

文章编号: 100025013(2010)020187205

# 高效液相色谱测定麦糟水解液中单糖和有机酸

张兰, 程珊影, 李夏兰, 方柏山

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 建立在麦糟水解液中, 单糖、有机酸和糖醛酸等的高效液相色谱测定法。在确定的色谱条件下, 葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、甲酸、乙酸、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸的分离状况良好, 其峰面积与质量浓度的线性关系良好, 相关系数  $R^2$  值为 0.9912~0.9997, 回收率为 99.40%~105.90%。木糖、半乳糖、甘露糖在 Aminex HPX087H 柱上不能分离, 但可用 ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱分离。采用示差折光检测器检测, 柱温为 30℃, 流动相中乙腈和水的体积比为 80:20, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 0.02 mL, 外标法定量, 结果表明, 其峰面积与浓度线性关系良好, 相关系数  $R^2$  值为 0.9959~0.9991, 回收率为 99.99%~102.70%。

**关键词:** 麦糟; 单糖; 有机酸; 糖醛酸; 高效液相色谱

**中图分类号:** TQ353.1<sup>+</sup>4; O657.7<sup>+</sup>2

**文献标识码:** A

植物纤维原料主要由纤维素、半纤维素和木质素 3 大组分组成。半纤维素由木糖通过  $\beta$ 1,4-糖苷键连接成木聚糖主链, 其侧链基团主要有阿拉伯糖基、甘露糖基、半乳糖基、半乳糖醛酸基、葡萄糖醛酸基、乙酰基和甲酰基等, 通过醚键或酯键连接在主链上<sup>[1,2]</sup>。目前, 常用分析各糖类化合物的方法主要有高效液相色谱法、示差检测法和高效阴离子交换-脉冲安培检测法。陈勇等<sup>[3]</sup>采用 Alltech 柱同时分析发酵酒中的糖、醇、酸类物质。梁立娜等<sup>[4]</sup>用 CarboPac PA20 阴离子交换柱分析木质纤维水解液中的单糖和糖醛酸, 但其采用梯度洗脱, 操作繁琐。胡志群等<sup>[5]</sup>用高效液相色谱法, 成功分离并测定荔枝果肉中的多种糖、酸和维生素, 分离效果好、准确率高、操作快速简单, 但其  $\text{NH}_2$  基柱流动相采用乙腈, 毒性大, 容易造成污染。Blakeney 等<sup>[6]</sup>用气相色谱法, 测定麦糟水解液中的阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖。Solang 等<sup>[7]</sup>采用 Aminex HPX087H 柱, 分析蔗渣水解液中的葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、木糖醇和乙酸。Carvalho 等<sup>[2]</sup>也采用 Aminex HPX087H 柱, 分析麦糟水解液中葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甲酸、乙酸及糖醛酸。但这些研究对其他单糖及糖醛酸没有测定。Bartolome 等<sup>[8]</sup>采用气相色谱法, 测定麦糟水解液中阿拉伯糖、木糖和木糖醇, 但由于气相色谱的样品需要衍生处理, 操作比较复杂。本文采用高效液相色谱法, 同时测定麦糟水解液中多糖、有机酸和糖醛酸。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

(1) 仪器: 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Aminex HPX087H 柱(美国 BioRad 公司), ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱(美国 Agilent 公司), BS224S 型分析天平(德国 Sartorius 公司), 0.22  $\mu\text{m}$  的水性、油性过滤膜(德国 Membrana 公司), DKZC 型电热恒温振荡水槽(上海精密仪器有限公司), 球磨机(江苏南京科析实验仪器研究所)。

(2) 试剂: 硫酸(分析纯, 上海试剂总厂), 乙腈(色谱纯, 山东禹王实业有限公司), 葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、甲酸、乙酸、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸标准品(色谱纯, 中国国药集团化学试剂有限公司)。实验用水为 Millipore 超纯水。

收稿日期: 20080212

通信作者: 李夏兰(1962), 女, 教授, 主要从事生物化工的研究。E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804)

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 (1) Aminex HPXC87H 柱色谱条件1 柱温为 30~ 65 e ,流动相为 3~ 5 mmol # L<sup>-1</sup> 的硫酸(超声波脱气 15 min), 流速为 0.3~ 0.6 mL # min<sup>-1</sup>, 示差折光检测器检测, 进样量为 0.02 mL. (2) ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱色谱条件1 柱温为 30 e ,流动相中乙腈和水的体积比为 80 B 20, 流速为 1.0 mL # min<sup>-1</sup>, 示差折光检测器检测, 进样量为 0.02 mL.

1.2.2 样品制备 球磨机球磨麦糟 30 min, 过 50 目筛, 以获得粒径小于 0.5 mm 的麦糟粉末. 料液比 (麦糟质量 m 和水的体积 V, 下同) 为 1 B 8, 于 100 e 下煮沸 1 h, 冷却; 用多层纱布水洗, 直到 pH 值为中性, 并于 80 e 干燥, 至水的体积分数小于 10%<sup>[9]</sup>. 干燥后, 麦糟按料液比为 1 B 6 的比例与质量分数为 72% 的硫酸溶液混合, 室温下水解 3 h<sup>[11]</sup>. 然后, 调节硫酸浓度为 1 mol # L<sup>-1</sup>, 于 100 e 下加热水解 2 h. 取酸水解液 2 mL, 于离心机(10 000 r # min<sup>-1</sup>) 中冷冻离心 20 min, 再用 0.22 Lm 水性滤膜过滤 3 次, 备用.

2 结果与讨论

2.1 Aminex HPXC87H 柱测定结果

2.1.2 色谱条件的选择 分别考察酸浓度(3~ 5 mmol # L<sup>-1</sup>)、柱温(30~ 65 e), 以及流速(0.3~ 0.6 mL # min<sup>-1</sup>) 对分离度的影响1 结果表明, 酸浓度的变化对分离度的影响不大. 随着流动相流速增加, 保留时间减小, 且流速大于 0.5 mL # min<sup>-1</sup> 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, 升高柱温, 有利于分离效果. 在温度 50~ 65 e 时, 分离度几乎没有变化. 因此, 色谱条件选用 5 mmol # L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为流动相, 流速为 0.4 mL # min<sup>-1</sup>, 柱温为 50 e, 在此色谱条件测得单糖及有机酸的标准色谱图, 如图 1 所示.

由图 1 可知, 葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甲酸和乙酸的分离度良好, 而半乳糖、甘露糖、木糖保留时间接近, 不能分开.

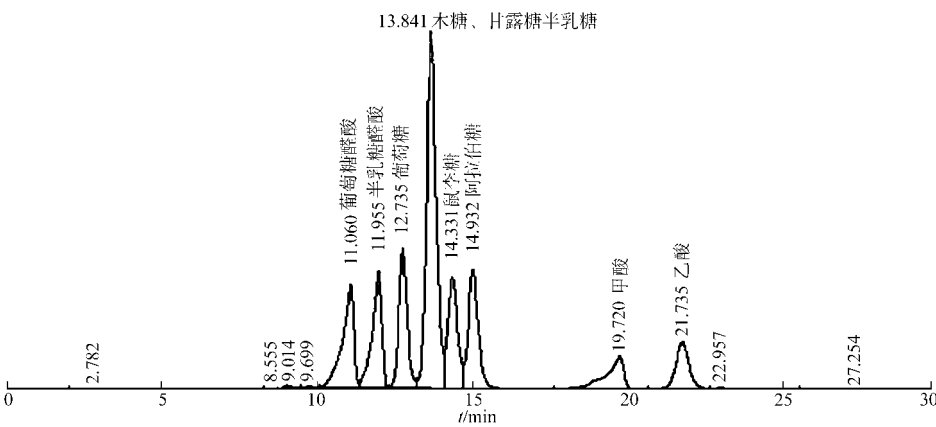


图 1 单糖及有机酸的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of monosaccharides and organic acids

2.1.2 单糖及脂肪酸的线性回归方程 使用所配制的标准储备液, 按选定的色谱条件进行测定, 其线性范围、线性回归方程、相关系数及检出限, 如表 1 所示. 表 1 中的线性回归方程, y 为峰面积, x 为质量浓度(Q g # L<sup>-1</sup>)1 在线性范围内, 峰面积与其浓度线性关系良好, 以 3 倍噪音计算最小检出限 Q<sub>min</sub>.

2.1.3 准确度及精密度的测定 按选定的色谱条件, 在麦糟的水解液中加入已知量的单糖及脂肪酸进行回收试验. 以峰面积外标法定量, 重复测定 3 次, 结果表明, 其回收率为 99.40%~ 105.90%, 相对标准偏差为 0.67%~ 2.28%.

2.1.4 麦糟水解液样品的分析 麦糟水解液按选定的色谱条件进行待测成分测定, 葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、木糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甲酸和乙酸的质量浓度分别为 0.05, 0.446, 4.19, 0.187, 0.026 g # L<sup>-1</sup>, 所得水解液的色谱图如图 2 所示.

从图 2 可知, 麦糟水解液中含有葡萄糖、木糖(或甘露糖、半乳糖)、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和乙酸1

其中, 葡萄糖、木糖(或甘露糖、半乳糖)和阿拉伯糖的质量浓度比较高, 葡萄糖醛酸和乙酸的质量浓度比较低. 在 10.304, 11.589, 18.931, 22.965 min 峰处还有一些杂质峰, 可能是酚类及糠醛、羟甲基糠醛、乙酰丙酮等.

表 1 Aminex HPX087H 柱分离的线性回归方程及检出限  
Tab. 1 Linear regression equation and detection limits of separated by Aminex HPX087H column

样品	Q g# L <sup>-1</sup>	线性回归方程	R <sup>2</sup>	Q <sub>min</sub> /g# L <sup>-1</sup>
葡萄糖醛酸	0~ 20	y= 346 713x+ 32 588	0.999 0	0.013
半乳糖醛酸	0~ 25	y= 310 486x+ 29 876	0.999 6	0.013
葡萄糖	0~ 25	y= 347 348x+ 25 027	0.999 7	0.013
三糖混液	0~ 25	y= 900 448x+ 472 652	0.991 2	0.007
鼠李糖	0~ 25	y= 311 273x+ 41 614	0.999 5	0.013
阿拉伯糖	0~ 25	y= 367 226x- 5 755. 5	0.999 4	0.013
甲酸	0~ 25	y= 142 179x+ 107 834	0.999 7	0.040
乙酸	0~ 25	y= 172 006x+ 11 228	0.999 7	0.033

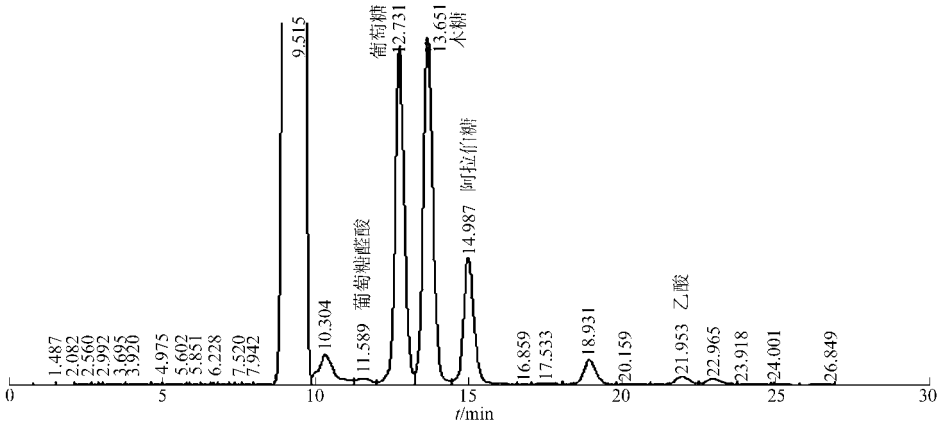


图 2 麦糟水解液的 Aminex HPX087H 柱色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the liquors of acid hydrolysis on brewery's spent grain by Aminex HPX087H column

2.2 ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱测定结果

Aminex HPX287H 柱不能分离木糖、半乳糖和甘露糖1 ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱是氨基柱, 流动相为水与乙腈的混合物, 可用以分离单糖和二糖.

2.2.1 色谱条件的建立 在选定的色谱条件下测得 3 个单糖的标准色谱图, 如图 3 所示.

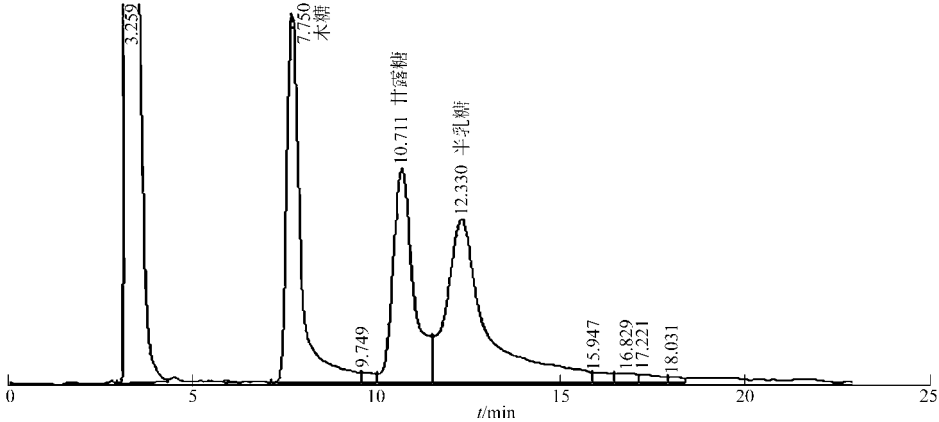


图 3 单糖的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of monosaccharides

2.2.2 单糖的线性回归方程 使用所配制的标准储备液, 按选定的色谱条件进行测定, 其线性范围、线性回归方程、相关系数及检出限, 如表 2 所示.

2.2.3 准确度及精密度测定 按选定的色谱条件, 在麦糟的水解液中加入已知量的木糖、甘露糖和半

乳糖进行回收试验. 以峰面积外标法定量, 重复测定 3 次, 结果表明, 其回收率为 99. 99%~ 102. 70%, 相对标准偏差为 0. 36%~ 0. 52% .

表 2 ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱分离的线性回归方程及检出限

Tab. 2 Linear regression equation and detection limits of separated by ZORBAX Carbohydrate Analysis column				
样品	$Q\text{ g}\#\text{ L}^{-1}$	线性回归方程	$R^2$	$Q_{\min}/\text{g}\#\text{ L}^{-1}$
木糖	1~ 25	$y=118\,898x-334.77$	0.998 6	0.240
甘露糖	1~ 25	$y=95\,589x-576.39$	0.999 1	0.340
半乳糖	1~ 25	$y=103\,010x+13\,666$	0.995 9	0.487

2. 2. 4 麦糟水解液样品的分析 按选定的色谱条件进行检测, 麦糟水解液待测成分为木糖、甘露糖和半乳糖, 其质量浓度的测定结果分别为 4. 01, 0, 0  $\text{g}\#\text{ L}^{-1}$ . 麦糟水解液的色谱图, 如图 4 所示.

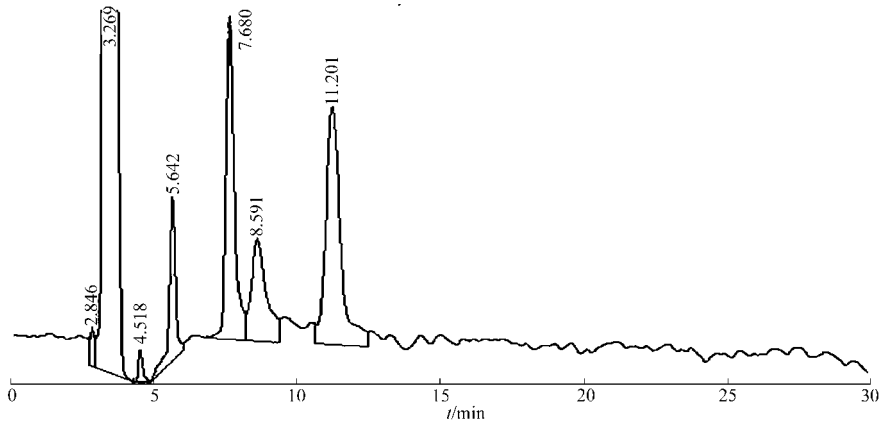


图 4 麦糟水解液的 ZORBAX Carbohydrate Analysis 柱色谱图  
Fig. 4 Column chromatogram of the liquors of acid hydrolysis on brewery's spent grain by ZORBAX Carbohydrate Analysis

2. 3 分析讨论

麦糟按照与文[ 1] 的方法水解后, 得到的样品用 HPLC 法进样检测1 将测得麦糟中各组分质量分数( $w_1$ ) 与用本文方法测定值( $w_c$ ) 进行比较, 如表 3 所示. 其中, 文[ 1] 的水解样品中的单糖用气液相色谱法检测, 糖醛酸按文[ 10] 的硫酸2 咋唑法测定, 乙酸采用英国拜发公司的酶法分析试剂盒测定<sup>[1]</sup>.

表 3 麦糟各组分质量分数的比较

Tab. 3 Compare components of brewery's spent grain					
样品	$w_c/\%$	$w_1/\%$	样品	$w_c/\%$	$w_1/\%$
葡萄糖	28. 05	27. 59	半乳糖	0	1. 67
木糖	26. 45	26. 46	葡萄糖醛酸	0. 32	4. 10
阿拉伯糖	11. 80	10. 76	半乳糖醛酸	0	-
甘露糖	0	0. 73	乙酸	1. 64	0. 85

由表 3 可知, 本实验测定的结果与文[ 1] 所用的方法测定的结果相比, 葡萄糖醛酸的质量分数相对较低1 这是因为文[ 1] 的糖醛酸采用硫酸咋唑比色法测定, 是以葡萄糖醛酸的质量分数计算的, 测定糖醛酸的总量不能反映样品中不同糖醛酸的实际值. 而且, 在硫酸咋唑比色法中, 其待测溶液中的戊糖、己糖与糖醛酸的吸收波长相同, 使测定值偏高. 本样品水解液中葡萄糖、木糖、阿拉伯糖的质量分数与文献值接近, 乙酸的质量分数则超过文献值1 这是由于麦糟的产地不同, 其各种成分也稍有不同, 水解液样品中不含有甘露糖和半乳糖, 可能其含量低于检出限, 也可能因麦糟产地不同而造成其组分的差异.

3 结束语

采用 Aminex HPLC87H 柱测定麦糟水解液中单糖、有机酸和糖醛酸, 以及采用 ZORBAX Carbo2 hydrate Analysis 柱测定木糖、甘露糖、半乳糖, 其检出限、回收率及相对标准偏差, 均可满足实验的测定要求. 与气相色谱相比, 样品无需衍生处理, 过滤后, 便可以直接进样检测; 与高效阴离子交换的杆脉冲

安培检测法相比, 所用检测器在实验室较为常见, 操作方便. 所建立的方法可以同时测定纤维原料水解液中的可能存在的主要单糖、有机酸和糖醛酸.

## 参考文献:

- [1] GIUSEPPINA M, CRAIG B F, AAN I S, et al. Fractionation and characterization of arabinoxylans from brewer. s spent grain and wheat bran[J]. Journal of Cereal Science, 2005, 42(2): 203-212.
- [2] CARVALHEIRO F, ESTEVES M P, PARAJO J C, et al. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewer. s spent grain[J]. Bioresource Tech, 2004, 91(1): 93-100.
- [3] 陈勇, 樊科权, 唐清兰, 等. 液相色谱对发酵酒中的糖、醇、酸类物质的测定[J]. 酿酒, 2006, 33(11): 73-74.
- [4] 梁立娜, 张萍, 蔡亚岐, 等. 高效阴离子交换脉冲安培检测同时分析单糖和糖醛酸[J]. 分析化学, 2002, 34(10): 1371-1374.
- [5] 胡志群, 王惠聪, 胡桂兵, 等. 高效液相色谱测定荔枝果肉中的糖酸和维生素 C[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 582-585.
- [6] BLAKENEY A B, HARRIS P J, HENRY R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis[J]. Carbohydrate Research, 1983, 113: 29-39.
- [7] SOLANGE I M, GIULIANO D, INES C R, et al. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from brewer. s spent grain in hemicellulosic hydrolysate[J]. Biotechnol Prog, 2005, 21(4): 135-136.
- [8] BARTOLOME B, SANTOST M, JIMENEZ J J, et al. Pentose and hydroxycinnamic acids in brewer. s spent grain[J]. Journal of Cereal Science, 2002, 36(1): 51-58.
- [9] 刘英丽, 李夏兰, 余晓芬, 等. 微波辅助酸水解麦糟制备低聚木糖的工艺[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 23-25.
- [10] BLUMENKRANTZ N, ASBOEHANSEN G. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489.

## Analysis of Monosaccharides and Organic Acids in the Liquors of Acid Hydrolysis on Brewery. s Spent Grain by HPLC

ZHANG Lan, CHENG ShanQing,  
LI Xiaolan, FANG BaiShan

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou, 362021, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) method was constructed to test individual monosaccharides and organic acids in the liquors of acid hydrolysis on brewery. s spent grain. Mixture of the glucose, arabinose, rhamnose, formic acid, acetic acid, glucuronic acid and galacturonic acid was measured in the given conditions. The correlation coefficient of these matters was 0.991 2 to 0.999 7 and the corresponding average recovery was 99.40% to 105.90%. For the case where, xylose, galactose and mannose can not be separated by Aminex HPX87H column, ZORBAX Carbohydrate Analysis column was used for further separation. The operating conditions were as follows: ZORBAX Carbohydrate Analysis column with differential refractive index detector, 30 °C, elution influent acetonitrile/water (80/20; volume ratio), flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and injection volume 0.02 mL. Under these conditions, the correlation coefficient was 0.995 9 to 0.999 1 and the corresponding average recovery was 99.99% to 102.70%.

**Keywords:** brewery. s spent grain; monosaccharide; organic acid; uronic acid; high performance liquid chromatography

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)