酸溶液 (pH=2.5) 为流动相,见图 1。

3.1.2 检测波长的选择 二极管阵列检测器在线扫描表明

样品中对照品中生物素均为边缘吸收,见图 2。考虑流动相的吸收情况,测定波长定为 201 nm。

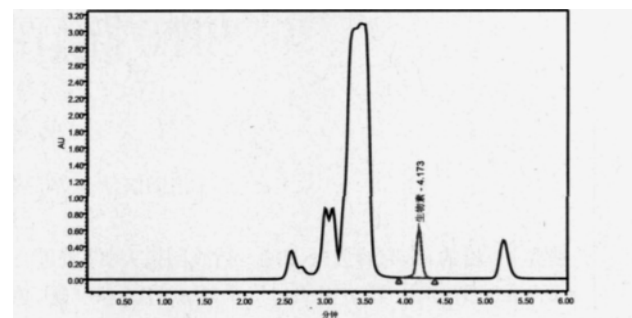


图 1 复合维生素样品中生物素的色谱图

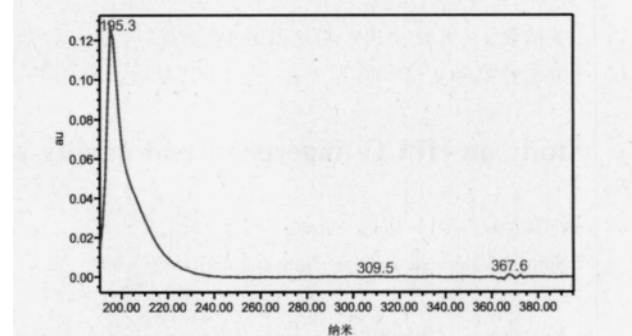


图 2 生物素光谱吸收图

3.2 生物素提取条件的选择

生物素为水溶性维生素,不溶于常见的有机溶剂,虽有文献报道用丙酮、己烷、乙酸乙酯提取,但主要是针对高糖类制剂^[6]。对于营养强化剂类的保健食品用水作为提取溶剂,完全可以满足方法要求,而且简便易行。

3.3 本方法优点

本法针对营养强化剂类的保健食品,给出了简单、快速的样品处理方式,上机检测出峰快、干扰少,具有良好的重现性和回收率,线性范围宽,应用于实际样品测定,结果令人满意。

[参考文献]

[1] 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.
 [2] 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.
 [3] 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.
 [4] 黄琴,丁安子,宋娟. 高效液相色谱法测定发酵液中生物素含量[J]. 化学与生物工程 2009, 26(8): 88-90.
 [5] 杜碧莹,刘丽芳. 注射用水溶性维生素中生物素含量的测定方法改进[J]. 临床合理用药 2010, 3(2): 11-13.
 [6] 卢京光,杨龙华,薛琦. HPLC 测定多维维生素糖浆中 D2 生物素的含量[J]. 中国新药杂志 2010, 19(22): 2106-2108.

(收稿日期: 2011-05-13)