

# 高效液相色谱法测定发酵液中 3-羟基丁酮

汤丹丹,王腾飞,王瑞明

(齐鲁工业大学 山东省微生物工程重点实验室,山东 济南 250353)

**摘要:**针对生物法制备3-羟基丁酮的微生物发酵体系,研究了利用高效液相色谱法测定3-羟基丁酮的方法。发酵液高速离心后经0.22 μm微孔滤膜过滤,以Hypersil NH<sub>2</sub>(300 mm×4.6 mm, 5 μm)为分离柱,乙腈-水(90:10, V/V)为流动相,流速为1 mL/min,检测器为示差折光检测器,柱温和检测器温度均为35 ℃,在25 min内可以完成色谱检测。方法回收率为95.96%~101.2%; RSD为1.69%~2.09%。实验结果证明,该方法是测定发酵液中3-羟基丁酮的快速、有效的定量分析方法,具有样品预处理简单,灵敏度高的优点,适合于指导整个发酵过程中条件的优化及发酵产物的实时监控。

**关键词:**高效液相色谱;示差折光仪;发酵液;3-羟基丁酮

中图分类号:TS 207.3 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)01-0067-03

## Determination of acetoin in fermentation broth by high performance liquid chromatography

TANG Dan-dan, WANG Teng-fei, WANG Rui-ming

(Qi Lu University of Technology, Key Laboratory of Microbial Engineering of Shandong Province, Jinan Shandong 250353)

**Abstract:** The acetoin microorganism fermentation system was prepared by biological method. The method to determine acetoin by high performance liquid chromatography was studied. The fermentation broth was pre-treated by centrifuging and filtering with 0.22 μm microporous membrane. A column of Hypersil NH<sub>2</sub>(300 mm×4.6 mm, 5 μm) with an mobile phase containing acetonitrile and water(90:10, V/V) was used for the analysis of acetoin in fermentation system, the flow rate was 1 mL/min, the column temperature and detector temperature was 35 ℃, the chromatography was completed in just 25 min. The recovery rate was 95.96%~101.2% and the relative standard deviations 1.69%~2.09%. The method was proved to be a rapid and effective quantitative analysis method with simple pretreatment and high sensitive to determine the acetoin in fermentation broth, which was fit for guiding real-time monitoring the fermentation process.

**Key words:** high performance liquid chromatography; differential refractometer; fermentation broth; acetoin

3-羟基丁酮,又名乙偶姻、甲基乙酰甲醇、醋喻,自然存在于玉米、葡萄、可可、苹果、香蕉、干酪、肉类等许多食品中,作为一种食用香料,我国GB 2760—1986规定为允许食用,美国食品和萃取协会(FEMA)安全号为2008<sup>[1]</sup>。由于其特有的奶油香

味,3-羟基丁酮作为香料应用范围极其广泛,用量也较大,多用于奶油、干酪、咖啡、坚果的香味增强剂,同时也可用于配制奶油、乳品、酸乳和草莓型香精等<sup>[2-3]</sup>。此外,3-羟基丁酮还作为一种重要的平台化合物,广泛应用于食品、化工、制药以及烟草等领域,2004年美国能源部将其列为30种优先开发利用的平台化合物之一<sup>[4]</sup>。目前工业化生产3-羟基丁酮的主要方法为化学合成法:丁二酮部分加氢

收稿日期:2014-06-28

作者简介:汤丹丹,1988年出生,女,在读硕士研究生。

通讯作者:王瑞明,男,博士,教授。

还原、2,3-丁二醇选择性氧化、丁酮氯化水解等方法<sup>[5]</sup>。该法产品收率低、环境污染严重、原料来源受限,诸多因素制约了其进一步的发展。微生物发酵法具有成本低、环境友好、反应条件温和等特点,成为当前的研究热点<sup>[6]</sup>。

目前,国内外检测食品中3-羟基丁酮的方法主要是用气相色谱法<sup>[7-9]</sup>,该方法虽然精密度和准确度都较高,但对设备要求也较高,而且分析时间长,检测速度慢,不适合大批量样品的连续性检测。采用液相色谱法检测3-羟基丁酮的文献较少,有报道采用有机溶剂抽提食醋中的3-羟基丁酮后直接经紫外光谱检测<sup>[10]</sup>,但3-羟基丁酮在紫外光区无特异性,且吸收波长较宽,干扰大,从而影响其准确测定。目前国内外的研究中,利用2,4-二硝基苯肼与醛酮反应的原理用与环境中的甲醛等物质的检测<sup>[11-12]</sup>。3-羟基丁酮含有酮基,可采用2,4-二硝基苯肼衍生后产生的腙产物对紫外—可见光有吸收的特性,在特定波长内进行检测。余书奇等<sup>[13]</sup>建立了2,4-二硝基苯肼柱前衍生的方法,适于葡萄酒体系中总3-羟基丁酮(即游离3-羟基丁酮及 $\alpha$ -乙酰乳酸转化生成的3-羟基丁酮)含量的测定。此法虽然能排除组分干扰,回收率较高,但步骤较为繁琐,易带来误差。在碱性介质中,3-羟基丁酮与含胍基的化合物反应生成红色化合物,该化合物在500~600 nm范围有光谱吸收,其吸光度在一定浓度范围内与3-羟基丁酮浓度成正比<sup>[14]</sup>。任潇等<sup>[15]</sup>利用这一特性,建立了肌酸比色法检测发酵液中的3-羟基丁酮的定量分析方法。该法与气相色谱法相比,操作简单、快速,但若菌株发酵产物中存在丁二酮或2,3-丁二醇,结果也呈阳性反应,造成检测结果偏大。本研究选用常用的Hypersil NH<sub>2</sub>柱,以示差检测器作通道检测,建立了高效液相色谱法测定发酵液中3-羟基丁酮的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

LC-1200 高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司; centrifuge 5804R 离心机;Eppendorf 公司;全自动反渗透净水机:郑州优尔普仪器设备有限公司。乙腈:美国 TEDIA 公司;3-羟基丁酮(纯度 $\geq 99\%$ ):Sigma 公司。

### 1.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil NH<sub>2</sub> (300 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-水(90:10, V/V);进样体积:10  $\mu$ L;流速:1 mL/min;柱温和检测器温度:35  $^{\circ}$ C, 检测器:示差折光检测器。

### 1.3 标准溶液的配制

精确称取3-羟基丁酮标准品,用流动相溶解配制成标准溶液,各标准品浓度分别为0.0001、0.001、0.002、0.01、0.02、0.1、0.2、0.5、1、2、4、5、10 mg/mL。

### 1.4 发酵液样品的预处理

本实验所用的发酵液是由枯草芽孢杆菌(本实验室保藏)发酵培养获得的。发酵液经离心(12000 r/min, 10 min)除去菌体,取上清液,经适当稀释后,用0.22  $\mu$ m 孔径的滤膜过滤,即得到待测样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

对3-羟基丁酮标准样品进行全波长扫描,结果见图1。由图1可以看出,3-羟基丁酮在紫外光区虽有吸收,但吸收较弱,且吸收波长较宽,故选择通用型的示差折光检测器。

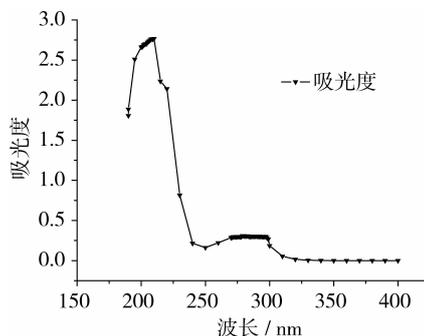


图1 3-羟基丁酮的波长扫描图

### 2.2 流动相的选择

乙腈-水体系、甲醇-水体系是在氨基柱中应用较多的流动相。由于乙腈洗脱能力强,基线噪音小,且实验中发现,甲醇-水体系分析时间稍长,分离度较小,柱压也较大,因此选用乙腈-水体系。考察流动相中乙腈的比例,发现随着乙腈比例的增大,分离度变大。乙腈比例至90%时分离效果最好,分离度达到2.281。经过不同流动相流速分离发酵液中3-羟基丁酮的比较,确定最终流速为1 mL/min。

### 2.3 回归分析与检出限

准确吸取不同浓度的3-羟基丁酮标准溶液10  $\mu$ L 分别进样,测定其峰面积,以峰面积Y为纵坐标,样品质量浓度X(g/L),绘制标准曲线为 $Y = 1.4628E + 6X + 20.890$  ( $R^2 = 0.9986$ ),说明3-羟基丁酮浓度与峰面积之间具有良好线性关系,满足定量分析要求。其线性范围是:0.5~4 g/L,以3倍信噪比(S/N)计算最小检出限量为1.5 mg/L。

### 2.4 精密度实验

利用上述确定的方法对含3-羟基丁酮的发酵液进行定性定量分析。取24、36、48、60 h的发酵液

样品1、2、3、4 四份各重复5次测定,结果见表1。由表看出,相对标准偏差(RSD)都小于2.5%,精密度高,说明该方法是可靠的。

表1 精密度实验结果(n=5)

样品	3-羟基丁酮含量/(g/L)					$\bar{x}$	RSD /%
	1	2	3	4	5		
样品1	10.347	9.986	10.013	10.124	10.451	10.202	1.87
样品2	16.322	16.034	16.780	16.395	16.216	16.349	1.69
样品3	21.459	20.902	21.288	22.137	21.530	21.463	2.09
样品4	25.108	24.875	24.462	24.901	25.634	24.996	1.71

## 2.5 方法回收率

取同一发酵液样品四份,其中一份作本底,另三份添加一定量的不同浓度的3-羟基丁酮标准溶液后测定3-羟基丁酮含量,每份样品进行3次平行测定,考察方法的回收率,结果见表2。从表2看出,3-羟基丁酮的回收率在95.96%~101.2%之间,说明方法的准确度较高,重现性好。

表2 3-羟基丁酮的回收率实验结果

样品成分	发酵液中含 量/(g/L)	加标量 /(g/L)	加标实测值 /(g/L)	回收率 /%
3-羟基丁酮	20.064	5.000	24.862	95.96
3-羟基丁酮	20.064	10.000	30.134	100.7
3-羟基丁酮	20.064	15.000	35.251	101.2

## 2.6 发酵液中3-羟基丁酮的检测

按2.4节方法制备48h发酵液样品,在上述分离条件下进行色谱分析,结果见图2。结果表明:目前使用的枯草芽孢杆菌,在现有的发酵条件下,发酵液中除主要成分3-羟基丁酮外,副产物较少。

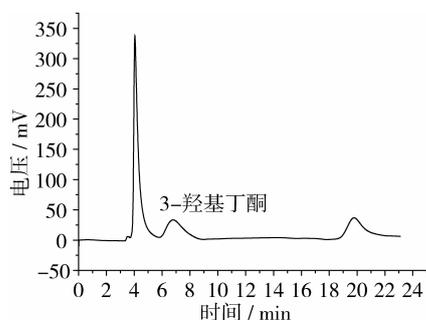


图2 48h发酵液的色谱分离图

## 3 结论

建立了借助示差折光检测器检测发酵液中3-羟基丁酮的高效液相色谱方法。经过多次实验证明:以Hypersil NH<sub>2</sub>(300 mm×4.6 mm,5 μm)为分离柱,乙腈-水(90:10, V/V)为流动相,流速为

1 mL/min,控制柱温和检测器温度均为35℃,25 min即可完成色谱检测。本方法样品仅需高速离心除菌体后经0.22 μm微滤膜过滤,样品预处理较简单,灵敏度高、分析速度快等优点,对于及时测定发酵过程中3-羟基丁酮随时间变化具有重要意义。

## 参考文献:

- [1]凌关庭. 食品添加剂手册(第二版)[M]. 北京:化学工业出版社, 1997.
- [2]韩丽,赵祥颖,刘建军. 3-羟基丁酮的研究现状[J]. 食品与发酵工业,2006, 32(10): 116-118.
- [3]胡明一,王中. 食用香料乙偶姻[J]. 精细与专用化学品,2002, 10(1): 20-21.
- [4]Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: volume 1, Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis,2004.
- [5]Hespell R B. Fermentation of Xylan, Corn Fiber, or Sugars to Acetoin and Butanediol by Bacillus polymyxa Strains [J]. Current Microbiology, 1996, 32(5):291-296.
- [6]纪晓俊,黄和,杜军,等. 3-羟基丁酮的合成及应用进展[J]. 现代化工,2008, 28(4): 18-22.
- [7]练敏,纪晓俊,胡南,等. 气相色谱法快速测定产酸克雷伯氏杆菌发酵液中的代谢产物[J]. 分析实验室,2008,27: 19-21.
- [8]Yixiao Fan, Yanjun Tian, Xiaoying Zhao, et al. Isolation of acetoin-producing bacillus strains from Japanese traditional food - natto[J]. Prep. Biochem. Biotech., 2013, 43(6): 551-564.
- [9]Jiyuan Tian. Determination of several flavours in beer with headspace sampling - gas chromatography [J]. Food Chemistry, 2010, 123: 1318-1321.
- [10]Ji-Cheng Chen, Qi-He Chen, Qin Guo, et al. Simultaneous determination of acetoin and tetramethylpyrazine in traditional vinegars by HPLC method [J]. Food Chemistry,2010, 122: 1247-1252.
- [11]Shigehisa Uchiyama, Yohei Inaba, Naoki Kunugita. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B,2011, 879(17-18): 1282-1289.
- [12]朱鸭梅,崔群,王海燕. 高效液相色谱法测定乙醛溶液中的乙二醛和乙醛酸[J]. 色谱,2010, 28(1): 59-63.
- [13]余书奇,晏日安,陈文锐,等. 2,4-二硝基苯衍生/高效液相色谱法测定葡萄酒中总乙偶姻的含量[J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 223-227.
- [14]W. W. Westerfeld. A Colorimetric Determination of Blood Acetoin [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1945, 161(2): 495-502.
- [15]任潇,纪晓俊,孙世闻,等. 肌酸比色法快速测定发酵液中3-羟基丁酮的含量[J]. 食品科技,2009, 34(8): 260-263. ㊟