

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240401017

# 在线净化二维液相色谱法测定特殊医学配方食品中的牛磺酸

李雨墨, 迟秋池, 顾正健, 张庆临, 陈燕\*

(上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 使用两泵一阀的二维液相色谱系统, 建立在线净化二维液相色谱法检测特殊医学用途配方食品中牛磺酸的分析方法。**方法** 利用中心切割方法搭建在线二维液相色谱分离系统。以 C<sub>18</sub> 柱作为一维色谱柱、0.1% 三氟乙酸和甲醇作为流动相对样品溶液进行初步分离净化, 以五氟苯基(pentafluorophenyl, PFP)色谱柱作为二维色谱柱、0.1% 甲酸和乙腈作为流动相进行二次分离。由牛磺酸衍生物在一维色谱上的保留时间确定阀切换时间, 由 C<sub>18</sub> 小柱作为富集柱捕获牛磺酸衍生物, 二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)进行检测, 建立在线二维液相色谱分析方法。优化丹磺酰氯柱前衍生法前处理条件, 并从多个方面对建立的方法进行方法学考察。**结果** 牛磺酸衍生物在 2.5~40.0 μg/mL 范围内具有良好线性关系, 相关系数大于 0.999; 检出限为 1.2 mg/100 g, 定量限为 4.0 mg/100 g; 该方法回收率为 95.28%~97.58%, 相对标准偏差为 0.56%~1.38%, 可以满足特殊医学用途配方食品中牛磺酸的定量分析需要。**结论** 本研究建立的方法自动化程度高、分析时间较短、准确度高、重复性好, 适用于特殊医学用途配方食品中的牛磺酸检测。

**关键词:** 牛磺酸; 特殊医学用途配方食品; 二维液相色谱法

## Determination of taurine in food for special medical purpose by on-line purification two-dimensional high performance liquid chromatography

LI Yu-Mo, CHI Qiu-Chi, GU Zheng-Jian, ZHANG Qing-Lin, CHEN Yan\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an on-line two-dimensional liquid chromatography method for the determination of taurine in formula food for special medical purpose by using a two-dimensional liquid chromatography system. **Methods** The online two-dimensional liquid chromatography separation system was built by the central cutting method. A C<sub>18</sub> column was used as the one-dimensional chromatographic column, and 0.1% trifluoroacetic acid and methanol were used as the mobile phases for preliminary separation and purification of the sample solution. A pentafluorophenyl (PFP) chromatographic column was used as the two-dimensional chromatographic column, and 0.1% formic acid and acetonitrile were used as the mobile phases for secondary separation. The valve switching time was determined by the retention time of taurine derivatives in one-dimensional chromatography. Taurine derivatives were captured by a C<sub>18</sub> column as an enrichment column and detected by a diode array detector (DAD) to establish an online two-dimensional liquid chromatography analysis method. The

\*通信作者: 陈燕, 副主任药师, 主要研究方向为食品质量与食品安全。E-mail: cheniansifdc@163.com

\*Corresponding author: CHEN Yan, Associate Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, No.1500, Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: cheniansifdc@163.com

pretreatment conditions of dansulfonyl chloride pre column derivatization method were optimized and methodological investigations on the established method from multiple aspects were conducted. **Results** The linear coefficient of taurine derivatives had good linearity in the range of 2.5–40.0  $\mu\text{g/mL}$ , and the correlation coefficient was greater than 0.999. The limit of detection was 1.2  $\text{mg}/100\text{ g}$ , and the limit of quantitative was 4.0  $\text{mg}/100\text{ g}$ , both of which were lower than the national standard method. The recoveries of taurine were 95.28%–97.58% and the relative standard deviations were 0.56%–1.38%, which could meet requirements for quantitation analysis of taurine in formula food for special medical purpose. **Conclusion** This method has a high degree of automation, short analysis time, high accuracy, and good repeatability, which is suitable for the determination of taurine in formula food for special medical use.

**KEY WORDS:** taurine; formula food for special medical purpose; two-dimensional liquid chromatography

## 0 引言

牛磺酸(taurine)化学名称为 2-氨基乙磺酸,是一种由含硫氨基酸转化而来的物质。现代研究表明,其具有多种生物学功能<sup>[1-4]</sup>,是人体必需的氨基酸。除此之外,牛磺酸存在于乳汁中,是婴幼儿生长发育过程中必需的营养成分<sup>[5-6]</sup>,在促进婴幼儿的大脑和中枢神经发育方面作用较为明显<sup>[7-10]</sup>,是婴幼儿配方乳粉和特殊医学用途配方食品中重要的组成成分。

牛磺酸是一种极性化合物,当它在被检测的物质中,并不以结合态的形式存在,一般用水作为提取试剂完全能够提取出样品中的牛磺酸<sup>[11]</sup>。但乳粉等含有大量蛋白质的样品给牛磺酸的检测分析带来了困难,所以在使用仪器进行检测前要去掉样品中的蛋白质和极性物质<sup>[12]</sup>。CHEN 等<sup>[13]</sup>对比了乙腈、硫酸锌、亚铁氰化钾与乙酸锌的混合试剂沉淀婴幼儿配方奶粉的效果,结果发现将亚铁氰化钾与乙酸锌联合使用时具有最好的沉淀效果,但硫酸锌在沉淀含糖量高的样品时,效果并不理想。刘旭辉等<sup>[14]</sup>利用 0.2% 的盐酸和乙醇来沉淀婴幼儿配方奶粉中的蛋白质,得到了较好的结果。由此可见,亚铁氰化钾、盐酸、乙醇、乙酸锌都能作为蛋白质沉淀剂在前处理过程中使用。

检测食品中牛磺酸的方法主要有滴定法<sup>[15-16]</sup>、分光光度法<sup>[17]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、氨基酸分析仪法<sup>[18]</sup>、液相色谱-串联质谱法<sup>[19-20]</sup>等。其中, HPLC 在测定婴幼儿配方食品中的牛磺酸时得到了广泛的应用,通过衍生化可以引入强吸收的功能基团,来提高检测的灵敏度、分离度和可选择性<sup>[21-22]</sup>,选择不同的衍生化方法、色谱柱来研究测定牛磺酸的方法已经成为主流趋势<sup>[23]</sup>。食品中牛磺酸的国标检测方法是 GB 5009.169—2016《食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定》,其中第一法柱后衍生法所需的钠离子交换柱价格昂贵,给测定方法的推广应用带来了困难,第二法丹磺酰氯柱前衍生法由于对实验条件要求更低,常常被选作检测方法。但是使用该方法对特殊医学用途配方食品中的牛磺酸

进行测定,发现大部分样品中基质干扰十分明显,牛磺酸衍生不充分或与其他氨基酸衍生物分离度差,导致无法对色谱峰进行准确积分定量<sup>[24-25]</sup>。因此,急需针对该类基质的特点对国标方法进行改进和优化,开发出能够准确测定特殊医学用途配方食品中牛磺酸的方法。

姚程晨等<sup>[26]</sup>将样液稀释 10 倍后再进行衍生,但该方法对色谱柱要求较高,需要使用资生堂 CAPCELLPAK C<sub>18</sub> 色谱柱进行梯度洗脱。李政等<sup>[27]</sup>建立以邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)为衍生试剂,使用 HPLC 测定特殊医学用途奶粉中牛磺酸含量的方法;卢兰香等<sup>[28]</sup>采用 6-氨基喹啉基-N-羧基-琥珀酰亚氨基甲酸酯为柱前衍生试剂,以不同 pH 的甲酸-甲酸铵缓冲液和乙腈为流动相进行梯度洗脱,可同时测定 19 种游离氨基酸和牛磺酸。以上两种衍生方法对牛磺酸的测定均有较好的效果,但所用衍生试剂价格较为昂贵、使用成本较高,难以广泛应用于大量样品的检测。

GIDDIN 提出了二维的概念<sup>[29]</sup>,即将两套色谱系统进行组合,使样品经过两次机制有所差异的分离系统。随着食品工业的发展和监管要求的提高,单系统液相色谱已经无法满足对某些复杂样品中成分的完全分离和定性分析的需求,因此对现代仪器分析技术提出了更高的要求,多维色谱技术的应用愈发广泛<sup>[30-32]</sup>,二维液相色谱也成为食品研究领域内的最具有开发价值的工具之一。目前食品检测领域对于二维液相色谱的方法研究主要集中在多种脂溶性维生素的同时测定上,如刘莹等<sup>[33]</sup>建立了固相萃取-在线二维液相色谱法同时测定食品中维生素 A、D 和 4 种维生素 E 异构体含量的方法;赵玉富等<sup>[34]</sup>利用双泵双检测器搭建了在线二维液相色谱分离系统,建立了维生素 A、维生素 E、维生素 D<sub>2</sub>、维生素 D<sub>3</sub> 和  $\beta$ -胡萝卜素含量的快速分析方法;张雯等<sup>[35]</sup>使用二维液相色谱法建立了一种检测发酵食品中 5 种苯乳酸的检测方法。以上这些研究均利用了二维色谱高分辨率、高灵敏度的特点,完成了对复杂基质中易受干扰的化合物的检测,均有较高的准确度、精密度和检测效率,也为其他二维色谱方法的开发提供了研究思路。

本研究拟建立一种用于检测特殊医学用途配方食品中牛磺酸的可靠准确的方法,以丹磺酰氯法作为衍生化方法,采用二维液相色谱法对样品溶液进行净化和测定、排除基质干扰,为特殊医学用途配方食品的质量安全控制提供研究基础和科学支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

特殊医学用途婴儿无乳糖配方食品、特殊医学用途婴儿乳蛋白深度水解配方食品、特殊医学用途婴儿氨基酸配方食品、特殊医学用途早产/低出生体重婴儿配方粉、特殊医学用途全营养配方食品均购买于药房。

乙酸钠(色谱纯)、牛磺酸对照品(纯度 99.5%)(上海安谱实验科技股份有限公司);乙腈(色谱纯,美国 J.T. Baker 公司);盐酸甲胺、甲醇、丹磺酰氯(色谱纯,德国默克公司);三氟乙酸(色谱纯,美国 Tedia 试剂公司);盐酸、冰乙酸、无水碳酸钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);甲酸(色谱纯)、亚铁氰化钾、乙酸锌(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

Agilent 1260 多维高效液相色谱仪[配有 3 个四元泵、2 个六通阀、1 个紫外检测器、1 个二极管阵列检测器(diode array detector, DAD),安捷伦科技(中国)有限公司];MS3 振荡器[艾卡(广州)仪器设备有限公司];ST40R 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司);Milli-Q 纯水仪(电阻率 18.2 M $\Omega$ ·cm,美国默克密理博公司);BT224S 电子天平(精度 0.01 g)、SQP 电子天平(感量 0.01 mg)[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];SHIMSEN Supeib II C<sub>18</sub> 色谱柱[4.6 mm×150 mm, 3.5  $\mu$ m, 岛津(上海)实验器材有限公司];Agilent Poroshell 120PFP 色谱柱[4.6 mm×150 mm, 2.7  $\mu$ m, 安捷伦科技(中国)有限公司]。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 标准溶液配制

牛磺酸标准储备溶液(1 mg/mL):精密称取牛磺酸 10.00 mg(精确至 0.01 mg)于 10 mL 棕色容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,该储备溶液在 4 °C 避光条件下可保存 6 个月。

标准工作溶液的制备:分别精密吸取 0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400 mL 标准储备溶液置于 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0  $\mu$ g/mL 的系列标准工作溶液。

#### 1.3.2 试剂配制

沉淀剂 I:称取 75 g 亚铁氰化钾,加 500 mL 水溶解,混合均匀;沉淀剂 II:称取 150 g 乙酸锌,加 500 mL 水溶解,混合均匀;盐酸溶液(1 mol/L):取 9 mL 盐酸,用水稀释并定容到 100 mL;碳酸钠缓冲液(80 mmol/L, pH 9.5):称取

2.12 g 无水碳酸钠溶于 100 mL 水中,用盐酸溶液(1 mol/L)调 pH 至 9.5 后用水定容至 200 mL,混匀;衍生试剂:称取 0.3 g 丹磺酰氯,加入 200 mL 乙腈使其溶解;三氟乙酸溶液(0.1%):取 1 mL 三氟乙酸溶于 1000 mL 水中;甲酸溶液(0.1%):取 1 mL 甲酸溶于 1000 mL 水中;盐酸甲胺溶液(20 g/L):称取 1.0 g 甲胺盐酸盐,加入 50 mL 水溶解。

#### 1.3.3 样品前处理

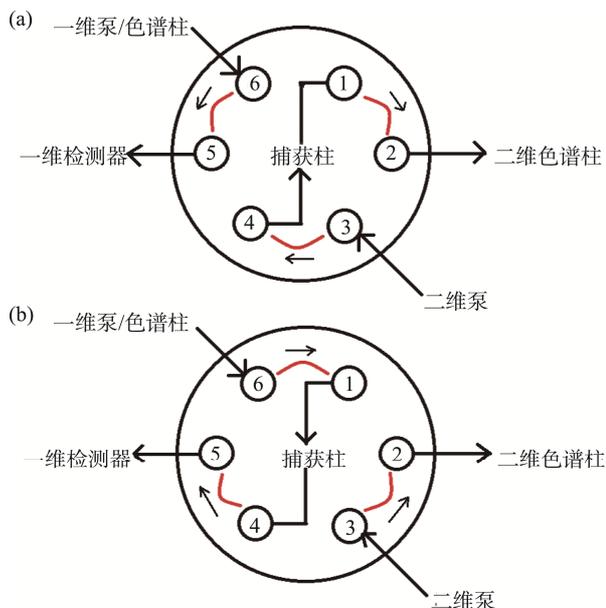
提取:称取试样 2.5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 40 °C 的水 20 mL,摇匀使试样充分溶解。样品溶液冷却至室温后,分别先后加入沉淀剂 I 和沉淀剂 II 各 2.0 mL 并涡旋混合,待样品中的蛋白质沉淀后转入 50 mL 容量瓶中,使用 20 mL 左右的水分 3 次冲洗离心管后一并转入容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。样液于 4500 r/min 下离心 10 min,过滤后待衍生。

衍生:吸取 200  $\mu$ L 所得滤液于 10 mL 具塞试管中,加入 1.0 mL 碳酸钠缓冲液和 1.0 mL 衍生试剂,充分混合后于衍生 1 h(衍生在室温避光条件下进行,中途需摇晃 1 次),加入 100  $\mu$ L 盐酸甲胺溶液后涡旋混合,避光静置 10 min。待沉淀完全后将样液于 4500 r/min 下离心 5 min,取上清液经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,供液相色谱仪检测。

另取系列标准工作溶液各 200  $\mu$ L,分别置于不同的 10 mL 具塞试管中,同样品溶液衍生步骤进行处理。

#### 1.3.4 二维色谱流路构建

本研究采用中心切割的全自动在线切换二维液相色谱。如图 1(a)所示,当六通阀保持初始状态时,样品由一维泵经过色谱柱进入一维检测器,通过测试牛磺酸在一维色谱上的保留时间,可以基本确定阀切换的时间;将阀切换至图 1(b)所示状态后,经过一维色谱柱分离净化的牛磺酸



注:(a)为初始状态;(b)阀切换状态。

图1 二维色谱流路设计图

Fig.1 Flow path of two-dimensional chromatographic

衍生物会保留在捕获柱上; 当切换回图 1(a)的初始状态时, 二维泵的流动相即可将捕获柱中的牛磺酸衍生物洗脱至二维色谱柱再次分离, 进入二维检测器检测。

### 1.3.5 二维液相色谱参考条件

一维色谱柱: SHIMSEN Supeib II C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 一维流动相: A 相为 0.1% 三氟乙酸水溶液, B 相为甲醇, 梯度洗脱程序见表 1; 二维色谱柱: Agilent Poroshell 120PFP (4.6 mm×150 mm, 2.7 μm); 二维流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈, 梯度洗脱程序见表 2; 二维检测器: DAD, 检测波长 254 nm; 捕获柱: Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> (3.0 mm×50 mm, 2.7 μm); 进样量: 40 μL, 样品盘控温: 5 °C; 阀切换时间: 5.00~5.30 min。

表 1 一维色谱洗脱程序

Table 1 Elution program of one dimensional chromatographic

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
8.0	80	20
8.5	5	95
12.0	5	95
12.5	80	20
20.0	80	20

表 2 二维色谱洗脱程序

Table 2 Elution program of two dimensional chromatographic

时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
5.5	90	10
7.5	70	30
15.0	60	40
15.1	5	95
17.0	5	95
17.1	90	10
20.0	90	10

### 1.3.6 方法学考察

参照 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》作为指导原则, 对拟定的分析方法进行准确度(回收率)、精密度(重复性)、灵敏度[检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantitation, LOQ)]、线性范围与相关系数的考察, 确定该方法适用于各类特殊医学用途配方食品中牛磺酸的检测。

## 1.4 数据处理

使用 Agilent 1260 配套的色谱处理软件完成数据采集、色谱图绘制、线性计算与积分定量, 使用 Excel 2021 进行数据处理, 使用 Origin 2022 pro 进行绘图与色谱图处理, 方法学考察的回收率实验平行测定 6 份, 结果以平均回收率和相对标准偏差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 二维液相色谱检测条件的建立

#### 2.1.1 一维色谱条件的选择与阀切换时间的确定

在本研究中, 一维色谱作为对样品溶液进行初次分离净化使用。C<sub>18</sub> 色谱柱具有分离度高、稳定性好、适用性广泛、价格较低等特点, 因此选择其作为一维色谱柱。首先尝试使用 GB 5009.169—2016 第二法中的色谱系统作为一维色谱条件, 即使用碳酸钠缓冲液(80 mmol/L, pH 9.5):乙腈=75:25 (V:V)进行等度洗脱的方式。经测试发现由于水相为盐溶液, 导致柱压较高, 并且标准物质在一维色谱上的保留时间不稳定, 无法用于二维方法的建立。

在反相色谱分离多肽和蛋白质的方法中, 多使用三氟乙酸作为离子对试剂。三氟乙酸不仅可用于调节流动相的 pH, 还可以通过与疏水键合相和残留的极性表面以多种模式相互作用, 增强分离效果并显著改善峰形。另一方面, 三氟乙酸的紫外最大吸收峰低于 200 nm, 对氨基酸等物质的检测干扰很小。使用 0.1% 三氟乙酸:甲醇=80:20 (V:V) 作为一维流动相, 由图 2 可知, 该条件下牛磺酸衍生物有较好的峰形和稳定的保留时间, 可分离样品溶液中大部分杂质, 但需要增加高比例有机相的清洗梯度, 避免杂质残留于色谱柱中, 影响下一个样品的分析。牛磺酸衍生物在一维色谱上的保留时间为 5.261 min, 因此将阀切换时间设置为 4.80~5.50 min。

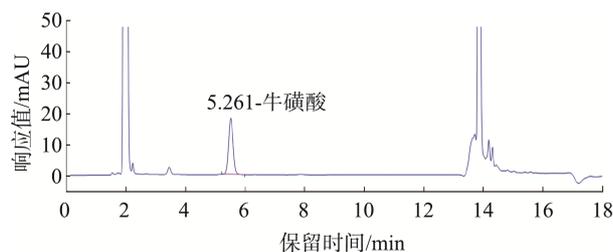


图2 牛磺酸一维色谱图

Fig.2 One dimensional chromatogram of taurine

#### 2.1.2 二维色谱条件的选择与优化

五氟苯基(pentafluorophenyl, PFP)柱对含有双苯环的丹磺酰-氨基乙磺酸具有很好的保留作用<sup>[36]</sup>, 选择 PFP 柱作为二维色谱柱, 0.1% 甲酸水溶液:乙腈=70:30 (V:V) 作为流动相, 考察优化牛磺酸衍生物在二维色谱上的分离效果。如图 3 所示, 测试发现该条件下牛磺酸衍生物峰形有严重拖尾现象, 推测原因是捕获过程中一维的流动相与待测物一起进入二维中造成了干扰。由于溶剂的差异, 第一维的流动相溶剂在待测物捕获过程中通过切换阀转移到第二维的时候, 不可避免地会对第二维分析产生影响, 从而导致第二维的色谱峰产生异常。要降低或排除这一溶剂效应, 需要减少一维流动相进入二维色谱的总量, 或利

用溶剂与待测物的极性差异,使其在二维色谱上充分分离。因此,采用缩短阀切换时间至 5.00~5.30 min 并且将流动相改为梯度洗脱的方式进行调整,经优化的梯度洗脱程序能使牛磺酸衍生物在二维色谱上有较好的呈现效果,如图 4 所示。

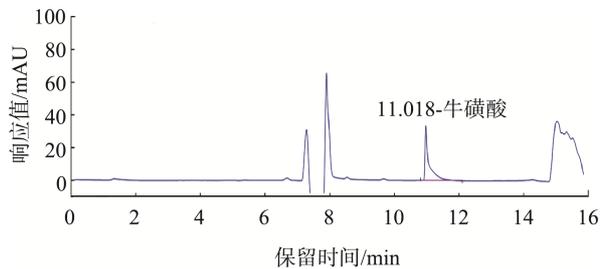


图3 优化前牛磺酸二维色谱图

Fig.3 Two-dimensional chromatogram of taurine before optimization

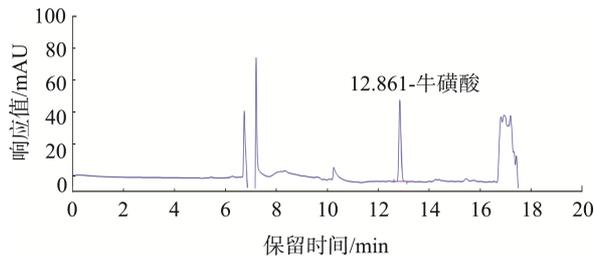


图4 优化后牛磺酸二维色谱图

Fig.4 Two-dimensional chromatogram of taurine after optimization

## 2.2 衍生条件优化

部分特医样品中氨基酸含量较高,会与牛磺酸竞争衍生试剂,造成牛磺酸衍生不充分。在对检出限、定量限进行估测后,将国家标准方法中衍生用样品溶液体积由 1.00 mL 减少至 200  $\mu$ L,并在此条件下考察衍生时间的影响。经考察,在减少衍生溶液体积后,仅需 1 h 便可使样品溶液达到充分衍生的效果,如图 5 所示,相比于国标方法(GB 5009.169—2016)中 2 h 的衍生时间,大幅减少了前处理所需时间,提升了检测效率。

## 2.3 方法学考察结果

### 2.3.1 线性范围与相关系数、灵敏度

按 1.3.1 配制牛磺酸系列标准工作液,各浓度工作液取 200  $\mu$ L 按 1.3.3 中的衍生步骤进行衍生化处理,对衍生后的系列标准工作溶液进行测定,以牛磺酸质量浓度( $X$ ,  $\mu$ g/mL)为横坐标,对应的牛磺酸衍生物的峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线。经计算,所得线性回归方程为  $Y=15.9535681X-22.155828$ ,相关系数  $r$  为 0.99935。结果表明,牛磺酸在 2.5~40.0  $\mu$ g/mL 质量浓度范围内线性关系良好,符合定量分析要求。

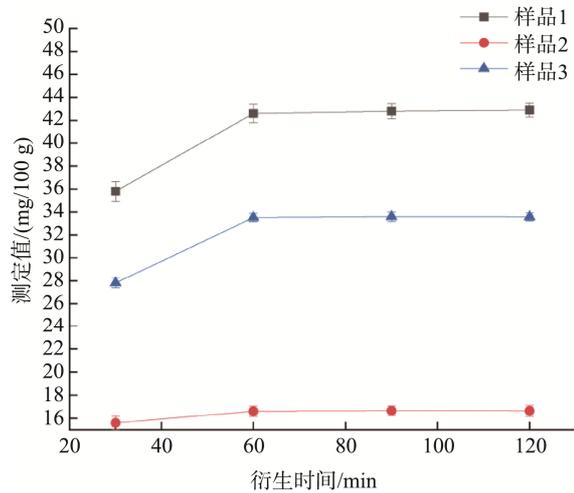


图5 衍生时间对结果的影响

Fig.5 Effects of derivative time on results

选择阴性样品作为空白基质进行加标实验,以信噪比  $S/N \geq 3$  时对应的浓度作为检出限,以信噪比  $S/N \geq 10$  时对应的浓度作为定量限,得出取样量为 2.5 g 时,牛磺酸的检出限为 1.2 mg/100 g,定量限为 4.0 mg/100 g,尽管该方法的前处理过程中减少了衍生用样品提取液的取用量,但其检出限、定量限均优于国标方法(GB 5009.169—2016),具有更高的灵敏度。

### 2.3.2 准确度、精密度

选取 5 种不同类型的特殊医学用途配方食品,准确称取各样品 2.5 g(精确至 0.01 g) 24 份,其中 6 份作测定本底值用,另外 18 份添加牛磺酸标准储备液,分别制成牛磺酸添加水平为 100、200、300 mg/kg 的试样各一式 6 份,按样品前处理方法进行加标回收率实验,计算平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),考察方法准确度和精密度。考察结果如表 3 所示,该方法所得平均回收率在 95.28%~97.58% 范围内,RSDs 在 0.56%~1.38% 范围内,具有较好的准确度和精密度,符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》和 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》相关要求,可用于特殊医学用途配方食品中牛磺酸的检测。

表 3 回收率实验结果  
Table 3 Test results of recovery rates

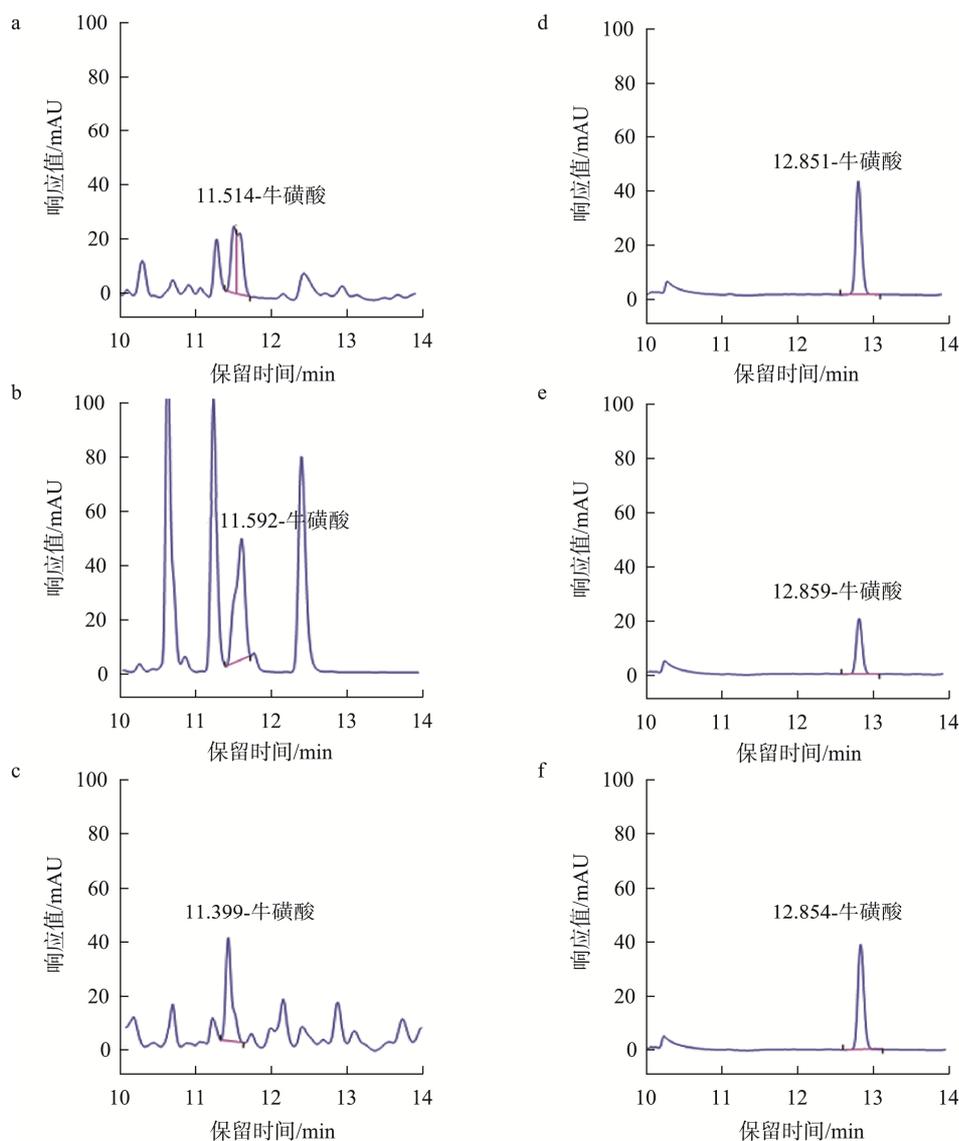
基质类型	加标量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSDs/(%, n=6)
无乳糖配方	100	95.60	0.65
	200	96.51	0.95
	300	97.58	0.88
乳蛋白深度水解配方	100	96.05	1.36
	200	95.49	0.57
	300	97.16	0.77

表 3(续)

基质类型	加标量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSDs/(%, n=6)
氨基酸配方	100	96.55	1.05
	200	96.42	1.38
	300	95.71	1.28
早产/低出生体重配方	100	95.60	0.72
	200	95.36	0.95
	300	96.63	0.68
全营养配方	100	97.24	0.73
	200	95.28	0.56
	300	96.54	0.65

### 2.4 方法比较

选择多个特殊医学用途食品, 分别使用 GB 5009.169—2016 中的第二法和本方法进行检测, 由图 6 两个方法所得的色谱图比较可得, 通过减少提取液的取用量并且使用一维色谱净化、二维色谱再次分离检测的方式, 可以排除各类不同配方的特殊医学用途食品中的基质干扰、使牛磺酸充分衍生, 适用性较强。该方法衍生效果好、色谱分离度高、保留时间稳定, 相比于国标方法(GB 5009.169—2016), 在对于特殊医学用途食品中牛磺酸的检测上具有更高的准确度、精密度和灵敏度, 使用成本低、检测效率高、稳定性也更好, 可满足大批量样品的准确定量需求, 有较高的应用价值和良好的发展前景。



注: a~c为国标法(GB 5009.169—2016)测定样品所得色谱图; d~f为本方法测定样品所得色谱图; 其中a与d为特殊医学用途婴儿氨基酸配方食品、b与e为特殊医学用途婴儿无乳糖配方食品、c与f为特殊医学用途婴儿乳蛋白深度水解配方食品。

图6 国标法(GB 5009.169—2016)与本方法测定所得色谱图

Fig.6 Chromatograms obtained by national standard method (GB 5009.169—2016) and two-dimensional method

### 3 讨论与结论

本研究使用二维液相色谱技术建立了一种可以用于检测特殊医学用途配方食品中牛磺酸的方法。试样用水溶解后,以亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白质,取上清液用丹磺酰氯衍生反应。衍生物经一维色谱通过  $C_{18}$  柱将杂质分离后,由柱切换阀进入二维色谱,通过 PFP 柱分离测定,紫外检测器或 DAD 检测,外标法定量。经方法学考察,牛磺酸在 2.5~40.0  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内均显示出良好的线性关系,相关系数  $r=0.99935$ ,该方法检出限为 1.2  $\text{mg}/100\text{g}$ 、定量限为 4.0  $\text{mg}/100\text{g}$ ,回收率在 95.28%~97.58% 范围内, RSDs 在 0.56%~1.38% 范围内,具有较高的灵敏度、准确度、精密度,可以满足测定特殊医学用途食品中牛磺酸的需要。在前处理步骤上,本研究以 GB 5009.169—2016 中的第二法丹磺酰氯柱前衍生法作为研究基础,改进优化其前处理条件,大幅减少了衍生所需时间。且相比于 OPA 柱后衍生法,本方法检测成本低、测定效果好、应用范围广,可彻底解决国标方法(GB 5009.169—2016)由于基质干扰较强导致检测困难的问题,对特殊医学食品质量分析技术的发展进步有重要的意义。

### 参考文献

- [1] JONG CJ, SANDAL P, SCHAFFER SW. The role of taurine in mitochondria health: More than just an antioxidant [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4913.
- [2] TAKASHI I, SHIGERU M. Taurine deficiency associated with dilated cardiomyopathy and aging [J]. *J Pharmacol Sci*, 2024, 154(3): 175–181.
- [3] AHMED K, CHOI H, YIM JE. The impact of taurine on obesity-induced diabetes mellitus: Mechanisms underlying its effect [J]. *Endocrinol Metab*, 2023, 38(5): 482–492.
- [4] GARCIA AD, DI PJ, MARTINEZ VA, *et al.* Taurine: A promising nutraceutical in the prevention of retinal degeneration [J]. *Neural Regenres*, 2024, 19(3): 606–610.
- [5] WU G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health [J]. *Amino Acids*, 2020, 52(3): 329–360.
- [6] DI PJ, MARTINEZ VA, PICAUD S, *et al.* Taurine: An essential amino sulfonic acid for retinal health [J]. *Neural Regenres*, 2023, 18(4): 807–808.
- [7] 谢昭鹏, 姚昱昆, 刘斌雄, 等. 牛磺酸提取及检测方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 323–331.  
XIE ZP, YAO YK, LIU BX, *et al.* Research progress on extraction and detection methods of taurine [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(24): 323–331.
- [8] SHARMA S, SAHOO BM, BANIK BK. Biological effects and mechanisms of taurine in various therapeutics [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2023, 20(6): 60–78.
- [9] 张茗晰, 张萌, HARRIS RIPPES, 等. 牛磺酸的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(7): 76–78.  
ZHANG MX, ZHANG M, HARRIS R, *et al.* Research progress on taurine [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2015(7): 76–78.
- [10] OJA S, SARANSAARI P. Taurine and the brain [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, (1370): 325–331.
- [11] 王丙然, 任德财, 李星, 等. 婴幼儿配方奶粉中牛磺酸的检测研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(22): 287–291.  
WANG BR, REN DC, LI X, *et al.* Research progress of taurine detection in infant formula milk powder [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(22): 287–291.
- [12] GILL B, WOOD JE. Analysis of taurine in infant formulas and adult nutritionals by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2023, 38(5): 482–492.
- [13] CHEN XF, ZHOU W, JIE YS. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry infant milk direct determination of taurine [J]. *Food Sci*, 2015, 36(24): 280–285.
- [14] 刘旭辉, 刘莹, 张娜, 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.* Optimization of pre-treatment of taurine in infant formula powder and analysis of amino acid analyzer [J]. *Mod Instrum Med Treat*, 2016, 22(5): 92–94.
- [15] 陈骋, 赵基钢, 何庆功, 等. 酸碱中和滴定法测定环氧乙烷法合成牛磺酸含量[J]. *应用化工*, 2019, 48(9): 2268–2270.  
CHEN C, ZHAO JG, HE QG, *et al.* Acid-base neutralization titration method for determining the content of taurine synthesized by epoxyethane method [J]. *Appl Chem Ind*, 2019, 48(9): 2268–2270.
- [16] 汤晨希. 库仑滴定法测定牛磺酸含量研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2018.  
TANG CX. Study on coulomb titration method for determining taurine content [D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2018.
- [17] 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.
- [18] 刘常凯, 何林飞, 辛丽娜. 氨基酸分析仪检测婴幼儿奶粉中牛磺酸含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3957–3961.  
LIU CK, HE LF, XIN LM. Determination of taurine content in infant milk powder by aminoacid analyzer [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(12): 3957–3961.
- [19] 王耀楠, 貌达, 王梦婷, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定功能饮料中的牛磺酸和赖氨酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(22): 8730–8736.  
WANG YN, MAO D, WANG MT, *et al.* Determination of taurine and lysine in functional drinks by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(22): 8730–8736.
- [20] 梁静, 冯家力, 曾栋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定功能饮料中的肌醇、牛磺酸和咖啡因[J]. *实用预防医学*, 2023, 30(11): 1317–1320.
- [21] LIANG J, FENG JL, ZENG D, *et al.* Determination of inositol, taurine and caffeine in functional drinks by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Pract Prev Med*, 2023, 30(11): 1317–1320.
- [22] 郑国建, 沈鸣, 林毅侃, 等. 二维液相色谱法检测婴幼儿奶粉中的牛磺酸[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(4): 53–55.  
ZHENG GJ, SHEN M, LIN YK, *et al.* Detection of taurine in infant

- formula by two-dimensional liquid chromatography [J]. *Chin Dairy Ind*, 2019, 47(4): 53–55.
- [22] 刘建宇, 李雅君, 胡广红, 等. 高效液相色谱柱前衍生法测定奶粉中的牛磺酸[C]. 哈尔滨: 中国乳制品工业协会年会, 2006: 40–42.  
LIU JY, LI YJ, HU GH, *et al.* Determination of taurine in milk powder by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [C]. Harbin: Annual Meeting of China Dairy Industry Association, 2006: 40–42.
- [23] 黄喆雯, 唐钦强. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中牛磺酸含量[J]. *食品科学*, 2008, 29(3): 381–383.  
HUANG ZW, TANG QQ. Assay taurine in milk powder for infant and young children with pre-column dericatzation HPLC [J]. *Food Sci*, 2008, 29(3): 381–383.
- [24] 王晨元. 我国特殊医学用途配方食品注册现状、典型物质检测方法及应用性研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2023.  
WANG CY. Study on the current registration status, establishment of testing methods and its applicability for food for special medical purposes in China [J]. *Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology*, 2023.
- [25] 李宇, 张乃合, 刘洪海. 牛磺酸分析方法的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(17): 2167–2173.  
LI Y, ZHANG NH, LIU HH. Research progress in taurine analysis methods [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2021, 31(17): 2167–2173.
- [26] 姚程晨, 杨丽梅, 林立. 特殊医学用途婴儿配方食品中牛磺酸含量的测定[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(12): 44–48.  
YAO CC, YANG LM, LIN L. Determination of taurine content in infant formula for special medical purposes [J]. *Chin Dairy Ind*, 2022, 50(12): 44–48.
- [27] 李政, 张若煜, 梅英杰, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定特殊医学用途奶粉中牛磺酸含量[J]. *食品与发酵工业*, 2024. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037914  
LI Z, ZHANG RY, MEI YJ, *et al.* Determination of taurine content in formula powder for special medical by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. *Food Ferment Ind*, 2024. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037914
- [28] 卢兰香, 薛霞, 宿书芳, 等. 超高效液相色谱法测定特殊医学用途婴儿配方食品中的 19 种游离氨基酸和牛磺酸[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 190–197.  
LU LX, XUE X, SU SF, *et al.* Determination of 19 free amino acids and raurine in infant formula food for special medical purposes by ultra performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2022, 43(4): 190–197.
- [29] 康绍英, 刘宇星, 赵红清, 等. 两种柱前衍生法测定奶粉中牛磺酸的比较研究[J]. *食品安全导刊*, 2023, (27): 80–83.  
KANG SY, LIU YX, ZHAO HQ, *et al.* Comparison of two pre-column derivatization methods for the determination of taurine in milk powder [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2023, (27): 80–83.
- [30] GIDDING JC. Two-dimensional separations: Conceptand promise [J]. *Anal Methods-UK*, 1984, 56(12): 1258–1270.
- [31] 朱洁. 二维液相色谱技术在食品分析中的应用[J]. *现代食品科技*, 2020, (13): 92–94.  
ZHU J. Application of two-dimensional liquid chromatography technology in food analysis [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, (13): 92–94.
- [32] LIANG L. Recent development of two-dimensional liquid chromatography in food analysis [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15(5): 1214–1225.
- [33] 刘莹, 刘丽兰, 王艳超, 等. 固相萃取-在线二维快速同时测定食品中维生素 A、D 和 4 种维生素 E 异构体的含量[J]. *中国标准化*, 2019(9): 175–177.  
LIU Y, LIU LL, WANG YC, *et al.* Solid phase extraction-online two-dimensional rapid simultaneous determination of vitamin A, D, and four vitamin E isomers in food [J]. *Chin Stand*, 2019(9): 175–177.
- [34] 赵玉富, 刘晓玲, 咸伟玥, 等. 二维液相色谱同时测定婴幼儿配方乳粉中多种脂溶性维生素[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(6): 37–40.  
ZHAO YF, LIU XL, XIAN WY, *et al.* Determination of multiple fat soluble vitamins in infant formula milk powder by two-dimensional liquid chromatography [J]. *Chin Dairy Ind*, 2019, 47(6): 37–40.
- [35] 张雯, 林毅侃, 黄雨晴, 等. 在线二维高效液相色谱法测定发酵食品中的苯乳酸[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(9): 243–249.  
ZHANG W, LIN YK, HUANG YQ, *et al.* Detection of phenyllactic acid in fermented food using two-dimensional high-performance liquid chromatography [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(9): 243–249.
- [36] 卞华, 翁史亮, 王亮. 基于二维液相色谱体系分析特殊医学用途奶粉中的牛磺酸含量[J]. *中国食品学报*, 2022, (3): 288–296.  
BIAN H, WENG SL, WANG L. Analysis of taurine content in special medical purposes milk powder based on two dimensional liquid chromatography system [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2022, (3): 288–296.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

## 作者简介



李雨墨, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与食品安全。  
E-mail: 373395069@qq.com



陈燕, 副主任药师, 主要研究方向为食品质量与食品安全。  
E-mail: chenyanlifdc@163.com