

文章编号:1673-9468(2008)04-0103-04

高效液相色谱法对发酵液中六种物质的同时测定

王鑫昕^{1,2}, 李 维²

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 2. 四川师范大学生命科学院, 成都 610066)

摘要:建立了简单且准确的高效液相色谱法对丙丁菌发酵过程相关的6种物质进行同时测定。采用 Aminex HPX-87H 型色谱柱, 柱温是 15℃, 流动相为 0.05 mmol/L 硫酸, 流速为 0.5 mL/min, 检测器选用示差折光检测器。在此条件下, 发酵液中的六种物质的峰面积与浓度线性关系良好, 相关系数(R^2)在 0.9991~1.000 之间, 回收率(η)为 99.34%~101.11%。通过对样品的分析可知, 发酵液中副产物乙酸、丁酸及底物葡萄糖质量浓度都较低, 丁醇、丙酮和乙醇的产量为丙酮丁醇梭菌发酵生产的一般水平, 各物质都得到良好分离, 全检测用时 45 min。

关键词:丁醇; 高效液相色谱; 示差折光检测器; 发酵液

中图分类号: Q819

文献标识码: A

The simultaneous determination of six substances involving butanol in fermentation broth using high performance liquid chromatography

WANG Xin-xin, LI Wei

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

Abstract: The simple and exact method for the determination of the six substances existing in the fermentation was founded by employing high performance liquid chromatography. The chromatographic separation was performed on Aminex HPX-87H with mobile phase of 0.05 mmol·L⁻¹ of Sulfuric acid at a flow rate of 0.5 ml·min⁻¹. Refractive index detector was chosen, and the column temperature was 15℃. In this separation condition, a good linear relationship exists between the peak area of six substances and their concentrations with correlation coefficient ranging from 0.9991~1, and the recovery is form 99.34% to 101.11%. By the analyzing the samples, concentration of accessory production such as acetate, butyrate and the reactant glucose were entirely in a low level, meanwhile, the yields of the butanol, acetone and ethanol are close to the normal level. Suitable separation among the six substances were achieved, and the whole operation was consumed within 45 minutes.

Key words: butanol; HPLC; refractive index detector;

能源短缺正制约着我国的经济发展和影响着国家的战略安全, 因此寻找廉价、清洁、可再生的替代燃料迫在眉睫。丁醇作为一种重要的化工原料和新型生物燃料, 以其极大的潜力吸引着国内外众多生物实验室致力于发酵法生产丁醇的研究。

发酵法是以粮食为原料, 经丙酮丁醇梭菌发酵, 发酵后得到的主要目的产物丙酮、丁醇和乙醇的质量比一般为 3:6:1, 且这三种物质的总溶剂产

量一般为 15 g/L^[1], 最后精馏获得较纯产物; 此发酵过程中常会有乙酸、丁酸等副产物的生成^[1], 此类副产物含量的确定, 对于确定菌种代谢方式、朝向工业期望的方向引导代谢途径有非常重要的作用。同时发酵液中残余葡萄糖含量的测定, 也是用于衡量底物利用率的重要参数。基于上述考虑, 较快捷的测量发酵过程中以上各物质的含量, 是优化发酵法生产丁醇的一个基础环节。目前除

收稿日期: 2008-09-05

作者简介: 王鑫昕(1982-), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 从事生物化学和发酵研究。

了对盐酸四环素原料药用气相色谱法仅测量残留正丁醇的研究外^[2],国内尚未见到有关高效液相色谱法同时测量丙酮、丁醇、乙醇、乙酸、丁酸和葡萄糖含量的报道。在发酵工业或医药领域,有许多关于高效液相色谱法测定单一物质含量的方法^[3,4],借助高效液相色谱法同时测定多种物质含量的研究也逐步摸索出有效的实验方法。辛梅华等^[5]采用高效液相色谱法,对蔗渣水解液及发酵液中多种糖或糖醇进行了分析,操作较气相色谱法简单省时^[6],且误差小;此外,准确分析了各自发酵产物的含量^[7-8],精确测定了中药络石藤中生物活性物质黄酮苷元的成分^[9],也均是通过高效液相色谱法建立了简便、准确、灵敏、稳定的测定方法。本文基于高效液相色谱法对丙丁菌发酵液中的6种物质进行了分析测量实验,其快速测定发酵过程中相关的小分子醇酮酸的方法为发酵法生产丁醇的进一步研究打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Aminex HPX - 87H 柱(美国 Bio - Rad 公司), Eppendorf 5415D 离心机(德国 Eppendorf 公司), AL204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), Purelab UHQ 纯水仪(英国 ELGA LabWater 公司), 100 - 1000 μ l 微量移液器(德国 Eppendorf 公司), 0.2 μ m 水性过滤膜(英国 Whatman 公司)。

1.2 试剂

硫酸(分析纯,上海试剂总厂),丁醇、乙醇、丙酮(色谱纯,美国 Sigma - Aldrich 公司),葡萄糖、乙酸、丁酸标准品(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 色谱条件

Aminex HPX - 87H 型色谱柱,柱温为 15 $^{\circ}$ C,流动相为 0.05 mmol \cdot L⁻¹的硫酸,先后经抽滤、超声波脱气 15 min 处理,流速为 0.5 ml \cdot min⁻¹,检测器为示差折光检测器,进样量 20 μ l。

1.4 标准曲线的绘制^[10]

分别准确称取丁醇 25.0000 g,丙酮 10.0000

g,乙醇 5.0000g,葡萄糖 15.0000g,丁酸 5.0000g 和乙酸 5.0000g,用超纯水定容于 1 L 的容量瓶中,配成丁醇、丙酮、乙醇、葡萄糖、丁酸和乙酸的标准混合储备液(如表 1)。此标准混合储备液按表 1 用超纯水稀释,配成相应质量浓度的标准混合液。所有标准混合液上样前用 0.2 μ m 水性滤膜过滤到进样瓶中,以备自动进样。

1.5 样品制备

取一定体积的丙丁菌发酵上清液,以 12 000 r \cdot min⁻¹转速离心 10 min 后,吸取上清液用 0.2 μ m 水性滤膜过滤 2 次,备用。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析

通过流动相的酸浓度、柱温及流速等条件的多次改变尝试,得到 1.3 中的色谱条件为分离葡萄糖、乙酸、乙醇、丁酸、丙酮和丁醇 6 种物质的最佳色谱条件。在此色谱条件下,以含 5g \cdot L⁻¹丁醇, 2g \cdot L⁻¹丙酮, 1g \cdot L⁻¹乙醇, 3g \cdot L⁻¹葡萄糖, 1g \cdot L⁻¹乙酸和 1g \cdot L⁻¹丁酸的标准混合液上 HPLC, 进样 20 μ l。六种物质的保留时间依次为:葡萄糖 10.444 min, 乙酸 17.801 min, 乙醇 22.674 min, 丁酸 25.760 min, 丙酮 26.709 min 和丁醇 39.373 min(图 1)。

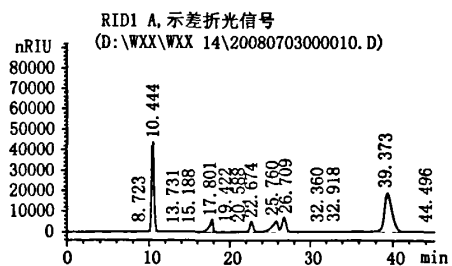


图1 标准混合液的高效液相色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of standard solution

2.2 标准曲线的制作

按最佳色谱条件进行标准样品的测定,其线性回归方程、相关系数(R^2)及线性范围分别如表 2 所示。表 2 中, y 为峰面积, x 为样品质量浓度。在线性范围内,6 种物质均有良好的线性关系。

表1 标准混合储备液及标准混合液浓度表

Tab.1 Substances concentrations in the standard stored solution and standard mixed solutions

溶液	质量浓度/(g·L ⁻¹)					
	丁醇	丙酮	乙醇	葡萄糖	乙酸	丁酸
标准混合储备液	25.0000	10.0000	5.0000	15.0000	5.0000	5.0000
	20.0000	8.0000	4.0000	12.0000	4.0000	4.0000
标准混合液	10.0000	4.0000	2.0000	6.0000	2.0000	2.0000
	5.0000	2.0000	1.0000	3.0000	1.0000	1.0000
	1.0000	0.4000	0.2000	0.6000	0.2000	0.2000

表2 丁醇等6种物质的线性回归方程

Tab.2 Linear regression equation of the six substances

物质	线性回归方程	R ²	线性范围/(g·L ⁻¹)
丁醇	y = 216 378x + 92 140	0.9991	0.0000 ~ 25.0000
丙酮	y = 151 330x - 14 524	0.9998	0.0000 ~ 10.0000
乙醇	y = 152 742x + 14 185	0.9990	0.0000 ~ 5.0000
葡萄糖	y = 330 223x + 10 062	1.0000	0.0000 ~ 15.0000
乙酸	y = 190 682x + 17 916	0.9993	0.0000 ~ 5.0000
丁酸	y = 294 970x + 14 990	0.9998	0.0000 ~ 5.0000

表3 标准混合液样品的相对标准偏差

Tab.3 Relatively standard deviation of the standard mixed solution

物质	标准混合液中浓度/(g·L ⁻¹)	C _s /(g·L ⁻¹)	RSD%
丁醇	10.0000	9.9975	0.53
丙酮	4.0000	4.0263	0.59
乙醇	2.0000	2.0080	0.63
葡萄糖	6.0000	5.9424	0.69
乙酸	2.0000	2.0317	1.01
丁酸	2.0000	2.0079	0.89

表4 标准混合溶液样品的空白加标回收率

Tab.4 Recovery tests of standard mixed solution

物质	3次分别测量的浓度/(g·L ⁻¹)			C _s /(g·L ⁻¹)	η/%
	1	2	3		
丁醇	10.0278	10.0072	10.0513	10.0288	100.29
丙酮	3.9845	4.0340	4.0311	4.0177	100.44
乙醇	1.9986	2.0019	2.0078	2.0028	100.14
葡萄糖	5.9614	5.9636	5.9570	5.9607	99.34
乙酸	2.0025	2.0356	2.0287	2.0222	101.11
丁酸	2.0021	2.0168	2.0074	2.0089	100.44

2.3 准确度及精密度实验

取含 10g·L⁻¹丁醇的混合标准样品,按选定色谱条件进行测定,以峰面积外标法定量,连续重复进样5次。5次测量浓度的平均值(C_s)如表3所

示,计算相对标准偏差(RSD)均小于1.01%,表明该方法精密度良好。由3次测量结果计算的平均值(C_s)及空白加标回收率(η)如表4所示,在99.34%~101.11%,说明此方法准确度亦较高。

表5 丁醇加标回收率实验结果 (n=9)

Tab.5 Results obtained in the recovery test of butanol (n=9)

初始浓度/(g·L ⁻¹)	样品量/g	添加量/g	测得量/g	测量的浓度/(g·L ⁻¹)	η /%	η /%	RSD/%
9.7926	0.0147	0.0120	0.0266	17.7182	99.07	99.66	2.63
		0.0126	0.0270	18.0094	97.82		
		0.0143	0.0285	18.9786	96.36		
		0.0143	0.0290	19.3622	100.38		
		0.0150	0.0294	19.5815	97.89		
		0.0157	0.0306	20.3914	101.26		
		0.0169	0.0319	21.2911	102.06		
		0.0192	0.0348	23.1782	104.58		
		0.0196	0.0338	22.9928	97.49		

2.4 6种物质的测定及加标回收率

取发酵后的样品,按照1.5的方法进行样品的处理,处理后精确取样品10份,每份均为1500 μ L,对其中一份按1.3的色谱条件进行测定,以峰面积外标法定量,重复3次测量并求平均值:丁醇9.7926 g/L,丙酮5.5363 g/L,乙醇1.1180 g/L,葡萄糖0.2229 g/L,乙酸0.2929 g/L,丁酸0.8299 g/L。

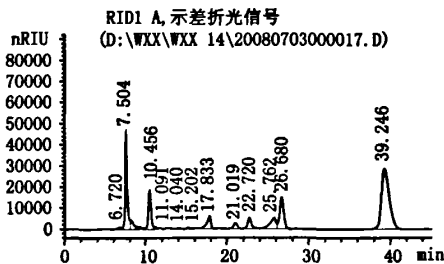


图2 实际样品的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of practical samples

余下的9份样品中,每一份样品中6种物质浓度均为上述样品测得的平均浓度。向9份样品中分别加入一定量的丁醇标准品,按照选定的色谱条件进行分析,以峰面积外标法定量,计算加标回收率,结果详见表5。

从表5可知,回收率(η)在96.36%~104.58%之间,平均回收率为99.66%,相对标准偏差(RSD)为2.63%。葡萄糖,乙酸,乙醇,丁酸,丙酮的按和丁醇的相同的方法得到,结果分别为100.02%,99.37%,99.86%,100.12%和100.08%。

3 结论

上述结果表明,HPLC可以同时测定发酵液中

存在的丙酮、丁醇、乙醇、乙酸、丁酸和葡萄糖6种物质浓度,分离效果好,分析速度较快,而且此方法测定这6种物质的准确度和精密度都较高,可以准确定量;对样品制备的简单操作也成为基于HPLC测量发酵液中丁醇等物质浓度的另一个优点。

参考文献:

- [1] DAVID T JONES, DAVID R WOODS. Acetone - butanol fermentation revisited[J]. Microbiological Reviews, 1986, 50(4): 484 - 524.
- [2] 李红林,岳光. 盐酸四环素原料药中残留正丁醇测定方法的改进[J]. 四川师范学院学报,2002,23(4): 385 - 387.
- [3] 孙雷,彭华松,程凡,等. 高效液相色谱法快速测定发酵液中的藤黄绿菌素[J]. 上海交通大学学报,2007, 41(2):325 - 327.
- [4] 饶志明,徐美娟,沈微,等. 高效液相色谱法测定发酵液中1,3-二羟基丙酮(DHA)方法的建立[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(1):61 - 64.
- [5] 辛梅华,徐金瑞,方柏山,等. 蔗渣水解液及发酵液中糖及糖醇的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 1997,16(6):44 - 46.
- [6] 王彦中,穆惠玲. 气相色谱测定土壤中的糖[J]. 色谱, 1994,12(6):438 - 439.
- [7] 余晓芬,刘英丽,程珊影,等. 麦糟水解液中单糖及脂肪酸的HPLC分析[J]. 华侨大学学报,2007,28(4):403 - 405.
- [8] 张建国,王学东,魏东芝. 高效液相色谱法同时测定发酵过程中腺苷甲硫氨酸相关的六种物质[J]. 工业微生物,2008,38(1):6 - 9.
- [9] 李星霞,万丽丽,朱金辉,等. HPLC法测定络石藤中黄酮苷元成分[J]. 中国药房,2008,19(6):436 - 438.
- [10] 张晓彤,云自厚. 液相色谱检测方法[M]. 北京:化学工业出版社,2000.

(责任编辑 刘存英)

高效液相色谱法对发酵液中六种物质的同时测定

作者: [王鑫昕](#), [李维](#), [WANG Xin-xin](#), [LI Wei](#)
作者单位: [王鑫昕, WANG Xin-xin\(中国科学院微生物研究所, 北京, 100101\)](#), [李维, LI Wei\(四川师范大学, 生命科学院, 成都, 610066\)](#)
刊名: [河北工程大学学报\(自然科学版\)](#) 
英文刊名: [JOURNAL OF HEBEI UNIVERSITY OF ENGINEERING \(NATURAL SCIENCE EDITION\)](#)
年, 卷(期): 2008, 25 (4)
被引用次数: 2次

参考文献(10条)

1. DAVID T JONES; DAVID R WOODS [Acetone-butanol fermentation revisited](#) 1986(04)
2. 李红林; 岳光 [盐酸四环素原料药中残留正丁醇测定方法的改进](#) [期刊论文]-[四川师范学院学报](#) 2002(04)
3. 孙雷; 彭华松; 程凡 [高效液相色谱法快速测定发酵液中的藤黄绿菌素](#) [期刊论文]-[上海交通大学学报](#) 2007(02)
4. 饶志明; 徐美娟; 沈微 [高效液相色谱法测定发酵液中1, 3-二羟基丙酮\(DHA\)方法的建立](#) [期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2008(01)
5. 辛梅华; 徐金瑞; 方柏山 [蔗渣水解液及发酵液中糖及糖醇的高效液相色谱分析](#) [期刊论文]-[分析测试学报](#) 1997(06)
6. 王彦中; 穆惠玲 [气相色谱测定土壤中的糖](#) [期刊论文]-[色谱](#) 1994(06)
7. 余晓芬; 刘英丽; 程珊影 [麦糟水解液中单糖及脂肪酸的HPLC分析](#) [期刊论文]-[华侨大学学报](#) 2007(04)
8. 张建国; 王学东; 魏东芝 [高效液相色谱法同时测定发酵过程中腺苷甲硫氨酸相关的六种物质](#) [期刊论文]-[工业微生物](#) 2008(01)
9. 李星霞; 万丽丽; 朱金辉 [HPLC法测定络石藤中黄酮苷元成分](#) [期刊论文]-[中国药房](#) 2008(06)
10. 张晓彤; 云自厚 [液相色谱检测方法](#) 2000

本文读者也读过(6条)

1. 李俊. [LI Jun HPLC-RID法测定氨基葡萄糖盐酸盐的含量](#) [期刊论文]-[海峡药学](#) 2011, 23(2)
2. 孟婧姝. 王敏. [MENG Jing-yao. WANG Min 高效液相色谱法测定发酵液中醋酸可的松及醋酸泼尼松的含量](#) [期刊论文]-[药物生物技术](#) 2007, 14(1)
3. 王俊华. 杨洁. 申彤. [Wang Jun-hua. Yang Jie. Shen Tong 乳酸发酵胡萝卜汁中有机酸的HPLC测定](#) [期刊论文]-[现代食品科技](#) 2006, 22(4)
4. 王立东. 张克诚. 石义萍. 崔增杰. 张思林. [WANG Li-dong. ZHANG Ke-cheng. SHI Yi-ping. CUI Zeng-jie. ZHANG Si-lin 高效液相色谱法测定发酵液中的武夷菌素](#) [期刊论文]-[农药](#) 2008, 47(11)
5. 孙雷. 彭华松. 程凡. 许煜泉. 张雪洪. [SUN Lei. PENG Hua-song. CHENG Fan. XU Yu-quan. ZHANG Xue-hong 高效液相色谱法快速测定发酵液中的藤黄绿菌素](#) [期刊论文]-[上海交通大学学报](#) 2007, 41(2)
6. 努尔古丽. 冉竹叶. 赵小峰. 朱静. 于娟. 马越. [NUER Gu-li. RAN Zhu-ye. ZHAO Xiao-feng. ZHU Jing. YU Juan. MA Yue 高效液相色谱法定量测定采油微生物发酵菌液中的有机酸](#) [期刊论文]-[分析测试技术与仪器](#) 2007, 13(2)

引证文献(2条)

1. [王丽华](#) [高效液相法测定酸水解茺花黄酮苷元含量分析](#) [期刊论文]-[科学与财富](#) 2011(5)
2. [郝秀艳](#). [王升](#) [酸水解茺花中黄酮苷元的含量分析](#) [期刊论文]-[中国科技纵横](#) 2011(12)