

HPLC-ELSD 法定量测定发酵液中的 *L*-异亮氨酸万红贵<sup>1</sup>, 朱庆平<sup>1</sup>, 蔡 恒<sup>1</sup>, 蔡立明<sup>2</sup>, 宁健飞<sup>2</sup>, 陆 彬<sup>1</sup>

1(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009) 2(无锡晶海氨基酸有限公司, 江苏无锡, 214199)

**摘 要** 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)定量测定发酵液中 *L*-异亮氨酸的含量。结果表明, *L*-异亮氨酸浓度在 0.960 ~ 2.880 g/L 时, 其峰面积(*Y*)与相应的浓度(*X*)呈线性关系, 线性方程为  $Y = 0.6615X - 0.2439$ , 相关系数为 0.9997。*L*-异亮氨酸的平均回收率为 99.08% ~ 101.3%, 相对标准偏差为 0.56% ~ 1.32%。方法的精密性、准确性好, 稳定性高, 能简便、快速、准确地测定发酵液中 *L*-异亮氨酸的含量。

**关键词** *L*-异亮氨酸, 高效液相色谱(HPLC), 蒸发光散射检测量(ELSD)

*L*-异亮氨酸(*L*-isoleucine)是人体 8 种必需氨基酸之一, 具有促进体内蛋白质、酶和肽类激素合成的功能, 在肌肉蛋白质代谢中极为重要, 主要用于治疗神经障碍、食欲减退和贫血, 有增强身体免疫力的功能, 是氨基酸输液、氨基酸口服剂不可或缺的成分<sup>[1, 2]</sup>。此外, *L*-异亮氨酸被广泛运用于食品工业、化妆品、光化学、电化学等领域<sup>[3, 4]</sup>。

*L*-异亮氨酸主要通过发酵法生产, 目前介绍 *L*-异亮氨酸测定方法的文献较少。采用纸层析法、化学比色法测定 *L*-异亮氨酸, 准确度低, 使用氨基酸分析仪测定成本较高, 不适用于生产测定<sup>[5, 6]</sup>。因此, 测定发酵液中异亮氨酸的含量需要一种高效快速的方法。本文尝试建立 *L*-异亮氨酸的 HPLC-ELSD 定量分析方法, 为发酵液中 *L*-异亮氨酸的含量测定提供一种简单、快速、准确的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪 器

高效液相色谱仪(Alltech), 包括 426HPLC 泵, ELSD 2000 检测器等; TGL-16G 冷冻离心机(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), *L*-异亮氨酸标准品(99%, sigma 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), 所用水由 Milli-Q 纯水机制备。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Prevail C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm i. d., 5

μm); 流动相: 0.14% 三氟乙酸(含 0.06% 七氟丁酸)溶液-乙腈溶液(80 : 20); 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 样品溶液的配制

*L*-异亮氨酸发酵液经 10 000 r/min 的速率离心 15 min 后, 取上清液稀释 10 倍, 经 0.22 μm 水膜过滤后待用。

### 1.5 标准溶液的配制

准确称取 *L*-异亮氨酸标准品 0.48 g, 用超纯水溶解, 振荡并定容至 100 mL, 得到浓度为 4.800 g/L 的 *L*-异亮氨酸标准品储备液。分别取 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 标准品储备液, 用超纯水分别稀释至 10 mL, 得质量浓度为 0.960 g/L, 1.440 g/L, 1.920 g/L, 2.400 g/L 和 2.880 g/L 的标准溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

*L*-异亮氨酸无紫外吸收, 无法直接使用紫外检测器检测, 必须进行衍生化处理才能检测。而 ELSD 对无紫外吸收的非挥发性化合物可以直接检测, 省略了衍生化处理这一步骤。因此实验中使用 ELSD 检测, 操作简单、快速。

以体积比为 90 : 10、80 : 20、70 : 30 的 0.14% 三氟乙酸(含 0.06% 七氟丁酸)溶液-乙腈溶液作为流动相进行实验。结果表明, 体积比为 80 : 20 时, *L*-异亮氨酸色谱峰与杂质峰完全分离, 色谱峰保留时间短, 峰形良好, 故选用该流动相。

漂移管温度和雾化气体流量是 ELSD 的重要参数, 对样品在 ELSD 中的响应值均有很大影响。通过改变漂移管温度(105℃、110℃、115℃、120℃和 125℃)和调节雾化气体流量(2.6 L/min、2.8 L/

第一作者: 研究员, 高级工程师。

收稿日期: 2006-11-13, 改回日期: 2007-01-11

min、3.0 L/min、3.2 L/min)发现,漂移管温度为110℃、气体流量为2.8 L/min时,基线平稳,响应值适中,故选用该 ELSD 参数。

2.2 线性范围及检出限

在1.3节中规定的色谱条件下,对5种不同浓度的L-异亮氨酸标准溶液进样,以L-异亮氨酸标准品浓度为横坐标,相应的峰面积/10<sup>7</sup>为纵坐标,以最小二乘法进行线性回归,得回归方程为 $Y = 0.6615X - 0.2439$ ,相关系数 $r^2 = 0.9997$ ,线性范围为0.960~

2.880 g/L。当S/N=3时,L-异亮氨酸的检出量为0.048μg。

2.3 精密度

对1.920 g/L的L-异亮氨酸标准溶液经6次平行测定,测定结果如表1所示,相对标准偏差为1.22%。对同一发酵液样品溶液经6次平行测定,测定结果如表2所示。L-异亮氨酸含量的相对标准偏差为1.41%,表明该方法精密度高、重复性好。

表1 L-异亮氨酸标准品测定的重复性

测定值/g · L <sup>-1</sup>						平均值/g · L <sup>-1</sup>	标准偏差	RSD/%
1.937	1.902	1.949	1.943	1.892	1.914	1.923	0.0235	1.22

表2 L-异亮氨酸样品精密度测定结果

测定值/g · L <sup>-1</sup>						平均值/g · L <sup>-1</sup>	标准偏差	RSD/%
20.52	20.82	21.29	20.98	20.64	21.14	20.90	0.295	1.41

2.4 稳定性

色谱系统稳定后,对同一发酵液样品溶液分别在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h时进样,测定结果如表3所示。L-异亮氨酸含量的相对标准偏差为1.85%,表明该方法在12 h以内稳定性良好。

表3 L-异亮氨酸的稳定性测定结果

测定时间/h	测定值/g · L <sup>-1</sup>	平均值/g · L <sup>-1</sup>	标准偏差	RSD/%
0	20.24			
2	20.47			
4	19.61			
6	19.66	20.07	0.371	1.85
8	20.53			
10	20.13			
12	19.87			

间短,可达到快速检测的目的。根据L-异亮氨酸的回归方程,按外标法计算可得样品中L-异亮氨酸的含量。

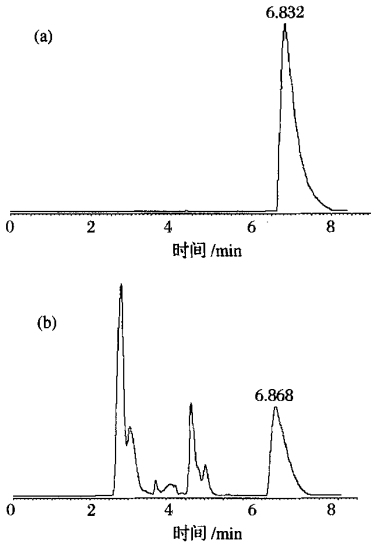


图1 标准溶液(a)和发酵液(b)样品的色谱图

2.5 回收率

将一定含量的L-异亮氨酸发酵液样品溶液分成3组,每组3份。每组分别加入低、中、高3种浓度的标准溶液,在1.3节规定的色谱条件下进样,测定结果如表4所示。样品的平均回收率为99.08%~101.3%,相对标准偏差为0.56%~1.32%,表明该方法准确可靠。

2.6 样品的测定

分别将L-异亮氨酸发酵液样品溶液和标准溶液进样测定,标准溶液和样品溶液的色谱图如图1所示。由图1可知,样品溶液中L-异亮氨酸色谱峰与杂质峰完全分离,标准溶液和样品溶液中L-异亮氨酸的保留时间分别为6.832 min、6.868 min,保留时

3 结论

通过HPLC-ELSD色谱条件的选择,建立了使用HPLC-ELSD定量测定发酵液中的L-异亮氨酸的方法。结果表明,理想的HPLC-ELSD色谱条件如下:流动相为体积比80:20的0.14%三氟乙酸(含0.06%七氟丁酸)溶液-乙腈溶液,流速为0.8 mL/min,蒸发光散射检测器漂移管温度为110℃,气体流

量为 2.8 L/min。该方法操作简单快速,稳定性高,精密度、准确度高,可满足发酵液中的 *L*-异亮氨酸定量分析要求。该方法也可用于 *L*-异亮氨酸分离纯化过程中 *L*-异亮氨酸的含量测定,为发酵法生产 *L*-异亮氨酸的整个工艺过程提供可靠的检测手段。

表 4 *L*-异亮氨酸的回收率测定结果

组号	添加量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD/%
1	4.08	4.18	102.5	101.3	1.32
	4.08	4.07	99.85		
	4.08	4.14	101.5		
2	8.42	8.38	99.52	99.96	0.56
	8.42	8.47	100.6		
	8.42	8.40	99.76		
3	13.06	12.95	99.16	99.08	0.66
	13.06	13.02	99.69		
	13.06	12.85	98.39		

#### 参 考 文 献

1 吴梧桐. 生物制药工艺学[M]. 北京:中国医药科技出版

社,1993

- 王小生. 必需氨基酸对人体健康的影响[J]. 中国食物与营养,2005(7):48~49
- Masahiro Suzuki, Sanae Owa, Mutsumi Kimura, et al. Supramolecular hydrogels and organogels based on novel *L*-valine and *L*-isoleucine amphiphiles [J]. Tetrahedron Letters,2005,46(2):303~306
- Masahiro Suzuki, Teruaki Sato, Akio Kurose, et al. New low molecular weight gelators based on *L*-valine and *L*-isoleucine with various terminal groups [J]. Tetrahedron Letters,2005,46(2):741~745
- 李 进, 张伟国. 纸层析-分光光度法测定发酵液中 *L*-异亮氨酸[J]. 无锡轻工大学学报,2005,24(1):95~98
- 张邦建, 宋文军, 张克旭. 化学比色法测定发酵液中 *L*-异亮氨酸的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2005,25(2):29~32

## Detection of *L*-Isoleucine in Fermentation Broth by HPLC-ELSD

Wan Honggui<sup>1</sup>, Zhu Qingping<sup>1</sup>, Cai Heng<sup>1</sup>, Cai Liming<sup>2</sup>, Ning Jianfei<sup>2</sup>, Lu Bin<sup>1</sup>

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

2(Wuxi Jinghai Amino Acid Co. Ltd, Wuxi 214199, China)

**ABSTRACT** This paper developed a method for the determination of *L*-isoleucine in fermentation broth using the high performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). A good linearity was obtained in the range of 0.960~2.880 g/L ( $r = 0.9997$ ) for *L*-isoleucine. The average recoveries of *L*-isoleucine were 99.08%~101.3% and the relative standard deviations were 0.56%~1.32%. The method is simple and rapid with reproducibility for the determination of *L*-isoleucine in fermentation broth.

**Key words** *L*-isoleucine, HPLC, ELSD

#### 行业动态

### 利乐世界级包装材料厂落户呼和浩特市

2007年3月,全球著名液态食品加工及包装系统生产商利乐公司宣布,投资超过6千万欧元,在内蒙古呼和浩特市建立包装材料厂,计划于2008年第4季度正式投产。

位于呼和浩特经济技术开发区的新工厂将于今年年中全面动工。该厂采用利乐全球领先的无菌包装材料生产设备,预计年产包材80亿包。

在呼和浩特开设新厂,将大幅度提高利乐在中国的包材生产和供货能力,更好地满足和超越中国乳品和饮料生产厂商快速增长的需求。这项投资不仅体现了利乐与“中国乳品和饮料市场共同成长”的理念,也是响应中国政府开发西部政策和号召的重大举措。

随着呼市新厂项目的投资,利乐在中国累计投资已经超过26亿元人民币。利乐在北京、江苏昆山和广东佛山建有包材厂,并在上海拥有加工设备系统中心,加上即将兴建的呼市新厂,生产布局更加完善,辐射面更广。