

Application News

No. L548

高效液相色谱法

使用 Nexera™ Dual Injection 系统监控发酵过程

发酵是指微生物将原料分解为人们所需要的有用物质的过程。发酵工艺不仅用于生产食品，近年来还广泛用于工业领域。在工业领域中，对有机酸类、糖类、氨基酸类和其他组合物进行多维检测，以了解发酵过程或进行工艺优化。当使用 HPLC 分析时，适宜的分离模式和分析方法可能会因化合物种类不同而不同。使得每次样品分析可能需要使用多台独立设备。本文介绍了一个利用双进样系统监测发酵过程的实例，用一个系统同时评估两种类型的分析。

K. Koterawasa

■ 双进样系统概述

使用 Nexera SIL-40 系列自动进样器的可选双进样功能，可以将样品进样到两个流路中，实现一个平台上同时运行两种独立分析。将系统获得的两组结果集成在一个数据文件中，以确保特定样品的数据可追溯性。相应的方法和批处理文件也集成在一个文件中，以简化分析操作。

图 1 显示了用于两种类型分析的双进样系统的流路图。一个通道使用离子排斥色谱柱、柱后 pH 缓冲液和电导检测器分析有机酸类，另一个通道使用配体交换柱和示差折光检测器分析糖类。由于有机酸类分析和糖类分析涉及不同的柱温，因此在两个 CTO-40S 柱温箱中分别对色谱柱进行温控。

■ 有机酸类分析

流路 (1) 用于分析有机酸类。图 2 显示了使用表 1 所示分析条件获得的有机酸标准混合溶液（柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸和乙酸各 100 mg/L）的色谱图。

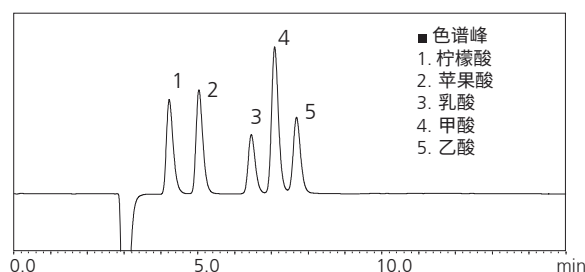


图 2 标准有机酸混合溶液的色谱图

表 1 有机酸分析的分析条件

| | |
|----------|--|
| 色谱柱 | : Shim-pack™ Fast-OA (100 mm x 7.8 mm I.D., 5 μm) (两只联用) |
| 保护柱 | : Shim-pack™ Fast-OA (G) (10 mm x 4.0 mm I.D., 12 μm) |
| 流动相流速 | : 0.8 mL/min |
| pH 缓冲液流速 | : 0.8 mL/min |
| 流动相 | : 5.0 mmol/L 对甲苯磺酸水溶液 |
| pH 缓冲液 | : 5.0 mmol/L 对甲苯磺酸、20 mmol/L Bis-Tris 和 0.1 mmol/L EDTA 4H 的混合水溶液 |
| 柱温 | : 40 °C |
| 进样量 | : 10 μL |
| 检测器 | : 电导检测器 |

有关使用 Shim-pack Fast-OA 色谱柱和柱后缓冲液进行分析的详细信息，请参阅技术报告“使用 Shim-pack Fast-OA 和 pH 缓冲液电导检测对有机酸类进行高速分析” (C190-E237)。

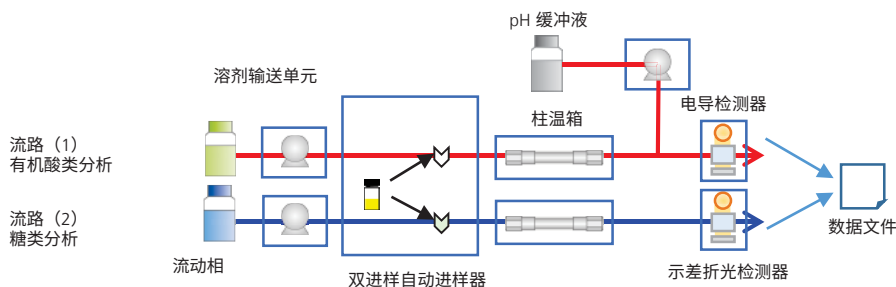


图 1 双进样流路图

糖类分析

流程 (2) 用于分析糖类。图 3 显示了使用表 2 中所示分析条件获得的糖类标准混合溶液 (葡萄糖、果糖、甘露糖和乳糖各 1000 mg/L) 的色谱图。

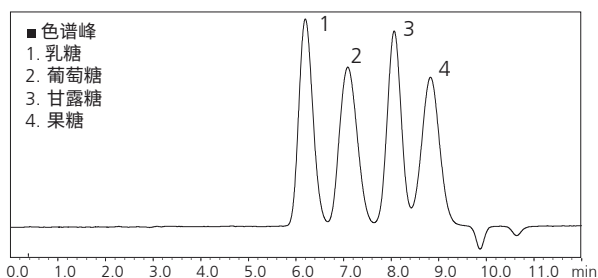


图 3 标准糖类混合溶液的色谱图

表 2 糖类分析的分析条件

| | |
|-----|--|
| 色谱柱 | : Shim-pack SCR-101C (300 mm × 7.9 mm I.D., 10 μm) |
| 保护柱 | : Shim-pack guard column SCR (C) (50 mm × 4 mm I.D., 10 μm) |
| 流速 | : 1.0 mL/min |
| 流动相 | : 水 |
| 柱温 | : 80 °C |
| 进样量 | : 10 μL |
| 检测器 | : 示差折光检测器 |

重现性

有机酸类标准混合溶液 (200 mg/L) 和糖类标准混合溶液 (1000 mg/L), 六次重复分析的保留时间和峰面积相对标准偏差 (RSD%) 结果分别见表 3 和表 4。结果表明, 所有化合物保留时间和峰面积 RSD% 均小于 1%。

表 3 有机酸类保留时间和峰面积重复性 (n=6)

| 成分 | 平均保留时间 (min) | 保留时间 %RSD | 面积值 %RSD |
|-----|--------------|-----------|----------|
| 柠檬酸 | 4.21 | 0.023 | 0.25 |
| 苹果酸 | 5.02 | 0.020 | 0.07 |
| 乳酸 | 6.44 | 0.018 | 0.39 |
| 甲酸 | 7.08 | 0.015 | 0.34 |
| 乙酸 | 7.67 | 0.013 | 0.53 |

表 4 糖类保留时间和峰面积重复性 (n=6)

| 成分 | 平均保留时间 (min) | 保留时间 %RSD | 面积值 %RSD |
|-----|--------------|-----------|----------|
| 乳糖 | 6.20 | 0.013 | 0.08 |
| 葡萄糖 | 7.10 | 0.055 | 0.09 |
| 甘露糖 | 8.07 | 0.010 | 0.13 |
| 果糖 | 8.83 | 0.008 | 0.11 |

校准曲线

图 4 所示为有机酸类的校准曲线, 表 5 列出了有机酸类的线性范围和判定系数。图 5 所示为糖类的校准曲线, 表 6 列出了糖类的线性范围和判定系数。五种有机酸类成分和四种糖类成分的判定系数均大于 0.9998, 表明线性良好。

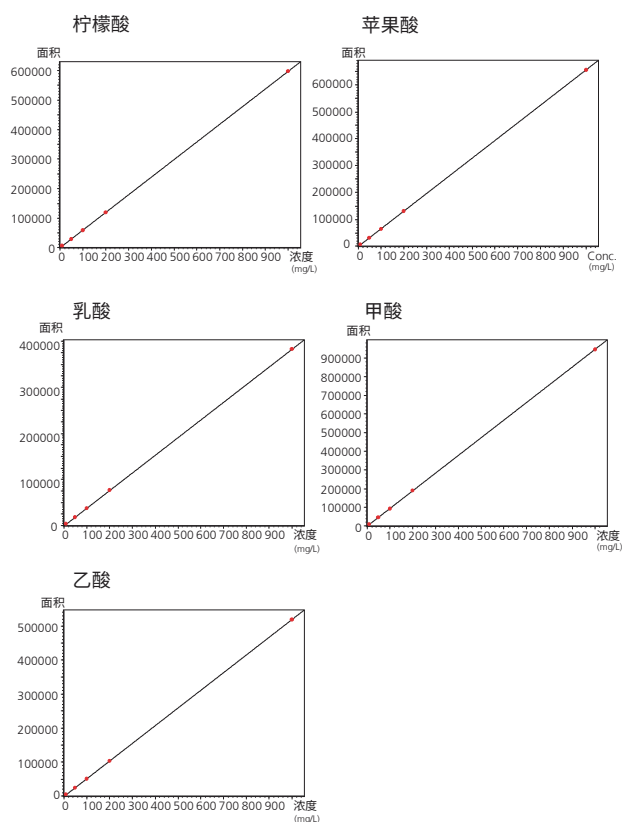


图 4 有机酸类校准曲线

表 5 有机酸类的线性

| 化合物 | 线性范围 (mg/L) | 系数 (R ²) |
|-----|-------------|----------------------|
| 柠檬酸 | 10-1000 | 0.9999 |
| 苹果酸 | 10-1000 | 0.9999 |
| 乳酸 | 10-1000 | 0.9999 |
| 甲酸 | 10-1000 | 0.9999 |
| 乙酸 | 10-1000 | 0.9999 |

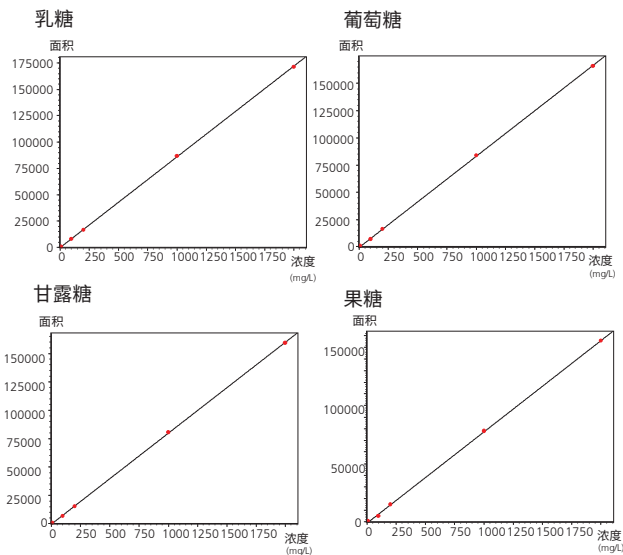


图5 糖类的校准曲线

表6 糖类的线性

| 化合物 | 线性范围 (mg/L) | 系数 (R^2) |
|-----|-------------|--------------|
| 乳糖 | 10-2000 | 0.9999 |
| 葡萄糖 | 10-2000 | 0.9999 |
| 甘露糖 | 10-2000 | 0.9998 |
| 果糖 | 10-2000 | 0.9998 |

进样残留评估

评估了有机酸类（柠檬酸和乳酸）和糖类（乳糖）残留。以超纯水进行进样针内部和外部清洗。

有机酸类残留评估结果如图6所示，糖类残留评估结果如图7所示。柠檬酸残留0.0055%，乳酸残留0.0069%，乳糖残留0.0098%，表明残留很少，足以证实其不影响定量结果。

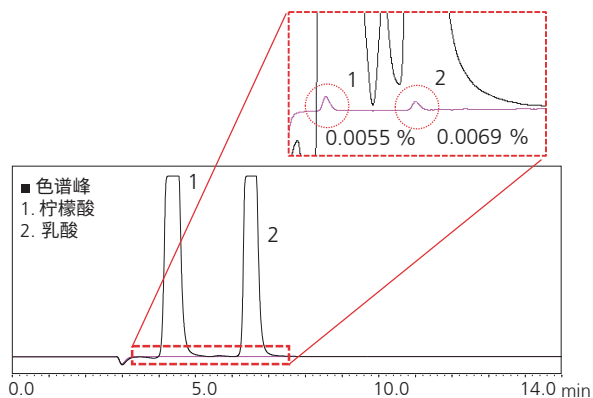


图6 柠檬酸和乳酸残留评估

黑线： 100 g/L 柠檬酸和乳酸的标准水混合溶液
 红线： 空白样品

黑线： 20 g/L乳糖水溶液
 红线： 空白样品

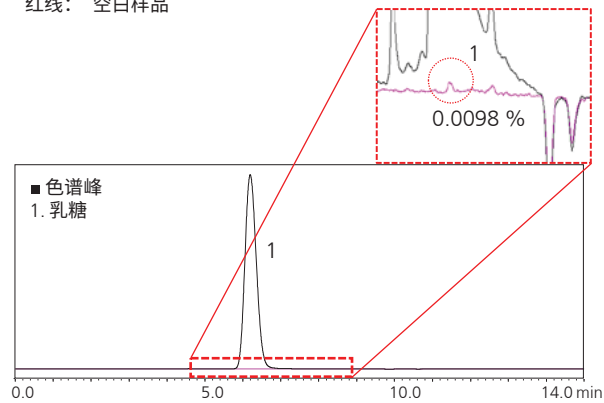


图7 乳糖残留评估

样本预处理

将酸奶添加到牛奶中，然后在商用酸奶机中将其加热至40℃进行发酵。随后，以固定时间间隔取样，得到样品。根据以下程序对样品进行预处理。

- (1) 称量1g酸奶。加入4 mL 5 mmol/L的对甲苯磺酸水溶液和1 mL 氯仿。
- (2) 剧烈摇晃1分钟，然后以10,000 rpm离心1分钟。
- (3) 收集上清液，并通过0.45 μm孔径过滤器过滤。
- (4) 滤液稀释十倍后待测。

酸奶分析

本文在发酵开始后以固定的时间间隔（0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0和8.5小时）分析样品。

发酵开始后3.5小时采集的样品中有机酸类的色谱图如图8所示，同一样品中糖类的色谱图如图9所示。检测到的有机酸类为柠檬酸和乳酸，检测到的糖类为乳糖。这些结果用于监测发酵过程。

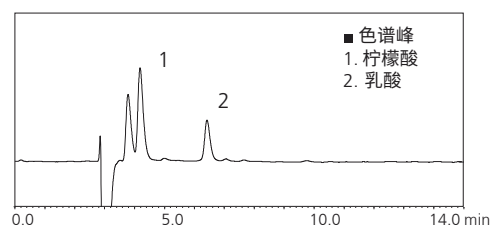


图8 发酵3.5小时后分析酸奶中有机酸类的色谱图

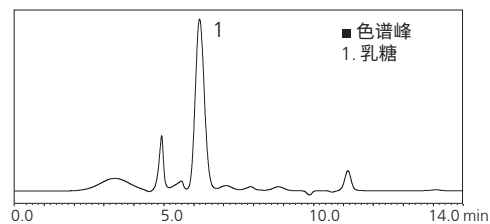


图9 发酵3.5小时后分析酸奶中糖类的色谱图

■ 酸奶回收率评估

用发酵开始后 3.5 小时采集的样品评估添加的有机酸类和糖类的回收率。在预处理过程的步骤 (1) 中, 称取 1g 酸奶。然后向酸奶中加入 2.6 mL 的 5 mmol/L 对甲苯磺酸水溶液、0.7 mL 的 400 mg/L 有机酸类混合物水溶液、0.7mL 的 2000 mg/L 糖类混合物水溶液和 1 mL 氯仿。有机酸类加标样品和未加标样品的色谱图如图 10 所示, 回收率如表 7 所示, 糖类加标样品和未加标样品的色谱图如图 11 所示, 回收率如表 8 所示。有机酸类和糖类的回收率良好, 均在 94.6% 至 101.8% 之间。

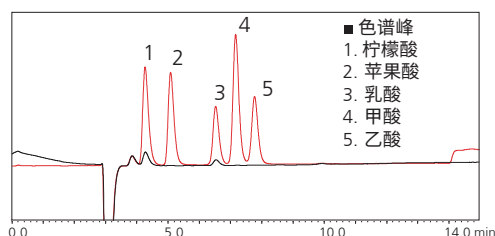


图 10 有机酸类的色谱图
(红色: 加标样品; 黑色: 未加标样品)

表 7 目标组分 (有机酸类) 的回收率
(添加剂浓度: 56 mg/L, 以预处理后的浓度计算)

| 化合物 | 加标样品的实际测量值 (mg/L) | 未加标样品的实际测量值 (mg/L) | 回收率 (%) |
|-----|-------------------|--------------------|---------|
| 柠檬酸 | 65.9 | 10.0 | 99.8 |
| 苹果酸 | 57.0 | 未检出 | 101.8 |
| 乳酸 | 61.4 | 8.4 | 94.6 |
| 甲酸 | 56.4 | 未检出 | 100.6 |
| 乙酸 | 56.1 | 未检出 | 100.3 |

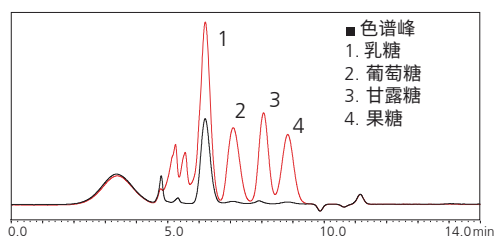


图 11 糖类的色谱图
(红色: 加标样品; 黑色: 未加标样品)

表 8 目标组分 (糖类) 的回收率
(添加剂浓度: 280 mg/L, 以预处理后的浓度计算)

| 化合物 | 加标样品的实际测量值 (mg/L) | 未加标样品的实际测量值 (mg/L) | 回收率 (%) |
|-----|-------------------|--------------------|---------|
| 乳糖 | 544.0 | 257.1 | 102.4 |
| 葡萄糖 | 282.4 | 未检出 | 100.9 |
| 甘露糖 | 301.5 | 未检出 | 107.7 |
| 果糖 | 298.6 | 未检出 | 106.6 |

■ 酸奶发酵过程中有机酸类和糖类含量变化监控

在发酵开始后以固定时间间隔 (0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0 和 8.5 小时) 取样进行分析, 以得到其中有机酸类和糖类的含量。

每个发酵间隔后有机酸类含量的变化如图 12 所示, 糖类含量的变化如图 13 所示。这些结果表明, 随着发酵的进行, 乳糖分解形成乳酸。

注意, 所示含量根据初始酸奶溶液换算得出。

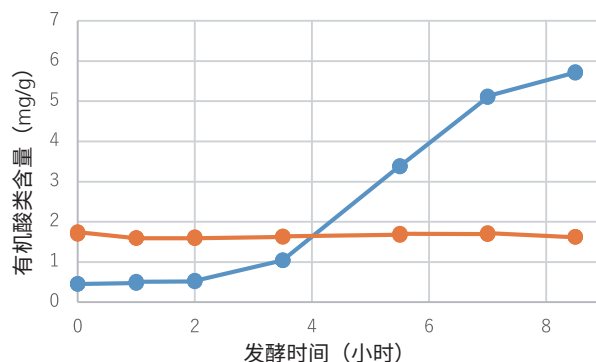


图 12 酸奶中有机酸类含量
(蓝色: 乳酸; 橙色: 柠檬酸)

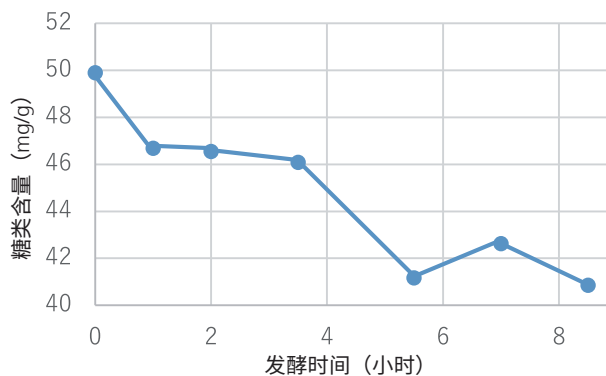


图 13 酸奶中糖类含量

■ 摘要

使用 Nexera 系列双进样系统, 可以在一个系统中同时执行两种不同类型的分析 (有机酸类分析和糖类分析)。使用双进样系统, 我们能够通过评估发酵过程中有机酸类和糖类含量水平的时程变化来监测发酵进程。双进样系统可同时分析相同样品中的不同类别化合物, 便于进行同一样品的多维度分析。

Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所在日本和 / 或其他国家的商标。

岛津应用云

