

氨基酸分析仪检测婴幼儿奶粉中牛磺酸含量

刘常凯, 何林飞*, 辛丽娜

(广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 南宁 530021)

摘要: **目的** 建立一种氨基酸分析仪测定婴幼儿奶粉中牛磺酸含量的分析方法。**方法** 样品经 0.01 mol/L 盐酸溶液溶解并用 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 219 g/L 乙酸锌沉淀蛋白质后 10000 r/min 离心 10 min 取出, 精密取上清液置 20 mL 量瓶中, 用上样溶液(pH 2.2)定容后, 采用氨基酸分析仪钠系统进行程序洗脱, LCA K06/Na 色谱柱进行分离, 茚三酮溶液衍生显色, 在 570 nm 波长下测得牛磺酸色谱峰, 用外标法峰面积定量, 保留时间定性。**结果** 牛磺酸在 5.544~110.880 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内有良好的线性关系($r=1.0000$), 回收率为 101.47%, 相对标准偏差为 1.6%($n=9$)。**结论** 该方法简单、便捷、准确性高, 适合于婴幼儿奶粉中牛磺酸的定量分析。

关键词: 婴幼儿奶粉; 氨基酸分析仪; 牛磺酸; 含量

Determination of taurine content in infant milk powder by amino acid analyzer

LIU Chang-Kai, HE Lin-Fei*, XIN Li-Na

(Guangxi-Asean Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method using amino acid analyzer for the determination of taurine in infant milk powder. **Methods** The sample was dissolved in 0.01 mol/L hydrochloric acid solution and precipitated with 106 g/L potassium ferrocyanide solution and 219 g/L zinc acetate. The protein was centrifuged at 10000 r/min for 10 min, and the supernatant was accurately taken in a 20 mL volumetric flask. After constant volume with a sample solution (pH 2.2), the program was eluted with an amino acid analyzer sodium system, separated by LCA K06/Na column, and colorimetrically derived from ninhydrin solution, and the taurine chromatographic peaks was measured at a wavelength of 570 nm, quantification of peak area by external standard method, retention time qualitative. **Results** Taurine had a good linear relationship in the concentration range of 5.544-110.880 g/mL ($r=1.0000$) with a recovery rate of 101.47% and a relative standard deviation of 1.6% ($n=9$). **Conclusion** This method is simple, convenient, accurate and suitable for the quantitative analysis of taurine in infant milk powder.

KEY WORDS: infant milk powder; amino acid analyzer; taurine; content

1 引言

牛磺酸(taurine)又称 β -氨基乙磺酸, 最早由牛黄中分离出来, 是一种含硫的非蛋白氨基酸, 不参与体内蛋白的

生物合成, 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]。人体合成牛磺酸的半胱氨酸亚硫酸羧酶(cysteine sulfinic acid decarboxylase,

*通讯作者: 何林飞, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。E-mail: 2960215496@qq.com

*Corresponding author: HE Lin-Fei, Pharmacist, Guangxi-Asean Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning 530021, China. E-mail:2960215496@qq.com

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, 牛磺酸对胎儿及新生儿生长发育以及中枢神经系统具有重要作用^[2], 牛磺酸是中枢神经系统含量最丰富的游离氨基酸, 对脑组织发育具有重要保护作用^[3], 牛磺酸具有多种生理功能, 是人体健康必不可少的一种营养素^[4], 因此婴幼儿配方乳及乳粉中要添加一定数量的牛磺酸^[5]。随着我国二胎政策的放开实施, 越来越多家庭选择再要一个孩子, 这种情势就会促进婴幼儿奶粉市场的紧俏, 各种品牌, 国产的、海淘的奶粉五花八门, 这就会导致一些准妈妈在婴幼儿奶粉的选择上无所适从, 同时也会让一些不法商家在奶粉市场上浑水摸鱼, 以次充好, 所以对于婴幼儿奶粉中牛磺酸含量的监控显得尤为重要了, 目前测定牛磺酸的主要方法有分光光度法^[6,7]、荧光吸光光度法^[8]、高效液相色谱法^[9-11]、衍生化高效液相色谱法^[12]、自动电位滴定法^[13]、傅立叶变换红外光谱法^[14]等。国标 GB 5009.169-2016《食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定》^[15], 第一法 邻苯二甲醛 OPA 柱后衍生高效液相色谱法检测, 第二法 丹磺酰氯柱前衍生法, 荧光检测, 衍生剂 OPA 本身容易氧化降解(由无色透明变成微黄色), 与氨基酸的衍生产物也不稳定, 衍生后需立即进样分析, 且此衍生剂剧毒, 衍生过程复杂, 不易操作。近年来关于测定牛磺酸含量使用氨基酸分析仪的报道逐渐增多, 去除样品中蛋白质的沉淀剂多种多样, 为此本方法利用氨基酸分析仪检测婴幼儿奶粉中牛磺酸含量, 并对样品中去除蛋白质的沉淀剂进行优化, 为婴幼儿奶粉的监控提供一定的技术支持和参考数据。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

S-4300D 氨基酸分析仪(德国 Sykam 公司); Multifuge X3R 台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Mettler Toledo 电子天平(瑞士梅特勒公司); Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司); WEB-6 水浴锅(苏州安创仪器有限公司)。

牛磺酸标准物质(纯度 99.0%, 上海安谱实验科技股份有限公司); 乙酸锌、亚铁氰化钾、浓盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 柠檬酸钠缓冲液(0.04 mol/L, pH 3.45)、样品稀释溶液(0.12 mol/L 盐酸溶液, pH 2.20)、茚三酮(色谱纯)(德国 Sykam 公司); 高纯氮气(纯度 99.99%, 广西瑞达化工技术有限公司); 超纯水(电阻率 18.2 mΩ·cm)实验室自制。

南宁母婴店国产奶 3 批和海淘奶粉 3 批, 均为 1 段奶粉。

2.2 实验方法

2.2.1 方法氨基酸分析仪测定条件

色谱柱 LCA K06/Na, 除氨柱: LCA K04/Na, 缓冲泵

流速: 0.40 mL/min, 分离柱柱温: 58 °C, 进样体积: 50 μL, 检测器波长: 570 nm, 图谱采集时间: 25.20 min, 进样等待时间: 0.1 min, 梯度洗脱见表 1。

表 1 梯度洗脱
Table 1 Gradient elution

时间/min	A% 钠盐缓冲液	D%20 g/L 茚三酮	缓冲泵流速/(mL/min)
0.00	100	0	0.40
5.00	100	0	0.40
5.01	0	100	0.40
10.00	0	100	0.40
10.01	100	0	0.40
25.10	100	0	0.40
25.20	100	0	0.40

2.2.2 标准线性的制备

精密称取牛磺酸标准品 11.088 mg 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1.1088 mg/mL 标准储备液, 精密取 2.5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加 pH 2.2 样品稀释液稀释置刻度, 即得浓度为 55.44 μg/mL 标准使用液, 分别精密量取 1.0、2.0、3.0、标准使用液分别置 10 mL 量瓶中, 分别精密量取标准储备液 0.5、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 pH 2.2 样品稀释液稀释置刻度, 得到浓度范围为 5.544~110.880 μg/mL 的系列标准溶液。

2.2.3 样品处理

取婴幼儿奶粉 0.1 g 置 50 mL 具塞三角瓶中, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液适量, 超声提取 5 min, 再加 2.0 mL 乙酸锌溶液, 2.0 mL 亚铁氰化钾溶液, 静置沉淀蛋白 3 h 后转移至 50 mL 离心管中离心(10000 r/min, 15 min), 取上清液 1.0 mL 置 20 mL 容量瓶中, 精密加 pH 2.2 样品稀释液稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 摇匀, 即得。

3 结果与分析

3.1 最大吸收波长的确定

鉴于 S-433D 氨基酸分析仪的特点, 含有一个双波长检测器的反应单元 s4300, 能够检测 570 nm 和 440 nm 可见光波长下任何有能量吸收的物质, 实验制备了一个浓度为 16.632 μg/mL 的牛磺酸标准溶液进行测定, 结果发现牛磺酸在 570 nm 响应较 440 nm 高, 见图 1, 故本实验选择 570 nm 作为牛磺酸的检测波长。

3.2 标准线性回归方程的确定

将 2.2.2 下的系列标准线性按上述氨基酸分析仪测试条件上机测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得到回归方程, $Y=55.911X+21.127$, 相关系数 $r=1.0000$, 可见在质量浓度范围 5.544~110.880 μg/mL 内呈

现良好的线性关系。

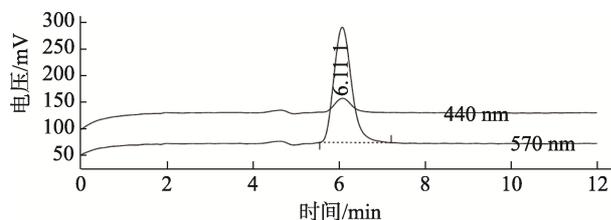


图 1 牛磺酸标准溶液最大吸收波长色谱图

Fig. 1 Maximum absorption wavelength chromatogram of taurine standard solution

3.3 蛋白沉淀剂的确定

参考相关文献^[16], 大部分选择无水乙醇或者磺基水杨酸溶液沉淀蛋白质, 本实验选择沉淀蛋白质的 2 种盐均为中性盐, 中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响, 一般在低盐浓度下随着盐浓度升高, 蛋白质的溶解度增加, 此称盐溶; 当盐浓度继续升高时, 蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出, 这种现象称盐析, 亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白质就是盐析反应, 因为蛋白质是胶体, 利用乙酸锌与亚铁氰化钾反应生成的氰亚铁酸锌沉淀来挟走或吸附干扰物质, 这 2 种中性盐除蛋白能力强, 且浓度高的盐离子有很强的水化力, 可夺取蛋白质分子的水化层, 使之“失水”, 于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出, 同时, 由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同, 故盐析所需的盐浓度也不一样, 本实验通过样品加标实验来考察无水乙醇、磺基水杨酸溶液、乙酸锌和亚铁氰化钾溶液沉淀样品蛋白质的情况, 称取 10 份样品(样品原有量为 0.644 mg)精密加入牛磺酸标准线性 6(浓度为 110.880 $\mu\text{g}/\text{mL}$)2.50 mL, 平行制备 2 份, 按 2.2.3 项下制备供试液, 上机测定, 加标后的样液浓度为 13.860 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 通过线性回归方程计算样品中牛

磺酸回收率, 同时参考文献^[17]以及 5009.169-2016 第二法, 考察不同浓度乙酸锌和亚铁氰化钾溶液对牛磺酸回收情况, 结果见表 2, 从结果可见, 采用乙酸锌和亚铁氰化钾溶液沉淀样品蛋白质所得到的回收率最高, 因为奶粉中蛋白质含量较高, 蛋白沉淀剂浓度过低容易沉淀不完全, 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 219 g/L 乙酸锌溶液与 150 g/L 亚铁氰化钾溶液和 300 g/L 乙酸锌溶液沉淀蛋白所得到的结果差别不大, 综合考虑最终选择 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 219 g/L 乙酸锌溶液容易沉淀蛋白质效果最佳。

3.4 样品提取剂盐酸溶液浓度的确定

本实验考察了 1.0 mol/L 盐酸溶液、0.5 mol/L 盐酸溶液、0.1 mol/L 盐酸溶液、0.01 mol/L 盐酸溶液, 对样品提取结果的影响, 分别用上述浓度的盐酸溶液按样品处理方法制备供试品溶液并上机测定, 结果发现, 盐酸浓度为 1.0 mol/L 时, 由于样液 pH 值较小(< 1.0), 牛磺酸色谱峰出现倒峰, 影响牛磺酸积分定量, 见图 2, 逐渐降低盐酸浓度, 倒峰越来越小, 当盐酸浓度为 0.01 mol/L 时, 牛磺酸峰型对称, 无倒峰, 测得此时样液 pH 为 4.5 ± 0.2 , 说明样液恰好处于酸性时, 色谱柱和流动相都能很好地分离洗脱牛磺酸, 鉴于色谱柱为阳离子树脂交换柱, 且牛磺酸是一种含硫的非蛋白氨基酸, 通过离子交换分离洗脱出来, 但样液过酸, $\text{pH} < 1.0$, H^+ 过多会使溶于酸的一些杂质被洗脱出来干扰牛磺酸峰, 综合考虑, 本实验选择 0.01 mol/L 盐酸溶液作为样品溶解剂。

3.5 精密度实验

称取样品 0.1 g, 按样品处理方式制备供试液上机, 平行实验测定 6 次, 得到峰面积并计算所得相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.92%, 表明方法精密度良好。

表 2 不同沉淀剂对去除样品蛋白质的影响

Table 2 Effects of different precipitants on the removal of sample proteins

沉淀剂名称	现象	测得量 /mg	加入量 /mg	原有量 /mg	回收率/%	平均回收率 /%
无水乙醇	明显出现沉淀物, 离心后上清液澄清	5.689	5.544	0.644	91.00	90.30
		5.611	5.544	0.644	89.59	
磺基水杨酸溶液	沉淀物不明显, 离心后的上清液有少许浑浊	4.572	5.544	0.644	70.85	71.73
		4.669	5.544	0.644	72.60	
25 g/L 亚铁氰化钾和 50 g/L 乙酸锌溶液	明显出现沉淀物, 离心后上清液有少许浑浊	5.214	5.544	0.644	82.43	82.72
		5.246	5.544	0.644	83.01	
106 g/L 亚铁氰化钾和 219 g/L 乙酸锌溶液	明显出现沉淀物, 离心后沉淀物较多, 上清液澄清	6.215	5.544	0.644	100.49	100.51
		6.218	5.544	0.644	100.54	
150 g/L 亚铁氰化钾和 300 g/L 乙酸锌溶液	明显出现沉淀物, 离心后沉淀物较多, 上清液澄清	6.121	5.544	0.644	98.79	98.90
		6.133	5.544	0.644	99.01	

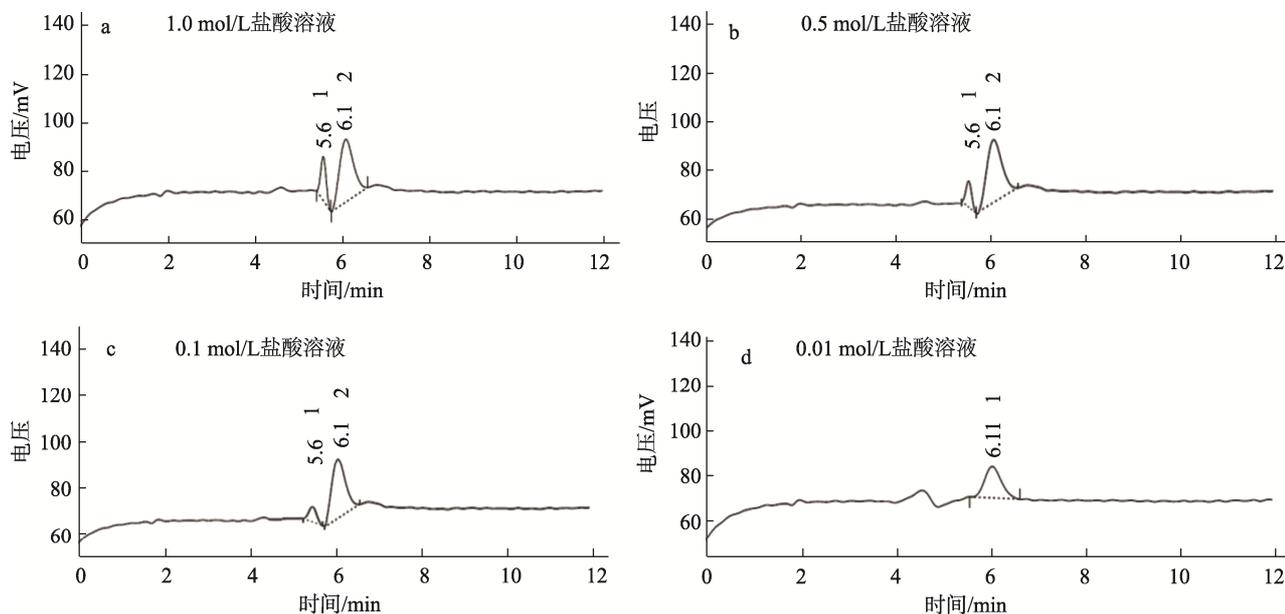


图 2 盐酸溶液所提取供试溶液上机后所得色谱图

Fig.2 Chromatogram of the test solution extracted from hydrochloric acid solution

3.6 重复性和稳定性实验

称取 6 份样品按样品处理方式制备供试液, 上机测定, 结果重复性 RSD 值为 1.12%($n=6$), 取其中 1 份供试液按 2、4、6、8、12、24 h 分别进样测定牛磺酸含量, 均值为(32.54±0.3) mg/100 g, 结果表明牛磺酸在 24 h 内是稳定的。

3.7 回收实验

称取样品 9 份, 以牛磺酸质量浓度的低浓度(5.544 μg/mL)、中间浓度(13.860 μg/mL)和高浓度(22.716 μg/mL)添加, 照 2.2.3 项下制备供试品溶液, 按公式

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{测得量} - \text{原有量}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

计算牛磺酸的回收率, 平均回收率为 101.47%, RSD 为 1.6%($n=9$), 结果见表 3, 表明本实验方法回收率高。

3.8 实际样品测定

称取 6 批不同来源的样品 0.1 g, 平行实验 2 份, 照 2.2.3 项下制备供试品溶液, 按外标法计算牛磺酸的含量, 同时采用国标 5009.169-2016 第二法测定这 6 批样品中牛磺酸含量, 结果见表 4, 从结果中可见, 本实验方法国产婴幼儿奶粉中牛磺酸含量与海淘奶粉并无明显差别, 表明对于婴幼儿奶粉不论国内还是国外婴幼儿奶粉添加的牛磺酸都达到要求的, 采用国标方法测得牛磺酸结果与本实验所得结果也并无差异, 可见本实验方法结果可靠, 但本实验较国标方法简单, 便捷, 所用衍生剂毒性低, 易于操作。

表 3 牛磺酸加标回收率实验结果($n=9$)
Table 3 Results of taurine standard recovery test ($n=9$)

序号	取样量/g	测得量/mg	原有量/mg	加入量/mg	回收率/%	每个水平的平均回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	0.1124	2.977	0.656	2.218	104.64			
1	0.1167	2.886	0.643	2.218	101.13	102.90		
	0.1059	2.915	0.632	2.218	102.93			
	0.1243	6.115	0.661	5.544	98.38			
2	0.1058	6.274	0.663	5.544	101.21	99.68	101.47	1.6
	0.1132	6.189	0.675	5.544	99.46			
	0.1362	9.657	0.654	8.870	101.50			
3	0.1077	9.684	0.683	8.870	101.48	101.83		
	0.1146	9.753	0.659	8.870	102.53			

表 4 本方法与国标方法测定国产奶粉与海淘奶粉样品中牛磺酸含量的结果比较

Table 4 Comparison of the determination results of taurine content by this method and national standard method for domestic milk powder and overseas online shopping milk powder samples

奶粉编号	本方法		国标方法	
	牛磺酸含量/(mg/100 g)		牛磺酸含量/(mg/100 g)	
	①	②	①	②
国-1	32.14	31.92	31.52	31.24
国-2	32.51	32.71	31.76	31.67
国-3	32.62	32.33	31.85	31.35
海-1	33.26	32.78	32.06	31.88
海-2	32.09	32.59	31.94	32.11
海-3	33.15	32.86	32.17	31.93

4 结 论

本实验建立了氨基酸分析仪检测婴幼儿奶粉中的牛磺酸含量, 经过方法学验证及优化, 利用 0.01 mol/L 盐酸溶液溶解样品, 乙酸锌和亚铁氰化钾溶液沉淀蛋白质, 采用氨基酸分析仪, LCA K06/Na 阳离子树脂交换柱分离, 茚三酮溶液衍生显色, 柠檬酸钠溶液梯度洗脱, 570 nm 波长测定国内以及海淘婴幼儿 1 段奶粉中牛磺酸含量, 并与国标操作方法进行比较, 本实验的检测方法优于国标方法, 检测结果与国标方法结果一致, 可见本实验结果可靠, 准确性高, 精密度和重复性良好, 对婴幼儿 1 段奶粉中的牛磺酸监控具有一定参考意义。

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(5): 78-80.
Bai XQ, Kong DY. Research progress of taurine [J]. Food Nutr China, 2011, 17(5): 78-80.
- [2] 高伟佳, 山丹, 于松, 等. 牛磺酸与胎儿生长受限的研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29: 194-196.
Gao WJ, Shan D, Yu S, et al. Research progress on taurine and fetal growth restriction [J]. Chin J Reprod Health, 2008, 29: 194-196.
- [3] Liu J, Liu L, Chen H. Antenatal taurine supplementation for improving brain ultrastructure in fetal rats with intrauterine growth restriction [J]. Neuroscience, 2011, 181: 265-270.
- [4] 贾振宇, 黎新明, 张翠荣. 牛磺酸的合成研究进展及应用前景[J]. 广东化工, 2006, (8): 14-16.
Jia ZY, Li XM, Zhang CR. Research progress and application prospect of taurine synthesis [J]. Guangdong Chem Ind, 2006, (8): 14-16.
- [5] 郑建仙. 功能性食品(第 2 卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
Zheng JX. Functional foods (volume 2) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.
- [6] 杨涓, 魏智清, 庞伟. 分光光度法测定宁夏枸杞中牛磺酸的含量[J]. 农业科学研究, 2005, 26(2): 28-30.
Yang J, Wei ZQ, Pang W. Determination of taurine in Ningxia wolfberry by spectrophotometry [J]. Agric Sci Res, 2005, 26(2): 28-30.
- [7] 李珊, 刘玉兰, 林伯群, 等. 吸光度法测定牡蛎中牛磺酸[J]. 青岛医学院学报, 1998, (4): 44-45.

- Li S, Liu YL, Lin BQ, et al. Spectrophotometric determination of taurine in oysters [J]. J Qingdao Med Coll, 1998, (4): 44-45.
- [8] 李珊, 刘玉兰. 荧光法测定食物中牛磺酸[J]. 理化检验-化册, 2001, 37(2): 80-81.
Li S, Liu YL. Determination of taurine in food by fluorescence method [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2001, 37(2): 80-81.
- [9] 金凤明, 李桂贞, 施超欧. 复合氨基酸中牛磺酸的高效液相色谱分析[J]. 石油化工高等学校学报, 2000, 13(3): 46-49.
Jin FM, Li GZ, Shi CO. High performance liquid chromatography analysis of taurine in compound amino acids [J]. J Petrochem Univ, 2000, 13(3): 46-49.
- [10] 张暄, 耿越, 张静静, 等. 高效液相色谱法快速测定海产品中牛磺酸[J]. 食品与药品, 2006, 8(4): 56-58.
Zhang L, Geng Y, Zhang JJ, et al. Rapid determination of taurine in seafood by HPLC [J]. Food Drug, 2006, 8(4): 56-58.
- [11] 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, Ni H, et al. Determination of taurine in oyster by HPLC [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2013, 13(2): 193-198.
- [12] 任一平, 黄百芬. 应用 OPA 柱前衍生法测定食品中的牛磺酸[J]. 食品与发酵工业, 1995, 21(1): 43-48.
Ren YP, Huang BF. Determination of taurine in food by pre-column derivatization with OPA [J]. Food Ferment Ind, 1995, 21(1): 43-48.
- [13] 张彤, 山广志, 陈思. 自动电位滴定法测定牛磺酸含量[J]. 首都医药, 2009, 16(10): 63-64.
Zhang T, Shan GZ, Chen S. Determination of taurine content by automatic potentiometric titration [J]. Capital Pharm, 2009, 16(10): 63-64.
- [14] Triebel S, Sproll C, Reusch H, et al. Rapid analysis of taurine in energy drinks using amino acid analyzer and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy as basis for toxicological evaluation [J]. Amino Acids, 2007, 33(3): 451-457.
- [15] GB 5009.169-2016 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定[S].
GB 5009.169-2016 determination of taurine in national food safety standard [S].
- [16] 刘旭辉, 刘莹, 张姗, 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 amino acid analyzer analysis of taurine in infant formula powder [J]. Mod Instrum Med, 2016, 22(5): 92-94.
- [17] SN/T 4262-2015 出口乳及乳制品中苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂的检测 高效液相色谱法[S].
SN/T 4262-2015 Determination of benzoic acid, sorbic acid and para-hydroxybenzoic acid esters in exported milk and dairy products-High performance liquid chromatography [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘常凯, 在职研究生, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。
E-mail: 373719196@qq.com



何林飞, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量与安全。
E-mail: 2960215496@qq.com