利用反相高效液相色谱法测定发酵液中的生物素含量*

蒲跃进[1,2], 周占琴[1], 杨明明[1], 刘　波[3], 樊俊华[3]
(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 湖北省畜牧兽医研究所,湖北 武汉 430209;
3 武汉阳光广济制药股份有限公司,湖北 武汉 430068)

[摘　要]　为了利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)更准确地测定发酵液中的生物素含量,以安捷伦 Zorbax SB-C18(4.6 cm ×250 cm,5 μm)为色谱柱,对液相色谱紫外线检测波长和流动相的溶液配比、K_2HPO_4 离子浓度和 pH 值进行筛选。结果表明,以体积分数 91.5 % K_2HPO_4 (0.04 mmol/L)与体积分数 8.5 % CH_3CN 混合液为流动相,在 pH 值为 2.5 和紫外检测波长为 215 nm 的条件下,获得的生物素吸收峰面积与质量浓度的线性相关系数达 0.9999,生物素加标回收率达 99.07 %～101.26 %,相对标准偏差为 0.48 %～0.82 %。由此可见,在上述条件下高效液相色谱法不仅可用于发酵液中生物素含量的测定,而且操作简便,测定结果可靠。

[关键词]　高效液相色谱; 生物素; 发酵液;流动相
[中国分类号]　O657.7+2　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1671-9387(2007)05-0073-04

Determination of biotin in broth system by reversed-phase high performance liquid chromatography

PU Yue-jin[1,2], ZHOU Zhan-qin[1], YANG Ming-ming[1], LIU Bo[3], FAN Jun-hua[3]
(1 *College of Animal Science and Technology, Northwest A &F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China;*
2 *Institute of Animal Science and Veterinary Medicine of Hubei Province, Wuhan, Hubei* 430209, *China;*
3 *GuangJi Pharmaceutical Corporation, Wuhan, Hubei* 430068, *China)*

Abstract: In order to effectually determine the biotin in fermented broth by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), the Anjielun Zorbax SB-C18(4.6 cm250 cm, 5 μm) was used and the ultraviolet wavelength for RP-HPLC, the compositions and pH of mobile phase and concentration of K_2HPO_4 in mobile phase were sifted by repeated tests. The results showed that when the complex liquid (pH = 2.5) composed of 91.5 % K_2HPO_4 (0.04 mol/L) and 8.5 % *(V/V)* was used for mobile phase, the interrelated coefficient between absorption peak and quality concentration of biotin reached 0.9999 with relative standard deviation of 0.48 % - 0.82 % when the ultraviolet wavelength is 215 nm and pH is 2.5. Therefore, the conclusion can be drawn that RP-HPLC can not only be used to determine the biotin content in fermented liquid, but also be convenient for operation.

Key words: high performance liquid chromatography; biotin; fermented broth; mobile phase

生物素(Biotin)是生物生命活动中必需的维生素之一,对动物生理具有不可替代的作用。目前,生物素已广泛应用于食品、化工、医药、畜牧、生物发酵等领域。市售生物素产品主要采用化学合成方法获

* [收稿日期]　2006-06-15
[作者简介]　蒲跃进(1978 -),男,陕西三原人,在读硕士,主要从事畜牧技术研究。
[通讯作者]　周占琴(1958 -),女,甘肃环县人,教授,主要从事家畜繁殖育种研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

得,但由于化学合成法工艺复杂,成本高,污染严重[1],在一定程度上限制了该产品的开发和应用。生物发酵工业的发展给生物素的生物合成带来了曙光。有学者提出利用生物技术生产生物素的技术路线,即利用基因工程技术构建工程菌,结合发酵技术生产廉价的生物素[2-6]。这种方法可以最大限度地降低生物素的生产成本,具有极大的应用潜力。为了能够准确而快速地测定发酵液中的生物素含量,研究人员作了许多有益的尝试,建立了许多测定方法,如微生物法[7]、高效液相法[8-12]、电化学法[13]、ELISA法[14]和生物自测法[6]等。在这些方法中,高效液相法由于具有测定速度快、分辨率和灵敏度高等特点,而成为生物素测定的首选方法,一些学者已用该方法测定了多维制剂和饲料中的生物素含量,并取得了满意的结果[12-15]。Przyjazny等[16]在高效液相的基础上,利用荧光标记的抗生物蛋白与生物素进行反应,再用荧光检测器对生物素进行检测,也取得了满意的结果。但上述2种方法各有不足,前一种方法主要针对生物素含量较高的产品,而后一种方法由于试剂价格昂贵,难以推广应用。为此,本试验在前人研究的基础上,建立了发酵液中生物素含量反相高效液相色谱测定法(RP-HPLC),以期为快速而准确地测定发酵液中生物素的含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种及培养基 生物素基因工程菌株BQJ-34由武汉阳光光济制药股份有限公司生物技术实验室提供,培养基为生物素发酵培养基[17]。

1.1.2 试剂 色谱纯生物素为Sigma公司产品,色谱纯CH3CN(乙腈)购于Fisher公司,分析纯K_2HPO_4由国药集团化学试剂公司出品。

1.1.3 仪器 高效液相检测器SPD-10A^{VP}和高效液相泵LC-10AT^{VP}为日本岛津公司生产,Zorbax SB-C18(4.6 cm ×250 cm,5 μm)色谱柱由美国安捷伦公司生产,U-3010型分光光度计和CR 21G型离心机为日本HITACHI公司产品,万分之一天平为美国梅特勒公司产品。

1.2 BQJ-34菌株的培养及发酵液处理

生物素基因工程菌株BQJ-34经斜面培养后,接种于生物发酵培养基中,在37 ℃,220 r/min振荡培养。取48 h发酵液10 mL,100 ℃水浴1 h,以破坏发酵液中的大分子物质。然后经10 000 r/min离心30 min,取上清液过滤,滤液即为所需测定样品。

1.3 生物素标准溶液的配制

准确称取32.3 mg的生物素粉,用超纯水溶解并定容至100 mL,50 ℃水浴以充分溶解生物素,配制成323 μg/mL的标准溶液,然后逐级稀释成161.5,129.2,64.6,32.3,16.15和8.075 μg/mL的标准生物素溶液。

1.4 生物素含量RP-HPLC检测方法的建立

1.4.1 检测波长的确立 以超纯水精确配制质量浓度为50,100,200,300,400和500 μg/mL的生物素溶液,并以超纯水作对照液(用于基线扫描),用紫外分光光度计(波长为190～300 nm)进行扫描,通过对样品的分离效果分析,确定生物素最佳检测波长。

1.4.2 流动相的确定 配制浓度分别为0.02,0.04,0.06和0.08 mol/L的K_2HPO_4溶液,然后向不同浓度的K_2HPO_4中加入CH_3CN,使其体积分数分别为12 %,10 %,9 %,8.5 %和8 %,配制成流动相(载液),检测同一样品中的生物素含量。根据色谱图的分离情况,确定流动相中最适K_2HPO_4浓度和两种成分的体积比。

1.4.3 流动相pH的确定 取上步确定的流动相4份,用H_3PO_4分别调其pH值为2.2,2.5,3.0和3.5,检测同一样品中的生物素含量,根据色谱图的分离情况,确定流动相最佳pH值。

1.4.4 生物素回归方程的建立 在已确定流动相条件下,取1.3节配制的生物素标准液各10 mL,过滤,以10 μL进样,测定标准溶液中生物素的吸收峰面积。以生物素吸收峰面积Y(mv·min)对生物素质量浓度X(μg/mL)作图,求回归方程。

1.4.5 生物素回收率和精密度检测 取甲乙2瓶(20 mL/瓶)生物素样品,其中甲本底值为20.5 mg/L,乙为30.6 mg/L。将甲瓶均分成两份,向其中分别加入202.0 mg和161.5 mg生物素(粉剂),然后测定生物素含量,每一加标的生物素样品重复测定5次,并将测定结果与原测定的生物素本底值进行比较,计算生物素的回收率并按内标法计算精密度。乙进瓶进行同样处理。

2 结果与分析

2.1 生物素含量RP-HPLC检测方法的检测波长

生物素溶液经扫描后,其最高吸收峰波长为194～203.5 nm,吸收值范围为0.779～1.948。分别在200,205,210,215和220 nm波长下,用高效液相色谱仪对样品进行检测,发现波长为215 nm时生物素的特征吸收峰与其他物质的峰分离(图1)。所

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以确定 215 nm 为生物素紫外检测的吸收波长。

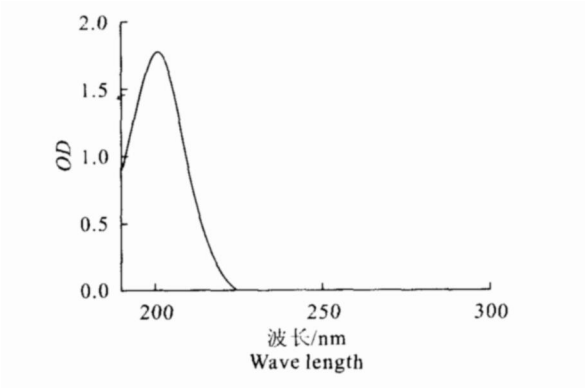

图 1　生物素波长扫描图

Fig. 1　Wavelength scanning of biotin

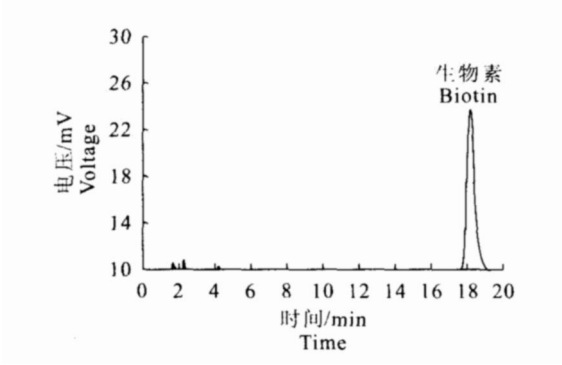

图 2　生物素标样色谱图

Fig. 2　Chromatogram of standard biotin

及离子浓度

结果表明,在相同的 K_2HPO_4 浓度(0.04 mol/L)条件下,CH_3CN 的用量影响生物素的吸收峰,当 CH_3CN 体积分数为 10 %时,生物素吸收峰和前一种物质吸收峰未能完全分离;当 CH_3CN 体积分数为 8 %时,生物素吸收峰和后一种物质不能分离;当 CH_3CN 体积分数为 8.5 %时,生物素分离效果最佳。因此,确定发酵液中生物素测定的流动相为:体积分数 91.5 % K_2HPO_4 (0.04 mol/L) + 体积分数 8.5 % CH_3CN。在此条件下,生物素标准样品和生物素测定样品色谱图见图 2(保留时间为 18.168 min)和图 3(保留时间为 18.135 min)。

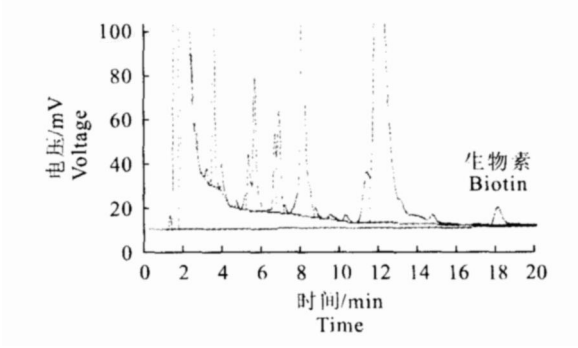

图 3　生物素样品色谱图

Fig. 3　Chromatogram of sample biotin

2.2　生物素含量 RP-HPLC 检测方法流动相配比

表 1　生物素回收率和 RP-HPLC 检测方法的精密度试验结果 (n = 5)

Table 1　Recovery and precision of biotin by RP-HPLC

本底值/ (mg·L⁻¹) Background	加入值/ (mg·L⁻¹) Added	实测值/ (mg·L⁻¹) Found	绝对偏差/ % Absolute deviation	相对偏差/ % Relative deviation	加标回收率/ % Recovery	平均回收率/ % Average recovery	精密度/ % Precision
		225.3	1.90	0.85	101.26		
		222.2	- 1.20	- 0.53	99.87		
20.5	202.0	223.1	- 0.40	- 0.18	100.27	100.41	0.48
		223.7	0.30	0.13	100.54		
		222.7	- 0.70	- 0.31	100.09		
		182.5	- 0.10	- 0.05	100.27		
		184.9	2.30	1.26	101.59		
20.5	161.5	183.2	0.60	0.33	100.66	100.34	0.82
		180.3	- 2.30	- 1.26	99.07		
		182.2	- 0.40	- 0.22	100.11		
		233.3	- 0.30	- 0.13	100.30		
		232.4	- 0.20	- 0.09	99.91		
30.6	202.0	234.5	1.90	0.82	100.82	100.03	0.51
		231.0	- 1.60	- 0.69	99.31		
		232.1	- 0.50	- 0.21	99.79		
		191.5	- 1.30	- 0.67	99.69		
		194.4	1.60	0.83	101.20		
30.6	161.5	192.2	- 0.60	- 0.31	100.05	100.34	0.52
		193.3	0.50	0.26	100.62		
		192.4	- 0.40	- 0.21	100.16		

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 生物素含量RP-HPLC检测方法流动相的pH值

试验结果表明,当流动相的pH值高于2.5时,生物素色谱图出现拖尾现象;pH值低于2.5时,虽然生物素色谱图未出现拖尾现象,但出峰时间较晚;在pH值为2.5,生物素的分离效果较好,出峰时间早,仅为24.711 min。因此,确定生物素含量RP-HPLC检测方法检测流动相的最适pH为2.5。

2.4 生物素含量RP-HPLC检测方法的回归方程

试验建立的生物素的线性回归方程为:$Y = 3839.3X - 1658.7$, $r = 0.999$。该方程表明,当生物素质量浓度为0.0875～323 mg/mL时,其吸收峰面积Y与其质量浓度X之间存在着良好的线性关系。

2.5 生物素的回收率和RP-HPLC检测方法的精确度

生物素的回收率和RP-HPLC检测方法的精密度试验结果见表1。从表1可以看出,生物素的加标回收率达到99.07%以上,平均为100.03%～100.41%,相对偏差为0.05%～0.85%,精密度达到0.48%～0.82%。

3 讨 论

由于各种物质的分子、原子和分子空间结构不同,其吸收光能的情况也不相同,每种物质都有其特有的、固定的吸收光谱曲线。因此,不适宜的扫描波长可导致一些物质的波峰不出现或不明显,进而影响其产量的检测效果。从本试验结果看,生物素的最大吸收峰出现在194～230.5 nm,吸收值为0.779～1.948。由于选择190 nm以下波长,检测出的物质较多,影响生物素的分离,因此将生物素的检测波长选择在200～220 nm。经过进一步反复试验,发现扫描波长为215 nm时,生物素的特征峰与其他物质的分离效果较好,因此选择215 nm作为生物素的检测波长。

高效液相色谱中所选用的流动相溶剂直接关系到生物素分离的时间和效果,不适宜的流动相难以使色谱柱在短时间内达到平衡,且检测时基线漂移,噪声增大。本试验在前人研究基础上,选择(0.02 mol/L) K_2HPO_4作为流动相,但由于K_2HPO_4的浓度和用量对流动相pH值的稳定及生物素电离有一定的影响,必须通过添加CH_3CN予以调整。因此,本研究对不同离子浓度K_2HPO_4溶液中CH_3CN的添加量进行试验与筛选,结果表明,CH_3CN体积分数高于8.5%时,对物质的洗脱能力增强,生物素的保留时间缩短,但与样品中其他杂质分离不好;CH_3CN体积分数低于8.5%时,样品溶液中各个色谱峰分离度改善,但生物素的保留时间延后,延长了分析操作时间。反复试验表明,当流动相中K_2HPO_4的浓度为0.04 mol/L、CH_3CN的体积分数为8.5%时,生物素可从发酵液中完全分离出来,而且保留时间适中,峰形较好。由此可见,流动相中的CH_3CN的用量不仅影响生物素的洗脱能力和保留时间,而且影响生物素样品与其他物质的分离度。这一结果与已有的研究结果[7-10]一致。因此本试验确定生物素含量RP-HPLC检测法的流动相为:体积分数91.5% K_2HPO_4 (0.04 mol/L) + 体积分数8.5% CH_3CN。

有研究表明,流动相的pH影响液相色谱分析仪对所检测物质的检测效果[11-14]。用于液相色谱分析的色谱柱可承受的pH为2～8,生物素在水溶液中呈电离态,在中性条件下几乎全部电离,而酸性条件可抑制其电离。因此,本试验在酸性条件下对K_2HPO_4进行了梯度洗脱,并对流动相的pH值进行了筛选,结果表明当流动相的pH值为2.5时,生物素的分离效果最好,而且出峰时间较早。故生物素含量RP-HPLC检测法流动相的pH值以2.5为宜。

从本试验建立的生物素检测线性回归方程中可以看出,生物素吸收峰面积和质量浓度之间存在着良好的线性关系。另一方面,从本试验所获得的生物素回收率和生物素测定的相对标准偏差来看,试验结果相对误差较小,符合检测要求。因此在适宜的流动相条件下,RP-HPLC法可用于发酵液中生物素含量的测定,其测定结果具有较高的可靠性。

[参考文献]

[1] 林 峰. 生物素的应用研究[J]. 四川畜牧兽医,2002,29(8):28-29.

[2] Streit W, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(1):21-32.

[3] Bower S, Perkins J, Yocum R, et al. Cloning and characterization of bacillus subtaliber A gene encoding a repressor of the biotin operation [J]. Journal of Bacteriology. 1995, 177(19): 2572-2575.

[4] Bower S, Perkins J B, Yocum R, et al. Cloning, sequencing, and characterization of the bacillus subtilis biotin biosynthetic operon[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(14): 4122-4130.

(下转第80页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

配群体的数学模型和非平衡自交群体的数学模型。因此,对于非平衡的植物群体它具有一般的代表性。数学模型(7)是一个平衡群体的数学模型,它可以转换为随机交配群体的数学模型和平衡自交群体的数学模型。因此,对于平衡的植物群体它具有一般的代表性。所以,普通群体是一个具有代表性的群体。

(3)在普通群体遗传平衡时,如果3个复等位基因频率相等,并且随机交配率等于3/5,此时群体中各种基因型频率相等。

(4) 在普通群体中,复等位基因遗传模型的建立补充和丰富了普通群体遗传的理论,为进一步研究多基因的遗传,以及其他因素对普通群体的影响奠定了基础。

(5) 复等位基因是表型多态性的内在因素,表型多态性是生物界的普遍现象。因此,讨论复等位基因在普通群体中的遗传规律,对研究生物的遗传、变异与进化具有重要意义。

(6)本文所讨论的群体为理想的普遍群体,不受突变、选择、迁移和遗传漂变等因素的影响。

[参考文献]

[1] 徐小林,徐立安,黄敏仁,等.栓皮栎天然群体SSR遗传多样性研究[J].遗传,2004,26(5):683-688.

[2] 邓志辉,吴国光,张 旋.中国南方汉族人群Y-STR基因座遗传多样性及法医学应用[J].遗传,2004,26(4):446-450.

[3] [美] Li C C.群体遗传学[M].吴仲贤,译. 北京:农业出版社,1981:51-72.

[4] [日] 向井辉美.群体遗传学[M].隋文彬,译.长春:吉林科学技术出版社,1984:1-4;27-118.

[5] 张 劳,李玉奎.群体遗传学概论[M].北京:中国农业出版社,1999:43-47.

[6] 张宏礼,郭满才,杜俊莉,等.复等位基因群体完全自交下母子间基因型联合分布的熵性质[J].黑龙江八一农垦大学学报,2003,2:34-38.

[7] 张宏礼,刘海泉.近亲繁殖下复等位基因平衡群体的熵性质[J].黑龙江八一农垦大学学报,2002(4):94-98.

[8] 张宏礼.复等位基因平衡群体的熵性质[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(2):119-122.

[9] 杜俊莉,郭满才,张宏礼.复等位基因平衡群体中亲属关系的信息学研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(2):155-158.

[10] 许时伦,李方奇,杨德来.突变对普通植物群体遗传的影响[C].遗传学基础理论问题讨论文集.北京:北京师范大学出版社,1993: 195-210.

(上接第76页)

[5] Evange L, Danae C, IreneV, et al. An anlytical techniques for determining biotin[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 881:331-343.

[6] 张西锋,张炜炜,杨明明,等.生物素生物合成的研究[J].生物技术,2006,16(4):82-84.

[7] 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(3):18-22.

[8] 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.

[9] 余林梁,黄晓兰,吴惠勤.饲料中生物素的高效液相色谱测定[J].分析测试学报,2003,22(5):102-103.

[10] 冯建文,王风麟.高压液相色谱法测定生物素方法的探讨[J].饲料工业,2002,23(7):37-38.

[11] 邓富良,周 平,陈本美,等.HPLC测定注射用水溶性维生素中生物素,叶酸及对羟基苯甲酸甲酯[J].中国新医药,2004,3(8):46-48.

[12] Anthony E, Charlene H. Liquid chromatographic determination of biotin in multivitamin-multimineral tablets[J]. Joutnal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1988(16):1311-1315.

[13] 王福荣,俞津婷,张 琳.利用异硫氰酸荧光素标记亲合素荧光法测定生物素含量[J].氨基酸和生物资源,1994 (03):47-49.

[14] 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.

[15] Sharon L, Crivelli F, Quick L, et al. A rewersed-phase high-performance liquid chromatographic(HPLC) assay for the determination of biotin in multivitamin-multimineral preparations[J]. Pharmaceuticalo Research, 1987, 3(4):261-262.

[16] Przyjazny A, Hentz N, Bachas L. et al. Sensitive and selective liquid chromatographic postcolumn reaction detection system for biotin and biocytin using a homogeneous fluorophore-linked assay [J]. Journal of Chromatography A, 1993(654): 79-86.

[17] Bower s, Perkins J, Yocum R, et al. Biotin bilsynthesis in bacillus substills: United States, 6303377 [P/OL]. 2001-10-16 [2006-3-15]. http: WWW. patentstorm, us/patants/6303377. html-19k-cached-similar pages.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net