

文章编号: 1000-5013(2007)04-0403-03

麦糟水解液中单糖及脂肪酸的 HPLC 分析

余晓芬, 刘英丽, 程珊影, 李夏兰, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 建立高效液相色谱(HPLC)测定麦糟水解液中的单糖及脂肪酸的分析方法,检测条件:色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱,柱温为 50℃,流动相为 5 mmol·L⁻¹的硫酸,流速为 0.4 mL·min⁻¹,检测器为示差折光检测器.在此条件下,水解液中的单糖及脂肪酸的峰面积与浓度线性关系良好,相关系数 R^2 在 0.999 91~0.999 98 之间,回收率为 97.3%~101.5%.通过对样品的分析表明,麦糟水解液中不含有葡萄糖、甲酸及乙酰丙酸,木糖和阿拉伯糖的质量浓度比较高,乙酸的质量浓度比较低,单糖及脂肪酸的混合液得到很好的分离,分离过程在 23 min 内完成.

关键词: 麦糟; 高效液相色谱; 单糖; 脂肪酸; 示差折光检测器

中图分类号: Q 539; Q 547.1; O 657.7⁺2

文献标识码: A

微生物发酵工艺生产木糖醇已经取得了许多重要的研究进展,以半纤维素水解液发酵生产木糖醇是目前研究的热点^[1].麦糟是啤酒厂的主要副产品,其水解液中除含葡萄糖、木糖、阿拉伯糖外,还含有有毒物质,如甲酸、乙酸、乙酰丙酸等,这些物质能抑制微生物的代谢,影响木糖醇的产量和质量^[2-3].因此,准确分析这些物质对微生物发酵生产木糖醇工艺的研究是非常重要的.目前,国内外用高效液相色谱法(HPLC)测定糖类化合物已有许多报道^[4-10],但同时分析单糖及脂肪酸的报道仅在 Solang 等^[3]的研究中略有叙述.本文报道用 HPLC 同时分析葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甲酸、乙酸和乙酰丙酸的方法.

1 材料和方法

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Aminex HPX-87H 柱(美国 Bio-Rad 公司),0.22 μm 的水性过滤膜(德国 Membrana 公司),DKU-30 型电热恒温油槽(上海精宏实验设备有限公司),DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司).

1.2 试剂

硫酸(分析纯,上海试剂总厂),葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甲酸、乙酸、乙酰丙酸标准品(上海国药集团化学试剂有限公司).

1.3 色谱条件

Aminex HPX-87H 型柱,柱温为 30~50℃,流动相为 3~5 mmol·L⁻¹的硫酸并经超声波脱气 15 min,流速为 0.3~0.6 mL·min⁻¹,检测器为示差折光检测器.

1.4 标准曲线的绘制

准确称取葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甲酸、乙酸和乙酰丙酸各 0.25 g,置于 10 mL 的容量瓶中,用超纯水溶解并定容配成 25 g·L⁻¹的标准储备液.实验时用超纯水稀释至质量浓度分别为 20,15,10,5,1,0.5,0.1 g·L⁻¹的溶液备用,所有样品上样前用 0.22 μm 水性滤膜过滤,手动进样 20 μL.

收稿日期: 2007-01-21

作者简介: 余晓芬(1980-),女,硕士研究生,主要从事生物化工的研究;通信作者:方柏山(1958-),男,教授,E-mail:fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20276026,20446004);福建省科技计划重点项目(2003I020)

1.5 样品制备

按固液比(w/V , 固体质量(g)和液体体积(L)的比)为 1:8 的比例,将水和麦糟混合,于 100℃ 下煮沸 1 h,冷却后,水洗并用 4 层纱布过滤,直到 pH 为 7.0.于 80℃ 干燥至水的质量分数小于 10%.将干燥后的麦糟与质量分数为 1%的硫酸以 1:8(w/V)的比例混合,在 100℃ 下水解 3h.取酸水解液 2 mL,冷冻并离心($12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 20 min,再用 0.22 μm 水性滤膜离心过滤 3 次,备用.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

改变流动相的酸浓度、柱温及流速,选择最佳色谱条件,实验结果表明,酸浓度的变化对分离度的影响不是太大.随着流动相流速增加,保留时间减小,但流速大于 0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 时,色谱柱压力偏高,有损色谱柱的使用寿命.柱温的改变对分离度的影响较大,随着柱温的升高,分离效果越好.因此,选择 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 作为流动相,流速为 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,柱温为 50℃ 进行实验,所测得单糖及脂肪酸的标准色谱图,如图 1 所示.图中, m_{RIU} 为 9~10 个折光系数单位.

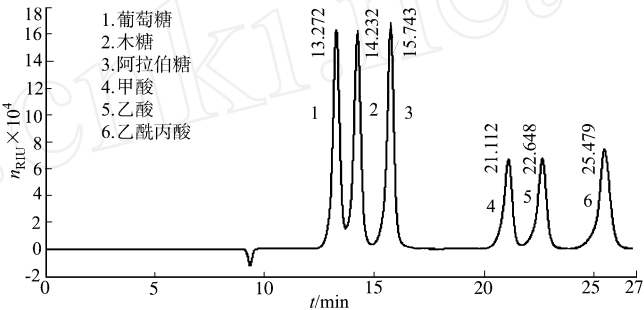


图 1 单糖及脂肪酸的标准曲线

Fig. 1 Standard curves of monosaccharides and fatty acid

2.2 单糖及脂肪酸的线性范围

按最佳色谱条件进行标准样品的测定,其线性范围为 0~25 g $\cdot\text{L}^{-1}$,而线性回归方程、相关系数(R^2)及检出限 C_{min} ,如表 1 所示.表中, A 为峰面积, C 为样品质量浓度.在线性范围内,峰面积与其浓度线性关系良好,以两倍噪音计算出最小检出限.

表 1 线性回归方程及检出限

Tab. 1 Linear regression equation and detection limits

样品	线性回归方程	R^2	$C_{\text{min}}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
葡萄糖	$A = 3.855 \times 10^5 C + 1.495 \times 10^4$	0.999 98	0.0263
木糖	$A = 3.959 \times 10^5 C - 2.101 \times 10^4$	0.999 83	0.0270
阿拉伯糖	$A = 4.061 \times 10^5 C + 7.012 \times 10^3$	0.999 95	0.0256
甲酸	$A = 1.992 \times 10^6 C + 6.566 \times 10^3$	0.999 92	0.0645
乙酸	$A = 2.094 \times 10^5 C + 1.988 \times 10^4$	0.999 91	0.0635
乙酰丙酸	$A = 2.857 \times 10^5 C + 7.012 \times 10^3$	0.999 95	0.0642

2.3 准确度及精密度实验

将混合的 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 标准样品按照选定条件进行分析,以峰面积外标法定量,重复测定 3 次,其平均

值 C_i 的结果如表 2 所示.由此可知,回收率(η)在 97.3%~101.5%,相对标准偏差(R_{SD})小于 2.16%.

2.4 麦糟水解液样品的分析

麦糟水解液的待测成分单糖及脂肪酸的测定结果,如表 3 所示(加入量为 5.0 g $\cdot\text{L}^{-1}$).从表 3 可

表 2 麦糟水解液标准样品的测定

Tab. 2 Recovery and relatively standard deviation

样品	$C_i/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\eta/(\%)$	$R_{\text{SD}}/(\%)$
葡萄糖	10.05	100.47	1.20
木糖	9.85	98.53	2.14
阿拉伯糖	9.99	99.89	1.12
甲酸	9.96	99.57	1.31
乙酸	9.98	99.80	1.08
乙酰丙酸	9.90	99.00	2.16

表 3 麦糟水解液实际样品的测定

Tab. 3 Recoveries and analytical results of practical samples

样品	$C/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_i/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\eta/(\%)$
葡萄糖	0	4.98	99.6
木糖	10.08	14.99	99.4
阿拉伯糖	11.01	15.88	99.2
甲酸	0	5.01	100.2
乙酸	0.74	5.69	99.1
乙酰丙酸	0	4.96	99.2

知,回收率在 99.2%~100.2%之间,所得水解液的色谱图如图 2 所示.从图 2 可知,麦糟水解液中不含葡萄糖、甲酸及乙酰丙酸,木糖和阿拉伯糖的质量浓度比较高,乙酸的质量浓度比较低.从分析可知,麦糟水解液的成分有利于木糖醇的发酵.此外,在保留时间 9.479 min 出现的是溶解样品的硫酸峰,在

保留时间 10.470,11.623,12.049 min 处有一些杂质峰,可能是酚类、糠醛及羟甲基糠醛等.

3 结束语

示差折光检测器用于检测无紫外吸收的单糖及脂肪酸类化合物,样品无需衍生处理,过滤后,便可以直接进样检测.本文采用 Aminex HPX-87H 柱,单糖及脂肪酸的混合液得到了很好的分离,只需 23 min 即可完成色谱的分离过程,具有分离效果好,分析速度快,操作简便的优点.本方法适用于单糖及脂肪酸的分离.

参考文献:

[1] 张厚瑞,何成新,梁小燕,等.半纤维素水解物生物转化生产木糖醇[J].生物工程学报,2000,16(3):304-307.

[2] 张学群,张柏青.啤酒工艺控制指标及检测手段[M].北京:中国轻工业出版社,1993:52-55.

[3] SOLANGE I M,GIULIANO D,INES C R. Kinetic behavior of candida guilliermondii yeast during xylitol production from brewer s spent grain hemicellulosic hydrolysate[J]. Biotechnol Prog,2005,21(4):1352-1356.

[4] 王吉顺,关家税,王淑仁,等.高效液相色谱法测定葡萄酒中含糖量[J].色谱,1992,10(6):369-371.

[5] 辛梅华,徐金瑞,方柏山,等.蔗渣水解液及发酵液中糖及糖醇的高效液相色谱分析[J].分析测试学报,1997,16(6):44-46.

[6] 王丽丽,刘汉成,王葵阳,等.HPLC 法测定半纤维素水解液中糖的研究[J].分析测试学报,1994,13(3):51-53.

[7] 郑春霞,梁永亮,范玲,等.高效液相色谱法分离和鉴别棉花中 13 种糖[J].分析测试学报,1998,17(4):46-47.

[8] 李敬慈,丁天惠.高效液相色谱法分析蜂蜜中的糖[J].分析测试学报,1995,14(5):62-65.

[9] 方宏,曾健智,陈海珊,等.高效液相色谱法检测蔗渣半纤维素水解液中的单糖[J].广西植物学报,2000,16(3):124-126.

[10] 吴伟志,罗廉,余世袁.植物单糖的高效液相色谱分析[J].色谱,1994,12(3):210-211.

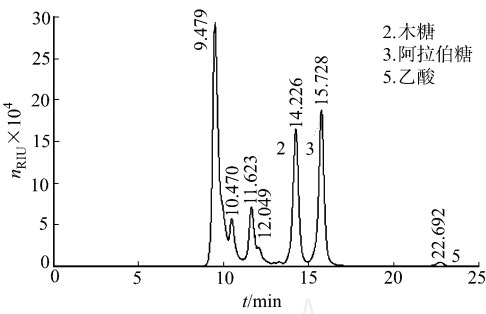


图 2 麦糟水解液的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of the liquors of acid hydrolysis on brewery s spent grain

Analysis of Monosaccharides and Fatty Acid in the Liquors of Acid Hydrolysis on Brewery s Spent Grain by HPLC

YU Xiao-fen , LIU Ying-li , CHENG Shan-ying ,
LI Xia-lan , FANG Bai-shan

(Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University , Huaqiao University , Quanzhou 362021 , China)

Abstract : A method for analysis of monosaccharides and fatty acid in the liquors of acid hydrolysis on Brewery s spent grain by high performance liquid chromatography (HPLC) is described. The operating conditions were Aminex HPX-87H column at 50 and differential refractive index detector , the mobile phase was 5 mmol · L⁻¹ H₂SO₄ and the flow-rate was 0.4 mL · min⁻¹. The monosaccharides and fatty acid in the liquors was measured in the anterior conditions. The correlation coefficient was 0.999 91 ~ 0.999 98 and the corresponding average recoveries were 97.3 % ~ 101.5 %. Glucose , formic acid and levulinic acid were not detected in the liquors of acid hydrolysis and the concentration of xylose and arabinose was high , while the acetic acid was low. The mixture of monosaccharides and fatty acid was efficiently separated and the whole process of separation was finished within 23 minutes.

Keywords : brewery s spent grain ; HPLC ; monosaccharide ; fatty acid ; differential refractive index detector

(责任编辑: 黄仲一)