

衍生化气相色谱法检测瘤胃液和青贮液中乳酸对映体和挥发酸

常影^{1,2} 邱静³ 魏吉安^{1,2} 孟庆翔^{1,2}

(1. 动物营养学国家重点实验室, 中国农业大学, 北京 100094; 2. 中国农业大学 动物科学技术学院/ 肉牛研究中心, 北京 100094; 3. 中国农业大学 理学院, 北京 100094)

摘要 利用手性衍生化试剂 *L*-薄荷醇和气相色谱柱前衍生化, 将瘤胃液和青贮液中 *L*-和 *D*-乳酸对映体转化为酯类非对映体对, 建立同时分析发酵液中乳酸对映体和挥发酸的气相色谱检测方法。样品乳酸对映体的质量浓度在 0.05 ~ 10.00 mg/mL 范围内时, 标准曲线的决定系数分别达到 $R^2 = 0.9995$ 和 $R^2 = 0.9996$ 。乳酸对映体的回收率为 96.15% ~ 108.24%, 且相对标准偏差小于 5%。采用本方法检测瘤胃液和青贮液样品的 *L*-和 *D*-乳酸对映体含量, 并且与酶学检测法进行比较, 2 种方法的测定结果没有显著性差异 ($P > 0.05$)。发酵液中挥发酸经衍生化处理, 可以与 *L*-和 *D*-乳酸对映体在同一色谱条件下检测, 各组分在 0.05 ~ 5.00 mg/mL 范围内线性良好, $R^2 = 0.9982 \sim 0.9994$ 。乳酸对映体和挥发酸的色谱分析在 6 min 完成。

关键词 乳酸对映体; 气相色谱法; 瘤胃液; 青贮液

中图分类号 S 816.17

文章编号 1007-4333(2006)02-0049-05

文献标识码 A

Gas chromatography assay of lactic acid isomers and VFA in rumen and silage fluids by pre-column chiral derivation procedure

Chang Ying^{1,2}, Qiu Jing³, Wei Ji'an^{1,2}, Meng Qingxiang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, Beef Cattle Research Center, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A novel procedure for determination of lactic acid isomers in the rumen and silage fluid was developed based on pre-column chiral derivation with *L*-menthol. The determination showed a linear response within the concentration range of 0.05 and 10.00 mg/mL for *L*- and *D*-lactate isomers with the correlation coefficients of 0.9995 and 0.9996, respectively. The recovery of each isomer averaged between 96.15% and 108.24% (RSD < 5%). A comparison of analytical results of lactate isomers on the rumen and silage fluid established between the enzyme procedure and that in this study showed no significant difference ($P > 0.05$). Using gas chromatography conditions described here, 6 volatile fatty acids (VFA) including acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, valerate and isovalerate acids were simultaneously analyzed with both lactate isomers, having high correlation coefficients of 0.9982 and 0.9994 within the VFA concentration range from 0.05 to 5.00 mg/mL. Fermentation fluids were run for 6 min for both the isomers of lactic acid and VFA assay.

Key words lactic acid isomer; gas chromatography; ruminal fluid; silage fluid

乳酸是反刍动物瘤胃微生物发酵饲料碳水化合物合成乙酸、丙酸等挥发酸的中间代谢产物, 在反刍动物急性酸中毒时瘤胃液中 *D*-乳酸含量比正常瘤胃液显著增加^[1]。反刍动物青贮饲料调制过程中

D-乳酸比例过高会诱发反刍动物瘤胃代谢障碍^[2]。因此准确检测发酵液中乳酸与挥发酸的含量与比例, 对于研究瘤胃微生物区系变化、调控瘤胃代谢障碍以及制备优良品质的青贮饲料均具有重要理论和

收稿日期: 2005-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270944)

作者简介: 常影, 博士研究生; 孟庆翔, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物营养与饲料研究, E-mail: qxmeng@cau.edu.cn

实际意义。

乳酸脱氢酶(DLH)酶解法是检测乳酸对映体的常规方法,但所需试剂种类繁多、反应耗时长和误差来源较多^[3]。利用手性分离色谱技术已经建立拆分乳酸对映体的几种方法^[4-6],但均需要购买性能专一且价格昂贵的手性色谱柱、手性流动相或特异性检测器。尽管色谱检测法已经实现乳酸和挥发酸的同时定量分析^[5,7],但是既能检测乳酸对映体比例又能同时分析挥发酸含量的方法还尚未见到。目前,分析微生物发酵液样品中酸性物质通常需要采取2种或2种以上的方法。因此为了降低试验成本、提高样品检测效率,本研究旨在探索同时检测发酵液中乳酸对映体和挥发酸的定量方法。

1 材料与方法

1.1 瘤胃液和青贮液的样品来源

体重约为400 kg装有永久性瘤胃瘘管的荷兰阉公牛作为瘤胃液供体动物。根据Menke等建立的活体外产气量法^[8],将30 mL瘤胃液在0.2 g粉碎玉米底物条件下培养24 h,离心(5400 r/min)10 min,去除饲料颗粒后的瘤胃发酵液备用。

青贮玉米发酵液取自中国农业大学肉牛研究中心制备的青贮研究样品,玉米品种为国家玉米改良中心培育的高油玉米青油1号,发酵时间7 d。在20 g青贮鲜样中加入100 mL蒸馏水,搅拌均匀后在4℃冰箱内静置浸泡24 h,过滤备用。

1.2 手性衍生化反应条件的确定

L-薄荷醇是常见的气相色谱手性衍生化试剂,常用以氨基酸、羧酸和不饱和脂肪酸的手性拆分^[8]。醇酸摩尔比和反应温度对外消旋乳酸薄荷酯的衍生化程度有较大影响,但是二者之间并无互作关系^[9]。本研究在外消旋乳酸薄荷酯合成工艺以及前期探索试验的基础上设计3个试验,采用完全随机化因子试验设计,分别研究了衍生化反应温度、时间和衍生化试剂添加比例对衍生化产物色谱峰面积的影响。试验1.在茄形瓶中加入*LD*-乳酸外消旋标准品(Amresco 0199)、*L*-薄荷醇(*L*-Menthhol, SIGMA Adrich M2258)(薄荷醇与乳酸摩尔比为4.5:1)、2 mL反应介质苯和催化剂,分别在60、70、80和90℃下衍生化反应1 h以确定衍生化反应最佳温度。试验2.采用试验1确定的适宜衍生化温度,研究手性衍生化试剂*L*-薄荷醇与*LD*-乳酸的适宜添加比例。试验3.探讨不同反应时间对衍生

化反应完成程度的影响。衍生化过程结束后,将反应产物全部转移至定量试管中,用苯清洗茄形瓶并定容至3 mL。向试管中加入1 mL超纯水,充分振荡使衍生化反应催化剂转移至水层,离心(3 000 r/min)5 min,取上清液进行气相色谱分析。上述3个试验各重复3次,每次重复试验的各处理组均设置3个平行。

1.3 气相色谱定性与定量分析

衍生化样品在配备有氢火焰离子化检测器(FID)的气相色谱仪(6890N, Agilent)上,利用HP-5 5%苯基甲基硅氧烷毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, Cat. 19091J-413)实现对映体拆分和定量分析。优化色谱分离条件如下: N₂作载气;柱流量恒定为2 mL/min,线速度38 cm/s;柱箱程序升温,从120℃以10℃/min的升温速率至220℃;进样口温度250℃,压力15.00 Pa,分流比40:1; FID温度250℃, H₂流量40.0 mL/min,空气流量450 mL/min,尾吹气流量+柱流量45 mL/min。衍生化产物进样量1 μL。

分别配制1 mg/mL的*L*-乳酸(Sigma L-2250)标准溶液和*D*-乳酸(Sigma L-0625)标准溶液,以考察衍生化过程是否发生对映体消旋化,并确定2种对映体在气相色谱中的保留时间。用外消旋乳酸标准品(Amresco 0199)准确制备0.1、0.5、1.0、5.0和10.0 mg/mL的5级乳酸外消旋标准液,以建立*L*-和*D*-乳酸衍生化产物的气相色谱标准曲线。用去离子水逐级稀释0.1 mg/mL的乳酸标准溶液,得到最终质量浓度为0.050、0.010、0.005和0.001 mg/mL的梯度乳酸标准溶液,衍生化后依次进样,以确定本方法的最小检测限。

分别量取乙酸110 μL、丙酸100 μL、丁酸160 μL、戊酸100 μL、异丁酸120 μL、异戊酸80 μL和外消旋乳酸102 mg用去离子水定容于100 mL容量瓶中,配制混合标准储备液。梯度稀释后,按上述操作步骤确定各有机酸的保留时间和线性范围。

1.4 瘤胃发酵液和青贮饲料发酵液样品的检测

在10 mL离心管中分别移取瘤胃发酵液和青贮发酵液5 mL,加入25%(体积分数)偏磷酸溶液1 mL,混匀在冰水浴中放置30 min以上,使样品蛋白质酸化凝固,并且保证样品pH低于乳酸pKa值(3.8)。样品离心(10 000 r/min)10 min,准确移取2 mL上清液到50 mL离心管中。用10 mL乙醚溶液分3次萃取样品的乳酸和其他有机酸成分,合并乙

醚至茄形瓶中,30 下旋转蒸发。浓缩后样品按照确定的适宜衍生化反应和色谱分离条件,进行 *LD*-乳酸对映体的拆分和定量检测。

1.5 *LD*-乳酸对映体的气相色谱检测法与乳酸脱氢酶检测法的比较

另取 2 mL 瘤胃液和青贮发酵液样品各 3 份,根据乳酸脱氢酶学检测方法^[9],利用在 340 nm 波长条件下 NADH 含量与乳酸含量成正比,检测 NADH 的吸光度从而求出样品中乳酸的含量,与气相色谱检测结果进行对比。

1.6 统计分析

利用 SAS 统计软件(SAS, 1996)中的广义线性模型(GLM)对衍生化反应条件优化数据、样品 *L*-和 *D*-乳酸含量的气相色谱检测结果以及乳酸脱氢酶法检测结果进行方差分析和多重比较。

2 结果与讨论

2.1 衍生化反应条件的确定

随着衍生化反应温度的提高,衍生化产物峰面积增加并呈现二次曲线规律($P < 0.05$),70 时乳酸薄荷酯衍生化反应程度最高(表 1)。由于衍生化反应是在苯介质条件下完成的,当反应温度高于苯的沸点温度(80.1)时,苯的汽化可能导致乳酸和薄荷醇衍生化反应不完全。此外乳酸、薄荷醇和乳酸薄荷醇酯都存在羟基,温度过高易导致分子内部脱水、生成二酸酯或多酸酯等副产物^[10]。因此,本试验确定 70 作为衍生化反应的最佳温度。

工业合成外消旋乳酸薄荷酯采用廉价乳酸原料过量的生产方式,本研究以准确定量样品中乳酸对映体为目的,采用手性衍生化试剂 *L*-薄荷醇过量以

表 1 衍生化反应温度对衍生化产物峰面积的影响 ($n = 3$)

Table 1 Effects of reaction temperature on peak areas of derivatives

非对映异构体	反应温度/				SEM	L	Q
	60	70	80	90			
<i>L</i> -乳酸衍生化产物	27.73 c	42.13 a	34.79 b	27.40 c	0.437	0.006	<0.001
<i>D</i> -乳酸衍生化产物	28.11 c	42.20 a	34.91 b	26.85 c	0.421	0.002	<0.001

注: SEM 为平均标准差;同行平均数后具有不同字母者差异显著($P < 0.05$);随衍生化反应时间的提高峰面积呈直线规律变化(L)或二次曲线规律变化(Q);下同。

促进反应正向进行。随着 *L*-薄荷醇添加比例从 1.5 提高到 3.5,衍生化反应程度逐渐提高;但二者比值从 3.5 提高到 4.5 时,产物峰面积没有显著差异($P > 0.05$)(表 2)。趋势分析表明,薄荷醇和乳酸的添加比例与衍生化产物峰面积呈显著的二次曲线

规律变化($P < 0.001$)。因此衍生化反应确定 3.5 1 的添加比例。工业外消旋乳酸薄荷酯合成时,乳酸与薄荷醇的摩尔比为 1.2~1.5,乳酸继续增加也会导致酯化率下降^[11]。

表 2 衍生化反应试剂 *L*-薄荷醇添加比例对产物峰面积的影响 ($n = 3$)

Table 2 Effect of mol ratio of *L*-menthol and *LD*-lactic acid on peak area of derivatives

非对映异构体	<i>L</i> -薄荷醇和乳酸的摩尔比				SEM	L	Q
	1.5 1	2.5 1	3.5 1	4.5 1			
<i>L</i> -乳酸衍生化产物	9.47 b	30.62 c	41.80 a	41.99 a	0.197	<0.001	<0.001
<i>D</i> -乳酸衍生化产物	9.00 b	31.18 c	41.87 a	42.59 a	0.281	<0.001	<0.001

薄荷醇与乳酸衍生化反应 30 min 的产物峰面积仅为反应 60 min 产物峰面积的 68%(表 3),但随后继续延长反应时间并未显著改变产物峰面积($P > 0.05$),因此乳酸与薄荷醇衍生化反应 60 min 以保证衍生化程度完全。工业外消旋乳酸薄荷酯合

成的反应温度较高,为防止羟基内部脱水通常以酸性较弱的甲基苯磺酸做催化剂,造成衍生化反应时间延长至 3 h 以上^[12]。本试验方案在 70 反应温度条件下,以催化能力更强的硫酸为衍生化反应催化剂,缩短了衍生化反应时间。

表3 衍生化反应时间对产物峰面积的影响($n=3$)

非对映异构体	衍生化反应时间/min				SEM	L	Q
	30	60	90	120			
L-乳酸衍生化产物	28.47 b	42.13 a	41.91 a	42.01 a	0.644	<0.001	<0.001
D-乳酸衍生化产物	28.73 a	42.20 a	42.53 a	42.10 a	0.826	<0.001	0.002

2.2 气相色谱检测方法的验证

根据 FID 检测器测得的峰面积响应值对 L-乳酸和 D-乳酸含量分别进行线性回归, 2 种乳酸对映体的衍生化产物峰面积与其质量浓度间呈现良好的线性关系(图 1), 线性方程分别为: $y_{(L-乳酸)} = 83.876x - 8.2331$ 和 $y_{(D-乳酸)} = 84.931x - 8.1447$, 其中: y 为乳酸峰面积, $\text{mAU} \cdot \text{min}$; x 为乳酸质量浓度, mg/mL 。决定系数分别为 L-乳酸 $R^2 = 0.9995$ 和 D-乳酸 $R^2 = 0.9996$ 。2 种乳酸对映体的分离度为 1.83。逐渐稀释至色谱峰信噪比接近 3 时, L-乳酸和 D-乳酸检测限相近, 均为 0.001 mg/mL 。

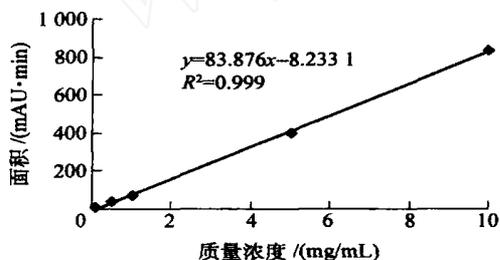


图1 L-乳酸的梯度标准曲线

Fig. 1 Calibration curves of the L-lactate isomer

乳酸对映体“空白加标”回收率和“样品加标”回收率的检验结果表明, L-乳酸和 D-乳酸的回收率分别达到 96.15% ~ 108.27% 和 98.18% ~ 104.03%,

表4 “空白加标”和“青贮液样品加标”的回收率($n=3$)

回收率检测方法	标准添加量/ mg	(样品)	加标准测定值			平均回收率/ %	RSD/ %	
			1	2	3			
空白加标	L-乳酸	0.5	0	0.52	0.54	0.56	108.27	4.07
	D-乳酸	0.5	0	0.51	0.52	0.53	104.03	2.10
样品加标	L-乳酸	2.2	2.77	4.89	4.87	4.90	96.15	0.84
	D-乳酸	2.2	3.69	5.84	5.82	5.89	98.18	1.68

2.3 发酵样品测定及其与酶学检测方法的比较

根据上述衍生化和色谱条件, 分别对瘤胃发酵液和青贮发酵样品进行检测, 并且与酶学检测法进行了比较(表 5)。不同样品用 2 种方法的测定结果

且回收率均值的相对标准偏差均小于 5% (表 4)。空白加标回收率略高于样品加标回收率, 这表明青贮发酵液样品基质对乳酸对映体回收率有一定影响, 可能是样品中其他酸性物质与薄荷醇发生反应, 导致衍生化试剂添加比例略有下降。尽管如此, 空白加标和样品加标回收率均符合色谱检测的质量控制范围。发酵液样品中 6 种常见挥发酸经衍生化反应的产物保留时间均未影响乳酸对映体的分离(图 2), 且质量浓度在 $0.05 \sim 5.00 \text{ mg/mL}$ 范围内线性良好, $R^2 = 0.9982 \sim 0.9994$ 。LD-乳酸外消旋标准的对映体衍生化产物峰面积比值基本接近于 1, 这表明在衍生化反应过程中未发生消旋化反应。

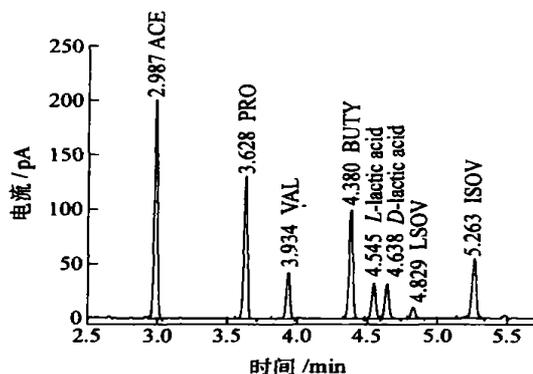


图2 乳酸对映体和挥发酸的衍生化产物

Fig. 2 Chromatogram of lactate isomers and VFA

均没有统计学上的显著差异($P > 0.05$)。测定乳酸含量较高的青贮样品时, 气相色谱检测法的相对标准差和 RSD 值均小于酶学检测法。由于酶学检测法需要对青贮样品进行高比例稀释以确保乳酸脱氢

酶过量,增加了高浓度样品的误差。由于正常瘤胃发酵条件下乳酸通常不超过 0.5 mg/mL, *D*-乳酸甚至没有^[1],而本方法的检测限为 0.001 mg/mL,因此对于样品乳酸浓度较低时,可以采用氮气浓缩溶剂苯,以提高样品检测结果的准确程度。

由于酶学检测法所需的试剂种类繁多、配置复

杂,本试验以 *L*-乳酸和 *D*-乳酸试剂盒的方式对乳酸对映体的酶学检测,因此避免了一个重要的酶学检测法误差来源,即试剂配置过程容易出现缓冲溶液 pH 值不准确和试剂交叉污染的问题^[3]。但试剂盒高昂的价格限制了本对比试验的样品检测数量。

表 5 发酵液样品的气相色谱检测结果与酶学检测结果的比较 ($n=3$)

Table 5 Comparison of the GC method with Enzyme method in determination of fermentation fluid

发酵液样品		气相色谱检测法		酶学检测法		SEM	P
		检测均值	RSD/ %	检测均值	RSD/ %		
瘤胃液/ (mg/ mL)	<i>L</i> -乳酸	0.005 2	9.62	0.004 9	8.16	0.000 6	0.808
	<i>D</i> -乳酸	0.002 5	12.00	0.002 2	13.62	0.000 4	0.595
青贮液/ (mg/ g)	<i>L</i> -乳酸	49.00	0.29	50.56	2.47	0.631	0.224
	<i>D</i> -乳酸	68.91	0.41	69.69	4.91	1.718	0.778

3 结 论

本研究利用常见手性衍生化试剂 *L*-薄荷醇对瘤胃液或青贮发酵液中的乳酸进行衍生化,2 种乳酸对映体转化为酯类非对映体对在气相色谱条件下实现分离检测。*L*-乳酸和 *D*-乳酸对映体在 0.05 ~ 10 mg/mL 范围内的色谱检测回收率分别为 96.15% ~ 108.27% 和 98.18% ~ 104.03%。同时,发酵液样品中其他 6 种常见挥发酸经衍生化处理既不影响乳酸对映体的分离,又在同一色谱条件下线性良好。因此本研究实现了在同一色谱条件下同时检测乳酸对映体和挥发酸,整个色谱分析在 6 min 内完成。

参 考 文 献

- [1] Allen M S, Beede D. Causes, detection and prevention of ruminal acidosis in dairy cattle examined [J]. Feedstuff, 1996, 68:13-18
- [2] Dunlop R H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis[J]. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, 1972, 16:250-302
- [3] Ewaschuk J B, Zello G A, Naylor, et al. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers [J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2002, 781:39-56
- [4] Betschinger F, Libman J, Shazer A. Gas chromatographic enantiomer separation on a chiral self associating selector [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 746:53-62
- [5] Buglass A L, Lee S H. Sequential analysis of malic acid and both enantiomers of lactic acid in wine using a high performance liquid chromatographic column switching procedure [J]. Journal of Chromatographic Science, 2001, 39:453-458
- [6] 白冬梅,赵学明,胡宗定. 高效液相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中乳酸的光学纯度[J]. 色谱,2001,19(1):13-15
- [7] Yang M H, Choong Y M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C2 ~ C12) volatile organic acids in foods [J]. Food Chemistry, 2001, 73:101-108
- [8] Menke K H, Raab L, Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro [J]. J Agric Sci, 1979, 93: 217-222
- [9] Gutmann I, Wahlefeld A W. *L* (+) lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD [A]. In: Bergemeyer H, ed. Methods of Enzymatic Analysis [C]. New York: Academic
- [10] 曾苏,章立,沈向忠,等. 光学异构体的气相色谱拆分方法[J]. 色谱,1994,2(4):259-262
- [11] 廖蓓玲. 直接酯化法合成乳酸薄荷酯[J]. 河池师专学报,2002,22(4):65-67
- [12] 高根之,赵霞,田来进. 固体超强酸 $\text{SO}_4^{2-}/\text{ZrO}_2$ 催化合成乳酸薄荷酯[J]. 曲阜师范大学学报,1997,23(1):78