

高效液相色谱柱后衍生法测定奶粉中牛磺酸的含量

LC-088

摘要：本文建立了奶粉中牛磺酸的高效液相色谱柱后衍生测定法。通过 Na 型氨基酸分析色谱柱进行液相色谱分离，OPA 邻苯二甲醛柱后衍生，荧光检测器进行定量分析。方法的线性范围为 1~20 $\mu\text{g/mL}$ ；仪器的定量限和检出限分别为 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ；1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的牛磺酸标准溶液连续进样 6 次，保留时间 RSD% $<0.02\%$ ，峰面积 RSD% $<0.4\%$ ；仪器的重复性良好，奶粉样品中加入 0.5 mg/100g 牛磺酸，回收率分别为 84.14%。

关键词：OPA 柱后衍生 奶粉 牛磺酸

牛磺酸 (Taurine) 又称 2-氨基乙磺酸，最早由牛黄中分离出来，故得名。具有多种生理功能，是人体健康必不可少的一种营养素。牛磺酸虽然不参与蛋白质合成，但它却与胱氨酸、半胱氨酸的代谢密切相关。人体合成牛磺酸的半胱氨酸亚硫酸羧酶 (CSAD) 活性较低，主要依靠摄取食物中的牛磺酸来满足机体需要。牛磺酸广泛分布于动物组织细胞内，海生动物含量尤为丰富，哺乳类组织细胞内亦含有较高的牛磺酸，特别是神经、肌肉和腺体内含量更高，是机体内含量最丰富的自由氨基酸。牛磺酸在脑内的含量丰富、分布广泛，能明显促进神经系统的生长发育和细胞增殖、分化，且呈剂量依赖性，在脑神经细胞发育过程中起重要作用。此外，牛

磺酸还可以提高神经传导和视觉机能、防止心血管病、改善内分泌状态，增强人体免疫等功能。

食品安全国家标准《GB5413.26-2010 婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定》对婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定做了相关的检测规定，包括有 OPA 柱后衍生高效液相色谱法，单磺酰氯柱前衍生高效液相色谱法。标准规定的定量限为 0.5 mg/100g。

本篇应用文集参考 GB5413.26-2010 的要求，采用岛津 LC-20A 柱后衍生液相色谱系统，建立了一种 OPA 柱后衍生高效液相色谱法测试奶粉中牛磺酸含量的测试方法，供用户参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 LC-20A 氨基酸柱后衍生系统。具体配置为：系统控制器 CBM-20A、泵 LC-20ADXR \times 2 (输液泵)、柱温箱 CTO-20AC、自动进样器 SIL-20ACXR、检测器 RF-20AXS、柱后衍生管路套件。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack AMINO-Na 6.0 mm \times 100 mm 5 μm

流动相：柠檬酸缓冲液

衍生液：OPA 衍生液

流速：0.4 mL/min

衍生液流速：0.4 mL/min

分析时间：10.0min

柱温：60 $^{\circ}\text{C}$

检测器激发波长：338 nm

检测器发射波长：425 nm

进样量：20 μL

1.3 样品制备

1.3.1 流动相和衍生试剂制备

偏磷酸溶液 (10 g/L)：称取 10.0 g 偏磷酸，用水溶解并定容至 1000 mL。流动相柠檬酸缓冲液配置：称取 19.6 g 柠檬酸三钠，加 950 mL 水溶解，用硝酸调 pH=3.10~3.25，加入 1 mL 苯酚，采用 0.45 μm 水系微孔滤膜抽滤，备用。

柱后荧光衍生剂配置方法：硼酸钾溶液配置：称取 30.9 g 硼酸，26.3 g 氢氧化钾，用水溶解并定容至 1000 mL。

衍生液配置：称取 0.60 g 邻苯二甲醛，用 10 mL 甲醇溶解后，加入 0.5 mL 2-巯基乙醇和 0.35 g Brij-35，用 0.5 mol/L 的硼酸钾溶液定容至 1000 mL，经 0.45 μm 水系微孔滤膜抽滤。备用。

1.3.2 标样配制

牛磺酸标准溶液配置：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 的牛磺酸标准储备液。移取不同体积的牛磺酸标准储备液，用水稀释制备标准系列浓度为 1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 。现配现用。

1.3.3 样品制备

奶粉样品处理：准确称取奶粉样品 20 g，加入 30 mL 偏磷酸溶液溶解，充分摇匀，移入 100 mL 容量瓶中，放入超声波振荡器中振荡 15 min，取出冷却至室温后，用水定容至刻度，样液在 5000 转 / 分钟条件下离心 10 min，取上清液经 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤，上机测试。

结果讨论

2.1 牛磺酸标准品色谱图

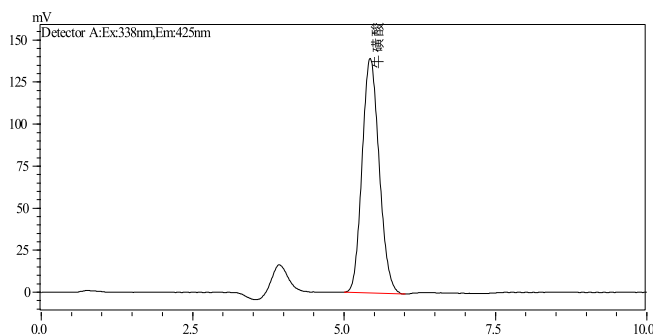


图 1 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 牛磺酸标准品色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的牛磺酸标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如下图 2 所示，线性方程及相关系数见表 1。

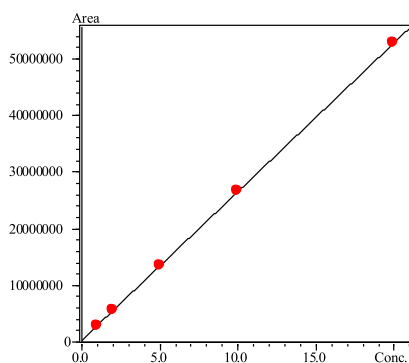


图 2 牛磺酸校准曲线

表 1 牛磺酸校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数r
1	牛磺酸	$Y=2627290X+324483$	0.9999

2.3 重复性考察

取 1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 牛磺酸标准品，进样量 20 μL ，连续进样六次，进行重复性考察，得到统计结果如表 2 所示，保留时间 RSD% 值在 0.018% 以下，峰面积 RSD% 值在 0.37% 以下。统计结果显示，重复性结果良好。

表 2 重复性结果

化合物	1.0 µg/mL		5.0 µg/mL		10.0 µg/mL	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
牛磺酸						
RSD(%)	0.018	0.37	0.016	0.24	0.015	0.13

2.4 灵敏度实验

根据标准曲线中的最低点 1.0 µg/mL 计算仪器的灵敏度, 通过 LabSolutions 软件计算信噪比、仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算), 结果见表 3。

表 3 1.0 µg/mL 信噪比、检测限

编号	名称	S/N	LOQ(µg/mL)	LOD(µg/mL)
1	牛磺酸	125.89	0.02	0.08

2.5 回收率实验

按照 1.3 所述方法处理奶粉样品, 上机测试, 检出该奶粉样品中含有牛磺酸。奶粉样品色谱图如图 3 所示。奶粉样品中加入 0.5 mg/100g 标准品, 奶粉样品加标色谱图如图 4 所示。牛磺酸的回收率为 84.14%, 如表 4 所示。

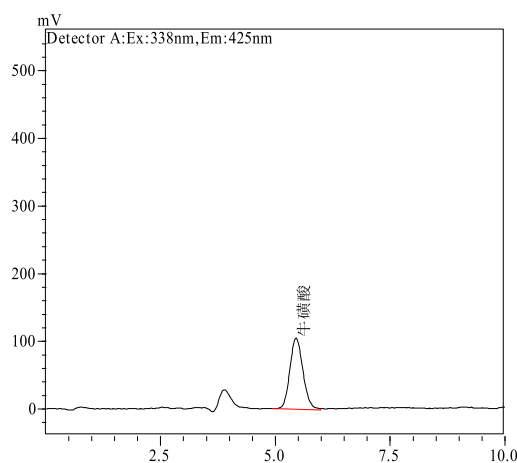


图 3 奶粉样品色谱图

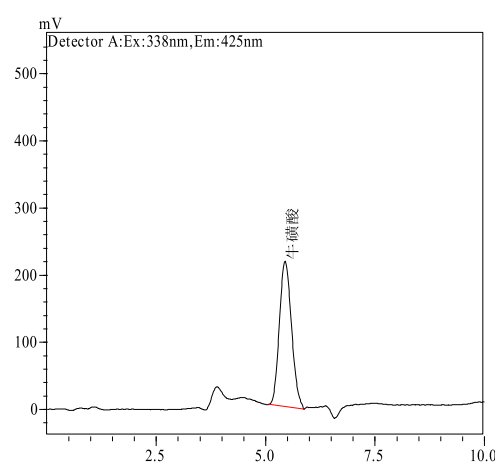


图 4 0.5 mg/100g 加标样品色谱图

表 4 样品测试以及回收率考察

化合物名称	R.T. (min)	奶粉样品 (mg/100g)	奶粉加标样 (mg/100g)	回收率 %
牛磺酸	5.439	0.3324	0.7531	84.14

结论

本文参考《GB5413.26-2010 婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定》建立了高效液相色谱柱后衍生法测定奶粉中牛磺酸含量的方法。该方法能够实现样品的快速分析, 仪器的最低定量限和检出限分别为 0.08 µg/mL 和 0.02 µg/mL, 仪器的重复性较好, 奶粉样品中加入 0.5 mg/100g 牛磺酸, 回收率为 84.14%。本方法适合作为奶粉中牛磺酸测定的快速分析方法。