

毛细管气相色谱法分析丙酮和丁醇发酵产物

刘广慧, 朱文众, 胡铁功

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄, 050018)

摘要 建立了毛细管气相色谱法, 测定丙酮和丁醇发酵产物中丙酮、丁醇、乙醇含量的方法。采用 HP-INNO-WAX(19091N-236)毛细管柱(60m×0.251 mm×0.50 μm), 氢火焰离子化检测器(FID), 柱温程序升温, 以高纯氮作为载气, 流速 1 mL/min, 分流比 90:1, 进样量 1.0 μL, 以内标法定量。在确定的色谱条件下, 乙醇、丙酮、丁醇线性关系良好, 线性回归系数 $\geq 0.999\ 3$, 平均回收率在 99.2%~99.8%, 相对标准偏差 $\leq 2.50\%$, 最低检测限分别为 0.10 μg/mL, 0.12 μg/mL 和 0.20 μg/mL。该方法简单, 灵敏度高, 重复性好, 结果准确, 适用于丙酮和丁醇发酵产物的检测。

关键词 毛细管气相色谱法, 丙酮和丁醇发酵, 丙酮, 丁醇, 乙醇

由丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)发酵产生的丙酮、丁醇、乙醇统称为丙丁总溶剂, 是重要的基本有机化工原料, 除直接用作溶剂外, 还有许多用途^[1]。发酵法是在厌氧条件下利用淀粉、甘薯发酵生成丁醇、丙酮和乙醇等混合溶剂, 通常的质量比例为 6:3:1^[2]。目前报道的气相色谱法测定总溶剂含量所用的气相色谱条件差别很大, 通常采用不同材料的填充柱来检测^[3,4], 但随着毛细管气相色谱仪的广泛应用, 用毛细管柱代替填充柱测定各种成分已成为今后的趋势。在柱温选择上有些采用程序升温条件, 有些采用恒温条件, 有的样品要经过复杂且费时的萃取预处理^[5], 在萃取过程中溶剂易挥发从而会影响数据的准确性。笔者结合丙酮丁醇发酵工艺实验, 建立了用毛细管气相色谱法以异丁醇作为内标物简单快速测定丙丁发酵醪液中总溶剂的含量, 并对丙酮、丁醇和乙醇 3 种溶剂进行定性、定量分析, 对发酵工艺的中间控制和含量的检测起到了很好的作用, 它具有分离效能高, 分析速度快, 准确, 样品用量少等特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6820 气相色谱仪(美国), 分流/不分流进样口, 氢火焰离子化检测器(FID), CERITY NDS QA/QC 工作站, GX300A-氮、氢、空一体机, 台式离心机。

丙酮、乙醇、丁醇、异丁醇均为国产色谱纯试剂, 水为超纯水。

1.2 色谱条件

HP-INNOWAX(19091N-236)毛细管色谱柱(60 m×0.251 mm×0.50 μm)。

柱温: 初始温度 70℃, 保持 1 min 后以 20℃/min 的速率升至 130℃, 保持 1 min 后以 10℃/min 的速率升至 170℃, 保持 1 min 后, 以 5℃/min 的速率升至 190℃, 保持 2 min, 总运行时间为 16 min。总流量 100 mL/min, 载气(N₂)流速 90 mL/min; 柱流速 1 mL/min; H₂ 流速 30 mL/min; 空气流速 300 mL/min。进样口温度 180℃, FID 的温度为 220℃, 进样量 1.0 μL, 分流比 90:1。采用内标法定量, 内标物为异丁醇。

1.3 标准溶液的配制

内标溶液的配制 准确称取适量异丁醇, 用超纯水制成每 100 mL 中含有 0.192 mg 异丁醇的溶液。

标准溶液的配制 准确称取乙醇标准品 150 mg, 丙酮标准品 400 mg, 丁醇 750 mg 置 25 mL 容量瓶中, 加超纯水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。分别准确吸取对照品 0.01、0.05、1.0、2.0、3.0 和 4.5 mL, 置 5 mL 容量瓶中, 再准确加入 0.5 mL 内标液, 用超纯水稀释至刻度, 摇匀, 得到一系列溶液。

1.4 样品处理

取不同培养时间的发酵液, 摇匀, 倒入 5 mL 的离心管中离心(9 000 r/min, 10 min)后, 取 1 mL 上清液, 加入 4 mL 内标液, 充分摇匀。进样 1.0 μL 进行检测。以保留时间进行定性, 内标法进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析条件的选择

第一作者: 硕士研究生(朱文众教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-07-17

2.1.1 色谱柱的选择

丙丁发酵产物丙酮、丁醇、乙醇为极性物质,故应当选择与之极性相似的毛细管柱,本实验室根据实际经验,选择了 HP-ANNOXWAX 毛细管柱。

2.1.2 柱温的选择

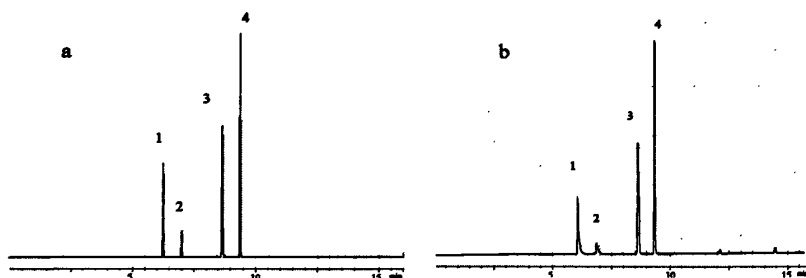
由于丙酮、乙醇、异丁醇、丁醇沸点差别较大,为了既能够使各色谱峰得到有效分离,又能够尽量缩短分析时间,采用了程序升温方式。同时还考虑了初始温度对保留时间和峰形的影响。固定其他实验条件,分别在初始温度为 60℃、70℃、90℃ 下测定丙酮、丁醇、乙醇标准液。试验表明,初始温度低于 70℃ 时,保留时间增加,不利于大批量样品的测定;初始温度高于 80℃,则峰出现严重的脱尾现象。故 70℃ 为适

宜初始柱温条件。

2.1.3 分流比的选择

固定其他测定条件进样,分别在分流比为 80 : 1, 90 : 1, 100 : 1 时进样丙酮、丁醇、乙醇标准液,研究分流比对峰形和峰面积的影响,试验发现,分流比小于 80 时, FID 的检测量超负荷,造成丙酮、乙醇的峰顶(顶点)分裂;分流比大于 100 时,低浓度物质乙醇的响应值小,不利于积分的处理;当分流比为 90 时,丙酮、乙醇、异丁醇、丁醇的峰形最好,出峰时间恰当,故选择 90 : 1 为分流比条件。

在上述的色谱条件下,发酵产物分离良好,结果见图 1。



a—标准图谱, b—发酵产物图谱
1—丙酮; 2—乙醇; 3—异丁醇(内标物); 4—丁醇

图 1 标准物与发酵产物图谱

2.2 线性范围和最低检测限

线性范围。取 0.1 μL 六个浓度水平的标准液分别进样。以溶液浓度 $C(\text{mg/mL})$ 为横坐标,待测峰面积与内标峰面积比值 A 为纵坐标进行线性回归,得到的标准曲线和回归系数见表 1。

结果表明,乙醇在 0.012~5.4 mg/mL,丙酮在 0.032~14.4 mg/mL,丁醇在 0.0~27.0 mg/mL 浓度范围内,线性关系良好,回归系数 ≥ 0.9993 。

表 1 丙丁总溶剂的标准曲线及线性回归系数

组分	线性方程	回归系数
乙醇	$A = 3.0366C + 0.0316$	0.9993
丙酮	$A = 2.7762C + 0.0261$	0.9997
丁醇	$A = 2.0595C + 0.1142$	0.9996

最低检测限以 3 倍信噪比计算乙醇、丙酮、丁醇的最低检测限分别为 0.10 μg/mL, 0.12 μg/mL 和 0.20 μg/mL。

2.3 加标回收率和精密度实验

对不同含量的发酵产物进行加标回收实验。取 2 个不同浓度级别的发酵产物进行本底值的测定,在

发酵产物中分别添加标准溶液,按实验方法重复 5 次分别测定溶液中丙酮、丁醇、乙醇的含量,计算其回收率和相对标准偏差,如表 2。

表 2 乙醇、丙酮、丁醇回收率和精密度测试结果

发酵产物	成分	本底值 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	加标量 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	实测值 $/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均回收率/%	相对标准偏差/%
A	乙醇	1.112	1.000	1.108 ± 0.012	99.2	0.54
	丙酮	3.353	3.200	3.349 ± 0.010	99.6	2.50
	丁醇	7.205	6.000	7.208 ± 0.006	99.9	0.16
B	乙醇	2.113	1.000	2.115 ± 0.015	99.4	0.80
	丙酮	6.060	3.200	6.059 ± 0.020	99.8	1.35
	丁醇	12.132	6.000	12.132 ± 0.009	99.8	0.31

从表 2 可知,丙酮、丁醇、乙醇的回收率在 99.2%~99.8%,相对标准偏差在 0.16%~2.5%,说明应用上述气相色谱法测定丙酮、丁醇、乙醇的含量,加标回收率和相对标准偏差均能满足定量分析的要求。

2.4 发酵产物含量的测定

丙丁发酵产物中含有溶剂(丙酮、丁醇、乙醇)及有机酸(乙酸、丁酸),是一个混合的产物。本研究主

要检测溶剂的产率,并对其进行定性、定量分析;而有机酸作为发酵监控的一个指标可以对其进行定性、定量分析。结果表明,各发酵产物分离效果好,峰形尖锐对称。所测发酵液中丙酮、乙醇、丁醇的含量分别为 (6.306 ± 0.051) 、 (1.025 ± 0.023) 、 (12.521 ± 0.049) mg/mL。

3 结 论

丙丁发酵属于微生物发酵,发酵过程中产物有溶剂(丙酮、丁醇、乙醇)和有机酸(乙酸、丁酸)等多种物质,在检测过程中容易出现重叠峰或拖尾峰,对检测准确性有很大的影响,尤其对丙丁发酵结束时产品的检测影响很大。采用毛细管气相色谱-氢火焰离子化检测器测定丙丁发酵产物,通过对柱温、流量、分流比、内标物的选择,缩短了检测时间并保证了各溶剂有效地分离。分析的灵敏度和准确度大为提高且重

现性良好。

参 考 文 献

- 1 成跃祖. 总溶剂的发展现状浅析[J]. 甘肃化工, 1994, (4): 11~13
- 2 陈驹声. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991. 109
- 3 Frederic Monot, Jean-Rene Martin, Henri Petidmange, et al. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44(6): 1318~1324
- 4 Mustafa Kansiz, Richard Gapes J, Don McNaughton, et al. Mid-infrared spectroscopy coupled to sequential injection analysis for the on-line monitoring of the acetone-butanol fermentation process[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 438: 175~186
- 5 林赛珍, 徐 敏, 章宗铭, 等. 丙酮丁醇梭菌发酵产氢工艺研究[J]. 药物生物技术, 2006, 13(2): 136~139

Analysis of Acetone-butanol Fermentation Products by Capillary Gas Chromatography

Liu Guanghui, Zhu Wenzhong, Hu Tiegong

(College of Biological Science and Technology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

ABSTRACT A capillary gas chromatographic method equipped with a flame ionization detector for the analysis of the products of the acetone-butanol fermentation (acetone, butanol, ethanol) was developed. The analytical column was HP-INNOWAX (19091N-236) (60 m×0.251 mm×0.50 μm). The oven temperature was programmed. The carrier gas was nitrogen. The flow rate was 1 mL/min. The split ratio was 90:1. The injection volume was 1 μL. Internal standard method was used for quantitative analysis. There were good relationships of ethanol, acetone, butanol on the determination condition. The average recoveries were 99.2%~99.8%. The relative standard deviations were less than 2.5%. The limits of detection were 0.10, 0.12, and 0.20 μg/mL, respectively. This method is sensitive, accurate, repeatable and easy to operate.

Key words capillary gas chromatography, acetone-butanol fermentation, acetone, butanol, ethanol

食品中铅镉含量制定国际新标准

食品安全专家对食物中铅、镉和黄曲霉素的限定最高含量设定新的国际标准,以提高和保证食品安全。

这份新标准由食品法典委员会制定,各国自愿执行,但可适用于国际贸易中的食品托运。

根据这份标准,每千克精白米中镉的含量最高不能超过0.4mg;在除牡蛎和扇贝外的贝壳类以及鲑鱼、章鱼等头足类海产品中,镉的含量不能超过每千克2mg;在鱼类中,铅的含量最高不能超过每千克0.3mg。

新标准没有对巴西坚果的黄曲霉素含量提出具体数量上限,但要求在生产流程中遵循新颁布的一项操作规程。

食品法典委员会在一份声明中说,食物中铅含量过高能导致贫血、肝损害和神经失调;镉含量过高能损害肾脏;黄曲霉素则被认为容易引发胃绞痛,并有致癌危险。

食品法典委员会的专家还同意成立一个特别工作小组,评估动物食品中和抗菌素有关的食物安全风险。食品法典委员会由世界卫生组织和联合国粮农组织共同管理,宗旨在于保障消费者的食品安全和确保食品贸易中的规范。