

工 业

ASE-超高效液相色谱法快速测定烟草中的
多酚类物质刘芳^{1,2}, 杨柳¹, 孙林^{1,2}, 张霞^{1,2}, 缪明明¹, 丁中涛²

1 红塔烟草(集团)有限责任公司技术中心, 玉溪 653100;

2 云南大学化学科学与工程学院, 昆明 650091

摘要:建立了加速溶剂萃取(ASE)-超高效液相色谱(UPLC)同时测定烟草中6种多酚物质的快速方法。用50%的甲醇水溶液在50℃下对烟草样品加速溶剂萃取5 min, 循环萃取2次, 将萃取液定容过滤后, 用配置二极管阵列检测器的UPLC进行分析。此方法具有分离效率高、分析时间短、检测灵敏的优点。应用此方法对18种单料烟和14种成品卷烟中的6种多酚成分进行了测定。结果表明:①不论是在单料烟叶还是成品卷烟中, 绿原酸和芸香苷的含量均占多酚总量的90%以上;②在单料烟叶中, 烤烟中多酚的含量高于白肋烟和晒烟;③不同部位的烤烟中, 多酚含量从上部、中部和下部依次降低, 这表明多酚成分可成为烟叶等级判别和质量控制的化学指标之一;④烤烟型卷烟中多酚的含量显著高于混合型卷烟中多酚的含量。

关键词:加速溶剂萃取;超高效液相色谱;多酚;烟草

中图分类号:TS412

文献标识码:A

文章编号:1004-5708(2008)06-0001-05

Fast determination of polyphenols in tobacco by ASE-UPLC

LIU Fang^{1,2}, YANG Liu¹, SUN Lin¹, ZHANG Xia^{1,2}, MIAO Ming-ming¹,DING Zhong-tao²

1 R&D Center, Hongta Tobacco (Group) Co., Ltd., Yuxi 653100, China;

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: An accelerated solvent extraction (ASE)-ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for the fast determination of 6 polyphenols in tobacco was established. Tobacco samples were extracted by ASE in 50% methanol solution under 50 °C for 5 min twice. The extracted solution was analyzed by a UPLC equipped with diode array detector after filtration. This method has the merits of high separation performance, fast determination, and good sensitivity. Polyphenols in 18 tobacco leaves and 14 cigarette samples were detected. Results indicated that the content of chlorogenic acid and rutin accounted for above 90% in both tobacco leaves and cigarette samples. The content of polyphenols in flue-cured tobacco leaves were higher than that in burley tobacco and sun-cured tobacco. Polyphenols content in flue-cured tobacco leaves reduced gradually from upper to bottom, which indicates that polyphenol compounds may be used as the chemical index for the tobacco grade discrimination and quality control. In addition, polyphenols in flue-cured cigarette were evidently higher than those in blended type cigarette.

Key words: accelerated solvent extraction; ultra performance liquid chromatography; polyphenols; tobacco

作者简介:刘芳,女,在读硕士研究生,从事烟草制品有害成分检测,

E-mail: liuf811211@126.com

杨柳(通讯作者)男,博士,工程师,从事烟草化学研究,

Tel: 0877-2968271 E-mail: liuyang929@126.com;

收稿日期:2008-02-21

烟草多酚主要包括单宁类、香豆素类、黄酮类、花色素类化合物,是烟叶中重要的香气前体物。在烟草的生长发育、调制特性、烟叶色泽、烟气香味等方面起着重要作用,是衡量烟草外在品质和内在质量的一个重要因素^[1-3],因此测定烟草中的多酚含量对于了解烟叶香气质量和指导卷烟配方具有重要意义。

反相高效液相色谱法(RP-HPLC)是分析烟草中多酚的一种有效检测手段^[4-9]。然而普通HPLC法前处理时需有机溶剂对样品进行脱脂处理,操作较复杂且可能会造成目标物损失。

加速溶剂萃取(ASE)是一种操作简单、萃取效率高的新型样品前处理手段,其萃取过程在封闭体系下完成,对环境友好。超高效液相色谱(UPLC)是一种基于小颗粒填料技术,具有超高速、超高分离度和超高灵敏度的新一代液相分离技术。本文将这2种技术相结合,建立了快速分析烟草多酚的ASE-UPLC方法,并用此法对实际烟草样品中6种多酚的含量同时进行了测定。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

ASE 300 加速溶剂萃取仪(Dionex 公司); Acquity 超高效液相色谱仪(Waters 公司,配有二元溶剂管理器,自动进样器,色谱工作站); Millipore 超纯水仪(Millipore 公司)。

甲醇(色谱纯, DIMA 公司); 乙酸(AR, 汕头市达濠精细化学品公司); 二次石英蒸馏水(电阻率 ≥ 18.2 M Ω .cm); 烟叶和卷烟样品由红塔集团提供; 咖啡酸(99%)、七叶亭(99%)、茛菪宁(97%)、绿原酸(98%)、芸香苷(98%)、槲皮素(98%)(标样, Fluka 公司)。

1.2 样品前处理与分析

分别根据 GB/T5006.1、GB/T19616 和 YC/T31 对

卷烟抽样、烟草成批原料取样,并测定烟草及卷烟烟丝水分。将烟叶和烟丝样品分别粉碎至过40目筛,准确称取0.1g(精确至0.1mg)样品于11mL萃取池中,剩余空间用硅藻土充满,将萃取池中预先注入提取溶剂,加压、加热(预热5min)。在50℃和10342.5kPa条件下静态萃取5min,循环2次,再以35%池体积的萃取剂(体积分数为50%甲醇水溶液)冲洗萃取池,将萃取液定容至25mL,静置至室温。吸取适量萃取液,用0.2 μ m滤膜过滤,移入2mL色谱小瓶中进行UPLC分析。

分析条件为:

色谱柱: ACQUITY BEH-C18(2.1 \times 100mm, 1.7 μ m); 流动相A: 醋酸/甲醇/水(体积比1:44:5); 流动相B: 醋酸/甲醇/水(体积比1:5:44); 柱温: 35℃; 进样量: 1 μ L; 梯度条件如表1所示。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	A	B	流速/(mL/min)	曲线
0	10	90	0.3	1
5	70	30	0.3	6
6	10	90	0.3	1
7.5	10	90	0.3	1

在上述色谱条件下,标样和试样在340nm波长处的色谱图见图1。采用试样与标样对比保留时间和光谱图定性,外标法定量。

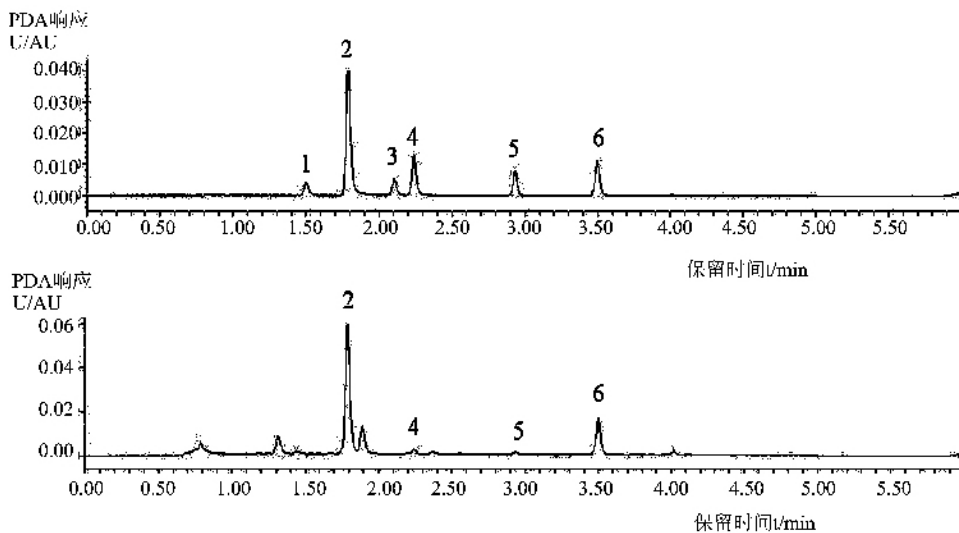


图1 标样和试样在340nm波长处的多酚色谱图

1. 槲皮素 2. 绿原酸 3. 七叶亭 4. 咖啡酸 5. 茛菪宁 6. 芸香苷

2 结果与讨论

2.1 萃取方法

萃取多酚的常用方法有加热回流萃取^[4-6]、加速溶剂萃取法^[7]、超声萃取^[9]、水浴法^[10]。为选择对多酚适宜的萃取方法,分别进行了多种方法的比较试验。结果表明,水浴法萃取不完全且耗时;加热回流萃取操作繁琐,多酚易分解,影响结果的准确性;超声萃取操作简单、萃取完全,但溶剂消耗大,不适合大批量试样处理。而加速溶剂萃取耗时短,溶剂消耗少,可将24个样品自动连续萃取完全,适合批量处理。因此,选择ASE作为本文的前处理方法。

2.2 萃取溶剂的选择

多酚类物质在极性有机溶剂中具有较大的溶解

度,在热丙酮及甲醇液中溶解性最好,多酚的萃取常用甲醇^[11],分别用丙酮和甲醇进行萃取比较实验,甲醇的萃取效果好,故选择甲醇为提取剂。首先,取一定量的标样,分别用40%、50%、60%(体积分数)的甲醇水溶液溶解并分析。结果显示,40%、50%甲醇水溶液无溶剂效应影响,60%的甲醇水溶液有影响。图2为萃取剂在不同体积分数配比下的分析效果图。A为40%、50%甲醇水溶液分析图,B为60%甲醇水溶液的检测结果。B图与A图相比,峰2出现毛刺,峰5、6峰型不尖锐。所以选择无溶剂效应的40%和50%甲醇水溶液作为萃取剂。然后,分别用40%和50%甲醇水溶液对试样萃取,经试验最终确定50%甲醇水溶液在50℃和10342.5 kPa静态萃取5 min,循环2次,以35%池体积萃取剂冲洗萃取池的条件下,萃取效果最好。

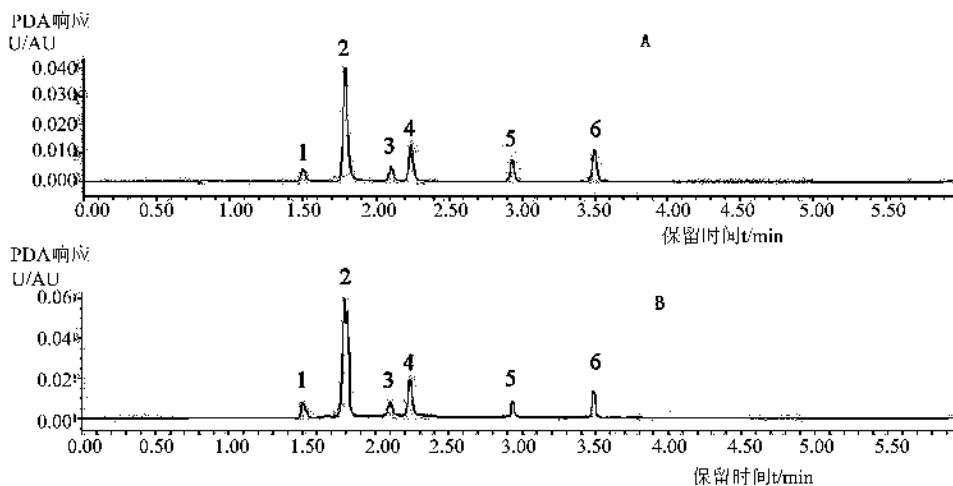


图2 标样分别在50%和60%甲醇水溶液的检测图

1. 槲皮素 2. 绿原酸 3. 七叶亭 4. 咖啡酸 5. 莨菪宁 6. 芸香苷

2.3 流动相的选择

多酚类物质化学性质较活泼,酚羟基易氧化和电离。在甲醇-水为流动相的环境下,多酚作为一种弱电解质会发生电离。生成的离子和未电离的中性分子在固定相表面有不同的保留行为,引起酚在固定相表面形成双重保留,导致分离效果差,峰形拖尾。实验选择1:44:5(体积比)的醋酸-甲醇-水为流动相,有效地抑制了多酚的电离,使分离效果和峰形得到改善^[5]。

2.4 主要多酚的光谱特征及检测波长的选择

在280~380 nm波长范围内,用PDA检测器分别对6种烟草多酚进行全扫描,图3所示为其三维光谱图。通过与标样色谱图和光谱图对照确认,图1中的试样峰2、4、5、6分别为绿原酸、咖啡酸、莨菪宁、芸香苷。从图3的光谱图可以看出,槲皮素、绿原酸、七叶

亭、咖啡酸、莨菪宁、芸香苷的最大吸收波长分别为334.5、325.9、349.5、324.0、346.3、356.2 nm,为了准确定量,各组分均在最大吸收波长下提取色谱图。

2.5 方法分析特性

分别准确称取槲皮素、七叶亭、莨菪宁、咖啡酸各1.0 mg,芸香苷4.0 mg,绿原酸8.0 mg,置于25 mL容量瓶中,加入50%甲醇水溶液溶解并定容,摇匀,得到一级混合标准溶液,然后根据需要配置浓度为0.8、3.2、8、16、24 μg/mL的混合标准溶液。取各浓度的标准溶液分别进行UPLC分析,并对各个多酚的色谱峰面积和浓度进行回归分析,得到回归方程及相关系数如表2所示。检测限根据公式 $C_L = K \cdot sbl / S$ ^[12]计算。式中, C_L —检测限; sbl —空白测量的相对偏差; S —校正曲线的斜率; $K=3$; $3sbl$ 对应于90%的置信度。

表2 ASE-UPLC分析烟草中多酚类物质的方法分析特性

烟草多酚	回归方程	相关系数	检测限/(ng/mL)	文献检测限/(ng/mL)
槲皮素	$y = 4430x + 183$	0.9992	0.907	$30^{[6]}$
绿原酸	$y = 6150x - 706$	0.9998	0.653	$50^{[6]}, 100^{[13]}$
七叶亭	$y = 5470x + 235$	0.9998	0.735	$30^{[6]}$
咖啡酸	$y = 14400x + 479$	0.9997	0.279	$20^{[6]}, 50^{[13]}$
茛菪宁	$y = 8260x + 145$	0.9998	0.487	$30^{[6]}, 100^{[13]}$
芸香苷	$y = 3180x + 578$	0.9998	1.26	$60^{[6]}, 125^{[13]}$

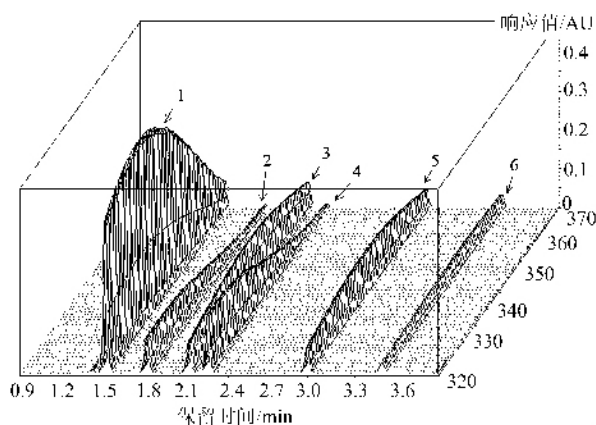


图3 主要多酚的光谱图

1. 槲皮素 2. 绿原酸 3. 七叶亭 4. 咖啡酸 5. 茛菪宁 6. 芸香苷

将参考文献检测限与本文结果相比较,结果显示,本方法的检测限远低于普通HPLC的检测限^[4-6],表明此方法具有很高灵敏度,可用于卷烟样品中多酚的分析,亦可满足今后低焦油卷烟有害成分分析的要求。

2.6 重复性与回收率

采用本方法,对某等级烟草中的多酚进行了5次平行测定,结果如表3所示。结果表明,所测多酚的相对标准偏差(R.S.D)接近2%,具有很好的重复性,适合烟草中多酚的分析。

为验证方法的准确性,进行了加标回收率试验。首先准确称取相同烟样两份,一份作为对照品,一份加入已知量的多酚标样,在相同的条件下平行测定5次,

并根据测定量、加入量和原含量计算回收率。结果如表3所示,6种多酚的平均回收率在95.6%~104.3%之间,表明本方法准确可靠。

2.7 实际样品分析

应用本方法分别测定了18种单料烟(编号1-18#)和14种成品卷烟(编号19-32#)中的6种多酚含量。结果如表4所示。

结果表明:①不论是在单料烟叶还是成品卷烟中,绿原酸和芸香苷的含量均占多酚总量的90%以上;②在单料烟叶中,烤烟中多酚的含量高于白肋烟和晒烟;③不同部位的烤烟中,多酚含量从上部、中部和下部依次降低,这表明多酚成分可成为烟叶等级判别和质量控制的化学指标之一;④烤烟型卷烟中多酚的含量显著高于混合型卷烟中多酚的含量。

3 结论

本文建立了快速灵敏的ASE-UPLC测定烟草及烟草制品中多酚的方法。该方法操作简单、重现性好、分离效率高、分析时间短,适于批量试样的快速分析。应用此方法分别测定了18种单料烟和14种成品卷烟中的6种烟草多酚的含量。结果表明绿原酸、芸香苷为主要多酚,烤烟型卷烟中多酚含量高于混合型卷烟。在烤烟中,多酚含量随其部位有明显变化,表明其含量在一定程度上可作为烟叶等级判别和香气质量控制的依据之一。

表3 烟草中烟草多酚回收率及精密度(n=5)

成分	原含量/ μg	加标量/ μg		测定量/ μg		回收率		RSD%	
		A	B	A	B	A	B	A	B
槲皮素	4.08	100	150	104.1	154.2	100.5	102.9	1.06	1.12
绿原酸	347.60	100	150	448.2	496.0	100.6	98.9	1.23	1.09
七叶亭	3.35	100	150	103.4	153.3	101.5	98.5	1.65	1.45
咖啡酸	2.30	100	150	102.2	152.4	95.6	104.3	1.49	1.67
茛菪宁	5.80	100	150	105.7	155.6	98.3	96.6	2.01	1.82
芸香苷	320.30	100	150	423.5	474.9	101.0	101.4	1.38	1.29

表4 部分烟草及卷烟样品中多酚的含量

(mg/g)

编号	类别	槲皮素	绿原酸	七叶亭	咖啡酸	茛菪宁	芸香苷
1 #	上部烤烟	0.194	7.18	0.0136	0.108	0.216	5.87
2 #		0.162	7.23	0.0086	0.0975	0.121	5.56
3 #		0.154	7.76	0.0164	0.111	0.133	5.56
4 #		0.167	7.39	0.0061	0.0770	0.142	5.86
5 #	中部烤烟	0.160	6.22	0.0039	0.0750	0.136	5.57
6 #		0.162	5.66	ND	0.0650	0.130	5.26
7 #		0.136	6.21	ND	0.100	0.132	5.25
8 #		0.106	6.85	ND	0.0612	0.116	4.95
9 #	下部烤烟	0.100	4.19	ND	0.0592	0.0948	3.96
10 #		0.0955	5.58	ND	0.0482	0.0968	3.90
11 #		0.0745	5.01	ND	0.0578	0.0718	4.69
12 #		0.0772	5.52	ND	0.0838	0.115	4.76
13 #	白肋烟	0.0326	1.59	ND	0.0165	0.0210	1.73
14 #		0.0269	1.34	ND	0.0264	0.0671	1.86
15 #		0.0579	1.47	ND	0.0301	0.0923	1.95
16 #	晒烟	0.0201	2.06	ND	0.0198	0.0534	1.84
17 #		0.0108	1.48	ND	0.0230	0.0361	1.69
18 #		0.0163	3.47	0.0335	0.0142	0.0582	2.65
19 #	混合型卷烟	ND	2.12	0.0159	0.0502	0.0750	1.69
20 #		0.168	4.86	ND	0.0798	0.0722	2.71
21 #		0.0378	2.92	0.0056	0.0292	0.0785	2.01
22 #		0.0855	3.51	0.0094	0.0178	0.0700	1.93
23 #		0.106	4.86	0.0100	0.0625	0.122	3.48
24 #		0.110	3.17	0.0026	0.0578	0.0690	1.70
25 #	烤烟型卷烟	0.130	6.23	0.0045	0.0625	0.0805	3.93
26 #		0.194	6.52	ND	0.0650	0.0815	3.94
27 #		0.173	6.49	ND	0.0672	0.0702	4.54
28 #		0.0998	5.09	0.0036	0.0418	0.0918	3.45
29 #		0.072	5.21	0.0019	0.0395	0.0962	3.25
30 #		0.186	6.08	ND	0.0952	0.0830	2.93
31 #		0.196	6.58	ND	0.102	0.0952	4.06
32 #		0.180	6.78	ND	0.0710	0.0838	4.25

注:ND表示未检测出。

参考文献

- [1] 徐晓燕,孙五三,王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003(1): 3-5.
- [2] 吴帼英,王宝华. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 42-43.
- [3] 朱小茜,徐晓燕,黄义德,等. 多酚类物质对烟草品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1910-1911.
- [4] 戴云,张甜,董学畅,等. 高效液相色谱法测定烟草中的多酚类物质[J]. 分析实验室, 2003, 22(11): 165-167.
- [5] 李忠,王岚,杨光宇,等. 固相萃取和高效液相色谱法测定烟草中的苯酚和儿茶酚[J]. 分析化学, 2001, 29(12): 1409-1411.
- [6] 张甜,董学畅,吴方评,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定烟草中10种多酚[J]. 分析化学, 2005, 33(3): 359-362.
- [7] 谷勋刚,董军华. 应用高效液相色谱法同时测定烟草中6种多酚类化合物[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 134-137.
- [8] Snook M E, Chortyk O T. An improved extraction-HPLC method for tobacco polyphenol[J]. Tob Sci, 1982, 26: 25-29.
- [9] 庄亚东,张映,王芳,等. 卷烟中多酚类物质的分析[J]. 烟草科技, 2004, 1: 23-26.
- [10] 李应金,吴玉萍. 烟草中多酚总含量的测定[J]. 光谱实验室, 2006, 23(5): 1127-1130.
- [11] Keinanen M, Oldham N J, Baldwin I T. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in nicotiana attenuate[J]. J Agric Food Chem. 2001, 49: 3553-3558.
- [12] IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature. Pergamon Press, Oxford, 1978.
- [13] 王岚,方瑞斌,李忠,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定烟草样品中主要的植物多酚[J]. 色谱, 2001, 19(6): 564-566.