

LC-MS/MS 法测定食品中生物素的含量

LCMSMS-702

摘要： 本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，对食品中生物素进行测定。结果表明，在标准曲线浓度范围内，生物素的线性良好，相关系数为 0.9992。取浓度为 25 ng/mL 生物素标准溶液，连续进样 6 次，其峰面积的相对标准偏差（RSD）为 2.1%，重复性良好。本方法可为食品中生物素的测定提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 生物素 同位素内标法定量

生物素（Biotin），又称为维生素 H、辅酶 R，是水溶性维生素，也属于维生素 B 族，B7。它是合成维生素 C 的必要物质，是脂肪和蛋白质正常代谢不可或缺的物质。是一种维持人体自然生长、发育和正常人体机能健康必要的营养素。

人体每天生物素需要量约为 100~300 μg。是人体多种酶的辅酶，参与体内的脂肪酸和碳水化合物的代谢；促进蛋白质的合成；还参与维生素 B12、叶酸、泛酸的代谢；促进尿素合成与排泄。因此，生物素对人体具有不可代替的作用。然而，机体不能合成或合

成量不足，不能满足机体的需要，必须经常通过食物中获得，所以我们要检验食品中生物素的含量，保证人体摄入量能满足身体需求。

本文根据中华人民共和国国家卫生健康委员会国家市场监督管理总局发布的《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》（征求意见稿）的要求，使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，建立了食品中生物素的测定检测方法，该方法能有效地监控食品中生物素的含量。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

检测器：LCMS-8050

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver.4.5

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：RP18 Column, 50 mmx 2.1 mm I.D., 130 Å, 5 μm

流动相：A 相 0.1% 甲酸 -10 mmol 甲酸铵水溶液，B 相：乙腈

流速：0.3 mL/min

进样量：5 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱

初始浓度 :A 相初始浓度为 95%，B 相初始浓度为 5%，详见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1	泵	B.Conc	5
2	柱温箱	CTO.RVL	0
5	泵	B.Conc	100
7	柱温箱	CTO.RVL	1
7.8	泵	B.Conc	100
8	泵	B.Conc	5
10	控制器	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)	接口电压: 4.0 kV
雾化气流速: 2.5 L/min	加热模块温度: 350°C
加热气流速: 10.0 L/min	DL 温度: 200°C
干燥气流速: 10.0 L/min	接口温度: 300°C
扫描模式: 多反应监测 (MRM)	MRM 参数: 见表 2

表 2 生物素 MRM 参数

No.	化合物	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	D- 生物素	58-85-5	245.05	97.05	-13.0	-9.0	-15.0
				123.00	-12.0	-12.0	-30.0
				227.05*	-19.0	-10.0	-13.0
2	生物素 D ₄ 内标	14493-42-6	249.10	97.10	-13.0	-34.0	-15.0
				126.05	-12.0	-30.0	-20.0
				231.10*	-20.0	-16.0	-20.0

注: * 表示定量离子

1.3 标准溶液配置

准确吸取适量生物素标准工作液于 10 mL 容量瓶中, 准确加入生物素 -D4 同位素内标工作液 (1 µg/mL) 150 µL, 用流动相 A 定容至刻度, 使标准系列生物素的浓度分别为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL 和 25 ng/mL, 每个系列溶液中同位素的浓度为 15 ng/mL, 临用现配。

1.4 样品前处理方法

参照《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》(征求意见稿) 第一法。

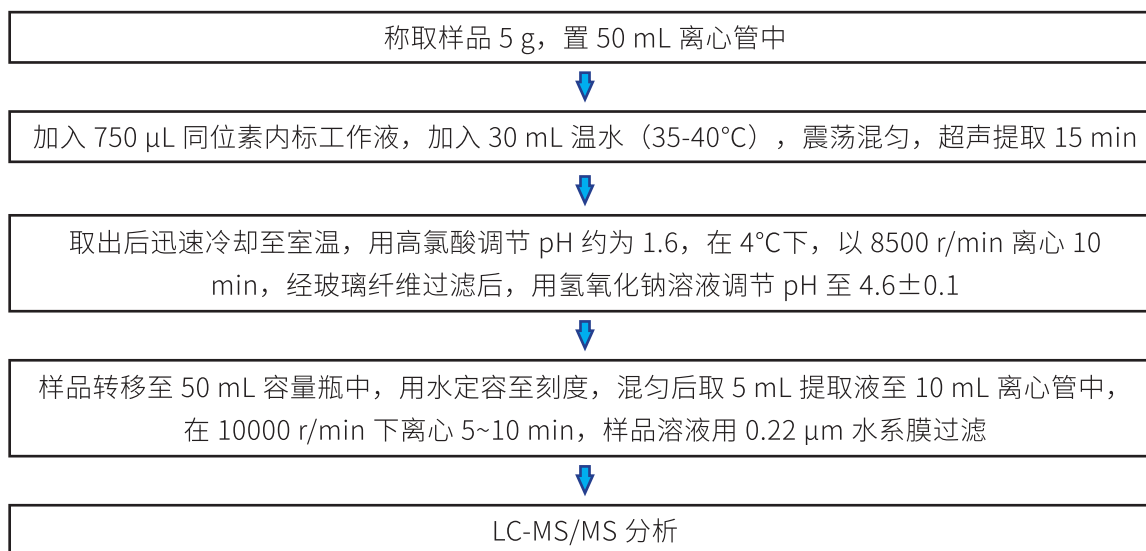


图 1 前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

生物素的标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示, 相关化合物信息表见表 3。

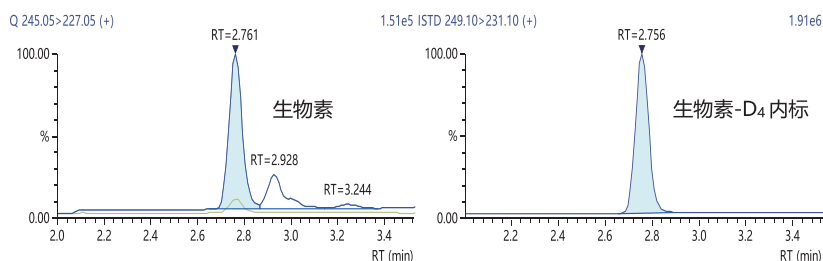


图 2 生物素标准溶液 MRM 色谱图

表 3 标准溶液化合物信息

No.	化合物	化学式	CAS 号	保留时间 (min)
1	生物素	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	58-85-5	2.761
2	生物素 -D ₄	C ₁₀ D ₄ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	1217850-77-5	2.756

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度标准溶液，以生物素浓度与生物素内标浓度的比值为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制生物素的标准曲线。所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数为 0.9992。曲线结果如下图 3，线性方程及相关系数如下表 4 所示。

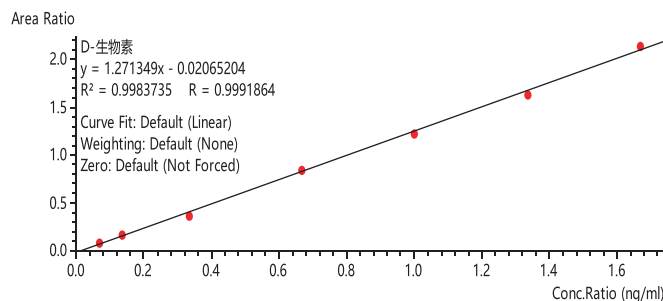


图 3 生物素的校准曲线

表 4 生物素的校准曲线参数

No.	化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	精确度 (%)
1	生物素	y=1.27229x-0.0217966	1~25	0.9992	93.0-114.2

2.3 精密度实验

以浓度为 25 ng/mL 的标准溶液（15 ng/mL 内标），连续进样 6 次，考察分析方法保留时间和峰面积重复性。结果表明：生物素的保留时间的 RSD 为 0.2% 和峰面积的 RSD 为 2.1%，方法重复性良好，仪器精密度良好。结果见表 5。

表 5 重复性实验测试结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	生物素	0.2	2.1
2	生物素 -D ₄	0.3	1.2

2.4 样品加标回收率实验

取乳粉样品，按照 1.4 步骤中制备样品和加标样品，进行回收率实验，结果详见表 6。测试结果显示：加标浓度为 10、20 ng/mL 时，分别配制 6 次，其加标回收率分别为 79.95%、76.59%；RSD 分别为 2.00%、0.29%。

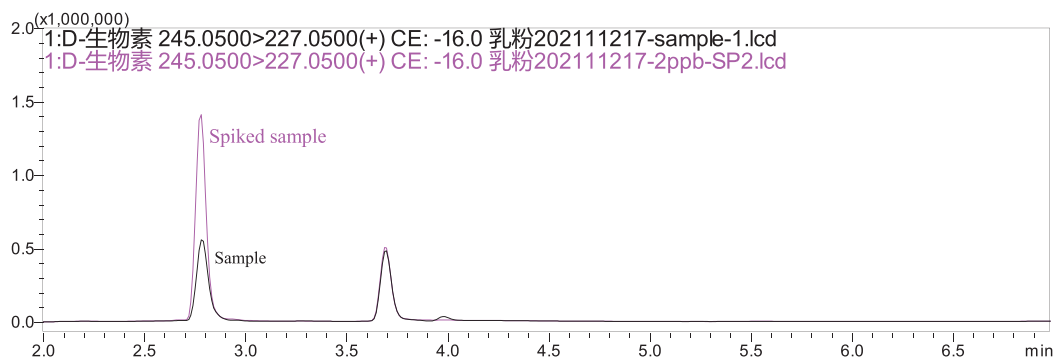


图4 样品与加标样品 MIC 叠加图

表6 样品加标实验结果 (n=6)

No.	化合物	样品浓度 (ng/mL)	加标 10 ng/mL		加标 20 ng/mL	
			回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	生物素	8.7329	79.95	2.00	76.59	0.29

2.5 灵敏度实验

将最低浓度为 0.3 ng/mL 的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行上机测定。通过软件计算分别得到检出限和定量限。在上述条件下，生物素的 LOD 为 0.3 ng/mL，LOQ 为 1 ng/mL，测试结果表明仪器灵敏度良好，满足标准中测定低限的要求。

■ 结论

本文利用岛津公司的 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，参照《食品安全国家标准食品中生物素的测定》（征求意见稿）第一法，建立了食品中生物素含量的测定方法。结果表明，内标生物素 D4 15 ng/mL，生物素在 1~25 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数达到 0.9992，方法检出限为 0.3 ng/mL，方法定量限为 1 ng/mL；重复性实验中，对 25 ng/mL（生物素）的标准溶液重复进样 6 次，保留时间的 RSD 为 0.2%，峰面积的 RSD 为 2.1%，仪器精密度良好；加标回收实验中，加标量 10 ng/mL，20 ng/mL；样品的综合加标回收率分别为 79.95%、76.59%，RSD 为 2.00%、0.29%。该方法可为食品中生物素的测定提供参考。

岛津应用云

