

全自动氨基酸分析仪测定支链氨基酸粉中牛磺酸的含量

秦菁*, 魏鲜娥, 蔡伟江, 陈彩云, 梁洁仪
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立全自动氨基酸分析仪测定支链氨基酸粉中牛磺酸。**方法** 样品经上样缓冲液(pH 2.2)溶解提取, 按照氨基酸分析仪设定的钠体系程序洗脱, 用 Na 型离子交换色谱柱分离, 与茚三酮反应液在 135 °C 下反应, 生成可在 570 nm 和 440 nm 检测到的蓝色物质, 采用外标法定量。**结果** 牛磺酸在 4.1065~20.5326 µg/mL 浓度范围内有良好的线性, $r^2=0.999$, 回收率为 101.28%, RSD 为 2.1%, 检出限为 15 mg/100 g。**结论** 该方法准确可靠, 不需要剧毒衍生试剂, 适用于支链氨基酸粉中牛磺酸的测定。

关键词: 牛磺酸; 支链氨基酸粉; 保健食品; 氨基酸分析仪

Determination of taurine in branched amino acid powder by automatic amino acid analyzer

QIN Jing*, WEI Xian-E, CAI Wei-Jiang, CHEN Cai-Yun, LIANG Jie-Yi
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of taurine in branched amino acid powder by automatic amino acid analyzer. **Methods** The sample was extracted by loading buffer (pH 2.2), and eluted according to the sodium system procedure by the amino acid analyzer, separated by Na-ion exchange chromatographic column, and reacted with ninhydrin at 135 °C. The reaction was carried out at 570 nm and 440 nm of the blue material, using external standard method for quantitation. **Results** Taurine had a good linear relationship in the range of 4.1065~20.5326 µg/mL ($r^2=0.9999$), the average recovery was 101.28%, RSD was 2.1%, and the limit of detection was 15 mg/100 g. **Conclusion** The method is accurate and reliable, and do not need toxic reagents, which is suitable for the determination of taurine in branched chain amino acid powder.

KEY WORDS: taurine; branched chain amino acid powder; health food; amino acid analyzer

1 引言

牛磺酸(taurine)是一种含硫的 β -氨基乙磺酸, 主要以游离状态存在于组织间液和细胞内液中, 作为生理营养的活性物质, 对人体起着十分重要的生理调节作用, 尤其是

增强免疫力和抗疲劳^[1]。目前测定牛磺酸的主要方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、衍生化高效液相色谱法、氨基酸分析仪法等^[2-5]。现有的国家标准 GB 5413.26-2010《婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定》^[6]第一法采用茚三酮柱后衍生, 用高效液相色谱荧光检测器进行检测; 第二法为

*通讯作者: 秦菁, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 151837270@qq.com

*Corresponding author: QIN Jing, By-Health Co., Ltd, Zhuhai 519040, China. E-mail: 151837270@qq.com

丹磺酰氯柱前衍生法,用紫外或荧光检测器检测。GB/T 5009.169-2003《食品中牛磺酸的测定》^[7]第一法采用邻苯二甲醛(*o*-phthaldialdehyde, OPA)柱前衍生用高效液相色谱紫外检测器进行检测;第二法采用薄层色谱法。其中丹磺酰氯对光和湿敏感不稳定,且需衍生反应 2 h,耗时久。衍生试剂 OPA 剧毒,柱前衍生易损伤色谱柱,且具有相同基团的化合物经过衍生后对牛磺酸的检测有干扰,衍生步骤繁杂,色谱柱平衡时间久,且需 2 min 内进样测试^[8-10]。而薄层色谱法对薄层板的要求较高。

本研究建立了全自动氨基酸分析仪测定支链氨基酸粉中牛磺酸的含量^[11-13],样品用上样缓冲液溶解超声提取,用全自动氨基酸分析仪进行测定。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器设备

支链氨基酸粉(汤臣倍健股份有限公司)。

柠檬酸钠、浓盐酸、氢氧化钠、氯化钠、硫二甘醇、苯酚、异丙醇(分析纯,国药集团)、茚三酮缓冲液(biochrom)、牛磺酸对照品(CHEM,批号:421-65D,含量 99%)。

Biochrom 30+ 系列全自动氨基酸分析仪(英国 Biochrom 公司);XP 205 电子天平(感量 0.01 mg,瑞士梅特勒公司);KQ-500E 型超声仪(上海舒美公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 仪器条件

(1) 色谱条件

分析柱: PEEK 钠或锂预洗柱和分析柱或同等性能的分析柱(biochrom Na+ Sodium Column 或同等性能的色谱柱);进样量: 20 μ L;检测波长: 570 nm 和 440 nm。

(2) 钠系统程序设置

A 钠系统再生程序

缓冲液	温度(℃)	时间(min)	流速(mL/h)	Nin	Rec
5	98	5	35	OFF	OFF
6	98	4	35	OFF	OFF
1	98	3	35	OFF	OFF
0	45	2	OFF	OFF	OFF
1	45	9	44	OFF	OFF
1	45	1	44	ON	OFF
1	45	1	35	ON	OFF

注: Nin 为缓冲液通道, Rec 为茚三酮缓冲液通道。

B 钠体系样品程序

缓冲液	温度(℃)	时间(min)	流速(mL/h)	Nin	Rec	commands
1	45	1	35	ON	OFF	
1	45	0	35	ON	OFF	Reset
1	45	1	35	ON	OFF	Load
1	45	1	35	ON	OFF	
1	45	0	35	ON	OFF	Reset
1	45	5	35	ON	ON	
2	47	12	35	ON	ON	
5	47	1	35	ON	ON	
5	98	17	35	ON	ON	
6	98	4	35	ON	ON	
1	98	3	35	ON	ON	
0	45	2	OFF	OFF	OFF	
1	45	9	44	OFF	OFF	
1	45	1	35	ON	OFF	
1	45	1	35	ON	OFF	

2.2.2 标准品溶液的配制

精密称取 50 mg 对照品至 50 mL 棕色容量瓶中,加入适量上样缓冲液(pH 2.2)超声溶解并定容至刻度,摇匀,即得 1 mg/mL 的贮备液。

精密吸取牛磺酸标准贮备液 2 mL 至 100 mL 容量瓶,加上样缓冲液(pH 2.2)稀释至刻度,摇匀,然后再分别吸取该稀释液 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mL 至 25 mL 容量瓶,加上样缓冲液(pH 2.2)定容至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 的滤膜过滤作为标准品溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制

称取研磨均匀的粉末样品 0.2 g 至 50 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 6 mol/L 盐酸溶液润湿,再加适量上样缓冲液(pH 2.2)超声(功率 500 W,频率 50 kHz,35 $^{\circ}$ C)25 min,取出放冷,用上样缓冲液(pH 2.2)定容至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 的滤膜过滤作为供试品溶液。

2.3 钠体系蛋白水解缓冲液配方

钠体系蛋白水解缓冲液配方见表 1。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理方法的选择

参考 GB5009.124-2003 采用 6 mol/L 盐酸对样品进行

表 1 钠体系蛋白水解缓冲液配方
Table 1 The formulation of sodium system proteolytic buffer

	上样缓冲液	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 5	缓冲液 6
PH	2.2	3.2	4.25	6.45	NaOH
Na 离子浓度(mol/L)	0.2	0.2	0.2	1.2	0.4
柠檬酸钠(g)	19.6	19.6	19.6	19.6	—
浓盐酸(mL)	17.3	13.5	9.3	0.7	—
氢氧化钠(g)	—	—	—	—	16
氯化钠(g)	—	—	—	58.4	—
无水乙醇(mL)	20	2	—	—	—
80%苯酚(mL)	1.2	1.2	1.2	1.2	—
异丙醇(mL)	—	20	—	—	—
加超纯水至(L)	1	1	1	1	1

酸水解^[14], 用上样缓冲液(pH 2.2)进行溶解, 因样品支链氨基酸粉中标志性成分为牛磺酸和支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸), 支链氨基酸需经盐酸消解转化, 而牛磺酸为游离型氨基酸, 因此采用本方法测定牛磺酸时色谱峰无干扰。

3.2 仪器洗脱条件的选择

因牛磺酸为磺化氨基酸, 与树脂结合不紧, 最先被洗脱^[15], 通过试验, 根据蛋白水解分析程序进行优化, 能快速将牛磺酸洗脱出来, 出峰时间为 4.5 min, 然后进行再生程序。

3.3 线性范围

在试验条件下, 对牛磺酸标准工作溶液进行测定。结果表明, 牛磺酸在 4.1065 至 20.5326 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 线性方程为 $Y=44189X-2.004$, 相关系数 $r^2=0.999$, 见图 1。

3.4 精密度实验

在试验条件下, 制备 6 份供试品溶液, 测定样品中的牛磺酸含量, 6 份样品测定结果的 RSD 为 1.2 %, 说明本方法的精密度良好。

3.5 稳定性实验

将牛磺酸标准品溶液分别在室温下放置 0、30、60、90、120、240 min 时测定牛磺酸的峰面积, RSD 为 0.7%, 表明牛磺酸标准品溶液在室温下 4 h 内的稳定性良好。

3.6 检出限和定量限

以牛磺酸标准溶液的色谱响应值计算, 当信噪比(S/N)为 3 时, 检出限为 0.1628 μg/mL, 换算得到方法的检出限为 15 mg/100 g。当信噪比(S/N)为 10 时, 测得仪器的定量

限为 0.5372 μg/mL, 方法的定量限为 50 mg/100 g。

3.7 方法的回收率试验

精密称取 9 份样品, 分成 3 组, 每组 3 份样品, 每组按 50%、80%、100%分别准确加入牛磺酸标准溶液(牛磺酸浓度为 0.0296604 mg/mL) 5.0、8.0 和 10 mL 进行加标回收试验, 结果见表 2。经测定, 本方法的平均回收率为 101.28 %, RSD 为 2.1%。

3.8 样品检测与分析

采用本方法对样品和标准品进行测试, 样品溶液牛磺酸色谱图和标准品溶液牛磺酸色谱图见图 2 和图 3, 从图中可看出, 样品与标准品的牛磺酸色谱峰出峰位置一致, 且无杂质峰干扰。

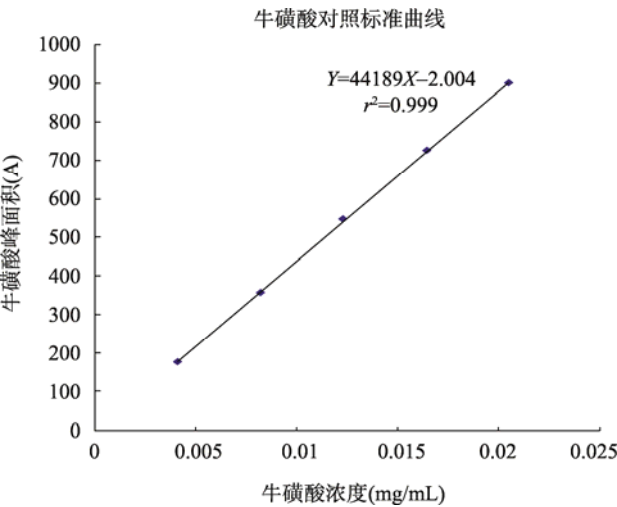


图 1 牛磺酸的标准曲线
Fig. 1 The standard curve of taurine

表 2 加标回收率实验(n=3)
Table 2 The spiked recoveries (n=3)

名称	加标体积	样品质量(g)	样品浓度 (mg/mL)	理论加标量 (mg)	实测加标量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
牛磺酸	5.0 mL	0.20515	0.008888	0.148302	0.14877885	100.321	100.54		2.1
		0.20252	0.008829	0.148302	0.14961868	100.887			
		0.20239	0.008811	0.148302	0.14890601	100.407			
	8.0 mL	0.21843	0.011143	0.2372832	0.24239237	102.153	103.55	101.28	
		0.21993	0.011224	0.2372832	0.24428087	102.949			
		0.21998	0.011349	0.2372832	0.25045882	105.552			
	10.0 mL	0.21805	0.012155	0.296604	0.29353995	98.966	99.74		
		0.21679	0.01225	0.296604	0.30010561	101.18			
		0.21892	0.012187	0.296604	0.29388628	99.083			

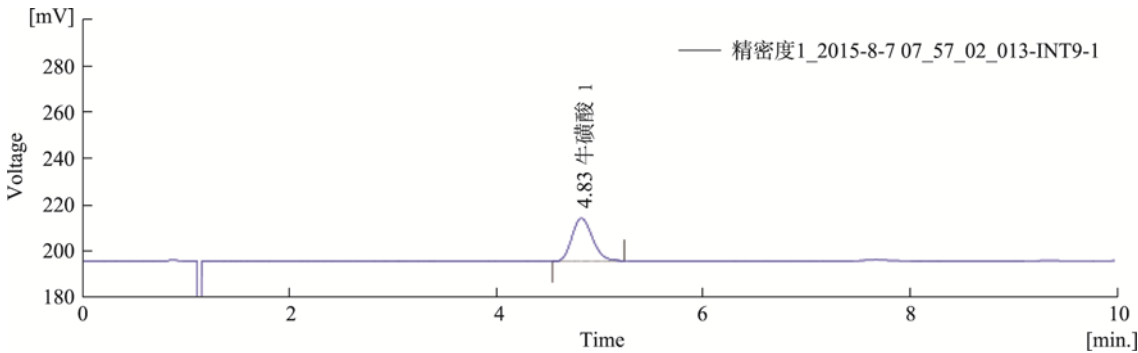


图 2 样品溶液的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of sample

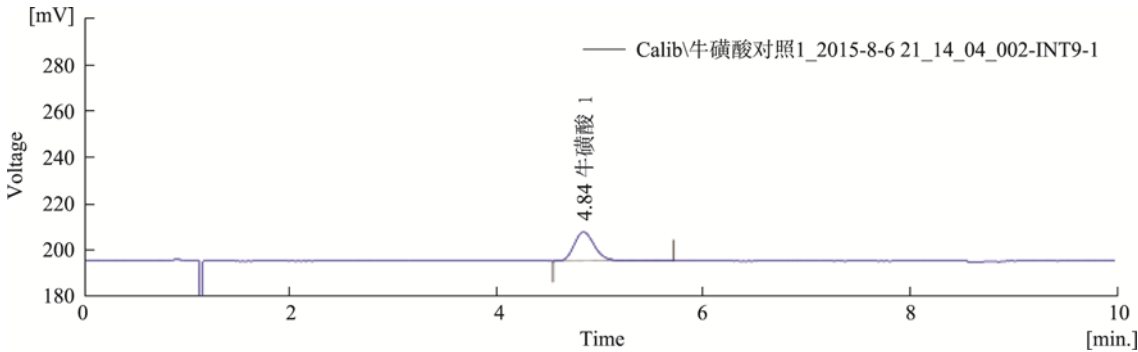


图 3 牛磺酸标准品溶液的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of taurine standard

4 结 论

支链氨基酸粉中牛磺酸的理论含量在 0.9 至 1.8 g/kg, 根据 GB/T 5009.169-2003 的方法检测结果只有 0.29 g/kg, 加标回收率只有 30%~40%, 结果偏差大, 其中衍生试剂 OPA 剧毒, 柱前衍生易损伤色谱柱。OPA 是快速反应剂, 有些氨基酸反应极其不稳定, 且样品中具有相同基团的

化合物经过衍生后对牛磺酸的检测有干扰, 影响结果的准确性。

本方法通过对样品进行简单的样品前处理, 采用氨基酸分析仪对样品进行分析, 检测结果为 1.4 g/kg 左右, 加标回收率为 101.28%。前处理操作简单, 且不用剧毒衍生试剂 OPA, 降低安全风险, 减少了人工衍生带来的误差, 而且不损伤柱子, 衍生化反应在氨基酸分离后, 避免其他

杂峰干扰^[16],结果回收率高,分析时间快,适用于保健食品支链氨基酸粉中牛磺酸的含量检测。

参考文献

- [1] 白小琼,孔德义.牛磺酸研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(05):78-80.
Bai XQ, Kong DY. Research progress of taurine [J]. Food Nutr China, 2011, 17(05): 78-80.
- [2] 孙变娜,沈和定,吴洪喜,等.高效液相色谱法测定4种石磺中牛磺酸的含量[J].海洋渔业,2015,37(1):93-98.
Sun BN, Shen HD, Wu HX, *et al.* Determination of taurine in four kinds of sulfonates by HPLC [J]. Marine Fish, 2015, 37(1): 93-98.
- [3] 冯盛斌,胡海娥. PTC 柱前衍生反相高效液相色谱法测定维生素功能饮料中L-赖氨酸和牛磺酸的含量[J]. 饮料工业,2014,17(4):38-40.
Feng SB, Hu HE. Simultaneous determination of taurine and L-lysine in vitamin functional drinks by RP-HPLC with pre-column derivatization [J]. Bever Ind, 2014, 17(4): 38-40.
- [4] 陈申如,胡 阳,倪 辉,等.高效液相色谱法测定牡蛎中牛磺酸含量[J].中国食品学报,2013,13(2):193-198.
Chen SR, Hu Y, Li H, *et al.* Determination of taurine in oyster by HPLC [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, 13(2): 193-198.
- [5] 娄婷婷,赵婷,温华蔚,等.婴儿食品中牛磺酸含量测定及其不确定度分析[J].食品研究与开发,2016,37(24):120-124.
Lou TT, Zhao T, Wen HW, *et al.* Determination and uncertainty evaluation for taurine in infant formula [J]. Food Res Dev, 2016, 37(24): 120-124.
- [6] GB 5413.26-2010 婴幼儿食品和乳品中牛磺酸的测定[S].
GB 5413.26-2010 Determination of taurine in foods for infants and young children, milk and milk products [S].
- [7] GB/T 5009.169-2003. 食品中牛磺酸的测定[S].
GB/T 5009.169-2003 Determination of taurine in foods [S].
- [8] 方宏兵,王德强.食品中牛磺酸的检测方法研究进展[J].粮油食品科技,2011,19(4):45-47.
Fang HB, Wang DQ. Research progress of determination of taurine in foods [J]. Sci Technol Cere, Oils Foods, 2011, 19(4): 45-47.
- [9] 刘旭辉,刘莹,张姝,等.婴幼儿配方粉中牛磺酸的前处理优化及氨基酸分析仪分析[J].现代仪器与医疗,2016,22(5):92-94.
Liu XH, Liu Y, Zhang S, *et al.* Pretreatment optimization and analysis of taurine in infant formula powder and analysis of amino acid analyzer [J]. Mod Instrum Med Treat, 2016, 22(5): 92-94.
- [10] 袁辉,高帅,王传兴,等.三种柱前衍生法测定乳粉中牛磺酸含量的方法比较[J].中国乳品工业,2015,43(3):53-56.
Yuan H, Gao S, Wang CX, *et al.* Comparison of three methods for determining taurine content in milk powder by pre-column derivatization [J]. China Dairy Ind, 2015, 43(3): 53-56.
- [11] 张燕婉.氨基酸分析仪法测定肉食品中牛磺酸含量[J].肉类研究,1996,(1):37-39.
Zhang YW. Determination of taurine in Meat by amino acid analyzer [J]. Meat Res, 1996, (1): 37-47.
- [12] 王洪健,周兴起,冯志强,等.氨基酸自动分析仪测定食品中牛磺酸的方法建立[J].现代食品科技,2012,28(3):348-350.
Wang HJ, Zhou XQ, Feng ZQ, *et al.* Determination of taurine in food products by amino acid autoanalyzer [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(3): 348-350.
- [13] 周梦怡,勇强,张强,等.基于氨基酸分析仪的氨基酸检测实验教学计[J].实验室科学,2016,19(5):19-26.
Zhou MY, Yong Q, Zhang Q, *et al.* Experimental teaching design on amino acid detection by automatic amino acid analyzer [J]. Lab Sci, 2016, 19(5): 19-26.
- [14] GB/T 5009.124-2003 食品中氨基酸的测定[S].
GB/T 5009.124-2003 Determination of amino acids in foods[S].
- [15] 蔡梅,吉文亮,刘华良,等.氨基酸自动分析仪对食品中牛磺酸快速测定方法研究[J].中国卫生检验杂志,2013,23(1):41-45.
Cai M, Ji WL, Liu HL, *et al.* Study on rapid determination of taurine in food by utilizing the amino acid autoanalyzer [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(1): 41-45.
- [16] 丁永胜,牟世芬.氨基酸的分析方法及其应用进展[J].色谱,2004,22(3):210-215.
Ding YS, Mou SF. Development of analytical methods for amino acids and their applications [J]. Chin J Chromatogr, 2004, 22(3): 210-215.

(责任编辑:姚 菲)

作者简介



秦 菁,主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 151837270@qq.com