

## 用双波长可见光谱法快速测定半纤维素提取液中糖的含量

迟聪聪<sup>1</sup>, 张 曾<sup>1\*</sup>, 柴欣生<sup>1,2</sup>, 戈玮玮<sup>1</sup>

1. 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州 510640
2. 乔治亚理工大学造纸研究所, 亚特兰大 GA30332, 美国

**摘 要** 传统的 Douglas 比色法(间苯三酚-冰醋酸显色法)只能测定水溶性聚戊糖或戊糖, 该研究对上述方法进行了改进, 通过采用双波长技术实现对总糖和戊糖、己糖含量的同时测定。研究发现, 425 nm 是戊糖和己糖的等摩尔吸收波长, 553 nm 是戊糖的特征吸收波长, 以上述二波长为基础大大简化了双波长法的计算公式。半纤维素提取液中干扰物质的光谱结果显示, 提取液中的木素和葡萄糖醛酸对戊糖和己糖的测定结果都没有显著干扰。结果表明, 该方法测定总糖和戊糖、己糖的含量都具有较高的精度和准确性, 回收率为 97.4%~101.9%。该方法简单、快速, 非常适用于阔叶木和禾本科植物半纤维素提取液中混合糖含量的同时测定。

**关键词** 总糖; 戊糖; 双波长分光光度法; 半纤维素提取液

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)04-1084-04

### 引 言

生物质资源作为一种巨大的可再生资源, 在缓解世界资源短缺与能源危机方面具有较大潜力。“生物质精炼”是近几年国内外的研究热点, 国外学者提出了“联合型林产品生物质精炼(integrated forest products biorefinery, IFBR)”的构想, 即在木片制浆前增加预处理段, 提取木片中的半纤维素糖, 用以转化为高附加值的产品, 如生产燃料乙醇、生物柴油和木糖醇等<sup>[1,2]</sup>。其中, 提取液中主要糖类组分含量的快速测定, 对于优化预提取工艺和确定糖的发酵条件将具有重要意义。

用于多糖含量的分析方法有很多。一类是传统的分析方法, 比如测总还原糖的方法如 3,5-二硝基水杨酸盐比色法(DNS 法)<sup>[3]</sup>, 利用多糖在强酸性条件下的水解产物与酚类缩合生成有色化合物的方法, 如地衣酚-硫酸法、苯酚-硫酸法和 Douglas 法(又称间苯三酚-冰醋酸显色法)<sup>[4-6]</sup>, 上述方法操作简单, 但不能同时分别测己糖和戊糖, Douglas 法与上述其他方法相比, 测定准确度相对较高。二是现代仪器分析方法, 主要包括气相色谱法、高效液相色谱法和离子色谱法。气相色谱分析前需对单糖进行衍生化, 工序繁琐且衍生化反应会影响组分定量和定性分析<sup>[7]</sup>。高效液相色谱法和离

子色谱法是目前定性和定量分析糖类组分的最好方法<sup>[8,9]</sup>, 但仪器操作和维护成本很高。因此, 建立一种能较准确测定提取液中的主要糖类组分, 并操作简单、快速, 不需要昂贵仪器的新方法, 对于开展生物质精炼的研究是很有必要的。

本文对 Douglas 法进行改进, 采用双波长技术实现对戊糖和己糖含量的同时测定, 为植物半纤维素提取液中糖类组分(包括单糖、低聚糖和多糖)的分析提供一种新的手段。研究还对预提取液中其他物质对糖测定结果的干扰影响进行了评价。

### 1 实 验

#### 1.1 原料与试剂

桉木木片取自广东雷州林业局, 风干后装袋保存。本实验所用试剂除 D-木糖为生化试剂, 其他均为分析纯试剂。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 标准糖溶液的配制

分别配制不同浓度的木糖和葡萄糖标准溶液, 浓度范围为 0.5~5.0 mmol·L<sup>-1</sup>; 同时配制上述两种糖的混合液, 单糖和总糖浓度范围分别为 0.58~0.95 和 1.10~1.55 mmol·L<sup>-1</sup>。

##### 1.2.2 显色反应及可见光谱测定

收稿日期: 2009-04-26, 修订日期: 2009-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671647)资助

作者简介: 迟聪聪, 女, 1981 年生, 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室博士研究生 e-mail: congcongchi@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: ppzhang@scut.edu.cn

准确称取 2 g 间苯三酚溶于 110 mL 冰乙酸中, 加入 10 mL 无水乙醇和 2 mL 浓盐酸, 混合均匀后静置, 待溶解完全后备用。移取 1 mL 标准糖或样品溶液于 25 mL 比色管中, 加入 10 mL 显色反应试剂摇匀, 在沸水浴中反应 10 min 后立即冷却, 5 min 后于 SCINCO s-3100 型紫外-可见分光光度计中进行全波长扫描, 以空白样进行相同的显色反应作为参比。

### 1.2.3 半纤维素预提取及木素试样的制备

木片中半纤维素的预提取采用高温热水预水解方式, 在美国 M./K 609-2-10 型电热蒸煮锅中进行。木素为硫酸盐木素, 采用酸析法分离, 纯化步骤参照 Lundquist 方法<sup>[10]</sup>, 提纯木素样品用 PL 表示, 将其溶于稀碱液即得木素溶液试样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单糖显色反应原理及其可见光谱

Douglas 比色法的原理是在高温酸性条件下, 待测样品中的聚戊糖和聚己糖分别水解为戊糖和己糖, 然后脱水转变为糠醛和羟甲基糠醛, 再与间苯三酚显色<sup>[6]</sup>。2.2 中图 1 的光谱结果显示, 木糖和葡萄糖在波长 553 和 410 nm 处分别有最大吸收, 葡萄糖在 553 nm 附近也有微弱吸收, 但只有其含量远远高于木糖含量时才会对后者的测定产生干扰。因此, 传统的 Douglas 法在显色反应试剂中加入一定量的葡萄糖溶液作为空白, 以减小葡萄糖对木糖测定的干扰<sup>[6]</sup>。很显然, 这种消除干扰的方法仍然不适用于葡萄糖含量高的样品。

### 2.2 双波长法测总糖、戊糖和己糖的含量

图 1 为不同浓度木糖和葡萄糖显色反应后的可见光谱。可以看出, 相同摩尔浓度的木糖和葡萄糖经显色反应后, 均在相同波长 425 nm 处具有等吸收, 因此 425 nm 为木糖和葡萄糖的等摩尔吸收波长。由实验得出, 波长 425 nm 处的吸光度与总糖浓度之间的关系遵循朗伯-比尔定律, 关系表达式为  $y=0.1016x$  ( $n=6, R^2=0.9976, y$  为吸光度,  $x$  为总糖浓度  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 因此可以由波长处的吸光度值计算总糖含量。

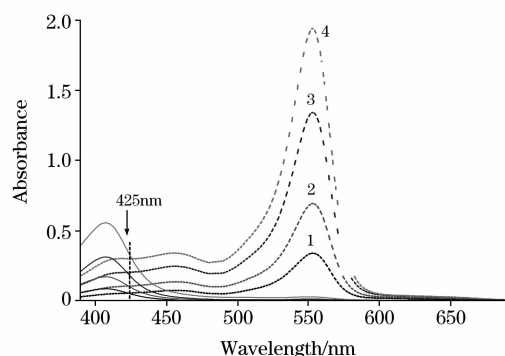


Fig. 1 Spectra of derivatives from various concentrations of glucose and xylose

Concentration of sugar/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Xylose: 1: 0.5; 2: 1.0; 3: 2.0; 4: 3.0

Glucose: 1: 0.5; 2: 1.0; 3: 2.0; 4: 3.0

实验结果还显示, 不同浓度的木糖经显色反应后, 在波长 553 nm 处的吸光度与糖浓度的关系也遵循比尔定律, 关系方程为  $y_1=0.6628x$  ( $n=6, R^2=0.9986, y_1$  为 553 nm 处的吸光度,  $x$  为木糖浓度  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。在没有其他物质干扰的前提下, 对于双组分混合糖体系, 二者在 553 和 425 nm 都有吸收, 可分别表达为

$$A_1 = \epsilon_1^1 c_1 + \epsilon_1^2 c_2 \quad (1)$$

$$A_2 = \epsilon_2^1 c_1 + \epsilon_2^2 c_2 \quad (2)$$

式中:  $c_1$  和  $c_2$  分别表示戊糖和己糖的浓度,  $\epsilon_1^1$  和  $\epsilon_1^2$  分别表示戊糖和己糖在 553 nm 处的摩尔吸收系数,  $\epsilon_2^1$  和  $\epsilon_2^2$  分别表示戊糖和己糖在 425 nm 处的摩尔吸收系数,  $A_1$  和  $A_2$  分别为波长 553 及 425 nm 处的吸光度。

在等摩尔吸收波长 425 nm 处, 戊糖和己糖的摩尔吸光系数相等, 即

$$\epsilon_2^1 = \epsilon_2^2 = \epsilon \quad (3)$$

$$c_T = c_1 + c_2 = \frac{A_2}{\epsilon} \quad (4)$$

这里  $c_T$  表示总糖浓度。

由于相对戊糖而言, 同等摩尔浓度的己糖在 553 nm 处的吸收非常小(约为戊糖吸收的 1.5%~2.0%), 对于阔叶木和禾本科植物, 提取液中以戊糖为主, 因此己糖在该波长处的吸收可忽略不计, 由此可简化为式(5)和式(6)进行计算。

$$c_1 = \frac{A_1}{\epsilon_1^1} \quad (5)$$

$$c_2 = c_T - c_1 \quad (6)$$

### 2.3 提取液中干扰物质的影响

木材半纤维素提取液的成分比较复杂, 其中某些含有醛基的有机物质可以与显色反应试剂中的间苯三酚显色, 因而可能会对戊糖和己糖的测定产生干扰。提取液中含有醛基的有机物主要为木素、糖醛酸、己糖和戊糖, 因此本文主要探讨了木素和糖醛酸对两者测定结果的影响。

图 2 的光谱显示, 葡萄糖醛酸的显色反应产物在 553 nm 有特征吸收, 与图 1 中相同浓度木糖 ( $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的结果相比, 前者的吸光度 (0.39) 要比木糖 (1.95) 低得多。在阔叶木半纤维素中, 每 9~10 个木糖单元就有 1 个 4-O-甲基葡萄糖醛基侧链<sup>[11]</sup>, 即使木片中的葡萄糖醛酸全部脱落进入预提取液, 其所对应的吸光度仅为  $0.39 \times 0.3/3.0 =$

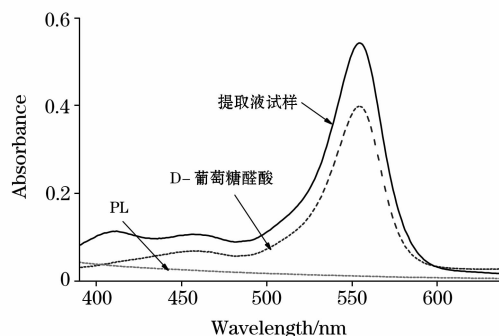


Fig. 2 Spectrum of the derivatives from interfering substances

注: PL 浓度  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 葡萄糖醛酸浓度  $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 预提取条件:  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , 液比 1:5, 升温 50 min, 保温 150 min。

0.039, 干扰比例约 2%, 因此葡萄糖醛酸的吸收干扰可忽略不计。

基于半纤维素提取液中的木素含量( $<0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 评价了木素对混合糖测定结果的影响, 结果见图 2。很显然, 木素显色反应的产物在 425~600 nm 波长范围内无明显吸收(最高仅 0.03), 因此可排除木素对本方法中糖类分析结果的

干扰。

#### 2.4 方法的精度和准确性评价

由重复试验得知, 本方法测定戊糖和己糖的  $\epsilon_1^1$  和  $\epsilon_2^1$  ( $\epsilon_2^2$ ) 的相对标准偏差分别为 2.64% 和 5.83%。为验证本方法用来测定各糖含量的准确性, 本文采用已知各组分糖含量的混合糖溶液为基准进行评价, 其回收率结果如表 1 所示。

Table 1 Recovery rate of the sugars

样品 编号	总糖			木糖			葡萄糖		
	理论浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	实测浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	理论浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	实测浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/ %	理论浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	实测浓度/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/ %
1	1.28	1.29	100.9	0.704	0.704	100.5	0.580	0.589	101.5
2	1.50	1.49	99.5	0.700	0.695	99.3	0.800	0.797	99.6
3	1.55	1.57	101.2	0.600	0.600	100.0	0.950	0.968	101.9
4	1.10	1.09	99.3	0.600	0.606	101.0	0.500	0.487	97.4

注: 表中“理论浓度”为各种糖的实际浓度, “实测浓度”为采用本方法所测结果

表 1 中的结果表明, 采用本方法所测总糖、木糖和葡萄糖的回收率均较高为 97.4%~101.9%, 证明本方法可以实现对总糖和戊糖、己糖含量的准确测定。

法实现对戊糖和己糖含量的同时测定。该方法操作简单、快速, 可用于植物半纤维素提取液中糖类组分的分析, 特别适合于聚戊糖类半纤维素含量较高的阔叶木和禾本科植物。

### 3 结 论

本研究对传统的 Douglas 比色法进行改进, 采用双波长

#### 参 考 文 献

- [1] van Heiningen A. Pulp & Paper Canada, 2006, 107(6): 38.
- [2] Amidon T E. Pulp & Paper Canada, 2006, 107(6): 47.
- [3] Miller G L. Anal. Chem., 1959, 31: 426.
- [4] Scott T A, Melvin E H. Anal. Chem., 1953, 25: 1656.
- [5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Anal. Chem., 1956, 28: 350.
- [6] Douglas S G. Food Chem., 1981, 7: 139.
- [7] LI Xiao-hua, HE Lan-fang, CHANG Feng-mei, et al(李筱华, 何兰芳, 常凤眉, 等). Chinese Journal of Chromatography (色谱), 1987, 5(1): 4.
- [8] Cheetham N W H, Sirimanne P, Day W R. J. Chromatogr., 1981, 207: 439.
- [9] LIANG Li-na, ZHANG Ping, CAI Ya-qi, et al(梁丽娜, 张萍, 蔡亚岐, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2006, 34(10): 1371.
- [10] Lundquist K, Kirk T K. Tappi J., 1980, 63(1): 80.
- [11] CHEN Jia-xiang, YU Jia-luan(陈嘉翔, 余家鸾). Research Methods for the Chemical Structure of Plant Fibers(植物纤维化学结构的研究方法). Guangzhou: Publishing Company of South China University of Technology(广州: 华南理工大学出版社), 1989. 43.

## Rapid Determination of Sugars in Hemicellulose Extraction Liquor by Dual-Wavelength Spectrophotometry

CHI Cong-cong<sup>1</sup>, ZHANG Zeng<sup>1\*</sup>, CHAI Xin-sheng<sup>1, 2</sup>, GE Wei-wei<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Pulp & Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2. Institute of Paper Science and Technology, Georgia Institute of Technology, Atlanta GA 30332, USA

**Abstract** The traditional Douglas colorimetric method (phloroglucinol - glacial acetic acid colorimetry) could only be used to measure all forms of five-carbon sugars, including mono-, oligo- and poly- saccharides. Relative improvement is done on this method to achieve simultaneous determination of pentosan, hexosan and their monosaccharides, by the dual-wavelength method. Results indicate that 425 nm is the equal molar absorption wavelength of pentose and hexose, while 553 nm is the maximum absorption wavelength of pentoses. So the calculating formula has been greatly simplified based on the absorbance at 425 and 553 nm. The research results of interfering substances in the extraction liquor show that the lignin and glucuronic acid has no significant influence on the determination of pentoses or hexoses. It is concluded that this improved method has high precision and accuracy, and its recovery range is from 97.4% to 101.9%. Therefore, as a simple and rapid method, it is quite appropriate for measuring mixed sugars of pentoses and hexoses in the extraction liquor from hardwood or graminaceous plant.

**Keywords** Total sugars; Pentoses; Dual-wavelength spectrophotometry; Hemicellulose extraction liquor

(Received Apr. 26, 2009; accepted Jul. 29, 2009)

\* Corresponding author