

传统微生物法与试剂盒法测定乳粉中生物素比较

程敏*, 刘锦光

(雅培(嘉兴)营养品有限公司, 嘉兴 314000)

摘要: **目的** 比较微生物法和试剂盒法测定配方奶粉中生物素的结果。**方法** 用国标 GB 5009.259-2016 和试剂盒方法测试标准参考物质和不同配方奶粉中生物素含量, 对结果进行精密度和相对偏差比较。**结果** 微生物方法测得标准参考物质生物素平均值为 173.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 试剂盒法测得标准参考物质生物素平均值为 199.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 与标准物质指定值(189 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)相对标准偏差分别为 8.49%, 5.34%; 对不同配方奶粉生物素检测, 2种方法的相对标准偏差<10%。**结论** 微生物法与试剂盒法测试配方奶粉中生物素结果接近, 可综合实验室人员和经济条件选择适当的方法进行测试。

关键词: 配方奶粉; 生物素; 微生物法; 试剂盒法

Comparison for determination of biotin in milk powder by microbiological method and kit method

CHENG Min*, LIU Jin-Guang

(Abbott (Jiaxing) Nutritionals Co., Ltd., Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT: Objective To compare the results of determination of biotin in formula milk powder by microbiological method and kit method. **Methods** The content of biotin in standard reference substance and different formula milk powder was tested by GB 5009.259-2016 and kit method, and the precision and relative deviation of the results were compared. **Results** The mean value of standard reference substance biotin measured by microbial method was 173.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, and the average value of standard reference substance biotin by kit method was 199.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. The relative standard deviation from the reference value of the reference substance (189 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) was 8.49% and 5.34%, respectively. The relative standard deviations of the 2 methods were less than 10% for the detection of biotin of different formulas. **Conclusion** The results of determination of biotin in formula milk powder by microbiological method and kit method are similar, and the laboratory personnel and economic conditions can be integrated to select the appropriate method.

KEY WORDS: formula powder; biotin; microbial method; kit method

1 引言

婴幼儿配方奶粉是指以牛乳(或羊乳)及其加工制品为主要原料, 加入适量的维生素、矿物质和其他辅料, 经加工制成的供婴幼儿食用的产品。配方奶粉是婴幼儿除母乳外主要的营养来源^[1], 对维生素和其他成分的添

加量有严格的要求。

维生素是机体正常代谢和生理机能不可缺少的一类有机化合物, 是婴幼儿配方奶粉的重要组成部分, 按其溶解性分为水溶性和脂溶性维生素^[2]。生物素是一种较稳定的水溶性维生素, 又称维生素 B₇, 是构成羧化酶的重要成分^[3], 是脂肪和蛋白质正常代谢不可或缺的物质。

*通讯作者: 程敏, 硕士, 主要研究方向为食品科学与安全。E-mail: chengmin898xp@126.com

*Corresponding author: CHENG Min, Master, Abbott (Jiaxing) Nutritionals Co., Ltd., Jiaxing 314000, China. E-mail: chengmin898xp@126.com

表2 样品管的制备
Table 2 Preparation of samples

试管号	1	2	3	4	样品空白
蒸馏水/mL	4	3	2	1	0
样品溶液/mL	1	2	3	4	5
培养基/mL	5	5	5	5	5

表3 试剂盒生物素标准溶液制备
Table 3 Preparation of standard curves for the test kit method

	标准曲线浓度 ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)	无菌水 / μL	标准品储备溶液 / μL
空白	0	900	0
标准品 1	0.08	900	100
标准品 2	0.24	350	150
标准品 3	0.40	250	250
标准品 4	0.56	150	350
标准品 5	0.72	50	450

(2) 样品制备

参考 VitaFast 维生素检测试剂盒使用说明书, 准确称取 1 g 的样品至 50 mL 无菌试管中, 加无菌蒸馏水至 40 g, 混匀, 用 HCl 或 NaOH 调整 PH 值至 8.0 ± 0.2 。95 °C 以上水浴中提取 30 min, 每 5 min 振荡 1 次, 确保试管塞紧闭。之后, 迅速冷却至 30 °C 以下。无菌移取 1.4~2.0 mL 到无菌离心管(1.5~2.0 mL)中, 然后 8000 r/min 离心 5 min。根据样品中生物素的含量对上清液进行稀释。

(3) 培养基制备

取 10 mL 无菌水加入生物素测定培养基瓶中, 振荡摇匀, 95 °C 以上水浴 5 min。其间振荡至少 2 次, 并确保瓶子封闭。迅速冷却至室温 30 °C 以下。使用 0.2 μm 无菌滤膜过滤培养基至 15 mL 无菌离心管中。

(4) 加样培养

按需取出微孔板条并在板上固定, 移取 150 μL 培养基至微孔中, 再加入 150 μL 标准品或稀释的样品, 用粘合箔盖住板条或微孔, 除去粘合箔上的保护层。做好标记, (37 ± 1) °C 避光培养 44~48 h。

(5) 读数

从培养箱中取出微孔板, 在桌面上振荡混匀液体, 混匀后撕掉粘合箔, 用酶标仪读数。以标准品生物素含量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 依据标准曲线计算样品中生物素含量。

3 结果与分析

3.1 SRM1869 不同测试方法结果

用 2 种方法分别测试 SRM1869, 得到 10 组数据见表 4。从数据可以看出, 微生物法和试剂盒法相对标准偏差均小于 10%, 2 个方法的精密度都较好, 试剂盒方法较微生物法平均值更接近标准品给定值, 且相对标准偏差较微生物法小。

3.2 不同配方奶粉样品测试结果

用 2 种方法对不同基质不同配方奶粉进行测试得到的结果如表 5 所示, 2 种方法测试结果均在样品给定范围内且接近中间值。7 个样品 2 种方法的相对偏差最小为 1.65%, 最大 9.51%, 均小于 10%。

4 结论与讨论

超高效液相色谱-同位素稀释质谱法测定配方奶粉中的生物素含量操作过程简单, 分析周期短, 灵敏度高, 重复性好^[1]。高效液相色谱法检测食品中生物素因其具有检测速度快, 高分辨率和高灵敏度等特点, 是生物素检测的重要手段之一^[14]。

化学方法测试生物素其原理是检测与标准物质结构相同的生物素成分, 与生物活性无关。会漏检有生物活性的生物素, 同时不具备生物活性但与标准物质结构相同的物质也会被检测到。试剂盒方法与传统微生物方法测试原理相同, 检测具有生物活性的生物素。化学法只可作为可选法, 当出现争议时都以微生物法作为仲裁方法^[15]。实验结果证明相比于传统微生物法, 试剂盒法操作相对简单, 且实验的准确度也满足实验要求, 适用于大批量样品的检测中。因此实验室相关检测人员可根据实际检测需求来选择合适的检测方法。

表4 微生物法与试剂盒法测定标准参考物质结果
Table 4 Results of standard reference substance determination by microbiological method and kit method

	生物素含量($\mu\text{g}/100\text{ g}$)										SRM1869 标示值 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	平均值 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	标准 偏差	相对标 准偏差 /%	与标示 值相对 偏差/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
微生物法	164.1	184.8	166.0	180.1	148.7	186.1	173.9	167.9	180.4	184.0		173.6	11.92	6.87	8.49
试剂盒法	211.0	205.6	178.3	209.3	200.3	210.7	192.0	185.6	194.4	206.5	189 \pm 24	199.4	11.28	5.71	5.34

表5 不同配方样品微生物法与试剂盒测定生物素结果($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Table 5 Microbiological method and kit for biotin results in different formula samples ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

	参考范围	微生物法	试剂盒法	平均值	相对偏差/%
样品 1	21~78	50.53	47.68	49.11	5.80
样品 2	10.9~27.2	16.32	17.10	16.71	4.67
样品 3	8.08~26.26	14.73	16.20	15.47	9.51
样品 4	9.04~29.38	16.53	16.26	16.40	1.65
样品 5	19.2~56.4	33.64	32.16	32.90	4.50
样品 6	20.8~65.0	40.31	43.84	42.08	8.39
样品 7	8.0~39.0	12.84	13.62	13.23	5.90

参考文献

- [1] 梁敏慧, 崔亚娟, 叶润, 等. UPLC-IDMS 法测定配方奶粉中的生物素含量[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 136-140.
Liang MH, Cui YJ, Ye R, *et al.* Determination of biotin in milk powder by using ultra performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2015, 36(4): 136-140.
- [2] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biological chemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.
- [3] Kergaravat SV, Gomez GA, Fabiano SN, *et al.* Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor [J]. Talanta, 2012, 97: 484-490.
- [4] Takechi R, Taniguchi A, Ebara S, *et al.* Biotin deficiency affects the proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells in culture [J]. J Nutr, 2008, 138(4): 680-684.
- [5] Baez-Saldana A, Gutierrez-Ospina G, Chimalmonroy J, *et al.* Biotin deficiency in mice is associated with decreased serum availability of insulin-like growth factor-I [J]. Eur J Nutr, 2009, 48(3): 137-144.
- [6] Hernandez-Vazquez A, Ochoa-Ruiz E, Ibarra Gonzalez I, *et al.* Temporal development of genetic and metabolic effects of biotin deprivation. A search for the optimum time to study a vitamin deficiency [J]. Mol Genet Metabol, 2012, 107(3): 345-351.
- [7] Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation [J]. Teratology, 1990, 42(3): 295-300.
- [8] 潘一斌, 陈建辉, 俞利琴. 高效液相色谱法测定生物素的含量[J]. 中国药业, 2009, 18(24): 35.
Pan YB, Chen JH, Yu LQ, *et al.* The content of biotin was determined by high performance liquid chromatography [J]. China Pharm, 2009, 18(24): 35.
- [9] 刘加庆, 周丽, 田勇. HPLC 检测生物素的方法研究[J]. 发酵科技通讯, 2008, 37(2): 17-21.
Liu JQ, Zhou L, Tian Y. Study on detection method of biotin by HPLC [J]. Bull Ferment Sci Technol, 2008, 37(2): 17-21.
- [10] 李菁菁, 叶润, 崔亚娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定配方奶粉中泛酸、生物素和氰钴胺素[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 61-64.
Li JJ, Ye R, Cui YJ, *et al.* Determination of pantothenic acid, biotin, cyanocobalamine in formula milk powder using ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(12): 61-64.
- [11] 刘进玺, 钟红舰, 董小海. 超高效液相色谱-质谱联用测定维生素预混合饲料中生物素含量[J]. 分析实验室, 2010, 29(7): 62-64.
Liu JX, Zhong HJ, Dong XH. Determination of biotin in premix feed with UPLC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(7): 62-64.
- [12] GB 5009.259-2016 食品安全国家标准 食品中生物素的测定[S].
GB 5009.259-2016 National food safety standards-Determination of biotin in food [S].
- [13] 崔国萍, 黄宝钗, 杨薇. 微生物法与试剂盒法测定婴幼儿配方奶粉中叶酸含量的方法比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3497-3500.
Cui GP, Huang BC, Yang W. Comparison of the determination of folic acid content in infant formula powders by microbiological method and the kit method [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3497-3500.
- [14] 刘跃芹, 吴杰, 赵雪松, 等. 生物素分析方法的研究进展[J]. 广州化工, 2013, 41(17): 8-10.
Liu YQ, Wu J, Zhao XS, *et al.* Advances in the analytical methods of biotin [J]. Guangzhou Chem Ind, 2013, 41(17): 8-10.
- [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 of biological diathesis fraction in infant food by GB and kit methods [J]. China Dairy Ind, 2014, 42(7): 56-59.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



程敏, 硕士, 主要研究方向为食品科学与安全。

E-mail: chengmin898xp@126.com