

# 木质纤维素原料预处理前后主要糖成分的测定

牛涛<sup>1</sup>, 汤金婷<sup>1</sup>, 李志军<sup>2</sup>, 曾晶<sup>1</sup>, 刘朝霞<sup>1</sup>, 龚大春<sup>1</sup>

(1.三峡大学艾伦·麦克德尔米德再生能源研究所,湖北宜昌 443002;2.安琪酵母有限公司,湖北宜昌 443002)

**摘要:** 建立了利用 HPLC-ELSD 测定木质纤维素原料预处理后水解液中主要糖的成分葡萄糖和木糖含量的方法。实验条件优化得出在漂移管温度为 90 °C, 流动相为乙腈:水(70:30), 流速为 1 mL/min, 氮气流速为 2.0 L/min 条件下, 经 Shodex Asahipak NH2P-50(4.6 m×250 mm, 5 μm) 色谱柱后, 可以将水解液中的主要糖成分葡萄糖和木糖进行良好的分离。结果表明, 葡萄糖在 0.0094~110 mg/mL 范围内, 木糖在 0.031~62.34 mg/mL 内标准曲线相关系数均为 0.999, 精密度高(以木糖和葡萄糖的相对标准偏差分别为 0.54% 和 0.66%)。该方法具有简洁、快速、准确、重现性好的特点。

**关键词:** 检测方法; 木质纤维素; 葡萄糖; 木糖; 高效液相蒸发光散射检测

中图分类号: TS261.7; O657; O658

文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2009)08-0125-03

## Measurement of Main Sugar Content Before & After the Pretreatment of Lignocellulose

NIU Tao<sup>1</sup>, TANG Jin-ting<sup>1</sup>, LI Zhi-jun<sup>2</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>, LIU Zao-xia<sup>1</sup> and GONG Da-chun<sup>1</sup>

(1. Alan.G. MacDiarmid Renewable Resources Research Institute, Yichang, Hubei 443002;

2. Angel Yeast Co. Ltd., Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract:** The measurement method of main sugar content including glucose and xylose by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) before and after the treatment of lignocellulose was developed. The optimum technical conditions were obtained as follows: the experimental drift tube at a temperature of 90 °C, mobile phase of acetonitrile: water=70:30, flow rate as 1 mL/min, nitrogen flow rate as 2.0 L/min, and a good separation of glucose and xylose in the hydrolysate. The results showed that the correlation coefficient of the determination was 0.999 (between 0.0094~110 mg/mL for glucose and between 0.031~62.34 mg/mL for xylose). The method had high precision with RSD as 0.54% for glucose and 0.66% for xylose respectively. The method had the advantages including simple operation, rapid measurement, high accuracy and good repeatability.

**Key words:** measurement; lignocellulose; glucose; xylose; HPLC-ELSD

随着石油资源的日益枯竭, 粮食的日益紧张, 以及对乙醇、丁醇等为主的液体燃料和其他生物质化工产品(乳酸、丁二酸等)的巨大需求, 促使以木质纤维素为原料生产可发酵性糖, 然后生物转化生物化工产品的研究与开发成为中国、美国等世界耗能大国的科学界和产业界的热点<sup>[1]</sup>。在木质纤维素的生物加工过程的研究中, 首先要搞清楚它在糖化前后的组成。木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素 3 种成分组成。其中纤维素是由 D-六环葡萄糖经 β-1,4 糖苷键联结而成的直链多糖。半纤维素是许多不同的单糖聚合的杂多糖, 包括葡萄糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖等, 主要成分为木糖。

传统的测糖方法主要是 DNS 法, 其原理是利用糖的

还原性, 最终得到的是总还原糖的含量, 不利于对木质纤维素中的原料做出准确的评价。因此, 目前主要是利用高效液相测定糖的含量, 其检测方法主要有示差法和蒸发光散射法两种。关于示差法有部分文献报道<sup>[2]</sup>。该方法对检测柱温要求高, 一般在 60~80 °C。而蒸发光散射检测柱温度一般在室温下即可进行。蒸发光散射检测器(ELSD)的原理<sup>[3]</sup>主要是经色谱柱分离的洗脱液与氮气混合形成均匀的微小液滴, 经过加热的漂移管后, 流动相被蒸发, 剩下雾状的微小颗粒, 经光的照射后, 发生散射, 产生信号。

吕颖等人利用反相液相色谱-蒸发光散射测定了药物中的葡萄糖胺<sup>[4]</sup>; 魏炆<sup>[5]</sup>等人利用二醇基柱高效液相色

基金项目 宜昌市科技攻关项目(A2007103-1) 横向项目“纤维素乙醇的相关关键技术的研究”(200800230)。

收稿日期: 2009-03-20

作者简介: 牛涛(1985-), 研究生, 从事生物催化与转化的研究。

通讯作者: 龚大春(1967-), 男, 生物化工博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物质能的研究与开发以及手性化合物的合成技术研究。

谱-蒸发光散射检测法测定饮料中的糖; Pamita Bhandari 等利用 HPLC-ELSD 测定胡黄连中的糖的种类和含量<sup>[6]</sup>; 蔡欣欣等利用 HPLC-ELSD 测定了食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖的含量<sup>[7]</sup>; 而采用该方法测定木质纤维素水解前后的糖的方法尚不多见。本文利用 Waters 公司提供的高效液相仪器采用 HPLC-ELSD 对木质纤维素的预处理前后糖的变化进行了测定分析, 得出较好的测定葡萄糖和木糖的液相分离条件, 为木质纤维素的糖化效率和预处理方法提供评价的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Waters 600 泵 (美国), Waters ELSD 2424 蒸发光散射检测器 (美国), 色谱工作站 Waters Empower, 优普超纯水制造系统 (成都超纯水科技有限公司)。

木糖和葡萄糖均为分析纯, 流动相为乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 生产) 和优普超纯水。

### 1.2 色谱条件

色谱柱 Shodex Asahipak NH2P-50 (4.6 m×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 水 (70:30); 流速为 1 mL/min; 柱温: 25 °C; 漂移管温度: 90 °C; 氮气流速 28 psi。

### 1.3 对照品溶液的制备

将木糖和葡萄糖于 (96±4) °C 下烘干至恒重后, 分别精密称取 100 mg, 用水配成 1 mg/mL 的标准混合溶液, 再分别稀释成 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL 和 0.8 mg/mL 4 个浓度。

### 1.4 样品的预处理

因样品是在预处理后用酶进行水解, 所以要检测其中糖的种类和含量必须去除其中的蛋白质。即将样品按 1:1 的比例加入乙腈, 然后在 15000 r/min 下离心 15 min, 取上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤即得样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的绘制

在 1.2 的色谱条件下, 将配制好的 5 个不同浓度标准溶液进 20 μL 到液相色谱仪中, 测定各自的峰面积。以浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 结果见图 1、图 2, 得到的线性回归方程见表 1。

### 2.2 精密度实验

取一待测样品重复进样 5 次, 每次 20 μL, 木糖和葡萄糖峰面积积分值的相对标准偏差分别为 0.54 % 和 0.66 %。

### 2.3 重现性实验

取同一待测样品按 1.4 的方法制备成 5 份, 分别进

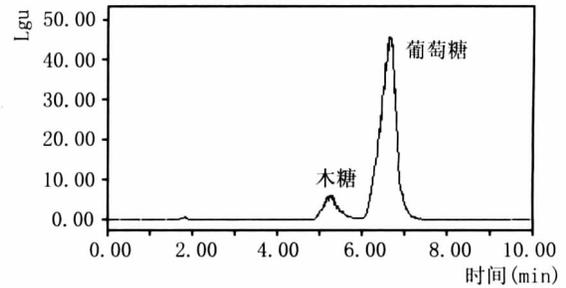


图 1 对照品 HPLC 图谱

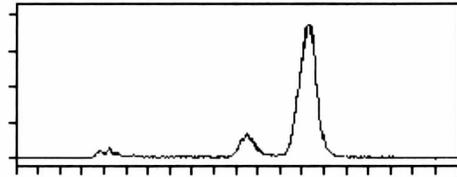


图 2 样品 HPLC 图谱

表 1 木糖和葡萄糖的标准曲线线性方程及相关系数

| 项目   | 木糖                                    | 葡萄糖                                   |
|------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 线性方程 | $Y = -672359 + 1.81 \times 10^{-6} X$ | $Y = -974011 + 4.87 \times 10^{-6} X$ |
| 相关系数 | 0.999                                 | 0.999                                 |
| 线性范围 | 0.031~62.34 mg/mL                     | 0.0094~110 mg/mL                      |

样 20 μL, 所得木糖和葡萄糖的相对标准偏差分别为 1.39 % 和 1.78 %, 说明该方法有较好的重现性。

### 2.4 稳定性实验

取一待测样品, 分别在 0、12 h、24 h 和 48 h 时分别进样, 测得相应的木糖和葡萄糖的 RSD 分别为 1.61 % 和 1.10 %。

### 2.5 回收率实验

分别向已知浓度的样品中加入木糖和葡萄糖 0.15 g、0.2 g、0.33 g 和 0.5 g, 测得所得的平均回收率为 110 %、101 %、106 % 和 100 %。相应的 RSD 分别为 1.73 %、0.98 %、1.17 % 和 1.25 %。

### 2.6 样品含量测定

6 组样品按 1.4 处理后, 分别进样分析, 所得数据结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (mg/mL)

| 样品 | 木糖含量   | 葡萄糖含量 |
|----|--------|-------|
| 1  | 0.0479 | 0.675 |
| 2  | 1.61   | 4.13  |
| 3  | 0.807  | 0.765 |
| 4  | 0.166  | 0.821 |
| 5  | 0.909  | 0.954 |
| 6  | 0.891  | 0.974 |

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

分别选择甲醇和乙腈作为流动相, 发现以乙腈做流

动相时, 基线较为平稳。当乙腈和水的比例为 70:30 时, 木糖和葡萄糖的分离效果较好, 而且出峰时间短, 缩短了检测时间。

### 3.2 漂移管温度的选择

漂移管的温度是蒸发光散射检测器最重要的参数, 因此选择适当的漂移管温度尤为关键。如果漂移管温度太低, 测溶剂不能蒸发完全, 仪器噪音较大; 但是温度过高会使样品蒸发, 使得灵敏度降低。经实验测定后, 选择漂移管的温度为 90 °C<sup>[7]</sup>。

### 3.3 氮气流速的选择

氮气的流速也是一个十分重要的参数。如果流速过快, 则样品还未来得及蒸发就被带走。但如果气体流速太低, 就会产生较大的液滴, 影响仪器的灵敏度。最后选择气体压力 28 psi, 即氮气流速为 2.0 L/min<sup>[7]</sup>。

最后得出在漂移管温度为 90 °C, 乙腈:水为 70:30, 氮气流速为 2.0 L/min 时, 所测定的结果准确、可靠, 可在 10 min 内完成样品的检测, 大大缩短了检测时间。

#### 参考文献:

[1] 曾晶, 叶媛, 龚大春, 等. 表面活性剂对纤维素酶酶解过程的影

响[J]. 酿酒科技, 2008, (12):38-40.

- [2] Valentina Usenik, Jerneja Fabic, Franci Stampar. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Food Chemistry, 2008, (107): 185-186.
- [3] 阳金勇. 液相色谱仪 ELSD 蒸发光散射检测器简介与校准方法研究[J]. 科技信息, 2007, (25):324-325.
- [4] 吕颖, 齐莹, 张莉, 等. 反相高效液相色谱 蒸发光散射检测法测定复方中的盐酸葡萄糖胺[J]. 色谱, 2007, 25(6):948-949.
- [5] 魏泱, 郭亮, 丁明玉. 二醇基柱高效液相色谱 蒸发光散射检测法测定饮料中的糖[J]. 色谱, 2001, 19(6):520-523.
- [6] Pamita Bhandari, Neeraj Kumar, Bikram Singh, Vijay K. Kaul. Simultaneous determination of sugars and picrosides in *Picrorhiza* species using ultrasonic extraction and high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, (1194): 257-261.
- [7] 蔡欣欣, 张秀尧. 高效液相色谱蒸发光散射检测法测定食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 968-982.

(上接第 124 页)

二类香气成分在荔枝烈酒香气成分中含量巨大, 为主要的呈香成分, 得出荔枝烈酒的典型性香气物质为乳酸乙酯; 一类香气成分带给荔枝烈酒花香、玫瑰香、丁香等香气, 对荔枝烈酒的香气也有重大贡献。荔枝烈酒的香气是各种香气成分相互协同、缓冲、烘托、叠加的结果。

#### 参考文献:

- [1] 岳强, 曾新安, 于淑娟, 等. 新鲜荔枝汁营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2006, 27(4):173-174.
- [2] 杨幼慧. 荔枝酒发酵工艺研究[J]. 酿酒, 2004, (2):66-68.

- [3] 张斌, 曾新安, 陈勇, 等. 高强电场作用下荔枝酒香气成分变化分析[J]. 食品科学, 2007, (12):386-389.
- [4] 文瑞明. 香料香精手册(第一版)[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2000.
- [5] 周新虎. 引起白酒口干、上头问题的初探[J]. 酿酒科技, 2001, 107(5):44-45.
- [6] 李华. 葡萄酒品尝学(第一版)[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [7] 邢其毅, 金声, 等. 荔枝香气化学成分的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1995, 35(2):159-164.

## 洋河酒厂上半年销售同比增长 41.27 %

本刊讯 2009 年 1~6 月, 江苏洋河酒厂股份有限公司实现销售同比增长 41.27 %, 上交税费同比增长 15.51 %, 公司主导品牌洋河蓝色经典销售更是增势不减, 上半年实现销售同比增幅 48.6 %。在中高档产品销售攀升的拉动下, 洋河酒厂今年上半年产品吨酒售价同比也大幅增加。

今年以来, 江苏洋河酒厂股份有限公司按照年初确定的全力推进发展战略的明晰、发展主业的腾飞、发展层次的升华、发展要素的积聚、发展文化的塑造等五大任务, 牢固树立主导品牌全国化的指导思想, 积极探索洋河营销新模式, 居安思危, 居危思“机”, 顺势而为, 逆“市”而上, 实施思路、战略、机制、能力等“四大突破”, 加快营销、生产、管理、执行等“四项转型”, 全方位加大工作力度, 提高营销水平, 做到科学发展, 努力实现洋河新一年的更大跨越、更大突破。(小小)