



免疫亲和柱净化/高效液相色谱-串联质谱法 检测婴幼儿配方乳粉中生物素含量

吴宏*, 林玉宙, 黄彩云, 陈小波, 韦玮

(明一(福建)婴幼儿营养品有限公司, 福建 福州 350212)

摘要:建立了免疫亲和柱净化/高效液相色谱串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中生物素的方法。样品用磷酸盐缓冲液溶解, 并通过生物素免疫亲和柱净化后, 采用 Ultimate AQ-C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) 色谱柱分离, 以甲醇-0.1% 甲酸(30:70)为流动相, 进样量为 5.0 μL, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C, 并经电喷雾电离串联质谱在多离子反应监测(MRM)模式下进行测定, 定量离子为 227.2, 定性离子为 227.2、96.9, 碰撞能量分别为 10、30 V。结果显示, 生物素在 0.1~1.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 方法检出限为 20.3 μg/kg。对空白试样进行 3 个浓度水平的加标回收实验, 测得加标回收率为 92.7%~98.5%, 相对标准偏差为 1.7%~1.9%。该方法具有样品处理简单、灵敏度高、重现性好、分析时间短等优点, 可以满足婴幼儿配方乳粉中生物素含量的测定要求。

关键词: 免疫亲和柱; 乳粉; 生物素; 高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: O657.63; Q563.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2013)09-1135-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2013.09.020

Determination of Biotin in Infant Formula Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry with Immunoaffinity Purification Column

WU Hong*, LIN Yu-zhou, HUANG Cai-yun, CHEN Xiao-bo, WEI Wei

(Wissun(Fujian) Babies & Infants Nutrition Co., Ltd, Fuzhou 350212, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC - MS/MS) coupled with immunoaffinity purification column was developed for the determination of biotin in infant formula milk powder. The sample was dissolved with phosphate buffer and cleaned up through biotin immunoaffinity column. The analyte was separated on an Ultimate AQ - C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) column using methanol - 0.1% formic acid (30 : 70, by volume) as mobile phase with injection volume of 5 μL, at a flow rate of 0.3 mL/min and a column temperature of 40 °C. The analysis of biotin was performed by HPLC - MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive electrospray ionization (ESI) source. The quantitative ion was *m/z* 227.2, and qualitative ions were *m/z* 227.2, 96.9, with excitation voltages of 10, 30 V. A good linear calibration was obtained for biotin in the range of 0.1 - 1.0 μg/mL, with a method detection limit of 20.3 μg/kg. The average recoveries at three spiked levels were in the range of 92.7% - 98.5% with RSDs of 1.7% - 1.9%. With the advantages of easy sample handling, high sensitivity, good reproducibility, short analysis time, the method could meet for the determination of biotin in infant formula milk powder.

Key words: immunoaffinity column; milk powder; biotin; high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (HPLC - MS/MS)

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-04-30

* 通讯作者: 吴宏, 硕士研究生, 助理工程师, 研究方向: 食品检测、仪器分析, Tel: 15280063720, E-mail: wuhong5231703@163.com

生物素(Biotin)又称维生素 B7、维生素 H 或辅酶 R, 为一种水溶性 B 族维生素。目前已知有 8 种异构体, 其中天然存在的 D-生物素具有活性, 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, 是维持动物机体正常生理机能所必需的维生素之一^[1]。

生物素的测定方法主要有微生物法^[2-3]、酶联免疫法^[4-6]、分光光度法^[7]、荧光分光光度法^[8-9]和电化学法^[10-11]等。其中微生物法的灵敏度高, 但由于大多数菌株不是专一性的, 因此会带来较大的检测误差, 且整个操作规程费时、费力^[12]; 酶联免疫法的测定原理是基于生物素和亲和素的特定反应, 但由于亲和素价格昂贵, 此法难以推广^[5,13]; 近年来陆续有报道采用高效液相色谱法测定生物素含量^[14-15], 但由于生物素无典型的紫外(UV)发色团, 用紫外检测器需在低 UV 波长下测定, 因此高效液相色谱法的灵敏度比较低, 对于一些生物素含量较低的样品不能检测。针对婴幼儿配方食品成分复杂, 所添加生物素含量极低的特点, 本文引入免疫亲和柱技术进行纯化、富集, 同时结合高效液相色谱的分离能力和质谱的高灵敏度、高选择性对婴幼儿配方乳粉中的生物素进行测定。该方法简便、快速、选择性和重复性好, 结果准确可靠, 能满足婴幼儿配方乳粉分析的要求, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱 - 6410B 电喷雾质谱联用仪; Biotex 生物素免疫亲和柱(美国 Biotex 公司); HSE - 24B 型固相萃取仪(天津恒奥科技发展有限公司); AL204 型电子天平(梅特勒 - 托利多仪器有限公司); BF - 2000 型氮气吹干仪(北京八方科技有限公司); TG16 - WS 型台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); Simplicity 型超纯水系统(美国密理博公司)。

生物素标准品(纯度大于 98%, 购于 Sigma - Aldrich); 甲醇(色谱纯); 甲酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(优级纯); 水为超纯水。

1.2 样品前处理

称取婴幼儿配方乳粉 25 g, 将其溶解于 100 mL PBS(pH 7.4, 50 mmol/L)中, 置于 10 000 r/min 离心机中离心 10 min, 移取 20 mL 提取液, 用 20 mL PBS 缓冲液稀释后, 将其加到生物素免疫亲和柱(1.0 μ g, 3 mL)中, 调节流速为 1~3 mL/min, 样液流出后吸取 50 mL PBS 溶液洗涤样液试管, 待液体流干, 用真空泵抽干柱中液体。将亲和柱下口堵住, 下方放置接收管, 加入 1 mL 甲醇, 待甲醇浸润 30 s 后, 缓慢将甲醇放出, 流速在 1 mL/min 以内, 再加入 2 mL 甲醇, 流出液置于氮吹仪中吹至近干, 用水定容至 1 mL, 漩涡混合 1 min, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 上机检测。

1.3 仪器条件

色谱柱: Ultimate AQ - C₁₈(2.1 mm \times 100 mm, 3 μ m); 流动相: 甲醇 - 0.1% 甲酸(30 : 70); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5.0 μ L。

离子源为电喷雾离子源(ESI); 离子喷雾电压: 4 000 V; 碰撞气压力: 45 psi; 干燥气流速: 10 L/min; 干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C; 离子化模式: 正离子化方式; 扫描方式为多离子反应监测(MRM); 母离子质荷比(m/z): 245.1; 定量离子 m/z : 227.2; 定性离子 m/z : 227.2、96.9; 碰撞能量分别为: 10、30 V。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析

生物素在电喷雾正离子化方式下, 主要生成 $[M + H]^+$ 准分子离子峰, 为 m/z 245.1, 选择 $[M + H]^+$ 进行产物离子扫描, 生成的主要碎片离子质荷比为 m/z 245.1 \rightarrow 227.2、245.1 \rightarrow 96.9, 选择 m/z 227.2 碎片离子作为定量离子, 图 1A、B 分别为生物素的 MRM 质谱图及总离子流(TIC)图。

2.2 干扰组分的影响^[16]

婴幼儿配方食品成分复杂, 含有碳水化合物、氨基酸、蛋白质和各种维生素等。用水作提取剂时, 碳水化合物、氨基酸和蛋白质等均会被提取出, 这些杂质峰可能会干扰生物素的测定, 影响生物素的离子化过程, 降低其离子化效率, 从而影响分析的准确性。此外, 过多杂质的存在也会污染色谱柱。

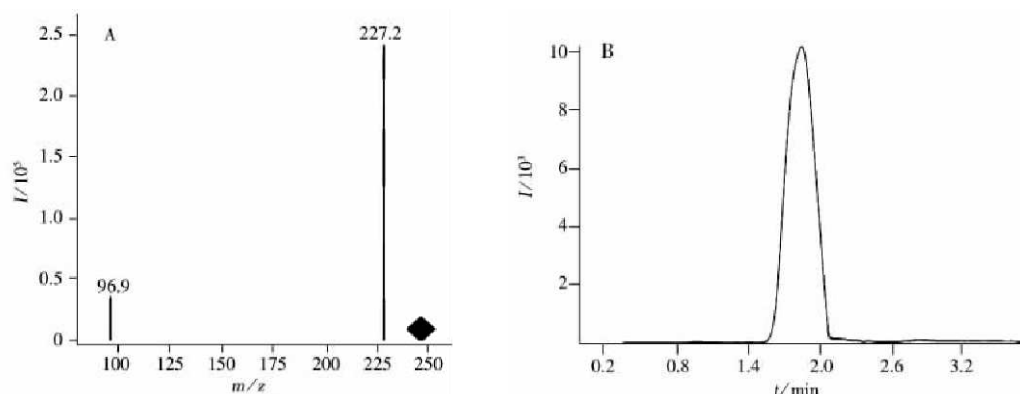


图1 生物素的二级质谱图(A)及TIC图(B)

Fig. 1 Product ion spectra(A) and total ion chromatogram(B) of biotin

为防止蛋白质等物质对免疫亲和柱净化过程产生干扰,采用高氯酸、亚铁氰化钾和乙酸锌溶液、三氯乙酸溶液及调pH 4.6四种沉淀蛋白的方法。由于免疫亲和柱的适宜pH值约为7.4,为此需将上述过滤液调至pH 7.4后再过柱。通过回收率实验发现,上述4种方法生物素的回收率均小于60%,表明这4种处理方法不可行。究其原因,可能是由于在蛋白沉淀过程中部分生物素被蛋白质吸附或包裹造成损失,同时,样液酸碱体系不稳定也影响其与抗体的结合。为此,根据免疫亲和柱的特点,本实验采用PBS缓冲溶液使样液的酸度稳定在适宜范围;并根据该柱专一性强、不对蛋白吸附等特点,在不去除蛋白质的情况下直接过柱净化。实验证明,若样液不去除脂肪,由于脂肪对抗体表面的掩盖作用可造成结果偏低;若将离心去除脂肪后的样液直接过柱,也会因样液较为粘稠造成堵塞而难以过柱;而将样液与缓冲溶液1:1稀释后再过柱,则既可以解决堵塞问题,也可解决脂肪对生物素与抗体结合的影响等问题。该条件下样品回收率达90%以上,且精密度较好,满足日常检测要求。

2.3 免疫亲和柱性能的测定

考察了不同上样量、不同吸附洗脱速度下免疫亲和柱的性能,通过测定回收率进行最佳净化条件的考察。首先采用含有500 ng的标准生物素溶液按1、2、3、4、5 mL/min吸附洗脱速度进行测试,结果表明:当流速高于2 mL/min时其回收率显著下降;当超过4 mL/min时回收率已低于50%,说明流速过快对吸附洗脱效果影响显著(见表1)。由于1 mL/min和2 mL/min流速时的回收率水平相当,故进一步考察了这两种流速对实际样品测定的影响。结果显示,2 mL/min流速的综合效果强于1 mL/min,故选择2 mL/min为最佳流速。考察了2 mL/min吸附洗脱速度下不同上样量对回收率的影响,测得回收率均在97%以上,证明该免疫亲和柱性能优良。

表1 不同吸附洗脱速度对生物素测定结果的影响

Table 1 Effect of adsorption elution speed on measurement of biotin

Adsorption elution speed (mL/min)	Spiked (ng)	Found (ng)	Recovery (%)
1	500	492	98.4
2	500	484	96.8
3	500	394	78.8
4	500	267	52.8
5	500	244	48.8

2.4 标准曲线与线性范围

取储备液用流动相逐级稀释成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列生物素标准溶液,以生物素的质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)和峰面积(y)进行线性回归,结果表明,生物素在0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,其线性方程为 $y = 436\,988x - 474.332$, $r = 0.9997$ 。当信噪比为3时,测得生物素的检出限为4.06 ng/mL,方法检出限为20.3 $\mu\text{g/kg}$ 。由于婴幼儿配方乳粉中生物素含量通常不少于80 ng/g,故本方法完全可满足婴幼儿配方乳粉分析的要求。

2.5 回收率与精密度

向不含生物素的空白试样中添加0.2、0.4、0.6 mg/kg 3个浓度水平的生物素标样溶液,分别进行

5次平行测定, 结果见表2。结果表明, 生物素的回收率为92.7%~98.5%, 相对标准偏差为1.7%~1.9%。本方法的回收率稳定, 能满足实际样品分析的需要。

表2 空白试样中生物素的加标回收率及相对标准偏差($n=5$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) for biotin in a blank sample ($n=5$)

Spiked (mg/kg)	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
0.2	94.8, 95.4, 96.5, 95.8, 96.9	1.8
0.4	96.2, 97.4, 98.5, 97.9, 96.8	1.9
0.6	94.2, 93.8, 94.8, 93.4, 92.7	1.7

2.6 实际样品的分析

将市场上出售的5种婴幼儿配方奶粉, 分别按上述方法进行检测, 以考察方法的实用性, 测得5种奶粉中生物素含量分别为29.8、32.7、35.1、34.3、41.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 基本与标识含量一致。此方法可用于奶粉中生物素含量的检测。

3 结论

本实验采用免疫亲和柱净化-高效液相色谱质谱联用方法, 建立了婴幼儿配方乳粉中生物素含量的测定方法。通过对样品前处理方法的优化, 确定了采用缓冲液处理、离心脱脂、免疫亲和柱净化及富集的方法, 无需沉淀去除蛋白质, 从而解决了高效液相色谱-串联质谱测定时的干扰及定量问题。该方法操作简便、定量准确、灵敏度高、结果稳定可靠, 为婴幼儿配方乳粉生产及质检提供了切实可行的分析检测方法。

参考文献:

- [1] Nojiri S, Kamata K, Nishijima M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, 16(8): 1357-1362.
- [2] Shi L, Yang X L, Wang G D, Yang Y X. *Acta Nutrimenta Sin.* (石磊, 杨晓莉, 王国栋, 杨月欣. 营养学报), **2002**, 24(2): 181-184.
- [3] Livaniou E, Costopoulou D, Vassiliadou I, Leondiadis L, Nyalala J O, Ithakissios D S, Evangelatos G P. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 881(1): 331-343.
- [4] Kim B, Buckwalter J M, Meyerhoff M E. *Anal. Biochem.*, **1994**, 218(1): 14-19.
- [5] Xu Y P, Chen Z X, Wu J X, Ma Z C. *Microbiol. China* (徐幼平, 陈正贤, 吴建祥, 马志超. 微生物学通报), **2000**, 27(1): 47-50.
- [6] Mishra S, Storer M K, Sherwin C M, Lewis J G. *Clin. Chim. Acta*, **2005**, 360(1/2): 60-66.
- [7] GB/T 17778-2005. Determination of d-Biotin in Premix (预混合饲料中d-生物素的测定). National Standards of the People's Republic of China (中华人民共和国国家标准).
- [8] Wang F R, Yu J T, Zhang L. *Amino Acids & Biotic Resources* (王福荣, 俞津婷, 张琳. 氨基酸和生物资源), **1994**, (3): 47-49.
- [9] Wang F R, Zhang L, Yu J T. *China Brewing* (王福荣, 张琳, 俞津婷. 中国酿造), **1994**, 1: 17-19.
- [10] Kan Y W, Chen J, Chen Q M, Li H T. *J. Instrum. Anal.* (堪英武, 陈静, 陈启明, 李海涛. 分析测试学报), **1998**, 17(5): 69-71.
- [11] Kergaravat S V, Fabiano S N, Laube T, Pividori M I, Hernández S R. *Talanta*, **2012**, 97(16): 484-490.
- [12] Liu J Q, Zhou L, Tian Y. *Fajiao Keji Tongxun* (刘加庆, 周丽, 田勇. 发酵科技通讯), **2008**, 37(2): 17-21.
- [13] Feng J W, Wang F L. *Feed Ind.* (冯建文, 王凤麟. 饲料工业), **2002**, 23(7): 37-38.
- [14] Huang Q, Ding A Z, Song J. *Chem. Bioeng.*, **2009**, 26(8): 88-90.
- [15] Gimnez E C, Trisconi M J, Kilinc T, Andrieux P. *J. AOAC Int.*, **2010**, 93(5): 1494-1502.
- [16] Tao D L, Jiang J D, Zhang Y S. *Sci. Technol. Food Ind.* (陶大利, 姜金斗, 张永胜. 食品工业科技), <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20130118.1337.007.html>.