

高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定烤烟中的水溶性葡萄糖、果糖和蔗糖

王 荔¹, 陈巧珍¹, 宋国新¹, 沈 轶², 刘百战²

(1. 复旦大学分析测试中心, 上海 200433; 2. 上海烟草(集团)公司, 上海 200082)

摘要 :用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)测定了烤烟中的水溶性葡萄糖、果糖和蔗糖。采用水浸取及膜过滤法处理烤烟样品,以 Dionex CarboPac PA-1 阴离子交换柱为色谱柱,0.2 mol/L NaOH 水溶液为淋洗液进行分离测定。葡萄糖、果糖和蔗糖的含量与其峰面积的线性关系良好,回收率均在 97% 以上。方法简便易行,灵敏度高,重现性良好,可以实现对烟草中单糖的快速分离和测定。

关键词 :高效阴离子交换色谱;脉冲安培检测法;葡萄糖;果糖;蔗糖;烤烟

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)02-0201-04 栏目类别 :研究论文

Determination of Water-Soluble Glucose, Fructose and Sucrose in Flue-Cured Tobacco by High Performance Anion Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection

WANG Li¹, CHEN Qiaozhen¹, SONG Guoxin¹, SHEN Yi², LIU Baizhan²

(1. Center of Analysis & Measurement, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Tobacco (Group) Corporation, Shanghai 200082, China)

Abstract : The quantitative determination of water-soluble sugars such as glucose, fructose and sucrose in flue-cured tobacco by high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was developed. The method was used to determine flue-cured tobacco samples containing large amounts of carbohydrates after pretreatment by water-leaching and membrane filtration. The separation was performed on a Dionex CarboPac PA-1 anion exchange column with 0.2 mol/L NaOH solution as the eluent at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 20 μ L. Good linearities were obtained for glucose, fructose and sucrose within the range of 0.5 – 100 mg/L ($r^2 > 0.997$). The detection limits ($S/N = 3$) were 0.1 mg/L, 0.1 mg/L and 0.2 mg/L, and the average recoveries were 97.3%, 101.4% and 98.9% with good reproducibility for glucose, fructose and sucrose, respectively.

Key words : high performance anion exchange chromatography (HPAEC); pulsed amperometric detection (PAD); glucose; fructose; sucrose; flue-cured tobacco

糖类与烟草的品质有很大关系,是影响烟草香味、吃味的重要因素之一,对烟气的酸碱平衡和焦油含量有直接的影响^[1]。新鲜烟叶或干烟叶中都含有大量的水溶性糖,包括单糖、双糖和其他可溶性的低聚糖,如葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖等,而单糖占水溶性糖总量的 80% 以上^[2]。

目前常用的芒森·沃克法(即费林试剂法)^[3]和流动注射法^[4]可测定烟草中水溶性的还原糖和总糖,但是这些方法大多只能测定总糖量,不能测定

单个成分的含量,而且当样品中有多种糖醇共存的情况下,这些成分会对还原糖和总糖测定产生干扰。随着对烟草原料质量和成品品质的深入研究,烟草中单糖和低聚糖的准确测定显得愈来愈重要。

目前测定单糖常用的方法是气相色谱法^[5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6]以及毛细管电泳法(CE)^[7]。由于糖类化合物和多元醇的挥发性过低、极性太强及沸点较高,样品需衍生化后才能用气相色谱进行分析,所以采用气相色谱分析糖时,需先

将单糖通过硅烷化法或乙酰化法衍生制成相应的三甲基硅醚、糖醇醋酸酯等低沸点的衍生物,才能进行分析,操作较麻烦,误差也较大,因此使该类方法的实际应用受到了很大限制。高效液相色谱法应用较多,它不需衍生化,但样品前处理比较麻烦;由于待测物在紫外光区无吸收,但在样品中的含量较高,可选用示差折光检测器进行检测,然而流动相和提取溶剂的不一致又会导致示差折光检测器有很大的溶剂峰而干扰分析^[6]。CE 是利用带电粒子在高压电场中迁移速率不同而进行分离的一种新技术,其检测方式有紫外-可见检测、激光诱导荧光检测、电化学检测等,但糖类物质既不带电,也无紫外吸收基团和荧光基团,所以不能直接利用毛细管电泳对其进行分离分析,需要先使糖带电或对糖进行衍生化,使其具有紫外吸收基团或荧光基团,然后才能进行分离测定^[7],方法也比较繁琐。

离子色谱法(IC)不仅能分析阴阳离子,还能将一些非离子型物质转变成成为离子型物质后测定。由于糖在碱性条件下阴离子化,对在恒电位下工作的金电极或铂电极的安培检测器产生响应值,因此可采用离子色谱与高灵敏度和选择性的脉冲安培检测器联用(HPAEC-PAD)^[8]对糖类进行分析。该方法测定糖类具备显著的优点:样品前处理非常简单,不需要预先衍生就能分析几乎所有的单糖和大部分的寡糖及低聚糖,避免了一些毒性衍生试剂的应用;采用 PAD 检测器,灵敏度高(低至 pmol 的含量亦可被检测)。常采用离子色谱法对食品、饮料以及植物提取物等样品中的糖类化合物进行测定,但分析烟草中糖类化合物的报道国内外还很难看到。本法采用水浸取及膜过滤法处理烟草样品,使用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法对烤烟中的葡萄糖、果糖和蔗糖含量进行了测定。结果表明:该法简便、实用、准确,灵敏度高且重现性好。研究同时表明,对于烟草样品中大量的可溶性单糖,采用该法处理和稀释后测定,完全可以避免其他含量相对较低的糖醇类物质在分离和检测中产生干扰。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

DX-600 型离子色谱仪(美国 Dionex 公司)配有 GP50 梯度泵、AS50 自动进样器(温度设定为 30 ℃)、ED50 电化学检测器(金工作电极,Ag-AgCl 参比电极,钛对电极),Chromleon 色谱工作站。Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

D-葡萄糖(glucose)、果糖(fructose)、蔗糖(sucrose)标准物质(美国 ACROS 公司,纯度

99.9% 以上),氢氧化钠(分析纯,上海化学试剂厂),去离子水(18.2 MΩ·cm)。

淋洗液的配制:淋洗液为 0.2 mol/L NaOH 水溶液。配制氢氧化钠淋洗液时,先用固体氢氧化钠配制成 50% (质量分数) NaOH 储备溶液,至少放置 24 h。使用时用高纯水稀释配制成 0.2 mol/L 氢氧化钠淋洗液,经过 0.45 μm 滤膜过滤后使用。

1.2 色谱条件

色谱柱:Dionex CarboPac PA-1 阴离子交换柱,包括分析柱(4 mm i. d. × 250 mm)和保护柱(4 mm i. d. × 50 mm);进样体积:20 μL。淋洗条件:淋洗液为 0.2 mol/L NaOH 水溶液,流速为 1.0 mL/min;检测条件:积分脉冲安培检测,E1 = +0.10 V,E2 = -2.00 V,E3 = +0.60 V,E4 = -0.10V,检测波形见图 1。与常用的其他波形相比,该法采用主动型的清洗电位(E2),可降低对工作电极的损耗,提高分析的长期稳定性。

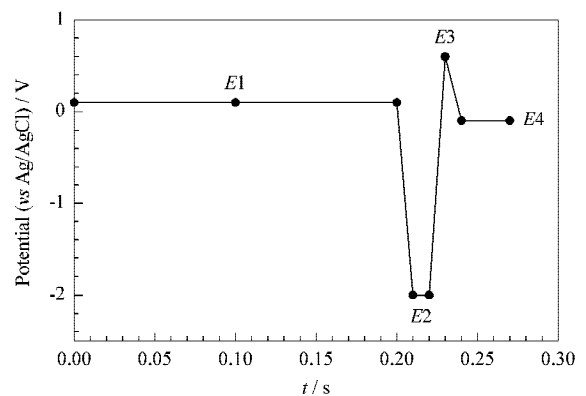


图 1 脉冲安培检测分析葡萄糖、果糖和蔗糖的检测波形

Table 1 Detection waveform for glucose, fructose and sucrose

1.3 样品处理

准确称取烟草样品约 0.100 0 g 于 100 mL 玻璃烧杯中,加入去离子水 10 mL,充分振摇,放置 40 min 后,移入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。用 0.45 μm 滤膜过滤,取清液 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,进样测定。

2 结果与讨论

2.1 烟草样品的前处理

离子色谱法测定固体样品中的水溶性离子时,一般不需溶解样品,可直接用去离子水提取;此外,用滤膜过滤样品,也是前处理中常见的步骤,当处理后的样品中含有颗粒时,可通过 0.45 或 0.22 μm 微孔滤膜过滤后直接进样^[9]。

在烟草行业中,乙醇作为糖类的提取剂使用的历史很长,但因该过程的步骤比较复杂,近几年对这

种传统方法进行改进的报道很多。曾满枝等^[10]对乙醇浸泡提取方法进行了改进,采用水作提取剂,对烟草样品水浴加热酸解脱蛋白后得到的水解液进行了水溶性总糖含量的测定。

在相同的条件下,分别采用去离子水、80% 甲醇溶液和 80% 乙醇溶液对烤烟样品进行提取,其色谱图见图 2。结果表明,三种方法的提取效果相当,但在 80% 甲醇溶液和 80% 乙醇溶液提取样品所得提取液的色谱图中,保留时间为 1~3 min 处有明显的干扰峰,因而必须除去多余的溶剂,而水提取液的干扰显著减少,故本实验中采用水浸出提取法。

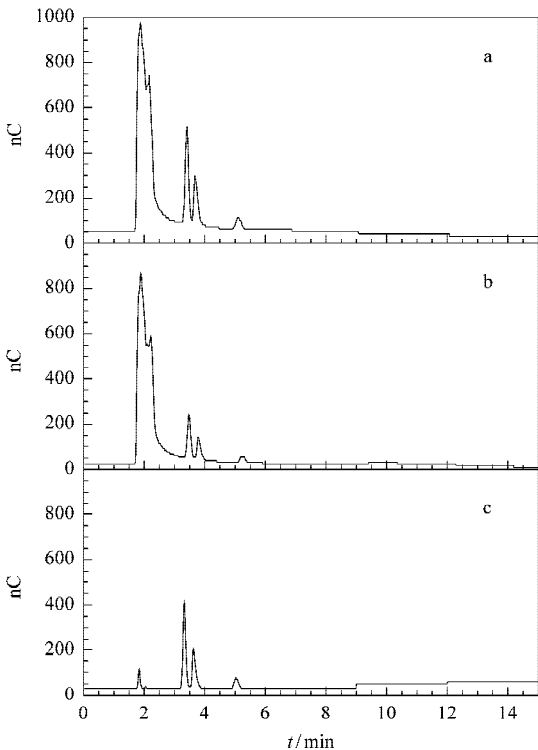


图 2 采用 80% 甲醇溶液、80% 乙醇溶液和水提取样品所得提取液的色谱图

Fig.2 Chromatograms of extracts obtained with three leaching methods for glucose, fructose and sucrose

a. leached by 80% methanol solution; b. leached by 80% alcohol solution; c. leached by ultra pure water.

以往的研究结果^[2]表明,在对烟草样品进行水浴加热时,虽然提高温度会加快糖的溶出,但温度过高也会加速多糖、蔗糖和麦芽糖的水解。我们选择在室温(25℃)下水作提取剂,实验结果显示,未检出对葡萄糖、果糖、蔗糖产生干扰的多元糖醇,效果比较理想。

本实验还考察了提取时间对测定结果的影响。图 3 为相同质量的烟草样品经浸取不同时间所测得的葡萄糖、果糖、蔗糖的信号强度值。可以看出在提取时间为 40 min 时,各糖均具有较好的提取效果,故以此作为单个或大批烟草样品的提取时间。

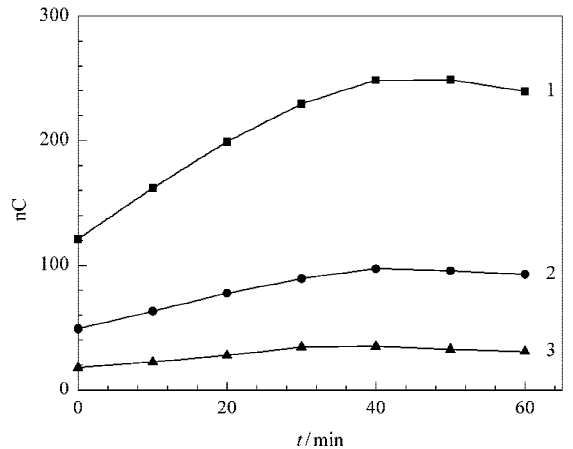


图 3 烟草样品经不同浸取时间后 3 种糖的信号强度

Fig.3 Signal intensities of sugars of different leaching times of tobacco

1. glucose; 2. fructose; 3. sucrose.

烟草样品提取液中除了糖以外,还含有少量其他杂质成分,会污染色谱柱而降低柱效,所以在进样之前要预先分离这些成分。实验发现,经过预先稀释(约 1 000 倍或更高倍数),并经 0.45 μm 滤膜过滤后,降低了干扰物的浓度,而且 3 种糖的浓度均在适宜的上机浓度范围内。

故本实验采用室温(25℃)下水作提取剂,通过振摇、放置、稀释和滤膜过滤完成对烟草样品的前处理。使用该实验方法测得烟草样品中葡萄糖、果糖、蔗糖的含量总和在 20% 以上,略低于流动注射等经典方法测定的水溶性总糖含量,结果是可信的。

2.2 色谱分离条件的选择

Dionex 糖类分析柱的种类很多,其中 CarboPac PA-1 分离柱适用于多种基体中单糖和双糖的分离以及线性多聚糖的分离,而烟草样品中的水溶性糖类主要以单糖为主,因此选择 CarboPac PA-1 作为本方法的色谱分离柱。

淋洗液的选择是非抑制型离子色谱仪中关键的环节之一。在 25℃ 水中,葡萄糖、果糖和蔗糖是离解常数为 12~13 的弱酸,在高 pH 的淋洗液下就可全部以阴离子的形式在色谱柱上保留继而得到分离^[8]。实验结果显示,采用 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液效果良好。淋洗液由 50% 的 NaOH 溶液用刚煮沸并冷却的去离子水稀释。如果溶液中含有 CO₃²⁻,则会加强淋洗液的强度,从而引起上述糖类的分离度下降。在 50% 的 NaOH 溶液中 Na₂CO₃ 的溶解度极低,因而用它配制淋洗液。比较后发现,流速为 1.0 mL/min 的淋洗液对 3 种糖的分离效果好,一次进样可以同时分离和检测,且可在 10 min 内完成。操作简便,不需繁琐的梯度洗脱。图 4 是烤烟样品和 3 种糖的混合标准溶液的色谱图。

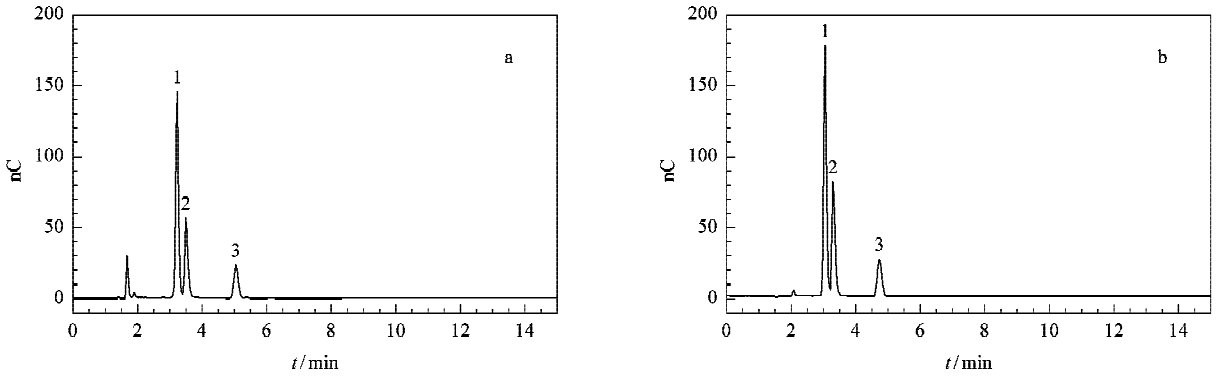


图 4 (a) 烤烟样品和 (b) 3 种糖的混合标准溶液的色谱图

Fig.4 Chromatograms of (a) a flue-cured tobacco sample and (b) the mixture of three sugar standards

1. glucose ; 2. fructose ; 3. sucrose.

2.3 方法的精密度、检出限、线性范围及回收率

采用“ 1. 2 ”节的色谱条件进样 20 μL ,对葡萄糖、果糖和蔗糖的系列混合标样进行测定 ,以信噪比为 3 确定检出限 ,以 5 次平行测定的峰面积计算相

对标准偏差 ,得到本方法的精密度、检出限和线性范围(见表 1)。采用标准加入法检验了方法的回收率 ,结果见表 1。数据表明 ,本方法具有较好的精密度、较低的检出限及较宽的线性范围。

表 1 方法的精密度、检出限、线性范围及回收率(n = 5)

Table 1 Reproducibility , detection limit , linearity of the method and the recovery (n = 5)

Analyte	RSD ¹⁾ /%	Detection limit/ (mg/L) (S/N = 3)	Linear range/ (mg/L)	Regression equation ²⁾	Correlation coefficient	Recovery ³⁾ (RSD)/ %
Glucose	0.9	0.1	0.5 - 100	y = 2.670x + 1.031	0.9996	97.3 (3.2)
Fructose	1.5	0.1	0.5 - 100	y = 1.764x + 1.039	0.9990	101.4 (3.7)
Sucrose	2.8	0.2	0.5 - 100	y = 1.009x + 0.961	0.9972	98.9 (5.2)

1) relative standard deviation of the peak area ; 2) y : peak area (nC · min) ; x : concentration of the analyte (mg/L) ; 3) the addition of glucose , fructose and sucrose at 5.0 mg/L each.

2.4 实际样品分析

采用“ 1. 3 ”节的样品处理方法 ,对某产地的烤烟样品进行了葡萄糖、果糖、蔗糖的含量测定 ,每个样品平行测定 5 次。结果表明 ,葡萄糖、果糖和蔗糖的含量分别为 8.89% ,6.02% 和 7.31% ,除蔗糖因存在一定程度的水解反应 ,RSD 略大于 5% 外 ,其他结果的 RSD 均在 5% 以下 ,结果令人比较满意。

(孙雨安 ,王国庆 ,张应军 ,阎克玉 ,李兴波 ,谢冰 ,刘保霞 . 分析科学学报 , 2004 , 20(5) : 531

[3] Tobacco Industrial Standard of P. R. China , YC/T 32-1996. Beijing : Chinese Standard Press (中华人民共和国烟草行业标准 . 北京 : 中国标准出版社) , 1996

[4] Tobacco Industrial Standard of P. R. China , YC/T 159-2002. Beijing : Chinese Standard Press (中华人民共和国烟草行业标准 . 北京 : 中国标准出版社) , 2002

[5] Mao Duobin , Qu Zhigang , Zhang Junsong , Tian Ningya , Zhang Wenye. Chinese Journal of Chromatography (毛多斌 , 曲志刚 , 张峻松 , 田宁亚 , 张文叶 . 色谱) , 2003 , 21(4) : 437

[6] Shi Honglin , Wang Baoxing , Yang Guangyu , Huang Haitao , Li Zhong , Jiang Ciqing. Chinese Journal of Analytical Chemistry (施红林 , 王保兴 , 杨光宇 , 黄海涛 , 李忠 , 蒋次清 . 分析化学) , 2002 , 30(3) : 384

[7] Ma Qiang , He Yu Zhao , Xiao Xiezhong , Huang Rui , Xu Haitao. Chinese Journal of Chromatography (马强 , 何友昭 , 肖协忠 , 黄瑞 , 徐海涛 . 色谱) , 2002 , 20(3) : 230

[8] Mou Shifen , Li Zongli. Chinese Journal of Chromatography (牟世芬 , 李宗利 . 色谱) , 1995 , 13(5) : 320

[9] Ye Mingli , Shi Qinghong , Wang Yiqi. Modern Scientific Instruments (叶明立 , 施青红 , 王一琦 . 现代科学仪器) , 2004 , (2) : 49

[10] Zeng Manzhi , Luo Zhigang , Ling Chen. Tobacco Science & Technology (曾满枝 , 罗志刚 , 凌晨 . 烟草科技) , 2000 , (2) : 27

3 结论

本文将离子色谱这种准确、灵敏的分析方法应用于烟草制品中糖类物质的测定 ,实现了对烤烟中葡萄糖、果糖、蔗糖等可溶性单糖的快速同时检测 ,为烟草样品中糖类物质的测定及研究提供了一种有效、便捷的新手段。该方法的样品前处理简单 ,测定方法灵敏、准确 ,可适用于大批量样品的分析。

参考文献 :

[1] Wang Lu , Geng Yongqin , Wang Lan , Li Zhong , Jiang Ciqing. Journal of Yunnan University (Science Edition) (王璐 , 耿永勤 , 王岚 , 李忠 , 蒋次清 . 云南大学学报(自然科学版) , 2004 , 26(Suppl) : 199

[2] Sun Yu'an , Wang Guoqing , Zhang Yingjun , Yan Keyu , Li Xingbo , Xie Bing , Liu Baoxia. Journal of Analytical Science