

反相高效液相色谱法定量分析木质素的主要降解产物

江智婧, 朱均均, 李 鑫, 连之娜, 余世袁, 勇 强*

(南京林业大学 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要 :建立了反相高效液相色谱法定量分析玉米秸秆蒸汽爆破预处理过程中产生的主要木质素降解产物的方法。采用 C18 色谱柱,柱温 30 ℃,乙腈-水(含 1.5% 的醋酸)为流动相,梯度洗脱,流速为 0.8 mL/min,254 nm 和 280 nm 波长下紫外检测,可实现 4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛和紫丁香醛的有效分离。6 种主要木质素降解产物线性回归方程相关系数为 0.999 9 ~ 1.000 0,加标回收率均在 96% 以上,相对标准偏差低于 2.5% ($n=6$),满足定量分析要求。

关键词 :反相高效液相色谱 ;酚类化合物 ;降解产物 ;木质素 ;玉米秸秆

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2011)01-0059-04

Determination of main degradation products of lignin using reversed-phase high performance liquid chromatography

JIANG Zhijing, ZHU Junjun, LI Xin, LIAN Zhina, YU Shiyuan, YONG Qiang*

(Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract : An analytical method using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was developed for the separation and quantitative determination of main degradation products of lignin (4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin and syringaldehyde) during the steam exploded pretreatment for corn stovers. The separation was carried out on a C18 column with the mobile phase of acetonitrile-water (containing 1.5% acetic acid) at 30 ℃ at a flow rate of 0.8 mL/min and the detection wavelengths of 254 and 280 nm. Under the optimized conditions, the correlation coefficients of the 6 compounds were between 0.999 9 and 1.000 0. The recoveries of the 6 compounds were all above 96% and the relative standard deviations ($n=6$) were less than 2.5%. This method is suitable for the determination of the main degradation products of lignin during the steam exploded pretreatment of lignocellulosics.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); phenolic compounds; degradation products; lignin; corn stovers

木质纤维资源是潜在的燃料乙醇的生产原料。木质纤维原料中纤维素、半纤维素和木质素紧密结合的结构很难被纤维素酶水解成单糖,继而发酵成乙醇,因此木质纤维原料在酶水解前必须经过预处理。纤维质原料的预处理一般在高温、高压或在酸、碱存在的条件下进行,在预处理过程中,原料中的纤维素、半纤维素和木质素不可避免地发生降解作用从而产生一些对后续酶解、发酵有抑制作用的

物质。不同的原料及预处理方法产生的抑制物种类及分布也不相同^[1,2]。

高温、稀酸或蒸汽爆破预处理过程中产生的木质素降解产物成分复杂,目前发现含量较高且对后续酶解、发酵有抑制作用的物质主要包括 4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛和紫丁香醛等 6 种酚类化合物^[3-5]。木质素降解产物的研究主要采用气相色谱法^[3,6],但该方法存在样品处

* 通讯联系人:勇 强,教授,主要从事生物质资源生物降解与转化的研究。E-mail: swhx@njfu.com.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(30871992)、国家“863 计划”(2008AA05Z401)和国家林业局公益性行业科研专项课题(201004001)。

收稿日期:2010-09-03

理要求高、衍生化不彻底等缺点。而采用液相色谱法定量分析木质素降解产物的研究尚未见报道。本文采用反相高效液相色谱法建立了玉米秸秆蒸汽爆破预处理过程中产生的主要木质素降解产物的定量分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器、设备、试剂和材料

仪器:Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有紫外可变波长检测器(VWD),Agilent 化学工作站(2 005)和 Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司);蒸汽爆破预处理装置由武汉润格环保设备有限公司生产,体积为 3.5 L,最高工作压力为 2.5 MPa,全自动控制。

试剂:甲醇和乙腈均为色谱纯试剂;乙酸和乙酸乙酯均为分析纯试剂;水为超纯水。

标准品:4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛、紫丁香醛为分析纯试剂,均购自 Sigma 公司。

玉米秸秆:收集于内蒙古呼和浩特地区。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

精确称取上述 6 种酚类化合物标准品,用 1.5%(体积分数)乙酸水溶液-乙腈(95:5, v/v)分别配制质量浓度为 100 mg/L 4-羟基苯甲酸、100 mg/L 香草酸、100 mg/L 紫丁香酸、200 mg/L 4-羟基苯甲醛、500 mg/L 香草醛和 100 mg/L 紫丁香醛的单标准溶液。以 6 种单标准溶液为基础配制含 6 种标准品、不同浓度梯度的混合标准溶液,置于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 原料预处理

玉米秸秆切成 2~3 cm 长,在 3.5 L 蒸汽爆破预处理装置中于 1.5~2.2 MPa 下处理 2~6 min。

1.2.3 木质素降解产物的提取

称取一定量的玉米秸秆蒸汽爆破物料,用固液比 1:10 的蒸馏水分 3 次洗涤,吸滤,合并滤液,收集水洗液。用浓盐酸调节水洗液的 pH 值至 2.0,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,收集有机相并混匀,然后加入无水硫酸镁脱水,抽滤除去沉淀。有机相于 40 ℃、16 kPa 下减压蒸发至干,然后用一定量的 1.5% 乙酸水溶液-乙腈(95:5, v/v)溶解。

1.2.4 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C18 柱。流动相:A 相为 1.5% 乙酸水溶液,B 相为乙腈。梯度洗脱程序:0~45 min,5% B~40% B;45~50 min,

40% B~100% B;50~55 min,100% B~5% B;55~60 min,5% B。柱温 30 ℃;检测波长:0~17.45 min 为 254 nm,17.50~60 min 为 280 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:10 μL。

2 结果与讨论

2.1 降解产物提取方法的选择

根据 6 种酚类化合物易溶于有机溶剂的性质,通过比较以不同有机溶剂为萃取剂对 6 种酚类化合物的萃取效率,最终确定以乙酸乙酯为萃取剂。液-液萃取法富集目标化合物可排除其他物质的影响,且方法简便易行^[7]。

2.2 酚类化合物的分离条件研究

2.2.1 检测波长的选择

6 种标准品在紫外可变波长分光光度计上进行全波长(190~400 nm)扫描,确定其最大吸收波长。结果表明,各标准品的紫外吸收最大值均在 200 nm 左右,其次为 254 或 280 nm。但采集色谱数据时,根据 Agilent 1100 化学工作站手册,样品检测波长应至少大于所用流动相截止波长 20 nm 以上,而乙腈的截止波长为 210 nm,水的截止波长为 190 nm^[8],因此确定色谱检测波长为 254 和 280 nm。

2.2.2 流动相的选择和优化

流动相的选择:考察了以甲醇和乙腈为流动相中有机溶剂的分离效果。结果表明,流动相为乙腈-水溶液时的峰形和选择性比甲醇-水溶液有明显改善,峰形窄尖,分离度较理想,且各峰保留时间较为合适,符合分离要求;又因乙腈-水的黏度小、产生的柱压低、便于操作,故确定流动相为乙腈-水溶液。

洗脱条件的选择:分别以 2% 乙酸水溶液-乙腈(80:20、70:30 和 60:40, v/v)为流动相进行等度洗脱。结果表明,6 种标准品不能达到基线分离。以 2% 乙酸水溶液为 A 相、乙腈为 B 相进行梯度洗脱。结果表明,在 0~45 min 内由 5% B 增加到 40% B 的梯度条件下,6 种酚类化合物达到基线分离且分离效果较好,最终确定 1.2.4 节的梯度洗脱程序。

流动相 pH 值的选择:在 6 种待分析的木质素降解产物中,4-羟基苯甲酸、香草酸和紫丁香酸在含有大量水的流动相中容易产生解离,以非单一的形式存在,导致出现色谱峰形拖尾变宽和不对称等现象。在流动相中加入酸可以抑制上述化合物的电离,增大其分布系数,从而明显改善各色谱峰的峰形和分离度。由于液相色谱的分离效果与酸的种类、浓度及流动相的组成有关^[9],因此分别考察了流动相的水相中添加不同量乙酸(分别为 0.2%、1.0%、

1.5%、2.0% 和 2.5% (体积分数) 对分离效果的影响, 结果以水相中含有 1.5% 乙酸时的分离效果最好 (见图 1)。

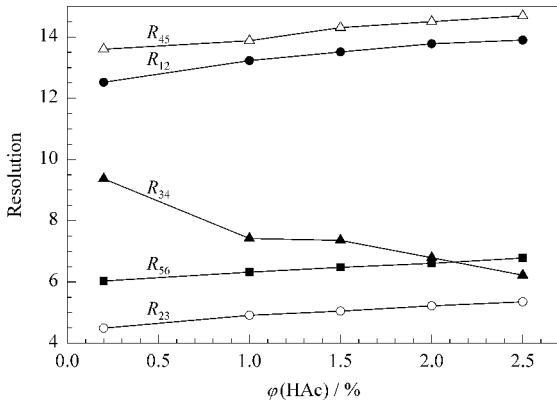


图 1 流动相中乙酸含量对 6 种酚类化合物分离度的影响

Fig. 1 Effect of content of HAc in mobile phase on the resolution of 6 phenolic compounds

Resolutions: R_{12} , between 4-hydroxybenzoic acid and vanillic acid; R_{23} , between vanillic acid and syringic acid; R_{34} , between syringic acid and 4-hydroxybenzaldehyde; R_{45} , between 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin; R_{56} , between vanillin and syringaldehyde.

由图 1 可知, 随着水相中 HAc 含量的增大, 除 R_{34} 减小外, 其余相邻色谱峰的分离度均增大。从理论计算结果和色谱分析条件考虑, 若某一特定酸的解离常数为 pK_a , 则流动相的 pH 以 $2 \leq \text{pH} \leq (pK_a - 2)$ 为最佳^[10]。4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸的 pK_a 依次为 4.582^[11]、4.355^[11] 和 4.345^[12], 平均 ($pK_a - 2$) 为 2.427, 而 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱适宜的 pH 范围为 $3 < \text{pH} < 6$ 。HAc 含量的增大虽能更好地抑制酚酸类化合物的电离, 但长时间使用对色谱柱性能有不利的影 响。综合考虑分离度及对色谱柱性能的影响, 确定流动相为乙腈-水 (含 1.5% HAc) (5:95, v/v) 溶液, 此时流动相的 pH 为 2.7。

2.2.3 流速及柱温的影响

在 25 °C、1.2.4 节的梯度洗脱条件下进行洗脱, 考察不同流速 (0.5、0.8、1.0 和 1.2 mL/min) 对

6 种酚类化合物的分离影响。结果表明, 随着流速的增大, 各种酚类化合物的保留时间均减小, 但减小的幅度略有差异。综合考虑色谱峰分离情况, 确定适宜的流速为 0.8 mL/min。

在流速为 0.8 mL/min、1.2.4 节的梯度洗脱条件下进行洗脱, 考察不同柱温 (20、25、30 和 35 °C) 下 6 种酚类化合物的分离情况。结果表明, 随着柱温的升高, 各种酚类化合物的保留时间均减小, 但在柱温为 30 °C 时, 各酚类化合物的分离度达到最佳, 故确定柱温为 30 °C。

2.2.4 峰的归属

以单一标准品加入混合标样中进行分析, 通过对比各峰峰高的变化确定 6 种木质素降解产物的相应峰位。图 2 为目标物混合标准溶液的色谱图。

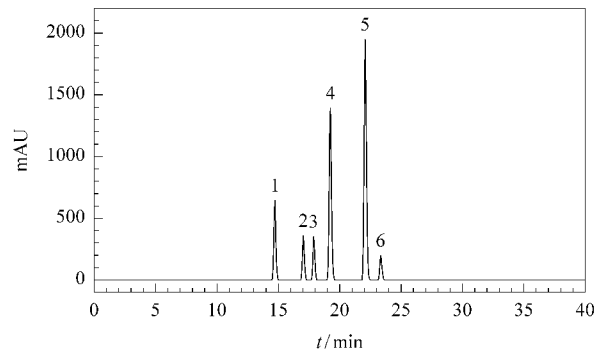


图 2 6 种酚类化合物混合标准溶液的 RP-HPLC 谱图

Fig. 2 RP-HPLC chromatogram of a mixed solution of 6 phenolic compound standards

Peak identifications: 1. 4-hydroxybenzoic acid; 2. vanillic acid; 3. syringic acid; 4. 4-hydroxybenzaldehyde; 5. vanillin; 6. syringaldehyde.

2.3 酚类化合物的分离与测定

对系列浓度的 6 种酚类化合物混合标准溶液进行定量分析, 以峰高 y 对质量浓度 x 作线性回归, 其保留时间、线性回归方程和检出限 (信噪比为 3) 结果如表 1 所示。

2.4 加标回收率和精密度

对玉米秸秆蒸汽爆破预处理物料水洗液萃取物进行加标回收试验, 样品重复进样测定 6 次, 加入待

表 1 6 种酚类化合物的保留时间、线性回归方程和检出限

Table 1 Retention times, linear regression equations and detection limits of 6 phenolic compounds

Compound	Retention time/ min	Linear range/ (mg/L)	Regression equation	Correlation coefficient	Detection limit/ (mg/L)
4-Hydroxybenzoic acid	14.70	19.8 - 99.0	$y = 6.456x + 1.511$	1.000	0.24
Vanillic acid	17.02	19.8 - 98.9	$y = 3.642x + 0.7603$	1.000	0.68
Syringic acid	17.87	20.4 - 102	$y = 3.482x + 0.3778$	1.000	0.89
4-Hydroxybenzaldehyde	19.20	40.0 - 200	$y = 6.889x + 5.986$	1.000	0.10
Vanillin	22.04	100 - 502	$y = 3.855x + 11.32$	0.9999	0.10
Syringaldehyde	23.30	18.8 - 94.1	$y = 2.123x + 0.6000$	0.9999	2.44

y : peak height; x : mass concentration, mg/L.

测物标准品后再重复进样测定 6 次,计算加标回收率及相对标准偏差(RSD),结果见表 2。由表 2 可

知 6 种酚类化合物的加标回收率均高于 96%, RSD < 2.5% ($n = 6$), 结果满足定量分析要求。

表 2 6 种酚类化合物的加标回收率及精密度 ($n = 6$)
Table 2 Recoveries and precision of 6 phenolic compounds ($n = 6$)

Compound	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
4-Hydroxybenzoic acid	14.05	49.50	62.85	98.59	2.32
Vanillic acid	31.06	49.47	78.92	96.75	2.23
Syringic acid	24.53	51.00	75.04	99.04	2.36
4-Hydroxybenzaldehyde	65.46	99.96	163.83	98.41	1.86
Vanillin	69.96	251.0	322.47	100.60	1.57
Syringaldehyde	51.08	47.04	96.48	96.51	2.46

2.5 玉米秸秆蒸汽爆破预处理物料水洗液样品的测定

玉米秸秆经蒸汽爆破预处理后,用固液比 1:10 的水洗涤物料,固液分离后水洗液在 1.2.4 节色谱条件下测定其中 6 种酚类化合物的含量,其色谱分离结果如图 3 所示。

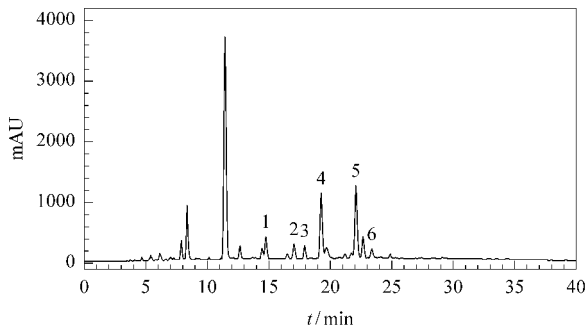


图 3 玉米秸秆蒸汽爆破预处理物料水洗液的 RP-HPLC 谱图
Fig. 3 RP-HPLC chromatogram of 6 phenolic compounds in steam-exploded corn stover prehydrolyzate

Peak identifications: 1. 4-hydroxybenzoic acid; 2. vanillic acid; 3. syringic acid; 4. 4-hydroxybenzaldehyde; 5. vanillin; 6. syringaldehyde.

由图 3 可知,RP-HPLC 可用于玉米秸秆蒸汽爆破预处理过程中产生的主要木质素降解产物的定量分析,6 种主要木质素降解产物分离效果较好。水洗液中 4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛和紫丁香醛质量浓度分别为 2.79、6.10、4.95、13.02、14.13 和 10.08 mg/L。保留时间为 8.34 min 和 11.38 min 的色谱峰分别是玉米秸秆中碳水化合物降解产物 5-羟甲基糠醛和糠醛的色谱峰。

3 结语

建立了玉米秸秆蒸汽爆破预处理过程产生的主要木质素降解产物的定量分析方法。在优化的色谱条件下,6 种主要木质素降解产物得到了很好的分

离,且回收率均在 96% 以上。该方法具有简易性、实用性、可行性和重复性好等优点。

参考文献:

- [1] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, et al. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 200
- [2] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, et al. *Enzyme Microb Tech*, 2010, 46: 170
- [3] Zhu J J, Yong Q, Chen S X, et al. *Chemistry and Industry of Forest Products* (朱均均, 勇强, 陈尚研, 等. 林产化学与工业), 2009, 29(2): 22
- [4] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 65(1): 24
- [5] García-Aparicio M P, Ballesteros I, González A, et al. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 129: 278
- [6] Juárez M J B, Zafra-Gómez A, Luzón-Toro B, et al. *Biores Technol*, 2008, 99: 2392
- [7] Liu Q T, Li Q, Wu Q J, et al. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (刘群涛, 李琦, 武千钧, 等. 分析试验室), 2006, 25(12): 69
- [8] Snyder L R, Kirkland J J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed. Gao C, Chen X M, Gao H, transl. Beijing: Chemical Industry Press (斯奈德 L R, 柯克兰 J J. 现代液相色谱方法导论. 2 版. 高潮, 陈新民, 高虹, 译. 北京: 化学工业出版社), 1988: 239
- [9] Liu J Y, Yang X D, Xu L Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 等. 色谱), 2002, 20(3): 245
- [10] Zhao J C, Guo Z A, Chang J H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (赵景婵, 郭治安, 常建华, 等. 色谱), 2001, 19(3): 260
- [11] Gokel G W. *Handbook of Organic Chemistry*. 2nd ed. Zhang S S, Wen Y H, Ding C F, et al, transl. Beijing: Chemical Industry Press (戈克尔 G W. 有机化学手册. 2 版. 张书圣, 温永红, 丁彩凤, 等, 译. 北京: 化学工业出版社), 2006: 679
- [12] Lyman W J, Reehl W F, Rosenblatt D H. *Handbook of Chemical Property: Estimation Methods*. Xu Z H, Mao Z X, Wang L S, et al, transl. Beijing: Chemical Industry Press (莱曼 W J, 雷尔 W F, 罗森布拉特 D H. 化学性质手册: 估算方法. 许志宏, 毛卓雄, 王乐珊, 等, 译. 北京: 化学工业出版社), 1991: 201