

SPR 技术检测奶粉中生物素

孙明君^{1,2*}, 陈雍硕³, 张晓文¹, 陈 启⁴

(1. 山东出入境检验检疫局食品农产品检测中心, 青岛 266002; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266002;
3. GE Healthcare, 上海 200000; 4. 浙江省疾控中心理化分析中心, 杭州 310027)

摘 要: **目的** 利用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术, 建立快速定量测定牛奶中生物素的方法。**方法** 将生物素共价偶联到表面等离子共振芯片 CM5 表面, 并对竞争结合的生物素结合蛋白的结合浓度及芯片的再生条件进行优化, 检测芯片的稳定性。在无抗生素牛奶中添加系列质量浓度的生物素, 利用免疫竞争抑制原理构建标准曲线, 并对市售 10 个奶粉样品进行检测。**结果** 制备的芯片稳定, 50 个循环相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 10 %。日间批内同一样品差异为 8.75%, 该方法的检测限为 0.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 回收率为 80.4%~91.2%。10 个牛奶产品中生物素含量全部在固定的允许范围内。所建立的方法可以在 4 h 内完成样品的前处理和检测。**结论** 该方法是一种简便、快捷的定量检测方法。

关键词: 表面等离子共振; 生物芯片; 生物素; 微生物法

Detection of biotin in milk powder basing on surface plasmon resonance

SUN Ming-Jun^{1,2*}, CHEN Yong-Shuo³, ZHANG Xiao-Wen¹, CHEN Qi⁴

(1. The Food and Agricultural Products Testing Agency of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Food Science and Engineering, Ocean University of China College, Qingdao 266002, China; 3. GE Healthcare, Shanghai 200000, China; 4. Zhejiang CDC Physicochemical Analysis Center, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT: **Objective** To build a method of fast-testing biotin in milk by using the technique of surface plasmon resonance (SPR). **Methods** Biotin was covalently coupled to laboratory prepared CM5 chip to obtain vitamin chip. The optimal antibody working concentration and chip regeneration conditions were investigated. Meanwhile, the stability of vitamin chip was measured. A series of different concentrations of biotin was added to blank milk samples to construct a standard curve for biotin quantification according to the principle of competitive immune inhibition assay. Ten commercial milk samples were determined by the developed method. **Results** Vitamin chip displayed good stability, and the relative standard deviation(RSD)for 50 cycles was less than 10%. The limit of detection (LOD) of biotin was 0.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Biotin contents below the required threshold level were observed in none of ten milk samples. Less than four hours was consumed for the determination of biotin by the developed method. **Conclusion** This method may offer a simple and efficient approach for biotin quantification.

KEY WORDS: surface plasmon resonance; biochip; biotin; microbiological method

*通讯作者: 孙明君, 助理工程师, 主要研究方向为进出口食品农产品质量与安全检验。E-mail: sun_mingjun@hotmail.com

*Corresponding author: SUN Ming-Jun, Associate Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: sun_mingjun@hotmail.com

1 引言

生物素是维持人体正常机能与代谢活动不可或缺的水溶性B族维生素,人体无法自行制造合成,必须额外补充。奶粉作为婴幼儿主要食品,其中生物素的含量对婴儿健康的影响尤为重要。国家相关标准限制了奶粉中生物素的添加量,但仍有不少市售奶粉存在生物素的不合理添加。世界上许多国家和组织对奶粉中生物素含量的检测建立了限制标准,在我国对奶粉中生物素的检测主要依据GB 5413.19-2010食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定^[1]。目前,奶粉中生物素主要检测方法有微生物检测法,理化检测法如HPLC和免疫检测法等。

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)是在金属和电介质界面处入射光场在适当的条件(能量与动量匹配)下引发金属表面的自由电子相干振荡的一种物理现象^[2]。Kretschmann等^[3]利用衰减全反射棱镜耦合方法,实现光激发表面等离子波(surface plasma wave, SPW),为SPR传感器的商用化奠定了基础。Caelen等^[4]应用基于Biacore Q平台的SPR传感器来测定维生素B₂(核黄素),用羧甲基葡聚糖来固定核黄素,已知浓度核黄素连接蛋白与样品混合,用SPR传感器测定未结合蛋白量,奶粉基质的产品核黄素的检测限为70 ng/mL。Haughey等^[5]应用商品化的Biacore QSPR传感器测定维生素B₅(泛酸)用羧甲基葡聚糖来固定泛酸。该方法可以检测各种食物提取物中的维生素B₅(例如婴儿配方奶粉,麦片,宠物食品,鸡蛋粉),检测限为4.4 ng/mL。Indyk等^[6]证实了SPR生物传感器可以检测维生素B₈(生物素)和维生素B₉(叶酸),他们应用商品化的Biacore QSPR生物传感器竞争抑制检测,试验中他们在婴幼儿配方奶粉中检测到浓度低至2 ng/mL的生物素和叶酸。Indyk等^[7]根据竞争抑制原理用商品化的Biacore QSPR传感器检测维生素B₁₂(钴胺素)。采用胺偶联化学在传感器表面将维生素B₁₂固定在羧甲基葡聚糖层。在婴幼儿配方奶粉或源自牛的提取物中的钴胺素检测限为0.06 ng/mL。

由于SPR技术具有灵敏度高、免标记、实时、快速检测等突出优点,因此SPR传感技术已被广泛应用于药物研究^[8-9]、食品分析^[10-11]、环境监测^[12-13]等领域。20世纪90年代瑞典的Biacore公司将SPR

生物传感器技术引入兽药残留分析中,目前已生产出多种检测试剂盒,国内已有利用SPR技术进行牛奶中磺胺甲恶唑检测研究^[14]的报道。生物传感器在食品相关领域,包括农产品中的农药或除草剂残留,动物产品,如乳制品、肉类和鱼类中的食品防腐剂,营养性添加剂等的检测已成为热门。对于有机污染物、农药残留、兽药残留、微生物及微生物代谢产物等小分子物质的检测,常规情况下采用的分析方法有HPLC-MS、HPLC、GC、GC-MS等。这些方法缺点是成本高、费时费力、对环境有污染、前期准备十分繁琐,无法成为一种高效的自动化常规分析方法。国内外已有多种关于采用SPR生物传感器检测不同样品的报道,本研究利用SPR技术,建立奶粉中生物素的检测方法。该技术的检测方法,具有样品前处理相对简单、高特异性、灵敏度高、重复性好、分析快捷、定量准确等优势^[15],适用于大规模的奶粉中生物素的含量检测。

本实验基于Biacore 3000型表面等离子共振仪,采用了竞争抑制法作为检测方法,测定婴幼儿配方奶粉中的生物素含量。在奶粉样品中加入已知浓度的生物素结合蛋白(biotin binding protein, BBP),混合后的样品被流过预先包被过生物素分子的传感芯片。样品中的生物素分子会和BBP进行结合,而剩余的游离BBP则结合到芯片表面上的生物素分子,因结合而产生的信号由仪器实时记录并输出。如果样品中的生物素分子浓度越高,则游离的BBP越少,产生的信号也相对较低,反之亦然。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

奶粉(市售)、生物素传感芯片(GE 型号: CM5)、生物素结合蛋白(GE 批号: 10104787)、超纯水、Pall 0.22 μm 滤膜、1 mL 一次性无菌注射器、离心管(1.5、2.0、50.0 mL)、100.0 mL 棕色容量瓶、96孔板(圆底)、天平、离心机、Biacore 3000型表面等离子体共振仪(General Electrics, GE)、高温灭菌锅。

2.2 样品的前处理

精确称取1 g奶粉样品到50 mL离心管中,加15 mL超纯水,振荡至完全溶解后于高温灭菌锅中120 °C 20 min(使样品中蛋白质失活)。取出冷却至室温,用超纯水将体积补到20 mL,再用移液枪吸2 mL

样液至 2 mL 离心管中, 13000 r/min 离心 10 min, 用 1 mL 一次性无菌注射器吸取 1 mL 中间的溶液部分(小心避开表层的脂肪层和底部的沉淀)过 0.22 μm 滤膜到 1.5 mL 离心管中。

2.3 标准曲线的构建

用去离子水将标准样品母液(100 $\mu\text{g/mL}$)稀释为 1.23、3.70、11.1、33.3、50、75、100.0 ng/mL。该方法生物素检测范围在 2~70 ng/mL, 最佳检测范围为 10~50 ng/mL。

2.4 优化芯片

将仪器中的维护芯片更换为 Sensor Chip Biotin, 加入足够量的缓冲液(0.01 mol/L HEPES、0.15 mol/L NaCl、3 mmol/L EDTA、0.005% Surfactant p20)于瓶中并放置 Buffer 隔间, 运行 Prime 程序, 之后选择通道, 设定进样位置和流速 40 $\mu\text{L/min}$, 然后加入 200 μL Conditioning solution 于 1.5 mL 离心管中, 放入样品盘中, 连续进行 3 次洗针。

2.5 回收率实验

从 10 个检测样品中采用简单随机抽样选取 3 个样品, 每个样品加标量 20 ng/mL, 做回收率实验。

2.6 样品检测

将样品和标准样品按照编辑好的程序并对应样品位置和体积用移液枪加样。加完样品后用铝箔条封盖 96 孔板, 并放入仪器样品盘中。在 1.5 mL 离心管中分别加入对应体积的生物素结合蛋白和再生试剂, 并放入样品盘中。保存文件后, 点击开始进行检测。

3 结果与分析

3.1 再生条件的优化与芯片稳定性

在筛选芯片再生条件中, 我们分别对甘氨酸(pH 1.5, pH 2.0, pH 2.5 和 pH 3.0)、氢氧化钠(20、50、75 mmol/L)以及氯化钠(1、2 mol/L)等条件进行了测试。针对每个再生试剂, 又分别对流速(10、20、40 $\mu\text{L/min}$)和再生时间(30、60 s)进行测试。最终确定 50 mmol/L 氢氧化钠, 流速 40 $\mu\text{L/min}$, 进样 30 s 作为再生条件。

将生物素结合蛋白进样时间设为 100 s, 流速 40 $\mu\text{L/min}$ 。再生条件为 50 mmol/L 氢氧化钠, 流速 40 $\mu\text{L/min}$, 进样 30 s。依照进样—再生的顺序作为一个循环, 共进行 50 个循环进行芯片稳定性测试, 见图 1。

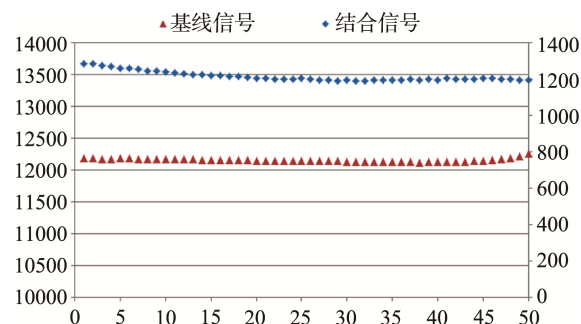


图 1 芯片稳定性测试

Fig. 1 Stability test of chip

左边的 Y 轴是基线信号, 右边的 Y 轴是结合信号

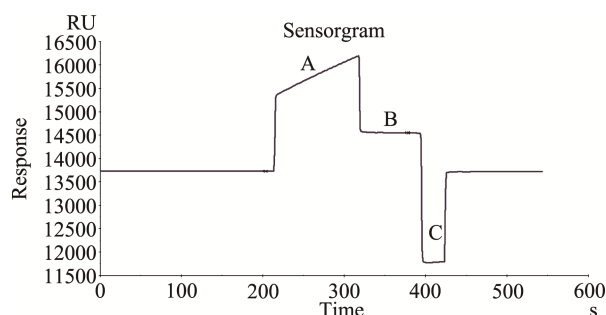


图 2 芯片测试反应过程

Fig. 2 Chip test reaction process

A: 样品进样; B: 样品解离; C: 再生

芯片测试反应过程见图 2。实验结果表明, 结合信号平均响应值为 1216 RU, 50 个循环的结合信号的相对标准偏差(RSD)为 2.2%, 每一次再生都可以将结合到芯片上的生物素结合蛋白完全洗脱下, 同时对蛋白的再次结合影响微乎其微。

3.2 标准曲线的建立

根据在不同浓度下得到的结合信号, 采用 4 因子非线性回归进行拟合, 得到图 3 标准曲线。

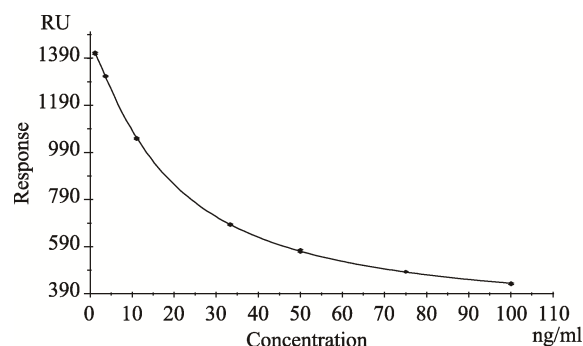


图 3 生物素标准曲线

Fig. 3 Calibration curve of biotin

应用 logistic 四因子回归分析建立标准曲线, 公式($Y=R_{hi}-(R_{hi}-R_{lo})/(1+(Conc./A1)^{A2})$), 标准曲线的 $R^2=0.99993$, 表明回归方程拟合的非常好。

3.3 不同方法的样品测定结果的比较

目前, 根据国家标准 GB5413.19-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定^[1]采用微生物法来测定婴幼儿食品和乳品中的生物素含量, 本研究采用商品化试剂盒(拜发公司)采用微生物微量滴定法来作方法比较。对市售 10 个奶粉分别做了生物传感器与微生物法检测生物素的试验, 结果见表 1。

从试验数据来看, 除个别数据 RSD > 10%外, 其他数据相对标准偏差均在 10%以内, 日内精密度试验所得结果也比较满意。由于 GB5413.19-2010^[1]对婴幼儿配方奶粉中生物素含量的检测所得的结果是游离生物素总量, 因为生物素本身并不稳定, 并且有类似物的干扰, 同时在日常的检测中也经常出现同一批样品初检与复检所得检测结果差异很大的情况,

表 1 两种方法检测生物素的数据结果(n=3)
Table 1 Comparing the data of biotin assay in two different methods (n=3)

样品	Biacore (μg/100 g)		微生物法(μg/100 g)		产品标识值 (μg/100 g)
	平均值 (AVG)	相对标准偏差 (RSD)	平均值 (AVG)	相对标准偏差 (RSD)	
1	95.36	7.23%	35.12	0.5%	15
2	87.66	5.83%	59.3	4.7%	20
3	52.40	7.85%	19.2	11.9%	15
4	62.35	6.48%	30.72	9.0%	15
5	42.29	4.41%	21.00	10.6%	18
6	56.71	0.73%	32.4	9.3%	15
7	53.77	4.88%	43.9	6.0%	18
8	38.94	10.81%	21.1	6.5%	20
9	47.91	9.20%	20.48	10.2%	15
10	55.16	6.16%	41.4	6.0%	20

因此与微生物法比较后同一样品的试验结果有一定出入, 但根据 GB10765-2010、GB10767-2010 所得的结果均判定为合格且是可以接受的。

3.4 回收率

从 10 个检测样品中随机采用简单随机方法选取 3 个样品, 编号分别是 3、6、8 号, 每个样品加标量 20 ng/mL, 并按照前处理步骤做回收率实验。通过所检测的数据, 我们计算后得到 3 号样品回收率为 80.4%、6 号样品回收率为 88.9%、8 号样品回收率为 91.2%, 结果在预期范围之内, 详见表 2。

表 2 样品回收率数据(n=6)
Table 2 Data of sample recovery rate(n=6)

回收率 (%)	回收率均值	标准偏差 (SD)	相对标准偏差 (RSD)
样品 3	80.4%	12%	15.0%
样品 6	88.9%	8.7%	9.8%
样品 8	91.2%	16.7%	18.3%

3.5 检测限

取 3 份空白样品进行检测, 以其信号平均值加上 3 倍的标准偏差值作为该方法的最低检测线。根据实验结果, 最低检测限约为 1 ng/mL。

表 3 日内精密度数据(n=7)
Table 3 Data of the intra-day precision(n=7)

日内精密度 (μg/100 g)	平均值	标准偏差 (SD)	相对标准偏差 (RSD)
样品 6	13.02	1.14	8.75%

以上试验可以得出: 相对标准偏差小于 10%, 日内精密度试验 RSD 为 8.75%(见表 3), 随机选取的 3 个样品回收率在 80.4%~91.2%之间。样品只需简单的稀释、离心处理即可直接检测, 可以实测奶粉样品中的生物素质量浓度范围为 2.0~70 ng/mL。单个样品测量用时 2 min, 可在 4 h 内完成 20 个样品的检测。相对传统的 HPLC 和 GC 检测技术, 本方法样品前处理简单, 同时也缩短了测量时间, 是一种高效便捷的测量方法。

4 结 论

本研究通过对照奶粉中添加不同质量浓度的生物素得到标准曲线, 与缓冲液^[16]相比, 更加合理, 减少了奶粉样品中其他物质的影响, 最低检测质量浓度为 0.1 μg/100 g。并且优化了再生条件, 提高了芯片的稳定性。从 10 个样品的检测结果来看, 与微生物法检测结果相比, 部分样品所测得的数值要偏高于

微生物法的检测结果。其主要原因紫外线会导致奶粉基质中维生素 B₂(核黄素)降解为异络嗪, 而异络嗪会与生物素结合蛋白结合, 产生交叉反应。从而进一步导致游离的生物素结合蛋白减少, 造成生物素的检测结果偏高。因此, 我们需要防止样品在制备和检测过程直接照射到紫外线。或者在样品上样之前, 在每个样品中添加 80 微克核黄素结合蛋白(riboflavin-binding protein, Sigma R8628), 就可以有效抑制异络嗪的干扰。虽然在实验中, 部分生物素检测结果略有偏高, 但其浓度依然在国家相关标准的允许范围之内, 是可以被接受的。

参考文献

- [1] GB 5413.19-2010 婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定[S]. GB 5413.19-2010 Determination of free biotin in foods for infants and young children, milk and milk products[S].
- [2] Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B*, 1999, 54: 3–15.
- [3] Kretschmann E, Raether H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light[J]. *Z Naturforsch*, 1968, 23A: 2135–2136.
- [4] Caelen I, Kalman A, Wahlström L. Biosensor-based determination of riboflavin in milk samples [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(1): 137–143.
- [5] Haughey SA, O’Kane AA, Baxter GA, *et al.* Determination of pantothenic acid in foods by optical biosensor immunoassay [J]. *JAOAC Int*, 2005, 88: 1008–1014.
- [6] Indyk HE, Evans EA, Bostrom Caselunghe MC, *et al.* Determination of biotin and folate in infant formula and milk by optical biosensor-based immunoassay [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(5): 1141–1148.
- [7] Indyk HE, Persson BS, Caselunghe MC, *et al.* Determination of vitamin B12 in milk products and selected foods by optical biosensor protein-binding assay: method comparison [J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(1): 72–81.
- [8] Thillaiaynagalingam P, Newcombe AR, Donovan O, *et al.* Detection and quantification of affinity ligand leaching and specific antibody fragment concentration within chromatographic fractions using surface plasmon resonance[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 48(2): 179–188.
- [9] Li J, Wu H, Hong J, *et al.* Odorranalectin is a small peptide lectin with potential for drug delivery and targeting[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(6): 2381.
- [10] Rebe Raz S, Bremer MG, Giesbers M, *et al.* Development of a biosensor microarray towards food screening using imaging surface plasmon resonance[J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24(4): 522–577.
- [11] Labib M, Hedstrom M, Amin M, *et al.* A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 634(2): 255–261.
- [12] Zhang WW, Chen YC, Luo ZF, *et al.* Analysis of 17 β -estradiol from sewage in coastal marine environment by surface plasmon resonance technique[J]. *Chem Res Chin Univ*, 2007, 23(4): 404–407.
- [13] Khalavka Y, Becker J, Sonnichsen C. Synthesis of rod-shaped gold nanorattles with improved plasmon sensitivity and catalytic activity[J]. *J American Chem Soc*, 2009, 131(5): 1871–1875.
- [14] 周宏敏, 欧惠超. 利用表面等离子共振技术快速检测牛奶中的甲恶唑[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 168–171.
Zhou HM, Ou HC. Using surface plasmon resonance technology for rapid detection of sulfamethoxazole in milk[J]. *Food Sci*, 2010, 31(6): 168–171.
- [15] 郭文林. 利用表面等离子谐振免疫生物传感器检测动物组织中的兽药残留[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(11): 31–36.
Guo WL. Veterinary Inspection of animal tissue surface plasmon resonance biosensor Residues Utilization[J]. *China J Vet Med*, 2004, 38(11): 31–36.
- [16] Gao YL, Guo F, Gokavi S, *et al.* Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formula using biosensor-based assays[J]. *Food Chem*, 2008, 110(3): 769–776.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



孙明君, 助理工程师, 主要研究方向为进出口食品农产品质量与安全检验。
E-mail: sun_mingjun@hotmail.com