

# 高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸

陈军, 徐礼生, 张兴桃, 董增

(宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000)

**摘要:** 研究了高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸的最佳参数。结果表明, 流动相分配比  $V$  (磷酸二氢钾溶液): $V$  (甲醇)=30:70, 流量 1 mL/min, C18 柱分离, 柱温 38 °C, 检测波长 265 nm 时为高效液相色谱法检测 L-色氨酸的最佳参数。回收率在 92.00%~110.00%, 外加丝氨酸没有干扰发酵液中 L-色氨酸含量测定。此方法用于样品中的 L-色氨酸的测定, 分离效果良好。

**关键词:** 高效液相色谱; L-色氨酸; 酶法制备

**中图分类号:** S 816.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)03—0327—04

## Study on High Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Enzymatic Preparation of L-Tryptophan

CHEN Jun, XU Lisheng, ZHANG Xingtao, DONG Zeng

(College of Biology and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography method for determination of enzymatic Preparation of L-tryptophan (L-Trp) were studied. The results showed that the optimal parameter were 0.05 mmol/L potassium dihydrogen phosphate - methanol (30:70) as the mobile phase, the detection wavelength by 265 nm, the flow rate of 1.3 mL/min, separated on a C18 column and 38 °C column temperature. The recoveries ranged from 92.00%~110.00%, and the Serine added had no interference to determination of L-tryptophan. The L-Trp in fermentation liquid was separated effectively in these conditions.

**Keywords:** high performance liquid, L-tryptophan, enzymatic preparation

L-色氨酸在人体是一种限制性氨基酸,也是一种必需氨基酸,在人体内无法合成,需要从食物中摄取。作为食品添加剂<sup>[1]</sup>,早期 L-色氨酸的生产多采用化学合成法、蛋白质水解法等,由于酶法制备色氨酸具有成本低、周期短、产率高、质量好等优点,因此该技术将会成为 L-色氨酸的工业化生产

的主要方法。目前,L-色氨酸测定方法有氨基酸分析仪、分光光度法和荧光法等<sup>[2-9]</sup>,鉴于高效液相色谱技术具有分辨率高、速度快、重复性高等优点,高效液相色谱法测定微生物发酵液中的 L-色氨酸已有报道<sup>[10-11]</sup>,但高效液相色谱法用于酶法制备 L-色氨酸的测定尚未见报道。作者通过考察流动相及其

收稿日期: 2015-03-31

基金项目: 安徽省大学生创新创业训练计划项目(AH20141037906); 宿州区域发展协同创新中心项目(2015SZXTZXKFZD01); 宿州学院科研平台项目(2015ykf02); 宿州学院教授(博士)科研启动基金项目(2014jyb06)。

作者简介: 陈军(1980—),男,安徽萧县人,农学硕士,讲师,主要从事微生物发酵方面的研究。E-mail: cj998001@163.com

引用本文: 陈军,徐礼生,张兴桃,等. 高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(03): 327-330.

分配比、波长、柱温等因素,确立了高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸的最适色谱条件,并进行了方法评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

丝氨酸,甲醇,L-色氨酸,磷酸二氢钾,氢氧化钠,双蒸水:以上试剂均为分析纯。

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪;日本岛津公司;KQ5200DB 数控超声波清洗器;80-2 型电动离心机;金城国盛实验仪器厂;PHS-3C 型精密酸度计。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 色谱条件确定方法** 利用岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪测定 L-色氨酸的含量,采用 0.025%磷酸溶液-甲醇体系作为流动相,分别研究流动相及分配比、流动相流速、检测波长及柱温对检测结果的影响。

**1.2.2 标准曲线** 称取 L-色氨酸 0.400 g 定容 1 L,配置成质量浓度为 400 mg/L 的 L-色氨酸标准样品,将上述配置好的 L-色氨酸标准样品用流动相稀释成一定的浓度梯度,将所有标准样品采用 0.30  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后采用 UV-紫外分光光度法检测,绘制 L-色氨酸标准样品。

**1.2.3 发酵液样品的处理** 取 1.0 mL 发酵液 15 000 r/min 离心 5 min,然后用移液枪吸取其上清液,进行适当稀释,使其质量浓度介于 0~400 mg/L 的线性范围内,然后用 0.30  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,所得滤液采用 UV-紫外分光光度法<sup>[12]</sup>测定其 L-色氨酸含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 流动相及分配比的确定

设置分配比为 20:80、25:75、30:70、35:65、40:60 五个体系,由图 1 可知,随着增大流动相分配比,其波峰面积呈现先增大后降低趋势,分配比流动相为 30:70 的条件下,波峰面积具有最大值,综上分析选用  $V(0.025\% \text{磷酸溶液}):V(\text{甲醇})=30:70$  为该方法测定酶法制备 L-色氨酸的最佳分配比流动相。

### 2.2 流动相流速的确定

分别选择流动相的总流速为 0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL/min,观察发酵液的波峰变化和高效液相色谱仪的压力变化。结果表明,流速越小其保留时间

越大,波峰的分 离效果较好;流速越大其保留时间越小,但发酵液中物质的分离效果变差。另外流速越大其泵压也增大,易损坏分离柱,该法测定酶法制备 L-色氨酸研究的最适流速为 1.0 mL/min。

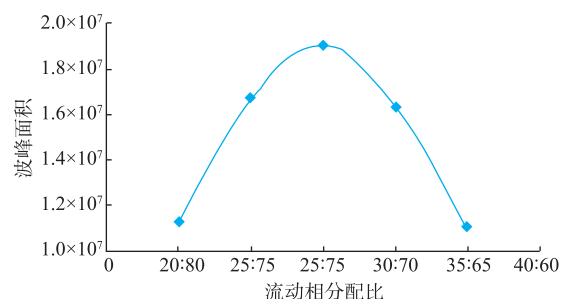


图 1 不同流动相分配比下 L-色氨酸的检测波峰面积

Fig. 1 Peak area of L-tryptophan under different mobile phase

### 2.3 检测波长的确定

L-色氨酸含有一个苯环,紫外线区域内有吸收峰,测定中不需添加其它显色试剂。为了探讨最适检测波长,在工作站中设置 5 个检测器波长,分别为 245、255、265、275、285 nm。由图 2 可知,随着波长提高,其波峰面积呈现先增大后降低趋势,波长设定为 265 nm 时,波峰具有最大值。确定检测波长在 265 nm 时为高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸研究的最佳波长。

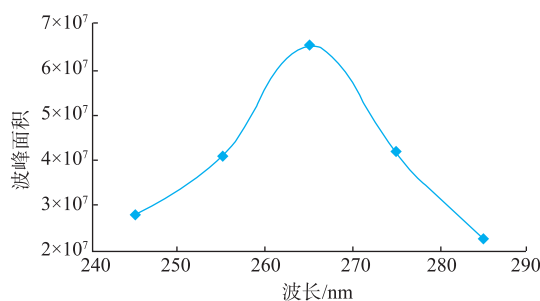


图 2 不同紫外波长下 L-色氨酸的检测波峰面积

Fig. 2 Peak area of L-tryptophan under different ultraviolet wavelengths

### 2.4 柱温的确定

柱温对高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸有较大影响,选择一个合适的柱温对检测结果至关重要,柱温分别设置 30、35、40、45、50  $^{\circ}\text{C}$ 。由图 3 知,随着柱温的提高,其波峰面积呈现先增大后减小的趋势,其中柱温在 38  $^{\circ}\text{C}$  时,L-色氨酸出现一个

最大吸收峰面积,当柱温继续升高时,L-色氨酸的波峰面积逐渐降低。综上讨论,最终确定柱温 38 ℃ 为高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸研究的最优柱温。

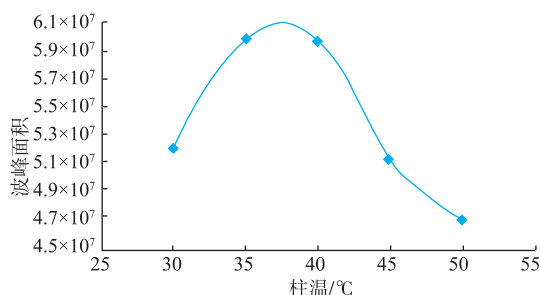


图 3 不同柱温条件下 L-色氨酸的检测波峰面积

Fig. 3 Peak area of L-tryptophan at different column temperature

### 2.5 确定色谱条件及标准曲线的确定

以岛津 C18 (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 为分离柱,流动相分配比为 V(0.025%磷酸溶液):V(甲醇)=30:70,流速为 1.0 mL/min,柱温为 38 ℃,检测波长为 265 nm,进样量为 10 μL,图 4 所示为 L-色氨酸标准品使用该法检测的色谱图,L-色氨酸的保留时间为 3.520 min。

根据以上色谱条件,得 L-色氨酸的标准曲线,见图 5,可知线性范围在 0~400 mg/L 内,线性相关系数为  $R^2=0.9993$ ,线性关系良好。

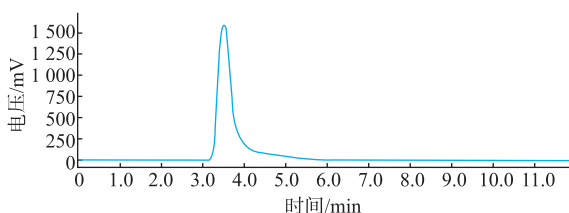


图 4 L-色氨酸标准样品色谱图

Fig. 4 Chromatograms of L-tryptophan standard sample

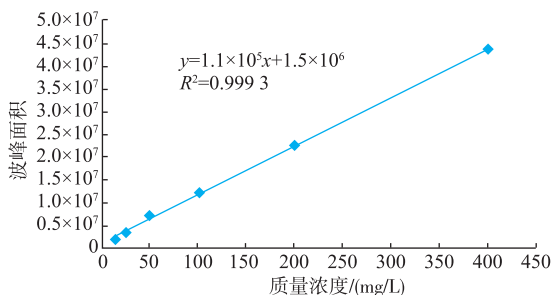


图 5 L-色氨酸标准曲线

Fig. 5 Standard curves of L-tryptophan

### 2.6 加样回收率测定

为了进一步验证其准确性,进行了回收实验检测,取质量浓度为 200 mg/L 的 L-色氨酸标准品 100 mL,然后取 100 mg 的 L-色氨酸样品加入到已知的 200 mg/L L-色氨酸标准品中混合,将其混合液进行进样检测,在相同条件检测 5 次,结果见表 1。结果表明,回收效果良好,回收率在 92.00%~110.00%,平均值 99%,由此可见,高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸准确度较好。

表 1 L-色氨酸加样回收率测定 (n=5)

Table 1 Recovery test of L-tryptophan (n=5)

检测次数	测得量/mg	回收率/%
1	101	101
2	92	92
3	110	110
4	84	84
5	110	110
平均值	99	99
标准偏差(S)	±0.022 8	±0.022 8

### 2.7 干扰试验

本实验中的 L-色氨酸发酵液是通过丝氨酸经过酶催化转换而成的,而检测结果证实了发酵液中含有剩余的丝氨酸,为了排除丝氨酸的影响,进行了标准品加入丝氨酸的干扰实验。取 100 mg/L 丝氨酸 1 mL 与 100 mg/L L-色氨酸等体积混合,将其混合液用高效液相色谱法进行测定,结果见图 6。色谱图中只有 L-色氨酸波峰,且其保留时间为 3.520 min,这与 L-色氨酸标准品的保留时间基本相同,可见在 265 nm 检测波长下丝氨酸对 L-色氨酸的检测没有影响,所以外加丝氨酸没有干扰发酵液 L-色氨酸质量浓度的测定。

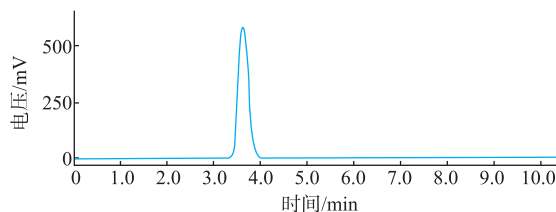


图 6 混合液色氨酸与丝氨酸的色谱图

Fig. 6 Chromatograms of mixed liquor of L-tryptophan and serine

### 2.8 样品的测定

采用流动相分配比 V(磷酸二氢钾溶液):V(甲

醇)=30:70,流量 1 mL/min,柱温 38 ℃,检测波长265 nm 测定 L-色氨酸合成酶发酵液,得出 L-色氨酸色谱图。由图 7 可知,色谱柱柱效高,将波峰面积代入标准曲线中,得出发酵液中 L-色氨酸质量浓度为 80mg/L。

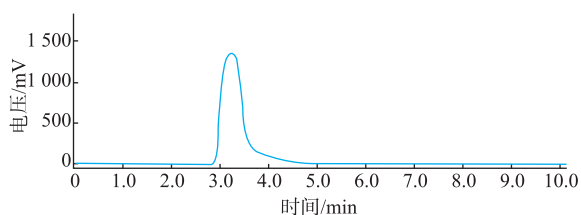


图 7 样品中 L-色氨酸检测色谱图

Fig. 7 Results of L-Tryptophan of the sample

### 3 结语

通过研究确立了高效液相色谱法测定酶法制备 L-色氨酸的最适色谱条件,流动相分配比  $V$ (磷酸二氢钾溶液): $V$ (甲醇)=30:70,流量 1 mL/min,C18 柱分离,柱温 38 ℃,检测波长 265 nm。方法用于发酵液中的 L-色氨酸的测定,保留时间为 3.520 min,在 0~400 mg/L 范围内线性良好,回收率在 92%~110%之间,外加丝氨酸没有干扰发酵液中 L-色氨酸含量测定。该方法简便、准确、适用性强。

### 参考文献:

- [ 1 ] LI Jianxin,ZHANG Xumei,XU Qishou. Physiological and biochemical effects of tryptophan and its application[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,2005,27(3):58-62.(in Chinese)
- [ 2 ] REN Jiaoyan,ZHAO Mouming,WANG Jinshui,et al. Novel method for spectrophotometric determination of tryptophan in phytolysates[J]. **Food Science**,2006,27(12):591-593.(in Chinese)
- [ 3 ] WANG Jianqing,ZHANG Yu. Determination of the amino acid of fishmeal by amino acid analyzer [J]. **Animal Husbandry and Feed Science**,2007(6):37-38.(in Chinese)
- [ 4 ] HU Baoxiang,YANG Mu,LIU Wenhan,et al. Indirect determination of tryptophan by flame atomic absorption spectrometry[J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**,2006,23(6):1308-1310.(in Chinese)
- [ 5 ] YANG Hongbing,LIANG Lanqiu,LU Liliang. Flow injection electrochemiluminescence method for determination of tryptophane[J]. **Journal of Shihezi University(Natural Science)**,2005,23(6):674-675.(in Chinese)
- [ 6 ] LI Chunxiang,LIANG Yulin,DENG Keqin. Determination of L-tryptophan at electrochemically reduced grapheme oxide modified electrode[J]. **Journal of Analytical Science**,2014,29(2):231-234.(in Chinese)
- [ 7 ] ZHANG Shaohong,SHI Boan,XI Juan. Investigation on simultaneous determination of tryptophan and cysteine by chemiluminescence method[J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**,2007,7(26):5-8.(in Chinese)
- [ 8 ] WANG Xiaoying,WEI Yongfeng,MA Dongmei,et al. Linear scanning voltammetry for the simultaneous determination of 5-hydroxytryptophan and tryptophan[J]. **Chemistry**,2007(6):459-462.(in Chinese)
- [ 9 ] CUI Zhumei,GU Xia,HUANG Youru,et al. The change of tryptophan content in pumpkin seeds during germination determined by fluorescence spectrophotometry[J]. **Seed**,2009,11(28):62-64.(in Chinese)
- [10] ZHANG Bo,LIU Yunjie,QUAN Xiangao. HPLC determination of tryptophan in fermental solution [J]. **Journal of Jining Medical College**,2009,32(2):116.(in Chinese)
- [11] CHENG Likun,XU Qingyang,XIE Xixian,et al. Quick determination of L-tryptophan in fermented broth by HPLC [J]. **Journal of Tianjin University of Science & Technology**,2010,25(1):9-12.(in Chinese)
- [12] XU Lan,AN Wei. Simultaneous determination of tryptophan and tyrosine by UV spectrophotometry [J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**,2011,28(5):2321-2323.(in Chinese)