

Application News

No. L548

高效液相色谱法

Nexera™ 双进样系统监测发酵过程

微生物分解各种物质并产出有用的物质，这个过程称为发酵。近年来，除了食品以外，发酵也被广泛运用于工业领域。为理清发酵过程并优化其条件，对有机酸、糖、氨基酸等多种化合物进行了测定，展开了多方面分析。使用 HPLC 法时，由于不同的化合物所适用的分离模式以及检测方法各不相同，因此需要分别单独分析。本文介绍了一种使用双进样系统监测发酵过程的分析方法，在同一个系统中同时执行两种类型化合物的分析。

K. Koterawasa

■ 双进样系统的概要

利用 Nexera 的自动进样器 SIL-40 系列的可定制双进样功能，对独立的两条流路分别进样，同时进行不同条件的两个系统的分析。另外，本系统获得的两个结果可以汇总到一个数据文件中，确保了样品数据的可追溯性。方法文件、批处理文件也汇总到一个文件中，因此可以便捷的进行分析操作。

图 1 所示为双进样系统流路图。第一条流路使用了离子排斥色谱柱、柱后缓冲电导法、电导检测器对有机酸进行分析；第二条流路使用配体交换色谱柱、示差折光检测器对糖类进行分析。由于有机酸和糖类分析时柱温条件不同，因此分别使用两台 CTO-40S 柱温箱来控制温度。

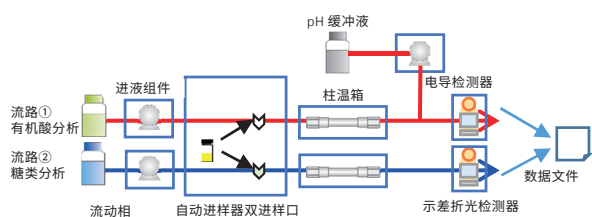


图 1 双进样系统流路图

■ 有机酸的分析

流路①对有机酸进行分析。图 2 所示为有机酸（柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、醋酸）的混合标准溶液（各 100 mg/L）的色谱图，表 1 为有机酸的分析条件。

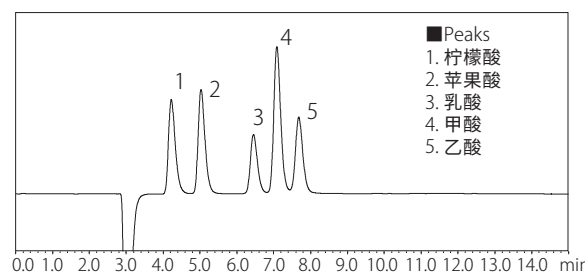


图 2 有机酸混合标准溶液的色谱图

表 1 有机酸的分析条件

色谱柱	: Shim-pack™ Fast-OA (100 mm L. × 7.8 mm I.D., 5 μm) (使用 2 根)
保护柱	: Shim-pack Fast-OA (G) (10 mm L. × 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 p- 甲苯磺酸水溶液
pH 缓冲液	: 5.0 mmol/L p- 甲苯磺酸 ⁺ 20 mmol/L Bis-Tris, 0.1 mmol/L EDTA 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 与柱后缓冲电导法的分析详情，请参考技术报告《使用 Shim-packFast-OA 与 pH 缓冲电导检测法对有机酸快速分析 (C190-0489) 》。

糖类的分析

流路②对糖类进行分析。图3所示为糖类（葡萄糖、果糖、甘露糖、乳糖）的混合标准溶液（各1000 mg/L）的色谱图，表2为糖类的分析条件。

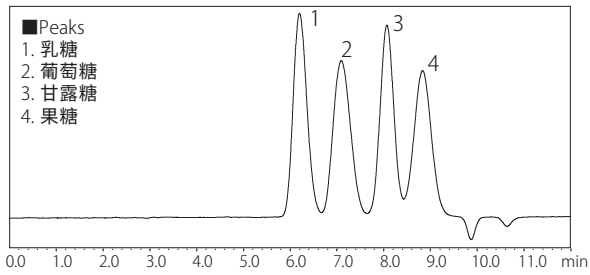


图3 糖混合标准溶液的色谱图

表2 糖类的分析条件

色谱柱	: Shim-pack SCR-101C (300 mm L. × 7.9 mm I.D., 10 μm)
保护柱	: Shim-pack 保护柱 SCR (C) (50 mm L. × 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

重复性

表3、表4分别显示了有机酸混合标准溶液（各200 mg/L）以及糖混合溶液标准溶液（各1000 mg/L）连续6次分析的保留时间和峰面积RSD%结果。所有成分的保留时间、峰面积RSD%相对标准偏差结果均小于1%。

表3 有机酸标准溶液分析结果 (n=6)

化合物名称	保留时间 平均 (分钟)	保留时间 %RSD	峰面积 %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 糖标准溶液分析结果 (n=6)

化合物名称	保留时间 平均 (分钟)	保留时间 %RSD	峰面积 %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所示为有机酸的标准曲线，表5为标准曲线的线性范围与相关系数。图5所示为糖类的标准曲线，表6为标准曲线浓度范围与相关系数。

有机酸的5个化合物及糖类的4个化合物相关系数均为 $R^2=0.9998$ 以上，线性良好。

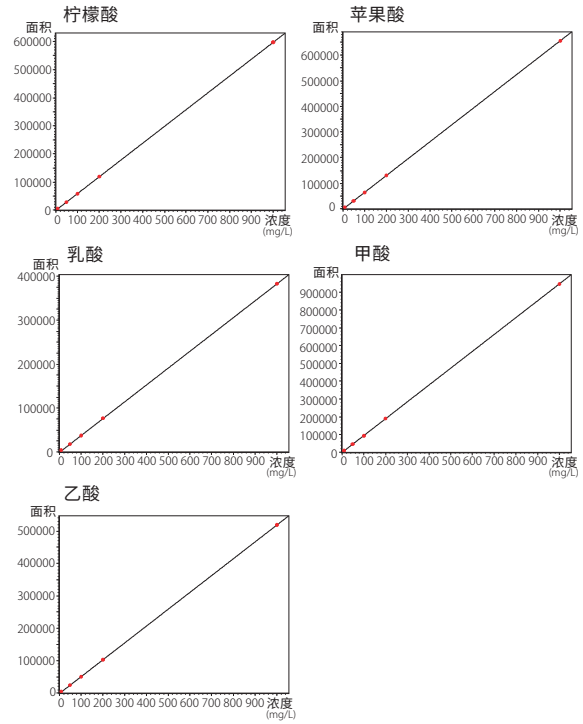


图4 有机酸的标准曲线

表5 有机酸的线性范围与相关系数 (R^2)

化合物名称	线性范围 (mg/L)	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

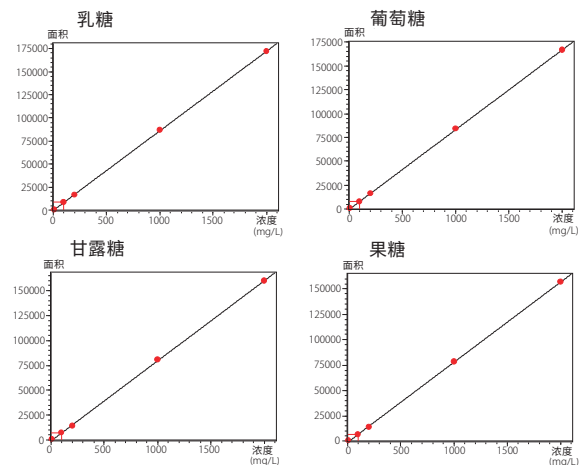


图5 糖类的标准曲线

表6 有机酸的检量范围与贡献率 (R^2)

化合物名称	线性范围 (mg/L)	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

■ 残留量评估

对有机酸（柠檬酸、乳酸）、糖（乳糖）的残留量进行了评估。清洗自动进样器时，在清洗液中加入水，将进样针内外壁清洗干净。

图6所示为有机酸的残留量评估结果，图7为糖类的残留量评估结果。结果表明，柠檬酸残留量为0.0055%、乳酸为0.0069%、乳糖为0.0098%，残留量小，不会对定量产生影响。

黑线：100 g/L 柠檬酸、乳酸混合标准水溶液
红线：空白溶液

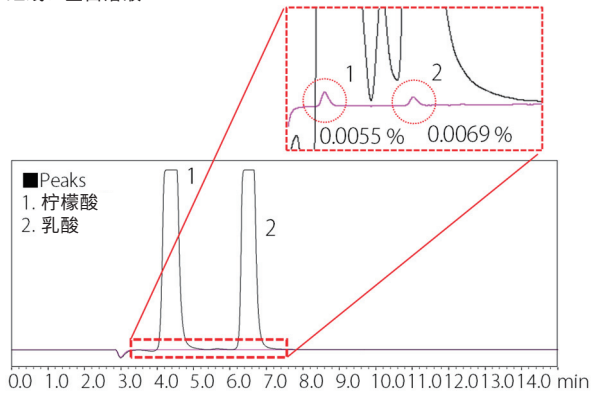


图6 柠檬酸、乳酸的残留量评估

黑线：20 g/L 乳糖水溶液
红线：空白溶液

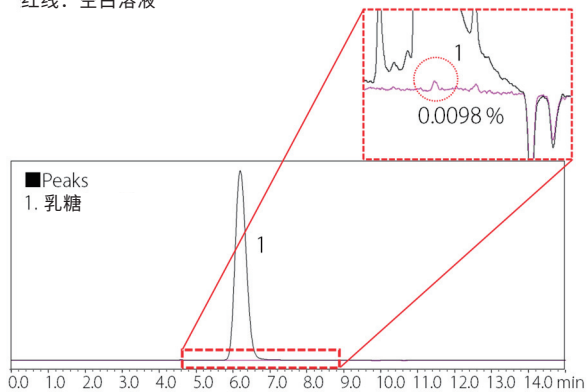


图7 乳糖的残留量评估

■ 样品的预处理

在牛奶中加入酸奶，放入酸奶制造机中，在40℃温度下进行发酵，每隔一定时间取样。预处理方法如下：

- (1) 称1 g 酸奶，加入5 mmol/L p- 甲苯磺酸水溶液4 mL和1 mL 氯仿；
- (2) 振荡1分钟，在10000 rpm 速度下进行离心；
- (3) 取上清液，用0.45 μm 微孔滤膜过滤；
- (4) 滤液用纯水稀释10倍，制成分析试样。

■ 酸奶的分析

对经过一定时间后（0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5小时）的试样进行分析。

图8所示为发酵3.5小时后的样品有机酸分析色谱图，图9为同一样品的糖类分析色谱图。结果表明，柠檬酸、乳酸及乳糖有检出。

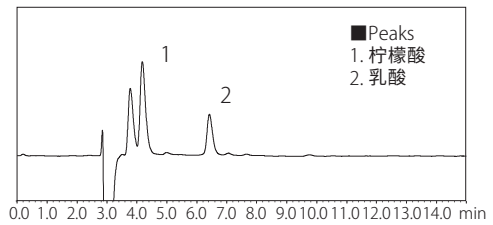


图8 发酵3.5小时的酸奶中有机酸分析色谱图

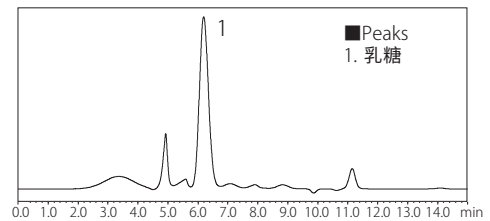


图9 发酵3.5小时的酸奶中糖类分析色谱图

■ 酸奶回收率试验

取发酵 3.5 小时的样品加入有机酸、糖类，进行回收率试验。在预处理操作 (1) 中，称 1 g 酸奶，加入 5 mmol/L p- 甲苯磺酸水溶液 2.6 mL、400 mg/L 有机酸混合水溶液 0.7 mL、2000 mg/L 糖混合水溶液 0.7 mL、氯仿 1 mL。图 10 所示为有机酸添加标准液的色谱图，表 7 为有机酸的回收率结果，图 11 为糖类添加标准液的色谱图，表 8 为糖类的回收率结果。有机酸和糖类的回收率达到 94.6-101.8%，结果良好。

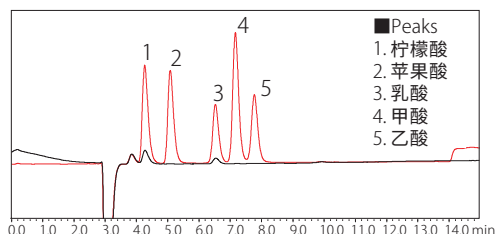


图 10 有机酸的色谱图
(红：添加标准液、黑：未添加标准液)

表 7 有机酸回收率结果
(添加量：预处理后浓度换算结果 56 mg/L)

化合物名称	有添加 浓度 (mg/L)	无添加 浓度 (mg/L)	回收率 (%)
柠檬酸	65.9	10.0	99.8
苹果酸	57.0	未检测出	101.8
乳酸	61.4	8.4	94.6
甲酸	56.4	未检测出	100.6
乙酸	56.1	未检测出	100.3

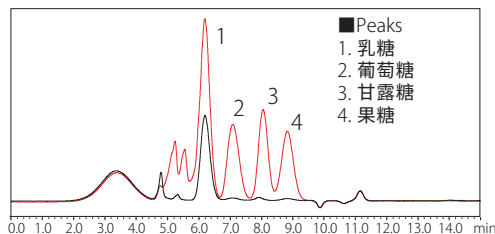


图 11 糖类的色谱图
(红：添加标准液、黑：未添加标准液)

表 8 糖类回收率结果
(添加量：预处理后浓度换算结果 280 mg/L)

化合物名称	有添加 浓度 (mg/L)	无添加 浓度 (mg/L)	回收率 (%)
乳糖	544.0	257.1	102.4
葡萄糖	282.4	未检测出	100.9
甘露糖	301.5	未检测出	107.7
果糖	298.6	未检测出	106.6

■ 酸奶发酵时间进程变化试验

对经过一定时间 (0.0、1.0、2.0、3.5、5.5、7.0、8.5 小时) 后的样品进行分析，确认了有机酸、糖类含量的时间进程变化。

图 12 所示为不同发酵时间下有机酸含量的变化，图 13 为糖类含量的变化。从结果可以发现，随着发酵的进程，乳糖发生分解，生成乳酸。

这里显示的浓度换算为酸奶原液的浓度。

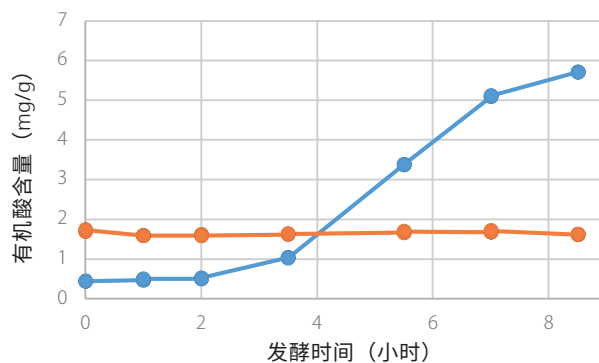


图 12 酸奶中有机酸的含量
(蓝：乳酸、橙：柠檬酸)

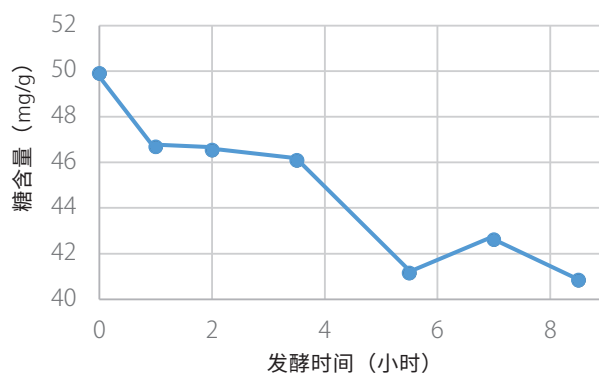


图 13 酸奶中糖类的含量

■ 结论

使用 Nexera 系列双进样系统，可以同时进行分析有机酸和糖类的分析。

使用该系统，可以评估酸奶发酵过程中的有机酸、糖含量的时间进程变化，对发酵进展情况监测。双进样系统可实现快速同时对多种化合物进行分析。

岛津应用云



Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2019 年 8 月