

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

黄喆雯, 唐钦强

(深圳海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518057)

摘要: 目的: 探讨使用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相法测定婴幼儿配方乳粉中牛磺酸含量的可行性。方法: HPLC 法, 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05mol/L 醋酸钠溶液 (35:65), 流速 1.0ml/min, 检测波长 360nm。结果: 测得的标准曲线在 0.00~20.34 μg/ml 范围内线性关系良好 ($r = 0.9996$), 平均回收率为 99.6%, RSD 为 2.0% ($n=5$)。结论: 该方法准确, 重现性好, 可用于婴幼儿配方乳粉中牛磺酸的质量控制。

关键词: 牛磺酸; 含量测定; HPLC; 婴幼儿配方乳粉

Assay Taurine in Milk Power for Infant and Young Children with Pre-column Derivatization HPLC

HUANG Zhe-wen, TANG Qin-qiang

(Shenzhen Neptunus Biology and Technologic Co. Ltd., Shenzhen 518057, China)

Abstract: Objective: Strengthen the reliability of determining the assay for taurine in milk power for infant and young children with pre-column derivatization HPLC. Methods: HPLC method was used, chromatography condition included The instrument was SHIMADZU-10A with a Kromasil C₁₈ column, and the mobile phase was methanol-0.05mol/L NaAc (35:65) at flow rate of 1.0 ml/min. The UV detection wavelength was 360 nm. Results: Taurine had a good linearity ($r = 0.9996$) in the range of 0.00~20.34 μg/ml. The relative recovery was 99.6%, RSD was 2.0% ($n=5$). Conclusion: An accurate method with good reproducibility for control of taurine in milk power for infant and young children were established.

Key words taurine assay; HPLC; milk power for infant and young children

中图分类号: TS252.51

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0415-04

牛磺酸 (分子式 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, 分子量 125) 是一种氨基磺酸, 牛磺酸除了能促进大脑的正常发育外, 还能增强机体的免疫力^[1]。它作为一种新型营养强化剂添加在最新研制的第二代母乳化奶粉及其他各类儿童营养食品中。在婴幼儿食品中一般的添加量为 30~50mg/100g^[2], 常用的含量测定方法有: 邻苯二醛柱后衍生^[3]、2,4-二硝基氟苯柱前衍生^[4]、邻苯二醛柱前衍生^[5]高效液相色谱法。目前国标推荐的婴幼儿配方食品和乳粉中牛磺酸的含量测定方法为 HPLC 柱后衍生法: 样品经预处理, 在阳离子交换柱中被分离, 再与邻苯二甲醛 (OPA) 进行柱后衍生反应, 由荧光检测器检测定量^[3], 该方法具有灵敏度高、定量准确等优点, 但是分离需使用的钠离子交换柱价格昂贵, 这给测定方法的推广应用带来

了困难。为了有效控制海王牌牛初乳营养粉的质量, 本实验参考文献[6]通过选择供试品溶液的制备方法和 HPLC 条件, 采用 2,4-二硝基氟苯为柱前衍生试剂与牛磺酸在 pH9 的碳酸氢钠溶液中定量进行化学衍生反应, 缩合成二硝基苯氨基酸, 在反相色谱 C₁₈ 柱上进样分离, 用紫外检测器检测定量, 对建立牛初乳营养粉中的牛磺酸含量的测定方法进行研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

牛初乳营养粉 深圳海王健康科技发展有限公司;
牛磺酸对照品 (批号: 111601-200301) 中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯; 水为自制超纯水; 其他试

收稿日期: 2007-02-07

作者简介: 黄喆雯 (1979-), 女, 执业药师, 研究方向为药物及保健食品分析。E-mail: huangzhewen@hotmail.com

剂均为分析纯；

1.2 仪器

SHIMADZU-10A 液相色谱系统 (UV 检测器) 岛津公司；TDL-40B 型大容量离心机 成都市生科仪器有限公司；超声仪 上海船舶仪器研究院。

1.3 色谱条件与系统适应性实验

色谱柱：Kromasil C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm)；流动相：乙腈-0.05mol/L 醋酸钠溶液 (35:65)；流速：1.0ml/min；柱温：35℃；进样量 10 μl；检测波长 360nm。理论塔板数按牛磺酸峰计算应不低于 3000，相邻峰的分

离度应大于 1.5。按上述色谱条件得到的空白，对照品及供试液的色谱图见图 1。

1.4 溶液的制备

1.4.1 对照品溶液的制备

精密称取牛磺酸对照品 10mg，加水稀释至 100ml，制成每 1ml 含 0.1mg 的溶液，按 1.4.3 方法操作，即得。

1.4.2 供试品溶液的制备

精密称取样品约 5g 于具塞锥形瓶中，精密加入 25ml 水，超声溶解，精密加入 0.1mol/L 盐酸溶液 10ml，摇匀，加入 15g/L 硫酸锌溶液 5ml，摇匀，精密加入 10ml 水，摇匀，4000r/min 离心 20min，取上清液过滤，取续滤液 2ml，按 1.4.3 方法操作，即得。

1.4.3 衍生化反应

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液，分别置于 10ml 量瓶中，加 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液 2.0ml 和 1% 的 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液 1.0ml，混匀，置暗处 60℃ 水浴 1h，放冷至室温，用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液定容，摇匀。用微孔滤膜过滤，即得。

2 方法与结果

2.1 线性关系考察

精密量取对照品溶液 0.00、0.40、0.80、1.20、1.60、1.80、2.00ml，分别置于 10ml 量瓶中，按 1.4.3 项下操作，分别精密吸取对照品溶液 10 μl，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定峰面积，以对照品的浓度为横坐标，峰面积积分为纵坐标，绘制标准曲线见图 2。数据及处理见表 1。

表 1 标准曲线数据

Table 1 Data of standard curve

浓度 (μg/ml)	0	4.07	8.14	12.20	16.27	18.31	20.34
峰面积	0	290379	608454	939492	1247791	1384331	1564022

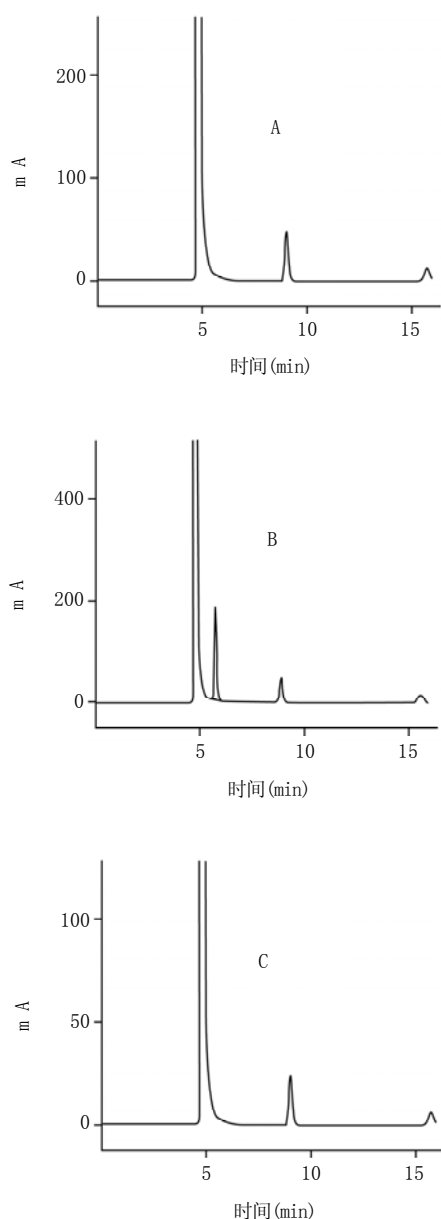


图 1 空白(A)、对照品(B)、供试品(C) 高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of blank (A), reference substance (B) and sample (C)

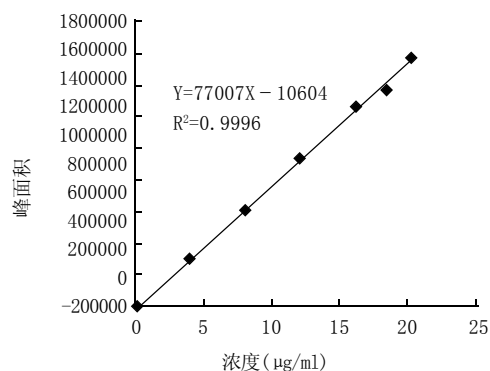


图 2 标准曲线

Fig.2 Standard curve

结果表明,牛磺酸在0.00~20.34 μ g/ml范围内呈良好线性关系,回归方程为:Y=77007X-10604, R²=0.9996。

2.2 稳定性实验

取供试品溶液,按上述色谱条件,分别在0、1、2、3、4、5、6h进样,测其峰面积, RSD=0.31%(n=6)。结果表明,供试品溶液6h内基本稳定(表2)。

表2 稳定性实验数据
Table 2 Results of stability

时间(h)	0	1	2	3	4	5	6	峰面积 平均值	RSD (n=6, %)
峰面积	620095	615720	614876	617109	615182	616824	620095	616634	0.31

2.3 精密度实验

精密吸取供试品溶液,按上述色谱条件,连续进样6次,记录峰面积,牛磺酸的峰面积平均值为606844, RSD=0.17%(n=5)(表3)。

表3 精密度实验
Table 3 Results of precision

次数	0	1	2	3	4	5	6	峰面积 平均值	RSD (n=6, %)
峰面积	607013	608741	606552	606234	605680	606844	607013	606844	0.17

2.4 重复性实验

取同一批样品6份,精密称定,按1.4.2项下方法操作,依法显色,进样测定,样品中牛磺酸含量为41.20mg/100g(n=6), RSD为1.92%(n=6)。结果见表4。

表4 重复性实验结果(n=5)
Table 4 Results of reproducibility

次数	1	2	3	4	5	6	平均值 (mg/100g)	RSD (n=6, %)
含量(mg/100g)	39.37	41.11	40.97	40.47	39.32	39.97	40.20	1.92%

2.5 加样回收率实验

取已知含量的牛初乳营养粉5g,共5份,精密称取,分别精密加入101.7 μ g/ml牛磺酸对照品溶液10ml,按2.2项下操作制备溶液,在上述色谱条件下测定,计算回收率,牛磺酸的平均回收率为99.6%, RSD=2.0%(n=5)。

2.6 样品测定

取3批供试品(生产日期分别为20040204、20040205、

20040206),每批三份,分别按1.4.2项下操作制成供试品溶液,依上述色谱条件测定,结果见表5。

3 讨论

表5 样品含量测定结果

生产日期	平均含量(mg/100g)	RSD (%)
20040204	43.99	1.40
20040205	46.13	0.89
20040206	40.28	1.61

3.1 样品预处理方法的考察

3.1.1 沉淀试剂的选择

分别使用10g/L偏磷酸溶液、60g/L磺基水杨酸溶液与15g/L硫酸锌溶液等不同的试剂进行沉淀。结果表明,15g/L硫酸锌溶液的效果最好。实验确定,在溶液pH4~5时,沉淀较完全,离心后沉淀与样液分离彻底。

3.1.2 提取时间的考察

结果表明,超声15min后,延长超声时间,牛磺酸的提取率没有明显差异。

3.2 流动相的筛选

对乙腈-0.05mol/L醋酸钠溶液(35:65)、甲醇-0.05mol/L醋酸钠溶液(37:63)等不同流动相系统进行考察。结果表明,流动相为乙腈-0.05mol/L醋酸钠溶液(35:65)时,供试品溶液中牛磺酸的色谱峰峰形好,与2,4-二硝基氟苯及其他峰能达到基线分离,不拖尾。

参考文献:

- 王晓洁.牛磺酸与儿童发育[J].中国学校卫生,1998,19(1):11.
- GB 14880-94 食品营养强化剂使用卫生标准[S].
- GB/T5413.26-1997 婴幼儿配方食品和乳粉牛磺酸的测定[S].
- 杨素珍,王淑华.高效液相色谱柱前衍生法测定食品中的牛磺酸[J].食品工业科技,2002,23:68-69.
- 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(1):43-48.
- 张志国,刘宁,贾云虹,等.采用HPLC法柱前衍生检测乳粉中的牛磺酸[J].食品与发酵工业,2004,30(9):100-103.
- 李占胜,张家麟,王家伟,等.高效液相色谱法测定乳粉中牛磺酸[J].肉类卫生,1996(5):17-19.