

基于国标法和试剂盒法对乳粉质控样品 生物素含量的测定

梁美丹, 陈楷, 易云婷, 林秀敏, 张彬彬, 肖剑*

(广州市食品检验所, 广州 510410)

摘要: **目的** 用国标法和试剂盒法对乳粉质控样品的生物素含量进行测定, 评价两种方法对生物素检测结果差异性。**方法** 根据两种方法中植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对游离生物素的特异性和灵敏性, 测定菌株的生长情况从而得到乳粉中生物素的含量。**结果** 国标法测定所得标准曲线范围为 0~1 ng/100 g($R^2=0.9993$), 试剂盒法测定所得的标准曲线范围是 0~0.72 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ($R^2=0.9983$), 线性关系良好; 两种方法测定生物素的含量差异不显著($P>0.05$), 结果均符合要求并在给定值的范围内。**结论** 两种方法对质控样品检测结果准确, 稳定性好, 适用于乳粉中生物素的检测。

关键词: 生物素; 国标法; 试剂盒法; 乳粉质控样

Determination of the biotin content in quality control milk powder by national standard method and kit method

LIANG Mei-Dan, CHEN Kai, YI Yun-Ting, LIN Xiu-Min, ZHANG Bin-Bin, XIAO Jian*

(Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 510410, China)

ABSTRACT: Objective The biotin content in quality control milk powder was determined by national standard method and kit method, and the differences of results by two methods were evaluated. **Methods** *Lactobacillus plantarum* had the characteristics of sensitivity and specificity to the free biotin, it could reflect the biotin content in milk powder by measuring the growth of the strain. **Results** The results showed that the interrelating coefficient of the two methods were good, the standard curve of national standard method was in the range of 0~1 ng/100 g($R^2=0.9993$) and the kit method was 0~0.72 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ($R^2=0.9983$). The content of biotin that tested by two methods had no significant difference($P>0.05$), and they all conformed to the requirements of the test, which were with the scope of the limited range. **Conclusion** It is feasible to detect the biotin in milk powder by national standard method and kit method for its high accuracy.

KEY WORDS: biotin; national standard method; kit method; quality control milk powder

1 引言

生物素(biotin)又称维生素 H, 是一种水溶性维生素, 是人体不可缺少的营养物质, 也是重要的食品

添加剂之一, 它在机体内碳水化合物、脂类、蛋白质和核酸的代谢过程中发挥着重要作用^[1]。生物素的用途十分广泛, 在医学上用于治疗癫狂患者和先天性婴儿营养缺陷, 修复人体蛋白损伤, 预防少年白发脱

*通讯作者: 肖剑, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。E-mail: xjhq521@163.com

*Corresponding author: XIAO Jian, Engineer, Guangzhou Institute of Food Inspection, No. 58, Tangxin West Street, Sanyuanli Road, Guangzhou 510410, China. E-mail: xjhq521@163.com

发,改善老弱病人、孕妇及各种重危病人的营养,降低Ⅰ型糖尿病人的血糖水平;在发酵生产中,常用于调整菌量和产酸率;在农业畜牧业上,生物素还被用作饲料添加剂、植物生长促进剂等^[2]。

生物素检测方法有微生物法^[3~5]、色谱法^[6~9]、酶联免疫法^[10,11]、荧光法^[12]、分子印迹法^[13]等。目前为止,美国分析化学家协会(AOAC)和中国国家标准将微生物法作为婴幼儿食品和乳品中游离生物素检测的首选方法,其基本原理是利用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对游离微生物的特异性和灵敏性,定量测定出试样中待测物质的含量^[14]。由于微生物检验法具有较高的灵敏度和可靠性,广泛得到国际权威机构的认可,国内外也开发了以微生物法为原理相关的微孔板试剂盒^[15,16]。

本文利用国家标准法和试剂盒方法对乳粉质控样品进行测定,通过重复试验和加标回收试验综合分析比较两种方法对检测结果的差异性。

2 材料与方法

2.1 样品及标准品

乳粉质控样品:购于中国检验检疫科学研究院测试评价中心的婴儿配方乳粉,编号为QC-C026(证书结果证明QC-C026样品中生物素的含量指定值为22.550 μg/100 g,满意值范围为16.432~28.758 μg/100 g)。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*):购于美国Microbiologics,编号为ATCC 8014。

生物素(d-Biotin)标准品:购于德国Dr. Ehrenstorfer,纯度≥99%(Lot NO: 30712, CAS: 58-85-5)。

2.2 主要培养基和试剂

乳酸杆菌琼脂培养基(美国BD公司)、乳酸杆菌肉汤培养基(美国BD公司)、生物素测定用培养基(美国BD公司)、生物素检测试剂盒(德国拜发公司)。

2.3 主要仪器设备

分光光度计(Thermo Helie Gamma)、生化培养箱(广东环凯SP250)、酶标仪(Bio-Rad iMark)、酸度计(德国testo sto 206-pH1)、离心机(Sigma 1-14K)。

2.4 试验方法

2.4.1 国家标准法

参照国家标准GB 5412.19-2010^[14]进行样品的处理和试验。

2.4.2 试剂盒法

2.4.2.1 样品处理

称取1 g混匀后的样品,加入无菌蒸馏水定容到50 mL,于95 ℃水浴提取30 min,在提取过程中需振荡数次。提取后迅速冷却至室温,用无菌过滤器将样品过滤。

2.4.2.2 培养基制备

将10 mL无菌水加入生物素检测培养基中,于95 ℃水浴5 min,期间振荡多次使培养基充分溶解,然后迅速冷却至室温,用0.2 μm无菌过滤器将培养基过滤至无菌离心管中备用。

2.4.2.3 标准品的配制

取出试剂盒标准品,根据提示加入相应的无菌水,充分溶解后制成标准品浓缩液,并根据表1要求将标准品浓缩液进行稀释。

表1 试剂盒法生物素标准品稀释
Table 1 The dilution of biotin standard in kit method

序号	无菌水(μL)	标准品浓缩液(μL)	标准曲线浓度(μg/100 g)
1	900	0	0
2	900	100	0.08
3	350	150	0.24
4	250	250	0.40
5	150	350	0.56
6	50	450	0.72

2.4.2.4 接种、培养

取出所需数量的微孔条至于微孔架上,依次将150 μL生物素检测培养基、150 μL标准品或样品加入微孔中,每个样品(包括标准品和待测样品)三次重复。接种完后用粘合箔盖住微孔板,于37 ℃培养箱避光孵育44~48 h。

2.4.2.5 数据读取

将孵育好的微孔板放置桌面上,将其在桌面上来回振荡,使微生物溶解在培养基中。小心揭开粘合箔,使用移液枪头或针破坏微孔中液体表面的泡沫。用酶标仪在波长为630 nm下测定浑浊度。

2.4.2.6 结果计算

利用软件“RIDAWIN”绘制生物素试剂盒测定法标准曲线,并根据标准曲线计算出相应的浓度,根据计算公式得出样品中生物素含量。

$$\text{生物素含量}(\mu\text{g}/100\text{ g或mL})=\frac{\text{样品浓度}\times\text{稀释倍数}}{\text{样品总量}(\text{g或mL})}$$

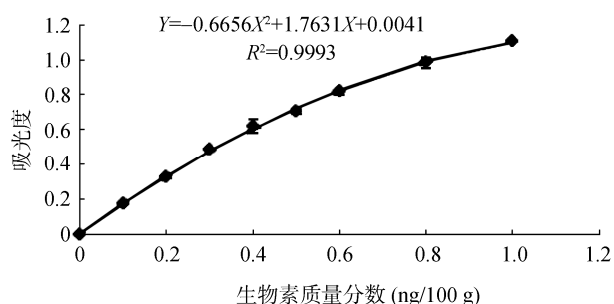
2.5 统计分析

每次试验重复4次,数据统计分析采用Excel和SPSS19.0。

3 结果

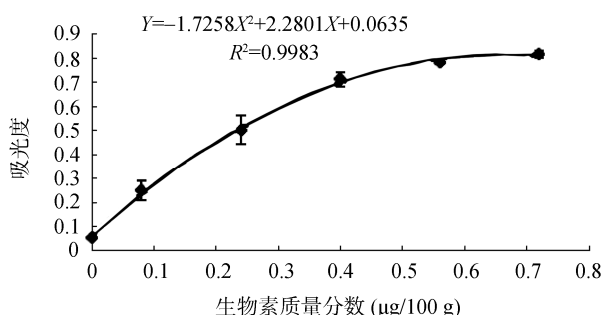
3.1 标准曲线绘制

以生物素标准品的质量分数作为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。国标法测定生物素的质量分数为0~1 ng/100 g时,标准曲线的线性关系良好,回归方法 $Y=-0.6656X^2+1.7631X+0.0041$, $R^2=0.9993$ (图1a);试剂盒法标准曲线质量分数在0~0.72 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 时,标准曲线的线性关系良好,回归方法 $Y=-1.7258X^2+2.2801X+0.0635$, $R^2=0.9983$ (图1b)。两种检验方法的 R^2 值均大于0.99,符合标准GB 27404-2008^[17]中线性回归方程相关系数的要求。



(a) 国标法测定生物素标准曲线

(a) The standard curve of biotin detected by national standard method



(b) 试剂盒法测定生物素标准曲线

(b) The standard curve of biotin detected by kit method

图1 生物素标准曲线图

Fig. 1 The standard curve of biotin

3.2 质控样品中生物素的测定

利用国标法和试剂盒法将质控乳粉样品进行生物素测定,4次重复试验检测结果如表2。国标法中RSD为3.44%,试剂盒法为3.11%,两种方法重复试验中相对标准偏差较低,说明重复性良好,数据可靠。将两种方法检测结果进行显著性差异分析,发现国标法和试剂盒法测定生物素的结果差异不显著($P>0.05$)。

乳粉质控样品生物素的测定值范围是16.432~28.758 $\mu\text{g}/100\text{ g}$,指定值为22.550 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。国标法和试剂盒法生物素的检测结果均在质控样品测定值的范围之内,与指定值相比分别低9.89%和8.82%,属于可接受水平。

3.3 加标回收测定

对质控乳粉进行加标回收试验,取样并加入已知浓度的标准品溶液,国标法和试剂盒法测定并计算其加标回收率,结果见表3。国标法中加标量为0.15 μg 时,回收率为100.97 $\pm$ 11.31%;加标量为0.3 μg 时,回收率为109.57 $\pm$ 2.70%,两次加标回收率结果比较理想,符合要求。试剂盒法中加标量为0.1 μg 时,回收率为100.84 $\pm$ 5.39%;加标量为0.15 μg 时,回收率较低为83.67 $\pm$ 1.43%,但两次加标的回收率结果都符合要求。

4 讨论

目前,生物素微生物检测法被美国AOAC和中国国家标准选定为仲裁方法,该法是利用植物乳杆菌对有活性生物素的特异性,从而将有活性的生物素检测出来^[14]。只有具有生物活性的生物素才能被人或动物吸收利用,因此微生物法更适用于维生素的测定^[15]。

在本文中基于微生物检测的原理,分别使用国标法和试剂盒法,采用多次重复试验和加标回收的方法对质控乳粉中生物素含量测定,结果发现国标法检测结果比试剂盒法结果略高(1.18%),与徐琼等^[15]研究结果一致,利用卡法分析两种方法测得生物素含量的差异性,结果显示两种方法所测定生物素含量差异不显著($P>0.05$),且两种方法检测结果比乳粉质控样品指定中位值略低(国标法比中位值低9.89%,试剂盒法比中位值低8.82%),但在其给定的范围值内,表明两种方法数据结果准确可靠,加标回收率均符合要求。

表 2 两种方法对生物素测定结果
Table 2 The result of biotin detected by two methods

重复试验	国标法(μg/100 g)	平均值(μg/100 g)	RSD(%)	试剂盒法(μg/100 g)	平均值(μg/100 g)	RSD(%)
1	19.40	20.32±0.70	3.44	19.74	20.56±0.64	3.11
2	20.87			21.10		
3	20.13			20.35		
4	20.87			21.04		

表 3 两种方法回收率测定结果
Table 3 The recovery rates of biotin detected by two methods

方法	加标量(μg)	测定值(μg/100g)	回收率(%)	平均值(%)
国标法	0.15	27.93	102.62	100.97±11.31
		28.92	115.97	
		27.44	96.01	
		26.94	89.27	
		36.07	106.27	
	0.3	36.56	109.57	109.57±2.70
		36.56	109.57	
		37.05	112.88	
	0.1	30.25	98.31	100.84±5.39
		30.75	103.38	
31.10		106.93		
试剂盒法	0.15	29.90	94.75	83.67±1.43
		33.04	84.69	
		32.74	82.65	
		33.10	85.10	
		32.68	82.25	

备注: 国标法中加标量 0.15 μg 称取样品质量 $m_1=2.0227$ g, 加标量 0.3 μg 称取样品质量 $m_2=2.0241$ g; 试剂盒法中加标量 0.1 μg 称取样品质量 $m_3=1.0145$ g, 加标量 0.15 μg 称取样品质量 $m_4=1.0179$ g。

在国标方法检验中,菌种的活性对检测结果有较大的影响,因此在试验过程菌种需多次传代以增强活力,但菌种活化代数不宜超过 5 代,菌悬液吸光度(A)在 0.50~0.64 较为适宜^[5],试验过程中加入标准溶液时要准确快速,避光操作,避免维生素的损失;所用的移液管、试管、烧杯等玻璃仪器需清洗干净并烘干;操作过程中应注意防止其他微生物的污染。试剂盒法操作步骤较国标法简单,虽平行性不如国标方法好,但结果误差都在可接受范围内,整个试验过程中注意严格无菌操作,检测所用的离心管、过滤器要高温高压灭菌;样品处理完后要迅速降温,避免生

物素的降解。

5 结 论

综上所述,国家标准法和试剂盒法两种方法对生物素的测定,其标准曲线线性良好($R^2>0.99$),重复线性好,结果准确可靠,可适用于乳粉中生物素的测定。

参考文献

[1] Nojiri S, Kamata K, Nishijima M. Fluorescence detection of biotin using post-column dedvatization with OPA in high

- performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 16(8): 1357-1362.
- [2] 李秋顺, 郑晖, 孟庆军, 等. 生物素的测定方法及应用进展[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 103-107.
- Li QS, Zheng H, Meng QJ, *et al.* Progress of determination methods and applications of biotin [J]. Food Ind, 2012, 33(5): 103-107.
- [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(05): 96-98.
- Tang SP, Li B, PENG C, *et al.* Study on microbiological method for biotin determination in infant formula milk power [J]. Food and Mach, 2008, 24(05): 96-98.
- [4] 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.
- Yin XH, Yang JB, Zhang XY, *et al.* Determination method for biotin in infants formula food [J]. Chin Dairy Ind, 2002, 30(5): 117-119.
- [5] 秦磊磊, 陈绪华, 刘健, 等. 微生物法测定婴幼儿奶粉中游离生物素条件优化[J]. 现代农业科技, 2013, (15): 296-297.
- Qin LL, Chen XH, Liu J, *et al.* Optimization of determination conditions of free biotin of infant milk powder by microbiological method [J]. Mod Agric Sci Technol, 2013, (15): 296-297.
- [6] 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(自然科学版), 2007, 35(5): 73-76, 80.
- Pu YJ, Zhou ZQ, Yang MM, *et al.* Determination of biotin in broth system by reverse-phase high performance liquid chromatography [J]. J Northwest Agric Forest Univ (Nat Sci Ed), 2007, 35(5): 73-76, 80.
- [7] 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.
- Huang Q, Ding AZ, Song J. Determination of content of biotin in fermentation liquid by HPLC [J]. Chem Biol Eng, 2009, 26(8): 88-90.
- [8] Ekpe AE. Determination of biotin in multi-vitamin and multi-mineral tablet by HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 16(8): 1311-1315.
- [9] 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.
- Xiao J, Yang DJ, Zhang XZ. Quantitative determination of biotin in health foods by HPLC [J]. Chin J of Food Hyg, 2006, 18(3): 234-236.
- [10] 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[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 47-50.
- Xu YP, Chen ZX, Wu JX, *et al.* ELISA determination of biotin in fermentation liquid [J]. Microbiology, 2000, 27(1): 47-50.
- [11] Chang YS, Wu CH, Chang RJ, *et al.* Determination of biotin concentration by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method [J]. J Biochem Biophys Meth. 1995, 29(3-4): 321-329.
- [12] Thompson LB, Schmitz DJ, Pan SJ. Determination of biotin by high-performance liquid chromatography in infant formula, medical nutritional products, and vitamin premixes [J]. J Aoac Int, 2006, 89(6): 1515-1518.
- [13] Piletska E, Piletsky S, Karim K, *et al.* Biotin-specific synthetic receptors prepared using molecular imprinting [J]. Anal Chim Acta, 2004, 504(1): 179-183.
- [14] GB5413.19-2010 婴幼儿食品和乳品中游离生物素的测定[S]. GB5413.19-2010 Determination of free biotin in foods for infants and young children, milk and milk Products [S].
- [15] 徐琼, 王志伟, 冯琦, 等. 国标法和试剂盒法对婴幼儿食品中生物素质量分数的测定[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(7): 56-59.
- Xu Q, Wang ZW, Feng Q, *et al.* Determination the content of biotin in infant foods GB method kit method [J]. Chin Dairy Ind, 2014, 42(7): 56-59.
- [16] 张旺, 邹志飞, 袁慕云, 等. 微孔板试剂盒法检测婴幼儿配方奶粉中叶酸质量分数[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(2): 59-60, 64.
- Zhang W, Zou ZHF, Yuan MY, *et al.* Micro plate kit method for the determination of folic acid in infant formula milk powder [J]. Chin Dairy Ind, 2013, 41(2): 59-60, 64.
- [17] GB 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. GB 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



梁美丹, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检测技术。
E-mail: meidanamy@126.com



肖 剑, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测技术。
E-mail: xjqh521@163.com