

# 反相 HPLC 同时检测乳酸及乳酸甲酯含量

姜绍通, 刘 模, 陈小燕, 郑 志

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 本实验采用反相高效液相色谱法实现了对乳酸、乳酸甲酯的分离并对其定量分析效果进行研究。HPLC 分析条件为: Purospher STAR C<sub>18</sub> 反相柱, 二极管阵列检测器, 以 0.005mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 与甲醇混合溶液(9:1, V/V)为流动相, 流速为 1.0ml/min, 进样量 20 μl, 检测波长 210nm。该方法快速、简便、灵敏、重现性好。

**关键词:** L- 乳酸; 乳酸甲酯; 反相高效液相色谱(RP-HPLC)

## Simultaneous RP-HPLC Determination of Lactic Acid and Methyl Lactate

JIANG Shao-tong, LIU Mo, CHEN Xiao-yan, ZHENG Zhi

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** A reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was developed for the simultaneous determination of lactic acid and methyl lactate. The HPLC was equipped with Purospher STAR C<sub>18</sub> reversed-phase column and diode array detector. The mobile phase was composed of 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution and chromatographically pure methanol (9:1, V/V) with the flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 20 μl, and the detection wavelength was set as 210 nm. This method is accurate, simple, rapid and reproducible.

**Key words:** lactic acid; methyl lactate; reverse phase-high performance liquid chromatographic (RP-HPLC)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0165-03

乳酸(lactic acid, LA)在食品、医药、化学工业、皮革、香料等领域具有广泛的用途<sup>[1]</sup>。近年来, 由于聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)的生物可降解性导致乳酸的生产再一次受到重视。乳酸由于其难挥发性(122℃, 1661.73Pa)、亲水性, 使得传统的分离方法如钙盐法、萃取法、吸附法、膜法等都不能得到适合制备聚乳酸的高纯度乳酸单体<sup>[2]</sup>。酯化反应-精馏耦合法是精制乳酸的有效方法, 粗乳酸与低级醇类(如甲醇)酯化后, 蒸馏得到高纯度乳酸酯, 精馏反应水解乳酸酯即可得到高纯度乳酸<sup>[2-3]</sup>。酯化反应-精馏法精制乳酸过程中需要监测乳酸及乳酸酯的含量。目前, 乳酸的检测方法主要有滴定法<sup>[4]</sup>、反向高效液相色谱法<sup>[5]</sup>等, 乳酸酯类的分析主要采用气相色谱法<sup>[6]</sup>。本实验探讨一种同时分析测定乳酸及乳酸甲酯(methyl lactate, ML)的快速而精确的 HPLC 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

L- 乳酸(≥ 99%)、乳酸甲酯(≥ 98%) Sigma 公司; 浓硫酸(AR) 中国宿州化学试剂有限公司, 甲醇(一级色谱纯) 上海振兴化工厂一厂; 重蒸水。

### 1.2 仪器与设备

Waters515 高效液相色谱系统(Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 处理软件) 美国 Waters 公司; Purospher STAR C<sub>18</sub> 反相柱(250mm × 4.6mm, 5 μm) 美国 Merck 公司; 超声波脱气器、滤膜过滤器; FA1004 电子天平。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

Purospher STAR C<sub>18</sub> 反相柱, 流动相采用 0.005mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 与色谱纯甲醇的混合溶液(9:1, V/V), 流速 1.0ml/min, 检测波长 210nm, 进样量 20 μl, 柱温为室温, 信噪比设为 3。流动相使用前通过了 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯膜进行真空过滤, 并超声波脱气。

#### 1.3.2 标准样品和样品的配制

以重蒸水配制乳酸和乳酸甲酯浓度分别为 9.0210、

收稿日期: 2008-08-29

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z361)

作者简介: 姜绍通(1954-), 男, 教授, 学士, 主要从事农产品生物化工研究。E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

11.3580g/L 的标准品母液, 再将该母液稀释成不同质量浓度的标准品溶液, 然后以  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤, 备用。

取一定量的乳酸(质量分数88%左右)于500ml的三口烧瓶中, 在恒温水浴锅中预热到  $60\ ^\circ\text{C}$ , 然后加入预热到  $60\ ^\circ\text{C}$  的甲醇(质量分数大于99%,  $n_{\text{甲醇}}:n_{\text{乳酸}} = 4:1$ )和强酸性阳离子交换树脂作催化剂, 催化剂装载量为每100ml反应体积6g催化剂。以甲醇的加入时刻作为反应的开始时间, 同时开动磁力搅拌器以保证反应体系混合均匀。每10min从三口烧瓶中取样1ml, 根据浓度用蒸馏水稀释100~200倍, 然后以  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤, 备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 定性测定

流动相中  $0.005\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液与甲醇的体积比, 对 L- 乳酸及其甲酯的分离度有较大影响。结果表明,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液在混合流动相中的体积比增加时, L- 乳酸、乳酸甲酯的保留时间均延长, 但是乳酸甲酯的保留时间增加幅度大于 L- 乳酸保留时间增加幅度。 $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液与甲醇体积比为 9:1 时, 可以保证较好的分离效果且分析时间较短。在上述色谱条件下进样乳酸及乳酸标准混合液, 得到乳酸及乳酸甲酯混样的色谱图(图1)。从图1可以看出, 在上述色谱条件下乳酸及乳酸甲酯得到了很好的分离。

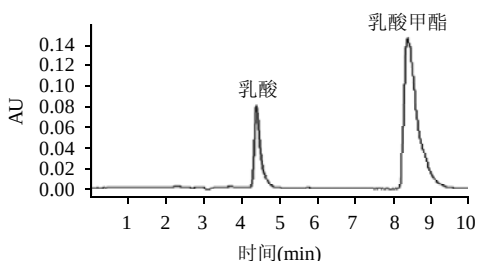


图1 乳酸及乳酸甲酯高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed lactic acid and methyl lactate standards (a, lactic acid; b, methyl lactate)

### 2.2 标准曲线的测定

吸取不同质量浓度的混合标准样品溶液依次进样  $20\ \mu\text{l}$ , 每个浓度进样5次, 取其平均值。以峰面积为  $X$ , 样品溶液浓度为  $Y$ , 建立乳酸工作曲线的外标方程为:  $Y = X/(6.28 \times 10^5) + 0.0018$ ,  $r = 0.9999$ ; 乳酸甲酯工作曲线的外标方程为:  $Y = X/(1.08 \times 10^6) + 0.0092$ ,  $r = 0.9999$ 。

### 2.3 精密度测定

在 1.3.1 节色谱条件下, 检测  $3.6084\text{g/L}$  L- 乳酸、 $4.5432\text{g/L}$  乳酸甲酯标准品溶液, 进样5次, 结果见表1。可以看出本检测方法有很好的重复性, 以乳酸峰面积计算,  $RSD = 1.149\%$ , 以乳酸甲酯峰面积计算,  $RSD = 1.360\%$ 。

表1 测定方法的重复性

Table 1 Reproducibility of determination method

|      | 浓度(g/L) | 测定次数    |         |         |         |         | 平均值     | RSD(%) |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
|      |         | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       |         |        |
| 乳酸   | 3.6084  | 2287408 | 2219017 | 2255558 | 2263772 | 2238203 | 2252792 | 1.149  |
| 乳酸甲酯 | 4.5432  | 4928923 | 4902830 | 4901301 | 4853556 | 4761659 | 4869654 | 1.360  |

### 2.4 回收率测定

准确吸取1ml酯化反应釜样品加入100ml容量瓶, 再分别加入标准母液10、20、30、40、50ml, 定容, 以  $0.45\ \mu\text{m}$  孔径滤膜过滤后检测。结果见表2, 乳酸的加标回收率为  $98.81\% \sim 101.65\%$ ,  $RSD = 1.280\%$ ; 乳酸甲酯的加标回收率为  $98.72\% \sim 101.80\%$ ,  $RSD = 1.288\%$ 。

表2 乳酸及乳酸甲酯的回收率

Table 2 Recovery rates and RSDs of precision for lactic acid and methyl lactate in spiked sample

| 实验号 | 乳酸       |          |          |        |        | 乳酸甲酯     |          |          |        |        |
|-----|----------|----------|----------|--------|--------|----------|----------|----------|--------|--------|
|     | 本底值(g/L) | 加标量(g/L) | 测定值(g/L) | 回收率(%) | RSD(%) | 本底值(g/L) | 加标量(g/L) | 测定值(g/L) | 回收率(%) | RSD(%) |
| 1   | 1.1545   | 0.9021   | 2.0366   | 97.78  |        | 2.4274   | 1.1358   | 3.5452   | 98.42  |        |
| 2   | 1.1545   | 1.8042   | 2.9714   | 100.70 |        | 2.4274   | 2.2716   | 4.686    | 99.43  |        |
| 3   | 1.1545   | 2.7063   | 3.8708   | 100.37 | 1.280  | 2.4274   | 3.4074   | 5.8918   | 101.67 | 1.288  |
| 4   | 1.1545   | 3.6084   | 4.7483   | 99.59  |        | 2.4274   | 4.5432   | 7.0143   | 100.96 |        |
| 5   | 1.1545   | 4.5105   | 5.6459   | 99.58  |        | 2.4274   | 5.6790   | 8.1027   | 99.93  |        |

### 2.5 酯化样品测定

根据所建立的检测条件, 检测乳酸甲醇酯化后的试样(见1.3.2节), 色谱图见图2, 结果见表3。

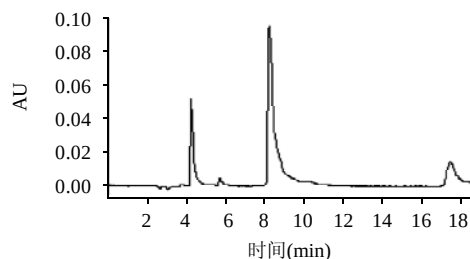


图2 酯样品 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatogram of lactic acid after being esterified with methanol

表3 不同酯化反应时间乳酸及乳酸甲酯的浓度

Table 3 Contents of lactic acid and methyl lactate at different esterification time

| 时间(min) | 乳酸浓度(g/L) | 乳酸甲酯浓度(g/L) | 转化率(%) |
|---------|-----------|-------------|--------|
| 0       | 3.2550    | 0           | 0      |
| 10      | 1.9986    | 1.4519      | 38.6   |
| 20      | 1.4601    | 2.0743      | 55.1   |
| 30      | 1.1545    | 2.4274      | 64.5   |
| 40      | 0.9944    | 2.6124      | 69.4   |
| 50      | 0.9022    | 2.7162      | 72.3   |
| 60      | 0.8344    | 2.8017      | 74.4   |
| 70      | 0.8053    | 2.8310      | 75.3   |
| 80      | 0.7762    | 2.8701      | 76.2   |
| 90      | 0.7519    | 2.8926      | 76.9   |
| 100     | 0.7325    | 2.9107      | 77.5   |
| 110     | 0.7082    | 2.9502      | 78.2   |
| 120     | 0.7034    | 2.9487      | 78.4   |

注: 转化率(%) = 反应后乳酸浓度  $\times$  100 / 乳酸初始浓度。

### 3 结 论

本研究采用 Purospher STAR C<sub>18</sub> 反相色谱柱, 流动相体积比为 9:1 的 0.005mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 甲醇混合溶液, 流速为 1.0ml/min, 进样量 20 μl, 检测波长为 210nm, 实现对乳酸酯化样品中乳酸及乳酸甲酯的有效分离。

本实验建立的反相 C<sub>18</sub> 柱高效液相色谱法同时测定乳酸及乳酸甲酯含量的方法, 操作简单、快速、重现性好、测定结果稳定可靠, 可用于酯化反应 - 精馏精制乳酸过程中乳酸及乳酸甲酯的监控检测。

### 参考文献:

- [1] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 338-339.
- [2] JOGLEKAR H G, RAHMAN I, BABU S, et al. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid[J]. Separation and Purification Technology, 2006, 52: 1-17.
- [3] KUMAR R, NANAVATI H, NORONHA S B, et al. A continuous process for the recovery of lactic acid by reactive distillation[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81: 1767-1777.
- [4] 郑志, 姜绍通, 潘丽军. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 103-105.
- [5] 郑志, 姜绍通, 潘丽军, 等. 反相高效液相色谱法测定发酵液中乳酸的含量[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 89-91.
- [6] 张上玉. 乳酸乙酯的气相色谱分析[J]. 石家庄化工, 2000(3): 29-30.