

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

卞 华, 翁史昱*, 王 亮

(上海市质量监督检验技术研究院 上海 200233)

摘要 建立特殊医学用途全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸新的衍生方法,结合二维液相色谱体系精确定量。奶粉基质经超纯水溶解,亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白,用高质量浓度 30 mg/mL 丹磺酰氯衍生,有机碱三乙胺调节衍生环境,60 ℃水浴加热 1 h。衍生液在 Agilent XDB-C18 色谱柱上,以甲醇和 0.1%三氟乙酸为一维流动相分离其余氨基酸,锁定牛磺酸的出峰时间,通过柱切换技术,经捕集和中心切割后,被切换进入 Thermal Accucore™ PFP 色谱柱,以乙腈和 0.1%甲酸为二维流动相进行梯度洗脱,用荧光检测器进行定量分析。研究不同的衍生液浓度,衍生液 pH 值,衍生时间和二维液相色谱条件对牛磺酸回收率的影响,优化其条件。所建立的方法确保牛磺酸在 1.0~20.0 mg/L 范围线性良好,线性相关系数(R^2) ≥ 0.9996 ,对企业提供的实际样品平均回收率为 95.2%,相对标准偏差为 1.86%。本试验方法准确性高,抗干扰能力强,克服了全氨基酸水解配方奶粉中其余氨基酸对目标物衍生的影响,并提升了衍生的效率。解决了国标无法准确定量特殊医学用途奶粉中牛磺酸的含量,被 AOAC 委员会认可为检测特殊奶粉基质中牛磺酸含量的推荐性方法。

关键词 牛磺酸; 特殊医学用途; 全氨基酸水解配方奶粉; 二维液相色谱体系; 三乙胺

文章编号 1009-7848(2022)03-0288-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.03.032

牛磺酸(Taurine, $C_2H_7NO_3S$, $HO_3S-CH_2-CH_2-NH_2$)化学名为 β -氨基乙磺酸,是一种特殊的含硫非蛋白氨基酸,以游离状态分布于组织间液和细胞内液中。牛磺酸具有突出的生理药理作用,能调节机体内糖类和脂类的代谢,提高机体免疫力,维持渗透压平衡,增强细胞膜抗氧化能力等^[1-3],对婴幼儿智力开发和神经系统的发育也有重要作用^[4-5]。目前,牛磺酸作为一种必备的营养强化剂添加在食品中,欧美等发达国家规定在婴幼儿食品中必须添加一定量的牛磺酸。我国食品安全国家标准也规定,为了改善婴幼儿配方食品的蛋白质质量,提高其营养价值,推荐婴儿配方乳制品中添加适当牛磺酸。

特殊医学用途配方奶粉(特医奶粉)主要包括:部分水解、深度水解和全氨基酸水解配方奶粉,是针对过敏体质婴儿专门设计的。婴幼儿的免疫系统未完全发育,胃肠道屏障发育不成熟,牛奶蛋白对婴幼儿来说是一种异种蛋白,牛奶中的 β -

乳球蛋白有很强的致敏性,极易出现婴幼儿牛奶蛋白过敏,造成便血,腹胀,甚至会导致患儿出现死亡以及过敏性休克^[6]。牛奶蛋白过敏的发病率为 6%,已成为对婴幼儿健康成长发育产生影响的首要因素^[7-8]。水解配方奶粉在加工时将牛奶中的蛋白质部分水解或者完全水解,以降低过敏概率,且不会影响蛋白质的营养,已成为大多婴幼儿食用的首选。

特医奶粉的基质体系相对于普通婴儿配方奶粉复杂很多,蛋白质被水解后形成大量的氨基酸于基质中,对于牛磺酸的定量分析会产生很大的干扰。其中,薄层扫描法^[9-10]很容易受到其余氨基酸的干扰,准确性较低;高效液相色谱——串联质谱法^[11-13]虽应用广泛,但对于奶粉本身的基质效应显著,重复性不理想;高效液相色谱——紫外检测^[14-16],受到牛磺酸自身紫外吸收较弱的影响,灵敏度较低。

本文选择基质最为复杂的全氨基酸水解配方奶粉,改进前处理方法,以克服反应时间长的缺点^[17],保留丹磺酰氯柱前衍生定量准确的优点,并构建二维液相系统(2D-LC)。在除去大量氨基酸的干扰后,利用荧光检测器精确测定牛磺酸含量。本试验方法,不仅解决了国家标准目前无法准确定量全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸含量的问

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 上海市科学技术委员会:食品添加剂质量鉴定
关键技术与质量标准研究(17DZ2201200)

作者简介: 卞华(1989—),男,硕士,工程师

通信作者: 翁史昱 E-mail: wengsy@sqi.org.cn

题, 对其余特殊医学用途奶粉和普通婴幼儿配方奶粉也同样适用。

1 材料与amp;方法

1.1 设备和试剂

Dionex UltiMate 3000 系统 (双三元梯度泵), 美国 Thermal Scientific; Centrifuge 5804 高速离心机, 德国 Eppendorf; D-91126 多管涡旋振荡器, 德国 Heidolph; C9NK-SK1200BTU 超声波清洗机, 中国 KUDOS; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore; MSZO 204S 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo。

牛磺酸标准品、牛磺酸实物标样, 中国检验检疫科学研究院测试评估中心; 婴幼儿配方奶粉、特殊医学用途水解配方奶粉, 国内某知名乳业有限公司; 丹磺酰氯, 日本东京化成工业株式会社; 甲醇、乙腈 (色谱纯), 美国 Thermal Fisher Chemical; 甲酸 (色谱纯), 美国 ACS 色谱试剂; 三乙胺 (色谱纯), 美国 Tedia; 三氟乙酸、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 试验方法

1.2.1 标准溶液和衍生溶液配制 精确称取牛磺酸标准品 100.0 mg 于 100 mL 容量瓶, 配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。试验前, 将储备液用水稀释成质量浓度为 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液进行衍生, 由高效液相色谱-荧光检测器 (HPLC-FLD) 检测, 以保留时间定性, 外标法定量。

1.2.2 样品前处理 提取: 精确称取 (1.00 ± 0.05) g 奶粉样品于 50 mL 聚四氟乙烯塑料离心管中, 加入约 35 mL 超纯水, 涡旋 5 min, 超声 15 min, 加入 1 mL 150 g/L 亚铁氰化钾溶液和 1 mL 300 g/L 乙酸锌溶液, 去除基质中的蛋白质, 以 9 000 r/min 离心 2 min, 上清液转移至 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度。

衍生: 取 1 mL 溶液于 10 mL 聚四氟乙烯塑料离心管中, 加入 1 mL 30 mg/mL 高质量浓度丹磺酰氯衍生液), 10 μL 三乙胺, 60 $^{\circ}\text{C}$ 避光加热 1 h (每 15 min 取出涡旋 30 s), 加入 0.1 mL 质量浓度为 20 mg/L 的盐酸甲胺终止反应, 过 0.22 μm PTFE 滤膜, 供 2D-LC 荧光检测器检测。

1.3 色谱条件

1.3.1 一维色谱条件 色谱柱: Agilent XDB - C18 (3.0 mm \times 150 mm, 3.5 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 流动相 A₁: 0.1% 三氟乙酸水; 流动相 B₁: 甲醇; 流速: 0.4 mL/min; 梯度洗脱程序见表 1。紫外检测器: 254 nm。

1.3.2 二维色谱条件 二维液相系统连接流程见图 1。当六通阀从 1-2 连通状态转变为 1-6 连通时, 目标物被中心切入第二维液相体系; 色谱柱: Thermal Accucore™ PFP (3.0 mm \times 150 mm, 2.6 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 流动相 A₂: 0.1% 甲酸水; 流动相 B₁: 乙腈; 流速: 0.6 mL/min; 梯度洗脱程序见表 1。荧光检测器: 激发波长为 330 nm, 发射波长 530 nm。

表 1 液相色谱条件
Table 1 Liquid chromatography condition

时间/min	一维梯度条件	
	A ₁ : 1% 三氟乙酸水	B ₁ : 甲醇
0	80	20
1	80	20
11	0	100
11.1	80	20
14	80	20
时间/min	二维梯度条件	
	A ₂ : 1% 甲酸水	B ₂ : 乙腈
0	90	10
5	90	10
12	60	40
14	60	40

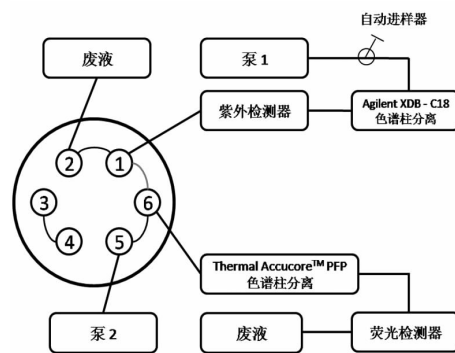


图 1 二维液相系统连接示意图

Fig.1 Schematic diagram of two-dimensional liquid system connection

2 结果与讨论

牛磺酸检测的关键因素为衍生条件,包括衍生液的浓度,衍生环境的 pH 值,和衍生时间。丹磺酰氯(二甲氨基-萘磺酰氯 DNS-CL)是一种强荧光剂,能专一地与肽链 N-端的 α -氨基反应生成丹磺酰-肽,后者水解生成的丹磺酰-氨基酸具有很强的荧光信号。传统婴儿配方奶粉在沉淀蛋白后,用 1.5 mg/mL DNS-CL 在碱性条件下衍生,得到荧光产物(参考国标 GB 5009.169-2016)^[18]。在全氨基酸水解配方奶粉中,其余氨基酸同样可与 DNS-CL 反应,导致牛磺酸的衍生反应不完全,其回收率不到 25%,相对标准偏差也较大(见表 2)。本试验将 DNS-CL 的浓度大幅度提高,同时考虑其不溶于水的物理性质,利用三乙胺(有机碱)代替传统的碳酸氢钠缓冲液调节溶液 pH 值,并在 60 °C 水浴中加热,提高反应速率,使高浓度的 DNS-CL 与牛磺酸充分反应。

另外,对二维液相系统进行探究,二维液相色谱是将分离机理不同且相互独立的两支色谱柱串联起来构成的分离系统,通过柱切换技术完成牛磺酸在二维色谱柱之间的流动^[19]。样品经第一维色谱洗脱分离,锁定目标物的出峰时间,进入切换阀的接口中,经捕集和中心切割,被切换进入第二维色谱柱及检测器^[20]。由此得到的牛磺酸具有更高的峰容量和分辨力。2D-LC 系统更适用于牛磺酸在多组分、复杂基质体系中的分离分析^[21-23]。

2.1 DNS-CL 衍生液浓度

提高 DNS-CL 的浓度,将包括牛磺酸在内的所有氨基酸一并衍生。DNS-CL 在乙腈中的溶解度为 50 mg/mL,尝试 3 个衍生质量浓度(15, 30, 45 mg/mL),研究全氨基酸水解配方奶粉的最佳衍生液浓度(表 3)。

随着 DNS-CL 浓度的增大,牛磺酸的回收率均有大幅提升。使用 15.0 mg/mL DNS-CL 衍生,牛磺酸的回收率低于 60%,这说明衍生反应仍不完全。而 30.0 mg/mL 和 45.0 mg/mL 质量浓度的 DNS-CL 均能确保牛磺酸得到较为完整的衍生,其牛磺酸的回收率都在 90% 以上。衍生物丹磺酰-氨基乙磺酸 DNS-NH-(CH₂)₂-SO₃H 的色谱峰形更为尖锐,峰面积、峰高均大幅增加。值得一提的是,45.0 mg/mL DNS-CL 在与牛磺酸反应的同时,

表 2 牛磺酸在不同奶粉基质中的回收率和相对标准偏差

	实际含量/ mg(100g) ⁻¹	回收率/%	相对标准 偏差 RSD/%
婴幼儿配方奶粉	39.2	98.0	0.43
全氨基酸水解配 方奶粉	9.6	24.0	6.76

注:企业理论添加量 40.0 mg/100 g;3 平行,4 批次,12 个样品的平均值。

表 3 全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸在不同丹磺酰氯浓度下的回收率和相对标准偏差

Table 3 Effect of different DNS-CL concentration on the recoveries and relative standard deviations (RSDs) of taurine in amino-acid-hydrolyzed formula milk powder

	丹磺酰氯 质量浓度/ g·L ⁻¹	实际含量/ mg(100g) ⁻¹	回收率/%	相对标 准偏差 RSD/%
全氨基	15.0	18.6	46.5	1.06
酸-水解	30.0	38.1	95.3	1.21
配方奶粉	45.0	37.9	94.8	2.81

注:企业理论添加量 40.0 mg/100 g;控制变量:三乙胺为 10 μ L,反应时间 2 h;结果取 12 个样品的平均值。

因自身溶解度的问题,衍生一段时间后,会有反应物沉淀析出^[24],造成衍生过程的不均匀,重现性不理想,这可能是其结果的相对标准偏差更大的主要原因。另外,高浓度 DNS-CL 衍生得到的丹磺酰-氨基乙磺酸中会伴有其它杂质(图 5c),经波长鉴定,与丹磺酰基团有关,其对色谱柱的分离和柱效都会有影响,目标峰的相对百分比也会下降,应尽量避免。在 30.0 mg/mL 和 45.0 mg/mL 的 DNS-CL 对牛磺酸检测结果没有显著性差异的情况下,本试验选择 30.0 mg/mL DNS-CL 作为最终的衍生液。

2.2 衍生环境 pH 值

牛磺酸与 DNS-CL 的反应过程中,随着荧光产物丹磺酰-氨基乙磺酸 DNS-NH-(CH₂)₂-SO₃H 的生成,DNS-CL 上的 Cl 与 H⁺结合为 HCl,降低了溶液的 pH 值,会抑制反应向正方向进行。在衍生过程中,需保持溶液体系在碱性环境中进行。牛磺酸的最佳起始衍生环境通常控制在 pH=9.5 左

右^[25-26]。考虑到 DNS-CL 不溶于水, 30.0 mg/mL DNS-CL 在与牛磺酸反应时, 无法利用碳酸钠缓冲液调节溶液 pH 值, 故本试验尝试用三乙胺

(有机碱, TEA) 来代替传统的碳酸钠缓冲液。表 4 表明不同初始衍生溶液的 pH 值对牛磺酸结果的影响。

表 4 全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸在不同三乙胺添加量下的回收率和相对标准偏差

Table 4 Effect of different triethylamine content on the recoveries and relative standard deviations (RSDs) of taurine in amino-acid-hydrolyzed formula milk powder

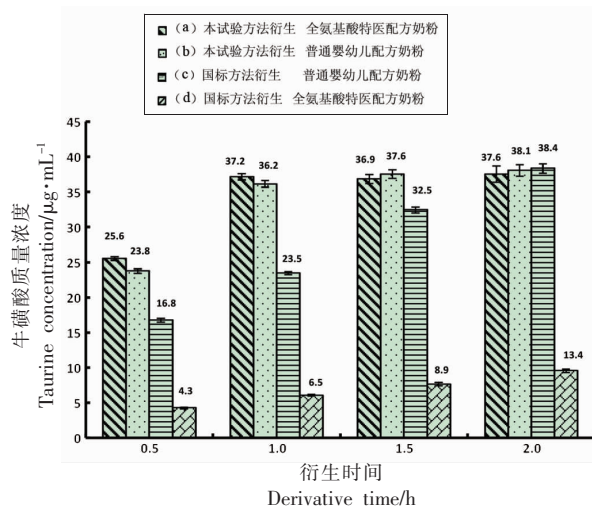
	三乙胺添加量/ μL	溶液初始 pH 值	实际含量/ $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
全氨基酸水解配方奶粉	0	6.4	1.6	4.1	0.25
	10	10.1	37.6	93.4	1.18
	20	10.5	36.4	91.0	1.21
	50	10.7	37.3	93.3	1.13

注: 企业理论添加量 40.0 mg/100 g; 控制变量丹磺酰氯质量浓度 30.0 mg/mL, 反应时间 2 h; 结果取 12 个样品的平均值。

在不添加三乙胺的情况下, 牛磺酸的回收率仅 4.1%。加入三乙胺能迅速提升溶液的 pH 值, 三乙胺(C_2H_5)₃N 中的 N 孤电子对为 SP³ 杂化, 很容易给出电子。同时, 三乙胺结合氢质子后, 其 3 个乙基可以通过超共轭效应来稳定电荷, 保证衍生溶液的稳定性。10 μL 三乙胺可将溶液的 pH 值调节至 10.1, 可以充分满足衍生条件, 其回收率达 90% 以上。随着三乙胺的增加, 目标物的色谱峰面积和回收率并没有显著性增加, 考虑到三乙胺有一定的刺激性, 在保证衍生充分性的前提下, 尽量控制其添加量。本试验最终选择 10 μL 三乙胺来调节衍生液的 pH 值。

2.3 衍生反应时间

从图 2a 可知, 在反应后的 0.5 h, 利用本方法得到的牛磺酸含量达 25.6 mg/100 g (回收率 64%), 1 h 后接近企业理论添加量 40 mg/100 g, 1.5 h 后, 其含量没有显著性增加。值得注意的是, 本方法同样可用于检测普通婴幼儿配方奶粉中的牛磺酸。虽然奶粉基质体系不同, 但是在牛磺酸添加量相同的情况下, 其检测结果随反应时间增加的变化趋势相同。经 1 h 的衍生, 回收率均达 90% 以上 (图 2a 和图 2b)。本方法与国标 GB 5009.169-2016 相比, 当检测同一普通婴幼儿配方奶粉时, 可将衍生时间缩短一半, 衍生过程在 1 h 左右完成, 加快了反应效率, 减少了反应时间和能耗 (图 2b 和图 2c); 而图 2d 说明国标方法无法完全衍生全氨基酸水解配方奶粉。



注: 企业理论添加量 40.0 mg/100g; 控制变量: 丹磺酰氯质量浓度为 30.0 mg/mL, 三乙胺添加量 10 μL ; 结果取 12 个样品的平均值。

图 2 衍生时间对牛磺酸含量和回收率的影响

Fig.2 Effect of derivative time on the recoveries and relative standard deviations (RSDs) of taurine

综上所述, DNS-CL 衍生法检测牛磺酸的优势在于准确度很高, 缺点在于专一性和特异性不强, 柱前衍生时间较慢。本试验利用高质量浓度的 DNS-CL 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中避光加热反应物, 使其充分反应, 提高衍生速度和效率。对于全氨基酸水解配方奶粉基质, 加热能提升高浓度 DNS-CL 的溶解度, 降低 DNS-CL 的析出, 使整个衍生反应更加均匀和彻底。全氨基酸水解配方特医奶粉在 30.0

mg/mL 的 DNS-CL, 10 μ L 三乙胺的衍生条件下, 60 $^{\circ}$ C 加热 1 h, 衍生得到最理想量的丹磺酰-氨基乙磺酸, 供荧光检测器检测。

2.4 液相条件

2.4.1 一维液相条件 比较图 3b 和 3c 可知, 全氨基酸水解配方奶粉中含有大量普通婴幼儿奶粉中没有的氨基酸。牛磺酸本身紫外吸收很弱^[27], 与其余氨基酸衍生物相比, 牛磺酸衍生物响应小很多数量级, 无法精确积分定量, 应将其分离出来。为了保证将一维色谱柱中的牛磺酸全部中心切割至二维色谱中, 首先利用牛磺酸标准品确定其衍生物在一维色谱中的出峰位置(图 3a)。选择 0.1% 三氟乙酸和甲醇为一维流动相, Agilent

XDB-C18(150 mm) 为色谱柱, 紫外检测器。流动相中的三氟乙酸与疏水键合相和残留的极性表面以多种模式相互作用, 来抑制待测物和反相色谱柱填料表面残留的硅羟基的作用, 确保牛磺酸衍生物良好的峰形。另外, 三氟乙酸的紫外最大吸收峰低于 200 nm, 对多肽在低波长处的检测干扰很小。牛磺酸衍生物在最大紫外波长(254 nm)吸收下的响应和峰面积虽很低, 但这不影响六通阀切换的时间。一维液相色谱的切割时间最终设定为 4.2 min 至 5.2 min。此时, 目标物顺利被切入二维液相色谱中, 而其余氨基酸都被保留在一维体系中。

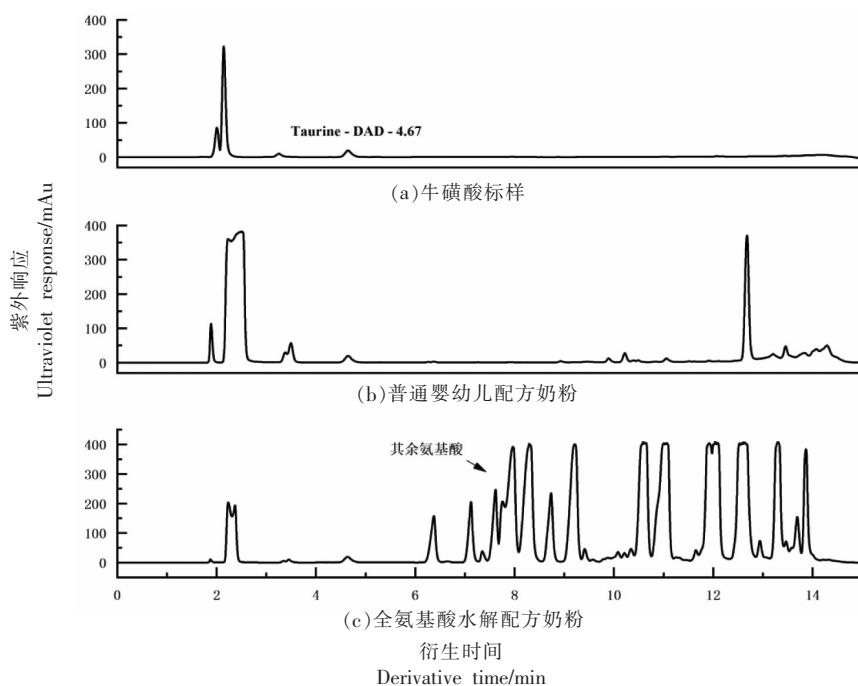


图 3 牛磺酸衍生物一维紫外色谱图

Fig.3 One-dimensional Ultra Violet chromatogram of taurine derivative

2.4.2 二维液相条件 二维液相色谱既要考虑 2 个维度的兼容性, 又要考虑不同液相体系存在的差异。本试验选择和一维液相条件相近的 0.1% 甲酸水和乙腈为二维流动相, Thermal AccucoreTM PFP 色谱柱, 荧光检测器。五氟苯基(PFP)固定相中的氟化基团可为卤代化合物中含极性官能团的化合物提供独特的选择性, 对含有双苯环的丹磺酰-氨基乙磺酸具有很好的保留, 同时, 其高硅胶表面覆盖率最大程度地减少了次级相互作用和峰

拖尾的情况, 可以获得很好的峰形。考虑到 PFP 填料的稳定性, 选择离解常数更温和的 0.1% 甲酸水作为二维水相; 化合物的保留时间更稳定, 柱压更小的乙腈作为二维有机相。图 4 说明 0.1% 甲酸水-乙腈体系无论在牛磺酸衍生物峰面积的大小还是稳定性上, 都是最佳选择。图 5 则说明牛磺酸衍生物在二维液相色谱中具有足够强的荧光响应信号和良好的色谱峰形, 分离度和灵敏度均满足奶粉中牛磺酸检测的要求。

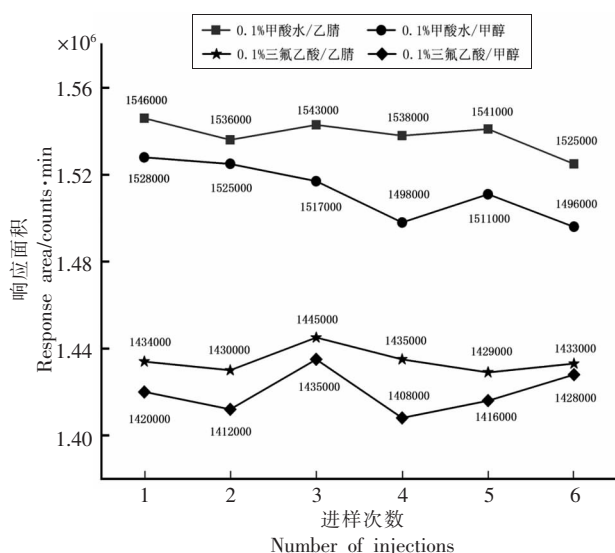


图4 牛磺酸衍生物在不同流动相体系中的峰面积

Fig.4 Peak area of taurine derivatives by different mobile phase system

2.5 方法学评价

2.5.1 线性关系 牛磺酸标样质量浓度在 1.0~20.0 mg/L 范围,标准曲线的线性良好,相关系数 (R^2) 达到 0.9996。其浓度与峰面积的线性方程为 $Y = 10433.78X + 1769.98$ 。

2.5.2 回收率和精密度 测定 4 种不同基质奶粉中的牛磺酸含量,所得结果基本一致(见表 5),回收率均在 90%以上,相对标准偏差均在 5%内,说明该方法在检测全氨基酸水解配方和普通婴幼儿配方的奶粉时具有良好的精密度、稳定性和一致性。

3 结论

本文建立了一套二维液相色谱体系,测定特殊医学用途全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸的含量。该方法在 1.0~20.0 mg/L 范围线性良好,线

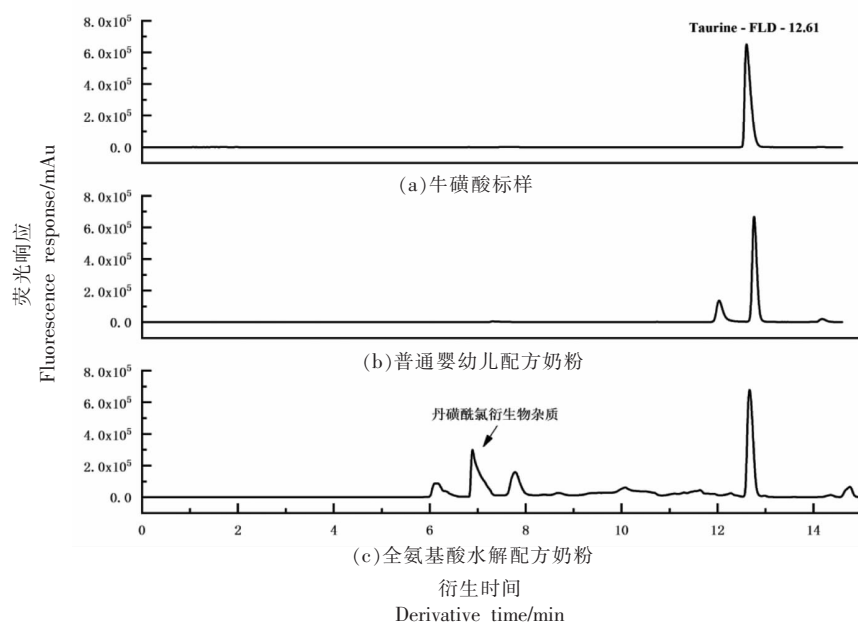


图5 牛磺酸衍生物二维荧光色谱图

Fig.5 Two-dimensional fluorescence chromatogram of taurine derivative

表5 4种基质奶粉中牛磺酸的回收率和相对标准差

Table 5 Recoveries and relative standard deviation (RSDs) of taurine in four different matrix milk powder

	检测质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	实际含量/ $\text{mg}\cdot(100\text{g})^{-1}$	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
全氨基酸水解配方奶粉	7.621	38.1	95.2	1.86
深度水解婴幼儿配方奶粉	7.359	36.8	92.1	2.68
部分水解婴幼儿配方奶粉	7.467	37.3	93.3	2.17
普通婴幼儿配方奶粉	7.522	37.6	94.0	3.16

注:理论添加量 40 mg/100g;3 平行,4 批次,12 个样品的平均值。

性相关系数 0.9996, 12 个实际样品的平均回收率为 95.2%, 相对标准偏差 1.86%。该方法准确性高, 抗干扰能力强, 缩短了丹磺酰氯的柱前衍生时间, 具有较好的实际应用价值, 解决了现行国家标准无法准确定量全氨基酸水解配方奶粉中牛磺酸的含量, 为特殊医学用途乳制品的检测提供了新技术支持, 有助于质检部门加强对乳制品市场的监管。经验证, 此方法同样适合于其它奶粉基质, 可为深度水解配方奶粉, 部分水解配方奶粉, 和普通婴幼儿配方奶粉的技术优化提供新的思路。同时, 此方法也被美国分析化学家协会(AOAC, Association of Official Analytical Chemists) 认可为检测特殊奶粉基质中牛磺酸含量的推荐性方法。

致谢

感谢上海市科委项目基金(NO.17DZ2201200) 对本试验的支持, 感谢 AOAC 委员会专家对本试验方法的认可和优化意见, 并感谢美国奥本大学生物系统工程系教授对本试验的指导和建议。

参 考 文 献

- [1] GILL B D, INDYK H E, WOOLARD D C. Current methods for the analysis of selected novel nutrients in infant formulas and adult nutritionals[J]. J AOAC Int, 2016, 99(1): 30-41.
- [2] RICCI L, VALOTI M, SGARAGLI G, et al. Protection by taurine of rat brain cortical slices against oxygen glucose deprivation- and reoxygenation-induced damage[J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 621: 26-32.
- [3] ANGELO Z, SALVATORE S, SCANU B, et al. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food application[J]. Amino Acids, 2009, 36(1): 159-161.
- [4] 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): 43-45.
CAI M, JI W L, LIU H L, et al. Study on rapid determination of taurine in food by utilizing the amino acid autoanalyzer[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(1): 43-45.
- [5] 刘莹, 胡建民, 富亮. 牛磺酸的性质及其生理功能[J]. 畜禽业, 2006(2): 14-15.
LIU Y, HU J M, FU L. Physiological effects and character of taurine[J]. Livestock and Poultry Industry, 2006(2): 14-15.
- [6] 何为, 潘家华. 深度水解蛋白配方奶喂养早产儿 327 例临床观察[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 856-859.
HE W, PAN J H. Clinical effect of extensively hydrolyzed formula in preterm infants: An analysis of 327 cases[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2017, 19(8): 856-859.
- [7] 卢国琇, 张娜娜, 韦佩俭, 等. 深度水解蛋白配方奶粉对婴儿牛奶蛋白过敏性腹泻的有效性[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(5): 95-96.
LU G X, ZHANG N N, WEI P J, et al. Effectiveness of a highly hydrolyzed protein formula for infants with milk protein allergic diarrhea[J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2019, 37(5): 95-96.
- [8] 顾春燕, 蒋慧芬, 王金秀. 深度水解蛋白配方奶喂养对极低/超低出生体重儿生长发育的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 852-853.
GU C Y, JIANG H F, WANG J X. Effect of extensively hydrolyzed formula on growth and development of infants with very/extremely low birth weight [J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2017, 19(8): 852-853.
- [9] 刘春美, 谢辉, 丁安伟. 薄层扫描法测定牡蛎软体中牛磺酸的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2002, 16(2): 23-24.
LIU C M, XIE H, DING A W. Determination contents of taurine in oyster soft tissue by TLCS[J]. Primary Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 16(2): 23-24.
- [10] 惠秋沙. 薄层扫描法测定保健饮料中牛磺酸的含量[J]. 食品与药品, 2011, 13(7): 276-278.
HUI Q S. Determination of taurine in health drinks by TLC[J]. Food and Drug, 2011, 13(7): 276-278.
- [11] 林琳, 林毅侃, 庞贝妮, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定特殊医学用途婴儿乳粉中牛磺酸的含量[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(1): 5-8.
LIN L, LIN Y K, PANG B N, et al. Determination of taurine content in infant formula for special medical purposes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Dairy

- Science and Technology, 2020, 43(1): 5-8.
- [12] 陈晓峰, 周围, 解迎双. 超高效液相色谱串联质谱法直接测定婴幼儿乳粉中牛磺酸[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 280-285.
CHEN X F, ZHOU W, XIE Y S. Direct determination of taurine in infant milk powder by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2015, 36(24): 280-285.
- [13] MASSIMO R, GIOVANNI C, MANUELA C, et al. Simultaneous determination of taurine, glucuronolactone and glucuronic acid in energy drinks by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1364: 303-307.
- [14] 袁辉, 高帅, 王传兴. 三种柱前衍生化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 C X. Comparison of three methods for determined taurine content in milk powder by pre-column derivatization[J]. China Dairy Industry, 2015, 43(3): 53-56.
- [15] FERREIRA I M P L V O, NUNES M V, MENDES E, et al. Development of an HPLC-UV method for determination of taurine in infant formulae and breast milk[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1997, 20(8): 1269-1278.
- [16] MOHAMMADREZA G S, SIMINOZAR M, MAHBOUB N, et al. A rapid determination of taurine in human plasma by LC[J]. Chromatographia, 2009, 69(11): 1427-1430.
- [17] 林玉宙, 黄耀铨, 丛晓, 等. 柱前在线自动衍生-高效液相色谱法快速测定乳粉中牛磺酸[J]. 乳业科学与技术, 2015, 38(5): 21-24.
LIN Y Z, HUANG Y Y, CONG X, et al. Rapid determination of taurine in milk powder by high performance liquid chromatography with on-line automated pre-column derivatization[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2015, 38(5): 21-24.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定: GB 5009.169-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standards: Determination of Taurine in Food: GB 5009.169-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [19] 王智聪, 张庆合, 李彤, 等. 二维液相色谱(SCX/RP)系统的构建及对珠蛋白水解产物的研究[J]. 中国科学B辑化学, 2006, 36(1): 64-70.
WANG Z C, ZHANG Q H, LI T, et al. Study on the globin hydrolysate by the construction of two-dimensional liquid-phase system(SCX/RP)[J]. Science in China Ser. B Chemistry, 2006, 36(1): 64-70.
- [20] 萧伟斌, 蹇阳, 李桦. 二维液相色谱在药物和毒物分析中的应用进展[J]. 分析化学评述与进展, 2014, 42(12): 1851-1858.
XIAO W B, JIAN Y, LI H. Application of two-dimensional liquid chromatography analysis of drugs and toxicants[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(12): 1851-1858.
- [21] 郑国建, 沈龔鸣, 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): 53-59.
ZHENG G J, SHEN Y M, LIN Y K, et al. Taurine determination by 2D-HPLC in infant formula[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(4): 53-59.
- [22] 陈学国, 孔亮, 盛亮洪, 等. 全二维液相色谱串联质谱用于银杏叶提取物成分分析的研究[J]. 色谱, 2005, 23(1): 46-51.
CHEN X G, KONG L, SHENG L H, et al. Application of two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the separation and identification of compounds in ginkgo biloba extracts[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(1): 46-51.
- [23] SAEVELS S, LAMMERTYN J, BERNA A Z, et al. An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life[J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 31: 9-19.
- [24] 丁雅韵, 谢孟峡, 邓志威. 丹磺酰氯作为氨基酸柱前衍生试剂衍生条件的研究[J]. 北京师范大学学报, 2001, 37(4): 526-529.
DING Y Y, XIE M X, DENG Z W. A study on the derivatising condition of amino acids using dansyl chloride as pre-column derivatising agent[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2001, 37(4): 526-529.
- [25] 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): 415.
- HUANG Z W, TANG Q Q. Assay taurine in milk powder for infant and young children with pre-column derivatization HPLC[J]. Food Science, 2008, 29(3): 415.
- [26] 董伟峰, 李宪臻, 林维宣. 丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生试剂衍生化条件的研究[J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(2): 115-118.
- DONG W F, LI X Z, LIN W X. Study on derivatizing condition of biogenic amines with dansyl chloride as pre-column derivatizing agent[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2005, 24(2): 115-118.
- [27] 夏义平, 李建平, 党亚敏, 等. 高效液相色谱在线衍生测定保健食品中牛磺酸的研究[J]. 中国热带医学, 2015, 15(11): 1312-1314.
- XIA Y P, LI J P, DANG Y M, et al. Determination of taurine by online derivation HPLC in health foods[J]. China Tropical Medicine, 2015, 15(11): 1312-1314.

Analysis on the Taurine in the Milk Powder with Special Medical Purpose Based on the Two-dimensional Liquid Chromatography System

Bian Hua, Weng Shiyu*, Wang Liang

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233)

Abstract A method for the determination of taurine in amino-acid-hydrolyzed formula milk powder with special medical purpose was developed using a novel derivative way, coupled with two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) system on precise quantification. The milk powder matrixes were dissolved with ultra pure water, precipitated proteinaceous substance by potassium ferrocyanide and zinc acetate, derived by high concentration dansylchloride (30 mg/mL), adjusted by triethylamine on pH value, and heated in 60 °C water bath for 1 hour. The derivative was performed on the Agilent XDB-C18 column with methanol and 0.1% trifluoroacetic acid as the one-dimensional LC mobile phase, so as to separate other amino-acids and locate the target. Subsequently, taurine entered into the Thermal Accucore™ PFP column after the capture and center-cutting by column switching technique, acetonitrile and 0.1% formic acid were utilized as the two-dimensional LC mobile phase to gradient elute the taurine, combined with fluorescence detector on quantification analysis. The derivative parameters (concentration, pH value and time) and 2D-LC condition were optimized to promote the target recovery. Taurine showed good linear ranged from 1.0-20.0 mg/L, while the correlation coefficients (R^2) was higher than 0.9996. The average recovery of the actual samples was 95.2%, with RSD 1.86%. This method, with high accuracy and strong anti-interference ability, overcame the influence of other amino acids on target derivation, and improved the derivative efficiency. This method solves the problem that national standard cannot accurately quantify the content of taurine in those milk powder with special medical purpose, and has been recognized by AOAC committee as the recommended method on taurine detection of those milk powder with complicated matrix.

Keywords taurine; special medical purpose; amino-acid-hydrolyzed formula milk powder; two-dimensional liquid chromatography system; triethylamine