

云南烤烟 HPLC 指纹图谱数据库的建立和规程研究

唐徐红¹, 矣跃平², 涂书新^{1*}, 袁仕信², 何云燕², 刘磊², 尹晓东², 何结望³, 李琳³

(1. 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070; 2. 云南省烟草烟叶公司, 昆明 650218;

3. 湖北中烟工业股份有限公司, 武汉 430051)

摘要: 选择合适的方法对烟叶质量进行科学合理的分类对于提高卷烟质量和生产技术水平具有重要意义。对云南省典型烤烟的 HPLC 指纹图谱分析规程进行了研究。规程包括样品取样和处理、特征提取剂的选择、仪器条件和分析及数据库的建立等 4 个关键过程。首次提出了烤烟指纹图谱分时数据库的概念和建立方法。所建立的指纹图谱技术规程可作为烟叶质量分类的新方法。

关键词: 指纹图谱; 烤烟; 分时数据库; 品质; 分类

中图分类号: S572; TP311

文章编号: 1007-5119(2012)02-0001-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.02.001

Establishment of HPLC Fingerprints Analysis Procedure for Flue-cured Tobacco in Yunnan

TANG Xuhong¹, YI Yueping², TU Shuxin^{1*}, YUAN Sixin², HE Yunyan², LIU Lei², YIN Xiaodong², HE Jiewang³, LI Lin³

(1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Yunnan Tobacco Corporation, Kunming 650218, China; 3. China Tobacco Hubei Industrial Co., Ltd, Wuhan 430051, China)

Abstract: Choosing an appropriate method to classify tobacco quality is of significance for improving the quality of tobacco product. This study established a standardization procedure of HPLC fingerprint analysis for Yunnan flue-cured tobacco. The technology included four main parts, i.e., the sampling and sample processing, the selection of feature extraction agents, instrumentation, and fingerprint database building. The study proposed the concept of time-sharing database of flue-cured tobacco fingerprints and its building method. The fingerprint technology could be applied for classification and controlling of the quality of tobacco.

Keywords: fingerprint; flue-cured tobacco; time-sharing database; quality type; classification

长期以来, 烟叶品质的评价和分类是采用感官评吸和化学分析等方法进行的。然而, 人工评吸工作量大, 劳动强度高, 且结果受主观因素影响大, 并不适合大规模生产应用。常规化学成分检测是广泛应用的烟叶质量判断的辅助手段^[1-3]。由于烟草是一种植物原料, 化学成分非常复杂, 烟叶香气物质中已鉴定的成分就高达 5000 种以上。显然, 单靠测定某一或某些化学成分很难对烟草质量进行有效的评价。

指纹图谱系指将分析对象经适当处理后, 采用一定的仪器分析手段得到的能够标示该对象特性

的共有峰的图谱。指纹图谱技术具有模糊指纹特征分析、宏观推断分析等特点, 是进行复杂物质质量评价的有效手段^[4-6]。指纹图谱技术已经成功地应用于中药品质量分析和判断及农产品溯源等领域。近年来, 一些研究者对指纹图谱技术在烟草科研与生产上应用的理论和实践进行了有益的探索。杨红燕等^[7]应用烟草中游离氨基酸指纹图谱反映不同种类烟丝的特性, 用于不同种类烟草的比较和分类。本课题组自 2005 年以来一直开展应用烤烟指纹图谱技术判断烤烟醇化品质的研究, 并建立了烤烟醇化品质判定的高效液相指纹图谱分析方法^[8-10]。过去

基金项目: 云南省烟叶公司重点攻关项目(2009YN010); 农业部公益性行业专项(201103007)

作者简介: 唐徐红, 男, 硕士, 主要研究方向为烟叶品质学。E-mail: tangxuhong@webmail.hzau.edu.cn。*通信作者, E-mail: stu@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2011-08-22

修回日期: 2011-11-07

的研究证明,烤烟指纹图谱技术是解决烤烟品质评价复杂问题的有效手段,但烤烟指纹图谱技术应用于烤烟质量控制的研究规程尚未见报道。我们假设,不同品质的烟叶具有独特的指纹图谱特征,对不同品质烟叶的指纹图谱特征进行表征,可实现对不同品质烟叶的分类,从而为烟叶质量分类提供有效手段。因此,本研究旨在建立云南省不同品质烟叶的指纹图谱分析规程,为烤烟生产质量控制、烟叶生态类型划分和提高配方打叶的稳定性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试烟叶品种 K326,等级为 C3F,分别取自云南省不同产区。2009 和 2010 年各收集样品 10 个,共 20 个。样品经云南省烟草烟叶公司统一复烤后制成烟丝。将烟丝样品在 60 °C 下烘干,用植物粉碎机粉碎,过 60 目筛,用塑料袋密封,置于超低温冰箱(-80 °C)中保存待测。

1.2 仪器设备及试剂

仪器:Agilent 1200 高效液相色谱仪,超声仪(Kudos SK2200HP),离心机(Sigma 1-14),超纯水机(Millipore)。

试剂:丙酮、乙醇、乙醚、甲醇、磷酸,均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),乙腈,色谱纯(Sigma),超纯水。

1.3 指纹图谱分析方法的建立

1.3.1 烟叶特征物提取剂的选择 根据研究选择不同的提取剂。实验中分别考察了水、甲醇、乙醇、丙酮和乙醚等 5 种提取剂。这 5 种提取剂是最常用的物质提取溶剂,极性大小从高到低依次排列,提取的物质极性也相应变化。5 种提取剂中,超纯水的极性最强,提取的物质也最多,但是,烟叶提取液经滤膜过滤后放置 1 d 后在瓶子底部出现絮状的沉淀,因此不能进行高效液相色谱仪的测定,否则会造成机器的堵塞。乙醚提取剂因沸点太低,在操作中容易造成溶剂的挥发流失,所建立的指纹图谱

稳定性差。乙醇提取剂所建立的烟叶指纹图谱稳定性好,但与甲醇相比提取的物质成分少,信息量小。甲醇和丙酮提取剂所建立的指纹图谱基线分离好,特征峰多,峰响应高,可以进行烟叶指纹图谱的相关研究。因此,本实验选择甲醇进行实验研究。

1.3.2 烟叶特征物提取方法的选择 常用的提取方法有超声波、恒温振荡、静置等不同提取方式。实验考察 30 min、1 h、1.5 h、2 h 等不同的提取时间对指纹图谱结果的影响,从而选取最佳的提取方式。实验表明,超声比恒温振荡效果要好很多,信号多,响应峰大,故选择超声波提取 1 h。

1.3.3 色谱条件的选择 本研究主要建立烟叶不同提取剂的 HPLC 指纹图谱。HPLC 指纹图谱的优点主要是分离效果高、基线稳定、灵敏度高、检测范围广。因此适合烟叶指纹图谱的建立。HPLC 指纹图谱色谱条件主要包括:流速、流动相、梯度洗脱、检测波长等。

流动相的选择:水相有超纯水、0.1%、0.3%磷酸(pH 2.17);有机相有乙腈和甲醇。实验表明,纯水在 180 nm 以上无吸收,色谱级乙腈在 200 nm 之上吸收值很低,都是较理想的洗脱剂。因此,选择乙腈和超纯水作指纹图谱的流动相比较好。而甲醇不适合作梯度洗脱,容易造成基线的漂移。梯度洗脱的摸索表明,针对复杂物质采用梯度洗脱尽量把洗脱时间限制在 60 min 左右。

色谱柱采用 Agilent ODS C18 柱,pH 使用范围 2.0~8.0。根据在 Agilent 1200 HPLC 的 DAD 检测器得出的三维指纹图进行波长的选择,发现 250 nm 处响应峰最多,为最佳波长。

1.3.4 烤烟甲醇提取物 HPLC 指纹图谱的分析过程 称取 0.300x g 烟末,加入 10.0 mL 甲醇。在温度 25 °C,频率为 40 MHz,功率为 40%的超声波仪器中超声 60 min。再在转速 8000 转/min 的离心机上离心 8 min。离心后取上清液、过 0.45 μm 的滤膜,取滤液为样品待测溶液。

设置色谱条件:Agilent ODS C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈为流动相 A,0.1%甲酸为流动相 B。梯度洗脱程序:A 与 B 体积比,0 min

为 5 : 95 ; 30 min 为 20 : 80 ; 45 min 为 30 : 70 ; 55 min 为 55 : 45 ; 保持 5 min , 然后 65 min 为 5 : 95 ; 保持 2 min 后运行 5 min 。 体积流量 : 0.8 mL/min , 柱温 : 25 °C , 检测波长 : 250 nm 。

1.4 数据统计分析方法

用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”软件对指纹图谱进行相似度评价,采用 C#编程语言设计软件。

2 结 果

2.1 指纹图谱的方法学考察

吸取甲醇空白溶液 5 μ L 进行的空白试验的结果表明,记录的色谱图出峰少,对检测基本无干扰(图略)。而采用甲醇提取液,HPLC 分析建立的烟草特征提取物色谱图基线平稳、响应峰多、分离度好(图 1)。

对样品提取液连续进样 5 次,比较保留时间和峰面积的精密性和重现性,结果表明,峰面积 $RSD < 3\%$ 。取烤烟样品提取液相隔 2、4、6、8、10、12 h 进行方法稳定性检测,结果发现,检测结果 $RSD < 3\%$,表明该方法很稳定。

另外,选取 2009 年 10 个样品指纹图谱,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”,经过数据导入和数据匹配,以平均数法建立对照指纹图谱(图 2)。从图 2 指纹图谱共有模式和匹配结果可以看出,有 48 个峰为 10 个批次样品所共有(表 1),经统计发现,共有峰峰面积占总峰面积的 90%以上。相似度分析表明,10 批次样品指纹图谱与对照图谱的相似度在 0.97 以上(表 2),表明所建立的指纹图谱完全符合技术规范。2010 年的结果与 2009 年的结果一致(数据未列)。

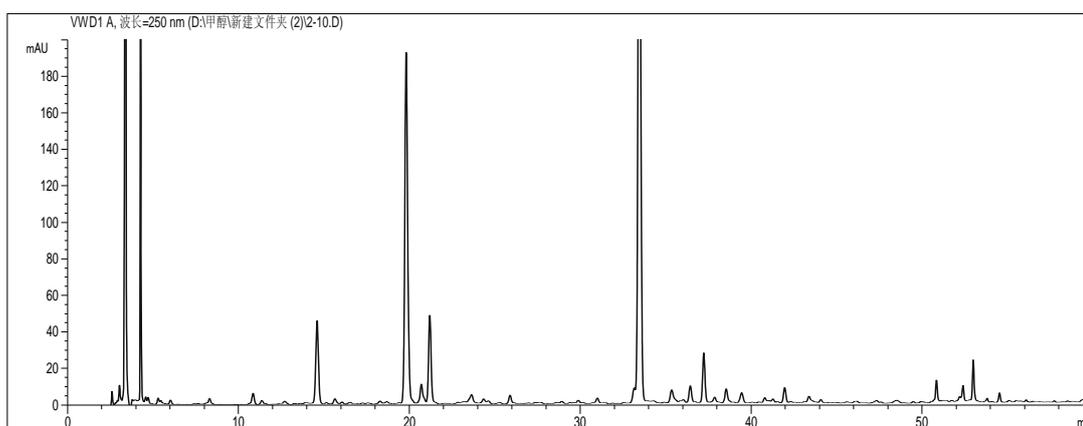


图 1 烤烟 HPLC 指纹图谱(甲醇提取法)

Fig.1 HPLC fingerprint of flue-cured tobacco by methanol extract method

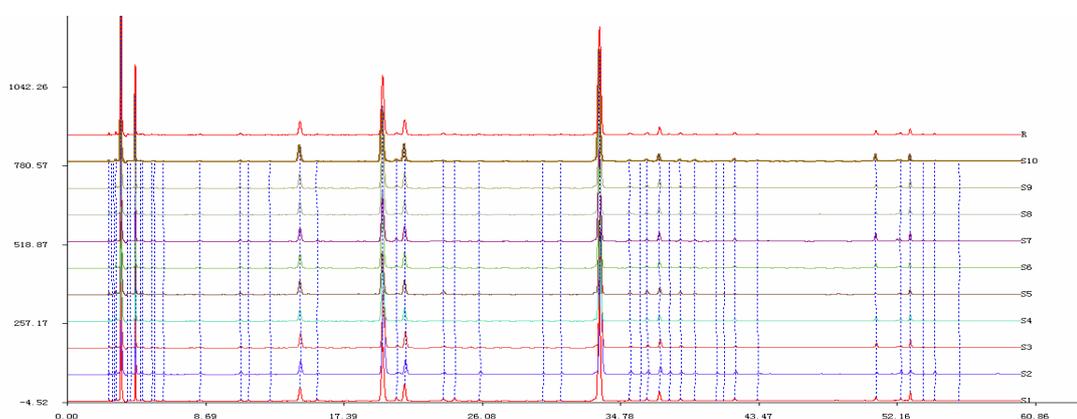


图 2 选取的供试 10 批次样品(S1-S10)和对照图谱(R)的 HPLC 指纹图谱及其共有模式

Fig.2 The common model of HPLC fingerprints of 10 batches of flue-cured tobacco samples (S1-S10) and control fingerprint (R)

表1 供试10批次烤烟样品指纹图谱共有峰的出峰时间
Table 1 The retention time of fingerprint peaks of 10 batches of flue-cured tobacco samples tested

共有峰	出峰时间/min	共有峰	出峰时间/min	共有峰	出峰时间/min
1号峰	2.61	17号峰	20.72	33号峰	40.92
2号峰	3.04	18号峰	21.21	34号峰	41.32
3号峰	3.37	19号峰	23.64	35号峰	42.02
4号峰	3.79	20号峰	24.37	36号峰	43.46
5号峰	4.27	21号峰	25.35	37号峰	43.71
6号峰	4.60	22号峰	25.98	38号峰	44.16
7号峰	5.35	23号峰	29.94	39号峰	46.34
8号峰	6.04	24号峰	31.07	40号峰	47.55
9号峰	8.38	25号峰	33.48	41号峰	48.45
10号峰	10.88	26号峰	35.36	42号峰	50.90
11号峰	11.39	27号峰	36.12	43号峰	52.52
12号峰	12.57	28号峰	36.50	44号峰	52.97
13号峰	14.62	29号峰	37.25	45号峰	53.09
14号峰	15.69	30号峰	37.89	46号峰	53.85
15号峰	18.76	31号峰	38.60	47号峰	54.59
16号峰	19.82	32号峰	39.45	48号峰	55.16

表2 供试10批次烤烟样品(S1-S10)指纹图谱和对照图谱的相似度分析

Table 2 Similarity analysis of fingerprints of 10 batches of flue-cured tobacco samples (S1-S10) and control fingerprint (R)

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S2	0.98	1.00								
S3	1.00	0.99	1.00							
S4	0.91	0.94	0.94	1.00						
S5	0.95	0.97	0.97	0.99	1.00					
S6	0.99	0.99	1.00	0.96	0.98	1.00				
S7	0.99	0.98	1.00	0.93	0.97	0.99	1.00			
S8	0.95	0.98	0.97	0.99	0.99	0.98	0.96	1.00		
S9	0.99	0.99	1.00	0.95	0.98	0.99	1.00	0.97	1.00	
S10	0.99	0.98	1.00	0.96	0.99	1.00	0.99	0.98	1.00	1.00
R	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	1.00	0.99	0.99	1.00	1.00

2.2 指纹图谱数据库的建立

不同代表性样品的指纹图谱数据有机联系放置在一起即构成指纹图谱数据库。由于各个样品的差异性绝对的,因此理论上和实际上都表明,各个样品的特征峰的个数和峰面积及其组合都是不同的,这样导致对不同样品的指纹图谱数据无法进行进一步的分析。通常采用如下两类方法对指纹图谱数据进行整理。

2.2.1 共有峰数据库的建立 所谓共有峰是在供研究样品的指纹图谱中都出现的特征峰。共有峰确定的原则有3条。其一,在超过60%的样本中同时出现;其二,对判断造成干扰的峰尽量不选择(峰面积需大于15 mAu);其三,所选择的指纹峰应在色谱流出时间范围内分布均匀且稳定。在这一原则

的指导下,对于2009年和2010年(数据未列)云南产区C3F单等级烟叶中确定甲醇提取物指纹图谱的共有峰有48个(表1)。

共有峰数据库的优点是简单明了,但其缺点是忽视了非共有峰的作用和贡献。不可否认,一定条件下,可能正是非共有峰的作用和贡献决定了烟叶的品质和级别的差异性。另外,每个图谱共有峰数据就有48个,在数据整理工作中非常繁琐和困难,尤其在大批量样品中由于有非共有峰的干扰很难做到样品间特征峰的一一对应。

2.2.2 分时数据库的建立 所谓分时特征峰是一定时间内特征峰的总面积或者总峰高,由此建立的数据库称为指纹图谱分时数据库。烟叶指纹图谱数据多,信息量大。如,本试验采用的云南烤烟样品,其共有峰有48个,而非共有峰也超过40个。这样,每个新样本靠人工去识别这些峰数据,工作量大,而且很难做到峰之间的一一对应,难度非常大。为此,本试验针对指纹图谱谱图的信息特征开发了分时数据库软件(图3)。



图3 烤烟HPLC指纹图谱数据库分时数据软件视窗示意图
Fig.3 The sketch figure for the software of time-sharing database of HPLC fingerprints

分时数据库软件的开发是为了快速处理指纹图谱数据,降低人为操作失误,最大程度地利用图谱的潜在信息,包括非共有峰对烟叶品质的影响。同时,降低人为误差,使数据整理工作变的简单方便,实现指纹图谱分析自动化的目的。方法是通过人工和计算机编程技术使原始指纹图谱数据库转

换成分时数据库。理论上,任何时间段都可以选用来进行建库。一般是时间段越短、信息量越丰富。通常根据计算要求,可以选1至5 min不等。

为选取合适的时间段,本项研究采用1、2、3和5 min等4个时间段,分别将60 min的图谱剪切成60、30、20和12个时段图谱数据进行分析。从不同时间段选取的结果来看,1 min和2 min时间段太短,特征峰之间还是会出现漂移;而5 min时间段包含的稳定性不高的特征峰太多。最终选取3 min时间段来对烤烟指纹图谱进行化学计量学分析。

3 讨论

烤烟指纹图谱建立规程包括烤烟样品取样和处理、特征提取剂的选择及提取、仪器条件和选择及数据库的建立等4个过程。

样品的取样要求在按照烤烟国家标准(GB2635—1992)进行分类的基础上,选择具有代表性的样品。进行分析前,样品需存放在-80℃冰箱中,防止烤烟醇化过程中化学成分的变化。本实验选择的提取剂为甲醇。甲醇溶剂在250 nm处基本无吸收或吸收很小,使得采用HPLC法建立的烤烟指纹图谱具有基线分离无干扰、准确、稳定性和重现性高等优点^[11]。另外,甲醇提取液所得到特征峰丰富,更能反应烟叶的质量。甲醇溶剂极性高,提取出的化合物包含了大量的致酸性物质,如有机酸等。有研究表明,酸性物质的变化与烤烟醇化质量有密切的关系^[10,12]。仪器条件的选择至关重要。在色谱柱确定后的条件下,可以根据流动相的选择和洗脱程序的变化使得特征峰得到有效的分离。根据我们的研究结果,参考中药指纹图谱的相关研究^[13],要求样品分析时间不少于50 min。而根据烤烟指纹图谱的特点,我们认为烤烟指纹图谱数据库的建立以分时数据库较好。

烤烟化学指纹图谱具有无法精密度量的模糊性,其强调的是色谱的完整面貌而不是特征峰精确的细微差别,反映的是烟叶质量的综合结果。表现在图谱上就是,指纹图谱分析不是对某一化学成分定性、定量,而是对整个图谱特征的展现。基于此,

指纹图谱分析技术作为可行的质量控制技术模式,在西方国家已经成为植物质量控制的分析技术^[14]。在我国中成药研究中,开发出了系列HPLC指纹图谱技术,可简便、快速的鉴别和区分不同来源的中药材^[15]。可以预计,通过烤烟指纹图谱特征峰与烟叶化学特征指标的相关性研究,了解各特征峰与烟叶品质的特征作用,及与香吃味、烟气质量等的联系,可为评价烟叶质量和质量分类提供科学的理论基础和崭新的技术途径。

4 结论

采用甲醇提取烤烟样品所得到的指纹图谱具有灵敏性高、可靠性高、信息量大等优点,它能较综合地反映烟叶质量。本研究首次提出了烤烟指纹图谱分时数据库的概念,采用分时数据库在烤烟质量分类研究和应用中更具有实用价值和可行性。

参考文献

- [1] 常爱霞,杜咏梅,付秋娟,等.烤烟主要化学成分与感官质量的相关性分析[J].中国烟草科学,2009,30(6):9-12.
- [2] 吴灵,尹键,柴向锋,等.烟草化学成分分析研究进展[J].株洲师范高等专科学校学报,2002,7(5):19-21.
- [3] 王利杰,卢红.云南烤烟几个品质指标部位间关系研究[J].西南农业学报,2008,21(6):1555-1558.
- [4] 曲国富,陆舍铭,孟昭宇,等.GC/MS法建立烟用香精香料指纹图谱研究[J].香精香料化妆品,2007(2):20-23.
- [5] 陆舍铭,王笛,任卓英,等.高效液相色谱建立烟用香精指纹图谱研究[J].云南烟草,2008(3):43-47.
- [6] 黄映凤,杨君,郭伟强,等.中药指纹图谱对香烟质量控制启示[J].理化检验:化学分册,2009,45(1):119-124.
- [7] 杨红燕,杨柳,朱文辉,等.烟草中游离氨基酸的超高效液相色谱快速分析及化学计量学研究[J].分析科学学报,2010,26(3):310-314.
- [8] 湖北中烟工业有限责任公司.一种烤烟醇化品质判定的高效液相色谱指纹图谱分析方法:中国,200810196806.7[P].2010-03-03.
- [9] 湖北中烟工业有限责任公司.一种烤烟醇化品质判定的高效液相色谱指纹图谱主成分分析方法:中国,200810196807.1[P].2010-03-03.

- [10] 孙敬国. 烤烟品质对肥料的响应及醇化质量的调控研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [11] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141-151, 169.
- [12] SUN Jingguo, HE Jiewang, WU Fengguang, et al. Comparative Analysis on Chemical Components and Sensory Quality of Aging Flue-cured Tobacco from Four Main Tobacco Areas of China[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(8): 101-105.
- [13] 王苏静, 常世卿. 中药色谱指纹图谱技术与应用[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2008: 2.
- [14] 王乐, 李素霞, 陈晶. 中药指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 河北化工, 2010, 33(1): 71-73.
- [15] 王嗣岑, 朱丽华, 贺浪冲, 等. 川芎药材活性部位的高效液相色谱指纹图谱定性分析方法[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2003, 24(3): 221-223, 236.

《中国烟草学报》2012年第2期目次

烟气与烟草化学

卷烟加料中 1,2-丙二醇的快速测定方法..... 薛训明, 胡立中, 叶为全, 等

农艺与调制

长期施用有机堆肥对土壤性状与烟叶质量的影响..... 王宏武, 冯柱安, 胡钟胜, 等

外源钙对二氯喹啉酸胁迫下烤烟叶片生理特性的影响..... 刘华山, 王晓军, 韩锦峰, 等

应用AMMI模型评价烤烟品种产量适宜性..... 查宏波, 黄 韡, 胡启贤, 等

基于 GIS 的陕西省烤烟气候生态适宜性区划..... 贺文丽, 郭兆夏, 李星敏, 等

烘烤过程中中、上部烟叶苹果酸及相关酶活性研究..... 全 琳, 官长荣

植物保护

烟草粉斑螟 *Ephestia elutella* (Hübner) 生活史与种群动态研究..... 张 皓, 张德胜, 花保祯

基于致病基因靶点的 PCR 法特异性检测土壤青枯菌..... 郭森森, 种 斌, 徐小洪, 等

生物技术

烟草叶绿体密码子的偏好性及聚类分析..... 杨惠娟, 刘国顺, 张松涛, 等

fps 基因过量表达对烟叶类胡萝卜素生物合成的影响..... 王冰莹, 杨永霞, 闫 鼎, 等

普通烟草抗渗透胁迫基因 *NtP5CS* 的克隆与表达分析..... 焦 蓉, 刘贯山, 刘好宝, 等

土壤中降解烟碱细菌多样性研究..... 刘 飞, 夏振远, 白江兰, 等

蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 筛选鉴定及在雪茄烟叶发酵中的应用研究..... 李 宁, 汪长国, 曾代龙, 等

现代烟草农业

山东省烟农参加专业合作社意愿的影响因素分析..... 李 升, 薛兴利, 张玉芹, 等

烟农专业合作社的获利空间与主体参与意愿分析——基于博弈论的视角..... 何 轶, 陈风雷, 戴成宗

烟农专业合作社发展探析..... 戴成宗, 何 轶, 杨双剑, 等

吸烟与健康

《烟草控制框架公约》的法律适用浅析..... 刘敬如, 王毅敏

《烟草控制框架公约》实施指南没有法律约束力的法理分析..... 林铮铃, 李保江, 姜泓海

烟草制品包装和标签履约情况综述及对我国卷烟包装影响的思考..... 胡 群, 王 黎, 李万珣, 等

综述

烟草野火病发生与防治的研究进展..... 王振国, 丁 伟