

配位体交换色谱法测定槐米废渣水解液单糖成分

贾鹏禹¹, 孙蕊¹, 彭绪玲², 曹龙奎^{1*}¹黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319; ²赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100080

摘要: 利用生物质转化成糖研究近年来备受关注, 为给工业化高效利用槐米废渣提供检测技术, 本文建立了槐米废渣水解转化糖液中 4 种主要单糖的铅(Pb^{2+})配位体交换高效液相色谱分析方法并采用离子色谱法验证了方法的可行性; 实验比较了 Pb^{2+} 和 Ca^{2+} 两种不同柱内抗衡离子对组分分离的影响, 最终利用铅配体方法对实际样品进行了测试。方法分离柱采用 Sepax Carbomix Pb-NP 5(300 × 7.8 mm ID, 5 μ m, 8% 交联度)色谱柱, 柱温 75 $^{\circ}C$; 流动相采用超纯水, 流速 0.50 mL/min; 检测器采用示差折光检测器, 检测器温度为 30 $^{\circ}C$; 样品采用活性炭固相萃取小柱脱除色素。结果表明, 组分葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖在 25 min 内完成分离, 在 0.2 ~ 20.0 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系, 方法检测限在 1.94 ~ 1.98 μ g/mL 之间; 槐米废渣水解液中阿拉伯糖平均含量大于 67%, 具有较高回收价值。方法样品前处理简便, 重现性好, 结果准确, 测试成本低。

关键词: 配位体交换色谱; 单糖; 水解液; 废渣; 槐米

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.014

Determination of Monosaccharides in Hydrolysate from Flos Sophorae Residue by LEX-HPLC

JIA Peng-yu¹, SUN Rui¹, PENG Xu-ling², CAO Long-kui^{1*}

¹Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; ²Thermo Fisher Scientific Inc, Beijing 100080, China

Abstract: In recent years, conversion of biomass materials to monosaccharides has attracted significant attention. In order to develop testing techniques for efficient usage of Flos Sophorae residue, the determination method of 4 monosaccharides in hydrolysate from Flos Sophorae residue was established with lead(Pb^{2+}) ligand exchange high performance liquid chromatography (LEX-HPLC) and ion chromatography was used to verify the feasibility of this method. Influence of separation by different counterions (Pb^{2+} & Ca^{2+}) in column was investigated. The lead(Pb^{2+}) ligand exchange was applied in the actual samples detection finally. A Sepax Carbomix Pb-NP 5(300 × 7.8 mm ID, 5 μ m, 8% crosslinkage) column was used for the separation with ultrapure water as mobile phase. The flow rate of mobile phase was 0.50 mL/min at a column temperature of 75 $^{\circ}C$. Temperature of refractive index detector (RID) was 30 $^{\circ}C$. Samples were pretreated by solid phase extraction (SPE) with activated carbon to remove colorings. The results showed that the separation was achieved within 25 min. The calibration curve was linear in the mass concentration range of 0.2-20.0 mg/mL, the limit of detection (LOD) of glucose, xylose, galactose and arabinose were 1.94-1.98 μ g/mL, respectively. Content of arabinose in samples exceeded 67% and it had a high usage value. The method was simple, accurate, economical and reproducible.

Key words: LEX-HPLC; monosaccharide; hydrolysate; residue; flos sophorae

槐米(Flos Sophorae)为豆科槐属植物槐树的干燥花及花蕾,在我国长江、黄河及东北辽河流域多有生产,是提取芸香甙(芦丁)的重要药用原料^[1],2015年全球槐米产量为11.5万吨,美洲和欧洲是全球槐米主要产区,其中欧洲产量占总产量的

41.7%,美洲占23.9%。近几年随着我国医药行业的发展,槐米的产销量逐年增加,据统计2015年其医药工业用量在4500~5000吨之间。槐米在进行药用成分提取后剩下大量槐米废渣,其中含有大量半纤维素,以往只作为饲料或焚烧处理^[2]。初步的研究工作表明,槐米半纤维素水解转化糖液中含有大量阿拉伯糖,阿拉伯糖作为功能性甜味剂,在糖尿病人、肥胖人群食品和保健品中的市场空间巨大,目

收稿日期: 2016-09-12 接受日期: 2016-11-30

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2013GB2B200144); 黑龙江省教育厅面上项目(12541591)

* 通信作者 Tel: 86-459-2673853; E-mail: caolongkui2013@163.com

前国内生产阿拉伯糖主要用玉米芯、玉米皮、阿拉伯胶等为原料,采用酸水解、酶法、微生物法制备^[3]。作为重要的生物质原料,半纤维素转化成糖能够带来巨大的经济产值^[4,5],因此利用槐米废渣水解转化成糖既可弥补目前功能糖生产原料的不足,又可有效利用工业废弃物。同时模拟移动色谱技术(SMB)在单糖高纯分离方面取得了较大进步,利用工业级模拟移动色谱制备技术将解决功能糖精制的核心技术问题^[6,7]。

准确测定槐米废渣水解糖液中的单糖组分含量,是评价原料水解工艺的重要依据,也是确定模拟移动色谱装置运行参数以及评价分离液纯度的重要依据。同时,研究利用仪器分析技术测定单糖组成具有方法学意义。目前测定单糖组成方法有气相色谱法、液相色谱法和离子色谱法等,其中柱前衍生液相色谱法是目前较为主流的单糖测定方法^[8,9],但样品前处理过程较为繁琐。与之相比,离子色谱法无需衍生即可分离样品中的糖类化合物^[10],分离度好,检测灵敏度高,可完成几乎所有的单糖组分分离,是目前测定单糖最为先进的仪器方法之一,但其设备依赖性强,仪器价格昂贵,不适合工厂配备。配位体交换液相色谱法(ligand exchange chromatography, LEX)是同步测定样品中多种单糖、二糖和低聚糖较为新颖的方法^[11],该方法样品无需生化处理,流动相采用纯水,不消耗有机试剂,操作简单,测试成本低廉,适合工厂化检测。本文利用铅配体交换分离模式,配以固相萃取样品前处理方法,检测了槐米废渣水解转化糖液及小试级模拟移动色谱分离液中4种主要单糖含量,建立了铅配体交换-示差折光检测高效液相色谱方法,所建检测方法收到了满意的结果,可为槐米废渣转化并精制单糖工艺提供准确数据。

1 材料与仪器

1.1 材料

槐米废渣水解转化糖液由实验室自制,废渣经硫酸高温高压或辅以微波-超声协同水解工艺后,经离子交换、脱色和浓缩等处理获得;色谱分离液由实验室研发的小试级模拟移动色谱(型号:SSMB-9Z9L 教育部粮食副产物加工与利用重点实验室)分离出口接收获得;固相萃取小柱(Supelclean ENVI-Carb 活性炭,500 mg/6mL,美国 Supelco 公司)。

1.2 试剂

葡萄糖(批号:G0141015053)、木糖(批号:X0141126041)、半乳糖(批号:G0150102003)、阿拉伯糖(批号:A0150416089)和果糖(批号:F0150918044)均为色谱标准品,纯度均 $\geq 99\%$ (美国西格玛奥德里奇公司);实验所用乙腈为色谱纯(美国 Fisher Scientific)、水为超纯水(Milli-Q)。

1.3 仪器

高效液相色谱仪(型号:1200 美国安捷伦公司),配备:四元梯度泵、示差折光检测器、恒温自动进样器、在线脱气机、柱温控制单元、Chemstation 色谱工作站;离子色谱仪(型号:ICS5000 + 美国赛默飞世尔科技公司),配备:带有真空脱气单元的 DP/SP 的四元梯度泵、DC 色谱柱箱、脉冲积分安培检测器、自动进样器、Chromeleon 7.0 数据采集系统;电子分析天平(型号:ML104 感量:0.0001 g 瑞士梅特勒托利多公司);超纯水系统(型号:Milli-Q Reference 美国默克密理博公司);固相萃取装置(美国沃特世公司);微波-超声萃取仪(型号:CW2000 上海新拓分析仪器科技有限公司);手持式电导率仪;手持式糖度计。

2 实验方法

2.1 离子色谱法对槐米废渣水解液单糖组成的定性分析

2.1.1 样品前处理方法

取槐米废渣水解液样品,加水稀释 1000 倍,过 0.22 μm 水性滤膜,滤液直接上机检测。

2.1.2 离子色谱条件

分析柱:CarboPac PA20 3 \times 250 mm,配备同系保护柱 CarboPac PA20 3 \times 50 mm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.40 mL/min;流动相采用梯度洗脱模式,流动相 A(NaOH)在 20 ~ 25 min 内由 6 mmol/L 线性增至 100 mmol/L 并保持至 50 min,流动相 B(NaAc)在 25 ~ 35 min 内由 0 mmol/L 线性增至 100 mmol/L 并保持至 50 min;检测器:脉冲积分安培检测器,电极 Au,参比电极 Ag/AgCl;检测器电位波形:糖四电位波形;进样体积:10 μL 。

2.1.3 定性方法

标准品保留时间定性。

2.2 配位体交换液相色谱法测定槐米废渣水解液中单糖

2.2.1 标准溶液配制与标准工作曲线绘制

精密称取葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和果糖标准品各 0.2000 g,用超纯水定容至于 100 mL 容量瓶中,配制成各单糖的混合标准品储备溶液,再逐级稀释为标准工作曲线系列溶液。标准溶液经 0.22 μm 的水相滤膜过滤后上机分析,以各组分浓度对应峰面积做回归方程并绘制标准工作曲线。

2.2.2 样品前处理

取槐米废渣水解液样品 0.2 mL 用纯水稀释后定容至 100 mL,取稀释液 5 mL 加入活化好的固相萃取小柱(500 mg/6mL)内。在负压下保留流出液,流出液经 0.22 μm 的水相滤膜过滤后上机分析。

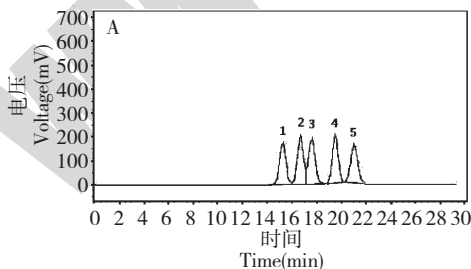
2.2.3 液相色谱条件与定量分析方法

色谱柱一:Sepax Carbomix Ca-NP 5(300 \times 7.8 mm ID,5 μm ,8% 交联度),配同系保护柱 Carbomix Ca-NP 5(50 \times 7.8 mm ID,5 μm ,8% 交联度);色谱柱二:Sepax Carbomix Pb-NP 5(300 \times 7.8 mm ID,5 μm ,8% 交联度),配同系保护柱 Carbomix Pb-NP 5(50 \times 7.8 mm ID,5 μm ,8% 交联度);流动相:超纯水;流速:0.50 mL/min;经典柱压:23 ~ 30 Bar;色谱柱一温度:80 $^{\circ}\text{C}$,色谱柱二温度:75 $^{\circ}\text{C}$;示差检测器温度:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。标准品保留时间定性,面积归一化法、外标法定量。

3 结果与讨论

3.1 离子色谱法对槐米废渣水解液中单糖的定性分析结果

利用色谱法进行未知样品中组分分析,一般采用不同分离模式或采用与质谱联用的方式进行组分



1-葡萄糖 2-木糖 3-半乳糖 4-阿拉伯糖 5-果糖
1-glucose 2-xylose 3-galactose 4-arabinose 5-fructose

图2 标准品(A)与样品(B)的配位体交换色谱图

Fig. 2 Ion chromatogram of mixed standards(A) and sample(B)

3.3 抗衡离子的比较和选择

配位体交换色谱法所用分析柱由加载不同抗衡

定性,离子色谱法是目前公认的单糖和寡糖分离较为先进的方法,采用离子色谱分离结合高灵敏度的脉冲安培检测器进行未知样品的单糖组成分析能够全面验证单糖组分避免组分遗漏。在 2.1.2 的梯度条件下,通过标准品保留时间定性,水解液样品中阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖等组分实现了较好分离,样品中主要单糖为阿拉伯糖和木糖,这两种单糖主要来源于半纤维素水解,由此验证了槐米废渣中主要以半纤维素为主,样品的离子色谱图见图 1。

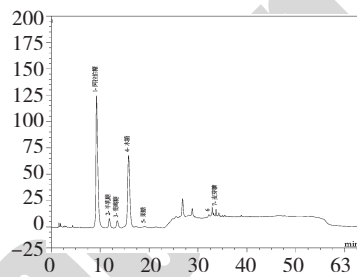
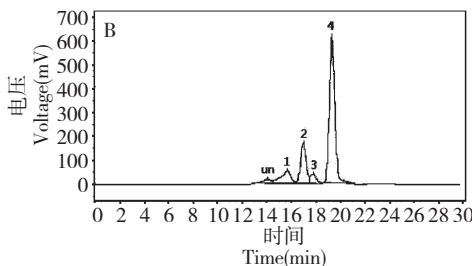


图1 槐米废渣水解液样品的离子色谱检测谱图

Fig. 1 Ion chromatograms of hydrolysate from Flos Sophorae residue

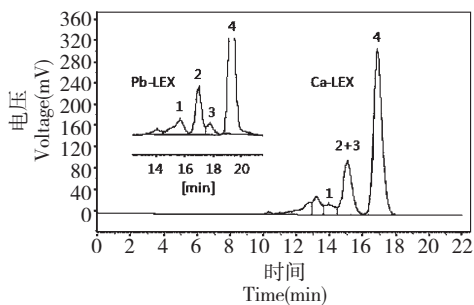
3.2 配位体交换色谱测定槐米废渣水解液中单糖的方法适应性考察

实验考察了配位体交换色谱法对标准品和实际样品中目标组分的分离情况,由图 2 可见,混合标准品组分分离情况良好,其中葡萄糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖和果糖分别在 15.6、16.8、17.7、19.2 min 和 20.9 min 处洗脱,实际样品目标组分峰位无干扰;上述结果与离子色谱法的组分定性结果相一致,说明能够满足槐米废渣水解样品的分析。



离子的阳离子交换树脂填料填充,并通过不同抗衡离子调节对组分的选择性,因此选择合适的抗衡离

子是决定分离的关键。通常 Ca^{2+} 和 Pb^{2+} 是分离单糖或二糖的两种重要选择性离子,实验比较了 Ca^{2+} 和 Pb^{2+} 两种抗衡离子对实际样品中目标组分的分离效果,样品在相同色谱条件下分离情况如图 3 所示,由主图可见 Ca^{2+} 配位体交换无法分离木糖与半乳糖,与小图 Pb^{2+} 柱样品分离状况相比,其在目标物分离优势上较 Pb^{2+} 柱差。由于半乳糖在木糖分离液结晶过程中有不利影响,需要对其含量准确测定,因此鉴于 Pb^{2+} 柱对实际样品分离中的优势,本实验最终采用铅(Pb^{2+})柱分离;另外考虑到分离柱以水为流动相运行压力的耐受性,实验选择了刚性更强的 8% 高交联度树脂。



1-果糖 2-木糖 3-半乳糖 4-阿拉伯糖

1-glucose 2-xylose 3-galactose 4-arabinose

图 3 Ca-LEX 和 Pb-LEX 分离色谱图

Fig. 3 Ion chromatograms of Ca-LEX and Pb-LEX

3.4 流动相与柱温条件的优化

配位体交换在进行单糖混合物分离时,流动相(水)和糖类化合物与抗衡离子间均存在配位引力,在分离时流动相与单糖组分竞争抗衡离子,进而洗脱单糖组分,由于各单糖与金属离子的吸引力不同产生了分离,也有文献报道在流动相中添加少量乙

睛可改善分离^[11,12],其作用机理一方面可能是其减弱了流动相的洗脱能力,另一方面可能是乙睛使聚合物填料充分溶胀增加了作用面积;流动相流速通常选择在 0.30 ~ 0.80 mL/min 之间,实验表明,采用较低流速可增加色谱分离度,但采用过低的流速延长了测试时间,故本实验选择流动相流速为 0.50 mL/min。

配位体交换分离单糖类化合物需要在较高的色谱柱温度(一般 55 ~ 80 °C)下进行,高温降低了流动相水的粘度,使得系统运行压力较低,不易损坏色谱柱填料;另外柱温提高可以避免糖发生旋光现象^[12]和色谱峰裂分。由于色谱柱温在达到工作温度时需要一定的时间,因此在检测前需要先采用较低流速(0.10 mL/min)充分预热色谱柱,待色谱柱达到工作温度后在逐步提高流速。

3.5 样品前处理

在分析测试之前,槐米废渣水解转化糖液样品经历了如下工艺过程:废渣在硫酸水解作用下转化成糖化液,糖化液通过压滤去除残渣、活性炭脱色、阴阳离子交换、蒸发浓缩等步骤得到待精制的糖液。实验所用待测样品中含有一定量因浓缩产生的焦糖色素,为避免色素等干扰物对色谱柱造成的损害,实验采用固相萃取技术进行样品处理,样液在负压下被迫穿透活性炭固相萃取小柱,此时色素被活性炭吸附保留,目标物不受保留被接收出来进行色谱分析。

3.6 回归方程、线性范围与检测限

实验对 4 种主要单糖进行线性范围考察,根据色谱峰面积 Y 对各单糖浓度 X 进行线性回归,依据三倍噪声计算检测限,结果见表 1。由表可知,方法线性关系良好,线性范围宽,灵敏度较高。

表 1 线性回归方程

Table 1 Linear regression equations

组分 Component	回归方程 Linear regression equation	线性范围 Linear range (mg/mL)	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	检出限 LOD ($\mu\text{g/mL}$)
葡萄糖 Glucose	$Y = 0.987 X + 0.98$	0.2 ~ 20.0	0.9998	1.96
木糖 Xylose	$Y = 1.037 X + 0.53$	0.2 ~ 20.0	0.9996	1.94
半乳糖 Galactose	$Y = 0.956 X + 0.24$	0.2 ~ 20.0	0.9997	1.97
阿拉伯糖 Arabinose	$Y = 1.011 X + 0.96$	0.2 ~ 20.0	0.9999	1.98

3.7 方法精密度和回收率

实验考察了方法精密度的,等量取样品 6 份,分别按照 2.2.2 流程进行前处理,进样 6 次,根据各组分

峰面积计算相对标准偏差,葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖的精密度的 ($RSD, n = 6$) 分别为:2.63%、2.54%、2.83% 和 2.76%,相对标准偏差均小于

4.6%,方法的稳定性较高;实验采用实际样品中定量加入标准物的方式进行了回收率实验,采用外标法定量,测得4种单糖平均回收率在98.9%~101.6%之间,前处理方法回收率效果良好。

3.8 样品测试结果

实验采用峰面积归一化和外标定量方法对4种不同水解处理工艺的槐米废渣转化糖液以及SSMB色谱分离液中葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖百分

含量及总糖含量进行了检测,每组处理重复3次,结果取平均值,见表2。结果表明,槐米废渣转化糖液中含有超过67%的阿拉伯糖和超过17%的木糖;不同处理工艺对水解液的单糖组成影响较小,但对总糖含量影响较大,微波-超声辅助水解液的总糖含量较一般酸水解提高12%;通过实验室小试级模拟移动色谱回收可得到高纯阿拉伯糖和木糖,槐米废渣具有较高的回收利用价值。

表2 样品测定结果

Table 2 Content determination results of samples

样品 Samples	葡萄糖 Glucose (%)	木糖 Xylose (%)	半乳糖 Galactose (%)	阿拉伯糖 Arabinose (%)	总糖 Total sugar (mg/mL)
酸水解 Acid hydrolysis	9.61	17.87	4.31	68.21	32.07
微波辅助 Microwave-assisted	9.23	17.98	4.57	68.22	34.45
超声辅助 Ultrasonic-assisted	9.36	18.21	4.82	67.61	33.94
微波-超声协同辅助 Microwave and ultrasonic-assisted	9.21	18.56	4.58	67.65	35.93
SSMB收集液 ASSMB collecting sample A	10.46	85.66	3.88	ND	43.67
SSMB收集液 BSSMB collecting sample B	ND	7.62	ND	92.38	115.89

4 结论

本文通过铅配位体交换示差折光检测高效液相色谱实现了槐米废渣水解转化糖液中葡萄糖和木糖等4种主要单糖的分离和含量的测定,通过离子色谱法验证了所建立方法具有较高的准确性,方法样品前处理采用活性炭固相萃取小柱除去样品基体中色素干扰物,方法简便易操作,重现性好;此法可为以槐米废渣为原料生产阿拉伯糖、木糖等功能糖工艺过程的控制提供准确的测试数据,仪器耗材投入小,检测成本低廉无试剂污染,适合企业车间化验室应用。此方法色谱系统中检测器可采用灵敏度更高的蒸发光散射(ELSD)作为检测器以提高方法灵敏度。

参考文献

- Pan YM(潘英明),Liang Y(梁英),Zhu ZR(朱志仁),*et al.* Study on extraction and activity of antioxidant components from *Sophra japonica* L. *Chem Ind Forest Prod*(林产化学与工业),2007,27(2):41-44.
- Liu YQ(刘艳琴),Li DW(李多伟),Li YF(李银芳),*et al.* The production technology research about using *Sophora japonica* fermentation from liquid to solid production of live-stock. *Genomics Appl Biol*(基因组学与应用生物学),2015,34:787-791.

- He L(何丽),Man QQ(满青青),Qiu ZL(仇芝林),*et al.* Effects of L-arabinose on growth and carbohydrate, lipid metabolism in wistar rats with normal feeding and high-sucrose and high-fat feeding. *Chin J Food Hygiene*(中国食品卫生杂志),2009,21:406-409.
- Tong YF(佟毅夫),Gong XW(龚晓武),Li Y(李勇),*et al.* Hydrolysis of cotton stalk for fermentable sugars in dilute sulfuric acid. *J Shihezi Univ, Nat Sci*(石河子大学学报:自然科学版),2015,33(1):22-25.
- Sun ZJ(孙振钧). Biomass industry and its developmental trends in China. *Trans CSAE*(农业工程学报),2004,20(5):1-5.
- Li LY(李良玉),Sun R(孙蕊),Li CY(李朝阳),*et al.* Purification of xylitol mother liquid using sequential simulated moving bed chromatography. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2015,27:1789-1793.
- Lei GH(雷光鸿),Jiang Y(姜毅),Wei CH(魏承厚),*et al.* Application on separation of bagasse pith extract to produce L-arabinose and D-xylose by simulate moving bed chromatography. *Food Sci Technol*(食品科技),2015,40:214-217.
- Lin X(林雪),Wang ZF(王仲孚),Huang LJ(黄琳娟),*et al.* An improved PMP derivatization method for analyzing monosaccharide composition. *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报),2006,27:1456-1458.