

高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇^{*}

袁 野, 应向贤, 范光先, 诸葛健
(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要 建立了一种比较精确和简便的高碘酸氧化法直接测定发酵液中赤藓糖醇质量浓度的方法, 通过校正吸光度值以消除发酵液中葡萄糖对赤藓糖醇质量浓度测定的干扰和影响, 赤藓糖醇质量浓度测定值的相对误差控制在 5% 以内. 精密度实验和回收率实验表明, 此法准确可靠.

关键词 赤藓糖醇 发酵液 高碘酸氧化 定量分析

中图分类号 :TQ223.163

文献标识码 : A

Quantitative Analysis in Erythritol in Fermentation Supernatant by Periodate Oxidation

YUAN Ye, YING Xiang-xian, FAN Guang-xian, ZHUGE Jian
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : A quantitative method for erythritol was developed by periodate oxidation, which allowed the easy and rapid analysis of erythritol of the fermentation supernatant. The accuracy test and recovery test showed that the method was accurate and reliable.

Key words : erythritol ; fermentation supernatant ; periodate oxidation ; quantitative analysis

赤藓糖醇是一种新型食品甜味剂,它具有降低热值显著和副作用小的特点,在当今多元醇甜味剂应用领域有着诱人的开发前景.赤藓糖醇的工业化生产采用酵母耗氧发酵法进行,发酵液中赤藓糖醇的定量测定常采用气相色谱法和高效液相色谱法,这两种方法的特点是用仪器分析,测定的程序包括对发酵液进行去除细胞、蛋白、多糖、有机酸和糖醇的衍生化等预处理步骤.高碘酸氧化法是一种较早应用的化学测定方法^[1],高碘酸在酸性条件下氧化带有邻接羟基的化合物,如糖和多元醇等,当反应在室温下完成,高碘酸被还原成碘酸,多元醇的末端羟基被氧化成甲醛,其余邻接羟基被氧化成甲酸.由于氧化反应存在定量关系,可以通过测定反应产物的量来测定多元醇的含量.实测操作时,一

般使氧化剂高碘酸过量,在一定反应时间内完全氧化多元醇,再用亚砷酸盐等还原剂终止反应,利用变色酸与甲醛反应生成紫红色化合物,通过比色分析测定多元醇含量.

1 材料与方法

1.1 仪器

722 分光光度计.

1.2 试剂

赤藓糖醇、葡萄糖、蒽酮、高碘酸钠、亚砷酸钠、硫酸、变色酸,均为分析纯试剂.

1.3 方法

1.3.1 糖的测定 蒽酮法^[2].

* 收稿日期 :1999-01-28 修改日期 :1999-11-03.

作者简介:袁野(1969 年 1 月生),男,四川乐山人,工学硕士.

1.3.2 赤藓糖醇的测定 在50 mL 的容量瓶中依次加入 1 mL 样品,9 mL 水,0.5 mL 10 mol/L 的硫酸,摇匀,加入 2.5 mL 0.1 mol/L 的高碘酸钠反应,然后加入 2.5 mL 1 mol/L 的亚砷酸钠终止反应,用水定容至刻度.取上述混合液 1 mL,加入 5 mL 10 g/L 的变色酸试剂,沸水浴 15 min,冷却至室温后用分光光度计于 570 nm 下测定.空白以纯水代替样品,同样操作.

2 结果与讨论

2.1 高碘酸氧化时间的确定

用 0.80 g/L 的标准赤藓糖醇溶液进行测定,测得氧化时间和吸光度的关系,见表 1.

表 1 氧化时间的影响
Tab.1 The influence of oxidation time

高碘酸氧化时间/min	吸光度 OD ₅₇₀
1	0.378
5	0.381
7	0.380
9	0.383
11	0.383
12	0.382

从表 1 可以看出,高碘酸氧化反应完成的时间很短,氧化时间在 1~12 min 之间均不影响测定结果.考虑到实验操作的方便,选取 5 min 作为氧化操作时间.

2.2 赤藓糖醇质量浓度线性范围的考证

配制质量浓度分别为 0.4,0.8,1.2,1.6 g/L 的标准赤藓糖醇溶液,测得吸光度和质量浓度的关系曲线,见图 1.

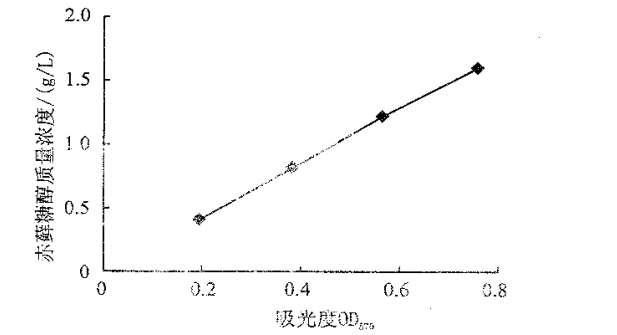


图 1 赤藓糖醇质量浓度与吸光度的关系曲线
Fig.1 The curve between erythritol concentration and absorptive value

对以上曲线进行直线回归,得式(1)

$$Y = 2.124X \tag{1}$$
$$R = 0.999\ 8$$

X——吸光度 OD₅₇₀,
Y——赤藓糖醇质量浓度(g/L).

从相关系数 R 值看出,赤藓糖醇质量浓度的范围为 0.4~1.6 g/L 时,线性相关较好.

2.3 赤藓糖醇和葡萄糖混合液中葡萄糖的存在对赤藓糖醇测定结果的影响及排除

配制赤藓糖醇和葡萄糖混合液(6 号液不含葡萄糖,作对比).见表 2.

表 2 不同混合液中赤藓糖醇和葡萄糖的浓度
Tab.2 Both erythritol concentration and glucose concentration in different solutions

混合液	混合液中赤藓糖醇质量浓度/(g/L)	混合液中葡萄糖质量浓度/(g/L)
1	0.5	20.0
2	0.5	16.0
3	1.0	12.0
4	1.0	6.0
5	1.5	1.2
6	1.5	0.00

再配制质量浓度分别为 0.8,4.8,9.6,14.4,20.0 g/L 的一组葡萄糖标准溶液.用高碘酸氧化法进行测定时,将一组赤藓糖醇标准溶液、一组葡萄糖标准溶液和 6 种混合液同法进行反应并测定.得到一条标准葡萄糖溶液的吸光度值与质量浓度关系曲线(图 2),当葡萄糖质量浓度为 20.0 g/L 时,吸光度 OD₅₇₀ 值达 0.218.曲线的回归方程见式(2).

$$Y = -0.0004X^2 + 0.0188X + 0.0131 \tag{2}$$
$$R = 0.997\ 6$$

X——葡萄糖质量浓度(g/L),
Y——吸光度 OD₅₇₀.

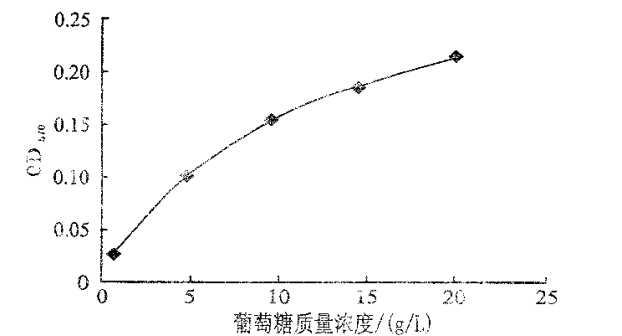


图 2 标准葡萄糖质量浓度与吸光度曲线
Fig.2 The curve between standard glucose quality concentration and absorptive value

实验证实,当混合液中的葡萄糖质量浓度较大时,测得的赤藓糖醇质量浓度明显偏大(表 3)。校正的方法如下,已知混合液中的葡萄糖质量浓度,根据公式(2)求得葡萄糖吸光度 Y 值,在测得的混合液吸光度值中减去葡萄糖吸光度 Y 值,得到校正吸光度值,再代校正吸光度值到公式(1),求得混合液

中的赤藓糖醇质量浓度。
考虑到配制的不同批次试剂可能有误差,同时为了考察方法是否稳定可靠,采用两个以上批次的试剂对 1~5 号赤藓糖醇和葡萄糖混合液分别进行了 4 次测定,测得赤藓糖醇质量浓度,结果见表 4。

表 3 高碘酸氧化法测定混合液中赤藓糖醇质量浓度的结果(不校正)
Tab.3 The result of detecting erythritol quality concentration (unrectified)

混合液	赤藓糖醇质量浓度/(g/L)	4 次测定值/(g/L)				平均值/(g/L)	绝对误差/(g/L)	相对误差/%
		1	2	3	4			
1	0.5	0.92	0.89	0.87	0.84	0.88	0.38	76
2	0.5	0.88	0.86	0.83	0.86	0.86	0.36	72
3	1.0	1.28	1.32	1.28	1.28	1.29	0.29	29
4	1.0	1.25	1.19	1.18	1.19	1.20	0.20	20
5	1.5	1.55	1.55	1.56	1.56	1.56	0.06	4
6	1.5	/	1.15	1.52	1.52	1.52	0.02	1.3

表 4 高碘酸氧化法测定混合液中赤藓糖醇质量浓度的结果(校正)
Tab.4 The result of detecting erythritol quality concentration of soultion by periodate oxidation(rectified)

混合液	赤藓糖醇质量浓度/(g/L)	4 次测定值/(g/L)				平均值/(g/L)	绝对误差/(g/L)	相对误差/%
		1	2	3	4			
1	0.5	0.44	0.44	0.42	0.40	0.43	0.07	14
2	0.5	0.44	0.44	0.45	0.45	0.45	0.05	10
3	1.0	0.96	0.95	0.98	0.94	0.96	0.04	4
4	1.0	1.02	0.95	0.99	0.99	0.99	0.04	1
5	1.5	1.5	1.47	1.49	1.49	1.48	0.02	1.3

通过校正,使混合液中葡萄糖的影响大为减小。当混合液中赤藓糖醇与葡萄糖质量浓度之比大于 1 比 12 时(葡萄糖作为碳源底物的赤藓糖醇发酵中后期属于这种情况),赤藓糖醇测定值的相对误

差可稳定地控制在 5% 以内。
2.4 精密度实验
用上述校正的方法对两批赤藓糖醇发酵液分别进行 3 次测定,结果见表 5。

表 5 发酵液中赤藓糖醇质量浓度的测定结果
Tab.5 The result of detecting erythritol of fermentation broth

发酵液批次	赤藓糖醇质量浓度测定值/(g/L)			平均值/(g/L)	标准偏差/%	变异系数/%
1	24.7	24.9	24.7	24.8	0.01	0.40
2	17.2	17.1	17.3	17.2	0.01	0.58

2.5 回收率实验

为考证方法的准确度,对两批赤藓糖醇发酵液进行了回收率实验。测得批次 1 的赤藓糖醇质量浓度和葡萄糖质量浓度分别为 24.8 g/L 和 40.6 g/L

L,批次 2 的赤藓糖醇质量浓度和葡萄糖质量浓度分别为 17.2 g/L 和 73.6 g/L。取发酵液 2 mL,加入 20.1 g/L 的标准赤藓糖醇溶液 2 mL,按上述校正方法进行测定,每批次样测 3 次,结果见表 6。

表 6 回收率实验结果

Tab.6 The result of recovery rate test

发酵液批次	原液赤藓糖醇量/mg	加入赤藓糖醇量/mg	3 次实测值/mg			回收率/%			平均回收率/%
1	49.6	40.2	92.0	92.4	93.2	105	106	108	106
2	34.4	40.2	76.4	75.6	75.6	104	102	102	103

从精密度实验和回收率实验结果看,用本文介绍的方法测定发酵液中赤藓糖醇的质量浓度是比较准确的。作者建立的高碘酸氧化法测定发酵液中赤藓糖醇的质量浓度,不需要对发酵液进行层析分离,采用校正的方法直接测定发酵液中的赤藓糖醇质量浓度。与气相色谱法和高效液相色谱法相比,

此法不需要昂贵的仪器设备,不需要对发酵液进行去除蛋白、有机酸、多糖以及糖醇的衍生化等预处理,仅需离心发酵液去除酵母细胞,分析测定时间大为缩短,对于测定大批量的发酵液样品,高碘酸氧化法是可靠的方法。

参考文献

[1] MEHLENBACHER V C. Hydroxyl groups-oxidation with periodic acid and periodates [A]. In: MITCHELL J JR, KOLTHOFF I M. **Organic Analysis**[C]. Interscience Publishers Inc, 1953.

[2] 张维杰 编. 糖复合物生化技术[M]. 上海 :上海科技出版社,1993.

(责任编辑:秦和平)