

采用高效液相色谱在线自动衍生法 对奶粉中牛磺酸进行分析



作者

李浪，周洁，肖尧，杨新磊
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文使用配备了具备编程功能自动进样器的 HPLC/UHPLC 快速分析乳制品中的牛磺酸。文中使用柱前 OPA 自动衍生方法、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分析乳制品中的牛磺酸，目标物峰形良好，能够有效与样品中的杂质分离，得到准确的测定结果。与现有方法相比，本方法操作非常简单、重现性好、灵敏度高，使用二极管阵列检测器 (DAD) 即可测定未强化奶粉中天然牛磺酸含量。该方法适用于乳制品中牛磺酸的快速、高效分析。

前言

牛磺酸是一种含硫氨基酸，广泛分布于体内各个组织和器官，且主要以游离状态存在于组织间液和细胞内液中，最先于公牛胆汁中发现而得名。长期以来一直被认为是含硫氨基酸的无功能代谢产物，后来经诸多研究发现，牛磺酸是调节机体正常生理活动的活性物质，且具有多种功能，是人体必需的重要氨基酸。人乳中牛磺酸含量很高，是主要的游离型氨基酸，而牛乳中牛磺酸含量却非常少。因此，牛磺酸已被作为营养强化剂添加在奶粉及其他各类儿童营养食品中，可以促进婴幼儿脑组织和智力的发育、提高新陈代谢能力，对宝宝的健康发展起着至关重要的作用。我国食品安全国家标准规定，推荐婴儿配方食品中添加牛磺酸^[1]。

牛磺酸的检测方法有很多，目前常用的方法是柱前或柱后衍生化高效液相色谱法。例如现行国标就是使用邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)柱后衍生以及单磺酰氯柱前衍生法^[2]。柱后衍生法利用牛磺酸与 OPA 在碱性条件下生成相应的衍生物，通过用荧光检测器来测定衍生物的含量，该法具有方法稳定、干扰小、重现性较好及回收率较高等优点，但是柱后衍生需要使用离子交换柱，离子交换柱通用性不好，不同供应商色谱柱一致性很差，安装了柱后衍生装置的液相色谱仪器通用性也很差，且装置较为昂贵，所以具有很大的局限性。柱前衍生方法利用单磺酰氯在碱性条件下与牛磺酸进行衍生化反应，在紫外或荧光条件下测定牛磺酸的含量，该法需要人工进行复杂且要求苛刻的衍生操作（衍生剂必须每次临用前现配、衍生过程需要避光等），衍生需要的时间很长而且衍生物不稳定，需衍生后立即进样分析，方法的检测灵敏度也较低。早期也有使用灵敏度更高、且衍生反应快速的 OPA 作为衍生剂的手动柱前衍生的方法^[3-4]，但因衍生产物的半衰期比丹磺酰氯的短很多，手动衍生因无法严格控制衍生时间的长短而重现性很差，所以方法的局限性更大。

安捷伦全自动氨基酸分析方法^[5]使用 OPA 作为衍生剂在自动进样器内完成全自动衍生，既克服了 OPA 作为柱前衍生剂的缺点，又保留了 OPA 衍生剂的优点，极大地提高了方法的稳定性及可靠性。安捷伦公司北京实验室及一些用户^[6]借助标准的安捷伦全自动氨基酸分析方法^[7]及试剂包并对其进行简化、利用单磺酰氯衍生方案的样品前处理步骤及色谱分析条件，完成了对牛磺酸的分析。随着安捷伦公司对全自动氨基酸分析方法的改进^[8]及新色谱柱的出现，对牛磺酸分析方法的性能有了进一步提高的空间，也需要分析速度更快、灵敏度更高且更合理的牛磺酸分析方法。

本研究采用的牛磺酸测定方法是在安捷伦全自动氨基酸分析方法^[8]及试剂的基础上，结合 OPA 分析牛磺酸的文献^[3-4]对方法进行了易用性及合理性的改善。同时，灵敏度的提高使之仅用紫外检测器就可检出未强化奶粉中牛磺酸的本底含量。

实验部分

试剂和样品

乙腈（迪马公司）为色谱纯；醋酸铵（Sigma）、5-磺基水杨酸(CNW)为优级纯。所用的实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水；牛磺酸对照品及所有样品均来自安捷伦的客户。

衍生试剂选用安捷伦氨基酸分析套件中的硼酸缓冲盐（部件号 5061-3339）及 OPA（部件号 5061-3335，这是已经与 3-巯基丙酸混合并溶于 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液中、配制好的 OPA）。

仪器和设备

采用 Agilent 1220 Infinity 液相色谱系统（部件号 G4294B），配备：二元梯度泵（内置脱气机）、自动进样器、柱温箱及 DAD 检测器。控制及数据处理软件使用 OpenLab Chemstation，版本 C.01.10。

色谱柱选用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm（部件号 699975-902）。

标样配制

准确称取 0.1000 g 牛磺酸标准品，用水溶解并定容至 100 mL，得到 1 mg/mL 牛磺酸标准储备液。将该牛磺酸标准储备溶液用水稀释配制一系列标准溶液，标准系列浓度为 0.5、2.0、5.0、10.0 及 20.0 μg/mL，临用前现配。

样品前处理

配制 0.2 mol/L 磺基水杨酸溶液：称约 5 g 的 5-磺基水杨酸（带 2 分子水）溶于 100 mL 水中。

配制及处理样品：称取约 5 g 奶粉溶于 40 mL 热水（约 40 °C）中，充分摇动混匀后静置。将该奶粉溶液与 0.2 mol/L 磺基水杨酸溶液 1:1 充分混合（各 5 mL）后静置 10 分钟，静置后置于高速离心机，13000 转离心 5 分钟。取上清液用 0.2 μm 过滤膜（水溶性）过滤后使用。

加标样品配制

前加标样品：溶解奶粉之前，加入 20 μg/mL 标样 5 mL，剩下步骤与处理样品一致。相当于在样品中添加了 1.25 μg/mL 的牛磺酸。

后加标样品：处理好并过滤后的样品溶液与 20 μg/mL 标样等体积混合。相当于样品的牛磺酸浓度减半，再加上 10 μg/mL 的牛磺酸。

液相色谱条件

色谱柱： Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm
流速： 1.0 mL/min (泵参数的设置，冲程： 100 μL，
压缩因子： 45)
柱温： 40 °C
流动相： A) 10 mmol/L醋酸铵溶液
B) 乙腈
梯度程序： 时间 (min) B (%)
0.0 5.00
1.0 5.00
6.0 15.00
6.5 70.00
8.0 70.00
8.5 5.00
12.0 5.00

检测器： 335 nm, 10 nm 带宽；参比 400 nm, 40 nm 带宽
自动进样器程序：
1 吸取 2.5 μL 硼酸缓冲盐 (部件号 5061-3339)
2 吸取 1.0 μL 样品
3 Mix In Air (在空气中混合)，将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4 等待 0.2 分钟
5 吸取 0.5 μL OPA (部件号 5061-3335)
6 Mix In Air，将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7 吸取 32 μL 纯水
8 Mix In Air，将 20 μL 混合液混合 8 次
9 进样
注：吸取速度均为 200 μL/min，混合 (Mix) 均采用最大速度 (Maximum Speed)

结果与讨论

奶粉样品的色谱分离结果

图 1 是奶粉样品的典型的色谱图。样品中牛磺酸峰出现在 5 分钟左右，离溶剂峰很远。牛磺酸峰前后的杂质峰都很小，而且完全没有干扰到牛磺酸峰的积分及定量（红色为压力曲线）。图 1A 是完整色谱图，图 1B 是两针重叠图，放大了牛磺酸峰附近部分。

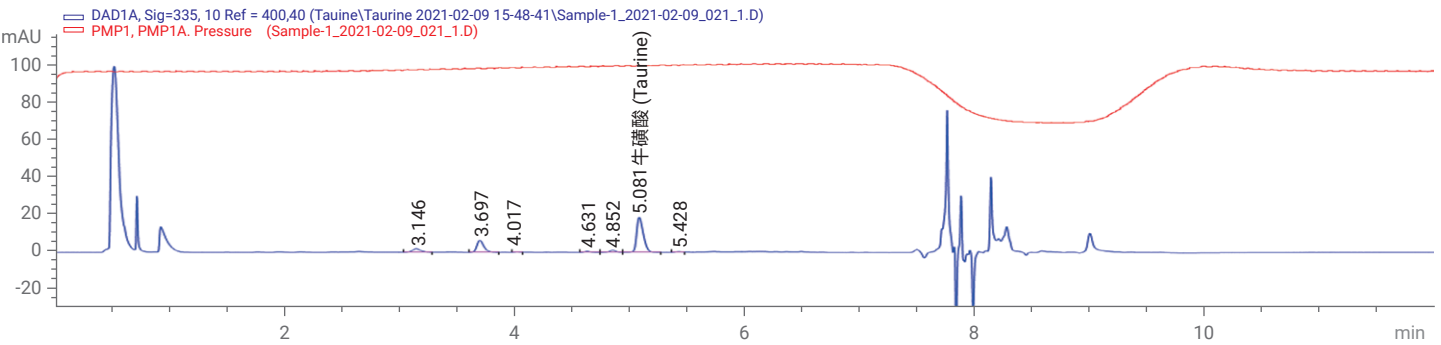


图 1A. 典型的样品色谱图（蓝色为样品的色谱图，红色为压力曲线）

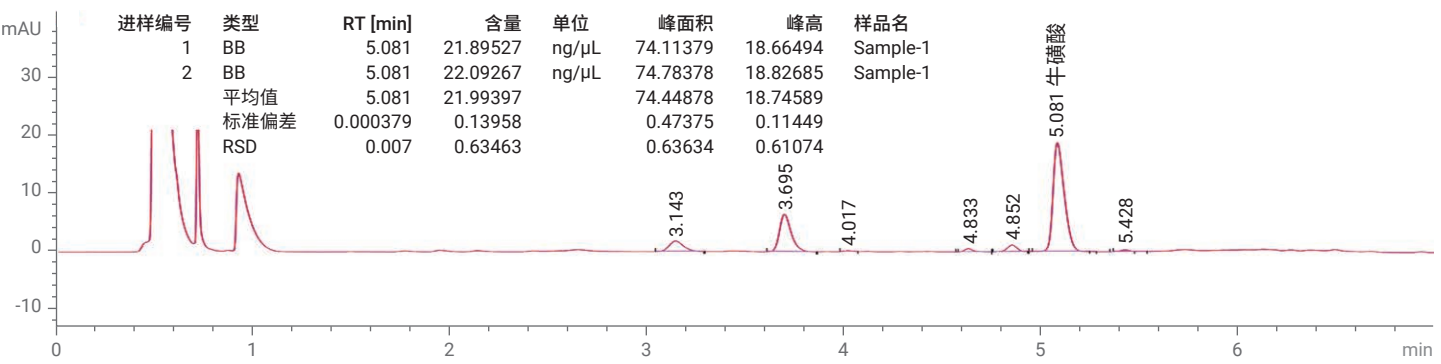


图 1B. 典型的样品色谱图（图 1A 的放大图，两针重叠）

标准曲线与相关系数

牛磺酸标样按浓度由低到高进样，每个浓度平行进样 2 次，取每个浓度点峰面积平均值进行计算。在 0.5–20.0 µg/mL 的浓度范围内的线性相关性良好，相关系数 R² 大于 0.999，如表 1 所示。图 2 是牛磺酸标样的色谱图的重叠图。图 3 是标准曲线图。

表 1. 牛磺酸的线性回归方程和相关系数

分析物	线性回归方程	相关系数 R ²
牛磺酸	y = 3.378x – 0.1608	0.99987

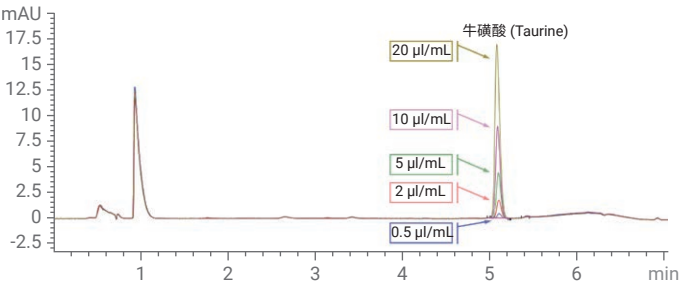


图 2. 牛磺酸标样的色谱图，浓度为 0.5–20.0 µg/mL，每个浓度进样 2 针

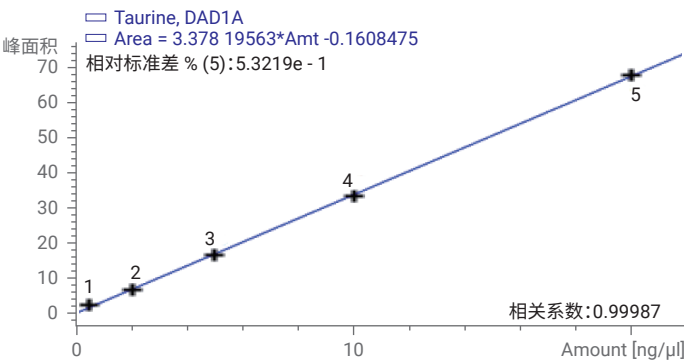


图 3. 牛磺酸的标准曲线

重现性

用牛磺酸标样做重现性实验，图 4 是用牛磺酸 2.0 µg/mL 浓度的标样 6 针获得的重现性色谱图。其保留时间的相对标准偏差 (RSD) 是 0.025%、峰面积的相对标准偏差 (RSD) 是 2.82%。图 5 是用牛磺酸 20.0 µg/mL 浓度的标样 6 针获得的重现性色谱图。其保留时间的相对标准偏差 (RSD) 是 0.037%、峰面积的相对标准偏差 (RSD) 是 1.21%。

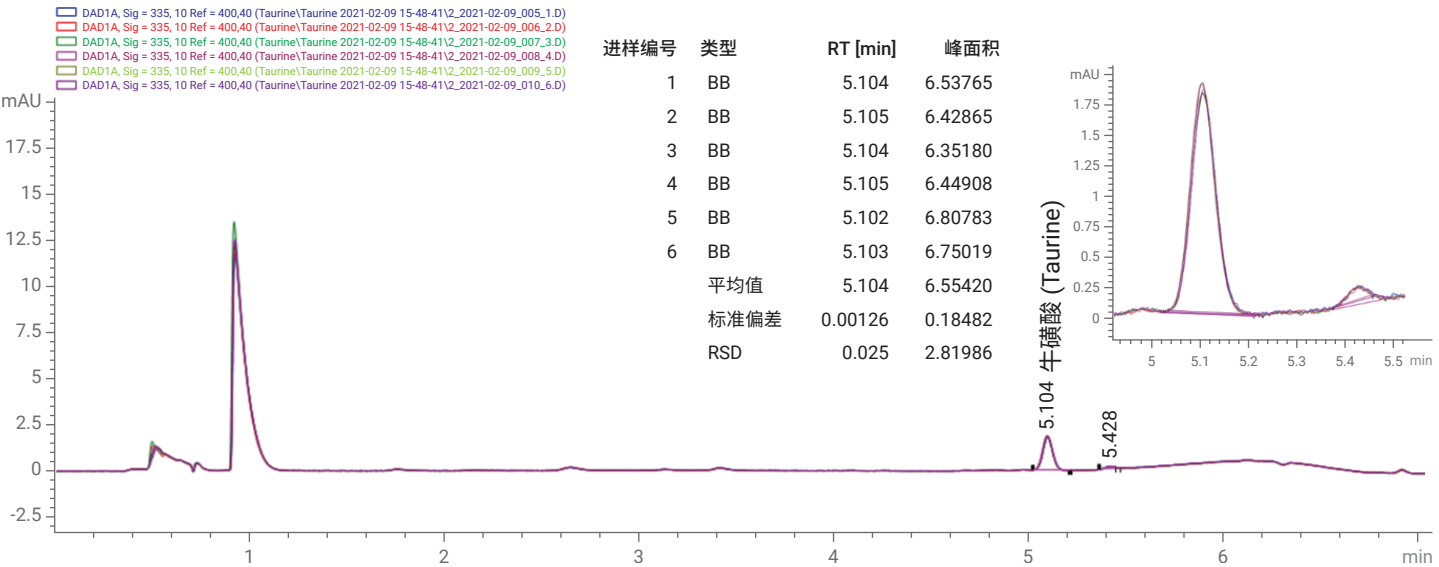


图 4. 牛磺酸 2.0 µg/mL 浓度的标样 6 针的重现性。右上小图是牛磺酸峰附近的放大图

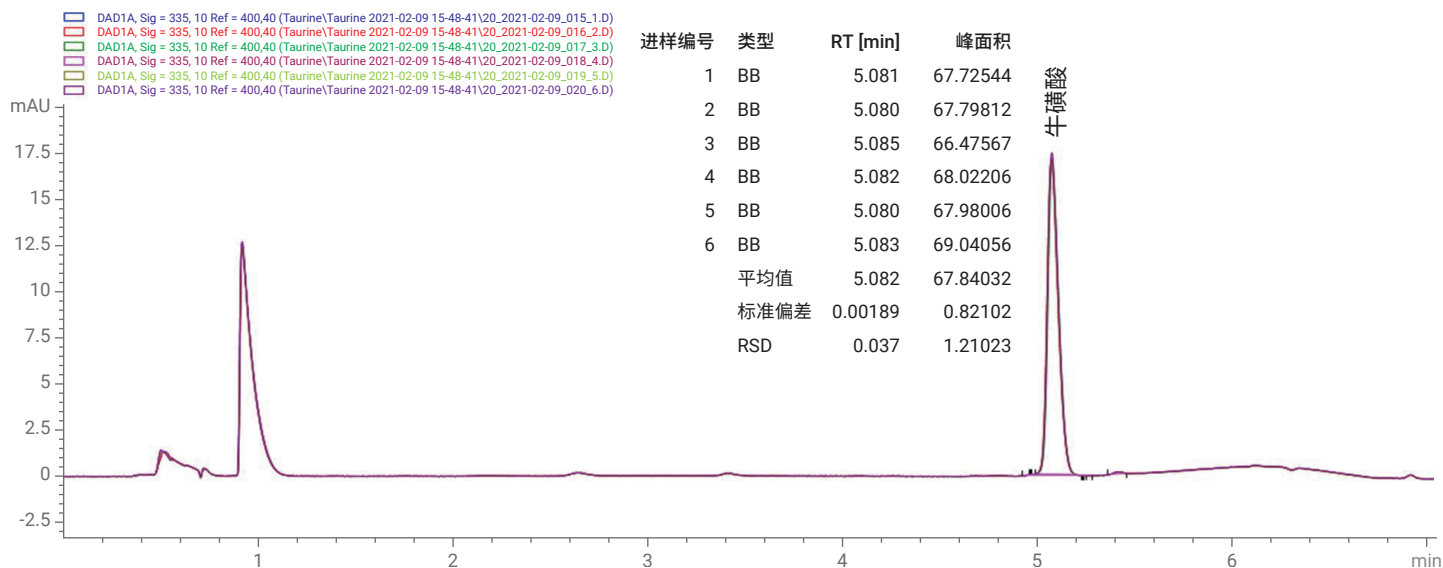


图 5. 牛磺酸 20.0 µg/mL 浓度的标样 6 针的重现性

奶粉样品的计算结果

本文做了 12 个不同奶粉的实际样品。按国标 (GB5009.169-2016) 的计算方法^[2] 计算其牛磺酸的含量。图 6 是 12 个样品的色谱图 (重叠图)。表 2 是这 12 个奶粉样品的分析结果。

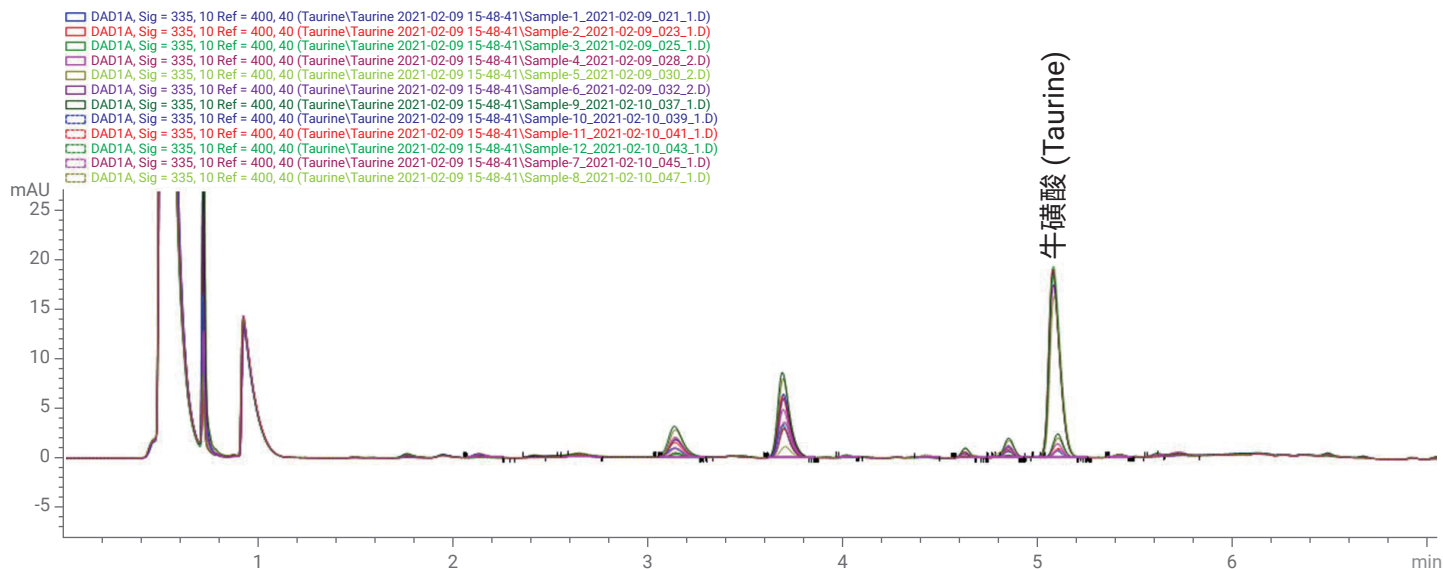


图 6. 奶粉中牛磺酸的分析, 12 个样品的色谱图

表 2. 奶粉中牛磺酸的含量计算

#	溶液浓度 (µg/mL)	样品含量 (mg/100 g)
1	21.990	35.184
2	23.000	36.800
3	21.420	34.272
4	1.609	2.574
5	2.220	3.552
6	20.420	32.672
7	0.868	1.389
8	18.940	30.304
9	2.760	4.416
10	0.767	1.227
11	1.033	1.653
12	21.850	34.960

加标回收率

本文考察了两种加标方式的回收率，前加标方式考虑到了样品前处理步骤的影响因素，而后加标方式仅仅考虑色谱的影响因素。每种方式各选了一个奶粉样品做加标，两种方式的加标回收率都很好，说明该方法的可靠性很好。

前加标样品的色谱图见图 7，回收率是 100.6%。后加标样品的色谱图见图 8，回收率是 95.7%。

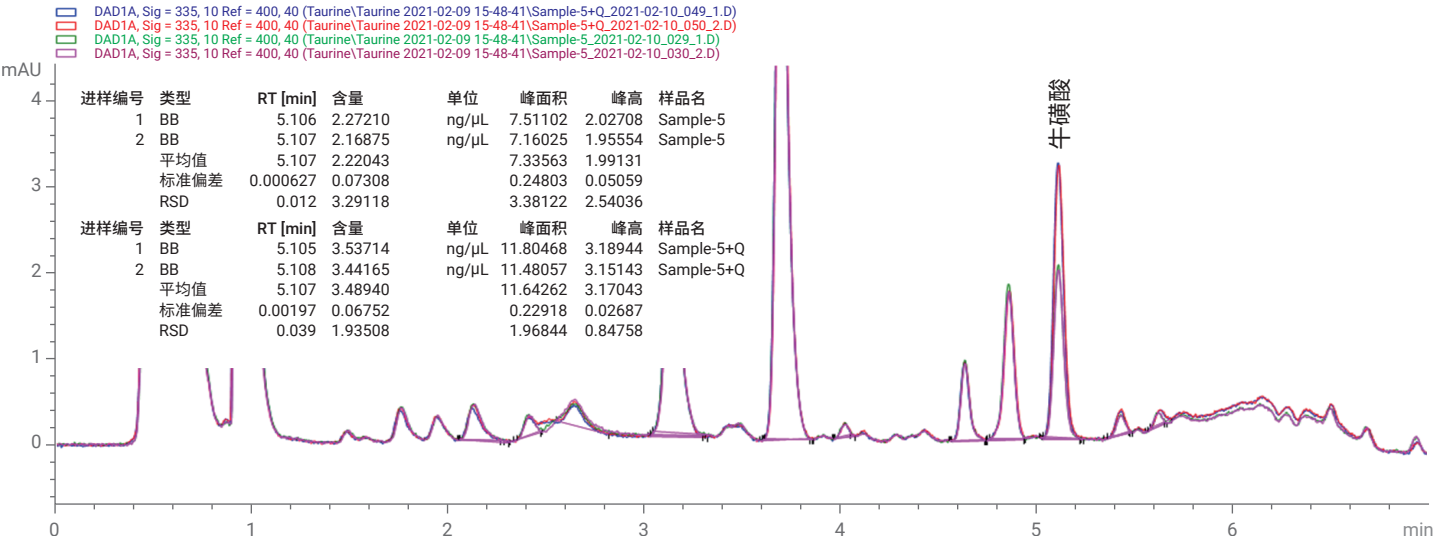


图 7. 前加标中奶粉样品 (5#) 与未加标样品的重叠图 (各两针)

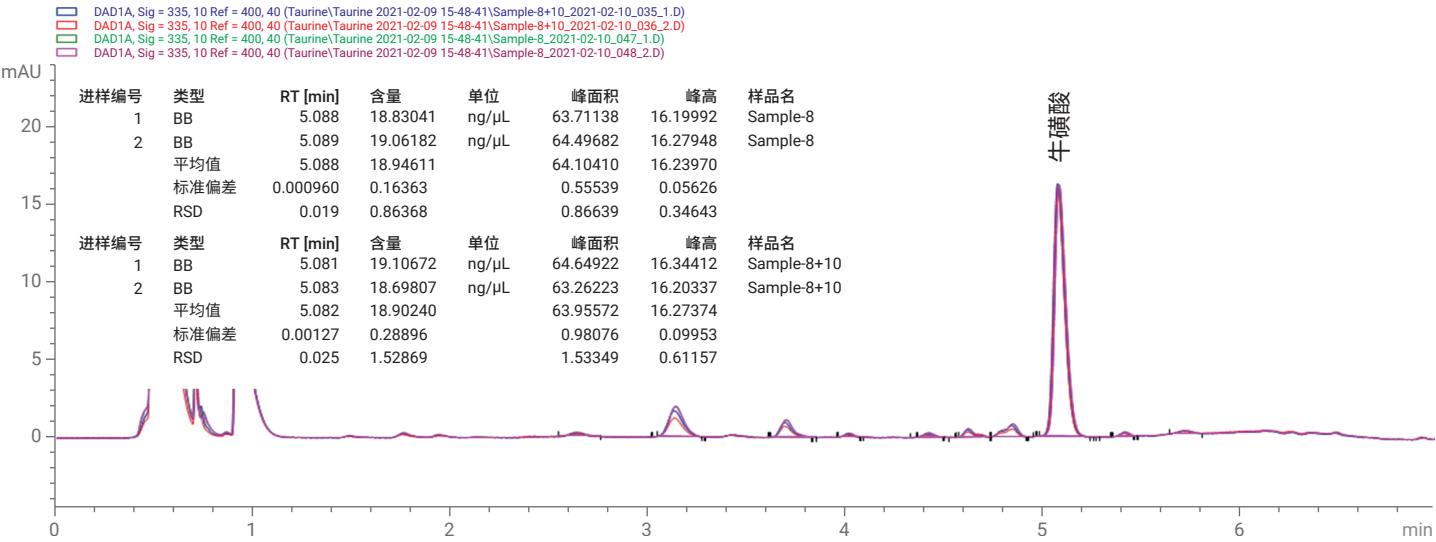


图 8. 后加标中奶粉样品 (8#) 与未加标样品的重叠图 (各两针)

方法的灵敏度水平及杂质干扰

国标 (GB5009.169-2016)^[2] 的丹磺酰氯柱前衍生法 (第二法) 可用紫外检测或荧光检测器, 用紫外检测器时标准曲线范围是 5.0–25.0 $\mu\text{g/mL}$, 而用荧光检测器时是 0.5–20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度。本方法用紫外检测器 (DAD), 而采用的标准曲线范围是 0.5–20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度, 与该国标中荧光检测器采用的标曲浓度水平一样, 实际标样的色谱图见图 2, 其 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度谱图的信噪比远高于定量限水平。因此, 该方法使用紫外检测器时的灵敏度水平与国标丹磺酰氯荧光法相当。

本文做的 12 个奶粉样品中, 有一半是未强化牛磺酸的奶粉。未强化奶粉中牛磺酸含量 (牛乳中天然存在的量) 很低, 按本

方法处理奶粉时, 溶液中含牛磺酸的浓度在 0.7–3.0 $\mu\text{g/mL}$ 之间。图 9 是 10 号样品的色谱图, 该奶粉经前处理后溶液含牛磺酸的浓度是 0.767 $\mu\text{g/mL}$, 计算出该奶粉中牛磺酸的含量是 1.227 mg/100 g。牛磺酸峰高约为 1 mAU, 且没有受到两侧杂质峰的干扰。

牛磺酸是一种含硫的氨基酸, 用 OPA 衍生的方法对所有一级氨基酸都会有衍生反应。因此, 需要考察其他氨基酸在该分析条件下是否对牛磺酸的分析有干扰。图 10 是牛磺酸标样、18 种氨基酸的混标、奶粉样品 (7#, 牛磺酸的溶液浓度是 0.868 $\mu\text{g/mL}$) 及水的色谱图重叠。可以看出, 其他氨基酸对牛磺酸没有干扰, 而且奶粉中通常会含有其他的氨基酸。

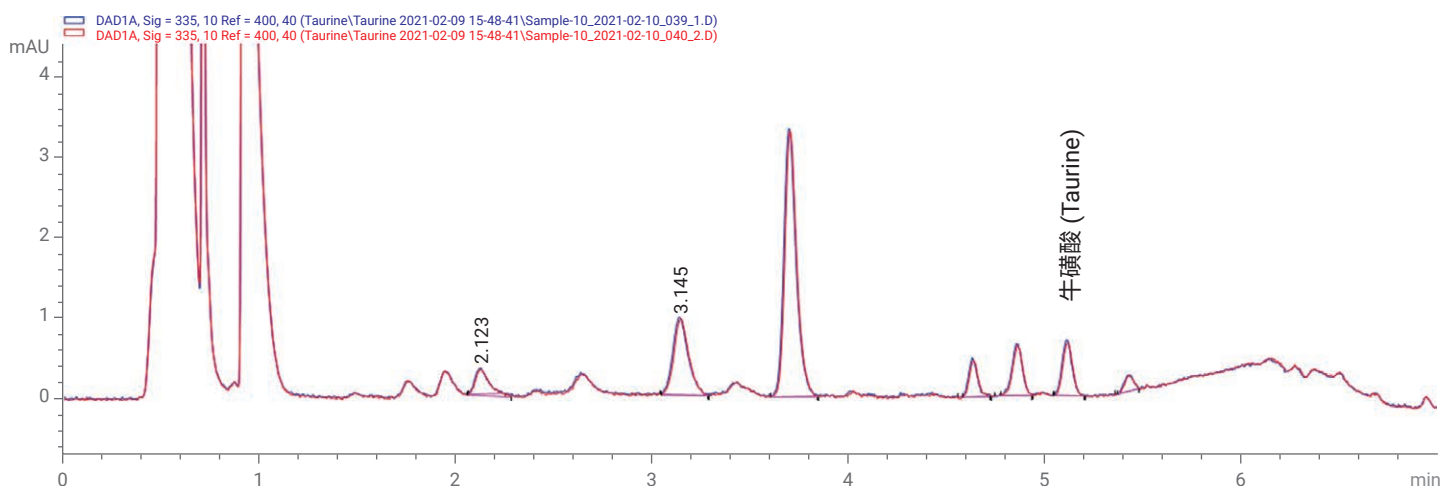


图 9. 牛磺酸含量较低的奶粉样品 (10#) 的色谱图 (两针重复进样)

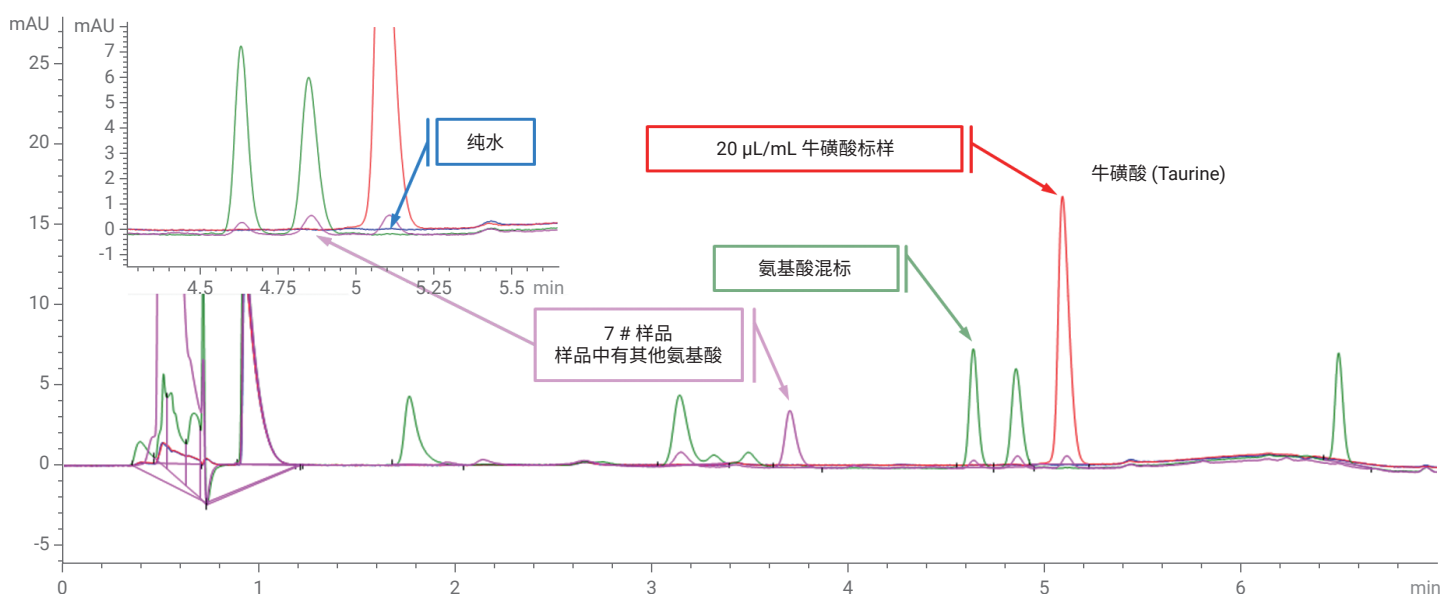


图 10. 牛磺酸标样、氨基酸混标、水与奶粉样品 (7#) 的色谱图, 左上小图是 5 分钟前后的放大图

结论

本实验利用安捷伦的氨基酸分析方法及试剂包，使用 Poroshell EC-C18 色谱柱，建立了准确、快速、重现性好的牛磺酸分析方法。实现了牛磺酸的定性、定量分析。在实验中实际检测了 12 种不同奶粉样品中的牛磺酸含量，包括未强化奶粉中低含量牛磺酸，均没有杂质干扰，可实现准确的定量分析。此外，用碘基水杨酸溶液处理奶粉与 OPA 衍生方案更为匹配^[3-4]，辅助用自动进样器在线进行 OPA 的衍生操作，使牛磺酸的分析过程简化并节省了大量样品前处理时间。因此，此方法非常适合乳制品中的牛磺酸分析。

本牛磺酸分析方法中的色谱条件包括：使用的 Poroshell EC-C18 色谱柱、流动相及其梯度条件以及自动进样器的 OPA 衍生，也可以用来分析其他基质中的牛磺酸含量。样品基质不同，前处理方法需要做相应的调整。在实验过程中也试过用现行国标方法中丹磺酰氯衍生方案中所用的蛋白沉淀剂（亚铁氰化钾及乙酸锌）进行奶粉的样品前处理^[2]，结果没有任何差异。但因碘基水杨酸溶液处理奶粉样品更为简单且与 OPA 衍生方法更为匹配，因此最终选择碘基水杨酸作为奶粉的前处理溶液。牛磺酸的 OPA 衍生方式如使用荧光检测器作为检测手段，可获得更高的灵敏度以及更好的选择性（更低的杂质干扰可能性）。但从本实验的 12 个奶粉样品看，没有使用荧光检测器的必要。在遇到更复杂基质的样品、需要更高灵敏度的情况下，可选择荧光检测器作为检测手段。

本实验使用的 Poroshell EC-C18 柱采用表面多孔填料，能够获得与亚 2 微米超高效液相色谱填料相当的柱效，使用仅 50 mm 的柱长就完全满足了奶粉中牛磺酸分析时杂质的分离，而且能使分析速度有所提高。

参考文献

1. GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品
2. GB 5009.169-2016 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定
3. GB/T 5009.169-2003 食品中牛磺酸的测定
4. Ferreira, etc. Development of An HPLC-UV Method for Determination of Taurine in Infant Formulae and Breast Milk, J Liq Chrom & Rel Technol 1997, 20: 1269-1278
5. Agilent ZORBAX Eclipse AAA Instructions For Use (Agilent ZORBAX Eclipse AAA 使用说明)，5980-3088EN
6. 林玉宙等 柱前在线自动衍生-高效液相色谱法快速测定奶粉中牛磺酸 乳业科学与技术 2015, Vol.38 No.5 21-24
7. 氨基酸分析操作指南：ADVANCEBIO 全程解决方案助您获得准确的分析结果，5991-7694CHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 6 月 4 日，中国出版
5994-4219ZHCN