

高效液相色谱法同时测定生物质乳酸 发酵液中有有机酸及糖类化合物

马 瑞, 欧阳嘉*, 李 鑫, 连之娜, 蔡 聪

(南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 建立了高效液相色谱(HPLC)同时测定生物质乳酸发酵液中有有机酸及糖类的分析方法。使用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱,以 5 mmol/L 的 H_2SO_4 为流动相,在柱温 55 $^{\circ}\text{C}$ 、流速 0.6 mL/min 条件下,采用示差折光检测器进行检测。结果表明,该方法可在 17 min 内实现发酵液中各种有机酸和糖类化合物等的完全分离与定量。6 种有机酸和 3 种糖类化合物在 0.15 ~ 5.19 g/L 范围内的线性关系良好,回归方程的线性相关系数在 0.999 8 以上。将该法用于米根霉发酵液的检测,两个水平的加标回收率为 96.91% ~ 103.11%,相对标准偏差($n=6$)为 0.81% ~ 4.61%。该法适用于微生物发酵液中多种有机酸和糖类的快速、高效分离和定量测定。

关键词: 高效液相色谱; 有机酸; 糖类化合物; 米根霉; 乳酸; 发酵液

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)01-0062-05

Simultaneous determination of organic acids and saccharides in lactic acid fermentation broth from biomass using high performance liquid chromatography

MA Rui, OUYANG Jia*, LI Xin, LIAN Zhina, CAI Cong

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of organic acids and saccharides in lactic acid fermentation broth from biomass was developed. A Bio-Rad Aminex HPX-87H column was used at 55 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was 5 mmol/L sulfuric acid solution at a flow rate of 0.6 mL/min. The samples were detected by a refractive index detector (RID). The results showed that six organic acids and three saccharides in fermentation broth were completely separated and determined in 17 min. The linear correlation coefficients were above 0.999 8 in the range of 0.15 – 5.19 g/L. Under the optimized conditions, the recoveries of the organic acids and saccharides in *Rhizopus oryzae* fermentation broth at two spiked levels were in the range of 96.91% – 103.11% with the relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of 0.81% – 4.61%. This method is fast and accurate for the quantitative analysis of the organic acids and saccharides in microbial fermentation broths.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); organic acids; saccharides; *Rhizopus oryzae*; lactic acids; fermentation broth

乳酸(lactic acid),化学名称为 2-羟基丙酸,分子式为 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$,是一种含有羟基和羧基的有机酸,广泛存在于人体、动物、植物和微生物中,是食品工业中常用的酸味剂和防腐剂,也是医药、化工、皮革、香料等工业的重要的原料^[1,2]。在乳酸发酵过程中,伴随产物乳酸生成的同时还有其

他一些有机酸作为副产物而释放到环境中^[3]。

利用生物质水解液发酵制取乳酸(以下简称生物质乳酸)是近年来乳酸生产工艺改进的重要方向。测定生物质乳酸发酵液中糖及各种有机酸代谢成分组成的变化,对揭示其代谢途径以及控制发酵过程,进而从代谢工程角度改良菌种和优化发酵工

* 通讯联系人: 欧阳嘉,教授,主要从事生物质能源开发利用和酶工程研究。Tel: (025) 85427587, E-mail: hgouyj@njfu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070513)、江苏省高校自然科学研究重大项目(10KJA22019)和江苏高校优势学科建设工程项目。

收稿日期: 2011-09-26

艺条件具有重要的意义。目前,传统发酵液中的有机酸多采用酶法或高效液相色谱法(HPLC)测定^[4-8],还原糖采用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸比色法)测定^[9]。由于采用了多种手段分析发酵液,分析过程繁琐费时,故同时分析发酵液中的各类代谢成分是目前研究的发展趋势。白冬梅等^[10]使用反相高效液相色谱方法同时分析了 3 种有机酸和葡萄糖。离子排斥液相色谱法应用于生产琥珀酸和富马酸的发酵液成分分析已有报道^[11-13],但主要集中在纯葡萄糖发酵和常见的代谢产物分析。生物质水解液为富含纤维成分的生物质原料经过不同的水解过程获得的上清液,其一般富含大量的糖分(主要是葡萄糖、木糖和纤维二糖)和少量的酸类物质(包括甲酸和乙酸)。针对生物质乳酸发酵工艺建立快速、准确地同时测定多种糖类物质和有机酸的分析方法对于该技术的发展具有重要的意义。

本研究采用 HPLC 法,利用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 糖分析柱,以示差折光检测器(RID)检测,建立了同时检测葡萄糖、木糖、纤维二糖以及包括乳酸在内的多种有机酸等 9 种组分的方法。该方法可以较准确地测定生物质乳酸发酵过程中的各种糖的消耗量以及乳酸等代谢产物的生成量,这对于研究微生物菌株的代谢调控,从而提高乳酸发酵的产量具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(配示差折光检测器,安捷伦化学工作站); Legend Mach1.6R 高速冷冻离心机(Thermo 公司); PL303 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); Classic UVF 超纯水设备(美国 ELGA)。

L-乳酸(纯度为 98%; CAS 号: 79-33-4; 美国 Sigma 公司); 柠檬酸(纯度为 99.5%; CAS 号: 5949-29-4)、乙酸(纯度为 99.5%; CAS 号: 64-19-7)、草酸(纯度为 99.5%; CAS 号: 6153-56-6)(南京化学试剂有限公司); 反丁烯二酸(富马酸)(纯度为 99%; CAS 号: 110-17-8)、琥珀酸(纯度为 99.0%; CAS 号: 110-15-6)(国药集团); 葡萄糖(纯度为 99.5%; CAS 号: 55-99-7)、D(+)-木糖(纯度为 99.0%; CAS 号: 58-86-7)(美国 Sigma 公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 9 μm); 流动相: 5 mmol/L H₂SO₄; 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 55 °C; 检测器:

RID; 进样量: 10 μL; 采用外标法定量。

1.3 标准溶液配制

用去离子水配制 9 种标准物质的混合溶液,各组分的质量浓度见表 1。

表 1 9 种物质的混合标准溶液的组成
Table 1 Mixed standard solution of nine compounds

Compound	Mass concentration/(g/L)
L-Lactic acid	0.838
Fumaric acid	0.527
Succinic acid	0.287
Oxalic acid	0.543
Acetic acid	0.528
Citric acid	0.544
Glucose	0.510
Xylose	0.535
Cellobiose	0.493

1.4 样品预处理

取 5 mL 发酵液,离心(10 000 r/min, 5 min)除去菌丝体和碳酸钙,取上清液稀释适当倍数;取 1 mL 的稀释液加入 0.05 mL 的 72% 硫酸进行酸解使有机酸游离出来,离心(10 000 r/min, 3 min)除去硫酸钙,然后用 0.22 μm 的滤膜过滤即得待测液。

1.5 定性与定量

在相同的条件下,将样品色谱图与有机酸以及糖类标准液色谱图对照,根据保留时间确定样品中各组分的色谱峰;在标样与样品进样量相同的情况下,应用外标法定量,计算样品中各物质的含量。

2 结果与讨论

2.1 标准物质的确定

在 1.2 节的色谱条件下测定各有机酸标准溶液(其中 L-乳酸的色谱图见图 1a),确定各组分的保留时间;再测定混合标准液,得到混合标准液的色谱图(见图 1b)。从图 1b 可以看出,各物质的出峰顺序为草酸、纤维二糖、柠檬酸、葡萄糖、木糖、琥珀酸、L-乳酸、富马酸、乙酸;通过对单标样品的色谱图与混合标准液的色谱图比照分析,发现 L-乳酸的标准液中含有一定量的琥珀酸。

2.2 柱温的选择

文献[14,15]使用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 分析柱进行有机酸分析时,选用的柱温各不相同。为确认柱温对分析效果的影响,本文考察了柱温为 45~70 °C 时的分离情况,结果如图 2 所示。从中可以看出柱温对葡萄糖和木糖的分离度影响较大。在 60 °C 以上,木糖的峰出现分裂,在 55 °C 以下此现象消失;通过对比单标溶液谱图中的目标物峰形,推测产生这种现象的可能原因是在高温下木糖的不同构型出峰时间不同。柱温对乳酸、富马酸和乙酸的影

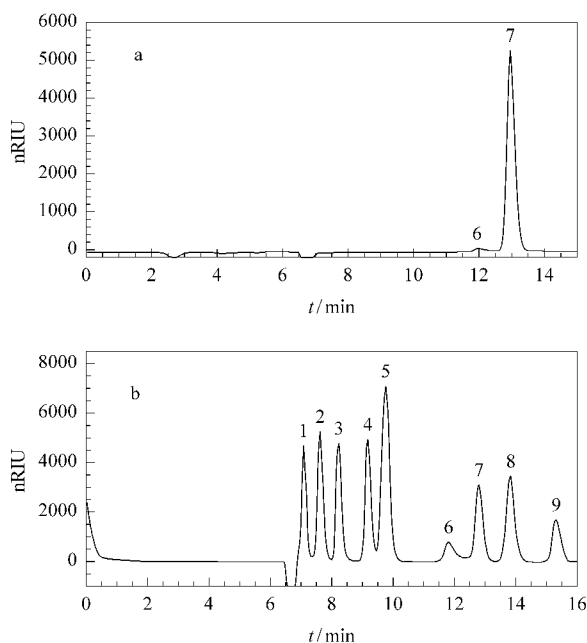


图 1 (a) L-乳酸标准溶液和 (b) 混合标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) L-lactic acid solution and (b) a mixed standard solution

Peaks: 1. oxalic acid; 2. cellobiose; 3. citric acid; 4. glu-cose; 5. xylose; 6. succinic acid; 7. L-lactic acid; 8. fumaric acid; 9. acetic acid.

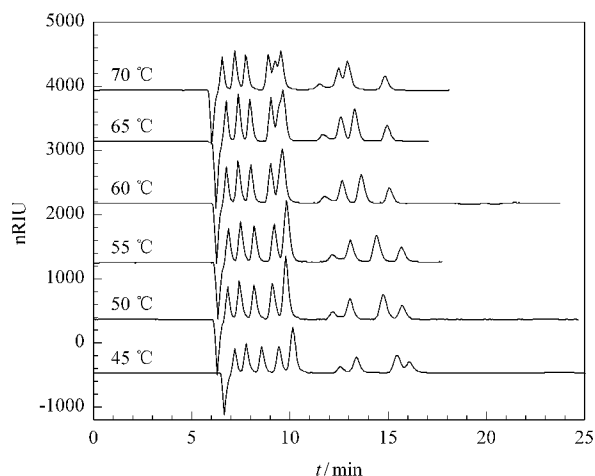


图 2 柱温对混合标准溶液中各组分保留时间的影响

Fig. 2 Effect of column temperature on retention times of compounds in a mixed standard solution

响也比较大,在 55 °C 时这几种组分的分离效果最好;随着温度的升高,富马酸的保留时间有所缩短,其他组分的保留时间基本保持不变,色谱峰形和分离效果随温度上升而好转。但在分离中,温度过高会使流动相中溶解的气体挥发形成气泡影响色谱分离与检测。综合考虑,本实验将柱温最终设定为 55 °C。

2.3 流速的选择

流动相的流速对液相色谱的分离有影响,在一定条件下增加流速会使分离度减小、峰面积减小、峰宽变窄。通过不同流速下对混合标准溶液的分离效果来判断流速对分离效果的影响。考察了流速在 0.4 ~ 0.7 mL/min 范围内的影响。从图 3 可以看出,随着流速的降低各组分的保留时间都有所增加,且分离度也增加,但效果不明显。随着流速的降低,检测样品的时间也会相应地增加。综合考虑,本实验最终选择的流速为 0.6 mL/min。

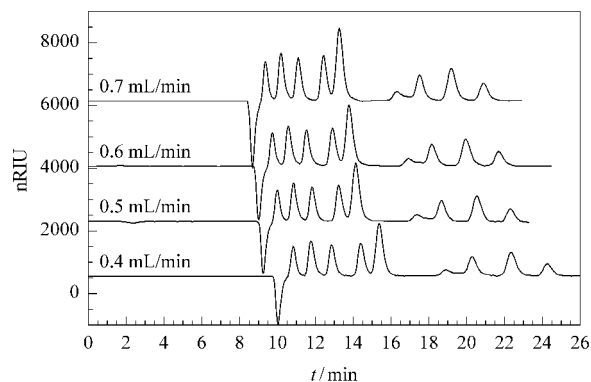


图 3 流速对混合标准溶液中各组分保留时间的影响

Fig. 3 Effect of flow rate on the retention times of compounds in a mixed standard solution

2.4 标准工作曲线的绘制

用去离子水准确配制不同浓度的混合标准溶液,分别进样 10 μ L 测定,以峰面积 A 对质量浓度 C (g/L) 进行线性回归,结果见表 2。以 3 倍信噪比 (S/N) 确定检出限 (LOD),各组分的检出限见表 2。

表 2 3 种糖类和 6 种酸类化合物的保留时间、线性关系和检出限 (LOD, $S/N=3$)

Table 2 Retention times, linear relationships and detection limits (LOD, $S/N=3$) of 3 sugar compounds and 6 organic acids

Compound	Retention time/min	Regression equation	Linear range/(g/L)	Correlation coefficient	LOD/(mg/L)
Cellobiose	7.668	$A = 151270.1C - 60.5$	0.15 - 4.52	1.00000	0.37
Glucose	9.238	$A = 144149.5C + 1314.8$	0.15 - 4.01	0.99999	0.14
Xylose	9.789	$A = 139264.6C - 255.8$	0.15 - 3.97	1.00000	0.21
Oxalic acid	7.088	$A = 95174.2C - 615.4$	0.15 - 3.98	1.00000	0.33
Citric acid	8.212	$A = 119104.8C - 169.6$	0.15 - 4.01	0.99999	0.49
Succinic acid	11.784	$A = 114577.7C - 628.5$	0.15 - 3.71	1.00000	0.97
L-Lactic acid	12.802	$A = 98034.7C + 1629.5$	0.19 - 5.19	0.99997	0.23
Fumaric acid	13.835	$A = 133206.2C + 2400.6$	0.15 - 3.96	0.99981	0.34
Acetic acid	15.304	$A = 69001.7C - 66.8$	0.15 - 3.95	0.99999	0.17

A : peak area; C : mass concentration, g/L.

2.5 重复性和回收率

利用所建立的方法对采用汽爆秸秆水解液米根霉摇瓶发酵 72 h 的发酵液进行定性和定量分析,通过对色谱图(见图 4)的分析,确定发酵液中主要含有乳酸、富马酸和葡萄糖。并以米根霉发酵液稀释适宜倍数后作为试验样本,连续进样 6 次,测得结果见表 3。葡萄糖、乳酸、富马酸和乙酸的相对标准偏差(RSD)为 0.81%、0.96%、4.04% 和 4.61%。

同时以稀释一定倍数的米根霉发酵液作为试验样品,平行取样 6 次进行 2 个水平的加标回收试验,结果见表 4,得到各种酸及糖类化合物的加标回收率在 96.91%~103.11% 之间。

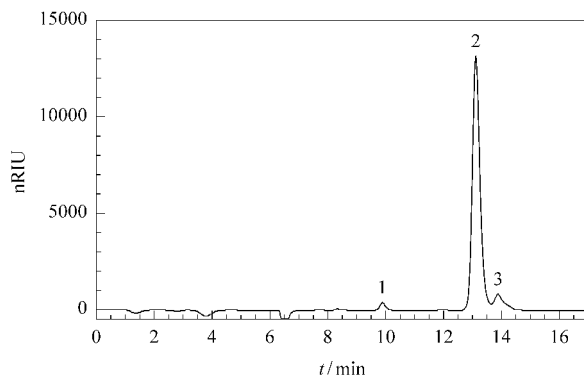


图 4 米根霉摇瓶发酵 72 h 的发酵液的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of 72 h fermentation liquid of *Rhizopus oryzae*

Peaks: 1. glucose; 2. L-lactic acid; 3. fumaric acid.

表 3 米根霉发酵液的重复性试验结果

Table 3 Repeated experiment results of *Rhizopus oryzae* fermentation broth

g/L

Number of analysis	Glucose	L-Lactic acid	Succinic acid	Fumaric acid	Citric acid	Acetic acid	Oxalic acid
1	0.11472	0.61176	0	0.01011	0	0.0017	0
2	0.11509	0.61170	0	0.00984	0	0.00268	0
3	0.11328	0.61889	0	0.00989	0	0.00154	0
4	0.11617	0.61754	0	0.00975	0	0.00167	0
5	0.11480	0.62580	0	0.10821	0	0.00170	0
6	0.11461	0.62391	0	0.00979	0	0.00243	0
Average value	0.11478	0.61827	0	0.01003	0	0.00162	0
Standard deviation	0.00093	0.00592	0	0.00041	0	0.00007	0
RSD/%	0.8090	0.9568		4.0414		4.6144	

表 4 米根霉发酵液中各组分的加标回收率($n=6$)

Table 4 Recoveries of compounds spiked in *Rhizopus oryzae* fermentation broth ($n=6$)

Compound	Background / (g/L)	Added / (g/L)	Found / (g/L)	Recovery / %
Cellobiose	0	1.9147	1.9241	100.49
		0.9623	0.9649	100.27
Glucose	0.1551	2.0147	2.1643	99.72
		1.0083	1.1621	99.87
Xylose	0	2.2847	2.2791	99.75
		1.1424	1.1430	100.05
L-Lactic acid	1.2212	2.6130	3.8483	100.54
		1.3131	2.5751	103.11
Succinic acid	0	2.0134	2.0301	100.83
		1.0117	1.0157	100.40
Fumaric acid	0.0254	2.0086	2.0059	98.60
		1.0023	0.9967	96.91
Citric acid	0	2.0319	2.0320	100.80
		1.0139	1.0150	100.11
Acetic acid	0.0031	2.0016	2.0130	100.41
		0.9988	0.9853	98.34
Oxalic acid	0	2.0178	2.0099	99.61
		1.0069	1.0101	100.32

3 结论

采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱建立了同时测定生物质发酵液中多种有机酸和糖类化合物的定性和定量分析方法。该方法准确可靠,可实现对生物质发酵液中多种残糖和有机酸的同时快速、准确和高效分离检测,并为其他类似的有机酸的定性和定量检测提供借鉴。采用高效液相色谱-示差折光检测有机酸及糖类化合物,与气相色谱相比,样品无需衍生处理,过滤后便可以直接进样检测;与高效阴离子交换-脉冲安培检测法相比,所用检测器在实验室中较为常见,操作也较为方便。

参考文献:

- [1] Sule B, Murat E, Dursun O. Biochem Eng J, 2004, 21(1): 33
- [2] Singh S K, Ahmed S U, Pandey A, et al. Process Biochem, 2006, 41: 991
- [3] Cao B C, Xu J L. Food and Fermentation Industries (曹本昌, 徐建林. 食品与发酵工业), 1993(3): 56
- [4] Yuan X Y, Wu W, Yu H. Instrumental Analysis (原小寓, 吴

- 伟,于泓. 分析测试学报),2008,27(1): 76
- [5] Shui G H, Leong L P. J Chromatogr A, 2002, 977(1): 89
- [6] Qian B, Zhang Y, Li S, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (钱兵,章燕,李莎,等. 分析化学), 2007, 35(11): 1651
- [7] Mou Y, Wang Y H, Xiu Z L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (牟英,王元好,修志龙,等. 分析化学), 2006, 34(S1): 83
- [8] Zhu X L, Ye F, Yang J, et al. Chinese Journal of Chromatography (朱晓玲,叶飞,杨洁,等. 色谱), 2010, 28(10): 945
- [9] Jiang M, Yao J M, Chen K Q, et al. Acta Energetica Sinica (姜岷,姚嘉旻,陈可泉,等. 太阳能学报), 2009, 30(6): 820
- [10] Bai D M, Du G M, Shen F, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (白冬梅,杜国民,沈菲,等. 分析试验室), 2004, 23(3): 15
- [11] Liu Y P, Zheng P, Sun Z H. Food and Fermentation Industries (刘宇鹏,郑璞,孙志浩. 食品与发酵工业), 2006, 32(12): 119
- [12] Fu Y Q, Gao Z, Li S, et al. Food and Fermentation Industries (付永前,高振,李霜,等. 食品与发酵工业), 2009, 35(1): 131
- [13] Pan G W, Zhao Z Y, Hu Z Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (潘广文,赵增运,胡忠阳,等. 色谱), 2010, 28(7): 712
- [14] Chinnici F, Spinabelli U, Amati A. J Liq Chromatogr Related Technol, 2002, 25(16): 2551
- [15] Wang P, Zhou R. Chinese Journal of Chromatography (王平,周荣. 色谱), 2006, 24(3): 239