

# 高效液相色谱法检测发酵液中木糖和木糖醇

方宏, 曾健智, 张厚瑞

(广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西桂林 541006)  
中国科学院

**摘要:** 建立高效液相色谱检测发酵液中木糖和木糖醇含量的分析方法。色谱柱为 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相为乙腈—水(80 : 20), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 示差折光检测器检测。木糖和木糖醇在 3.0~60 mg·mL<sup>-1</sup> 范围内, 峰面积与其浓度线性关系良好( $r=0.9995$ ); 平均回收率分别为 96.07%( $n=5$ ,  $RSD=0.51\%$ )和 97.47%( $n=5$ ,  $RSD=1.13\%$ )。方法简便、快速、准确。

**关键词:** 木糖; 木糖醇; 发酵; 高效液相色谱

**中图分类号:** Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)03-0275-03

## Determination of xylose and xylitol in fermentation broth by high performance liquid chromatography

FANG Hong, ZENG Jian-zhi, ZHANG Hou-rui

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China)

**Abstract:** A method for the determination of xylose and xylitol in fermentation broth by high performance liquid chromatography is described. The operating conditions were Hypersil NH<sub>2</sub> column(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm) at 35 °C and differential refractive index detector. Mobile phase was acetonitrile-water(80 : 20; volume ratio) and the flow-rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The linear range was 3.0 mg·mL<sup>-1</sup> to 60.0 mg·mL<sup>-1</sup>, the correlation coefficient was 0.9995. The corresponding average recoveries were 96.07%( $n=5$ ,  $RSD=0.51\%$ ) and 97.47%( $n=5$ ,  $RSD=1.13\%$ ) respectively. The method is simple, rapid and accurate.

**Key words:** xylose; xylitol; fermentation process; high performance liquid chromatography

木糖醇为白色结晶粉末, 易溶于水, 其甜度相当于蔗糖, 热量相当于葡萄糖。木糖醇在人体内代谢无需胰岛素参与, 不会引起血糖水平波动, 可作为糖代谢异常患者的糖代品(郑建仙, 1995); 木糖醇还有特殊的防龋功能, 应用于口香糖、果汁、糕点和冰淇淋等食品中, 受到了消费者的欢迎。

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(孙昆山等, 2001), 但距工业化应用还有一段距离, 在大量的实验工作中, 快速、准确地

测定木糖及其转化产物木糖醇的含量, 对于木糖醇高产菌株的筛选, 发酵工艺的优化都十分必要。有关含量测定中的比色法(Deschatelets 和 Yu, 1986; Song 和 Arnold, 1977), 专属性差, 准确度低; 气相色谱法(中国食品添加剂生产应用工业协会, 1999)选择性高, 灵敏度也高, 但糖类分子间引力较强, 挥发性弱, 遇热又不稳定, 不能直接用气相色谱分析, 必须制成易挥发的衍生物, 操作繁琐。液相色谱分析糖类化合物已有许多报道(刘云惠, 2000; Clement

收稿日期: 2003-06-20 修订日期: 2003-09-24

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(9811015)

作者简介: 方宏(1957-), 女, 浙江黄岩人, 实验师, 应用化学专业, 从事植物化学分析。

等,1992),但同时测定糖和糖醇的报道较少。本文采用氨基键合分析柱,用高效液相色谱检测发酵液中的木糖和木糖醇,获得了良好的分离,方法简便、快速、准确。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪:410 示差折光检测器,510 高压泵,U<sub>6K</sub> 手动进样器,Baseline 810 色谱工作站。D-木糖(D-xylose,生化试剂,上海试剂二厂);木糖醇(xylitol,SIGMA 公司);乙腈(色谱纯,0.5 μm 滤膜过滤),甲纯(分析纯),重蒸水(0.5 μm 滤膜过滤)。

### 1.2 色谱条件

检测器:Waters 410 示差折光检测器;色谱柱:

Hypersil NH<sub>2</sub>(4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm, 大连依利特公司);柱温:35 °C;流动相:V(乙腈):V(水)=80:20;流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL。

### 1.3 样品的制备

菌种:热带假丝酵母菌(*Candida tropicalis* AS 2.177 6)。种子培养基:1%葡萄糖,2%木糖,1.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.3% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1% 酵母膏,30 °C 恒温,200 r/min 摇床培养 12 h。发酵培养基:15% 木糖,1.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.3% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,1% 酵母膏,在 250 mL 锥形瓶中装入 25 mL 发酵培养基,灭菌后接入 1 mL 种子液,30 °C,200 r/min 摇床培养。间隔 6 h 取一次样,每次取 2 mL 发酵液(至木糖消耗完停止取样),离心去除菌体,上清液加入 2 mL 甲醇,再离心去除沉淀,将上清液移至 5 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇定容至刻度。供高效液相色谱检测。

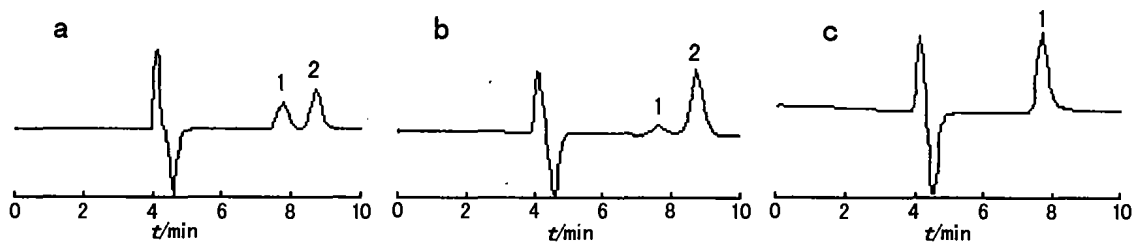


图 1 标准品和样品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the standard and the samples

a. 标准品; b. 样品(发酵); 样品(未发酵); 1. 木糖; 2. 木糖醇。

a. Standard; b. Sample(fermentation broth); c. Sample(no fermentation broth); 1. xylose; 2. xylitol.

## 2 结果与讨论

### 2.1 分析条件的选择

2.1.1 色谱条件的选择 在高效液相色谱分析中,用于糖类检测的糖分析专用柱,价格昂贵;普通氨基键合分析柱,也能用于单糖和双糖的检测,价格较为便宜。因此我们采用氨基键合分析柱,对甲醇-水、乙腈-水二元溶剂系统的分离情况分别进行考察,结果前者木糖和木糖醇的组分峰重叠,较难分离;后者分离情况较前者为好,以流动相乙腈:水=80:20(V/V)时,达到了较好的基线分离效果(图 1)。

2.1.2 柱温对分离的影响 柱温对分离的影响(图 2),从图 2 可见,在选定的条件下,以柱温 30 °C 时分离最佳,达到基线分离;35 °C 时接近基线分离,其分离度接近理想测定要求。考虑到南方春、夏、秋季

气温较高,为了便于在室温的环境下操作,我们选择 35 °C 进行检测。

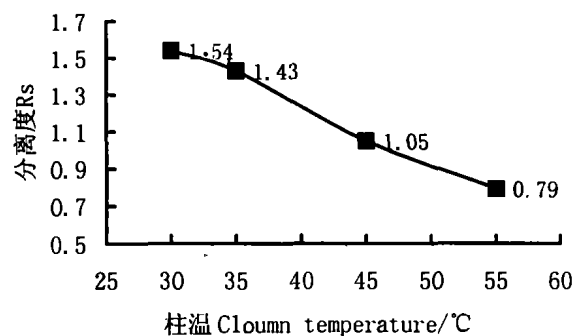


图 2 柱温对分离度的影响

Fig. 2 Effect of column temperature on resolution

2.1.3 制样溶液的选择 木糖和木糖醇易溶于水,微溶于甲醇、乙腈。以木糖做溶解试验,20 °C 时,在 1 mL 80% 乙腈水溶液中加入 20 mg 木糖,可完全

溶解;若加入 30 mg 木糖,会因溶解不完全使溶液呈现上、下层的分层现象,故不宜用流动相配制样品。若以水溶液直接进样,发酵液中的水溶性杂质也同时进入分析色谱柱,滞留在柱中,污染柱子,影响柱寿命。因此必须选择合适溶剂来配制样品,经实验,20 ℃时,1 mL 50% 甲醇水溶液中加入 250 mg 木糖,可完全溶解,以此溶液配制样品,发酵液中的部分水溶性杂质可沉淀除去。另外,木糖醇在 50% 甲醇水溶液中的溶解能力稍大于木糖,故我们选择 50% 甲醇水溶液制样,可有效地保护色谱柱,延长柱寿命。

## 2.2 线性关系试验

准确称取 D-木糖,木糖醇对照品各 3.000 0 g,置于 50 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL,置 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇定容至刻度,即得混合对照品系列溶液。分别取上述溶液 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,以峰面积 A( $\mu$ V·S)为纵坐标,质量浓度 C(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标进行线性回

归,结果表明:木糖和木糖醇在 3.0~60 mg·mL<sup>-1</sup> 范围内,峰面积与其浓度线性关系良好。

木糖:  $C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = 0.6427 + 8.6978 \times 10^{-5} \times A$ ,  $r = 0.9997$ 。

木糖醇:  $C(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = 0.9349 + 6.362 \times 10^{-5} \times A$ ,  $r = 0.9995$ 。

以两倍噪音计算最小检测量分别为 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> 和 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>。

## 2.3 回收率试验

精密吸取供试样品溶液 1.0 mL(已知木糖、木糖醇含量),置于 5 mL 容量瓶中,共取 5 份,准确加入混合对照品溶液 1.0 mL,50% 甲醇定容至刻度,摇匀。离心过滤,上清液按照(1.2)项的色谱条件测定,结果见表 1。

## 2.4 精密度和稳定性试验

取一个供测试的样品溶液,按照上述色谱条件进样检测,重复测定 5 次,木糖和木糖醇的 RSD 值分别为 0.54% 和 0.33%。将样品放置 2、6、24 h,再进样检测,结果峰面积基本不变,表明 24 h 内溶液稳定。

表 1 回收率试验结果(n=5)

Table 1 Analytical results of recovery test(n=5)

样品 Sample	木糖 Xylose				木糖醇 Xylitol			
	加入量 Added(mg·mL <sup>-1</sup> )	测得量 Found(mg·mL <sup>-1</sup> )	回收率 Recovery(%)	RSD (%)	加入量 Added(mg·mL <sup>-1</sup> )	测得量 Found(mg·mL <sup>-1</sup> )	回收率 Recovery(%)	RSD (%)
1	12.00	11.60	96.67		12.00	11.66	97.17	
2	12.00	11.56	96.33		12.00	11.84	98.67	
3	12.00	11.54	96.17	0.51	12.00	11.83	98.58	1.13
4	12.00	11.44	95.33		12.00	11.53	96.08	
5	12.00	11.50	95.83		12.00	11.62	96.83	

表 2 样品测定结果

Table 2 Analytical results of samples(g·L<sup>-1</sup>)

组分 Component	发酵时间 Fementation time(h)							
	0	18	24	30	36	42	48	54
木糖 Xylose	150.00	123.14	95.40	70.40	60.51	35.77	11.62	0.00
木糖醇 Xylitol	0.00	6.50	23.45	45.00	49.75	67.85	87.97	95.00

## 2.5 样品含量测定

取(1.3)项下制备的待测样品溶液,按(1.2)项下的色谱分析条件进行检测,结果见表 2。从表 2 可知,在选定的实验条件下,随着发酵时间的增加,木糖的质量浓度逐渐下降,木糖醇的质量浓度逐渐上升,体现了微生物发酵过程中,木糖向木糖醇转化的实际规律。

## 3 结 论

示差折光检测器用于检测无紫外吸收的糖类化合物,样品无需衍生处理,过滤后,便可以直接进样检测。本文采用氨基分析柱分离发酵液中的木糖和(下转第 198 页 Continue on page 198)

trum)、瑞香(*Daphne*)、重楼属(*Paris*)等。东亚分布及其变型的属共有 125 个,其中典型东亚分布属有 43 个,如猕猴桃属(*Actinidia*),五加属(*Acanthopanax*)、三尖杉属(*Cephalotaxus*)、蓬莱藤属(*Gardneria*)、茵芋属(*Skimmia*)、旌节花属(*Stachyurus*)等。中国—喜马拉雅分布变型有 66 个属,如射干属(*Belamcanda*)、南酸枣属(*Chorospondias*)、藤漆属(*Pegia*)、石海椒属(*Reinwardtia*)、扁核木属(*Prinsepia*)、猫儿屎属(*Decaisnea*)、蓝钟花属(*Cyananthus*)等。中国—日本分布变型有拐枣属(*Hovenia*)、鬼灯檠属(*Rodgersia*)、枫杨属(*Pterocarya*)等。

中国特有属仅有 25 个,如通脱木属(*Tetrapanax*)、巴豆藤属(*Craspedolobium*)、牛筋条属(*Dichotomanthes*)、银鹊树属(*Tapiscia*)、大血藤属(*Sargentodoxa*)等。

热带成分(类型 2~7)合计共占总属数的 68.2%,构成该植物区系的主体,因此,该植物区系仍属于热带性质的植物区系。同时该植物区系中又含有丰富的温带成分(类型 8~14),共有 406 属,占总属数的 29.94%,表明了该植物区系具有热带向亚热带的过渡性。该植物区系中热带亚洲成分是最为优势的成分,占总属数的 25.08%,故该植物区系受热带亚洲植物区系的渗透和强烈影响,属于热带亚洲植物区系的北部边缘部分,在世界植物区系分区上仍应属于热带亚洲植物区系。我们的研究结果

支持吴征镒把该地区作为古热带植物区,马来西亚亚区中的滇—緬—泰地区(Wu 等,1996)。

#### 参考文献:

- 包士英,毛品一,苑淑绣. 1998. 云南植物采集史略[M]. 北京: 中国科学技术出版社.
- 李恒,郭辉军,刀志灵. 2000. 高黎贡山植物[M]. 北京: 科学出版社.
- Audley-Charles MG. 1987. Dispersal of Gondwanaland: Relevance to evolution of the Angiosperms[A]. In: Whitmore TC (ed). Biogeographical Evolution of the Malay Archipelago[C]. Oxford: Clarendon Press.
- Metcalfe I. 1998. Palaeozoic and Mesozoic geological evolution of the SE Asia region: multidisciplinary constraints and implications for biogeography[A]. In: Hall R, Holloway JD (eds). Biogeography and Geological Evolution of SE Asia[C]. Leiden: Backbuys Publishers, 25-41.
- Morley JR. 1998. Palynological evidence for Tertiary plant dispersals in the SE Asian region in relation to plate tectonics and climate[A]. In: Hall R, Holloway JD (eds). Biogeography and Geological Evolution of SE Asia[C]. Leiden: Backbuys Publishers, 221-234.
- Myers N. 1998. Threatened biotas: Hotspot in tropical forests[J]. *Environmentalist*, 8(3): 1-20.
- Wu ZY, Wu SG. 1996. A proposal for a new floristic kingdom(realm)[A]. Proceedings of the IFCD[C]. CHEP & Springer Press, 3-42.

(上接第 277 页 Continue from page 277)

木糖醇,一次进样 10 min 即完成色谱分离过程,具有分离效果好,分析速度快,操作简便的优点,最为适合检测只需分离木糖和木糖醇的样品。

#### 参考文献:

- 中国食品添加剂生产应用工业协会. 1999. 食品添加剂分析检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 364-365.
- 郑建仙. 1995. 功能性食品(第一卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 100-108.
- Clement A, Yong D, Brechet C. 1992. Simultaneous identification of sugars by HPLC using evaporative light scattering detection and refractive index detection Application to plant tissues[J]. *J Liq Chromatogr*, 15(5): 805-807.
- Deschatelets L, Yu EKC. 1986. Simple pentose assay for bi-

omass nonversion studies[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 24(5): 379-385.

- Liu YH(刘云惠). 2000. Separation and determination of monosaccharides using internal standard method(高效液相色谱内标法分离和测定植物中的单糖)[J]. *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*, 18(6): 556-558.
- Song HB, Arnold LD. 1977. An improved colorimetric assay for polyols[J]. *Anal Biochem*, 81(1): 18-20.
- Sun KS(孙昆山), Wu MB(吴绵斌), Xia LM(夏黎明). 2001. Recent progress of xylitol bio-conversion with renewable hemicellulose resource(利用可再生纤维素资源生物转化木糖醇的研究进展)[J]. *Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)*, 27(9): 74-78.