

实验技术与方法

培养液中有机酸代谢产物 - 乙酸测定方法的改进

方从容 杨大进

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要:目的 解决培养液中有机酸代谢产物 - 乙酸检测方法中存在的色谱分离效果差和色谱柱使用寿命短的问题。方法 培养液酸化后,用丙酮和乙醚提取乙酸,气相色谱进行检测。结果 用该法测定培养液中乙酸的含量,相对标准偏差为 1.7% ~ 4.1%,回收率为 85.8% ~ 94.6%。结论 该方法具有操作快速、简便、准确等优点,完全可以满足菌株分类、鉴定的需要。

关键词:有机酸类; 醋酸; 色谱法, 气相

Improvement on Assay Method for Acetic Acid of Metabolites
of Organic Acid in Culture Solution

FANG Cong-rong, YANG Da-jin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To solve the problems on efficiency in chromatographic separation and life of chromatographic column in assay method of acetic acid. **Methods** After culture solution acidification, acetic acid was extracted by acetone and ether, and detected by gas chromatography. **Results** RSD varied from 1.7% to 4.1%, recovery rate varied from 85.8% to 94.6%. **Conclusion** The method was quick, simple and sensitive, and it can be used in strain classify and appreciation.

Key word: ORGANIC SCIDS; Acetic Acid; Chromatography, Gas

双歧杆菌是人和动物肠道内正常菌群的重要组成部分。由于双歧杆菌和其相关菌属 - 乳杆菌属是在分类上较接近的菌属,常用的形态、生化鉴定方法有时不易区分,且在国家标准《食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验》^[1]及《食品卫生微生物学检验 乳酸菌饮料中乳酸菌检验》^[2]中要求,鉴定乳酸菌和双歧杆菌除常用的形态、生化方法外,同时必须应用气相色谱法对其有机酸代谢产物(乙酸和乳酸)进行测定,并根据乙酸和乳酸的摩尔比值判定菌株,只有气相色谱鉴定结果和生化鉴定结果一致时,才能对菌株作出最终判定。

国家标准应用气相色谱法对挥发性有机酸 - 乙酸的测定,色谱柱:涂有 GDx-401 的 2 m 不锈钢柱,加 3% 磷酸。培养液经酸化后离心,直接取上清液进样。在实际应用中发现,乙酸的测定方法虽操作简便,但样液中杂峰较多,峰形差,又因进样液为水溶液,经过多次的分析后,柱效明显下降。因此,我们在原方法的基础上,对乙酸的测定方法进行了改进,改进后目标峰尖锐对称,无杂质峰干扰,柱寿命延长,取得了满意的结果。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 岛津 GC-16A 气相色谱仪配 FID

检测器。

丙酮、乙醚、硫酸,乙酸为保证试剂。乙酸标准溶液:准确吸取保证试剂乙酸 5.70 ml 加水稀释至 100.0 ml,摇匀,采用 GB/T 4789.34—2003《食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验》附录 B 方法进行标定,配成约 1.000 mol/L 的乙酸标准溶液。乙酸使用液:将经标定的乙酸标准溶液用水稀释至 10.00 mmol/L。所用试剂除注明外均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试样处理 取培养液 2.0 ml 放入 10 ml 离心管中,加入 0.2 ml 50% 硫酸,混匀,加入 2.0 ml 丙酮,混匀后加过量氯化钠,剧烈振摇 1 min,再加入 2.0 ml 乙醚,振摇 1 min 后,于 3 000 r/min 离心 5 min,将上清液转入另一试管中,下层溶液用 2.0 ml 丙酮和 2.0 ml 乙醚重复提取 2 次,合并有机相,于 40℃ 水浴中用氮气吹至少量溶液存在,用丙酮定容至 1.0 ml,混匀后备用。同样操作步骤处理乙酸标准和空白培养基。

1.2.2 气相色谱条件 色谱柱长 2 m,内径 4 mm 的玻璃柱,填充涂有 20% DNP + 7% Tween60 的 chromosorbw HP(80 ~ 100 目);柱温:110℃;汽化室:150℃;检测器:150℃;载气:(N₂) 50 ml/min;进样量 1.0 μl;外标法峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 乙酸提取溶剂的选择 以 20 μmol/ml 乙酸标准水溶液为样品, 比较了 4 种溶剂的提取效率, 结果见表 1。

溶剂	提取次数					
	6	2	3	4	5	
丙酮/乙醚	77.0	87.5	99.0	99.2	99.1	99.3
乙醚	45.9	60.5	73.0	79.0	87.5	91.5
正己烷	43.8	52.0	64.5	73.4	83.5	85.5
三氯甲烷	29.2	37.5	50.0	59.5	62.1	73.9

从表 1 中可以看出, 采用丙酮和乙醚联合提取乙酸的效果最好, 提取 3 次时乙酸提取率达 99.0%, 而其它 3 种单一的提取溶剂提取 6 次后, 乙酸仍不能提取完全。因丙酮和乙醚的沸点都较低, 易于浓缩, 提取率高, 操作简便, 因此选用丙酮和乙醚为提取溶剂。

2.2 色谱柱担体的应用 原方法的色谱柱担体是国产 GDJ-401, 虽然价格便宜, 装柱简便, 但由于乙酸处理液为水溶液, 经过几十次的上样分析后, 柱效明显下降, 无法再进行分析。为此, 改用填充有 20% DNP + 7% Tween60 的 chromosorbw HP(80~100 目) 为分析柱, 测定双歧杆菌中有机酸代谢产物(乙酸和乳酸)的含量, 发现其目标峰与杂质峰能有效地分离, 峰形对称, 在 10 min 内即可全部完成分析过程。乙酸分析谱图见图 1, 乳酸分析谱图见图 2。

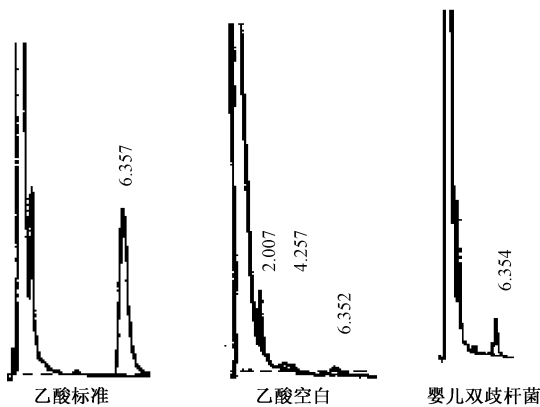


图 1 乙酸分析谱图

2.3 在进行试样分析的同时, 同样进行乙酸标准和空白培养液试验, 可准确地对培养液中的乙酸进行定性和定量分析。在空白培养基中, 虽然可检出少量的乙酸、乳酸组分, 但不影响试样的检测结果。

2.4 方法的精密度和回收率 选取乙酸含量不同的 3 种培养基, 添加 2 个浓度的乙酸标准溶液, 按 1.2 实验方法进行测定, 计算乙酸的相对标准偏差和加标回收率, 结果见表 2。

2.5 校正曲线和检出限 分别吸取乙酸标准使用液 0.2、0.5、2.0、5.0、8.0 ml 于 10 ml 容量瓶中, 加水

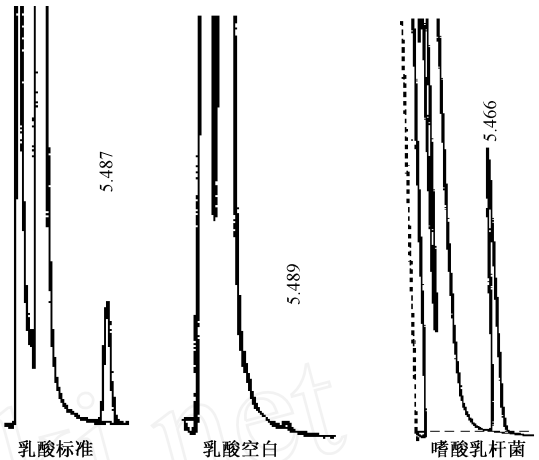


图 2 乳酸分析谱图

表 2 不同培养液中乙酸的回收率和相对标准偏差 (n = 6)

培养液名称	本底值 (mmol/L)	加标量 (mmol/L)	样品平均测得量 (mmol/L)	平均回收率 (%)	RSD (%)
嗜酸乳杆菌培养液	1.40	1.00	2.25	85.8	4.13
		10.00	10.32	89.2	2.56
婴儿双歧杆菌培养液	10.50	1.00	11.37	87.0	3.26
		10.00	19.96	94.6	1.65
两歧双歧杆菌培养液	36.04	5.00	40.36	86.4	2.37
		30.00	64.00	93.2	2.48

稀释至刻度, 制成标准系列。按试样处理步骤进行, 以乙酸的浓度为横坐标, 对应峰面积为纵坐标绘制校正曲线, 其线性回归方程 $y = 20739.7x - 44899.1$, 相关系数 $r = 0.9991$ 。并根据信噪比 $S/N = 3$, 计算出乙酸最低检测浓度为 $0.1 \mu\text{mol/ml}$ 。

2.6 样品测定 测定了 8 种杆菌培养基中乙酸和乳酸的含量, 将这 8 种菌株分别接种于 PYG 液体培养基中, (36 ± 1) 兼性厌氧培养 (48 ± 2) h 后作乙酸和乳酸的生化试验, 当乙酸摩尔含量/乳酸摩尔含量 ≥ 1.0 时, 判定此菌株为双歧杆菌, 反之为乳酸杆菌。比较和鉴定结果见表 3。

表 3 菌株鉴定气相色谱测定结果和菌株生化鉴定结果的比较

样品编号	气相色谱测定结果		菌株生化鉴定结果
	乙酸/乳酸	鉴定结果	
1	10/0.62	双歧杆菌	双歧杆菌
2	21/1.2	双歧杆菌	双歧杆菌
3	36/20	双歧杆菌	双歧杆菌
4	25/3.6	双歧杆菌	双歧杆菌
5	15/0.84	双歧杆菌	双歧杆菌
6	1.4/29	乳酸杆菌	乳酸杆菌
7	2.5/60	乳酸杆菌	乳酸杆菌
8	20/65	乳酸杆菌	乳酸杆菌

参考文献

[1] GB/T 4789.34—2003. 食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验[S].
 [2] GB/T 4789.35—2003. 食品卫生微生物学检验 乳酸菌饮料中乳酸菌检验[S].

[收稿日期 2007 - 07 - 31]