

## 高效液相色谱法检测蔗渣半纤维素水解物中的单糖\*

# Determination of Monosaccharide in Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by High Performance Liquid Chromatography

方 宏 曾健智 陈海珊 梁小燕 张厚瑞

Fang Hong Zeng Jianzhi Chen Haishan Liang Xiaoyan Zhang Hourui

(广西植物研究所 桂林 541006)

(Guangxi Institute of Botany, Guilin, 541006)

**摘要** 用高效液相色谱法测定甘蔗渣半纤维素水解物中的单糖含量。以 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱为色谱分析柱,用示差折光检测器检测,流动相是乙腈:水(80:20)。在此色谱条件下,甘蔗渣半纤维素水解物分离成:木糖、阿拉伯糖、果糖和葡萄糖。各单糖呈良好的线性关系。加样回收率的平均值为 97.3%~98.7%,此方法简便、快速、准确。

**关键词** 高效液相色谱法 甘蔗渣 半纤维素水解物 单糖

中图法分类号 Q 539.5

**Abstract** A method for the determination of monosaccharides in hemicellulose hydrolysate from sugar cane bagasse by HPLC (high performance liquid chromatography) was developed. The operating conditions were Hypersil NH<sub>2</sub> (150mm×4.6mm i. d) column; mobile phase of V(acetonitrile): V(water)=80:20; flow rate of 1.0 ml/min; detected with differential refractometer. Under this condition, the results are satisfactory. The method is simple, quick and accurate. The average recovery was 97.3% to 98.7%.

**Key words** HPLC (high performance liquid chromatography), bagasse, hemicellulose hydrolysate, monosaccharide

蔗渣是制糖工业的副产物,含半纤维素 25%~29%,是少数几种半纤维素含量极高的植物纤维材料之一。半纤维素的主要成分是木聚糖,稀酸很容易将其水解为单糖(主要成分是木糖)。因此,微生物发酵蔗渣半纤维素水解物生产乙醇<sup>[1]</sup>,木糖醇<sup>[2,3]</sup>等化工产品,被认为是合理利用这一廉价而又大量资源的经济而有效的途径。在我国制糖工业中,年产蔗渣约 1 095 万吨,其中部分蔗渣通过制浆造纸等途径已经得到合理的利用外,绝大部分的蔗渣仍然被当着燃料烧掉<sup>[4]</sup>。显然,利用蔗渣半纤维素水解物生物转化生产乙醇、木糖醇及其它化工

原料的研究,在我国更有着特别重要的意义。因此,建立一套快速而灵敏的方法检测蔗渣半纤维素水解物中各种单糖含量,对于深入研究蔗渣水解及其生物转化问题是十分必要的。

高效液相色谱法能有效地同时测定样品中的多个单糖<sup>[5]</sup>,但通常采用的糖分析专用柱,价格昂贵,分析成本甚高,是国内许多生产部门和科研单位难以承受的。为此,本文选用价格低廉的 NH<sub>2</sub> 柱为分析柱,检测蔗渣半纤维素水解物中的多种单糖的含量,获得满意的结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Waters 510 泵、410 示差折光检测器、U6k 手动进样器、810 色谱工作站。梅特勒 AT-200 型电子天平。乙腈(色谱纯, 0.5 μm 滤膜过滤), 水(重蒸水, 0.45 μm 滤膜过滤), 硫酸(分析纯), D-木糖、D-阿拉伯糖、D-果糖均为生化试剂, 葡萄糖为分析纯试剂。

### 1.2 色谱条件

检测器: Waters 410 示差折光检测器; 柱温: 35℃; 色谱柱: 大连依利特公司 Hypersil NH<sub>2</sub>(4.6 mm i.d. × 250 mm 5 μm); 流动相: V(乙腈): V(水) = 80:

流速: 1 ml · min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μl。

### 1.3 标准溶液的配制

精确称取 D-木糖、D-果糖、D-阿拉伯糖、葡萄糖对照品各 3.000 g, 置于 50 ml 容量瓶中, 用 50% 乙腈水溶液溶解并定容至刻度, 制成标准混合储备液。

## 2 结果

### 2.1 流动相的选择

分别以甲醇: 水和乙腈: 水为流动相, 检测蔗渣半纤维素水解物的单糖, 分离结果显示, 乙腈: 水系统明显优于甲醇: 水系统, 经实验比较, 当 V(乙腈): V(水) = 80: 20 时, 各单糖均获得良好的分离(见图 1)。

### 2.2 线性范围

准确移取上述标准储备液, 用 50% 乙腈水溶液配制成浓度分别为 1.5 mg · ml<sup>-1</sup>、3.0 mg · ml<sup>-1</sup>、9.0 mg · ml<sup>-1</sup>、18.0 mg · ml<sup>-1</sup>、30.0 mg · ml<sup>-1</sup>、45.0 mg · ml<sup>-1</sup>、60.0

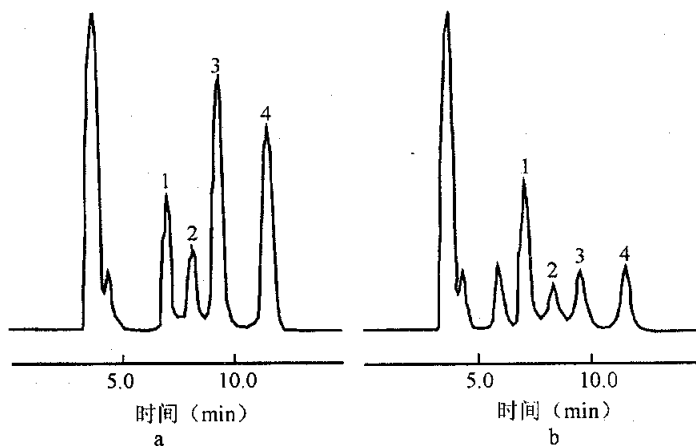


图 1 单糖分离结果

a: 标品色谱图; b: 样品色谱图。1: 木糖; 2: 阿拉伯糖; 3: 果糖; 4: 葡萄糖。

表 1 水解物中 4 种糖的线性关系

组 分	回归方程 ( $n = 7$ )	$r$	线性范围 (mg · ml <sup>-1</sup> )
木 糖	$C = (0.4272 + 3.21) \times 10^{-5} A$	$r = 0.9997$	0.5~60
阿拉伯糖	$C = (0.8311 + 3.72) \times 10^{-5} A$	$r = 0.9989$	0.7~60
果 糖	$C = (0.3584 + 1.31) \times 10^{-5} A$	$r = 0.9996$	0.2~60
葡 萄 糖	$C = (0.5218 + 1.76) \times 10^{-5} A$	$r = 0.9992$	0.3~60

$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  的标准系列工作液,按上述色谱条件,测其峰面积,以峰面积  $Y (\mu\text{V} \cdot \text{s})$  为纵坐标、质量浓度  $C (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$  为横坐标作标准曲线,其回归方程和相关系数列入表1。从表1数据可见:木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖在此测定条件下呈现良好的线性关系。

### 2.3 精密度试验

在上述色谱条件下,取标准溶液重复进样6次,结果:木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖的相对标准偏差(RSD)分别为1.6%,2.0%,1.1%,0.4%。

### 2.4 回收率考察

取已知含量的样品溶液5份,分别加入标准储备液2.5 ml,用50%乙腈水溶液定容至10 ml,按上述方法测定各组分的平均回收率,见表2。

表2 各组分的回收率( $n=5$ )

组 分	加入量		测得量				回收率				平均回收率(%)	RSD (%)	
	$(\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$		$(\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$				(%)						
木 糖	15.0	14.96	14.36	14.70	15.04	15.00	99.7	95.7	98.0	100.3	100.0	98.7	1.9
阿拉伯糖	15.0	14.64	14.13	14.72	14.67	14.79	97.6	94.2	98.1	97.8	98.6	97.3	1.8
果 糖	15.0	14.72	14.51	14.76	14.59	14.61	98.1	96.7	98.4	97.3	97.4	97.6	0.7
葡 萄 糖	15.0	14.35	14.58	14.70	14.67	14.64	95.7	97.2	98.0	97.8	97.6	97.3	1.0

### 2.5 样品的处理及测定

称取干燥的蔗渣(取自广西阳朔糖厂)碎末25 g,置于500 ml的锥形瓶中,加入1.5%硫酸溶液250 ml,0.1 MPa 加压水解60 min,过滤,70℃真空浓缩,浓缩液加石灰液调pH值至中性,保温一定时间后离心除去 $\text{CaSO}_4$ 沉淀。浓缩,真空干燥。得5.3 g。

准确称取上法得到的样品200 mg,用50%乙腈水溶液溶入10 ml容量瓶中,定容,摇匀。静置10 min,经0.5  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后按色谱分析条件进样检测,结果见表3。

表3 蔗渣水解半纤维素水解物中的单糖含量

样品	木糖 (%)	阿拉伯糖 (%)	果糖 (%)	葡萄糖 (%)
1	11.3	2.3	1.1	2.0
2	10.9	2.1	1.1	1.9

## 3 讨论

甘蔗渣半纤维素水解物中的部分水溶性杂质,不溶于50%乙腈水溶液,可经沉淀、过滤除去。因此,我们选择50%乙腈水溶液溶解样品,减少杂质对色谱柱的污染,延长色谱柱的使用寿命。本法能同时检测多种单糖,方法简便,快速,准确。

### 参考文献

- Roberto I C, Laci S, Barbosa M F S et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochemistry*, 1991, 26: 15~21.
- Roberto I C, Felipe M G A, Lsvid L D et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresource Technology*, 1991, 36: 271~275.
- Poonam Nigam, Dalel Singh. Processes for fermentative production of xylitol sugar substitute. *Process Biochemistry*, 1995, (30) 2: 117~124.
- 杨 斌. 甘蔗渣糖化及转化为酒精的研究概况. *食品与发酵工业*, 1995, 6: 61~65.
- 吴伟志, 罗 廉, 余世袁. 植物单糖的高效液相色谱分析. *色谱*, 1994, 12 (3): 210~211.

(责任编辑: 邓大玉)