乳酸菌素原料中有机酸的测定分析

马晓娟 谢有发 刘文君 乔培 钟地长 李诒光 余银芳
（江中药业股份有限公司，南昌，330096）

摘　要：采用手性柱高效液相色谱法分离并测定乳酸菌素原料中的L-乳酸与D-乳酸，采用气质联用法测定乳酸菌素原料中7种短链脂肪酸（乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸）的含量，最终对比不同厂家原料中9种有机酸的含量，为原料的质量评价提供科学依据。高效液相色谱法中流动相为2 mmol/L $CuSO_4$溶液（溶剂为5%异丙醇）、流速1.000 mL/min、柱温35 ℃、检测波长254 nm，L-乳酸、D-乳酸线性关系良好，重复性试验、稳定性试验的RSD值均小于3%，加样回收率分别为98.90%和100.26%。该方法操作简单，精密度和准确度高，适用于乳酸菌素原料中L-乳酸与D-乳酸的检测。短链脂肪酸的测定中，经过主成分分析，选择2个因子（F_1、F_2）对不同厂家原料进行综合评价，函数为 $F=72.047F_1+27.953F_2$，结果显示，C厂家原料相对于B、A厂家的较好。三个不同厂家的原料中9种有机酸的含量各有差别，对其含量进行评价，能够为原料的品质建立更全面、科学的评价体系。

关键词：乳酸菌素原料；L-乳酸；D-乳酸；短链脂肪酸；主成分分析
中图分类号：TS252.7　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1001-2230（2020）08-0053-04
doi:10.19827/j.issn1001-2230.2020.08.013

Analysis and Study of Organic Acids in Lactobacillin Material

MA Xiaojuan, XIE Youfa, LIU Wenjun, QIAO Pei, ZHONG Dichang, LI Yiguang, YU Yinfang
(Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd.,Nanchang 330096,China)

Abstract: L-lactic acid and D-lactic acid in lactobacillin material were separated and measured by chiral column HPLC. 7 kinds of short chain fatty acids (acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid and caproic acid) in lactobacillin material was determined by GC-MS method. Finally, the content of 9 kinds of organic acids in lactobacillin materials from different manufacturers were compared, to provide scientific basis for quality evaluation of raw material. In the HPLC method, the mobile phase was 2 mmol/L $CuSO_4$ solution (solvent was 5% isopropanol), the flow rate was 1.000 mL/min, the column temperature was 35 ℃, and the detection wavelength was 254 nm. L-lactic acid and D-lactic acid had better linearity. The RSD of L-lactic acid, D-lactic acid in repetitive test and stability test were all less than 3%.The recovery rates of L-lactic acid and D-lactic acid were 98.90% and 100.26%, respectively. The method is simple, precise and accurate, and suitable for the detection of L-lactic acid and D-lactic acid in lactobacillin materials. In the determination of SCFAs, two factors (F_1 and F_2) were selected for comprehensive evaluation of raw materials from different manufacturers after principal component analysis. The function was $F=72.047F_1+27.953F_2$. The results showed that raw materials from C manufacturers were better than those from B and A manufacturers . The contents of 9 kinds of organic acids in the raw materials from three different manufacturers are different from each other. The evaluation of their contents can establish a more comprehensive and scientific evaluation system for the quality of raw materials.

Key words: Lactobacillin material; L-lactic acid; D-lactic acid; SCFAs; PCA

0　引　言

乳酸是乳酸菌发酵中的主要代谢产物，结构式为$CH_3CHOHCOOH$，由于分子内含有一个不对称碳原子，因此具有旋光异构现象，可区分为L-乳酸和D-乳酸，当两者以等比例混合时，即成为内消旋的DL-乳酸。由于人体只含有L-乳酸脱氢酶，从而能分解自体产生的或摄入的L-乳酸，不能代谢D-乳酸[1]。世界卫生组织（WHO）明确规定，人体每天摄取D-乳酸的量限定在100 mg/kg体重以下，而对L-乳酸不加限制[2]。目前研究食品与药品中的L-乳酸、D-乳酸的报道较多，食品中多为发酵制品，如白酒[3]、酸奶[4-5]、乳酸饮料[5]、泡菜[6]等，药品中有醋酸奥曲肽注射剂[7]、左氧氟沙星[8]、乳酸菌素原料制剂[9]等，关于L-乳酸、D-乳酸的测定，已经建立的分析方法主要有4种：滴定法、旋光法、UV酶法分析、酶电极法和液相色谱法[10]。

短链脂肪酸通常是指碳链中碳原子数少于6的有机脂肪酸，主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸等[11]。短链脂肪酸是乳酸发酵的代谢物之一，能改善一些金属离子如钙、铁、镁的代谢和吸收，对胃黏膜有一定的保护作用，也能改善乳制品

收稿日期：2019-11-20
作者简介：马晓娟（1986-），女，工程师，研究方向为功能性食品开发。
通讯作者：余银芳

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的风味[12-13]。短链脂肪酸被吸收后，在各种器官中被利用，在调节内源性代谢方面起重要作用[14]。目前，气质联用法用于检测短链脂肪酸较为广泛，曾鳞粞[15]用GC-MS分别对生物组织、粪便、血液等对短链脂肪酸进行了分析，庞锦伟等[16]用GC-MS对酵素产品中的5种短链脂肪酸进行了测定。乳酸菌素原料是由嗜酸乳杆菌发酵脱脂奶粉而成的粉末，其中乳酸及短链脂肪酸是主要代谢产物。现行质量标准水平较低，质量控制方法简单，其中总酸量通过酸碱滴定法测定，没有较为详细的指标性成分。本实验参考白璧炜的检测方法[9]及国标方法[17]，采用高效液相色谱法对乳酸菌素原料中的L-乳酸、D-乳酸进行分离与测定，采用气质联用法[18-20]对原料中的7种短链脂肪酸进行测定，用较为先进的技术对原料进行质量分析，为选择原料提供科学的参考依据。

1 材料与设备

1.1 样品与试剂

乳酸菌素原料，分别由A、B、C原料厂家提供；L-乳酸对照品（≥98%）、D-乳酸对照品（≥90%），德国默克生命科学有限公司；乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸（均为色谱纯），上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200高效液相色谱仪，美国安捷伦科技有限公司；Agilent 7890A-7000D气质联用仪，美国安捷伦科技有限公司；sartorius MS204S/01电子天平，德国Sartorius赛多利斯公司；sartorius MS6.6S-CE电子天平，德国Sartorius赛多利斯公司；IQ 7000超纯水仪，厦门精益兴业科技有限公司；KQ-1000KDE超声清洗仪，昆山市超声仪器有限公司；GL-20G-II低温高速离心机，上海安亭科学仪器厂。

2 方法与测定

2.1 L-乳酸与D-乳酸的测定

2.1.1 标准品溶液的制备

精密称取L-乳酸对照品26.540 mg，D-乳酸对照品25.060 mg，加流动相溶解并定容到25 mL，经稀释并折算制成系列浓度的标准溶液，L-乳酸的对照品浓度分别为0.212、0.425、0.637、0.849、1.062 mg/mL，D-乳酸对照品浓度分别为0.200、0.401、0.601、0.802、1.002 mg/mL。

2.1.2 供试品溶液的制备

精密称取乳酸菌素原料粉末约0.6 g，精密称定，置于100 mL容量瓶中，加入少量流动相溶解，超声处理15 min，放冷，加溶液稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜过滤，即得。

2.1.3 色谱条件

色谱柱：手性柱Chirex 3126 (D)-penicillamine（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温：35 ℃；流动相：2 mmol/L硫酸铜溶液（溶剂为5%异丙醇）；流速：1.000 mL/min；检测波长：254 nm；进样量：10 μL。

2.1.4 定性与定量

将相同色谱条件下的样品色谱图与乳酸标准液色谱图进行对照，根据保留时间对样品中的L-乳酸、D-乳酸进行定性。用外标法定量，计算出样品中L-乳酸和D-乳酸的含量。

2.2 短链脂肪酸的测定

2.2.1 标准品溶液的制备

先配制高浓度混标，逐级稀释成9.5、8、2、1、0.5、0.3、0.2、0.1、0.05、0.02、0.005 μg/mL，然后加入内标。

2.2.2 供试品溶液的制备

（1）称取样本20 mg于2 mL EP管中，加入1 mL磷酸（0.5% *v*/*v*）溶液涡旋10 min混匀，超声5 min。

（2）取0.1 mL上述样品匀液加入到1.5 mL离心管中，加入0.5 mL MTBE（含内标）溶液，涡旋3 min，超声5 min；

（3）12 000 r/min、4℃条件下离心10 min，离心后吸取上层清液0.2 mL于进样瓶，待GC-MS/MS分析；

2.2.3 色谱条件

色谱柱：DB-FFAP (30m×0.25mm×0.25 μm)；进样量：3 μL；载气：氦气；柱流速：1.2mL/min；分流模式：2∶1；升温程序：95 ℃保持1min，以25 ℃/min的速度升至100 ℃，以17 ℃/min的速度升至130 ℃，保持0.4 min，以25 ℃/min的速度升至200 ℃，保持0.5 min；扫描模式：MRM；四级杆温度：150° C；前进样口温度：200 °C；传输线温度：230 °C；离子源温度：230 °C；电离电压：70eV。

3 结果与讨论

3.1 L-乳酸与D-乳酸检测的方法学验证

3.1.1 线性与范围

取“2.1.1”项下不同浓度的L-乳酸对照品溶液、D-乳酸对照品溶液，分别精密量取10 μL注入液相色谱仪峰面积，以对照品峰面积为横坐标（*X*），进样浓度为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得到回归方程。

L-乳酸：$y=0.0146x+0.0135$（$R^2=0.9998$）；线性范围0.2123~1.0616 mg/mL

D-乳酸：$y=0.0147x-0.0036$（$R^2=0.9997$）；线性范围0.2005~1.0024 mg/mL

3.1.2 重复性试验

精密称取乳酸菌素原料的同一批样品6份，每份约0.6 g，按“2.1.2”项下制备供试品方法平行制备，通过进样检测，根据峰面积与回归方程计算含量。

L-乳酸的平均含量为44.2359 mg/g，RSD值为1.48；D-乳酸的平均含量为35.5082 mg/g，RSD值为0.73。

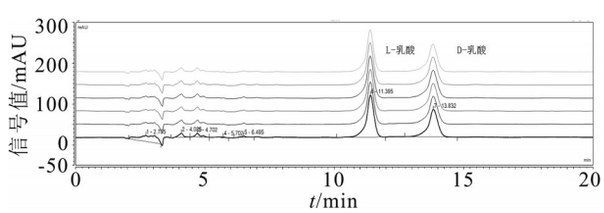

图1 L-乳酸、D-乳酸的重复性色谱图

3.1.3 稳定性试验

精密吸取乳酸菌素原料的同一供试品溶液，分别

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于配制后0、2、4、6、12、16、24 h进样检测，根据峰面积考察样品稳定性。L-乳酸的RSD值为1.32%，D-乳酸的RSD值为1.21%。表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

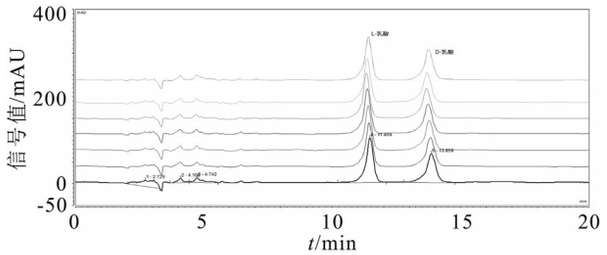

图2　L-乳酸、D-乳酸的稳定性色谱图

3.1.4　加样回收试验

精密称取乳酸菌素原料的同一批样品6份，每份称约0.10 g，至于25 mL容量瓶中，同时各移取10 mL同一浓度的对照品溶液（L-乳酸0.8043 mg/mL、D-乳酸0.7172 mg/mL）至容量瓶中，按“2.1.2”项下供试品制备方法平行制备，通过进样检测，根据峰面积与回归方程计算其含量。

L-乳酸的平均回收率为98.90%，D-乳酸的平均回收率为100.26%，RSD值分别为1.89、1.44。

3.2　不同厂家乳酸菌素原料中L-乳酸、D-乳酸的含量测定

按“2.1.2”项下供试品制备方法平行制备，对3个不同厂家乳酸菌素原料中L-乳酸、D-乳酸的含量进行检测。

表1　不同厂家乳酸菌素原料中L-乳酸、D-乳酸的含量　mg/g

厂家	L-乳酸	D-乳酸
A	80.0298±0.6854	71.6919±0.7088
B	85.0330±0.6767	59.8043±0.1310
C	106.7759±0.0696	77.3325±0.5850

由表中结果可知，不同厂家的乳酸菌素原料中，L-乳酸与D-乳酸的含量有明显差别，两者比值均大于1。其中厂家C的L-乳酸含量最高，厂家B的居中，而厂家A的含量最低，就L-乳酸含量进行排序为C＞B＞A。

3.3　短链脂肪酸标准品的测定

3.3.1　短链脂肪酸混标总离子流图

7种短链脂肪酸混合标液GC-MS总离子流色谱如图3。

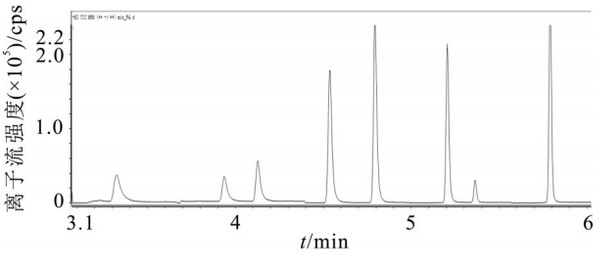

图3　7种短链脂肪酸混合标液GC-MS总离子流色谱图

3.3.2　短链脂肪酸线性关系

7种短链脂肪酸线性关系如表2。

表2　7种短链脂肪酸的出峰时间及线性关系结果

编号	英文缩写	名称	RT/min	线性方程	相关性系数R^2	线性范围/(mg·L^{-1})
1	AA	乙酸	3.328	y= 1.2848x+0.1517	0.9943	0.005~20
2	PA	丙酸	3.938	y= 0.6232x−0.0697	0.9972	0.05~20
3	IBA	异丁酸	4.127	y= 1.4206x+0.0060	0.9995	0.005~20
4	BA	丁酸	4.560	y= 6.4224x+0.2279	0.9977	0.005~20
5	IVA	异戊酸	4.800	y= 8.2127x−0.0110	0.9977	0.005~20
6	VA	戊酸	5.209	y= 4.6976x+0.0026	0.9968	0.005~20
7	HA	己酸	5.789	y= 5.2187x−0.1260	0.9953	0.05~9.5

3.4　不同厂家乳酸菌素原料中短链脂肪酸的含量测定

按“2.2.2”项下供试品制备方法制备样品，对3个不同厂家乳酸菌素原料中7种短链脂肪酸的含量进行检测。

表3　不同厂家乳酸菌素原料中短链脂肪酸的含量　μg/g

项目	A	B	C
乙酸	398.0611	461.5371	361.4520
丙酸	4.9868	4.7531	69.4990
异丁酸	0.8177	1.3617	1.9190
丁酸	28.9898	31.2121	33.1770
异戊酸	1.2345	1.7098	3.6300
戊酸	0.2063	0.2603	0.3220
己酸	17.3503	20.2289	13.0920
总量	451.6465	521.063	483.091

3.5　不同厂家乳酸菌素原料中短链脂肪酸主成分分析

采用SPSS 21.0软件，将三个厂家乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸、7种短链脂肪酸总量等8个指标转换成2个主成分，这2个主成分提供了100%的信息，且是综合的，相互独立的指标，因此可用这2个主成分对各样品进行综合评价，结果如表4所示，前2个主成分的累积贡献率为达100%，因此选定前2个主成分来概括样品信息。

表4　特征值、方差贡献及累积贡献率

主成分	特征值	方差贡献/%	累计贡献率方差贡献/%
1	5.764	72.047	72.047
2	2.236	27.953	100.000

表5是描述各因素对主成分贡献的主成分系数向量，对主成分1贡献最大的是异戊酸、丙酸、戊酸、异丁酸、丁酸，对主成分2贡献最大的是7种有机酸总量、乙酸、己酸、丁酸、异丁酸。

以2个主成分F_1、F_2与其贡献率构建出三个厂家短链脂肪酸的综合评价模型F，F是主成分F_1、F_2的线性组合，即：F=72.047F_1+27.953F_2。

利用数学模型对三个厂家短链脂肪酸进行综合评价，结果见表6。排名为C＞B＞A。

4　讨　论

本研究参考高效液相色谱法[9,12]及

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表5　主成分系数向量

得分系数	成分1	成分2
乙酸	−0.116	0.333
丙酸	0.171	−0.074
异丁酸	0.163	0.155
丁酸	0.160	0.173
异戊酸	0.173	0.012
戊酸	0.165	0.142
己酸	−0.146	0.243
总酸量	0.019	0.445

表6　3个厂家样品的主成分得分值排序结果

厂家	得分	排序
A	−0.777	3
B	0.008	2
C	0.769	1

气质联用法[13−15]分别对乳酸菌素原料中的L−乳酸与D−乳酸及乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、己酸等7种短链脂肪酸进行了含量测定，并对短链脂肪酸结果进行了主成分分析。最终结合L−乳酸、7种短链脂肪酸含量，判定三个厂家乳酸菌素原料质量为C＞B＞A。实验结果表明，本研究所用方法准确、可靠，可作为乳酸菌素原料质量控制的方法之一。

不同厂家9种有机酸的含量不同，可能是由脱脂奶粉的发酵工艺不同造成的，如发酵菌剂的活力、发酵时间或发酵温度的差异等。在此基础上，尝试建立乳酸菌素原料品质更全面更科学的评价体系，加入有机酸含量和比例的控制，可为进一步提高原料的品质、改善发酵工艺提供科学依据。

参考文献：

[1] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74 (3):524−534.

[2] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications [J]. Food Technology and Biotechnology, 2006,44 (2):163−172 .

[3] 江锋,赵振宇,聂叶,等.高效液相色谱法对白酒中的L−乳酸和D−乳酸的手性分离和测定[J/OL].酿酒科技:1−7[2019−09−29].

[4] 冯立科,杨爱君.高效液相色谱法直接拆分和测定酸奶中的乳酸手性对映体[J].农产品加工(学刊), 2014(23):43−46,49.

[5] 潘艳虹,刘冬梅,何叶子.手性柱色谱法测定酸奶及乳酸饮料中的L−乳酸及D−乳酸[J].中国乳品工业, 2010, 38(05):49−52.

[6] 黎婕,刘冬梅,冯细漫.几种泡菜中的乳酸两种手性对映体和亚硝酸盐的测定[J].食品研究与开发,2010,31(12):129−133.

[7] 梅芊,刘英.HPLC法测定醋酸奥曲肽注射剂中乳酸对映异构体含量[J].药物分析杂志,2017,37(11):2019−2024.

[8] 黄玉兰.HPLC鉴别乳酸左氧氟沙星中的乳酸[J].华西药学杂志,2016,31(06):631−633.

[9] 白璧炜,游正琴,许乾丽,等.高效液相色谱法测定乳酸菌素原料制剂中乳酸对映体的含量与比例[J].药物分析杂志,2015,35(12):2126−2130.

[10] 孙晶,朱学伸,王苑,等.食品中L−乳酸检测方法及其研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(31):17801−17802,17805.

[11] 郭本恒,刘振民.益生菌[M]. 北京:化学工业出版社，2015.

[12] 魏光强,陈越,卓加珍,等.酸奶发酵和冷藏过程中品质评价及主要风味成分变化分析[J].食品与发酵工业,2019,45(18):113−119.

[13] 马媛,耿伟涛,王金菊,等.乳酸菌代谢与食品风味物质的形成[J].中国调味品,2019,44(01):159−163,172.

[14] Li Linyan,Pan Meng,Pan Shijie,Li et al. Effects of insoluble and soluble fibers isolated from barley on blood glucose, serum lipids, liver function and caecal short−chain fatty acids in type 2 diabetic and normal rats.[J]. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2020,135.

[15] 曾鳞栖.基于固相萃取−气相色谱−质谱联用的生物样品中短链脂肪酸分析方法建立及应用[D].云南中医药大学,2019.

[16] 庞锦伟,姚欣,雷超,等.气相色谱−质谱法测定酵素产品中短链脂肪酸[J].中国酿造,2017,36(08):165−167.

[17] GB 1886.173−2016 食品安全国家标准 食品添加剂 乳酸[S].北京:中国标准出版社,2016.

[18] Bianchi F. Development of a headspace solid−phase microextraction gas chromatography − mass spectrometric method for the determination of short−chain fatty acids from intestinal fermentation[J]. Food Chemistry, 2011. 129(1):200−205.

[19] Zhao R.Application of packed−fiber solid−phase extraction coupled with GC−MS for the determination of short−chain fatty acids in children's urine[J]. Clin Chim Acta, 2017. 468: 120−125.

[20] Kowalski R. GC Analysis of changes in the fatty acid composition of sunflower and olive oils heated with quercetin caffeic acid, protocatechuic acid, and butylated hydroxyanisole [J]. ACTA Chromatographica, 2007, 18: 15−23.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net