

研究论文

# 一种用紫外光谱测定混合糖含量的新方法

胡湛波<sup>1,2</sup>, 王景全<sup>2</sup>, 柴欣生<sup>3</sup>, 孔海南<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; <sup>2</sup> 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004;

<sup>3</sup> 佐治亚理工大学造纸研究所, 亚特兰大 GA 30332, 美国)

**摘要:** 提出一种用紫外光谱测定样品中混合糖含量的方法。其原理是基于样品中的糖经浓硫酸处理后生成有紫外吸收的糠醛和羟甲基糠醛, 进行紫外波长吸收测定; 通过化学计量学软件, 根据一组已知糖浓度标准样品的多波长光谱和所对应组成浓度之间的数学关系, 建立校正模型。将未知样品的紫外光谱信息输入校正模型即可预测其组成中糖的含量。本方法无需使用有机试剂, 操作简便, 可以测定样品中戊糖、己糖和总糖的含量, 适合于木质生物质炼制研究中溶解性糖类组分的分析。

**关键词:** 紫外光谱; 混合糖; 化学计量学; 生物炼制; 木质生物质

中图分类号: O 629.1; O 657.32

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 05-1233-05

## A novel method for determination of sugars by UV spectroscopy

HU Zhanbo<sup>1,2</sup>, WANG Jingquan<sup>2</sup>, CHAI Xinsheng<sup>3</sup>, KONG Hainan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

<sup>2</sup> School of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China;

<sup>3</sup> Institute of Paper Science and Technology, Georgia Institute of Technology, GA 30332, Atlanta, USA)

**Abstract:** A simple UV spectroscopic method for determination of sugars was developed. Calibration models were established by the spectral measurement of a set of hydrolyzed standard sugar solutions by treating with concentrated sulfuric acid and a chemometrical software. The sugar contents in the sample can be predicted with the models by using the multi-wavelength spectral signals of its hydrolyzed solution. The present method does not need organic reagents and can provide the information of pentoses, hexoses, and total sugars in samples, and is suitable to be used for sugar analysis of the lignocellulosic biomass extraction process in bio-refinery research.

**Key words:** UV spectroscopy; sugars; chemometrics; bio-refinery; lignocellulosic biomass

## 引 言

当前世界各国都在大力发展生物质能, 生物炼制成为世界各国的战略研究方向<sup>[1]</sup>。而从木材以及非木材植物的木质生物质中提取纤维素和半纤维素碳水化合物, 通过酶或其他方式将纤维素和半纤维

素降解为相应的单糖经发酵生产燃料乙醇或其他化工产品, 是该领域研究的重点之一<sup>[2-4]</sup>。在木质生物质提取可溶性纤维素和半纤维素的分离过程中, 快速、准确测定水解液中最终降解为戊糖(以木糖为主)和己糖(葡萄糖), 以及总糖含量(即总的可溶性碳水化合物含量)信息, 对于确定各类木质

生物质原料的选择和优化抽提工艺条件尤为重要。

传统的糖类组分分析方法相当多,如只能测定总还原糖而不能测定各种单一糖含量的菲林法和 3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)<sup>[5-6]</sup>,能检测出多种糖的蒽酮法<sup>[7]</sup>和总糖含量的硫酸-苯酚法<sup>[8-10]</sup>,专测某一种糖的生物酶法<sup>[11-12]</sup>。其中,生物酶法使用的酶试剂价格昂贵,分析成本高;而一些采用所有有机物(如苯酚)作为反应显色剂的方法,由于有机物具有一定毒性,在实验操作上存在安全方面要求。以上这些方法通常实验步骤烦琐,其测定准确性和可靠性不高。

采用现代仪器手段的糖类分析方法中,主要是气相色谱法和高效液相色谱法。气相色谱法需对单糖做衍生化处理,得到具有挥发性的衍生物,从而对气体进行分析<sup>[13]</sup>。由于糖在溶液中的异构化,使分析时色谱得不到单峰,同时有些衍生物不稳定,给组分定性和定量带来困难<sup>[14]</sup>。高效液相色谱法被公认为是测定糖含量的最好手段<sup>[15-16]</sup>,它能对测定样品中的单糖、低聚糖、多糖进行有效分离检测。但高效液相色谱法所使用的糖分析专用柱价格昂贵,仪器操作和维护成本很高。

本研究目的是建立一种基于紫外光谱测定并结合化学计量学进行校正,无需使用有机试剂的简便测定糖含量的方法。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:安捷伦 8453 型紫外可见分光光度计(1 cm 石英比色皿),30 ml 离心试管,恒温水浴锅。

化学计量学软件:SMICA(Umetrics AB, Sweden)。

试剂:D-葡萄糖(AR)、D-木糖(BR,含量>99%)、浓硫酸(AR,98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,相对密度 1.84)。

### 1.2 实验方法与步骤

1.2.1 标准溶液的配制 配制一组共 14 个已知(随机)浓度的木糖和葡萄糖混合糖的水溶液。其中木糖的浓度变化范围为 0~0.057 mol·L<sup>-1</sup>;葡萄糖的浓度变化范围为 0~0.057 mol·L<sup>-1</sup>;总糖含量变化范围为 0.0115~0.057 mol·L<sup>-1</sup>。

1.2.2 糖的浓硫酸脱水处理 用移液管分别准确移取 1 ml 糖标准溶液加入不同的 30 ml 试管中。再用移液管向每个试管准确加入 5 ml 浓硫酸,摇

匀后静置 10 min,放入 25℃ 水浴恒温 20 min,使糖在浓硫酸作用下脱水反应完全。

1.2.3 浓硫酸处理后糖溶液的紫外光谱测定 用 1 cm 的石英比色皿,分别测定上述浓硫酸处理后糖溶液的紫外光谱,扫描范围为 190~400 nm,记录全部吸光度值。

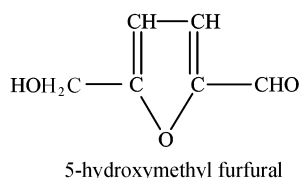
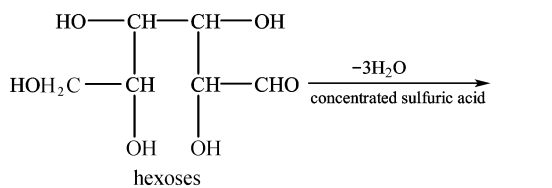
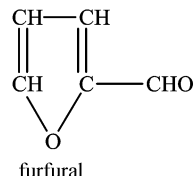
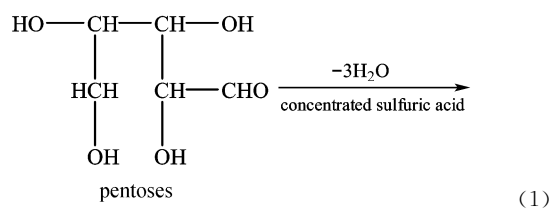
1.2.4 方法的校正 将上述测定的光谱值以及所对应的木糖和总糖含量的数据输入化学计量学软件(SMICA)程序中,选择偏最小二乘法进行多变量回归,得到方法的校正模型。

1.2.5 未知样品的测定 按 1.2.2 处理标准样品的方式,对未知样品进行浓硫酸处理后做紫外光谱扫描。将该吸光度值输入 SMICA 软件程序,用 1.2.4 得到的校正模型即可预测该未知样品中糖的含量。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 戊糖和己糖的酸脱水反应

可溶性碳水化合物包括单糖、低聚糖、多糖,在浓硫酸作用下多糖能很快降解为单糖,然后经脱水反应生成糠醛或糠醛衍生物,即戊糖被转化为糠醛、己糖被转化为羟甲基糠醛<sup>[8,17]</sup>。式(1)和式(2)分别表达了这类酸脱水反应的反应式<sup>[18]</sup>。



以上反应过程使不带未饱和键的糖分子变成带未饱和键的糠醛类分子，从而在紫外波长区域有光谱吸收，可采用紫外光谱法进行测定。由于木糖和葡萄糖的酸脱水过程与其他戊糖和己糖一致，最终产物均为糠醛或羟甲基糠醛，为此，可用木糖和葡萄糖配制戊糖、己糖的标准溶液。

## 2.2 糠醛和羟甲基糠醛的紫外光谱

戊糖和己糖经浓硫酸脱水后产物（糠醛及羟甲基糠醛）的紫外吸收光谱如图1所示。糠醛和羟甲基糠醛在该介质中，分别在316 nm和322 nm波长处有最大吸收峰。对于混合糖样品的紫外光谱，其最大吸收峰值的出现介于这两个波长之间。因此，根据糠醛以及羟甲基糠醛所产生的紫外光谱，可以实现间接测定样品中戊糖和己糖含量。

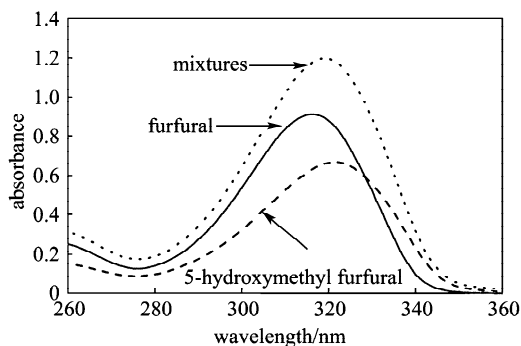


图1 糠醛和羟甲基糠醛在浓硫酸溶液中的紫外吸收光谱  
Fig. 1 UV spectra of furfural, 5-hydroxymethyl furfural and their mixtures in concentrated sulfuric acid

## 2.3 干扰物质的影响

在木质生物质水解提取糖类物质过程中，一部分木素也被抽提出来，特别是在碱性条件下。由于木素分子结构中有苯环基团，因此在紫外波长范围有很强的光谱吸收，必须考虑在本文的实验条件下木素的干扰情况。本文作者的研究发现，在浓硫酸介质中，抽提出的木素产生沉淀，而在紫外光谱测定中，产生由于光散射而造成的干扰，使光谱的基线上移。这种干扰可以采用对水解溶液的离心或过滤加以克服。对于一些含有色素物质的非木材植物原料（如竹子）抽提液，色素会对紫外光谱测定造成干扰。这类干扰可以通过简单空白实验排除。因此，本文将样品加入氢离子浓度为  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸溶液作为空白，以消除有色物质的干扰。因为都是在酸性体系，酸可溶木质素等有色物质的光谱相对变化变小<sup>[19]</sup>。图2示意了北美南方松木木片在  $170^\circ\text{C}$  经过 2 h 的水抽提溶液的酸空白溶液和经

浓硫酸水解后溶液的紫外光谱。可以看出在该抽提液中，有色物质对糖测定的光谱干扰不是很显著。因此，空白实验可有效地减小可溶木质素等有色物质对糖测定的干扰。

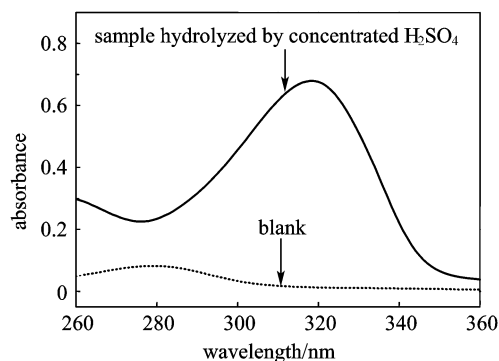


图2 松木木片水抽提溶液的空白溶液和经浓硫酸水解后溶液的紫外光谱

Fig. 2 UV spectra of sample with and without hydroxylation using concentrated sulfuric acid

## 2.4 结合化学计量学的紫外光谱测定抽提液中糖含量

2.4.1 化学计量学在复杂体系光谱测定分析中的应用 在分析化学中，常用化学统计学来解决复杂的校正问题<sup>[20-21]</sup>。其中，偏最小二乘法（partial-least-square, PLS）是解决线性复杂多变量关系的最有效的方法<sup>[22-23]</sup>。基于光谱的分析方法，找出一组已知浓度样品的多波长光谱和所对应的组成浓度，建立起两者之间的数学关系，实现根据未知样品的光谱信息预测其组成浓度的目的。

在大多数木质生物质的提取液中，尽管是半纤维素降解所产生的戊糖占主导地位，但总是与半纤维素和纤维素降解的己糖共存。因此，其浓硫酸处理后产物的紫外光谱总是糠醛和羟甲基糠醛的复合光谱。由于通常戊糖与己糖的含量差别很大，很难用几个波长的吸收来实现对其含量的准确测定。因此，本文采用多波长光谱测定并结合化学计量学进行校正的方法来实现对抽提液中糖含量的分析。目前，结合化学计量学的分析应用已很普遍，许多商业化的计量学计算机软件，如 SMICA<sup>[24]</sup> 或 Unscrambler<sup>[25]</sup> 等都可以用于此目的。

2.4.2 数学关系模型的建立 将已知各组分糖含量的混合糖溶液经硫酸处理后测定的全波长紫外光谱吸收值和糖的浓度，输入化学统计学软件 SMICA 进行运算，导出糖浓度和多波长吸光度值之间关系的数学关系（模型）。根据在实际抽提液中，

表 1 混合糖溶液中糖的实际浓度和模型预测浓度

Table 1 Comparisons between predicted and actual sugar contents in tested samples

Sample	Total sugars			Xylose			Glucose		
	Predicted contents /mol · L <sup>-1</sup>	Actual contents /mol · L <sup>-1</sup>	Recovery /%	Predicted contents /mol · L <sup>-1</sup>	Actual contents /mol · L <sup>-1</sup>	Recovery /%	Predicted contents <sup>①</sup> /mol · L <sup>-1</sup>	Actual contents /mol · L <sup>-1</sup>	Recovery /%
1	0.0360	0.0364	98.9	0.0143	0.0141	101.4	0.0217	0.0222	97.7
2	0.0388	0.0395	98.2	0.0273	0.0281	97.2	0.0116	0.0113	102.7
3	0.0623	0.0628	99.2	0.0291	0.0284	102.5	0.0331	0.0344	96.2
4	0.0633	0.0630	100.5	0.0397	0.0392	101.3	0.0236	0.0239	98.7
5	0.0732	0.0741	98.8	0.0416	0.0405	102.7	0.0316	0.0336	94.0

① Predicted contents of glucose=predicted contents of total sugars—predicted contents of xylose.

己糖含量较低的特点，本文采用戊糖和总糖为基准进行运算（己糖的浓度可以根据总糖和戊糖之差而得出）。图 3 分别示意了由化学统计学软件建立的模型所给出的戊糖和总糖的模型预测浓度与实际浓度的比较。结果表明，本文建立的校正模型的预测浓度和糖的实际浓度之间有很好的相关性，相关系数分别为 0.990（戊糖）和 0.983（总糖），预测的平均相对偏差小于 8.4%，完全可以满足对于抽提液中糖类工业分析的要求。

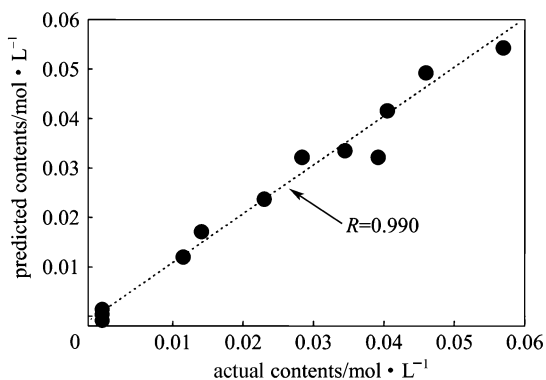
2.4.3 模型的检验 另一组（5 个）已知糖浓度的溶液作为被测样品，经浓硫酸处理后测定其紫外光谱并将吸光度值输入化学计量学软件建立的模型进行糖浓度预测。由表 1 可知，预测结果的回收率在合理范围，测定误差为 ±6% 之内，说明本方法可以对溶解性糖组分进行准确测定。该方法测定的混合糖溶液中糖含量，包含了样品中低聚糖等可溶性糖。

### 3 结 论

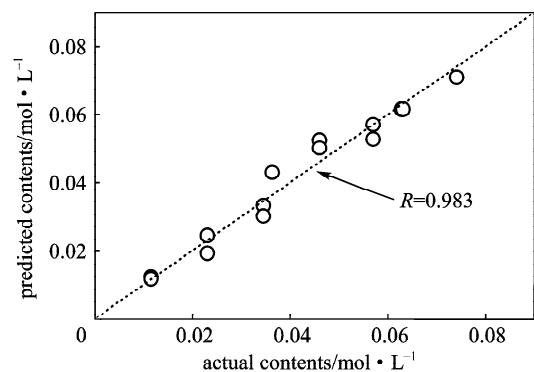
本文提出一种通过测定混合糖样品经浓硫酸处理后产物的紫外光谱，并结合化学计量学建立校正模型的戊糖、己糖和总糖的分析技术。该方法无需使用有机试剂，操作步骤简单，非常适合在木质生物质炼制研究中对抽提液糖类组分的分析。该方法很有潜力发展成为一种传感器技术，实现对过程溶液的糖含量进行在线检测。

### References

- [1] Qu Yinbo (曲音波). Industrialization of cellulosic ethanol. *Progress In Chemistry* (化学进展), 2007, **19** (7/8): 1098-1108
- [2] Kotrba R. Keeping pace with policy. *Ethanol Producer Magazine*, 2005 (1): 58-62
- [3] US Department of Energy. <http://www.doe.gov/news/4827.htm>
- [4] Chen Hongzhang (陈洪章), Qiu Weihua (邱卫华). The crucial problems and recent advance on producing fuel alcohol by fermentation of straw. *Progress In Chemistry* (化学进展), 2007, **19** (7/8): 1116-1121
- [5] Ashwell G. Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol.*, 1957, **3**: 73-105
- [6] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, **31**: 426-428



(a)



(b)

图 3 糖的校正模型

Fig. 3 Calibration model of pentoses (a) and total sugars (b)

- [7] Scott T A, Melvin E H. Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, 1953, **25**: 1656-1661
- [8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, **28**: 350-356
- [9] Buysse J, Merckx R. An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Exp. Bot.*, 1993, **44**: 1627-1629
- [10] Chow P S, Landhuser S M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*, 2004, **24**: 1129-1136
- [11] Blunden C A, Wilson M F. A specific method for the determination of soluble sugars in plant extracts using enzymatic analysis and its application to the sugar content of developing pear fruit buds. *Analytical Biochemistry*, 1985, **151**: 403-408
- [12] Hendrix D L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop. Sci.*, 1993, **33**: 1306-1311
- [13] Carlsson N G, Karlsson H, Sandberg A S. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by hightemperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**: 2404-2412
- [14] Li Xiaohua (李筱华), He Lanfang (何兰芳), Chang Fengmei (常凤眉), Gao Jie (高洁). Determination of carbohydrate remained in lignin preparations through aldonitrile derivatives by gas chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 1987, **5** (1): 4-8
- [15] Casterline J L, Oles C J, Ku Y. Measurement of sugars and starches in foods by a modification of the AOAC total dietary fiber method. *Journal of AOAC International*, 1999, **82**: 759
- [16] Cheetham N W H, Sirimanne P, Day W R. High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrate oligomers. *J. Chromatogr.*, 1981, **207**: 439-444
- [17] Raunkjer K, Thorkild H J, Nielsen P H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipids in domestic wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 1994, **28**: 251-262
- [18] Li Hesheng (李合生), Sun Qun (孙群), Zhao Shijie (赵世杰). *The Experiment Principle and Technique on Plant Physiology and Biochemistry (植物生理生化实验原理和技术)*. Beijing: Higher Education Press, 2000: 195-202
- [19] Bikova T, Treimanis A, Rossinska G, Telysheva G. On-line study of lignin behaviour in dilute alkaline solution by the SEC-UV method. *Holzforschung*, 2004, **58**: 489-494
- [20] Workman Jr J J, Mobley P R, Kowalski B R, Bro R. Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, part I. *Applied Spectroscopy Reviews*, 1996, **31** (1/2): 73-124
- [21] Brown S D, Sum S T, Despagne F, Lavine B K. Chemometrics; fundamental review. *Anal. Chem.*, 1996, **68**: 21R-61R
- [22] Geladi P, Kowalski B. Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 1986, **185**: 1-17
- [23] Hoskuldsson A. PLS regression methods. *Journal of Chemometrics*, 1988, **2**: 211-228
- [24] Wang Huiwen (王惠文), Wu Zaibin (吴载斌), Meng Jie (孟洁). *Partial Least-squares Regression Linear and Nonlinear Methods (偏最小二乘回归的线性与非线性方法)*. Beijing: National Defence Industry Press, 2006: 279-308
- [25] Martens H, Naes T. *Multivariate Calibration*. New York: John Wiley & Sons, 1989