

## 高效液相色谱法测定芒草 $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ 辐照降解副产物

李夏洁<sup>1</sup>, 李清明<sup>1,2\*</sup>, 苏小军<sup>2</sup>, 熊冬梅<sup>2</sup>, 胡秋龙<sup>2</sup>, 熊兴耀<sup>3</sup>

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 基于高效液相色谱法建立了同时定量分析芒草  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  辐照降解副产物(包括酚类、呋喃类和有机酸等 9 种)的方法。结果表明, 采用  $\text{C}_{18}$  色谱柱, 柱温  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 以乙腈- $0.01\text{ mol}(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (用磷酸调节 pH 至 2.7) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为  $0.8\text{ mL}/\text{min}$ , 多波长紫外检测, 可实现对目标化合物的有效分离和测定, 相对标准偏差为  $1.5\%\sim 2.3\%$ , 最低检出限为  $0.10\sim 0.89\text{ mg}/\text{L}$ 。在该条件下对经  $1\ 200\text{ kGy }^{60}\text{Co } \gamma$  辐照处理的芒草水提液进行检测, 检测出水提液中目标化合物对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛、对香豆酸、糠醛、甲酸、乙酸的质量浓度分别为  $17.78$ 、 $12.43$ 、 $3.26$ 、 $15.40$ 、 $10.18$ 、 $16.42$ 、 $2.52$ 、 $102.29$ 、 $86.24\text{ mg}/\text{L}$ 。

**关键词:** 芒草;  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  辐照; 酚类化合物; 呋喃类化合物; 有机酸; 高效液相色谱

中图分类号: Q691.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)05-0527-06

## Using HPLC to determinate the main byproducts degraded by $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ irradiation on miscanthus

LI Xiajie<sup>1</sup>, LI Qingming<sup>1,2\*</sup>, SU Xiaojun<sup>2</sup>, XIONG Dongmei<sup>2</sup>, Hu Qiulong<sup>2</sup>, XIONG Xingyao<sup>3</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China; 3.The Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China.)

**Abstract:** An analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) for separation and quantitative determination 9 kinds of byproducts degraded by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  irradiation on *Miscanthus* was developed. The separation was carried out on a  $\text{C}_{18}$  column with the following conditions: the mobile phase of acetonitrile and  $0.01\text{ mol}(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (phosphate adjust to  $\text{pH}=2.7$ ),  $25\text{ }^\circ\text{C}$  of column temperature, flow rate of  $0.8\text{ mL}/\text{min}$  and multi-wavelength detection. The result showed that the byproducts of *Miscanthus* degraded from  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  irradiation were well separated and their contents were well determined with relative standard deviations from  $1.5\%$  to  $2.3\%$ , and detection limits varied from  $0.10$  to  $0.89\text{ mg}/\text{L}$ . Water extracts of *Miscanthus* irradiated with  $1\ 200\text{ kGy }^{60}\text{Co } \gamma$  were detected using the methods at above condition, it was found that the target chemicals in water extracts were included in p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, p-coumaric acid, furfural, formic acid, and acetic acid, and their contents was  $17.78\text{ mg}/\text{L}$ ,  $12.43\text{ mg}/\text{L}$ ,  $3.26\text{ mg}/\text{L}$ ,  $15.40\text{ mg}/\text{L}$ ,  $10.18\text{ mg}/\text{L}$ ,  $16.42\text{ mg}/\text{L}$ ,  $2.52\text{ mg}/\text{L}$ ,  $102.29\text{ mg}/\text{L}$ , and  $86.24\text{ mg}/\text{L}$ , respectively. It was proved that the method was applicable to quantitative determination the main degradation byproducts of *Miscanthus* with  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation pretreatment.

**Keywords:** *Miscanthus*;  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  gamma irradiation; phenolic compounds; furan compounds; organic acids; high performance liquid chromatography (HPLC)

芒草是禾本科多年生草本植物, 适应性强, 产量高<sup>[1]</sup>, 在中国资源丰富, 是一种优良的制取燃料

乙醇的木质纤维素原料。中国在《生物质能源“十二五”规划》中把木质纤维素制取燃料乙醇的研究作为重点项目<sup>[2]</sup>。木质纤维素是由纤维素、半纤维素和木质素紧密结合构成的,它很难被纤维素酶水解成单糖而发酵成乙醇,因此,在酶解木质纤维素原料前通常要经过预处理来打破它的结构。预处理是在高温、高压和辐射或强酸、强碱等条件下进行的,因此,原料在结构被打破的同时还会发生一些降解作用,从而产生一些不可用于制取乙醇的降解副产物。这些副产物有的对后续酶解、菌种发酵有抑制作用,有的具有可利用价值,如香草醛可用作化妆香精和治疗癫痫病,对香豆酸对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、大肠杆菌及绿脓杆菌等均有不同程度的抑制作用,等等,因此,定性、定量检测木质纤维素预处理后的降解副产物对后续酶解、菌种发酵的脱毒以及副产物的有效利用等具有重要意义。

木质纤维素降解副产物主要包括酚类化合物、呋喃类化合物和有机酸<sup>[3-4]</sup>等 3 大类。原料不同,所用的预处理方法也不同,所产生的抑制物种类及含量也不一样<sup>[4-5]</sup>。经 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照预处理芒草中含量较高且对后续酶解、发酵有抑制作用的降解副产物较多,主要包括香草醛、香草酸、对羟基苯甲酸、4-羟基苯甲醛、对香豆酸、丁香酸等 6 种酚类化合物和糠醛等呋喃类化合物以及甲酸、乙酸等有机酸<sup>[6]</sup>。不同类型副产物的化学性质不同,用高效液相色谱法对其进行检测的检测条件也不一致,要同时检测出这几种不同类型的物质,常需要对检测条件进行摸索。虽然已有关于糠醛<sup>[7]</sup>、酚类化合物<sup>[8-9]</sup>、有机酸<sup>[10-11]</sup>高效液相检测的研究,但关于同时定量检测出这些目标化合物的方法尚未见报道。笔者探寻芒草经 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照后的主要降解副产物的高效液相色谱定量检测方法,并用建立的方法测定 1 200 kGy <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照芒草中各目标化合物的含量,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

芒草采自湖南农业大学教学科研基地。

### 1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:甲醇和乙腈(色谱纯,CNM 公司);浓盐酸、乙酸乙酯和无水硫酸镁(分析纯,国药集团

化学试剂有限公司);磷酸(分析纯,金华大化学试剂有限公司);磷酸氢二铵(分析纯,西陇化工股份有限公司)。水为超纯水。

标准品:香草酸(纯度 98%,国药集团化学试剂有限公司);丁香酸和对香豆酸(纯度 98%,西亚试剂公司);对羟基苯甲酸和 4-羟基苯甲醛(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);香草醛、糠醛、甲酸和乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

主要仪器:中草药粉碎机(广州华凯机电设备有限公司);BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪(配有紫外可变波长检测器 VWD、Agilent 化学工作站和 150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱,美国 Agilent 公司)。

### 1.3 试验条件的确定

#### 1.3.1 标准溶液的配制

准确称取上述 9 种标准品,用 5%的乙腈-水溶液(用磷酸调 pH 至 2.7)分别配制如下单标准溶液作为贮备液:质量浓度 50 mg/L 的对羟基苯甲酸;50 mg/L 的香草酸;25 mg/L 的丁香酸;50 mg/L 的 4-羟基苯甲醛;50 mg/L 的香草醛;75 mg/L 的对香豆酸;50 mg/L 的糠醛;50 mg/L 的甲酸;50 mg/L 的乙酸。以 9 种单标准溶液为基础,配制含 9 种标准品的混合标准溶液,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

#### 1.3.2 芒草预处理

辐照处理在湖南省辐射技术应用研究中心进行。试验采用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照源,源强为  $9.99 \times 10^{15}$  Bq,剂量率为 2 kGy/h。将准备好的试验材料置于辐射场中,于室温条件下进行照射,选用辐照剂量为 1 200 kGy 的样品。辐照后将样品用中草药粉碎机粉碎,装入磨口玻璃瓶中备用。

#### 1.3.3 辐照芒草中目标化合物的提取

称取 1.00 g 的芒草辐照样品,加入 20 mL 蒸馏水,在 80  $^{\circ}$ C 时恒温水浴 30 min,过滤,取滤液。先用浓盐酸调节滤液的 pH 值至 2.0,再用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,混匀收集有机相,然后用无水硫酸镁脱水,抽滤,除去沉淀。有机相于 63  $^{\circ}$ C、0.085 MPa 下减压旋转蒸发至干后,用 20 mL 5%的乙腈-水溶液(用磷酸调 pH 至 2.7)溶解。

### 1.3.4 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱。流动相 A 相为 0.01 mol/L 磷酸氢二铵溶液(用磷酸调 pH 至 2.7), B 相为乙腈。梯度洗脱程序为: 0~25 min B 相占流动相的比率为 5%~20%; 25~30 min B 相占流动相的比率为 20%~80%; 30~35 min B 相占流动相的比率为 80%~5%; 35~40 min B 相占流动相的比率为 5%。柱温 25 °C; 多波长(205、218、230、256、280、310 nm)进行检测; 流速为 0.8 mL/min; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 辐照芒草中目标化合物分离条件的确定

#### 2.1.1 检测波长的选取

用液相对 9 种物质的标准品分别进行全波长(190~400 nm)检测, 以确定各物质的最大吸收波长, 结果表明, 各标准品的最大紫外吸收波长有明显差异。甲酸、乙酸、糠醛、对羟基苯甲酸的最大吸收波长分别为 206、204、278、256 nm, 香草酸、

丁香酸的最大吸收波长均为 218 nm, 4-羟基苯甲醛、香草醛、对香豆酸的最大吸收波长分别为 284、230、310 nm。综合考虑后确定检测波长为 205、218、230、256、280、310 nm。

#### 2.1.2 流动相的选取

##### 2.1.2.1 流动相中有机溶剂的选取

分别以甲醇和乙腈作为流动相中的有机溶剂, 比较各目标化合物的分离效果及峰形, 结果表明, 在选用甲醇作为流动相中的有机溶剂时, 混标的 HPLC 色谱图中 4-羟基苯甲醛和香草醛 2 个峰之间出现连峰, 甲酸、乙酸的单标 HPLC 色谱图中有基线干扰现象。这可能是因为乙腈截止波长为 190 nm, 甲醇截止波长为 205 nm, 而样品所用的检测波长应大于流动相截止波长 20 nm 左右。选用乙腈作为流动相中的有机溶剂时, 各目标产物峰形窄尖, 在达到有效分离的同时缩短了整个分析时间(表 1), 且乙腈的灵敏度比较高, 柱压低, 故选择乙腈作为流动相中的有机溶剂。

表1 以甲醇-水溶液和乙腈-水溶液为流动相时各目标化合物的保留时间

| 溶剂 | 保留时间/min |       |        |        |        |        |         |        |        |
|----|----------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
|    | 甲酸       | 乙酸    | 糠醛     | 对羟基苯甲酸 | 香草酸    | 丁香酸    | 4-羟基苯甲醛 | 香草醛    | 对香豆酸   |
| 甲醇 | 2.457    | 3.406 | 10.989 | 18.352 | 22.532 | 23.626 | 27.459  | 28.001 | 32.724 |
| 乙腈 | 2.291    | 2.945 | 8.836  | 12.204 | 14.285 | 15.239 | 16.170  | 18.779 | 19.491 |

##### 2.1.2.2 酸种类的选取

酚类化合物容易产生解离, 甲酸、乙酸均为弱酸, 在水溶液中也会解离, 以非单一的形式存在, 这容易导致色谱峰形变宽、拖尾和不对称等现象出现, 因此, 可以在流动相中加入酸来抑制上述化合物的电离, 使它们能够以分子的形式在反相柱上保留。液相色谱的分离效果与酸的种类有关<sup>[12]</sup>, 目前, 用液相检测酚类化合物时多数是利用乙酸<sup>[13]</sup>或甲酸<sup>[14]</sup>对流动相进行 pH 调节, 本试验中需要在低紫外检测波长下进行检测, 而作流动相的物质在检测波长附近应没有吸收, 否则, 会有基线干扰, 因此, 选择磷酸作为 pH 的调节剂。

##### 2.1.2.3 流动相中缓冲盐的选取

缓冲盐溶液能够有效改善峰形, 影响酸存在形式的稳定性, 从而影响分离效果。芒草样品的成分复杂, 含有多种杂质, 如果没有缓冲盐溶液的缓冲就会形成负峰<sup>[15]</sup>。磷酸氢二铵是在检测波长处无吸收的弱酸电离抑制剂, 因此, 本试验中选择磷酸氢二铵为缓冲盐溶液。

##### 2.1.2.4 流动相 pH 的选取

在柱温 35 °C、流速 0.8 mL/min 的条件下, 用磷酸调节流动相中磷酸氢二铵盐溶液 pH 进行单因素试验的结果见表 2。由表 2 可知, pH 对目标化合物分离效果和保留时间的影响不明显。

表2 不同pH条件下各目标化合物的保留时间

| pH  | 保留时间/min |       |       |        |        |        |         |        |        |
|-----|----------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
|     | 甲酸       | 乙酸    | 糠醛    | 对羟基苯甲酸 | 香草酸    | 丁香酸    | 4-羟基苯甲醛 | 香草醛    | 对香豆酸   |
| 2.5 | 2.306    | 2.952 | 8.839 | 12.188 | 14.296 | 15.264 | 16.147  | 18.762 | 19.468 |
| 2.7 | 2.395    | 2.965 | 8.835 | 12.151 | 14.259 | 15.229 | 16.121  | 18.753 | 19.429 |
| 2.9 | 2.275    | 2.943 | 8.852 | 12.136 | 14.224 | 15.172 | 16.161  | 18.780 | 19.422 |
| 3.1 | 2.253    | 2.926 | 8.822 | 11.995 | 14.086 | 15.027 | 16.087  | 18.726 | 19.287 |
| 3.3 | 2.236    | 2.911 | 8.82  | 11.86  | 13.925 | 14.839 | 16.076  | 18.716 | 19.166 |

随着 pH 值增大, 香草醛和对香豆酸的保留时间间隔逐渐变小, 分离度变小, 在 pH 为 3.3 时, 香草醛和对香豆酸的分离度为 1.37(通常分离度大于等于 1.5 才视为 2 个峰完全分离), 因此, pH 为 3.3 时香草醛和对香豆酸的分离度不够, 形成连峰。因为长时间使用过低的 pH 会引起色谱柱键合相的损失, 而且可能导致基线严重漂移<sup>[16]</sup>, 所以, 综合考虑后确定流动相 pH 为 2.7。

### 2.1.3 流速的选择

在 35 °C、流动相中盐溶液 pH 为 2.7 的条件下

表3 不同流速条件下各目标化合物的保留时间

| 流速/<br>(mL·min <sup>-1</sup> ) | 保留时间/min |       |        |        |        |        |         |        |        |
|--------------------------------|----------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
|                                | 甲酸       | 乙酸    | 糠醛     | 对羟基苯甲酸 | 香草酸    | 丁香酸    | 4-羟基苯甲醛 | 香草醛    | 对香豆酸   |
| 0.5                            | 3.614    | 4.631 | 12.929 | 16.082 | 18.507 | 19.442 | 21.000  | 23.901 | 23.901 |
| 0.8                            | 2.289    | 2.939 | 8.729  | 11.776 | 13.864 | 14.842 | 15.618  | 18.236 | 18.754 |
| 1.0                            | 1.820    | 2.316 | 7.004  | 9.691  | 11.792 | 12.882 | 13.196  | 15.823 | 16.466 |
| 1.2                            | 1.522    | 1.935 | 5.955  | 8.386  | 10.389 | 11.526 | 11.526  | 14.111 | 14.827 |

### 2.1.4 柱温的选择

在流动相中盐溶液 pH 为 2.7、流速为 0.8 mL/min 的条件下, 分别设置柱温 20、25、30、35、40 °C 进行单因素试验, 结果(表 4)表明, 随着柱温升高, 大部分目标化合物的保留时间有所提前, 其中香草醛和对香豆酸、丁香酸和 4-羟基苯甲醛的分

分别设置流速 0.5、0.8、1.0、1.2 mL/min 进行单因素试验的结果见表 3。由表 3 可知, 流速对分离度和各峰保留时间的影响较大。流速越大, 各峰的保留时间明显提前, 使得整个分析时间大大缩短。流速在 0.5 mL/min 时, 香草醛和对香豆酸出峰时间重叠; 流速为 1.0 mL/min 时, 丁香酸和 4-羟基苯甲醛出峰不能完全分开; 流速为 1.2 mL/min 时, 丁香酸和 4-羟基苯甲醛的出峰时间重叠; 流速为 0.8 mL/min 时, 各峰分离效果较好, 且整个分离时间较为合适, 所以, 本试验中确定流速为 0.8 mL/min。

离度逐渐减少。在柱温为 40 °C 时, HPLC 色谱图中的香草醛和对香豆酸的色谱峰相连, 又因缓冲盐在较低温时易结晶析出, 对色谱柱有不利影响, 所以, 综合考虑各色谱峰的分离度和峰形后确定柱温为 25 °C。

表4 不同柱温条件下各目标化合物的保留时间

| 温度/<br>°C | 保留时间/min |       |       |        |        |        |         |        |        |
|-----------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
|           | 甲酸       | 乙酸    | 糠醛    | 对羟基苯甲酸 | 香草酸    | 丁香酸    | 4-羟基苯甲醛 | 香草醛    | 对香豆酸   |
| 20        | 2.344    | 3.037 | 9.384 | 13.757 | 15.567 | 16.320 | 17.837  | 20.169 | 21.311 |
| 25        | 2.338    | 3.026 | 9.254 | 13.254 | 15.125 | 15.934 | 17.226  | 19.615 | 20.539 |
| 30        | 2.291    | 2.945 | 8.836 | 12.204 | 14.285 | 15.239 | 16.170  | 18.779 | 19.491 |
| 35        | 2.289    | 2.939 | 8.729 | 11.776 | 13.864 | 14.842 | 15.618  | 18.236 | 18.754 |
| 40        | 2.268    | 2.897 | 8.481 | 11.119 | 13.306 | 14.362 | 14.894  | 17.609 | 17.938 |

### 2.1.5 洗脱梯度的选择

以 0.01 mol/L 磷酸氢二铵盐溶液(用磷酸调 pH 为 2.7)为 A 相, 以乙腈为 B 相, 在流速 0.8 mL/min、柱温为 25 °C 的条件下设置 3 个梯度洗脱条件(表 5)。

表5 洗脱梯度条件

| 梯度序号 | B 相占流动相的比率/% |           |           |           |
|------|--------------|-----------|-----------|-----------|
|      | 0~25 min     | 25~30 min | 30~35 min | 35~40 min |
| 1    | 5~20         | 20~80     | 80~5      | 5         |
| 2    | 5~30         | 30~80     | 80~5      | 5         |
| 3    | 5~40         | 40~80     | 80~5      | 5         |

由表 6 可知, 在 0~25 min, 随着 B 相所占比率的增加, 各目标化合物的保留时间提前, 分离度也降低。在梯度 3 中, 香草醛和对香豆酸的色谱峰相连, 香草酸和丁香酸的色谱峰相连。在梯度 1、2 中, 各目标化合物达到基线分离, 且分离效果较好, 但考虑到芒草样品成分复杂, 目标化合物分离度稍大, 两物质之间干扰较小, 因此, 确定洗脱梯度条件为表 5 中的梯度 1。

表6 不同梯度条件下各目标化合物的保留时间

| 梯度序号 | 保留时间/min |       |       |        |        |        |         |        |        |
|------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
|      | 甲酸       | 乙酸    | 糠醛    | 对羟基苯甲酸 | 香草酸    | 丁香酸    | 4-羟基苯甲醛 | 香草醛    | 对香豆酸   |
| 1    | 2.313    | 2.955 | 9.274 | 13.932 | 16.406 | 17.639 | 18.541  | 21.746 | 23.199 |
| 2    | 2.316    | 2.99  | 8.854 | 12.021 | 13.589 | 14.19  | 15.526  | 17.461 | 18.009 |
| 3    | 2.315    | 2.988 | 8.467 | 10.805 | 11.943 | 12.29  | 13.679  | 15.058 | 15.233 |

## 2.2 标准曲线的制作

将单一标准品对比混合标样的色谱图进行分析, 通过对比各峰保留时间的位置, 确定 9 种目标

产物的相应峰位。图 1 为目标产物混合标准溶液的 HPLC 色谱图。

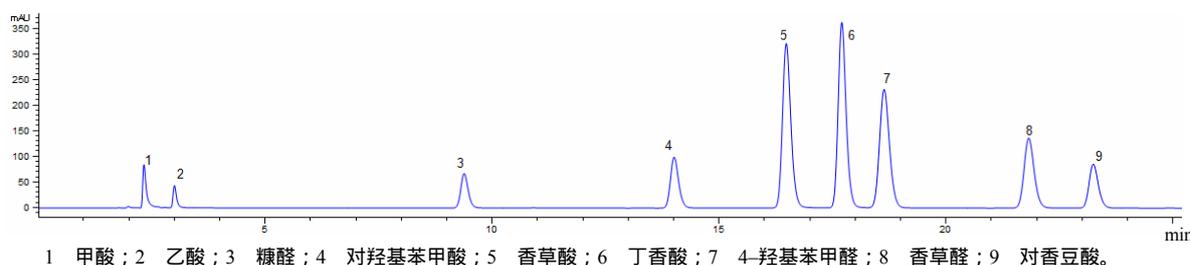


图1 混合标准溶液的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of a mixed standard solution

对 1.3.1 中配制的标准溶液里各目标化合物浓度进行稀释, 得到 5 个浓度梯度的混合标准溶液。各浓度梯度的混标按前述色谱条件分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 以质量浓度  $X$  ( $\text{mg/L}$ ) 对峰面积  $Y$  绘制标准曲线。其保留时间、线性回归方程和检出限(信噪比为 3) 结果如表 7 所示。对芒草辐照预处理物料热水浴萃

取物进行加标回收试验, 样品重复进样测定 6 次; 加入待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, 结果见表 7。由表 7 可知, 各目标化合物的加标回收率均高于 96%, 相对标准偏差  $< 2.5\%$  ( $n=6$ ), 结果满足定量分析要求。

表7 9 种目标化合物的保留时间、线性回归方程、检出限、加标回收率和精密度( $n=6$ )

| 样品      | 保留时间/min | 线性范围/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | 回归方程               | 相关系数    | 检出限/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | 加标回收率/% | 相对标准偏差/% |
|---------|----------|---------------------------------------|--------------------|---------|--------------------------------------|---------|----------|
| 甲酸      | 2.316    | 40 ~ 200                              | $y=0.7052x-1.4638$ | 1.000 0 | 0.10                                 | 104     | 2.1      |
| 乙酸      | 2.990    | 30 ~ 230                              | $y=0.5459x+7.6154$ | 0.999 5 | 0.12                                 | 97      | 2.0      |
| 糠醛      | 9.370    | 0 ~ 50                                | $y=102.88x+84.744$ | 0.999 6 | 0.56                                 | 101     | 1.8      |
| 对羟基苯甲酸  | 13.994   | 0 ~ 50                                | $y=77.803x+10.42$  | 0.999 9 | 0.24                                 | 97      | 2.2      |
| 香草酸     | 16.465   | 0 ~ 50                                | $y=83.668x+18.451$ | 0.999 9 | 0.62                                 | 98      | 1.8      |
| 丁香酸     | 17.686   | 0 ~ 25                                | $y=93.761x+8.3075$ | 0.999 9 | 0.37                                 | 103     | 2.2      |
| 4-羟基苯甲醛 | 18.618   | 0 ~ 50                                | $y=92.469x+26.692$ | 0.999 9 | 0.10                                 | 101     | 1.9      |
| 香草醛     | 21.805   | 0 ~ 50                                | $y=68.963x+21.751$ | 0.999 9 | 0.10                                 | 101     | 1.5      |
| 对香豆酸    | 23.227   | 0 ~ 75                                | $y=94.189x-121.14$ | 0.999 9 | 0.89                                 | 96      | 2.3      |

## 2.3 芒草辐照预处理后目标化合物的测定

取经 1 200  $\text{kGy}$   $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  辐照后的芒草, 按照 1.2.3 中的方法提取芒草降解副产物样品。在优化

后的色谱条件下测定样品中 9 种目标化合物的含量, 其色谱分离结果如图 2 所示。

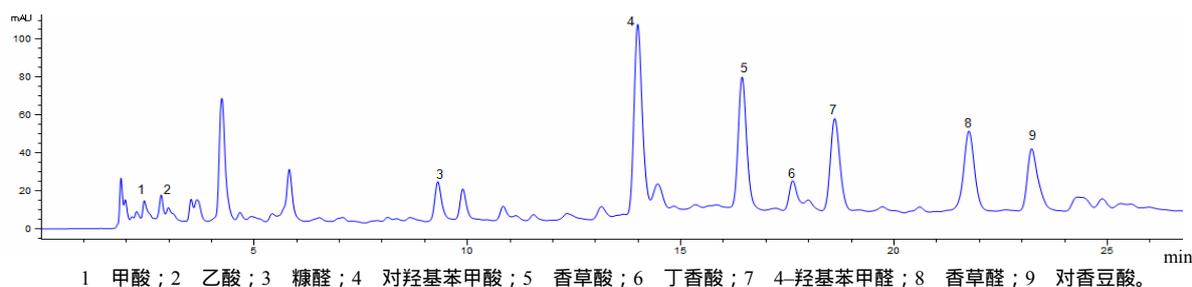


图2 芒草辐照预处理样品水提液的HPLC谱图

Fig.2 HPLC chromatogram from the water extracts of miscanthus pretreated with irradiation

由图 2 可知, HPLC 法可用于对芒草辐照预处理后主要降解副产物的定量分析, 9 种主要降解副产物的分离效果较好。计算结果表明, 芒草水提液中甲酸、乙酸、糠醛、对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛和对香豆酸的质量浓度分别为 102.29、86.24、2.52、17.78、12.43、3.26、15.40、10.18、16.42 mg/L。

### 3 结论与讨论

本研究中同时检测出了木质纤维素原料中的 3 大类副产物, 跟江智婧等<sup>[9]</sup>的方法相比, 在目标物达到有效分离的同时大大缩短了整个分析时间, 提高了工作效率; 与气质联用的方法相比<sup>[3,6]</sup>, 液相色谱法无需硅烷化, 克服了气质联用法样品预处理要求高、衍生化不彻底等缺点。建立了同时检测出木质纤维素原料中 9 种主要副产物的定量分析方法: 采用 C<sub>18</sub> 色谱柱, 柱温 25 °C, 以乙腈-0.01 mol(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>(用磷酸调节 pH 至 2.7) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 多波长紫外检测, 在此色谱条件下, 9 种主要的降解副产物得到了较好的分离, 相对标准偏差为 1.5%~2.3%, 最低检出限为 0.10~0.89 mg/L, 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。经 1 200 kGy<sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照处理后的芒草水提液, 在 4~6 min 还检测出了 2 个明显的峰, 按出峰时间推测, 这可能是其他有机酸所导致的(蒋怡乐等<sup>[6]</sup>利用气质联用法定性检测出芒草辐照降解产物中还有乳酸、乙酰丙酸和琥珀酸等有机酸)。芒草辐照降解产物成分复杂, 难以全部定性定量, 其后续研究与分析还有待开展。

#### 参考文献:

- [1] 易自力. 芒属能源植物资源的开发与利用[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(5): 455-463.
- [2] 孙健, 陈砺, 王红林. 纤维素原料生产燃料酒精的技术现状[J]. 可再生能源, 2004(6): 5-9.
- [3] 朱均均, 勇强, 陈尚钡, 等. 玉米秸秆蒸汽爆破降解

- 产物的分析[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(2): 22-26.
- [4] 林贝. 玉米秸秆酸解副产物对酒精发酵影响的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2007.
- [5] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, et al. Inhibition of cellulases by phenols[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3): 170-176.
- [6] 蒋怡乐. 芦苇、芒草 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照降解产物的分析及结构表征[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [7] 江滔, 路鹏, 李国学. 玉米秸秆稀酸水解时糠醛形成原因及影响因素[J]. 农业工程学报, 2009(7): 185-189.
- [8] 朱峰, 涂貌贞, 王丽莉, 等. 高效液相色谱法同时测定纺织品中 10 种酚类化合物[J]. 分析测试学报, 2013(3): 336-340.
- [9] 江智婧, 朱均均, 李鑫, 等. 反相高效液相色谱法定量分析木质素的主要降解产物[J]. 色谱, 2011, 29(1): 59-62.
- [10] Chen S F, Mowery R A, Castleberry V A, et al. High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1104(1): 54-61.
- [11] 赵景婵, 郭治安, 常建华, 等. 有机酸类化合物反相高效液相色谱法的分离条件研究[J]. 色谱, 2001, 19(3): 260-263.
- [12] 刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 等. 天然酚酸类化合物的反相高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2002, 20(3): 245-248.
- [13] 姚兴东, 聂园梅. 紫锥花种属中酚类化合物的 HPLC 分析[J]. 分析科学学报, 2006, 22(2): 199-201.
- [14] 欧阳新平, 陈子龙, 邱学青. 超高效液相色谱/高分辨质谱法测定木质素氧化降解产物中单酚类化合物[J]. 分析化学, 2014(5): 22.
- [15] 尹莉莉, 赵百东, 杨虹琦, 等. 高效液相色谱法测定烤烟非挥发性有机酸含量[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2014, 40(2): 139-143.
- [16] 陈磊, 黄雪松. 高效液相色谱法同时检测黄酒中的 5-羟甲基糠醛和 9 种多酚[J]. 分析化学, 2010(1): 133-137.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库