

# 苯乳酸的快速检测研究\*

沐万孟<sup>1</sup>, 周宏敏<sup>2</sup>, 刘凤丽<sup>1</sup>, 李兴峰<sup>1</sup>, 陈超<sup>1</sup>, 罗昭锋<sup>2</sup>, 江波<sup>1</sup>

1(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

2(中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家实验室 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽 合肥, 230027)

**摘要** 苯乳酸是一种新型生物防腐剂。文中研究了苯乳酸的薄层层析快速检测方法、反相高效液相色谱分析检测法, 并利用手性柱高效液相色谱分析检测 D-型和 L-型苯乳酸。

**关键词** 苯乳酸, 薄层层析, 反相高效液相色谱, 手性柱高效液相色谱

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA), 也称 3-苯基乳酸或  $\beta$ -苯乳酸, 即 2-羟基-3-苯基丙酸, 是近年来发现的一种新型生物防腐剂。1998 年, 苯乳酸首次被发现对单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)有很强的抑制作用<sup>[1]</sup>; 随后人们相继发现苯乳酸具有很广的抑菌谱, 对多种食源性致病菌如革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌及引起食品腐败的真菌都有抑制作用<sup>[2]</sup>。苯乳酸稳定性高, 安全无毒; 相比于 nisin, 苯乳酸抑菌谱宽, 溶解性好, 易于在食品体系中扩散, 具有宽广的 pH 范围和热稳定性, 因此有望开发成一种新型生物防腐剂应用于食品工业<sup>[3~5]</sup>。

苯乳酸的生物合成方法主要是通过乳酸菌发酵生产获得<sup>[6]</sup>。乳酸菌发酵过程中, 苯乳酸合成途径推测可能是苯丙氨酸代谢的分支, 首先 L-苯丙氨酸被脱氢生成苯丙酮酸, 再经过乳酸脱氢酶加氢还原生成苯乳酸, 而根据脱氢酶的种类不同, 生成的苯乳酸构型亦不同<sup>[7]</sup>。

建立苯乳酸的快速检测方法, 对于苯乳酸发酵生产菌株的筛选、定性定量检测、发酵优化具有重要意义; 对苯乳酸的构型分析及不同构型苯乳酸含量测定, 对于苯乳酸合成代谢机制及优化控制具有重要的基础意义。本文分别建立了薄层层析和反相高效液相色谱方法, 快速检测苯乳酸; 并建立手性柱高效液相色谱方法快速检测苯乳酸的构型和分别定量。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

D-型苯乳酸、L-型苯乳酸、D/L-型苯乳酸及苯丙氨酸购自 Sigma 公司, 苯丙酮酸购自 Fluka 公司; 高

效液相色谱试剂均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯试剂。RSGF254 薄层层析硅胶板购自烟台江友硅胶开发有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 苯乳酸样品的获得

D-型苯乳酸、L-型苯乳酸、D/L-苯乳酸标样分别用去离子水配制成 1 mg/mL。

苯乳酸发酵样品的获得<sup>[8]</sup>: 利用自行筛选的乳酸菌 *Lactobacillus* sp. SK007, 以含苯丙酮酸底物(含量为 5 g/L)的 MRS 培养基发酵培养, 30 °C 静置发酵 24 h; 4 000 r/min 离心 10 min, 弃菌体, 取发酵上清液为苯乳酸发酵样品进行检测分析。

#### 1.2.2 薄层层析检测

吸取 5~8  $\mu$ L 的样品, 点样至硅胶板, 进行薄层层析检测分析。展开剂 V(三氯甲烷): V(甲醇): V(冰醋酸) = 8: 1: 0.1; 层析结束后在 85 °C 加热 10 min, 先用 0.1 g/mL 硫酸的甲醇溶液处理, 烘干后再用 0.05 g/mL 磷钼酸的甲醇溶液进行显色, 再置于 110 °C 中加热 10 min, 观察现象, 样品在白色背景上呈现蓝色斑点。

#### 1.2.3 反相高效液相色谱

利用反相柱高效液相色谱法(RP-HPLC)检测分析苯乳酸。HPLC 条件: Agilent 1100 高效液相色谱, 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: A 为 0.5 g/L 三氟乙酸, B 为 0.5 g/L 三氟乙酸甲醇溶液; 洗脱程序: 0~20 min 为 10%~100% B, 20~23 min 保持 100% B; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10  $\mu$ L。

#### 1.2.4 手性柱高效液相色谱

利用手性柱高效液相色谱法(RP-HPLC)检测分析苯乳酸。HPLC 条件: 高效液相色谱仪型号为 Ag-

第一作者: 博士, 讲师。

\*“十一五”国家 863 资助项目(2006AA10334)资助

收稿日期: 2008-06-12, 改回日期: 2008-10-30

ilent 1100;手性层析柱型号为 Chiral-cel OJ-R;流动相为  $V(0.2 \text{ mol/L H}_3\text{PO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4, \text{pH } 2.0) : V(\text{甲醇}) : V(\text{乙腈}) = 85 : 1 : 14$ ;流速为  $0.4 \text{ mL/min}$ ;柱温为  $20^\circ\text{C}$ ;上样量为  $50 \mu\text{L}$ ;检测条件为  $210 \text{ nm}$ 。

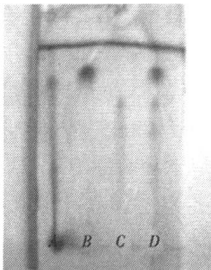
## 2 结果与分析

### 2.1 薄层层析检测

高效液相色谱、毛细管电泳等先进设备能够对一些化合物能准确定性定量,灵敏度高、重现性好,然而对样品形式、设备条件、检测手段要求苛刻,不能对多种样品同时检测,同时价格昂贵。建立一种简便、廉价的快速薄层层析检测苯乳酸方法,对于苯乳酸发酵生产、分离纯化等的实时监测及大量样品的定性分析,具有一定的必要性。

本研究首先尝试了多种展开剂系统,对苯乳酸样品进行薄层层析检测,以苯乳酸与苯丙酮酸(苯乳酸生产的原料)的分离度及显色对比度为指标,最终确定了氯仿-甲醇-冰醋酸系统为苯乳酸薄层层析检测的展开剂系统(数据未给出);并调节氯仿的比例,以调整展开剂的极性,最终确定  $V(\text{三氯甲烷}) : V(\text{甲醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 8 : 1 : 0.1$  时,样品分离检测效果最佳,见图 1。

对于显色剂的选择,铁氰化钾-三氯化铁试剂<sup>[9]</sup>(通用显色剂,还原性物质显蓝色)和葡萄糖-苯胺试剂(羧酸类专属性显色剂)<sup>[10]</sup>对苯乳酸无明显显色(数据未给出),而硫酸甲醇溶液-磷钼酸甲醇溶液对苯乳酸样品具有很好的显蓝色效果,操作过程为:先用  $0.1 \text{ g/mL}$  硫酸的甲醇溶液处理,烘干后再用  $0.05 \text{ g/mL}$  磷钼酸的甲醇溶液进行显色,再置于  $110^\circ\text{C}$  中加热  $10 \text{ min}$ ,样品在白色背景上呈现蓝色斑点,见图 1。



(其中 A、B、C、D 分别代表苯乳酸发酵液、苯乳酸标样、苯丙酮酸标样、苯乳酸和苯丙酮酸标样的混合液)

图 1 苯乳酸的薄层层析检测结果

### 2.2 反相高效液相色谱检测

根据将苯丙氨酸、苯丙酮酸与苯乳酸非极性的差异,可以利用反相柱同时将三者分离开,并通过  $210 \text{ nm}$  光吸收值检测与定量分析。图 2 为乳酸菌发酵液的高效液相色谱检测结果,保留时间  $6.0$ 、 $12.1$  和  $12.9 \text{ min}$  的色谱峰分别代表苯丙氨酸、苯丙酮酸和苯乳酸,根据积分软件可以对其定量分析。

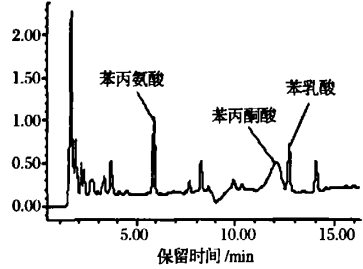


图 2 苯乳酸的反相高效液相色谱检测

### 2.3 手性柱高效液相色谱检测

苯乳酸的手性检测分析,对于微生物合成苯乳酸途径研究具有重要意义。乳酸菌发酵生产苯乳酸过程中,苯乳酸的合成途径<sup>[7]</sup>是苯丙氨酸代谢途径的一个分支(见图 3),苯丙氨酸通过苯丙氨酸脱氢酶脱氨生成苯丙酮酸;而苯丙酮酸经过  $D$ -乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.28)或  $L$ -乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27)催化生成  $D$ -型苯乳酸或  $L$ -型苯乳酸。 $D$ -乳酸脱氢酶<sup>[11]</sup>和  $L$ -乳酸脱氢酶<sup>[12]</sup>是完全不同的 2 个酶,蛋白结构、催化机制截然不同。目前已报道乳酸菌中的乳酸脱氢酶对丙酮酸和苯丙酮酸等底物具有较宽的底物谱,但底物专一性相差较大;同时不同种属的乳酸脱氢酶对于

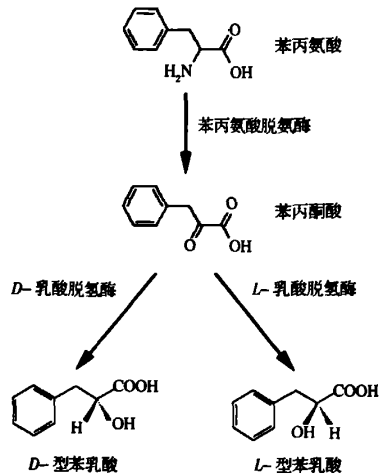
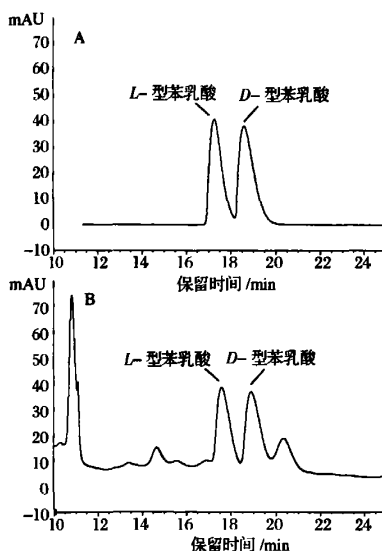


图 3 乳酸菌发酵中苯乳酸合成途径

苯丙酮酸合成苯乳酸的能力亦相差较大<sup>[13, 14]</sup>。对D-型苯乳酸和L-型苯乳酸进行分别检测,有助于苯乳酸合成途径及相关酶的结构功能关系的研究。

利用反相柱高效液相色谱尽管可以分离和检测苯乳酸,却不能将D-型和L-型苯乳酸分开,和分别定量定性分析。本研究首次利用手性柱高效液相色谱对D-型苯乳酸和L-型苯乳酸进行分别检测。利用Chiral-cel OJ-R手性柱可以将D-型苯乳酸和L-苯乳酸分离开,根据保留时间及210 nm光吸收值面积积分可以同时定性和定量检测D-型苯乳酸和L-苯乳酸(见图4)。



A为苯乳酸标样,B为乳酸菌发酵液样品  
图4 苯乳酸的手性高效液相色谱检测

### 3 结 论

(1) 利用薄层层析可以检测苯乳酸,展开剂V(三氯甲烷):V(甲醇):V(冰醋酸)=8:1:0.1,显色剂为0.1 g/mL 硫酸的甲醇溶液和0.05 g/mL 磷钼酸的甲醇溶液。

(2) 利用反相高效液相色谱可以同时检测苯丙氨酸、苯丙酮酸和苯乳酸,然而不能确定苯乳酸的构型。

(3) 利用手性柱高效液相色谱可以同时分离和检测D-型苯乳酸和L-型苯乳酸。

### 参 考 文 献

- 1 Dieuleveux V, Van Der Pyl D, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti-Listeria compounds pro-

- duced by *Geotrichum candidum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:800~803
- 2 Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69:634~640
- 3 Dieuleveux V, Lemarinier S, Gueguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 40:177~183
- 4 Dieuleveux V, Gueguen M. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese [J]. J Food Protect, 1998, 61: 1 281~1 285
- 5 Schnurer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives [J]. Trends Food Sci & Tech, 2005, 16: 70~78
- 6 Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, et al. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria; an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 233:289~295
- 7 Vermeulen N, Ganzle M G, Vogel R F. Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451(T) and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468[J]. J Agric Food Chem 2006, 54:3 832~3 839
- 8 Li X, Jiang B, Pan B. Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp. [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29:593~597
- 9 张静泽,江虹,刘庆增. 丹参素的化学研究概况[J]. 天津药学, 2000, 12(4): 5~8
- 10 陆冰真,翟永信. 薄层层析法在食品分析中的应用[M]. 北京:北京大学出版社,1981. 36~50
- 11 Taguchi H, Ohta T. D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus plantarum* [J]. J Biol Chem, 1991, 266:12 588~12 594
- 12 Zhou S, Shanmugam K T, Ingram L O. Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69:2 237~2 244
- 13 Arai K, Kamata T, Uchikoba H, et al. Some *Lactobacillus* L-lactate dehydrogenases exhibit comparable catalytic

## Rapid Determination of Phenyllactic Acid

Mu Wanmeng<sup>1</sup>, Zhou Hongmin<sup>2</sup>, Li Xingfeng<sup>1</sup>,  
Chen Chao<sup>1</sup>, Luo Zhaofeng<sup>2</sup>, Jiang Bo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

<sup>2</sup>(Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale and School of Life Sciences, University of  
Science & Technology of China, Hefei 230027, China)

**ABSTRACT** Phenyllactic acid is a novel biological preservative. Rapid determination methods of phenyllactic acid were studied using thin layer chromatography, reverse-phase HPLC and chiral HPLC. The later method could detect D- and L-phenyllactic acid simultaneously.

**Key words** phenyllactic acid, thin layer chromatography, reverse-phase HPLC, chiral HPLC

### 我国将加快修订乳品产业政策和行业准入条件

工业和信息化部消费品工业司表示,要加快修订现行乳品工业产业政策和行业准入条件,完善行业的规范化管理。

工业和信息化部于2008年11月19~20日在呼和浩特召开了全国乳制品行业整顿和规范工作现场会。会上提出,要结合落实《乳品质量安全监督管理条例》和《奶业整顿和振兴规划纲要》,进一步做好乳制品行业发展规划编制工作,有效遏制重复建设恶性竞争;加快推进乳制品生产企业建立良好生产规范,在生产婴幼儿奶粉的企业强制实施危害分析与关键控制点体系,提高乳制品安全管理水平。

要加快修订现行乳品工业产业政策和行业准入条件,补充和调整奶源基地建设、原料奶收购管理、质量检测、质量安全预警体系等内容,注重政策体系的统一规范,完善行业的规范化管理;严格执行整顿和规范期间一律暂停乳制品加工新上项目(企业)的核准的规定。

2008年9月三鹿牌婴幼儿奶粉事件发生以后,工业和信息化部会同地方政府主管部门对企业质量管理情况进行调研时发现,一些地方争抢奶源现象严重,原料奶收购环节秩序混乱,带来后续质量隐患;企业在原料奶收购质量追溯体系、产品全过程质量控制能力、企业产品监控体系建设、质量安全预防控制等方面存在管理漏洞。

### 首部鸡蛋国家标准将出台

据农业部门统计,仅鲜鸡蛋一项,我国每年的市场消费总额即达到1500亿元,这其中有超过90%的市场为各地农户自产的“散装蛋”所占据,而由规模化、产业化的品牌大厂商生产的产品不足10%。业内人士表示,目前市面上流通的无公害鸡蛋属于品质较好的产品,从蛋鸡品种提纯、孵化、室内育雏、饲养、防疫防病、场地环境、水源原料要求、质量标准、产品验收、包装、贮存等方面,全程实行标准化生产。而企业想要取得无公害鸡蛋和绿色食品的认证,必须向国家农业部申报,经国家检验部门的检验后,才能获得认证。根据国家标准,无公害鸡蛋中抗生素、重金属、农药等有毒有害物质都必须符合严格的规定。如国家标准要求饲养鸡的水质重金属不能过量,空气受污染程度不能超过标准规定,对饲料中的添加剂、药物中的添加剂都要严格控制。

另外,首部涉及所有鸡蛋的国家标准预计将在国家有关部门批准后很快出台。届时,将对鲜鸡蛋中可能存在的3大类近20个项目的公害污染物指标作出更为严格和明确的规定。特别是规定在鸡蛋内不得检出对人类危害较大的氯霉素、呋喃唑酮及沙门氏菌,但此前公布的新标准中并没有涉及三聚氰胺。