

紫外光谱法快速测定生物质提取液中的糠醛和羟甲基糠醛

张翠¹, 柴欣生^{1,2*}, 罗小林¹, 付时雨¹, 詹怀宇¹

1. 华南理工大学制浆造纸国家重点实验室, 广东 广州 510640

2. 佐治亚理工大学造纸科学与技术研究所, 美国 亚特兰大 GA30332

摘要 提出了一种基于紫外光谱快速测定木质生物质预提取液中糠醛(F)和羟甲基糠醛(HMF)的方法。研究中发现,在浓的冰醋酸介质中,276 nm是F和HMF的等吸收点波长;生物质预提取液中的酸溶木素是测定F和HMF光谱的主要干扰。然而,进一步研究发现,酸溶木素在250 nm到500 nm的光谱范围内均有吸收,而F和HMF在325 nm后便没有吸收。因此酸溶木素的影响可以通过其在325 nm的吸光度值乘上一个系数加以矫正。最终,基于等吸收点波长(276 nm)和F的最大吸收波长(272 nm),以及酸溶木素在325 nm(F和HMF均无吸收)处的波长,采用简单的三波长法就可定量检测出生物质提取液中F和HMF的含量。该方法测定前无需加入有毒的酚类物质作为显色剂,且简单、快速,测定F和HMF的相对偏差及回收率分别为3.02%和2.72%,95%~107%和96%~101%,因此很适合用于生物质精炼中木质生物质预提取半纤维素领域的研究。

关键词 紫外光谱;三波长法;生物质提取液;糠醛;羟甲基糠醛

中图分类号: TS 749, 1-34 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0247-04

引言

随着石油资源的日益减少和环境压力的逐渐增大,木质生物质已经成为生产经济、环保和可再生能源物质的首要选择^[1]。将木质生物质转化成糖是生产燃料乙醇的第一步,其中常用的转化方法有热水抽提^[2]、弱酸水解^[3,4]、酶水解^[5,6]和碱抽提^[7,8]。在热水抽提和弱酸水解过程中,在高温和一定酸度时部分糖脱水而转变为糠醛(Furfural,简称F)和羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural,简称HMF)^[9,10]。尽管F和HMF是重要的有机化工原料^[11],然而它们的存在对生产乙醇过程中的发酵微生物具有很强的抑制作用^[9,10]。因此,充分了解提取木质生物质糖过程中F和HMF的生成规律显得尤为重要,而准确的测定提取液中F和HMF的浓度是以木质生物质为原料转化提取糖工艺研究的重要前提。

测定F和HMF的传统方法主要有苯胺法^[12]、硫代巴比土酸法^[13]和缩氨基硫脲法^[14]等。苯胺法仅能测定F,且需要蒸馏将F与HMF分离,从而消除HMF对F测定的干扰;硫代巴比土酸法需要除去温克勒反应产生的浑浊物质;缩氨基硫脲法虽可测定F和HMF,但也需要蒸馏等繁杂的前处

理步骤。所有这些方法均是采用显色后间接测定。由于显色后的有色物质不很稳定,所以测定的误差较大^[15]。目前,采用气相色谱法^[16,17]对F或高效液相色谱法^[18-20]对F和HMF进行同时测定。然而这些法仍需要步骤繁琐的样品前处理,并且仪器操作和维护成本比较昂贵。

本研究将采用紫外三波长法同时测定提取液中F和HMF,测定前无需加入苯胺、硫代巴比土酸法等有毒性试剂进行显色处理,能更好的适应工业快速分析的要求。

1 实验材料和方法

1.1 仪器和器材

仪器: S-3100型紫外可见分光光度计(新科公司,韩国)(1 cm的常规比色皿); 10 mL比色管; 恒温水浴锅; 4520型高压反应釜(Parr Instrument设备公司生产,美国)。

试剂: 糠醛(Furfural, F)(BR, 含量>98%)、羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl furfural, HMF)(BR, 含量>98%)、冰醋酸(AR, 98% CH₃COOH, 相对密度1.16)。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 标准溶液的配制

收稿日期: 2009-01-29, 修订日期: 2009-05-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863")重点项目(2007AA100704)和国家自然科学基金项目(30771689)资助

作者简介: 张翠,女,1986年生,华南理工大学制浆造纸国家重点实验室硕士研究生 e-mail: zhangcui0115@126.com

* 通讯联系人 e-mail: luoxiaolin128@gmail.com; xin-sheng.chai@ipst.gatech.edu

分别配置 7 个已知浓度的 F 和 HMF 的冰醋酸溶液。其中, F 和 HMF 的浓度范围均为 $0 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 热水抽提液的制备

用磨粉机将桉木片磨成粉, 称取绝干桉木粉 20 g, 与水均匀混合, 液固比为 1 : 20, 置于高压反应釜中, 反应温度 $170 \text{ }^\circ\text{C}$, 保温时间 2 h。反应结束后用布氏漏斗进行过滤, 取滤液待测。

1.2.3 酸溶木素的制备

用磨粉机分别将桉木、马尾松、三倍体毛白杨和蔗渣磨成粉, 苯醇抽提 48 h 后晾干, 称取绝干粉 20 g, NaOH 用量 10% (基于木粉的绝干量), 液固比 1 : 20, 反应温度 $170 \text{ }^\circ\text{C}$, 保温 2 h。反应结束后同样用布氏漏斗过滤, 取滤液 1 mL 与 100 mL 纯的冰醋酸混合, 3 000 转离心分离出沉淀的碱木素, 取上层清液, 视其浓度稀释一定的倍数后用紫外-分光光度计进行扫描, 波长范围为 $190 \sim 600 \text{ nm}$, 记录全部吸光度值。

1.2.4 热水抽提液的紫外光谱测定

用纯的冰醋酸将热水抽提液稀释一定的倍数, 倒入离心管, 5 000 转冷冻离心去除沉淀, 然后置于 1 cm 的石英比色皿进行测定, 扫描范围 $190 \sim 400 \text{ nm}$, 记录全部吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 F 和 HMF 的紫外光谱及其吸光度值与浓度之间的关系

本文采用纯的冰醋酸作为介质对样品进行光谱测定, 其目的是该溶液在加热后可直接用于已报道的木质生物质提取液中戊糖含量测定方法的样品处理^[21]。

图 1 示意了不同浓度的 F 和 HMF 在冰醋酸介质中的紫外光谱。由图可知, F 和 HMF 的最大吸收波长分别为 272 和 281 nm, 而 276 nm 为两者的等吸收点, 即在该波长处等浓度的 F 和 HMF 有相同的摩尔吸光系数。因此, 在无干扰的情况下, 可由 272 和 276 nm 的吸光度值来测定样品中 F 和 HMF 的含量。

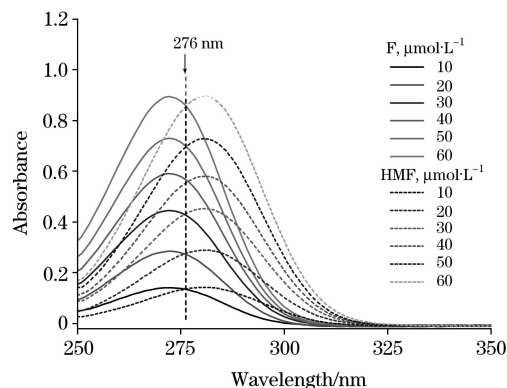


Fig. 1 Absorption spectra of F and HMF in acetic acid

根据图 1 的数据可得到在这些特征波长处吸光度值与浓度关系遵循朗伯-比尔定律, 即: $A = \epsilon c$, 其中 ϵ 是 F 或 HMF 在波长 λ 处的吸光系数 (由表 1 列出)。

Table 1 Absorptivities of F or HMF at different wavelengths

Species	Wavelength/nm		
	272	276	281
F	14 755	14 113	11 785
HMF	12 488	14 113	14 764

2.2 酸溶木素对 F 和 HMF 测定的影响

在用热水对木质生物质进行抽提的过程中, 部分木素也在不同程度上被抽提出来。在浓冰醋酸的介质中, 由于其酸溶木素也在紫外波长范围内有吸收, 因此对 F 和 HMF 的测定产生干扰。图 2 所示为 F, HMF, 桉木热水抽提液以及酸溶木素的紫外-可见吸收光谱。可以看出, 酸溶木素在 $250 \sim 400 \text{ nm}$ 的范围内有明显的吸收, 其与 F 和 HMF 仅在 $250 \sim 325 \text{ nm}$ 范围的吸收重叠。因此酸溶木素会对木质生物质热水抽提液样品中 F 和 HMF 的光谱测定产生了干扰。

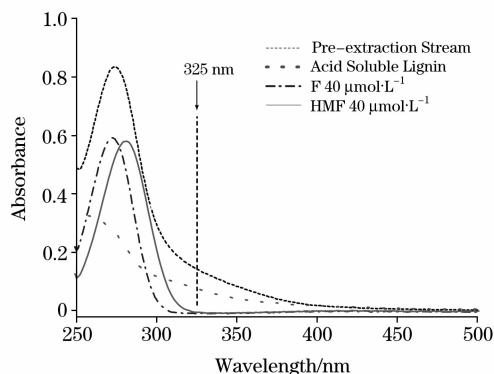


Fig. 2 Spectra of F, HMF, pre-extraction stream and the interference species in an acetic acid medium*

* The hot-water pre-extraction stream and acidic soluble lignin of eucalyptus were diluted 100 and 500 times by acetic acid, respectively

2.3 酸溶木素对 F 和 HMF 测定干扰的消除

2.3.1 酸溶木素在 F 和 HMF 测定波长干扰程度的确定

由图 2 可知, 在波长大于 325 nm 的吸收是单纯由酸溶木素所贡献的。因此, 可以通过该波长处酸溶木素的吸收推算出它在 F 和 HMF 所选择的测定波长处的吸收, 从而将酸溶木素的贡献从混合样品选定波长处总的吸光度中扣除。

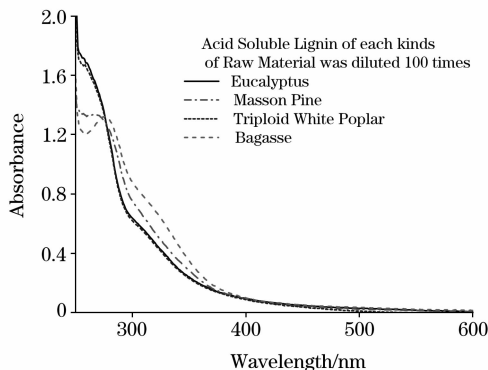


Fig. 3 Spectra of the acidic soluble lignins from different materials

图 3 所示为几种原料酸溶木素的紫外-可见光谱, 从中可知, 阔叶木、针叶木和非木材的酸溶木素光谱是有所差别的。然而, 同为阔叶木木种时, 其酸溶木素光谱差别较小。根据图 3, 可计算出这些原料的酸溶木素在所选 F 和 HMF 测定波长处吸光度(A_{λ}^r)于在 325 nm 的吸光度的比值, 即

$$K_r = \frac{A_{\lambda}^r}{A_{325}} \quad (1)$$

从而, 就可以根据酸溶木素 325 nm 的吸光度确定其在所选 F 和 HMF 测定波长处的干扰的程度。

2.3.2 三波长法测定样品中 F 和 HMF 含量

由(1)式扣除酸溶木素在 272 和 276 nm 处的干扰后, F 和 HMF 在这两个波长处的吸光度值和浓度的关系表示如下

$$A_{272} - K_1 A_{325} = \epsilon_1^1 c_1 + \epsilon_1^2 c_2 \quad (2)$$

$$A_{276} - K_2 A_{325} = \epsilon_2^1 c_1 + \epsilon_2^2 c_2 \quad (3)$$

其中, A_{272} , A_{276} 和 A_{325} 分别为稀释后样品在 272, 276 和 325 nm 的吸光度值; K_1 和 K_2 分别为酸溶木素在 272, 276 与 325 nm 吸光度值的比值, 即 A_{272}/A_{325} 和 A_{276}/A_{325} (其值与所用材种有关); c_1 和 c_2 分别为样品稀释后 F 和 HMF 的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ϵ_1^1 , ϵ_1^2 , ϵ_2^1 和 ϵ_2^2 为 F 和 HMF 各自分别在 272 和 276 nm 的摩尔吸光系数。

Table 2 K value of the raw materials selected

	Hardwoods		Softwood	Non-wood
	Eucalyptus	Triploid white poplar	Masson pine	Bagasse
$K_1 = A_{272}/A_{325}$	3.40	3.44	2.70	2.05
$K_2 = A_{276}/A_{325}$	3.41	3.43	2.63	2.07

根据表 2 中的 K 值, F 和 HMF 在 272 和 276 nm 处的摩尔吸光系数(由图 1 的数据求得), 最后可得到下列方程计算样品中 F 和 HMF 的含量, 即

$$W_F = c_1 M_F R = \frac{A_{272} - 0.88A_{276} - 0.41A_{325}}{23.61} R \quad (8)$$

$$W_{\text{HMF}} = c_2 M_{\text{HMF}} R = \frac{7.26A_{276} - 6.93A_{272} - A_{325}}{122.94} R \quad (9)$$

其中, W_F 和 W_{HMF} 分别为样品中 F 和 HMF 的含量, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; M_F 和 M_{HMF} 分别为 F 和 HMF 的摩尔质量; R 为样品的稀释倍数。

2.4 方法的精密度和准确性

方法的精密度评价是基于—热水抽提液(样品中 F 和 HMF 的含量分别为 0.18 和 0.09 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 按照上述条件进行试样配置和光谱测定, 并根据(8)和(9)式计算出 F 和 HMF 的含量, 重复三次所得。结果表明, 本方法测定 F 和 HMF 的相对偏差分别为 3.02% 和 2.72%。

为验证该方法的准确性, 将一系列体积(1 到 5 mL)的 F 和 HMF 溶液($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)分别加入上述抽提液样品中, 按照上述同样的步骤进行处理和测定, 并计算出该方法测定的回收率(结果见表 3)。

根据图 1 可知, 276 nm 是 F 和 HMF 的等吸收点, 因此它们的摩尔吸光系数相等, 即

$$\epsilon_1^1 = \epsilon_2^2 = \epsilon \quad (4)$$

由于 F 和 HMF 的总浓度 $c_T = c_1 + c_2$, 将其和(4)式代入(3)式可将两者的总浓度表示为

$$c_T = \frac{A_{276} - K_2 A_{325}}{\epsilon} \quad (5)$$

从而, 联立(2)和(5)式可得

$$c_1 = \frac{\left(A_{272} - \frac{\epsilon_1^2}{\epsilon} A_{276}\right) + \left(\frac{\epsilon_1^2}{\epsilon} K_2 - K_1\right) A_{325}}{\epsilon_2^1 - \epsilon_1^1} \quad (6)$$

而 c_2 则可由下式求得, 即

$$c_2 = c_T - c_1 \quad (7)$$

2.3.3 计算式中系数的确定

由图 3 数据计算的几种原料的酸溶木素在所选波长与 325 nm 的吸光度比值见表 2。可以看出, 阔叶木(桉木和 3 倍体毛白杨)的酸溶木素在 272 和 276 nm 处的吸光度值与其在 325 nm 处的吸光度值的比值是很相近的, 与针叶木(马尾松)和蔗渣的比值有较大的差别。

Table 3 Recovery test of the method

Sample number	Weight/ μg				Recovery/%	
	added		Measured		F	HMF
	F	HMF	F	HMF		
1	4.80	6.45	4.70	6.52	98	101
2	9.60	12.90	9.85	12.58	103	98
3	14.40	19.35	13.68	19.02	95	98
4	19.20	25.80	20.52	25.06	107	97
5	24.00	32.25	23.67	31.10	99	96

由表 3 的结果可知, 本方法对 F 和 HMF 的测定具有很好的准确性, 其回收率都在 95%~107% 的范围内, 完全可以满足木质生物质精炼研究中, 热水抽提液中快速分析 F 和 HMF 含量的要求。

3 结论

本文提出一种直接将样品溶于冰醋酸中, 基于等吸收点, 采用紫外三波长同时测定样品中糠醛和羟甲基糠醛的分析方法。该方法具有无需经过显色处理、操作步骤简单、快速等特点, 非常适合于木质生物质抽提糖液中对发酵微生物产生抑制的组分的分析, 同时为加速优化木质生物质生产乙醇的工艺提供了一个快速而有效的表征手段。

参 考 文 献

- [1] HU Zhan-bo, CHAI Xin-sheng, WANG Jing-quan, et al(胡湛波, 柴欣生, 王景全, 等). Progress in Chemistry(化学进展), 2008, 20(9): 1439.
- [2] Laser M, Schulman D, Allen S, et al. Bioresource Technol., 2002, 81(ER1): 33.
- [3] Israilides C, Grant G, Han Y. Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36: 43.
- [4] QU Yin-bo(曲音波). Progress in Chemistry(化学进展), 2007, 19(7/8): 1098.
- [5] Philippidis G, Smith T, Wyman C S. Biotechnol. Bioeng., 1992, 41: 846.
- [6] Ghosh P, Singh A. Adv. Appl. Microbiol., 1993, 39: 295.
- [7] Rodriguez-Vazquez R, Diaz-Cervantes D. Bioresource Technol., 1994, 47(2): 159.
- [8] Aiello C, Ferrer A, Ledesma A. Bioresource Technol., 1996, 57(1): 13.
- [9] YIN Jing-bo, CHEN Xue-si, ZHANG Long, et al(尹静波, 陈学思, 张 龙, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2002, 23(7): 1363.
- [10] LI Jing-ci, DING Tian-hui(李敬慈, 丁天惠). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1994, 22(9): 869.
- [11] YUAN Jian-ping, GUO Si-yuan, LI Lin(袁建平, 郭祀远, 李 琳). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1996, 24(1): 57.
- [12] Dinsmore H L, Nagy S. J. Assoc. Off. Anal., 1974, 57: 332.
- [13] Espinosa-Mansilla A, Durán-Merás I, López F S J. Agr. Food Chem., 1996, 44: 2962.
- [14] O'Haver T C, Green G L. Anal. Chem., 1976, 48: 312.
- [15] Silvia M R, Manuel A C, Ivonne D. Carbohydrate Polym., 2004, 56: 287.
- [16] Teixidó E, Santos F J, Puignou L J. Chromatogr. A, 2006, 1135: 85.
- [17] Elvira M S M G, Joao F L. J. Chromatogr. A, 2009, 1216: 2762.
- [18] Marcy J E, Rouseff R L J. Agr. Food Chem., 1984, 32: 979.
- [19] Lee H S, Rouseff R L, Nagy S. J. Food Sci., 1986, 51: 1075.
- [20] Albalá-Hurtado S, Veciana-Nogués M T, Izquierdo-Pulido M, et al. J. Agr. Food Chem., 1997, 45: 2128.
- [21] YU Jian-ren, ZHANG Zeng, CHI Cong-cong(于建仁, 张 曾, 迟聪聪). China Pulp & Paper(中国造纸), 2007, 26(11): 10.

Rapid Method for Determination of Furfural and 5-Hydroxymethyl Furfural in Pre-Extraction Stream of Biomass Using UV Spectroscopy

ZHANG Cui¹, CHAI Xin-sheng^{1,2*}, LUO Xiao-lin¹, FU Shi-yu¹, ZHAN Huai-yu¹

1. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China
2. Institute of Paper Science and Technology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA30332, USA

Abstract The present paper reports a rapid method for the determination of furfural (F) and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) in pre-extraction liquors of lignocellulosic biomass based on UV spectroscopy. In a concentrated acetic acid medium, F and HMF have an isosbestic point at 276 nm. It was found that the acidic soluble lignin in the pre-extraction sample is the major interference species in the F and HMF spectroscopic quantification. However, only acidic soluble lignins have the absorption at the wavelengths above 325 nm. Based on the absorption of the acidic soluble lignins at 325 nm, their absorptions at either F or HMF absorbed wavelengths can be determined. Thus, with a simple triple-wavelength technique, both F and HMF in the pre-extraction liquors of lignocellulosic biomass can be quantified based on the spectroscopic measurement at the isosbestic point wavelength (276 nm), maximum absorption wavelength of F (272 nm) and the acid soluble lignin absorbed wavelength (325 nm). The present method does not require the hazardous organic compounds (such as phenolic compounds etc.) acting as a color reagent in the experiment. It is not only simple and rapid, but also has a good measurement precision and accuracy, with the relative standard deviations of 3.02% and 2.72%, and recoveries of 95%-107% and 96%-101%, respectively, in the F and HMF quantification. The present method is suitable for use in the research on pre-extraction hemicellulose of the lignocellulosic biomass in bio-refinery area in order to achieve a high selective sugar conversion.

Keywords UV spectroscopy; Triple-wavelength method; Biomass pre-extraction liquor; Furfural; 5-hydroxymethyl-furfural

* Corresponding author

(Received Jan. 29, 2009; accepted May 6, 2009)