

发酵液中**DBT**含量的测定

李国强 魏东盛 邓飞

一、实验目的

- (1) 确定DBT的降解程度。
 - (2) 了解高效液相色谱(HPLC)的原理及使用方法。
 - (3) 掌握用HPLC测定发酵液中DBT含量的方法。
-

二、实验原理

1 HPLC的种类

- 正相色谱 (NP-HPLC)
 - 反相色谱 (RP-HPLC)
 - 离子交换色谱 (IEC)
 - 空间排阻色谱 (SEC)
-

液相色谱按两相极性不同分类

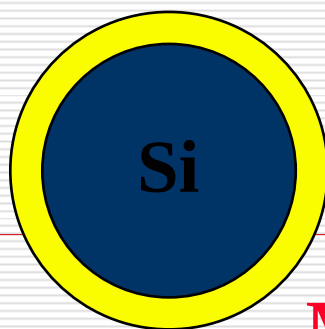
➤ 正相色谱

➤ 反相色谱

化合物保留时间随流动相配比的变化
不同极性的化合物出峰顺序不同

正相HPLC 色谱柱

- 硅胶型
- 氰基型
- 氨基型 糖类分析
- 二醇基型 蛋白质分析



Modified Si



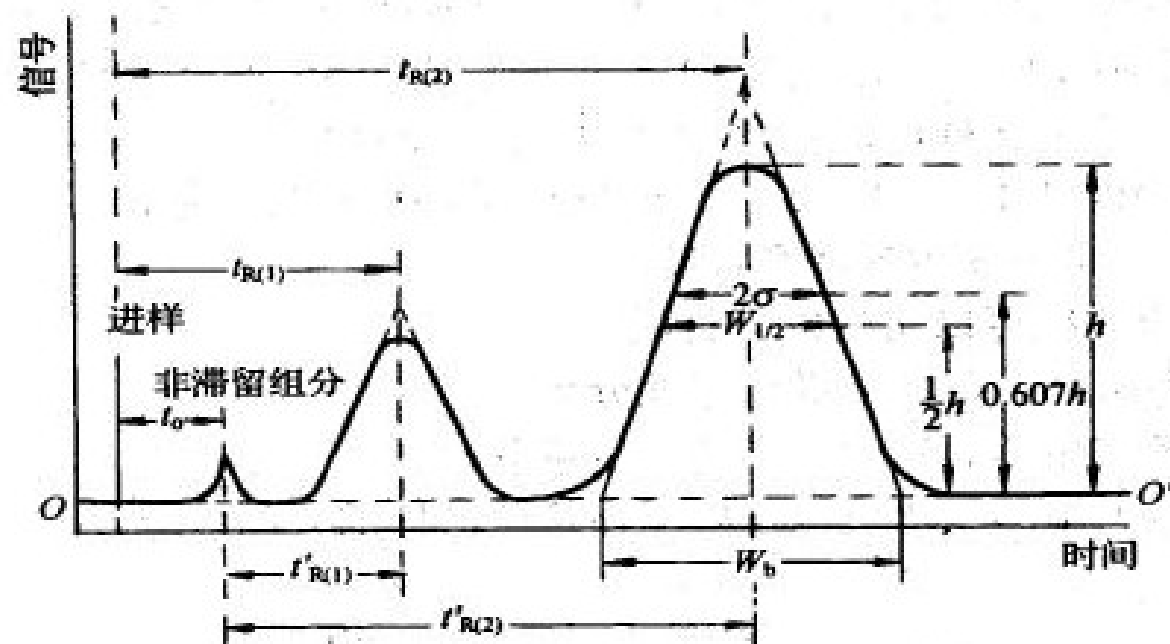
反相HPLC 色谱柱

- C18 (ODS) type
- C8 (octyl) type
- C4 (butyl) type
- Phenyl type
- TMS type
- Cyano type

Non-polar property



-
- 反向色谱：反向色谱用的填料常是以硅胶为基质，表面键合有极性相对较弱官能团的键合相。适用于能溶于水/有机混合物的中性或非离子化合物样品
 - 反向色谱所使用的流动相极性较强，通常为水、甲醇、乙腈等的混合物。样品流出色谱柱的顺序是极性较强的组分最先被冲洗出，而极性弱的组分会在色谱柱上有更强的保留。
-



三、实验材料

实验药品：

DBT、甲醇（色谱纯）、超纯水。

(2) 实验仪器：

1100高效液相色谱仪（Agilent公司）、微孔滤膜($0.45\text{ }\mu\text{m}$)。

色谱条件：

色谱柱：C18（ $4.6\times 250\text{mm}$ ， $5\text{ }\mu\text{m}$ ）；

检测器：紫外检测器；

检测波长：244nm；

柱温：室温；

进样量：20 μL ；

流速：1mL/min；

流动相：甲醇：水=9：1；

根据保留时间定性，峰面积定量。

四、实验步骤

1、标准曲线的绘制

- a. 称取2.0mg DBT，置于50mL容量瓶内用乙酸乙酯定容至20mL，即DBT母液浓度为40mg/L（老师）；
 - b. 按照下表将DBT母液用乙酸乙酯稀释成不同梯度，在7个20mL的试管内按照下表配制（老师）：
-

[illegible]

-
- 将各管摇匀，每支试管取 $20\ \mu\text{L}$ 进样，按实验材料中的色谱条件进行分析。记录1~7号管的峰面积。以峰面积为纵坐标，DBT浓度(mg/L)为横坐标绘出标准曲线（学生操作）。
-

2 发酵液中DBT的定量分析

- 取0.5mL 0和48 h 发酵罐培养液及工程菌株和新的原始菌株的摇瓶发酵液，于1.5 mL离心管中立即以等体积的乙酸乙酯抽提发酵液，漩涡震荡15s充分混匀，10000r/min离心5min。上层有机相取20 μ L进样，按实验材料中的色谱条件进行分析。每个样品做两个平行，测得峰面积后取平均值。根据峰面积在标准曲线上查得对应的DBT浓度或根据拟合的计算式计算DBT浓度。
-