

doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2015.03.012

天然牛磺酸的离子色谱分析方法研究

邵文尧 邱隆辉 郭 静 胡超群

(厦门大学 化学化工学院 福建 厦门 361005)

摘 要:通过考察实验的稳定性、精确度及回收率等,研究不同氨基酸对牛磺酸检测的干扰,成功建立了离子色谱法分离牛磺酸梯度洗脱程序,探索出一种更高效、更快速、更灵敏的离子色谱检测方法。色谱柱为氨基酸分析柱(AminoPac PA-10 2 mm×250 mm)、氨基酸保护柱(AminoPac PA-10 2 mm×50 mm);流动相组成为流动相 A(纯水)、流动相 B(250 mmol/L NaOH 溶液)、流动相 C(1.0 mmol/L 乙酸钠(NaOAc)),进行梯度洗脱;流速为 0.24 mL/min;柱温为 30 ℃;采用积分脉冲安培检测器检测;进样量为 25 μL。该法优化了牛磺酸的检测时间,提高了牛磺酸的检测效率,可运用于实验和生产中。

关键词:牛磺酸;离子色谱;稳定性;精确度;回收率

中图分类号:Q819

文献标志码:A

文章编号:1672-3678(2015)03-0064-06

Rapid detection of taurine by ion chromatography

SHAO Wenyao, QIU Longhui, GUO Jing, HU Chaoqun

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A more efficient, more rapid and more sensitive ion chromatography detection program was established to detect taurine in experiment and production. The conditions were as follows: amino acid analysis column (AminoPac PA-10 2 mm×250 mm), amino acid protection column (AminoPac PA-10, 2 mm×50 mm), mobile phase (the mobile phase A was pure water, the mobile phase B was 250 mmol/L NaOH solution, the mobile phase C was 1.0 mmol/L sodium acetate (NaOAc)), gradient elution, flow rate (0.24 mL/min), column temperature (30 ℃), integrated pulsed amperometric detection with injection volume of 25 μL. We have successfully established the gradient elution program in ion chromatography to separate taurine. The present ion chromatography method for detection taurine was efficient, rapid, accurate and the detection time was greatly improved.

Keywords: taurine; ion chromatography; stability; precision; recovery

牛磺酸(taurine, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$)是一种含硫的非蛋白质结构氨基酸,氨基在β位,与普通氨基酸存在本质区别,具有很强的生物活性,被广泛应用于保健食品和医药领域^[1-3]。牛磺酸天然品除存在于牛胆汁中,还以游离形式分布于动物体的各组织、器官中,特别在肌肉组织、神经组织、视网膜中

含量较高,在海生动物中含量尤为丰富。目前,天然提取法是牛磺酸提取的发展新方向,但传统的天然提取法需要将水产原料软体部分打浆,水产品无法得到综合利用^[4-6]。我国海洋资源丰富,章鱼是其中一种应用甚广的水产品原料,然而在章鱼加工中,其下脚料通常都被遗弃。在这些下脚料中,游

收稿日期:2014-08-16

基金项目:国家自然科学基金(21406185)

作者简介:邵文尧(1980—),男,福建厦门人,硕士,工程师,研究方向:天然产物应用开发, E-mail: wyshao@xmu.edu.cn

离态天然牛磺酸的含量高达 1.03% ,是牛磺酸含量最高的水产品之一 ,且原料来源广泛、安全 ,具有较好的发展前景^[7]。近年来离子色谱在氨基酸检测方面已日臻成熟 ,分析速度快 ,通常几分钟至十几分钟 ;检测灵敏度高 ,检测限可达 $10^{-12} \sim 10^{-8}$ mmol/L^[8-9] ;选择性好 ,对于非离子性物质无保留 ;可以实现多离子同时分析 ;离子色谱柱的稳定性高 ,使用寿命长^[10-11]。

基于此 ,笔者以离子色谱法建立一种快速、高效、准确的天然牛磺酸定量检测方法 ,以此来跟踪分析海洋低值产品中天然牛磺酸的提取方法 ,用于章鱼加工副产物天然牛磺酸的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂

ICS-90 型离子色谱仪 ,美国戴安公司 ;5418 R 型冷冻离心机 ,Eppendorf 公司 ;超声波清洗器 ,昆山市超声仪器有限公司。

色谱柱 :氨基酸分析柱 (AminoPac PA-40 2 mm \times 250 mm)、氨基酸保护柱 (AminoPac PA-40 2 mm \times 50 mm) ;流动相 :流动相 A 为水、流动相 B 为 250 mmol/L NaOH 溶液、流动相 C 为 1.0 mmol/L 乙酸钠 (NaOAc) ,进行梯度洗脱 ;流速为 0.24 mL/min ;柱温为 30 $^{\circ}$ C ;检测方法为积分脉冲安培检测器 ;进样量为 25 μ L。

牛磺酸标准品购于 Sigma-Aldrich 公司。其他各种无机盐及试剂购自国药集团化学试剂有限公司 ,均为分析纯。

章鱼提取液 :取 3 kg 章鱼下脚料分多次用搅碎机进行绞碎处理 ,倒入玻璃加热釜 ,把相连着的热循环机加热设定到 80 $^{\circ}$ C ,同时开启循环设定 ,用电磁炉加热 12 L 纯水 ,加热到 90 $^{\circ}$ C 左右时倒入玻璃加热釜 ,待温度到达 80 $^{\circ}$ C 后打开旋转搅拌器 (150 r/min) ,搅拌 1 h。

1.1.2 标准品及样品溶液的制备

1) 标准品溶液的配制 称取牛磺酸标准品 0.5 g 于 100 mL 容量瓶中 ,加水稀释至刻度 ,摇匀 ,即得 5 mg/mL 的标准品储备液。取储备液 0.8 mL 于 50 mL 容量瓶中 ,加水稀释至刻度 ,摇匀 ,即得 80 μ g/mL 的标准品储备液。

2) 供试品溶液的制备 量取 18 种标样 :L-丙氨酸、NH₄Cl、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-胱氨酸、

L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸各 0.038 μ mol ,置于 100 mL 容量瓶中 ,加水稀释至刻度 ,摇匀 ,得空白供试液即标准氨基酸混合液。量取空白供试液 1 mL ,置于 100 mL 容量瓶中 ,量取 5 mg/mL 标准品储备液 1 mL ,置于上述容量瓶中 ,加水稀释至刻度 ,摇匀 ,得标准品供试液 ,即标准品与标准氨基酸溶液的混合液。

3) 样品溶液 量取已处理的章鱼提取液 5 mL ,置 50 mL 容量瓶中 ,加水稀释至刻度 ,摇匀 ,即得样品溶液。

1.2 方法

1.2.1 专属性试验——洗脱条件优化

参考文献 [12-14] 设计了一组牛磺酸的梯度洗脱程序 ,见表 1。量取 5 mg/mL 的标准品溶液、空白供试液和标准品供试液各 5 mL ,过 0.45 μ m 水系膜备用 ,精密吸取上述过滤液各 0.25 μ L ,在前述色谱条件下 ,用表 1 中的离子色谱法分离牛磺酸梯度洗脱程序进行检测。

表 1 离子色谱法分离牛磺酸梯度洗脱程序

Table 1 The elution program of taurine by ion chromatography

时间/min	ϕ (洗脱液)/%		
	A(H ₂ O)	B(NaOH)	C(NaOAc)
0	64	36	0
3.0	64	36	0
22.0	50	50	0
23.0	50	50	0
33.0	34	16	50
40.0	34	16	50
40.1	20	80	0
42.1	20	80	0
42.2	82	18	0
55.0	82	18	0

1.2.2 标准曲线

量取 5 mg/mL 的标准品储备液 0.1、0.2、0.4、1、2、4 和 8 mL ,置于 100 mL 容量瓶中 ,加水至刻度 ,摇匀 ,制成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 和 400 μ g/mL 的标准品溶液。量取上述各浓度标

准品溶液 5 mL, 过 0.45 μm 水系膜备用, 吸取上述过滤液各 0.25 μL , 在前述色谱条件下进行测定, 以质量浓度 (ρ) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归。

1.2.3 精密度试验

量取 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品储备液 5 mL, 过 0.45 μm 水系膜备用, 吸取过滤液 0.25 μL , 在前述色谱条件下连续、重复进样 6 次。

1.2.4 稳定性实验

量取 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品储备液 5 mL, 过 0.45 μm 水系膜备用, 吸取过滤液 0.25 μL , 在前述色谱条件下, 分别于过滤后 0、2、4、8、16、24 和 48 h 进样。

1.2.5 检测限与定量限测定

按照标准曲线制作方法进行测定。

1.2.6 回收率试验

量取 1 mL 样品 5 份于小烧杯中, 加入 7 mL 水, 分别加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液 2 mL 后超声 2 min, 使之充分混合。量取上述各混合溶液 5 mL, 过 0.45 μm 水系膜备用, 吸取上述过滤液 0.25 μL , 在前述色谱条件下进行测定。

2 结果与讨论

2.1 专属性试验结果

由于实验样品溶液为章鱼下脚料的浓缩液, 含有多氨基酸, 用离子色谱法进行分离检测时会受到干扰, 所以先要进行专属性实验确定牛磺酸在离子色谱中的出峰时间。用离子色谱法分离牛磺酸梯度洗脱程序 (表 1) 进行检测, 结果见图 1、图 2。

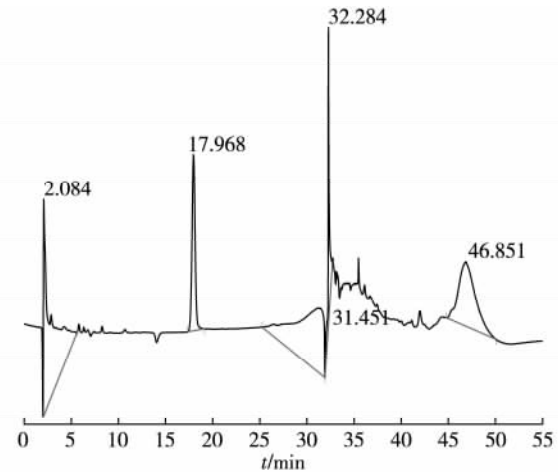


图 1 牛磺酸标准品的离子色谱

Fig. 1 Ion chromatogram of taurine standard substance

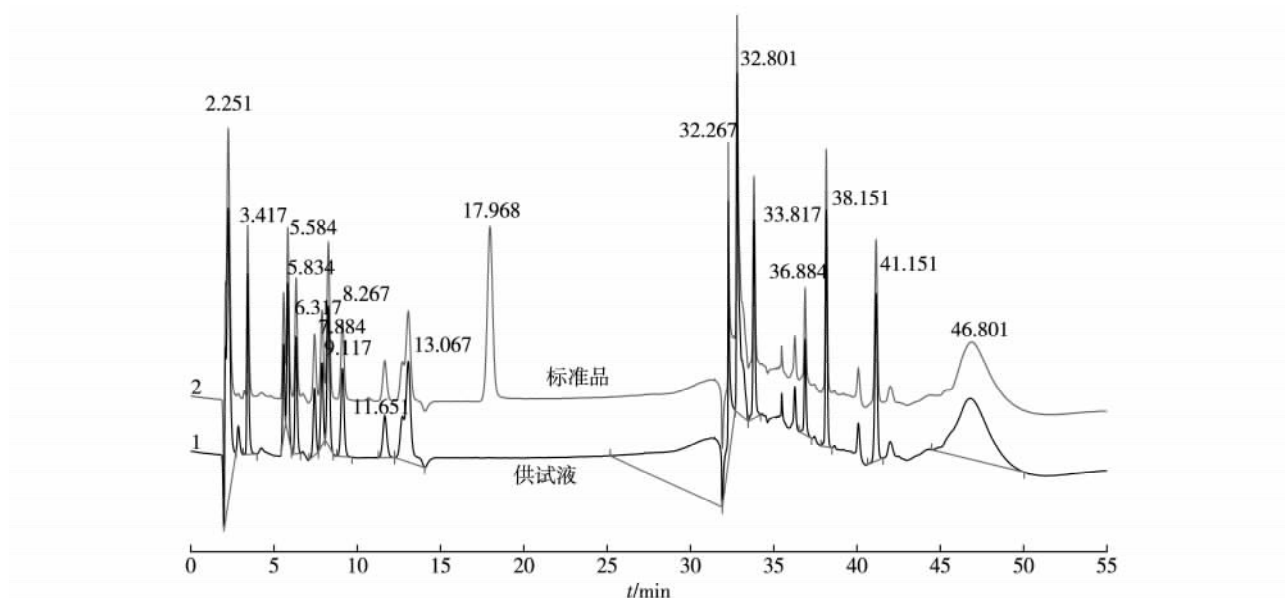


图 2 牛磺酸空白试液和标准品供试液的离子色谱

Fig. 2 Ion chromatogram of taurine blank test solution and standard test solution

由图 1 可知: 牛磺酸的出峰时间为 17.97 min。
由图 2 可知: 空白供试液中的 8 种氨基酸无干扰, 专

属性良好。

当流动相中 NaOH 比例提高时, 牛磺酸的出峰

时间提前,空白供试液中的氨基酸对牛磺酸的检测依然不存在干扰,专属性良好。

2.2 标准曲线

图3为离子色谱法检测牛磺酸的标准曲线,其回归方程为 $y = 0.1364x + 2.0525$, $R^2 = 0.997$ 。由图3可知,牛磺酸在 $5 \sim 400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内呈良好的线性关系。

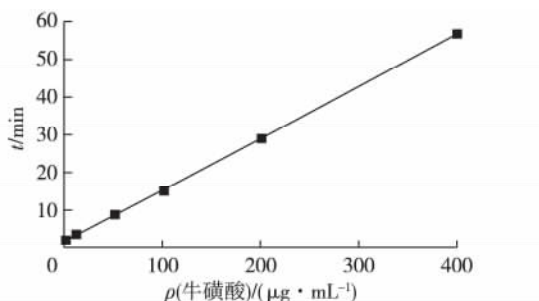


图3 离子色谱法检测牛磺酸的标准曲线
Fig. 3 Standard curve of taurine detected by ion chromatography

2.3 精密度试验结果

实验的精密度试验的检测结果见表2。由表2可知,重复进样6次的相对标准偏差(RSD)为0.6%,说明仪器精密度良好。

表2 牛磺酸精密度实验结果
Table 2 Results of precision test

实验号	峰面积	平均峰面积	RSD/%
1	15.63	15.626 67	0.6
2	15.55		
3	15.48		
4	15.68		
5	15.73		
6	15.69		

2.4 稳定性试验结果

稳定性试验的检测结果见表3。由表3可知,

48 h内样品检测RSD为1.14%,说明样品在48 h内稳定性良好。

2.5 检测限与定量限测定

检测限与定量限测定的结果见表4。由表4可知:当牛磺酸的质量浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时的信噪比为3.2(大于3),因此确定其检测限在 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右;当牛磺酸的质量浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,信噪比为18.6(大于10),由此确定其定量限在 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。

表3 牛磺酸稳定性实验结果
Table 3 Results of stability test

时间/h	峰面积	平均峰面积	RSD/%
0	9.671 7	9.673 6	1.14
2	9.865 6		
4	9.612 4		
8	9.603 9		
16	9.614 5		
24	9.542 9		
48	9.065 5		

表4 牛磺酸检测限和定量限实验结果
Table 4 Results of LOD and LOQ test

$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	峰面积	信噪比
5	1.050 9	3.2
10	2.142 3	18.6
20	4.433 3	45.1
50	10.275 6	56.5
100	17.179 5	44.9
200	31.098 5	411.4
400	55.233 7	438.9

2.6 回收率试验

表5为回收率试验结果。由表5可知:平均回收率为98.192%,RSD为2.8%,说明仪器的回收效果良好。

表5 牛磺酸样品回收率实验结果
Table 5 Results of recovery rate test

实验号	$m(\text{样品})/\mu\text{g}$	$m(\text{加入标品})/\mu\text{g}$	$m(\text{测得的牛磺酸})/\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	194.09	50	261.54	101.71	98.192	2.8
2	247.01	50	282.18	95.01		
3	269.14	50	308.20	96.57		
4	213.70	50	256.42	97.23		
5	194.62	50	245.69	100.44		

2.7 样品的检测

图4和图5分别是离子色谱法检测牛磺酸样品图和离子色谱法检测牛磺酸原液样品的色谱。

由图4、图5看出此种离子色谱法检测样品牛磺酸出峰时间为17.967 min,原液样品牛磺酸出峰时间为17.168 min,样品稀释与否对出峰时间没有影响。

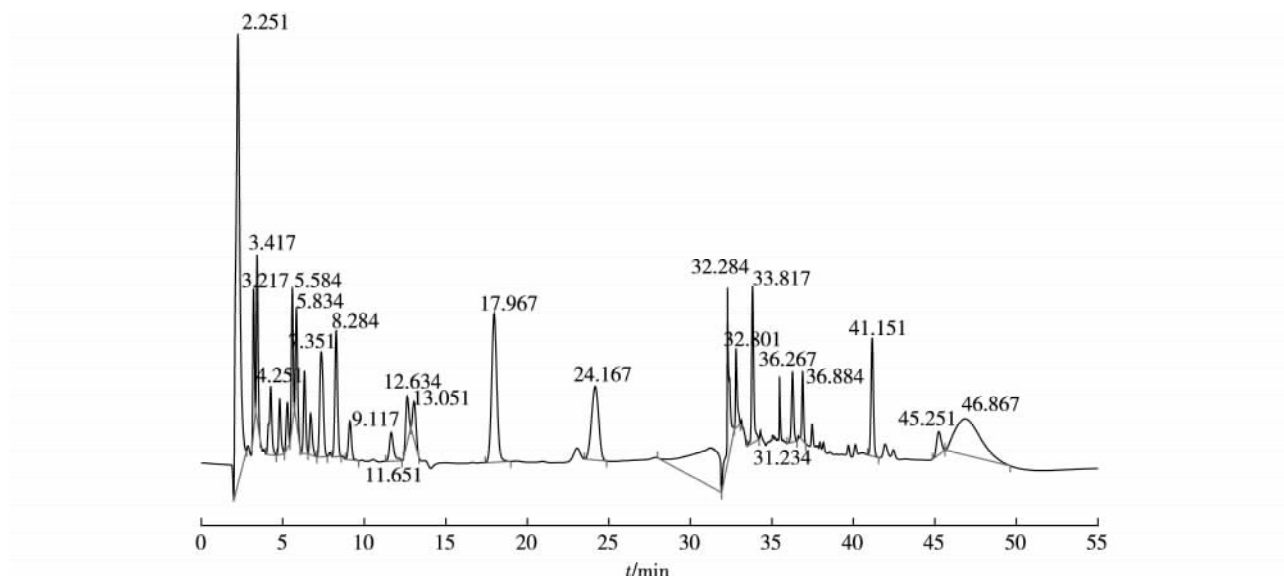


图4 牛磺酸样品的离子色谱

Fig. 4 Ion chromatography of taurine sample

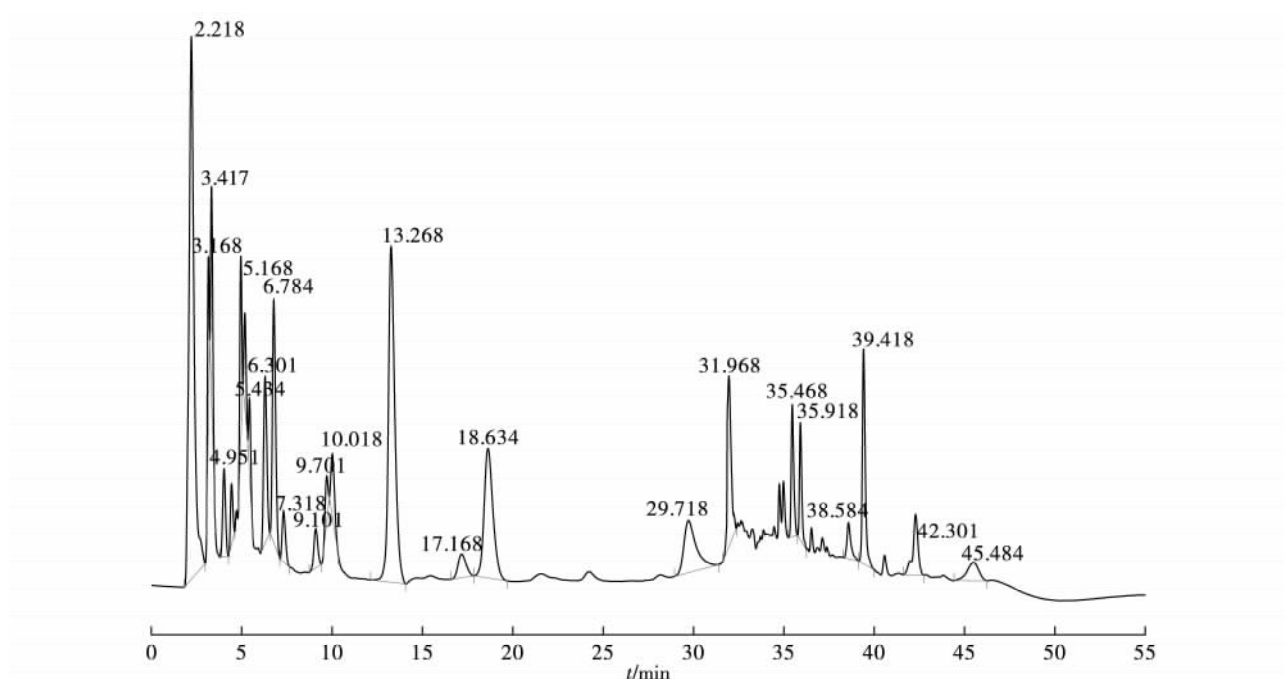


图5 牛磺酸原液样品的离子色谱

Fig. 5 Ion chromatography of taurine stock solution

3 结论

考察离子色谱法检测天然牛磺酸,利用梯度洗

脱程序达到分析检测的目的。色谱柱:氨基酸分析柱(AminoPac PA-10 2 mm × 250 mm)、氨基酸保护柱(AminoPac PA-10 2 mm × 50 mm);流动相:流动

相 A 为水、流动相 B 为 250 mmol/L NaOH 溶液、流动相 C 为 1.0 mmol/L NaOAc,进行梯度洗脱;流速为 0.24 mL/min;柱温为 30 ℃;检测方法为积分脉冲安培检测器;进样量为 25 μL。进一步结合稳定性试验、精确度试验及回收率试验等,表明该离子色谱法具有高效、快速、准确的特点,可用于实验和生产。但是本文中离子色谱检测方法的建立过程中检测限和定量限偏高,有待进一步探索实验方法以提高该方法的灵敏度。

参考文献:

- [1] 姜传福,王芳.等电点法提取文蛤中牛磺酸及其药物保健功能研究[J]. 辽宁石油化工大学学报,2008,28(4):30-32.
- [2] 韩金勇.牛磺酸生产应用及市场前景[J]. 化工技术经济,2002(1):29-30.
- [3] 王晓旭,郑志福.牛磺酸的医学功能[J]. 生化药物杂志,1990(1):12-13.
- [4] 龚丽芬,黄慰生,郑志福,等.牛磺酸的生物活性、提取与测定[J]. 福建化工,2003(1):26-28.
- [5] 潘凤莲.天然牛磺酸提取及分离纯化研究[J]. 畜牧与饲料科学,2011,32(3):77-78.
- [6] 张建钢,李文婷,邓波波,等.牛磺酸的生物学作用及其在养鸡生产中的研究进展[J]. 饲料博览,2012(1):21-24.
- [7] 贾如,陈静.从章鱼下脚料中提取牛磺酸工艺的研究[J]. 食品工业,2012,33(12):9-11.
- [8] 陈珊华,孙爱民.离子交换树脂层析分离混合氨基酸[J]. 南京医学院学报,1989,9(4):307.
- [9] 徐艳,宋成芝,孙雪萍,等.毛蚶中天然牛磺酸的提取和活性研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(17):9288-9289.
- [10] 罗春丽.辣椒精中辣椒碱类化合物的提取与纯化[D].北京:北京化工大学,2007.
- [11] 张翼,穆军,吕红丽,等.紫贻贝多烯脂肪酸乙酯及牛磺酸的提取与分析[J]. 大连交通大学学报,2011,32(2):63-68.
- [12] 武彩莲,郭长江.离子交换法与氨基酸的分离纯化[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(4):50-53.
- [13] Gamagedara S, Shi H, Ma Y. Quantitative determination of taurine and related biomarkers in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(2):763-770.
- [14] Cinquina A L, Cali A, Longo F, et al. Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection [J]. J Chromatogr A, 2004, 1032(1/2):73-77.

(责任编辑 荀志金)

(上接第 63 页)

- [5] 李志洲,刘军海.石榴皮中多酚类物质的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品与发酵工业,2009,35(11):152-155.
- [6] 陈红梅,谢翎.超声波法提取石榴皮多酚的最佳工艺[J]. 光谱实验室,2012,29(5):3203-3207.
- [7] Saad H, Charrier-El Bouhtoury B, Pizzi A, et al. Characterization of pomegranate peels tannin extractives [J]. Ind Crops Prod, 2012, 40:239-246.
- [8] 焦士蓉,王玲,陈明夏.石榴皮总多酚的超声波辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 西华大学学报:自然科学版,2009,28(1):60-62.
- [9] Basiri S, Shekarforoush S S, Aminlari M, et al. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage [J]. LWT: Food Sci Technol, 2015, 60(2):1025-1033.
- [10] 孙慧,贾冬英,姚开.石榴皮多酚提取物对醛糖还原酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(3):508-510.
- [11] 谢贞建,范珏,唐鹏程,等.石榴皮提取物的酶抑制作用研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(7):2829-2831.
- [12] 张海均,贾冬英,孙慧,等.石榴皮多酚提取物及纯化物对α-葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(9):1253-1256.
- [11] 龚盛昭,杨卓如,张木全.微波辅助提取牡丹皮中的酪氨酸酶抑制剂[J]. 精细化工,2007,24(8):766-768;777.
- [12] 李红艳,刘艳杰,王倩,等.红花中酪氨酸酶抑制成分的快速筛选和分析[J]. 现代药物与临床,2013,28(2):170-174.

(责任编辑 荀志金)