

反相高效液相色谱法测定烤烟叶片发育过程中的类胡萝卜素类物质

刘国顺¹, 韦凤杰¹, 王芳¹, 李亚娟¹, 郭桥燕¹, 黄晓书²

(1. 河南农业大学 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南 郑州 450002;

2. 河南农业大学 河南省高等学校农业生物技术与工程技术重点学科开放实验室, 河南 郑州 450002)

摘要 :建立了采用反相高效液相色谱测定烤烟叶片中类胡萝卜素的方法。烤烟叶片先用含0.1% 丁基羟基甲苯(BHT)的90% 丙酮水溶液萃取,然后加入0.1 g 醋酸铅,于4℃下以10 000 r/min 离心5 min 以去除蛋白质。色谱柱为C₁₈反相柱(3.9 mm i. d. × 150 mm, 5 μm)。流动相:A 甲醇-异丙醇(体积比为1:1);B 超纯水。洗脱程序:0~10 min, 70% A + 30% B;10~17 min, 100% A;17~30 min(90% A + 10% B)。流速0.5 mL/min。进样量:10 μL。检测波长:450 nm。该方法简化了样品的前处理过程,4种类胡萝卜素物质的加标回收率为91.77%~97.42%,相对标准偏差为3.46%~0.98%。用该方法研究了烤烟发育过程中类胡萝卜素含量的变化规律,获得了与文献较为一致的结果。

关键词 :反相高效液相色谱法;类胡萝卜素;烤烟叶片

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2006)02-0161-03 栏目类别:研究论文

Determination of Carotenoids in Flue-Cured Tobacco Leaves During its Growth by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

LIU Guoshun¹, WEI Fengjie¹, WANG Fang¹, LI Yajuan¹, GUO Qiaoyan¹, HUANG Xiaoshu²

(1. National Tobacco Cultivation, Physiology and Biochemistry Research Center, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Discipline and Open Laboratory of Agricultural Biological and Engineering Technique, Henan Institute of Higher Learning, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract : A reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of carotenoids in flue-cured tobacco leaves was developed. Carotenoids were extracted from flue-cured tobacco leaves by acetone-water (90:10, v/v) solution containing 0.1% butylated hydroxytoluene (BHT). Plant proteins were eliminated by adding 0.1 g Pb(Ac)₂ and by centrifugation (10 000 r/min) for 5 min at 4℃. Lutein, β-carotene, neoxanthin, violaxanthin and other plant pigments were separated on a reversed-phase C₁₈ column (3.9 mm i. d. × 150 mm, 5 μm), with a mobile phase of (A) methanol-isopropyl alcohol (1:1, v/v) and (B) water using a gradient elution at a flow rate of 0.5 mL/min. The optimum elution gradient was as follows: 0–10 min, 70% A + 30% B; 10–17 min, 100% A; 17–30 min, 90% A + 10% B. The recoveries of carotenoids in flue-cured tobacco leaves were 91.77%–97.42%, and relative standard deviations were 3.46%–0.98%. This method was applied to determine carotenoids in flue-cured tobacco leaves during its growth with satisfactory results.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); carotenoids; flue-cured tobacco leaves

类胡萝卜素是存在于植物和微生物中的脂溶性色素,通常是指C₄₀的碳氢化合物(胡萝卜素)和它们的氧化衍生物(叶黄素)两大类色素。类胡萝卜素在植物叶绿体的光合作用中起着重要作用^[1-3],

也是合成植物激素脱落酸(ABA)的前体^[4]。在烟叶中,类胡萝卜素作为许多重要致香成分的前提物对烟草香味品质的形成有重要作用^[5],烟草品质形成是烟草在品种、生态环境等综合条件下发育的结

果,因此研究烟草发育过程中类胡萝卜素的含量变化具有重要意义^[6]。类胡萝卜素的测定常采用分光光度法、高效薄层色谱扫描法以及液相色谱法^[7-10]。分光光度法准确性较差^[7,8],高效薄层色谱扫描法及传统的液相色谱法样品前处理复杂,采用固相萃取法虽可简化样品前处理,但使用成本较高^[9-12]。类胡萝卜素类色素稳定性差,提取测定时均要低温、避光、快速。为了准确测定烤烟发育过程中类胡萝卜素类物质,尽可能模拟自然状态下类胡萝卜素的含量、组分比例,我们简化了样品的前处理步骤,采用反相高效液相色谱法测定了烟草叶片发育过程中的类胡萝卜素,取得较满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱仪系统包括 Waters 515 泵, Waters 2487 紫外-可见分光光度检测器, Empower 色谱工作站, Rheodyne 7725i 型手动进样阀。Sigma 低温离心机。常州国华 HY-4 型振荡器。

超纯水为石英亚沸蒸馏水,并用北京历元公司超纯水仪处理,电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$; 异丙醇为 Sigma 公司生产的色谱纯试剂, 甲醇为 J. T. Baker 公司生产的色谱纯试剂; 叶黄素(lutein)、紫黄质(violaxanthin)、新黄质(neoxanthin)植物色素标准物由日本 WAKO 公司生产, β -类胡萝卜素(β -carotene)、 β -阿朴-8'-胡萝卜醛(β -apo-8'-carotenal, 内标)购于 Sigma 公司。烤烟叶片采自河南农业大学科教园区试验田。

1.2 标准溶液的配制

准确称取 β -胡萝卜素标准品 5 mg, 溶于 10 mL 丙酮中, 混匀后吸取溶液 1 mL 用丙酮定容至 10 mL, 配成 50 mg/L 的储备液。准确称取 1.824 mg β -阿朴-8'-胡萝卜醛溶于 100 mL 丙酮中, 然后稀释 5 倍, 得到 3.648 mg/L 的储备液。新黄质、紫黄质、叶黄素等标准溶液为直接购得, 质量浓度依次为 1.327, 0.974, 1.112 mg/L。采用逐步稀释法得到其他浓度的各种标准溶液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C₁₈ 反相色谱柱(3.9 mm i. d. \times 150 mm, 5 μm) (美国 Waters 公司)。流动相为: A, 甲醇-异丙醇(体积比为 1:1); B, 超纯水。流速 0.5 mL/min。洗脱程序 0~10 min(70% A + 30% B); 10~17 min(100% A); 17~30 min(90% A + 10% B)。以曲线 6 线性递增(减)的梯度条件, 平衡 10 min 后手动进样。进样量: 10 μL 。检测波长: 450 nm。柱温: 室温。

1.4 样品处理

取新鲜烟叶, 擦净表面污物, 剪碎(去掉中脉), 混匀。称取剪碎的新鲜烟叶样品 5 g, 放入研钵中, 加少量石英砂和 5 mL 90% 丙酮(体积分数为 90% 的丙酮水溶液, 含 0.1% 丁基羟基甲苯, 下同), 于冰浴条件下研成匀浆, 再加 90% 丙酮 10 mL, 继续研磨至组织变白, 然后倒入 100 mL 三角瓶中, 用 45 mL 90% 丙酮分 3 次冲洗研钵后倒入三角瓶中, 振荡萃取 30 min, 过滤。将滤渣用 10 mL 90% 丙酮洗涤 2~3 次, 至滤渣为白色, 合并滤液, 定容至 100 mL, 从中取 6 mL 至离心管中, 加入 0.1 g 醋酸铅, 以 10 000 r/min 的转速于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 min, 用 0.45 μm 针头过滤器过滤。

2 结果与讨论

2.1 类胡萝卜素的色谱分离

在“1.3”节色谱条件下, 主要类胡萝卜素都能达到基线分离, 分析时间较短, 色谱图见图 1。

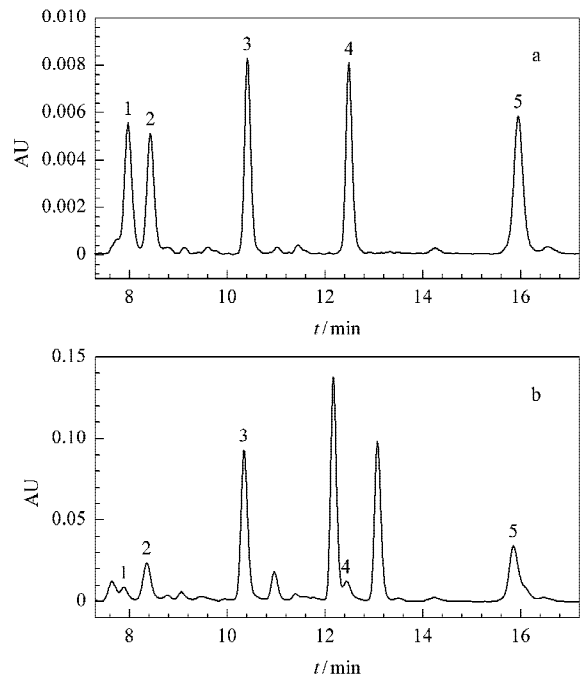


图 1 (a)类胡萝卜素标样和(b)烤烟新鲜叶片中色素类物质的色谱图

Fig.1 Chromatograms of (a) carotenoid standards and (b) green flue-cured tobacco leaves

1. lutein; 2. violaxanthin; 3. neoxanthin; 4. β -apo-8'-carotenal, internal standard; 5. β -carotene.

2.2 标准工作曲线的绘制

根据样品中类胡萝卜素的含量分别配制标准溶液, 进样后计算不同浓度下的峰面积。以峰面积(Y)对标准品的质量浓度(X, mg/L)进行线性回归, 结果见表 1。根据信噪比 $S/N = 3$, 测得各组分的最低检测质量浓度均为 40 $\mu\text{g/L}$ 。

表 1 类胡萝卜素类物质的回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of carotenoids

Component	Regression equation	r
Lutein	$Y = 1.33 \times 10^5 X - 2.18 \times 10^3$	0.9999
Neoxanthin	$Y = 1.36 \times 10^5 X - 5.47 \times 10^3$	0.9978
Violaxanthin	$Y = 1.36 \times 10^5 X + 6.48 \times 10^2$	0.9991
β -Carotene	$Y = 7.80 \times 10^4 X - 2.00 \times 10^4$	0.9999
β -Apo-8'-carotenal	$Y = 2.37 \times 10^5 X - 2.76 \times 10^4$	0.9997

Y: peak area; X: mass concentration, mg/L. Linear range: lutein, 0.0695 - 1.112 mg/L; neoxanthin, 0.083 - 1.327 mg/L; violaxanthin, 0.061 - 0.974 mg/L; β -carotene, 0.08 - 50 mg/L; β -apo-8'-carotenal, 0.228 - 3.648 mg/L.

2.3 回收率和精密度实验

准确称取相同烟样两份,其中一份加入已知量的混合标准溶液,在相同条件下测定 5 次,通过加入标准类胡萝卜素溶液量计算各组分的回收率,并计算相对标准偏差(见表 2)。

表 2 方法的回收率和精密度($n = 5$)Table 2 Recovery and precision of the method ($n = 5$)

Component	Added/ μg	Found/ μg	Recovery/%	RSD/%
Lutein	0.1392	0.1313	94.48	3.46
Violaxanthin	0.1221	0.1167	95.63	2.61
Neoxanthin	0.1663	0.1523	91.77	2.83
β -Carotene	5.7503	5.6009	97.42	0.98
β -Apo-8'-carotenal	0.7295	0.7509	102.8	0.37

2.4 样品测定

测定了烤烟 K326 发育过程中类胡萝卜素含量的变化(见图 2)。由图 2 可知,紫黄质是烤烟叶片发育过程中含量很少的一类类胡萝卜素物质,其在叶片发育前期、中期含量基本保持不变,为 12 $\mu\text{g/g}$ 左右,后期减少到 5 $\mu\text{g/g}$,减少了 58.3%。新黄质、叶黄素、 β -胡萝卜素在叶片生长前中期(15 ~ 40 d)随生育期的后移而增加,在欠熟期(40 d)有一高峰,含量分别为 43, 101.64, 171.92 $\mu\text{g/g}$ 。

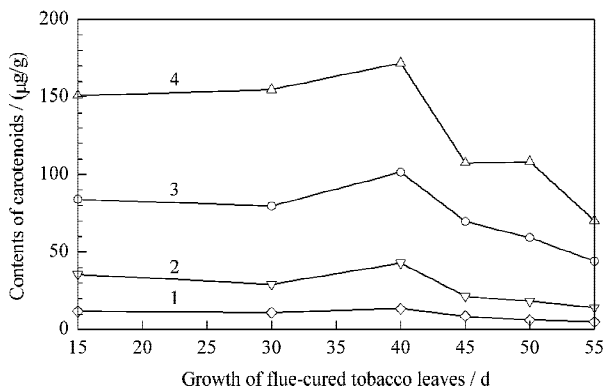


图 2 烤烟发育过程中类胡萝卜素含量的变化

Fig.2 Contents of important carotenoids in the growth of flue-cured tobacco leaves

1. violaxanthin; 2. neoxanthin; 3. lutein; 4. β -carotene.

2.5 讨论

文献[12,13]报道,新鲜烟叶的色素主要有叶绿素 a、叶绿素 b、叶黄素、新黄质、紫黄质和 β -胡萝卜素。一般来说,新鲜烟叶中的叶绿素含量变化范围为 0.5% ~ 4%,成熟烟叶中黄色色素,即胡萝卜素和叶黄素的总量约为叶绿素含量的五分之一至三分之一^[14]。烤烟型烟叶中的胡萝卜素是由 68% 的 β -胡萝卜素和 32% 的新- β -胡萝卜素所组成的混合物,而叶黄素的构成为 60% 的叶黄素、22% 的新黄质和 18% 的紫黄质^[15]。本试验结果与前人研究基本相同。本试验研究表明:河南盆栽条件下烤烟叶片发育过程中新黄质、 β -胡萝卜素含量较多,成熟过程中降解也较多,可以推测新黄质、 β -胡萝卜素在烤烟叶片发育过程中是影响河南烤烟香味物质产生的主要类胡萝卜素类物质。

参考文献:

- [1] Wang Yanli, Mao Lisong, Hu Xiche. Biophysical Journal, 2004, 86(5): 3 097
- [2] Lu Congming, Lu Qingtao, Zhang Jianhua, Kuang Tingyun. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(362): 1 805
- [3] Yu Shuwen, Tang Zhangcheng. Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 2nd ed. Beijing: Science Press(余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学.第 2 版.北京:科学出版社), 2001. 188
- [4] Schwartz S H, Qin Xiaoqiong, Zeevaart J A D. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1 591
- [5] Shi Hongzhi, Liu Guoshun. Aroma Science of Tobacco. Beijing: China Agriculture Press(史宏志,刘国顺.烟草香味学.北京:中国农业出版社), 1998. 53
- [6] Zuo Tianjue. Production, Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant. Shanghai: Shanghai Far East Publishers(左天觉.烟草的生产、生理和生物化学.上海:上海远东出版社), 1993. 386
- [7] Wang Ruixin. Tobacco Chemistry. Beijing: China Agriculture Press(王瑞新.烟草化学.北京:中国农业出版社), 2003. 281
- [8] Du Yongmei, Zhang Huaibao, Wang Xiaoling, Guo Chengfang, Shang Yao, Liu Baofa. Journal of China Tobacco(杜咏梅,张怀宝,王晓玲,郭承芳,商耀,刘宝法.中国烟草科学), 2003, (3): 28
- [9] Wu Fangping, Dong Xuechang, Zhang Tian, Yang Guangyu. Yunnan Chemical Technology(吴方评,董学畅,张甜,杨光宇.云南化工), 2005, 32(1): 24
- [10] Shi Honglin, Wang Baoxing, Liu Wei, Wang Lan, Li Zhong, Jiang Ciqing, Yang Guangyu. Acta Tobacaria Sinica(施红林,王保兴,刘巍,王岚,李忠,蒋次清,杨光宇.中国烟草学报), 2003, 9(2): 1
- [11] Shi Liang, Zhu Xiaolan, Liu Baizhan, Gao Yun. Chinese Journal of Chromatography(时亮,朱晓兰,刘百战,高芸.色谱), 1999, 17(6): 606
- [12] Court W A, Hendel J G. Tobacco Science, 1982, XXVI: 103
- [13] Lu Hongmei, Liang Yizeng. Chinese Journal of Chromatography(卢红梅,梁逸曾.色谱), 2005, 23(1): 57
- [14] Han Jinfeng. Planting Physiology of Tobacco. Beijing: China Agriculture Press(韩锦峰.烟草栽培生理.北京:中国农业出版社), 2003. 202
- [15] Weybrew J A. Tobacco Science, 1957, 1: 1