

高效液相色谱法对泡菜中 L-乳酸和 D-乳酸的手性分离和测定

刘冬梅¹, 吴晖¹, 余以刚¹, 李晓凤¹, 郭文洁², 曾伟杰²

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 广州菲罗门科学仪器有限公司, 广东 广州 510620)

摘要: 采用高效液相法和手性分离柱对泡菜发酵上清液中的 L-乳酸和 D-乳酸进行分离和测定。泡菜的培养上清液用 8000 r/min 离心 20 min, 再用 0.45 μm 滤膜过滤。滤液用配备二极管阵列检测器的高效液相系统检测, 检测波长为 254 nm。检测色谱柱为手性柱 Chirex 3126 (D)-penicillami (4.6 mm i.d.×250 mm L, 5 μm), 流动相为 2 mmol/L CuSO₄ 溶液 (溶剂为 5% 的异丙醇溶液)。L-乳酸和 D-乳酸的标准曲线在 2.5~20.0 g/L 范围线性良好, 两者的线性相关系数都为 0.999。泡菜滤液的 L-乳酸和 D-乳酸的回收率分别是 99.82% 和 100.02%。该方法操作简便, 精密度和准确度高, 适用于泡菜中 L-乳酸和 D-乳酸的测定。

关键词: L-乳酸; D-乳酸; 高效液相色谱; 手性柱; 泡菜

中图分类号: TS255.54; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)08-0074-03

Chiral Separation and Determination of L-and D-lactic Acid in Pickles by High-performance Liquid Chromatography

LIU Dong-mei¹, WU Hui¹, YU Yi-gang¹, LI Xiao-feng¹, GUO Wen-jie², ZENG Wei-jie²

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou FLM Scientific Instrument Co., Ltd, Guangzhou 510620, China)

Abstract: A new method for the separation and determination of L- and D-lactic acid in pickles supernatants by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a chiral column was studied here. The culture supernatants of pickles were centrifuged for 20 min at 8000 r/min and the supernatant fractions were filtered through a 0.45 μm membrane. The samples were then analyzed by HPLC on chiral columns with a PDA detector at 254 nm. High separation efficiency was achieved by using a Chirex 3126 (D)-penicillami column (4.6 mm ID×250 mm L, 5 μm) and a mobile phase consisting of CuSO₄ (2 mmol/L) and isopropyl alcohol-water (5:95). The calibration curves of L- and R- lactic acid were linear with regressions being of 0.999 in the concentration range of 2.5~20.0 g/L. The average recovery was 99.82% for D--lactic acid and 100.02% for L-lactic acid in filtrate of pickles. The method was simple and easy to operate with high accuracy and reproducibility and it was suitable for detection the concentration of L- and D-lactic acid in pickles.

Key words: L-lactic acid; D-lactic acid; HPLC; chiral column; pickles

乳酸 (Lactic acid) 学名 2-羟基丙酸, 结构式为 CH₃CHOHCOOH, 相对分子质量为 90.08, 由于分子内含有一个不对称碳原子, 因此具有旋光异构现象^[1], 如图 1, 可区分为 L-乳酸和 D-乳酸, 当两者以等比例混合时, 即成为内消旋的 DL-乳酸。由于人体只有代谢 L-乳酸的 L-乳酸脱氢酶, 世界卫生组织提倡在食品及医药行业中使用 L-乳酸取代目前普遍使用的 DL-乳酸^[1], WHO 明确规定, 人体每天摄取 D-乳酸的量限制在 100 mg/kg 体重以下, 而对 L-乳酸不加限制^[2]。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20676042)

作者简介: 刘冬梅 (1971-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品微生物及食品安全的教学及研究工作

另外, 高光学纯度的聚 L-乳酸在骨外科、人造手术缝合线、血管外科及药物控制缓释材料等方面具有良好的应用前景^[3]。所以, 对乳酸对映异构体进行拆分研究, 建立快速、灵敏、分离性能好的测定方法是一个具有理论及实际意义的课题。L-乳酸含量的测定方法中有酶法^[4]、EDTA 定钙法¹和高效液相法, 其中酶法测定步骤多, 酶易失活, 测定误差大; EDTA 定钙法测量误差大, 对乳酸的两种对映体无法精确定量, 如果采用普通的有机酸色谱柱, 也无法区分乳酸的两种对映体。用手性柱的 HPLC 方法分离乳酸对映异构体还未见报道。本文利用手性色谱柱中青霉胺与二价铜离子配位体, 对乳酸的两种对映体的络合能力的不同

[4], 将 L-乳酸和 D-乳酸进行拆分并定量, 利用该法分析接种干酪乳杆菌发酵的泡菜液中的乳酸含量。

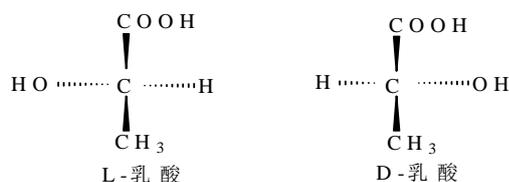


图 1 L-乳酸和 D-乳酸结构式

Fig.1 Mocular structure of L-lactic acid and D-lactic acid

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪系统, 配备 waters 600 泵多通道输送系统; waters 717 自动进样器; waters 2996 PDA 二极管阵列检测器; 色谱柱: 手性柱 Chirex 3126 (D)-penicillami, 4.6 mm ID×250 mm L; L-乳酸 (色谱纯, 98%纯度) (Sigma-Aldrich 公司出品); D-乳酸 (色谱纯, 93%纯度) (Sigma-Aldrich 公司出品); 异丙醇 (天津市科密欧化学试剂开发中心); 接种干酪乳杆菌发酵的泡菜 (自制)。

1.2 色谱条件

参照文献^[7,8], 流动相 2 mmol/L CuSO₄ 溶液 (溶剂为 5% 的异丙醇溶液), 使用前经 0.45 μm 滤膜过滤, 超声脱气; 流动相流速为 0.7 mL/min; 柱温 30 °C; 二极管阵列 Waters 2996, 检测波长为 254 nm; 标准和样品溶液用前均经过 0.45 μm 滤膜过滤后超声脱气; 进样量为 2 μL; 用 Empower 积分软件积分。

1.3 流动相的配制

2 mmol/L 的 5% 异丙醇溶液配制, 称取 CuSO₄·5H₂O 0.49936 g, 加 50 mL 双蒸水溶解, 转移置 1000 mL 的容量瓶中, 加入 50 mL 的色谱纯异丙醇, 再用双蒸水定容至 1000 mL, 用 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯膜进行真空超滤, 超声波脱气。

1.4 标准溶液制备

将标准 L-乳酸用 10 mL 的容量瓶分别配成 2.5 g/L、5.0 g/L、10 g/L 和 20 g/L 的标准溶液, 将标准 D-乳酸品用 10 mL 的容量瓶分别配成 0.5 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L 和 2.5 g/L 的标准溶液, 放置 3~4 °C 温度保存。

1.5 样品预处理

将不同发酵时间的泡菜液, 在 8000 r/min 下离心 15 min, 上清液再通过 0.45 μm 滤膜过滤, 取 1 mL 滤液进行适当稀释, 然后超声脱气, 即为待测液。

1.6 定性与定量

将相同色谱条件下的样品色谱图与乳酸标准液色

谱图进行对照, 根据保留时间确定样品中的 L-乳酸、D-乳酸。用外标法定量, 计算出样品中 L-乳酸和 D-乳酸的含量。

2 结果与讨论

2.1 标样及样品的分离色谱图

L-乳酸和 D-乳酸标准品的 HPLC 图谱如图 2 所示, L-乳酸的出峰时间为 20.2 min, D-乳酸的出峰时间约为 25.0 min, 根据乳酸标准品的浓度和峰面积, 得 L-乳酸标准曲线方程为 $Y=1024976.5035 X$, 回归系数 $R^2=0.999$; D-乳酸的标准曲线方程为 $Y=464480.6957 X$, 回归系数 $R^2=0.999$ 。式中 X 为乳酸浓度 (g/L), Y 为乳酸的峰面积。

根据标准曲线方程和图 2 的出峰时间与峰面积, 可计算 L-乳酸和 D-乳酸的含量, 可知本研究的接种干酪乳杆菌 LCR 719 的泡菜在发酵过程中以产生 L-乳酸为主, L-乳酸的含量占乳酸总量的 91% 以上。本研究利用手性柱 Chirex 3126 检测 L-乳酸和 D-乳酸, Chirex 3126 是一种配体交换柱, 以固相化与过渡金属离子 (Cu²⁺) 配位的配体为固定相, 基于流动相中的配体与固定相的配体间交换平衡以及稳定性来分离 L-乳酸和 D-乳酸^[4]。

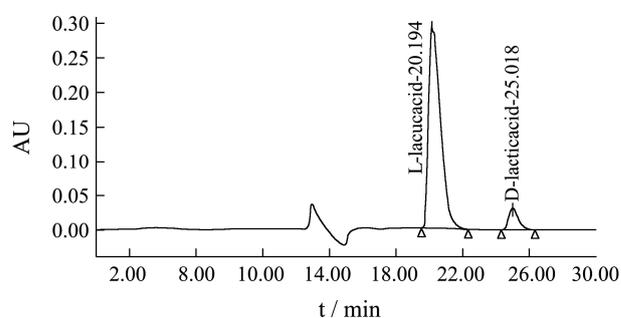


图 2 L-乳酸和 D-乳酸标准样品 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC profile of standard samples of L-and D-lactic acid

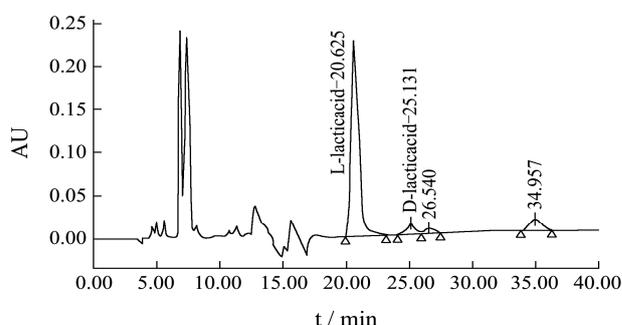


图 3 发酵 48 h 后泡菜滤液的 L-乳酸和 D-乳酸的色谱图

Fig.3 HPLC profile of L- and D-lactic acid of filtrate in pickles fermented for 48 h

2.2 标准样品的重复性

以 2 mmol/L 的 CuSO₄ 溶液作为流动相（流动相溶剂为 5% 的异丙醇溶液），分析条件同 1.2，分别进标准样 L-乳酸，D-乳酸 6 次，两种异构体保留时间的

相对标准偏差 RSD 见表 1，结果表明，本方法可以同时分析 L-乳酸和 D-乳酸，相对标准偏差分别为 0.83% 和 0.32%，重复性好。

表 1 保留时间的重复性

Table 1 Reproducibility of retention time

样品	保留时间 (min)						平均/min	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
L-乳酸	20.194	20.250	20.284	20.450	20.525	20.620	20.390	0.83
D-乳酸	25.018	25.050	25.132	25.135	25.200	25.225	25.127	0.32

2.3 测定样品的回收率和精密度

取处理后的滤液样品，分成 3 份，其中 1 份做本底量，另外 2 份各添加已知量的标准样品，分别测出乳酸在样品中的含量，再根据检测量计算出乳酸的回

收率和精密度，结果见表 2，实验结果表明，L-乳酸的回收率在 99.48%~100.16% 之间，D-乳酸的回收率在 99.72%~100.32% 之间。

表 2 乳酸回收率试验

Table 2 The recoveries of lactic acid (n=5)

样品	样品值/(g/L)	加入值/(g/L)	1	2	3	4	5	平均回收率/%	精密度 RSD/%
L-乳酸	13.003	5.000	4.980	4.900	5.020	5.001	4.970	99.48	0.82
L-乳酸	13.003	5.000	5.000	5.060	4.950	4.980	5.050	100.16	0.83
D-乳酸	1.206	0.500	0.495	0.495	0.497	0.501	0.505	99.72	0.78
D-乳酸	1.206	0.500	0.499	0.497	0.502	0.500	0.51	100.32	0.90

2.4 样品中 L-乳酸的测定

根据 L-乳酸和 D-乳酸的出峰时间和峰面积，可得到两者在泡菜中的含量，如表 3。可看出，随着发酵时间的延长，L-乳酸的含量不断升高，到 24 h 趋于稳定，24~48 h 稳定在 12.740~12.918 g/L 之间。D-乳酸含量先升高到 24 h 的 0.901 g/L，然后慢慢下降为一定值为 0.778 g/L。

表 3 泡菜发酵过程中 L-乳酸和 D-乳酸的含量

Table 3 Concentration of L- and D-lactic acid in pickles during the fermentation

发酵时间/h	8	16	24
L-乳酸/(g/L)	7.940	10.561	12.740
D-乳酸/(g/L)	0.762	0.770	0.901
发酵时间/h	32	40	48
L-乳酸/(g/L)	12.916	12.901	12.918
D-乳酸/(g/L)	0.878	0.778	0.778

3 结论

因此，本文采用高效液相法和手性柱可以将泡菜发酵上清液中的 L-乳酸和 D-乳酸分开。L-乳酸和 D-乳酸的标准曲线在 2.5~20.0 g/L 范围内线性良好，两

者的线性相关系数为 0.999。泡菜滤液的 L-乳酸和 D-乳酸的回收率分别是 99.82% 和 100.02%。方法简洁、易操作、精密度和准确度高，适用于泡菜中 L-乳酸和 D-乳酸的测定。

参考文献

- [1] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007,74 (3):524-534
- [2] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications [J]. Food Technology and Biotechnology, 2006,44 (2):163-172
- [3] Agrawal AK, Bhalla R. Advances in the production of poly (lactic acid) fibers [J]. Journal of Macromolecular Science-polymer reviews C, 2003,43(4): 479-503
- [4] Omole OO, Brocks DR, Nappert G, et al. High-performance liquid chromatographic assay of (L)-lactic acid and its enantiomers in calf serum [J]. Journal of Chromatograph B, 1999,727:23-29