

柱前衍生毛细管电色谱-电致化学发光法检测 功能饮料中的牛磺酸

田欣 周敏 谢琳 白德霞 朱苗苗 马永钧*

(西北师范大学化学化工学院, 甘肃省生物电化学与环境分析重点实验室, 兰州 730070)

摘 要 采用新型多羟基化富勒烯@二氧化硅@氧化铈@羟基磷灰石四元纳米粒子/交联壳聚糖内饰毛细管开管柱(QNPSC-OTCC)作为分析柱,建立了一种柱前衍生毛细管电色谱-电致化学发光联用技术(CEC-ECL)高选择性定量检测功能饮料中牛磺酸(TAU)的方法。结果表明,在 *N*-甲基化衍生反应中加入六次甲基四胺作为助催化剂,可将 TAU 定量转化为可发光检测的单一衍生产物,采用联吡啶合钌 ECL 法进行检测,TAU 衍生物的峰强度相比未衍生的 TAU 增敏 1000 倍以上。采用含钌 d-f 杂金属氰桥配位聚合物复合修饰铂电极作为 ECL 检测电极,TAU 衍生物的 ECL 峰强度比传统裸铂电极增敏 5.7 倍。在优化的测试条件下,采用内标法,选用盐酸倍他司汀(BSH)作为内标物与 TAU 同步衍生后进行测定,这两种衍生产物的发光峰高比值与 TAU 浓度在 0.2~6.0 mmol/L 和 6.0~10.0 mmol/L 两段范围内分别呈良好的线性关系,检出限($S/N=3$)为 0.09 mmol/L。将本方法用于 4 种市售功能饮料中 TAU 的测定,相对标准偏差(RSD)小于 0.9%,加标回收率在 95.0%~102.0%范围内,显示出良好的实际应用性能。

关键词 毛细管电色谱; 电致化学发光; 柱前衍生反应; 牛磺酸

牛磺酸(Taurine, TAU)即 2-氨基乙磺酸,是人体内一种重要的非蛋白含硫氨基酸,动物和人类的大脑、肌肉以及软骨发育都与 TAU 的代谢过程密切相关^[1],当人体内缺乏 TAU 或其代谢功能失调时,可导致视网膜退化及幼儿脑神经细胞发育缓慢^[2-3]。人体对 TAU 的生物合成能力有限,在饮食中补充 TAU 可以强健肌肉、改善心肌收缩力、预防心律不齐和动脉粥样硬化症、保持肝功能旺盛和促进糖类等营养物质代谢水平,在抗炎、抗衰老、治疗糖尿病和神经失调方面具有良好的效果^[4-10]。1994 年,我国正式颁布了有关 TAU 的食品营养添加剂使用的国家标准^[11]。近年来,TAU 作为有效组分已被普遍添加在不同功能型饮料中用于维持人体运动能力及抗疲劳^[12-13],然而,随着含有 TAU 成分的各种保健食品和滋补品不断进入消费市场,过量摄入 TAU 所导致的健康风险也不断增大^[14-15]。因此,为了有效监控这类商品中 TAU 的实际添加剂量,开发一种快速、简便、准确检测 TAU 含量的分析方法具有重要的现实意义。

目前,测定功能饮料中 TAU 的分析方法主要分为两类:第一类方法包括荧光光谱法^[16-17]、傅里叶变换红外光谱法^[18-19]、核磁共振法^[20]、电化学分析法^[21]和电致化学发光法(ECL)^[22]等,这类方法无须对样品组分进行预先分离,利用分析技术本身的选择性测定 TAU,检测灵敏度高,操作简便,但基底干扰不易消除,对复杂样品测定的准确度较差;第二类方法包括液相色谱法^[23-25]、液相色谱-质谱联用分析法^[26]、毛细管电泳法和微芯片电泳分析法^[27-31]等,这类方法需要对样品进行预分离,再利用不同检测方法对 TAU 进行检测,可进行复杂样品中多种成分的同时测定,但其样品前处理过程比较繁琐,仪器价格和人工成本偏高。近年来,基于毛细管柱的电动色谱分析方法得到了长足的发展,具有低成本、高柱效、纳升级进样量和多样化检测器联用等优势。修饰毛细管开管柱(OTCC)是电动色谱分离技术最适用的分析柱类型^[32],研究者将具有相分配作用的纳米级固定相物质修饰于分离毛细管柱内壁形成修饰型开管分析柱,采用高压电场产生的电渗流作为流动相驱动力,开发了毛细管电色谱(CEC)分析技术^[33-34]。

2024-01-23 收稿; 2024-05-29 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 21862019, 22166032)资助。

* E-mail: mayj@nwnu.edu.cn

CEC 分析技术的进样量仅为纳升级,对柱后联用检测器的灵敏度要求极高,而基于联吡啶合钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) ECL 原理的检测器可满足该要求。

利用 ECL 检测试剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 建立低成本、高选择性和高灵敏的分析方法用于测定多种重要生物分子具有广阔的应用前景^[35],而将毛细管电泳(CE)分离技术与 ECL 检测器联用所建立的 CE-ECL 分析方法已经得到广泛应用^[36]。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与有机胺之间的共化学发光反应与有机胺的氨基类型有关,相同浓度水平条件下,有机胺的共发光信号强度通常按照叔胺>仲胺>伯胺的顺序依次递减^[37]。由于 TAU 分子中仅有伯胺基团,且共存的强吸电子乙磺基也会极大地削弱共发光反应中间体之间的能量转移效率,因此 TAU 须经过 *N*-甲基化衍生反应将其分子中的伯胺基转化为叔胺基后,才能进一步提高 ECL 检测的灵敏度。已有研究报道采用甲醛作为衍生试剂对非蛋白氨基酸进行柱前 *N*-甲基化衍生,并采用 CE-ECL 法测定西瓜瓢中瓜氨酸的含量^[38],但此衍生反应中存在的过量甲醛通常也会生成具有 ECL 响应的甲基胺类杂质干扰峰。研究发现,引入六次甲基四胺(HMTA)作为 *N*-甲基衍生反应的助催化剂,可以使 TAU 仅生成可进行发光检测的单一衍生产物。此外,在这种间歇性添加 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 检测试剂的 ECL 检测池中,长时间连续测定时发光检测信号会因池内检测试剂的浓度贫化效应及进样物质对检测试剂的持续污染而略微下降。为有效消除这些不良影响,可选用含有仲胺结构的盐酸倍他司汀(BSH)作为内标物,将 BSH 与 TAU 同步进行柱前 *N*-甲基化衍生,并以二者的相对峰高比值作为定量参数建立内标分析法,可同时消除柱前衍生反应条件变化以及检测池内检测试剂的浓度贫化效应和污染效应对 TAU 测定准确度的不良影响。

本研究将具有相分配作用的纳米级固定相材料(包括多羟基化富勒烯、二氧化硅、氧化钪和羟基磷灰石纳米粒子)经交联壳聚糖固定在石英毛细管内壁上,形成新型修饰开管柱(QNPsC-OTCC),并使用此分析柱建立了柱前 *N*-甲基化衍生毛细管电色谱-电致化学发光联用技术(CEC-ECL)测定 TAU 的通用分析新方法。本研究还改进并制备了一种含钌 d-f 杂金属氰桥配位聚合物(d-f CyHMCPs)修饰铂电极,以替代裸铂电极作为 ECL 检测电极,极大地提高了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 的灵敏度与稳定性,可以满足对市售相关饮料样品中的 TAU 进行常规检测的实际要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MPI-A 型毛细管电泳电化学发光检测仪(西安瑞迈电子科技有限公司);PB-10 型酸度计(德国 Sartorius 仪器有限公司);熔融石英毛细管($50\text{ cm}\times 75\text{ }\mu\text{m}$ i.d,河北永年光导纤维厂);CHI 660E 电化学工作站(上海辰华仪器公司)。化学发光检测器三电极系统由 Ag/AgCl (0.1 mol/L KCl)参比电极、铂丝辅助电极和 d-f CyHMCPs 修饰铂或裸铂工作电极($\varphi=0.3\text{ mm}$)组成。

TAU(>99.0%)、BSH(>99.0%)、壳聚糖(脱乙酰度>95.0%)、(2-羟丙基)- γ -环糊精(HGC)(干基含量>98%)、*N,N*-二甲基甘氨酸(>99.0%)和 HMTA(分析纯)购自上海阿拉丁生化科技有限公司;多羟基富勒烯(>95.0%,平均粒度约 20 nm)购自西安瑞禧生物科技有限公司;纳米羟基磷灰石($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$,>99.0%,平均粒度约 20 nm)、纳米 SiO_2 (含量>99.0%,平均粒度约 30 nm)和纳米 Tm_2O_3 (含量>99.0%,平均粒度约 50 nm)购自北京德科岛金科技有限公司;甘氨酸(含量>99.0%)购自天津市远航化学品有限公司;六水合二氯联吡啶钌(含量>98.0%)和肌氨酸(含量>99.0%)购自北京百灵威科技有限公司。其它试剂均为分析纯;实验用水均为二蒸馏次水。

1.2 实验方法

1.2.1 内饰毛细管开管柱的制备方法

采用多羟基化富勒烯@二氧化硅@氧化钪@羟基磷灰石四元纳米粒子/交联壳聚糖内壁修饰毛细管开管柱($(\text{OH})_n\text{-C}_{60}\text{@SiO}_2\text{@Tm}_2\text{O}_3\text{@Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})/\text{Cross-linked chitosan coating-OTCC}$, QNPsC-OTCC)作为分析柱。参考文献^[38]的方法并加以修改进行毛细管修饰。(1)在新毛细管内注入 0.25 mol/L NaOH 溶液处理 0.5 h,用水冲洗;(2)注入含 10 mmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)、 10 mmol/L 硼酸、 10 mmol/L 醋酸钠、总浓度 2.0 mmol/L 的吡啶和顺-4-环己烯-1,2-二羧酸的混合溶液(摩尔比为 2:3)和 1.1 mmol/L 戊二醛的多元混合溶液,室温下静置 50 min;(3)在毛细管中注入经超声分散处理的含 0.8 mg/mL 壳聚糖及

四元纳米粒子复合物(总质量浓度为 0.9 mg/mL, $(\text{OH})_n\text{-C}_{60}\text{:SiO}_2\text{:Tm}_2\text{O}_3\text{:Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})=2:1:1:1$, 质量比)的 1.0%(V/V)稀冰醋酸溶液,使其均匀粘附在毛细管内壁上,在室温条件下静置 1 h 后,用高纯氦气吹扫排空管内液体,再将其置于 85 °C 烘箱中加热 90 min; (4)在毛细管内依次注入 1.0 mol/L 甲醛溶液和 0.01 mol/L NaOH 溶液,分别停留 10 s 后排空,置于 65 °C 烘箱中热处理 10 min,取出冷却至室温,即制成 QNP_sC-OTCC 修饰柱。

1.2.2 含钌 d-f 杂金属氰桥配位聚合物修饰铂工作电极的制备

采用掺铈类普鲁士蓝(Eu-PBAs)化学修饰铂电极作为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电致化学发光检测电极^[39],信号检测效果良好,但这种材料的耐碱性略差。本研究参照制备 d-f CyHMCPs 修饰电极的常规方法^[40],采用 $\text{Ru}(\text{CN})_6^{4-}$ 代替 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 作为氰桥供体、 Fe^{2+} 代替 Fe^{3+} 、三氨基嘧啶作为稀土离子配体,经电沉积制备含钌 d-f 杂金属氰桥配位聚合物修饰铂工作电极(d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs/Pt)。将裸 Pt 盘电极(直径 $\phi=0.3$ mm)依次用 0.3 及 0.05 μm 的 Al_2O_3 悬浊液抛光至镜面,再将此电极依次在无水乙醇和水中分别超声清洗各 2 min,最后用水冲洗。将电极先置于含 1.0 mmol/L 茚三酮、1.0 mmol/L 甘氨酸和 0.1 mol/L PBS (pH 8.44)的电镀液中(使用前在 53 °C 加热反应 47 min,生成茚三酮-甘氨酸胺合物),在 1.80 ~ -1.00 V 电位区间内,采用循环伏安法(CV),以 0.075 V/s 扫速循环扫描 5 圈进行底膜修饰^[41]。取出用水淋洗后,置于含稀土离子等成分的专用电镀液中,在 0.60 ~ -0.25 V 电位区间内以 0.017 V/s 扫速循环扫描 6 圈,制成 d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs 修饰膜。最后,将电极置于含 40 $\mu\text{mol/L}$ 磺基水杨酸(0.25 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液, pH=8.14)的电解液中,再采用 CV 法在 -0.65 ~ 1.80 V 电位区间内以 0.080 V/s 扫速循环扫描 3 圈,电聚合形成的聚磺基水杨酸外膜作为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的富集吸附层^[42]。制成的修饰电极置于 0.20 mol/L 氯乙酸缓冲溶液中,在 0 ~ 1.00 V 电位区间以 0.20 V/s 扫速循环扫描 10 圈,以清洗电极表面未聚合的吸附物质。制备 d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs 修饰膜专用电镀液的主要化学成分为 Eu^{3+} (10.0 mmol/L, 0.14 mL)、三氨基嘧啶(10.0 mmol/L, 0.09 mL)、氯乙酸-NaOH 缓冲溶液(0.2 mol/L, 5.00 mL)、曲拉通(1.0%, 1.40 mL)、 KNO_3 (0.50 mol/L, 1.15 mL)、 $\text{Ru}(\text{CN})_6^{4-}$ (10.0 mmol/L, 0.42 mL)、 Fe^{2+} (10.0 mmol/L, 2.25 mL)和葡萄糖酸钾(10.0 mmol/L, 0.14 mL),将相关溶液混合后调节 pH=2.62,再加入 CrO_4^{2-} (10.0 mmol/L, 0.07 mL),用水定容于 25 mL 比色管中,备用。

1.2.3 分析测试参数设置

检测池内液组成为 5.0 mmol/L $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和 130 mmol/L PBS 缓冲溶液(pH=6.00)。为确保实验的重现性,在连续进行实验 4 h 后须更换检测池内含 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的试液。流动相背景电解质组成为 1.6 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH=8.2)、7.0 mmol/L 三聚磷酸钠(STPP)、1.5 mmol/L 十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、22.4 $\mu\text{mol/L}$ HGC 和 0.3 % (V/V) 甲醇。光电倍增管高压为 865 V,电动进样高压为 11500 V,进样时间为 10 s,毛细管分离高压为 15000 V。

开始实验前需用运行清洗液(含 3.0 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH=8.0), 1.0 mmol/L STPP, 1.0 mmol/L SDS, 1.0% (V/V) 甲醇)清洗毛细管柱 600 s,以保证实验结果的重现性。所有进入毛细管内部的溶液须经 0.45 μm 醋酸纤维素膜过滤处理后使用。

1.2.4 溶液配制与柱前衍生反应步骤

分别配制 10.0 mmol/L 的 TAU 和 BSH 标准储备液,于 4 °C 保存备用,使用时稀释至所需浓度。优化实验条件时,以 1.00 mmol/L TAU-0.10 mmol/L BSH 混合液作为测试样液。

依据文献^[38]的方法,通过优化实验确定柱前衍生 TAU 的最佳反应条件。在 10 mL 比色管中加入 1.50 mL PBS 缓冲溶液(0.5 mol/L, pH=6.00),再准确加入适量试样(保持样品的总体积 < 2.5 mL),最后加入 0.75 mL 1.0 mol/L 甲醛溶液和 0.20 mL 混合催化剂溶液(0.10 mol/L 吡啶, 0.15 mol/L 顺丁烯二酸),加水稀释至 5.0 mL,于室温下反应 60 min。在以上比色管中加入 1.5 mL 0.20 mol/L 的 NaOH 溶液,摇匀,放入 60 °C 恒温水浴中反应 50 min; 依次加入 1.2 mL 0.20 mol/L 硼氢化钠(含 1.67 mmol/L HMTA)、0.25 mL 0.10 mol/L 氯化铵和 1.0 mL 0.20 mol/L 硼酸,这 3 种试剂间隔加入的反应时间依次为 30、10 和 10 min。以水定容后,将此反应液吸出,经滤膜过滤后进样测定。

功能饮料样品参考其标示值以水适当稀释或直接取样,在多只比色管中各加入确定量的试样原液和

BSH 标准溶液,再分别加入不同量的 TAU 标准溶液,同步进行衍生反应,对此系列衍生样品进行测定,依据其相对峰高比值,采用标准加入法计算样品中 TAU 的含量。

2 结果与讨论

2.1 TAU 和 BSH 衍生物的色谱分离特性

选择 QNP_sC-OTCC 作为分析柱对衍生反应前后 TAU 标准样品(含内标物 BSH)进行色谱分离。如图 1 所示,曲线 a 是未经衍生反应的 TAU 和 BSH 混合样品的色谱图,在 165 s 处仅出现 1 个小峰,与 BSH 纯品对照,可确定此峰为未衍生的 BSH 信号峰,说明未衍生的 TAU 无响应峰;曲线 b 为经衍生反应后混合样的色谱图,确定 167 s 处的峰为 BSH 衍生物的信号峰,296 s 处的峰对应 TAU 衍生物。对比曲线 a 和曲线 b 可知,分子中具有仲胺基团的未衍生的 BSH 仅有微弱的 ECL 信号,而衍生后的 BSH 的 ECL 信号增强约 18 倍;尽管含伯胺基团的 TAU 在常规修饰电极上能产生可检测的 ECL 共发光响应信号^[22],而以纳升级进的 CEC-ECL 法无法直接检出 TAU 信号,但 TAU 经柱前衍生后检出的 ECL 响应信号增强了 1162 倍。此时,混合样中 2 个衍生物的色谱峰峰形对称,无杂峰出现,相互之间分离良好。推测此衍生反应机理应为 TAU 和 BSH 分子中的氨基均发生了完全的 *N*-甲基化反应。

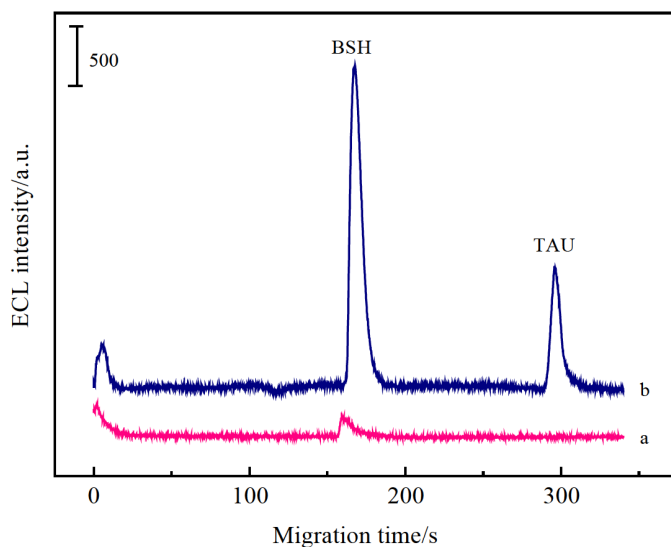


图1 牛磺酸(TAU)和盐酸倍他司汀(BSH)混合标样衍生反应前(a)后(b)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of a mixed standard sample containing taurine (TAU) and betahistidine hydrochloride (BSH) before (a) and after (b) derivatization reaction

为确证上述反应机理,采用同样的衍生条件,将 0.10 mmol/L 的甘氨酸(Gly)、*N,N*-二甲基甘氨酸和肌氨酸(Sar)分别加入 BSH 内标物进行 *N*-甲基化衍生反应,对其衍生前后的体系采用 CEC-ECL 法进行测定,结果列于表 1。未衍生的 3 种氨基酸中只有含叔胺基的 *N,N*-二甲基甘氨酸检出发光信号峰,经衍生反应后,其色谱峰的迁移时间和峰强度值变化均较小,说明含叔胺结构的 *N,N*-二甲基甘氨酸并不发生衍生反应;含有 *N*-甲基仲氨基团的 Sar 和含有伯氨基的 Gly 在分子结构上与 *N,N*-二甲基甘氨酸各相差 1 个和 2 个 *N*-甲基。实验结果表明, Gly 和 Sar 衍生前虽无 ECL 信号峰,而衍生后都出现了色谱峰,但迁移时间相近,而且其峰高值与 BSH 内标衍生物的相对峰高值也完全相同,表明 Gly 和 Sar 衍生的最终产物都为 *N,N*-二甲基甘氨酸(表 1 中 *N,N*-二甲基甘氨酸的相对峰高比)。由此可知,经衍生反应后, Gly 和 Sar 分子中的伯胺基和单甲基仲氨基团都完全甲基化,转化为 *N,N*-二甲叔氨基团,这也充分验证了 *N*-甲基化反应可将 TAU 含有的伯氨基定量转化为叔胺基的可行性,同时为建立 CEC-ECL 法定量分析 TAU 提供了理论依据。

表 1 甘氨酸(Gly)、肌氨酸(Sar)及*N,N*-二甲基甘氨酸衍生反应前后的电致化学发光(ECL)峰参数
Table 1 Electrochemiluminescence (ECL) peak parameters of glycine (Gly), sarcosine (Sar) and *N,N*-dimethylglycine before and after derivatization reaction

被测物质 Analyte		甘氨酸 Gly	肌氨酸 Sar	<i>N,N</i> -二甲基甘氨酸 <i>N,N</i> -Dimethylglycine
化学式 Chemical formula		H ₂ NCH ₂ COOH	H ₃ CNHCH ₂ COOH	(H ₃ C) ₂ NCH ₂ COOH
衍生反应前 ECL 峰参数 ECL peak parameters before derivative reaction	峰高比 ^a Peak height ratio ^a	N.D.	N.D.	312/98
	迁移时间 Migration time (s)	N.D.	N.D.	53.4
	相对峰高比 ^b Relative peak height ratio ^b	0.326	0.326	0.323
衍生反应后 ECL 峰参数 ECL peak parameters after derivative reaction	迁移时间 Migration time (s)	53.2	50.2	53.2

注: ^a表示与未衍生BSH峰高相比; ^b表示与衍生BSH 峰高相比; N.D., 未检出。
Note: ^a and ^b mean comparison with ECL peak height of the underived and derived BSH, respectively; N.D. means not detected.

2.2 含钌 d-f 杂金属氰桥配位聚合物修饰铂工作电极的响应性能

采用 0.14 mol/L PBS (pH=6.00) 配制含不同浓度 Ru(bpy)₃²⁺ 的测试液, 分别考察其在裸铂电极以及 d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs/Pt 修饰电极上的 CV 行为。如图 2A 所示, 裸铂电极在阳极化区间内出现 1 对可逆的 CV 信号峰, 其外形较平缓, Ru(bpy)₃²⁺ 浓度变化对峰电流的影响较小; 在 d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs/Pt 修饰电极上, 此峰电流相比裸铂电极明显增大了 1.45 倍, 且对应的氧化-还原反应过程的峰电流比值 (*i*_p^a/*i*_p^c) 略大于 1, 表明修饰电极对 Ru(bpy)₃²⁺ 具有显著的电催化氧化活性。分别将裸电极和修饰电极作为 ECL 检测电极, 用于 TAU 及 BSH 内标物混合样的柱前衍生 CEC-ECL 分析, 其色谱信号响应如图 2B 所示。采用裸电极检测时(曲线 a), TAU 和 BSH 衍生物的 ECL 峰强度均较弱, 色谱图的基线也比较倾斜; 采用修饰电极检测时(曲线 b), TAU 和 BSH 衍生物的 ECL 峰强度均极大增强, TAU 和 BSH 的发光峰高分别增大了 5.7 和 3.5 倍, 且基线平直、峰形对称。此结果表明, 采用复合修饰铂电极作为检测电极时, 由于铂电极上的复合修饰材料对发光试剂 Ru(bpy)₃²⁺ 既具有电催化活性, 又具有表面富集作用, 二者协同, 极大地增强了 ECL 检测器的绝对灵敏度, 并具有检测信号稳定、响应速度快的优点。

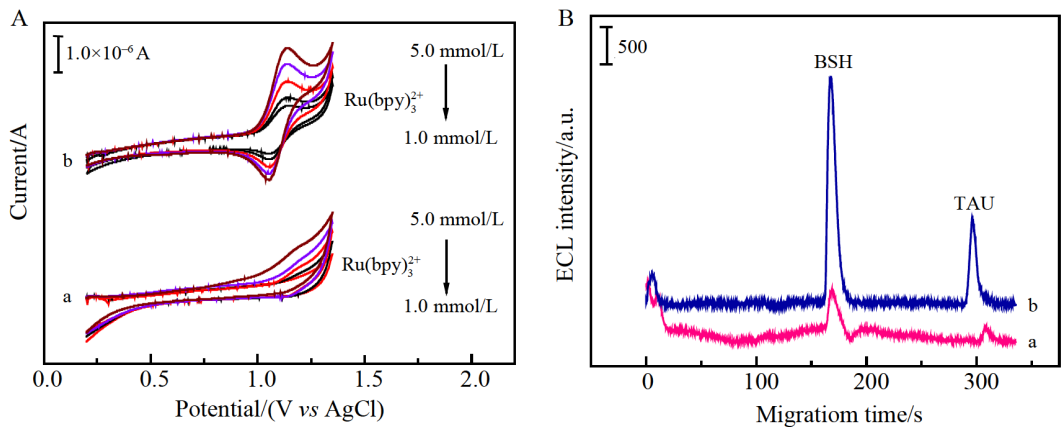


图2 分别使用裸铂电极(a)和 d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs/Pt 修饰电极(b)作为检测电极时,不同浓度的 Ru(bpy)₃²⁺的循环伏安图(A)以及TAU 和 BSH 混合衍生试样的色谱图(B)
Fig.2 (A) Cyclic voltammograms of different concentrations of Ru (bpy)₃²⁺ and (B) chromatograms of a mixed samples containing TAU and BSH derivatives when using a bare Pt electrode (a) and a d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs modified platinum electrode (d-f Eu-Fe-Ru CyHMCPs/Pt) (b) as detection electrode, respectively

2.3 流动相背景电解质成分的优化

在传统毛细管电泳操作模式下,采用开管柱作为分离柱时,背景电解质成分对待测物的分离有较大影响,其中,无机盐、表面活性剂和环糊精类添加剂都是不可或缺的化学组分。本研究采用多元纳米粒子修饰的 QNPsC-OTCC 开管分析柱,在毛细管柱内壁上修饰了具有相分配作用的纳米粒子,在 CEC 分离模式下,流动相背景电解质中不仅需要添加促进分离效果的成分,还需要添加一些具有增强电渗作用的添加剂(如三聚磷酸钠等)。参照文献[38],经大量实验筛选得到主要组成成分为硼砂缓冲溶液+STPP+SDBS+HGC 的背景电解质(具体加入量见 1.2.3 节),其中,STPP 具有显著增大电渗流的作用,而 HGC 可明显改善 TAU 衍生物色谱峰的峰形。对 STPP 和 HGC 浓度进行优化的结果分别如图 3A 和 3B 所示,当背景电解质中 STPP 和 HGC 的浓度发生改变时,TAU 和 BSH 两种衍生产物的 ECL 峰强度有同步变化的趋势。以响应峰的相对峰高比为定量参数(内标法原理),可部分校正因背景电解质成分比例波动引起的随机测量误差。

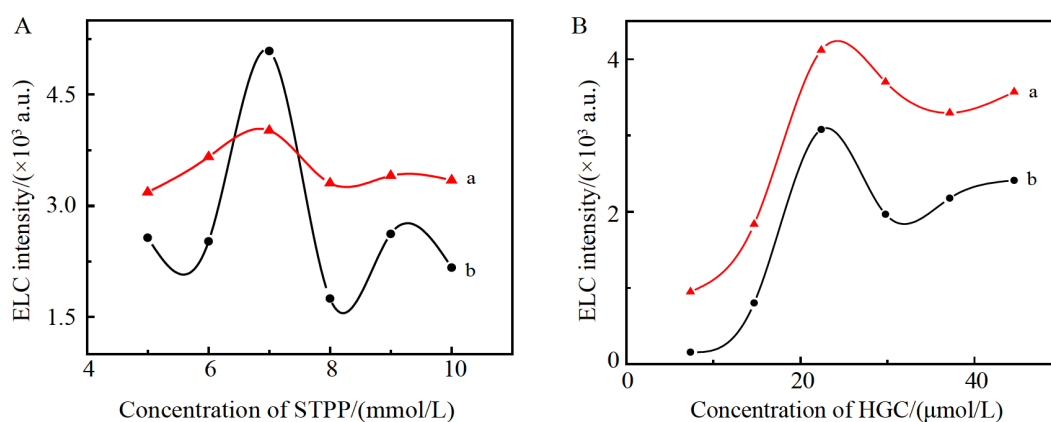


图3 背景电解质中三聚磷酸钠(STPP)和 2-羟丙基- γ -环糊精(HGC)的添加浓度对(A)TAU 和(B)BSH 衍生产物 ECL 峰强度的影响

Fig.3 Effects of the added STPP and HGC concentration in background electrolyte solution on ECL peak intensity of (A) TAU and (B) BSH derivatives

2.4 测定 TAU 的工作曲线

采用柱前衍生 CEC-ECL 法测定 TAU,并采用内标法保证方法的准确度。将内标物 BSH 与 TAU 同步进行柱前 *N*-甲基化衍生,以 BSH 与 TAU 的相对峰高比作为定量参数可抵消因衍生反应条件波动造成的误差。在间歇性添加 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 检测试剂的 ECL 检测池中,待测物的 ECL 信号会因池内检测试剂的浓度贫化效应及进样物质对检测试剂的持续性污染而略微下降,采用内标法也可消除上述不良影响。采用内标法测定不同浓度 TAU 的色谱图如图 4A 所示,待测物 TAU 和内标物 BSH 衍生产物的峰形单一且对称,2 个峰迁移时间相差大于 100 s。在 0.2~6.0 mmol/L 和 6.0~10.0 mmol/L 浓度区间内,TAU 初始浓度(C_{TAU})与其衍生产物的相对峰高比值呈线性关系(图 4B),线性回归方程分别为 $I_{\text{TAU}}/I_{\text{BSH}}=827.5C_{\text{TAU}}+0.3126$ ($R^2=0.9960$)和 $I_{\text{TAU}}/I_{\text{BSH}}=458.0C_{\text{TAU}}+2.589$ ($R^2=0.9930$),检出限($S/N=3$)为 0.09 mmol/L。本方法的分析性能与文献[29,31]报道的采用毛细管电泳法测定 TAU 的分析性能相近。此外,将 TAU 标样衍生后平行测定 7 次,相对峰高比值的相对标准偏差(RSD)仅为 0.9%,TUA 迁移时间的 RSD 为 0.8%,表明本方法的日内测量精密度良好。

2.5 实际样品分析

市售功能性饮料购自当地超市。采用内标标准加入法测定,未发现严重的共存基底物质干扰,因此饮料样品无需前处理即可直接取样进行衍生。对 4 种不同含量规格的功能饮料中 TAU 的含量检测结果见表 2,检测结果与产品标示值相符,加标回收率在 95.0%~102.0% 范围内,表明本方法检测实际样品的效果良好。

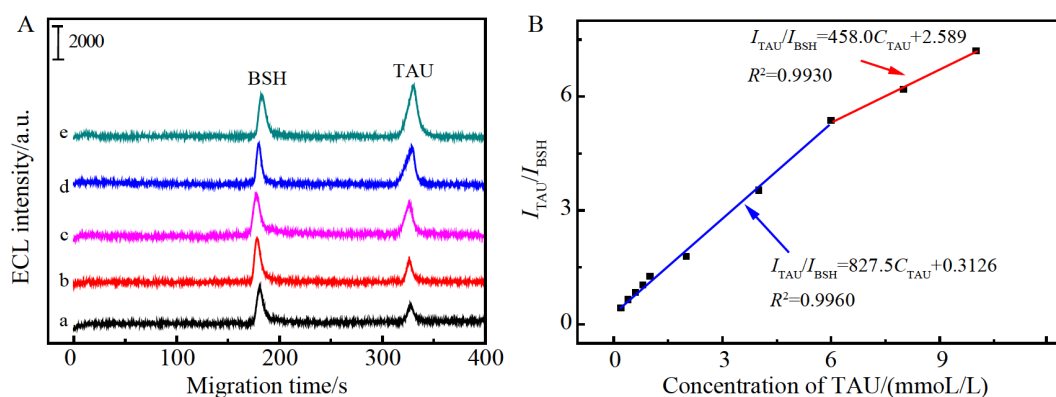


图4 (A)不同浓度TAU标样(a. 2.0 mmol/L; b. 4.0 mmol/L; c. 6.0 mmol/L; d. 8.0 mmol/L; e. 10.0 mmol/L)衍生物的色谱图; (B)内标法检测TAU的校正曲线

Fig.4 (A) Chromatograms of TAU derivatives with different concentrations of TAU standard (a. 2.0 mmol/L; b. 4.0 mmol/L; c. 6.0 mmol/L; d. 8.0 mmol/L; e. 10.0 mmol/L); (B) Calibration curve of internal standard method for detection of TAU

表2 实际功能饮料样品中TAU含量的测定结果

Table 2 Detection results of TAU contents in real functional drinking samples ($n=3$)

样品 Sample	测得值 Found/ (mmol/L)	加标值 Spiked/ (mmol/L)	总测得值 Total found/ (mmol/L)	测得含量 Found content/ (mg/100 mL)	标示含量 Labeled content/ (mg/100 mL)	回收率 Recovery/ %
饮料1 Drink 1	3.96 ± 0.02	1.50	5.48 ± 0.02	49.6	50	101.0
饮料2 Drink 2	4.39 ± 0.03	1.50	5.89 ± 0.02	54.9	55	99.1
饮料3 Drink 3	12.4 ± 0.10	5.00	17.1 ± 0.08	154.0	150	95.0
饮料4 Drink 4	29.2 ± 0.12	10.00	39.4 ± 0.20	366.0	370	102.0

3 结论

TAU经完全N-甲基化衍生反应生成具有更强ECL信号的唯一可发光检测产物,在衍生反应中添加少量HMTA作为助催化剂即可消除过量甲醛试剂产生的甲基胺类杂质。此柱前衍生反应操作简单,反应液无需处理即可直接进样测定,分析成本低。此外,采用含钨d-f CyHMCPs修饰铂工作电极以替代传统的裸铂工作电极,可使柱前衍生ECL法检测TAU的灵敏度提高5倍以上,检测电极的工作寿命长。以多羟基化富勒烯@二氧化硅@氧化镁@羟基磷灰石四元纳米粒子/交联壳聚糖内饰毛细管开管柱为分析柱,实际样品中的TAU及内标物峰在400 s内可分离完全。所建立的柱前N-甲基化衍生CEC-ECL方法具有良好的通用性,可推广用于不同复杂基底的食品样品中TAU的高选择性测定。

References

- [1] PÉREZ-HERNÁNDEZ E, PASTRANA-CARBALLO J J, GÓMEZ-CHÁVEZ F, GUPTA R C, PÉREZ-HERNÁNDEZ N. *Endocrinol. Metab.*, 2022, 37(4): 559-574.
- [2] FROGER N, MOUTSIMILLI L, CADETTI L, JAMMOUL F, WANG Q P, FAN Y, GAUCHER D, ROSOLEN S G, NEVEUX N, CYNOBER L, SAHEL J A, PICAUD S. *Prog. Retinal Eye Res.*, 2014, 41: 44-63.
- [3] STAPLETON P P, CHARLES R P, REDMOND H P, BOUCHIER-HAYES D J. *Clin. Nutr.*, 1997, 16(3): 103-108.
- [4] WEN C, LI F, ZHANG L, DUAN Y, GUO Q, WANG W, HE S, LI J, YIN Y. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2019, 63(2): 1800536.
- [5] QARADAKHI T, GADANEC L K, MCSWEENEY K R, ABRAHAM J R, APOSTOLOPOULOS V, ZULLI A. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2847.
- [6] SANTULLI G, KANSAR U, VARZIDEH F, MONE P, JANKAUSKAS S S, LOMBARDI A. *Nutrients*, 2023, 15(19): 4236.
- [7] SARKAR P, BASAK P, GHOSH S, KUNDU M, SIL P C. *Food Chem. Toxicol.*, 2017, 110: 109-121.
- [8] MURAKAMI S. *Amino Acids*, 2014, 46(1): 73-80.

- [9] JAKARIA M, AZAM S, HAQUE M E, JO S H, UDDIN M S, KIM I S, CHOI D K. *Redox Biol.* , 2019, 24: 101223.
- [10] SCHAFFER S W, ITO T, AZUMA J. *Amino Acids*, 2014, 46(1): 1-5.
- [11] GB 14880—94. Hygienic Standard for the Use of Nutritional Fortification Substances in Foods. National Standards of the People's Republic of China.
食品营养强化剂使用卫生标准. 中华人民共和国国家标准. GB 14880—94.
- [12] CHABAN R, KORNBERGER A, BRANSKI N, BUSCHMANN K, STUMPF N, BEIRAS-FERNANDEZ A, VAHL C F. *BMC Cardiovasc. Disord.* , 2017, 17(1): 220.
- [13] PICCIONI A, COVINO M, ZANZA C, LONGHITANO Y, TULLO G, BONADIA N, RINNINELLA E, OJETTI V, GASBARRINI A, FRANCESCHI F. *Intern. Med. J.* , 2021, 51(5): 636-646.
- [14] KAUR A, YOUSUF H, RAMGOBIN-MARSHALL D, JAIN R, JAIN R. *Rev. Cardiovasc. Med.* , 2022, 23(3): 083.
- [15] RUBIO C, CÁMARA M, GINER R M, GONZÁLEZ-MUÑOZ M J, LÓPEZ-GARCÍA E, MORALES F J, MORENO-ARRIBAS M V, PORTILLO M P, BETHENCOURT E. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5103.
- [16] ALNAJJAR A O, ELBASHIR A A, ELGORASHE R E, EBRAHIM A M, IDRIS A M, ABD EL-LATEEF H M. *J. Chem. Res.* , 2022, 46(5): 17475198221114760.
- [17] EL DIN M K S, WAHBA M E K S. *Luminescence*, 2015, 30(2): 137-143.
- [18] GONZÁLEZ-VÁZQUEZ M, MEZA-MÁRQUEZ O G, GALLARDO-VELÁZQUEZ T, OSORIO-REVILLA G, HERNÁNDEZ J L V, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ M. *J. Spectrosc.* , 2020, 2020: 8835846.
- [19] RÁCZ A, HÉBERGER K, FODOR M. *Anal. Bioanal. Chem.* , 2016, 408(23): 6403-6411.
- [20] HOHMANN M, FELBINGER C, CHRISTOPH N, WACHTER H, WIEST J, HOLZGRABE U. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , 2014, 93: 156-160.
- [21] FARAG A S, KLIKAROVÁ J, ČESLOVÁ L, VYTRÁS K, SÝS M. *Talanta*, 2019, 202: 486-493.
- [22] GUERRERO-ESTEBAN T, GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ C, REVENGA-PARRA M, PAU J L, PARIENTE F, LORENZO E. *Talanta*, 2019, 204: 63-69.
- [23] OMER M, OMAR M, THIEL A, ELBASHIR A. *Eurasian J. Anal. Chem.* , 2018, 13(5): em40.
- [24] GATTI R. *Chromatographia*, 2019, 82(12): 1833-1837.
- [25] MATSUDA M, ASANO Y. *Anal. Biochem.* , 2012, 427(2): 121-123.
- [26] RICCIUTELLI M, CAPRIOLI G, CORTESE M, LOMBARDOZZI A, STRANO M, VITTORI S, SAGRATINI G. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1364: 303-307.
- [27] KVASNIČKA F, RAJCHL A. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1645: 462075.
- [28] OPEKAR F, TŮMA P. *J. Sep. Sci.* , 2017, 40(15): 3138-3143.
- [29] VOCHYÁNOVÁ B, OPEKAR F, TŮMA P. *Electrophoresis*, 2014, 35(11): 1660-1665.
- [30] NGUYEN T D, NGUYEN M H, VU M T, DUONG H A, PHAM H V, MAI T D. *Talanta*, 2019, 193: 168-175.
- [31] GÖTZ S, REVERMANN T, KARST U. *Lab Chip*, 2007, 7(1): 93-97.
- [32] CHEONG W J, ALI F, KIM Y S, LEE J W. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1308: 1-24.
- [33] MAO Z, CHEN Z. *J. Pharm. Anal.* , 2019, 9(4): 227-237.
- [34] HU W, HONG T, GAO X, JI Y. *TrAC, Trends Anal. Chem.* , 2014, 61: 29-39.
- [35] SORNAMBIGAI M, BOUFFIER L, SOJIC N, KUMAR S S. *Anal. Bioanal. Chem.* , 2023, 415(24): 5875-5898.
- [36] LARA F J, AIRADO-RODRÍGUEZ D, MORENO-GONZÁLEZ D, HUERTAS-PÉREZ J F, GARCÍA-CAMPAÑA A M. *Anal. Chim. Acta*, 2016, 913: 22-40.
- [37] LI Hai-Juan, HAN Shuang, HU Lian-Zhe, XU Guo-Bao. *Chin. J. Anal. Chem.* , 2009, 37(11): 1557-1565.
李海娟, 韩双, 胡连哲, 徐国宝. *分析化学*, 2009, 37(11): 1557-1565.
- [38] YANG Ning, ZHOU Min, WANG Rong, LIU Fen, WANG Su-Xia, MA Yong-Jun. *J. Instrum. Anal.* , 2019, 38(4): 466-470.
杨宁, 周敏, 王荣, 刘芬, 王苏霞, 马永钧. *分析测试学报*, 2019, 38(4): 466-470.
- [39] ZHOU M, MA Y J, REN X N, ZHOU X Y, LI L, CHEN H. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 587(1): 104-109.
- [40] WANG S, ZHOU M, ZHU Y, PENG B, YANG J, MA Y. *J. Electrochem. Soc.* , 2020, 167(8): 086508.
- [41] HE C X, HOU L J, WANG Y. *Rev. Roum. Chim.* , 2022, 67(3): 207-216.
- [42] LU N, WANG W, CHEN X, CHEN Z. *Int. J. Electrochem. Sci.* , 2017, 12(5): 4035-4043.

Quantitative Determination of Taurine in Functional Drinks by Pre-Column Derivatization Capillary Electrochromatography Coupled with Electrochemiluminescence Detection

TIAN Xin, ZHOU Min, XIE Lin, BAI De-Xia, ZHU Miao-Miao, MA Yong-Jun*

(Key Laboratory of Bioelectrochemistry and Environmental Analysis of Gansu Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract Using a novel $(\text{OH})_n\text{-C}_{60}\text{@SiO}_2\text{@Tm}_2\text{O}_3\text{@Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ quaternary nano-particles/cross-linked chitosan coated open-tubular capillary column (QNPsC-OTCC) as the analytical column, a new method for highly selective determination of taurine (TAU) in functional drinks using pre-column derivatization capillary electrochromatography coupled with electrochemiluminescence (CEC-ECL) detection was established. In the experiments, it was found that adding hexamethylenetetramine as a co-catalyst in *N*-methylation derivative reaction could quantitatively convert TAU into a single derivative product that could be detected by ECL. With the help of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ reagent, the ECL peak intensity of TAU derivative was increased by more than 1000 times compared to the original TAU. In addition, a Ru-containing d-f cyano-bridged heterometallic coordination polymer modified platinum electrode was used instead of a bare platinum electrode as working electrode for ECL detection, which resulted in a further increase of the peak response of TAU derivatives about 5.7 times. Under optimized analytical conditions, by using betastatin hydrochloride (BSH) as the internal standard and simultaneously derivatized with TAU, the relative ratio of peak intensity of TAU and BSH derivatives showed a linear relationship with the initial TAU concentration in a two-segment ranges of 0.2–6.0 mmol/L and 6.0–10 mmol/L. The limit of detection of TAU was 0.09 mmol/L ($S/N=3$). The developed method was applied to determination of TAU contents in four commercial functional drink samples, and the relative standard deviations (RSDs) for relative intensity ratio were less than 0.9%, and the recoveries were in the range of 95.0%~102.0%, indicating good practicability of the method.

Keywords Capillary electrochromatography; Electrochemiluminescence; Pre-column derivatization; Taurine

(Received 2024-01-23; accepted 2024-05-29)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21862019, 22166032).