

# 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定玉米浆中游离 L-精氨酸

万红贵,宗素艳,朱明新,袁建锋,蔡恒

(南京工业大学制药与生命科学学院,江苏 南京,210009)

**摘要** 建立了高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)测定玉米浆中游离 L-精氨酸(L-Arg)的检测方法。采用 Alltima C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)色谱柱,以 5.0 mmol/L 七氟丁酸的体积分数 0.2% 三氟乙酸溶液和乙腈(体积比为 93.75 : 6.25)为流动相,流速为 0.8 mL/min,ELSD 漂移管的温度为 110℃,载气流速为 2.8 L/min。在该色谱条件下,L-精氨酸浓度 50.0~500 mg/L 时,其浓度的自然对数与峰面积的自然对数线性关系良好( $R^2=0.9996$ ),回收率为 97.70%~102.2%,精密度 RSD<2.48%。

**关键词** 高效液相色谱(HPLC),蒸发光散射检测(ELSD),玉米浆(CSL),L-精氨酸(L-Arg)

玉米浆(corn steep liquor)是从玉米浸渍水中制得的,简称 CSL。玉米在浸渍中使用一定量、一定浓度的亚硫酸溶液,使种皮成为半透性膜,一些可溶性蛋白质、无机盐和糖进入到浸渍水中,因而玉米浆含有丰富的营养物质。玉米稀浆经过浓缩制得玉米浆可作添加剂,按一定比例添加到玉米皮中,弥补玉米皮中蛋白质含量不足,还可用作抗生素、氨基酸和有机酸发酵用培养基,也可用于新型玉米浆饮品等<sup>[1]</sup>。

L-鸟氨酸生产菌大多为精氨酸缺陷型<sup>[2]</sup>,故必需在培养基中添加适量的 L-精氨酸才能满足鸟氨酸生产菌的生长,鸟氨酸发酵生产中,玉米浆作为主要有机氮源来源,是非常重要的原材料,因其含有丰富游离氨基酸,故不需在培养基中额外添加精氨酸,但因原料来源及处理方法不同而造成每批原材料中游离精氨酸含量不稳定,从而对鸟氨酸发酵产酸、糖酸转化率等造成重大影响。因此,准确地测定玉米浆中游离 L-精氨酸含量以确定培养基中玉米浆的添加量至关重要。

已报道的 L-精氨酸的检测方法主要有坂口试剂法<sup>[3~7]</sup>、电化学法<sup>[8]</sup>、化学发光法<sup>[9,10]</sup>、氨基酸分析仪测定法和高效液相色谱法<sup>[11~18]</sup>。但高效液相色谱法测定氨基酸大多采用柱前衍生化法或 HPLC-ELSD 的梯度洗脱检测,不仅分析时间长而且操作繁琐。未见 HPLC-ELSD 的等度洗脱分析检测 L-精氨酸的报道,研究中采用 HPLC-ELSD 及反相柱 Alltima C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)定量分析玉米浆中游离 L-精氨酸,与其他的方法相比,该测定方法具有

快速简便,样品不需衍生化可直接进样,不用梯度洗脱,不受前体氨基酸及其他肽类物质干扰,在较短的时间内达到分离目的等优点,适合于从复杂体系中快速检测游离 L-精氨酸的含量。

## 1. 材料与方法

### 1.1 仪器

Alltech 高效液相色谱仪,包括 426 型 HPLC 泵,ELSD 2000 检测器,Alltech 色谱工作站(美国奥泰科技有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);BS124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.2 试剂

乙腈(色谱纯,Caledon Laboratories 公司),三氟乙酸(AR,国药集团化学试剂有限公司),七氟丁酸(AR,Fluka 公司),三氯乙酸(AR,国药集团化学试剂有限公司)娃哈哈饮用纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),L-精氨酸(BR,国药集团化学试剂有限公司),不同产地玉米浆 1<sup>#</sup>(江苏),2<sup>#</sup>(山东),3<sup>#</sup>(山东,与 2<sup>#</sup> 不同批次)

### 1.3 色谱条件

色谱柱:Alltima C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm);流动相:5.0 mmol/L 七氟丁酸的体积分数 0.2% 三氟乙酸溶液和乙腈(体积比为 93.75 : 6.25);流速:0.8 mL/min;检测器:ELSD 2000;漂移管温度:110℃;气体流量:2.8 L/min;进样量:20 μL。

### 1.4 标准溶液的配制

精密称取 L-精氨酸标准品 100 mg,用超纯水溶解,定容至 100 mL,得质量浓度为 1.000 g/L 的 L-精

第一作者:硕士,研究员。

收稿日期:2008-06-24,改回日期:2008-09-25

氨酸标准品储备液。分别取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 标准品储备液,用超纯水稀释至 10 mL,得浓度为 50.0、100、200、300、400、500 mg/L 的标准溶液。

1.5 样品处理

精密称取玉米浆约 2.0 g,置于 50 mL 容量瓶中,用超纯水定容配制得质量浓度为 40 mg/mL 样品溶液,准确量取 5 mL 样品溶液,加入等体积的质量分数 30%三氯乙酸溶液,静止 60 min 后离心(10 000 r/min)15 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液待测。

2 结果与讨论

2.1 流动相配比的选择

分别以体积比为 90 : 10、93.75 : 6.25、95 : 5 的 5.0 mmol/L 七氟丁酸的 0.2%三氟乙酸-乙腈溶液为流动相进行试验。结果表明,采用 90 : 10 时,保留时间虽短,但 L-精氨酸色谱峰不能与杂质峰完全分离,而以体积比 95 : 5 时,分析时间延长,色谱峰拖尾,分离效果不好。以 93.75 : 6.25 时,L-精氨酸色谱峰与杂质峰完全分离,色谱峰保留时间短,色谱峰对称性好,峰形尖锐。

2.2 检测器参数的选择

蒸发光散射检测器的漂移管温度和气体流量是影响检测结果的重要参数。漂移管温度低于某一温度时,因流动相得不到充分的挥发,基线水平较高,而温度过高时,可能会带来更大的噪音,随着气体流量增大,响应值也随之减小。因此,分别考察了漂移管温度为 105、110 和 115℃,气体流量为 2.5、2.8 和 3.0 L/min。结果表明,在漂移管温度 110℃、气体流量 2.8 L/min 时,基线平稳,噪音较小,有适宜的响应值。因此,实验选择此参数进行测定。

2.3 线性范围和检出限

在 1.3 节规定的色谱条件下,对一系列不同浓度的 L-精氨酸标准溶液进样,以 L-精氨酸浓度(mg/L)的自然对数 X 为横坐标,相应峰面积的自然对数 Y 为纵坐标进行线性回归,得标准曲线方程为  $Y = 1.1624X + 7.7055$ ,相关系数  $R^2 = 0.9996$ ,线性范围为 50.0~500 mg/L。当信噪比(S/N)为 3 时,测得 L-精氨酸的检出限为 10.8 mg/L。

2.4 精密度

取上述线性范围内的 3 个浓度(100、200、500 mg/L)的 L-精氨酸标准溶液,连续进样(20 μL)6 次,

以峰面积和保留时间作为考察体系精密度的指标,结果如表 1 所示。峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.21%~2.48%,保留时间的 RSD 为 0.96%~2.32%,表明该方法精密度良好。

表 1 L-精氨酸的精密度测定结果

测定浓度/mg · L <sup>-1</sup>	峰面积的 RSD/%	保留时间的 RSD/%
100	1.21	2.32
200	2.48	1.78
300	1.56	0.96

2.5 稳定性

按 1.3 项下测定条件对同一样品溶液分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 时进样(20 μL),L-精氨酸峰面积的 RSD 为 1.85%,表明该方法在 24 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率

精密称取一定量已知含量的玉米浆,配制制成 2%样品溶液,将样品溶液分成 3 组,每组 3 份,分别加入 100、200、300 mg/L3 种浓度的标准 L-精氨酸标品溶液,按 1.5 项下样品处理方法处理后,在 1.3 项色谱条件下进样(20 μL)测定,结果如表 2 所示。样品的平均回收率为 97.70%~102.2%,相对标准偏差为 0.938%~1.33%,表明该方法准确可靠。

表 2 L-精氨酸的回收率测定结果

已知量/ mg · L <sup>-1</sup>	添加量/ mg · L <sup>-1</sup>	测得量/ mg · L <sup>-1</sup>	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
87.2	100	185.9	98.70	97.70	0.938
	100	184.7	97.50		
	100	184.1	96.90		
87.2	200	293.6	103.2	102.2	1.03
	200	291.8	102.3		
	200	289.3	101.1		
87.2	300	391.5	101.4	100.3	1.33
	300	388.9	100.6		
	300	382.7	98.80		

2.7 样品测定

按 1.5 样品处理方法和 1.3 试验条件分别测定了 3 种不同产地的玉米浆中游离 L-精氨酸,其标准溶液和样品溶液的色谱图如图 1 所示。通过比较保留时间和标准加入法对样品中 L-精氨酸色谱峰进行确定,结果如表 3 所示。氨基酸分析仪测定结果进行比较,由结果可看出,该法测定值与氨基酸分析仪测定结果接近,2 种分析方法相对偏差<6.25%,可用于玉米浆中游离 L-精氨酸的分析检测;不同产地及同一产地不同批次玉米浆中游离 L-精氨酸含量有所差别。

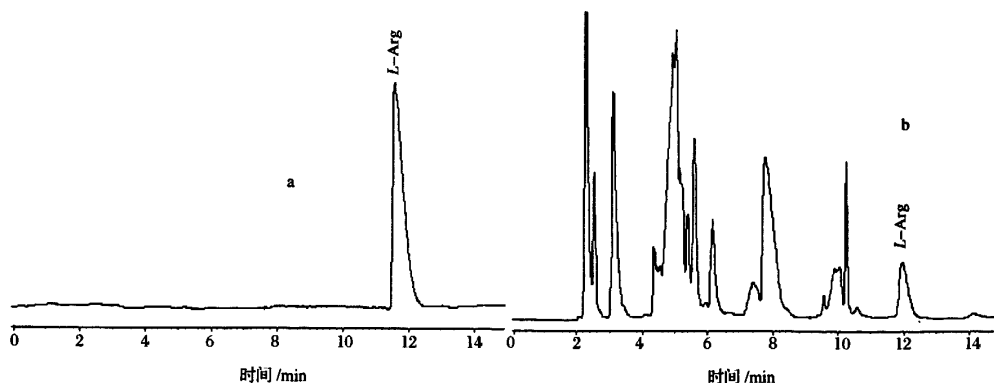


图1 L-精氨酸标准品(a)和样品(b)的色谱图

表3 HPLC-ELSD 和氨基酸分析仪样品测定结果(n=3)

样品	玉米浆 1 <sup>#</sup>	玉米浆 2 <sup>#</sup>	玉米浆 3 <sup>#</sup>
HPLC-ELSD/mg · g <sup>-1</sup>	8.25	7.09	7.61
氨基酸分析仪/mg · g <sup>-1</sup>	8.80	7.18	7.92
两种方法相对偏差/%	6.25	1.25	3.91

注:氨基酸分析仪测定结果由江苏省理化测试中心提供(所用仪器为 A200 amino Nova 氨基酸分析仪)

### 3 结论

采用 HPLC-ELSD 法测定玉米浆中游离 L-精氨酸,样品无需衍生化可直接进样分析,不需要繁琐的前处理,避免了衍生化法测定氨基酸的衍生化步骤,减小了测定误差,操作更简便、结果准确可靠。该分析方法可用于玉米浆中游离 L-精氨酸检测,为 L-鸟氨酸发酵培养基中玉米浆添加量提供依据,亦为其它有机氮源及发酵液中游离 L-精氨酸分析提供了参考。

### 参 考 文 献

- 常俊然. 谈谈玉米浆[J]. 淀粉与淀粉糖, 2004, (2): 35~36
- 潘韵, 陈宁. 微生物发酵法生产 L-鸟氨酸[J]. 生物科技通讯, 2000, 11(1): 61~64
- 蒙绮芳, 赖碧清, 周锡梁. L-精氨酸测定方法的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20 (3): 1~4
- 伍时华, 余海青. 发酵液 L-精氨酸测定的研究[J]. 发酵科技通讯. 2001, 30(4): 12~15
- 郝刚, 钱和. 发酵液中 L-精氨酸定量检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2005, 2: 184~186
- 贺小贤, 孙莹, 陈合. 发酵液中 L-精氨酸的检测方法[J]. 食品与药品, 2007, 9(1): 18~20
- 李华, 梁新红, 冯丽丹. 百里酚分光光度法测定发酵液中

- L-精氨酸含量[J]. 中国食品学报, 2007, 7 (4): 126~131
- 翟钧, 徐惠, 王春明. 吸附溶出伏安法测定精氨酸[J]. 甘肃化工, 2001, 3: 131~134
- 张小燕, 范晓东, 郭云柯, 等. 精氨酸的流动注射化学发光法测定[J]. 分析试验室, 2004, 23(8): 39~41
- Paul SF, Neil WB, Richard CF, et al. Chemiluminescence from the Sakaguchi reaction [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 329 (2): 340~341
- 吴艳, 艾连中, 丁先锋, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法分析碱性氨基酸[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22 (1): 74~76
- Chaves HJ, Braga Morais Z. HPLC assay of underivatized amino acid with column switching and evaporative light-scattering detection[J]. J High Res Chromatogr, 1997, 20 (4): 115~118
- Mathews BT, Higginson PD, Lyons R. Improving quantitative measurements for the evaporative light scattering detector [J]. Chromatographia, 2004, 60(10): 625~633
- Zhang WZ, Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolite in plasma by reversed-phase liquid chromatography with time controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization [J]. Anal. Biochem, 2004, 326(1): 87~97
- 李瑜, 江勇, 李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液 L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34(3): 32~34
- 姜岷, 王倩楠, 苏深, 等. HPLC-ELSD 法测定发酵液中 L-精氨酸含量[J]. 生物加工过程, 2006, 4(4): 61~64
- 鄢丹, 张毅, 韩玉梅, 等. HPLC-ELSD 法测定疏血通注射液 17 中未衍生氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 558~560
- 王绍萍, 惠洋, 桑春燕. 高效液相色谱法检测玉米浆中的氨基酸[J]. 中国地方病防治杂志, 2003, 18(1): 25~26

# Determination of L-arginine in Corn Steep Liquor by High Performance Liquid Chromatography-evaporative Light-scattering Detector

Wan Honggui, Zong Suyan, Cai Heng, Zhu Mingxing, Yuan Jianfeng

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with evaporative light scattering detector (ELSD-2000) was used for the determination of L-arginine in corn steep liquor without derivatization. An Alltima C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm i. d., 5 μm) was used with the mobile phase of 0.2% trifluoroacetic acid water solution containing 5.0 mmol/L heptafluorobutyric acid and acetonitrile (the ratio of volume was 93.75 to 6.25). The flow rate was at 0.8 mL/min. The drift tube temperature of ELSD was set at 110 °C, and the nitrogen flow rate was 2.8 L/min. The calibration curves were showed good linearity ( $R^2=0.9996$ ) within the concentration range of 50.0~500 g/L for L-arginine. The average recoveries were ranged from 97.70% to 102.2% and the standard deviation was less than 2.48%. The method was evaluated as rapid, accurate and simple. The validated method was successfully applied to quantify L-arginine in corn steep liquor and provided a new analysis of overall assessment of L-arginine in other organic nitrogen material or fermented broth.

**Key words** HPLC, ELSD, corn steep liquor, L-arginine

行业动态

## 我国肉类食品产业发展的三大方向

冷却肉的生产和消费比例将提高、逐渐代替热鲜肉是我国肉类食品产业发展的第一大趋势。发达国家冷却肉市场占有率达90%以上。冷却肉将代替热鲜肉,主要原因是(1)冷却肉的生产、贮藏、运输和销售均在冷链条件下进行,能科学控制温度,可有效抑制微生物的生长、保障鲜肉食品的卫生质量。(2)采用冷却生产和销售模式,可有效保留肉食品中的营养和风味成分。(3)冷却肉实行工厂化生产,并采用科学的管理体系。在热鲜肉的产销过程中,要对动物活体(活猪、活牛等)进行运输,但活体运输会带来动物疫病传播、环境污染、动物福利等方面的问题。而冷却肉采用的是宰后的畜禽胴体的冷链运输,可减少疫病传播的风险和环境污染,并可提高动物福利。

我国冷却肉在大城市已占到生鲜猪肉市场份额的25%左右。由于人们对食品安全、营养和风味的关注度越来越高,所以,冷却肉的市场潜力巨大、前景光明。

传统肉制品的生产方式将向现代化方向转变,这是我国肉类食品产业发展的第二大趋势。我国的传统肉制品包括腌腊和酱卤类肉制品等产品,如腌火腿、板鸭、风鹅、盐水鸭。传统肉制品的风味独特,国人十分爱吃这类食品,但目前,我国的很多传统肉制品仍以作坊方式生产,存在不少问题:不能满足商品属性,不能规模化生产,卫生安全性低。为此,科技人员应在以下几方面加大研发力度:(1)研究传统肉制品的风味形成机理。(2)研究影响传统肉制品品质的工艺,对传统工艺进行改造。例如,将风鹅的自然风干工艺改为人工风干,可将风干时间缩短50%~70%,从而缩短生产周期、提高生产效率。(3)研发新型生产设备。将传统肉制品的生产方式从手工转变为机械化,将有利于标准化生产的开展、提高肉制品质量。

低温肉制品的生产和消费比例将提高,是我国肉类食品产业发展的第三大趋势。低温肉制品是指在温和的加热环境下生产的肉制品,例如,采用巴氏消毒的温度(70~80℃)对肉进行加热处理,这种加热条件就比较温和。采用温和的条件对肉加热,对肉制品加工所用的原料肉中的营养和风味成分破坏较少,可有效保留肉类食品中的营养和风味物质。在发达国家,肉制品主要是低温肉制品。目前,我国已经开始生产低温肉制品,但要保障低温肉制品的卫生质量,必须要严格控制原料肉(生肉)的微生物数量。在正常条件下,刚屠宰的动物深层组织通常是无菌的,但在屠宰和加工过程中,肉的表面会受到微生物的污染。动植物的清洁状况和屠宰车间的卫生状况,与原料肉受微生物影响的程度密切相关,肉的初始载菌量越小,以其为原料加工的肉制品的卫生状况则越容易控制。在卫生状况良好的条件下屠宰出来的动物的肉,其初始菌落总数可控制在100cfu/cm<sup>2</sup>。