

工业

反相高效液相色谱法测定烟草中的类胡萝卜素及其异构体

刘少民¹, 储大燕¹, 洪深求², 童红武¹, 方力³, 周桂园⁴, 常宇⁴¹ 中国科学技术大学 烟草与健康研究中心, 合肥市徽州大道 1129 号 230052;² 安徽省烟草公司, 合肥 230022; ³ 云南烟草科学研究院, 昆明 650106;⁴ 红河烟草(集团)有限责任公司技术中心, 弥勒 652300

摘要: 采用反相高效液相色谱-二极管阵列检测器(RP-HPLC-DAD)分离和测定烟草中类胡萝卜素及其异构体的组成和含量。烟草样品经过含有 0.1% 丁基羟基甲苯(BHT)的丙酮溶液萃取, 浓缩后, 经 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱分离。流动相组成: A, 乙腈:水(体积比为 88:12); B, 乙酸乙酯。梯度洗脱程序: 0~25 min, 100% A; 25~50 min, B 由 0% 线性增加为 60%; 50~55 min, 40% A + 60% B; 55~60 min, A 由 40% 线性增加为 100%。检测波长: 450 nm。进样量: 10 μ L。流速: 1.0 mL/min。该方法简化了样品的前处理, 共分离出烟草中 11 种类胡萝卜素及其异构体。类胡萝卜素物质的加标回收率为 87.7%~94.6%; 相对标准偏差为 3.01%~4.29%。同时研究了新鲜烟叶和烘烤后烟叶中类胡萝卜素的分布和含量, 结果显示: 烟叶中类胡萝卜素的组成及含量与烟叶品种、部位以及调制有关。

关键词: 反相高效液相色谱法; 类胡萝卜素; 烟草

中图分类号: TS411.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2009)02-0001-09

Determination of carotenoids and isomers in tobacco leaves by RP-HPLC

LIU Shao-min¹, CHU Da-yan¹, HONG Shen-qi², TONG Hong-wu¹, FANG Li³,
ZHOU Gui-yuan⁴, CHANG Yu⁴¹ Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, China;² Anhui Provincial Tobacco Company, Hefei 230022, China;³ Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming 650106, China;⁴ Technology Center of Honghe Tobacco (Group) Co., Ltd., Mile 652300, China

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with photodiode array detection (DAD) was developed for the determination of carotenoids and their isomers in tobacco leaves. Carotenoids were extracted from tobacco leaves by cold acetone solution containing 0.1% butylated hydroxytoluene (BHT), and then were concentrated and separated on a Zorbax SB C₁₈ column. A mobile phase of acetonitrile-H₂O (88:12, v/v) (A) and ethyl acetate (100%) (B) with the following gradient elution was used: 100% A at the beginning, maintained for 25 min, decreased to 40% A in 50 min, maintained for 5 min and returned to 100% A in 60 min. A total of 11 constituents including carotenoids and some isomers in tobacco leaves were resolved with the flow-rate at 1.0 mL/min, injection at 10 μ L and detection at 445 nm. The recoveries of carotenoids in tobacco leaves were 87.7%~94.6%, and relative standard deviations were 3.01%~4.29%. This method was successfully applied for the quantification of carotenoids in green, fresh and flue-cured tobacco leaves. The results show that it presents many differences not only in carotenoids contents but also in carotenoids profiles between fresh and flue-cured tobacco leaves.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography; carotenoids; tobacco

作者简介: 刘少民, 男, 教授、研究生导师, 主要从事烟草化学研究, Tel: 0551-3492147, E-mail: liusm@ustc.edu.cn

基金项目: 安徽省烟草公司科研基金资助(NO: ahkj2007-08)

收稿日期: 2008-09-12

类胡萝卜素作为一种重要的天然色素广泛分布在植物、动物以及微生物中,它们一般是由8个类异戊二烯单位组合成多烯链,通过共轭双键构成的一类化合物或其氧化衍生物^[1-2]。类胡萝卜素的长链共轭结构赋予了它们重要的生物学功能。研究表明类胡萝卜素不仅是重要营养物质维生素A的前体物,同时还具有清除自由基、延缓衰老、增强免疫以及预防癌症等功能^[3-5]。因此,类胡萝卜素与人类健康密切相关。

研究表明,烟草中的类胡萝卜素是影响烟叶品质的主要成分之一,它不仅决定了调制后烟叶的外观质量^[6],而且类胡萝卜素降解物是烟叶重要的致香物质,直接或间接地影响烟叶的内在品质^[7];同时,烟草中一些类胡萝卜素在烟支高温燃烧时会形成多环芳烃^[8-9],因此烟草中的类胡萝卜素也是一种潜在的影响烟气安全性的物质,对烟草中类胡萝卜素种类及其含量的研究具有重要意义。

类胡萝卜素的测定常采用分光光度法、柱色谱法、薄层色谱法等^[10-12]。但这些方法由于准确度差,耗时以及样品前处理复杂等缺点而被具有准确、快速及容易实现自动化等优点的高效液相色谱法(HPLC)所取代。HPLC的迅速发展,特别是随着光电二极管阵列检测器(DAD)的引入,可更方便有效的利用光谱特征对类胡萝卜素及其异构体进行定性分析^[13]。本文使用ODS C₁₈反相色谱柱,研究建立了HPLC-DAD定性定量分析烟叶中类胡萝卜素的方法,并比较测定了新鲜烟叶和烘烤后烟叶中类胡萝卜素的分布及含量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1315A 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司), Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 × 150 mm 5 μm 美国 Agilent 公司), 振荡器(南京庚辰科学仪器有限公司), 旋转蒸发器(南京庚辰科学仪器有限公司), CQX25-06 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司), Milli-Q-185 超纯水制备系统(德国 Millipore 公司)。

β-胡萝卜素和 α-胡萝卜素混合标样(β-carotene and α-carotene 2:1), 玉米黄质(zeaxanthin), β-阿朴-8'-胡萝卜素(β-apo-8'-carotenal, 内标), 2,6-叔丁基对甲酚(2,6-butylated hydroxytoluene, BHT), 三乙胺(TEA), 叔丁基醚(MTBE)均购于 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA); 新黄质(neoxanthin), 紫黄质(violaxanthin)和叶黄素(lutein)标准样品从菠菜中分离得到。无水 Na₂SO₄, NaCl, KOH, 盐酸、乙醚、石油醚(30~60 °C), 正己烷、氯

仿、丙酮和甲醇(分析纯, 国药集团上海化学试剂有限公司), 甲醇、二氯甲烷、异丙醇、乙腈、乙酸乙酯、四氢呋喃、和丙酮(色谱纯, Fisher 公司)。不同品种以及不同部位烟叶样品由中国科学技术大学烟叶站和云南烟草研究院提供, 所有烟叶样品干燥后粉碎过 40 目筛收集。

1.2 新黄质、紫黄质和叶黄素标样的制备

根据 Kimura 等^[14]报道, 新黄质、紫黄质和叶黄素标样从菠菜中分离得到。从市场购买来的新鲜菠菜, 去掉叶脉, 用去离子水洗净叶片, 剪成碎片后迅速冻干成粉末。称取 20 g 菠菜叶粉末于 250 mL 锥形瓶中, 加入 90 mL 冰丙酮, 在振荡器上振荡 2 h (150 rpm), 抽滤, 用 30 mL 冰丙酮洗涤 2 次, 合并滤液。

在分液漏斗中预先加入 50 mL 石油醚, 将丙酮萃取液部分转移到分液漏斗中, 加入 10 mL 饱和 NaCl 溶液, 再缓慢加入 15 mL 去离子水, 轻轻振荡, 静置分层后, 放掉下层, 收集上层石油醚萃取液。重复以上操作, 直到所有丙酮萃取液全部转移到石油醚中。在石油醚萃取液中加入等体积的 10% KOH-甲醇溶液, 充入 N₂, 在室温、黑暗中皂化过夜。

皂化液取出后, 转移到分液漏斗中, 静置分层, 去除下层(除去叶绿素及其衍生物), 上层加入一定量的饱和 NaCl 溶液和去离子水洗至 pH 接近中性后, 转移到锥形瓶中, 加入无水 Na₂SO₄ 干燥。干燥后的皂化液旋转蒸发浓缩至 4 mL 左右。

在层析柱(30 cm × 20 mm i.d)中装入 30 g 中性氧化铝(110 °C 下活化 3 h), 上端加入少量的无水 Na₂SO₄ 形成约 1cm 左右的干燥层。将浓缩后的萃取液移入层析柱中, 分别用 85:15、60:40(体积比)的丙酮-石油醚体系来洗脱叶黄素和紫黄质, 用 100% 丙酮洗脱新黄质, HPLC 法测定分离得到标样的纯度^[14]。所得叶黄素、紫黄质和新黄质标样浓缩后, 溶解于乙醇中, 分别在 446、440 和 438 nm 波长下测定其吸光度, 并计算其浓度^[15]:

$$\text{类胡萝卜素浓度}(\text{g/mL}) = \frac{E}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100}$$

式中 E: 分光光度计测定的类胡萝卜素吸收值; E_{1cm}^{1%}: 类胡萝卜素的吸收系数(在乙醇中, 叶黄素和紫黄质均为 2250, 新黄质为 2243), 叶黄素、紫黄质和新黄质标样浓度分别为: 192 μg/mL, 42.6 μg/mL 和 54.8 μg/mL。通过计算 HPLC 色谱图中每种类胡萝卜素峰面积与所有峰面积之比, 得到叶黄素、紫黄质和新黄质的纯度范围分别为 94%~98%、93%~96% 和 90%~95%, 符合定量分析的要求。

1.3 标准溶液的配制

准确称取 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素混合标准品 5.00 mg、玉米黄质 1.00 mg 和 β -阿朴-8'-胡萝卜素 10.00 mg, 丙酮溶解后分别定容到 25 mL、10 mL 和 50 mL 棕色容量瓶中, 分别配置成 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液。从菠菜中分离得到的新黄质、紫黄质和叶黄素标样浓缩后溶在乙醇中, 其浓度分别为 54.8、42.6 和 192.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所有储备液中均含 0.1% 的 BHT 作为抗氧化剂, 充入 N_2 , 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存。

1.4 样品前处理

非皂化样品: 准确称取 0.5 g 烟样, 置于 100 mL 的磨口锥形瓶中, 加入 25 mL 丙酮(含 0.1% BHT), 同时加入 50 μg 内标(β -阿朴-8'-胡萝卜素), 用铝箔包裹密封, 振荡 2 h (150 rpm)。振荡萃取结束后, 迅速过滤, 滤渣用丙酮洗涤(15 mL \times 3 次), 合并滤液, 加入 15 g 无水 Na_2SO_4 干燥 2 h。干燥后, 将萃取液旋转蒸发浓缩至 1 mL 左右(水浴温度不超过 $35\text{ }^\circ\text{C}$)。经 0.45 μm 有机滤膜过滤到棕色色谱瓶中, 立即进样进行 HPLC 分析。

皂化样品: 准确称取 0.5 g 烟样, 置于 100 mL 的磨口锥形瓶中, 加入 25 mL 丙酮(含 0.1% BHT), 同时加入 50 μg 内标(β -阿朴-8'-胡萝卜素)。用铝箔包裹, 密封, 振荡 2 h (150 rpm)。振荡萃取结束后, 迅速过滤, 滤渣用丙酮洗涤(15 mL \times 3 次), 合并滤液, 将滤液部分转移到预先盛有 30 mL 无水乙醚的分液漏斗中, 加入一定量的饱和 NaCl 溶液和去离子水, 轻轻振荡, 静置分层后, 放掉下层, 收集上层。重复此操作, 直到所有丙酮萃取液全部转移到无水乙醚中。待全部转移完后, 在无水乙醚萃取液中加入等体积的 10% KOH -甲醇溶液, 充入 N_2 , 在室温、黑暗中皂化过夜。

将皂化液转移到分液漏斗中, 静置分层, 分离上下层, 下层用 15 mL 无水乙醚反萃 2 次, 反萃液与上层萃取液合并, 用饱和 NaCl 溶液和去离子水洗至 pH 接近中性, 加入无水 Na_2SO_4 干燥, 干燥后的皂化液旋转蒸发浓缩至 1 mL 左右(水浴温度不超过 $35\text{ }^\circ\text{C}$)。经 0.45 μm 有机滤膜过滤到棕色色谱瓶中, 立即进样进行 HPLC 分析。

1.5 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB C_{18} 柱(4.6 \times 150 mm 5 μm); 流动相: 乙腈:水(88:12)和乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 柱温: $25\text{ }^\circ\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 450 nm; 采用内标法进行定量分析。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	乙腈-水(88:12)	乙酸乙酯
0.00	100%	0
25.00	100%	0
50.00	40%	60%
55.00	40%	60%
60.00	100%	0

2 结果与讨论

2.1 烟草中类胡萝卜素的萃取

文献中报道类胡萝卜素的萃取溶剂很多^[16], 但由于类胡萝卜素样品的多样化以及类胡萝卜素种类的繁多, 使得没有一种溶剂能适合所有样品中类胡萝卜素的提取^[13]。为了寻找一种比较适合烟草中类胡萝卜素的萃取溶剂, 本文选择正己烷-甲醇-丙酮(50:25:25)、丙酮-石油醚(1:1)、甲醇-四氢呋喃(1:1)、氯仿-甲醇(2:1)和丙酮 5 种不同的溶剂体系进行优化, 结果表明, 5 种溶剂对烟草中类胡萝卜素的萃取效率没有很大的差异, 使用丙酮作为萃取溶剂时, 萃取过程中烟草样品中其它物质对类胡萝卜素的色谱分离影响最小, 所以最终选择丙酮作为烟草中类胡萝卜素的萃取溶剂。

为了抑制分析过程中类胡萝卜素的降解, 试验优化了加入不同浓度抗氧化剂(BHT)对萃取效率的影响(表 2)。结果显示, 当 BHT 浓度在 0.01% ~ 0.1% 范围内时, 类胡萝卜素的萃取量随着 BHT 浓度的增加而增加; 当 BHT 浓度达到 0.1% 后, 随着 BHT 浓度的增加, 类胡萝卜素萃取量的变化不大。故试验中选择在萃取剂中加入抗氧化剂(BHT)的浓度为 0.1%。同时考虑到类胡萝卜素易受到光和热的影响, 萃取操作在微弱黄色光线的室内进行。

2.2 皂化对类胡萝卜素测定的影响

在质体色素的测定中, 常引入皂化技术对样品进行前处理, 其目的是为了去除叶绿素和一些未知的油脂(这些组分干扰色谱分离并影响色谱柱寿命), 简化色谱分离、准确定性和定量^[13, 16-17]。但是皂化的同时会延长分析时间, 引入新的物质, 更重要的是引起类胡萝卜素的大量降解^[17]。本文分析比较了直接萃取和皂化提取 2 种前处理方法对烟草中类胡萝卜素测定结果的影响(表 3)。结果显示, 在较低的皂化浓度下(5% ~ 10% KOH -甲醇溶液), 类胡萝卜素降解量较小, 同时由于黄色色素的酯结合态的水解, 新黄质、紫黄质和叶黄素等类胡萝卜素的含量与皂化前相比, 都有少

量的增加。但随着皂化浓度的增加(20%~40% KOH-甲醇溶液),类胡萝卜素降解量增加,皂化后的类胡萝卜素含量明显低于皂化前。可见,在皂化的条件下很难对烟草中游离态的类胡萝卜素给出准确的定量结

果;同时,烟草中的叶绿素并不影响类胡萝卜素的色谱分离。因此,本文用含有0.1%丁基羟基甲苯(BHT)的丙酮溶液萃取烟草中的类胡萝卜素后直接测定,而未采用皂化技术。

表2 不同的抗氧化剂(BHT)浓度萃取下类胡萝卜素的含量

($\mu\text{g/g}$)

BHT 浓度	0	0.01%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%
顺式-新黄质	8.36	10.64	12.78	14.64	15.02	15.95
新黄质	60.42	62.36	66.47	75.93	76.36	77.18
紫黄质	52.47	56.82	60.34	67.83	68.34	67.05
黄体黄质	23.06	25.14	29.26	34.61	34.95	35.02
顺式-黄体黄质	3.28	3.42	3.64	4.02	4.24	4.29
顺式-紫黄质	10.47	11.54	13.12	16.22	17.03	17.62
叶黄素	306.7	312.9	320.7	339.6	341.7	342.3
玉米黄质	—	—	—	—	—	—
顺式-叶黄素 a	7.24	8.02	9.47	11.26	12.05	12.82
顺式-叶黄素 b	28.13	30.96	33.78	39.62	40.18	41.06
β -胡萝卜素	155.4	160.2	164.7	171.2	172.3	173.4
总类胡萝卜素	655.5	682.0	714.3	774.9	782.2	786.7

表3 不同浓度 KOH-甲醇溶液皂化下类胡萝卜素含量

($\mu\text{g/g}$)

KOH-甲醇溶液	0	5%	10%	20%	30%	40%
顺式-新黄质	10.36	12.64	15.78	12.64	8.32	4.63
新黄质	68.42	72.36	80.47	74.93	55.46	42.58
紫黄质	60.23	62.82	68.34	62.83	50.24	36.85
黄体黄质	29.84	30.14	32.26	28.61	21.15	14.32
顺式-黄体黄质	3.25	—	—	—	—	—
顺式-紫黄质	10.97	11.54	12.42	10.02	7.42	4.62
叶黄素	327.4	334.9	340.7	317.6	296.7	267.3
玉米黄质	—	—	—	—	—	—
顺式-叶黄素 a	6.37	3.48	—	—	—	—
顺式-叶黄素 b	30.63	34.67	36.73	29.64	19.58	13.24
β -胡萝卜素	168.5	165.2	162.7	158.2	152.6	146.8
总类胡萝卜素	716.0	727.8	749.4	694.5	611.5	530.3

2.3 分离条件的选择

2.3.1 流动相的优化

分别研究了四氢呋喃(THF)-水、丙酮-水、乙腈-水-乙酸乙酯、乙腈-甲醇-二氯甲烷、甲醇-异丙醇-水和乙腈-甲醇-叔丁基醚(MTBE)-水等二元到四元不同体系^[16]对类胡萝卜素的分离效果(流动相中均加入0.1% BHT作为抗氧化剂和0.05%三乙胺作为改进剂),试验结果表明,使用Zorbax SB C₁₈色谱柱,在乙腈-水-乙酸乙酯体系下,采用梯度洗脱,烟草中的11种类胡萝卜素(包括其异构体)均达到完全分离,色谱图见图1。

2.3.2 其他色谱条件的优化

分别考察了流动相流速、柱温和检测波长对分离效

果的影响,结果表明,流速为1.0 mL/min时,烟草样品中的类胡萝卜素及其异构体均可达到完全分离,且分离度较高,峰形良好,当流速增加至1.2 mL/min时,尽管可适当缩短分离时间,但分离度较差。柱温不仅影响物质的保留时间还影响色谱柱的选择性^[17],分别考察了20、25、30、35℃不同柱温对分离效果的影响,结果表明,随着柱温的升高,保留时间减小,但当柱温达到30℃时,叶黄素和玉米黄质、 β -胡萝卜素和 α -胡萝卜素的分离效果也变差,最终选择25℃作为最佳柱温。试验发现,DAD检测器检测波长在450 nm下,测定的类胡萝卜素及其异构体均显示出较好的分离效果和较高的响应信号,选择450 nm作为类胡萝卜素的测定波长。

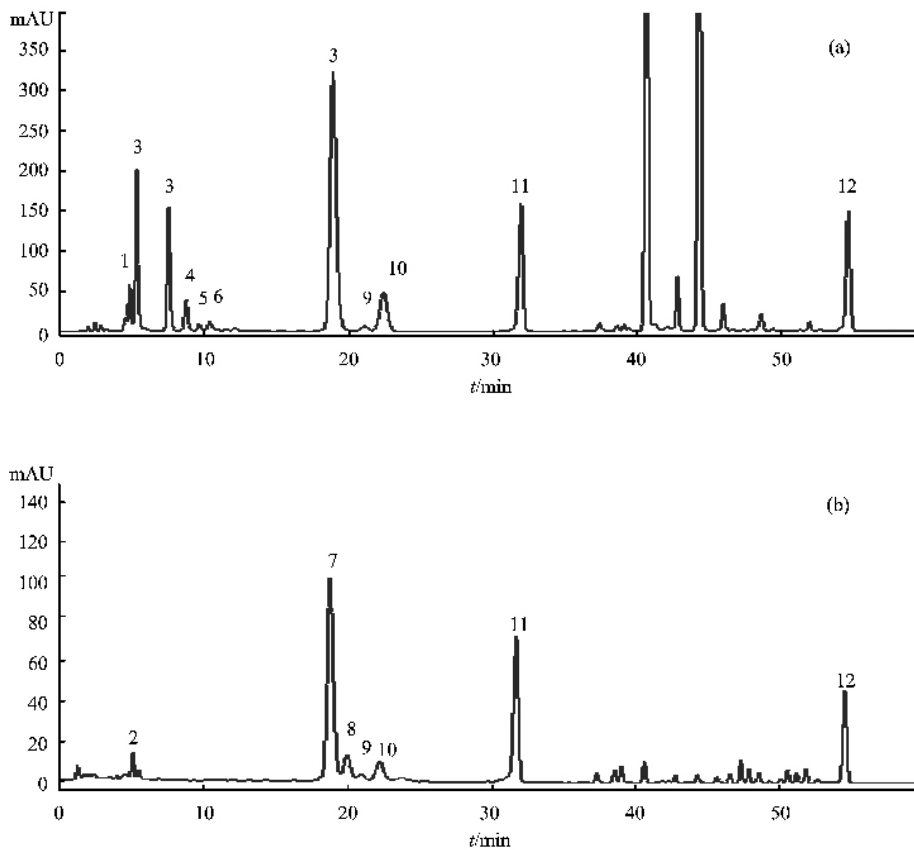


图1 类胡萝卜素 HPLC 色谱图:(A)新鲜烟叶;(B)烘烤后烟叶

注:1-顺式-新黄质;2-新黄质;3-紫黄质;4-黄体黄质;5-顺式-黄体黄质;6-顺式-紫黄质;7-叶黄素;8-玉米黄质;9-顺式-叶黄素 a;10-顺式-叶黄素 b;11-内标(β -阿朴-8'-胡萝卜素);12- β -胡萝卜素

2.4 方法的线性范围和检测限

配置了 5 个不同浓度的系列标准溶液,分别加入相同量的内标(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),标准溶液各种类胡萝卜素的浓度范围分别为:玉米黄质(1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) α -胡萝卜素(1.0, 10.0, 20.0, 35.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) β -胡萝卜素(2.0, 20.0, 40.0, 70.0, 100.0 $\mu\text{g}/$

mL) 叶黄素(1.92, 19.2, 57.6, 96.0, 192.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 新黄质(0.86, 8.6, 17.2, 25.8, 42.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和紫黄质(1.1, 14.5, 27.9, 41.3, 54.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在优化的色谱条件下,以目标物与内标物的峰面积之比为纵坐标(Y)浓度比为横坐标(X)绘制工作曲线,结果见表 4。

表4 类胡萝卜素的线性范围、回归方程、相关系数及检测限

类胡萝卜素	线性范围/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回归方程	相关系数	检测限*/(ng/mL)
新黄质	0.8 ~ 42.6	$Y = 0.3557X - 0.0259$	0.9972	26
紫黄质	1.1 ~ 54.8	$Y = 0.3469X + 0.0292$	0.9976	28
叶黄素	1.9 ~ 192.0	$Y = 0.6702X + 0.0397$	0.9987	42
玉米黄质	1.0 ~ 25.0	$Y = 0.1741X + 0.0104$	0.9984	26
α -胡萝卜素	1.0 ~ 50.0	$Y = 0.2151X - 0.0142$	0.9992	18
β -胡萝卜素	2.0 ~ 100.0	$Y = 0.4109X + 0.0323$	0.9996	19

注:* 信噪比 $S/N=3$

2.5 方法的精密度和回收率

准确称取 2 份相同烟样,1 份直接测定其中各种类胡萝卜素的含量,另 1 份加入已知量的标准溶液,在

优化的试验条件下平行测定 5 次。通过加入的标准物含量计算各类胡萝卜素的回收率,并计算相对标准偏差(见表 5)。对于类胡萝卜素的顺式异构体,因为顺、

反式类胡萝卜素具有相同的吸收系数,所以用其反式标样的结果进行评价。

表5 方法的回收率和精密度(n=5)

类胡萝卜素	添加量 / μg	测定值 / μg	回收率 /%	RSD /%
新黄质	25.8	22.6	87.7	4.03
紫黄质	41.3	36.8	89.2	4.29
叶黄素	96.0	88.5	92.2	3.46
玉米黄质	20.0	18.1	90.5	3.67
β -胡萝卜素	70.0	66.2	94.6	3.01

2.6 类胡萝卜素的定性与定量

图1为新鲜烟叶和调制后烟叶样品的色谱图。通过与类胡萝卜素标样峰的保留时间、DAD得到的光谱数据对照以及加标试验,烟叶色谱图上2、3、7、8、11、12峰分别定性为反式新黄质(*trans*-neoxanthin)、反式-紫黄质(*trans*-violaxanthin)、反式-叶黄素(*trans*-lutein)、反式-玉米黄质(*trans*-zeaxanthin)、 β -阿朴-8'-胡萝卜醛(β -apo-8'-carotenal)和反式- β -胡萝卜素(*trans*- β -carotene)。同时,由于类胡萝卜素的光谱结构中一般具有3个特征吸收峰(见图2),通过DAD检测到的光谱结构可以认为图1中色谱峰1、4、5、6、9、10也是类胡萝卜素类物质。

对于没有标样的类胡萝卜素及其顺式异构体的定性,文献报道的方法有最大吸收波长法(类胡萝卜素的顺式异构体的最大吸收较其反式异构体一般蓝移2~6 nm^[17])、光谱精细结构法(即%III/II——光谱图上第三与第二最大吸收比值百分数,见图2)、Q值法(Q值——光谱图上顺式峰与第二最大吸收峰吸收比值百分数,对于顺式异构体的定性通过测得的Q值与文献报道的值比较)^[17-18]等。据此,在图1中,峰1可定性为顺式-新黄质(*cis*-neoxanthin),因为它与紫黄质(峰3)有相似的光谱结构,但%III/II值比紫黄质小^[19]。峰6定性为顺式-紫黄质,与紫黄质(峰3)的最大吸收波长相比,它的最大吸收波长蓝移了6 nm,与文献报道一致^[17]。通过与文献报道的Q值比较,峰9、10定性为叶黄素顺式异构体(*cis*-lutein),即顺式-叶黄素a和顺式-叶黄素b;同时用Chen报道^[20]的方法,将反式-叶黄素标样在25℃,荧光下照射24 h,进行HPLC测定,在其相同的保留时间位置上出现了2种叶黄素顺式异构体的色谱峰,可进一步证实峰9、10为叶黄素顺式异构体。峰4、5定性为黄体黄质(luteoxanthin)及其异构体,因为峰4的最大吸收波长与紫黄质(峰3)相比,蓝移了20 nm;通过与文献报道值比较,其中峰5定性为顺式-黄体黄质(*cis*-luteoxanthin)。试验获得以及文献报道

的辅助定性的光谱数据见表6(见第9页)。

各种类胡萝卜素根据建立的回归方程用内标法进行定量。由于类胡萝卜素顺、反式异构体具有相同的吸收系数,对于没有标样的顺式类胡萝卜素异构体,按其相应的反式异构体的回归方程进行定量,其中黄体黄质(luteoxanthin)及其异构体根据紫黄质的回归方程定量。

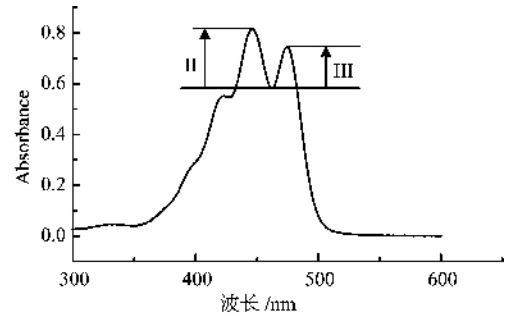


图2 叶黄素的精细结构(%III/II)

2.7 样品的测定

分别测定了4种不同部位的新鲜烟叶以及烘烤后的红大烟叶中类胡萝卜素含量,结果见表7和表8。

从新鲜烟叶和烘烤后烟叶的色谱图(图1)上分离出的类胡萝卜素种类看,新鲜烟叶中分离出了11种类胡萝卜素及其异构体,玉米黄质在新鲜烟叶中未检出,而出现在烘烤后的烟叶中,这可能是由于在烘烤的热处理过程中,烟叶中紫黄质在脱环氧化酶的作用下转化成玉米黄质^[24]。烘烤后的烟叶色谱图上,没有检测到紫黄质、黄体黄质以及它们的异构体,这可能是由于这些极性类胡萝卜素在热处理过程中不稳定,发生了降解。无论是新鲜烟叶还是烘烤后的烟叶都没有检测到 α -胡萝卜素,黄体黄质及其异构体是第1次在新鲜烟叶中尝试定性。

表7和表8的结果显示,相同品种,不同部位烟叶中,总类胡萝卜素含量从上部到下部依次降低,光照、温度和营养等不同的生长条件可能是类胡萝卜素含量差异的原因。在不同品种以及不同部位烟叶中,各种类胡萝卜素含量大小依次为:叶黄素及其异构体 > β -胡萝卜素 > 新黄质及其异构体 > 紫黄质及其异构体 > 黄体黄质及其异构体。由表7中不同部位红大烟叶在烘烤前后各种类胡萝卜素含量可以发现,烘烤过程中,各种类胡萝卜素均发生不同程度的降解,而 β -胡萝卜素相对于其它类胡萝卜素而言,降解量低一些,这与Court报道的高度氧化的类胡萝卜素在烘烤过程中降解较快的结果是一致的^[25]。

表7 不同品种、不同部位新鲜烟叶中类胡萝卜素含量

($\mu\text{g/g}$)

峰标号	类胡萝卜素	K326			云烟 85			CB-1		
		上部	中部	下部	上部	中部	下部	上部	中部	下部
1	顺式-新黄质	9.64	7.95	4.04	10.21	6.74	5.21	8.76	5.42	4.81
2	新黄质	70.22	62.33	40.88	65.47	50.12	38.57	59.24	51.09	36.46
3	紫黄质	68.18	47.83	37.69	60.27	44.67	32.46	52.36	40.66	29.53
4	黄体黄质	30.89	21.02	17.53	26.85	17.59	14.24	24.73	16.77	13.27
5	顺式-黄体黄质	2.55	3.16	3.77	4.69	3.62	2.96	4.02	3.95	3.06
6	顺式-紫黄质	11.41	12.57	9.58	12.92	10.34	8.75	11.84	10.22	9.37
7	叶黄素	311.3	259.4	206.7	326.2	272.4	198.6	300.4	245.5	187.8
8	玉米黄质	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	顺式-叶黄素 a	21.77	20.65	18.62	24.81	20.13	16.74	20.62	15.33	12.52
10	顺式-叶黄素 b	60.83	44.69	41.78	53.43	47.41	37.12	49.87	42.83	34.79
12	β -胡萝卜素	164.5	154.8	128.5	160.2	147.6	119.3	156.4	134.7	117.9
	总类胡萝卜素	751.3	634.4	509.1	746.1	620.6	473.9	688.2	566.5	449.5

表8 相同品种、不同部位烟叶在烘烤前后类胡萝卜素含量

($\mu\text{g/g}$)

峰标号	类胡萝卜素	新鲜红大烟叶			烘烤红大烟叶		
		上部	中部	下部	上部	中部	下部
1	顺式-新黄质	12.11	11.46	5.95	—	—	—
2	新黄质	79.42	71.43	56.84	52.43	46.27	30.47
3	紫黄质	75.82	66.71	47.32	—	—	—
4	黄体黄质	34.86	20.86	18.94	—	—	—
5	顺式-黄体黄质	3.52	2.88	1.85	—	—	—
6	顺式-紫黄质	11.96	10.23	8.08	—	—	—
7	叶黄素	372.5	308.5	274.7	272.4	258.1	178.9
8	玉米黄质	—	—	—	27.81	22.02	19.52
9	顺式-叶黄素 a	6.85	5.19	4.56	7.18	6.48	6.02
10	顺式-叶黄素 b	33.65	32.84	25.33	39.45	34.67	—
11	β -胡萝卜素	189.4	168.7	136.5	156.4	144.8	114.2
	总类胡萝卜素	820.1	698.8	580.1	555.7	512.3	349.1

3 结论

本文研究了反相高效液相色谱测定烟叶中类胡萝卜素的组成和含量的方法。在新鲜烟叶中共鉴定出11种类胡萝卜素,包括一种新的类胡萝卜素——黄体黄质和类胡萝卜素的一些异构体,并在烘烤后的烟叶中发现了玉米黄质。样品测定结果显示,叶黄素和 β -胡萝卜素是烤烟烟叶中含量最高,最具代表性的2种类胡萝卜素,不同品种、不同部位烟叶中类胡萝卜素在组成分布上相似,含量上存在一定差异;烘烤前后烟叶中类胡萝卜素无论在组成上或是含量上均存在明显差异。

参考文献

- [1] Olson J A, Krinsky N I. The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators? Introduction [J]. *FASEB J*, 1995, 9(15): 1547-1550.
- [2] 陶俊, 张上隆, 徐昌杰, 等. 类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(3): 276-281.
- [3] Riso P, Visioli F, Erba D, et al. Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection [J]. *Eur J Clin Nutr*, 58(10): 1350-1358.
- [4] 韩雅珊. 类胡萝卜素的功能研究进展 [J]. *中国农业大学学报*, 1999, 4(1): 5-9.

- [5] Giovannucci E ,Ascherio A ,Rimm E B ,et al. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate-cancer[J]. J Natl Cancer I 87(23): 1767-1776.
- [6] 姚益群 ,谢金伦 ,郭其菲 ,等 .云南烟草香气研究[J].烟草科技 ,1998(4): 24-27.
- [7] 王瑞新 .烟草化学[M].北京 :中国农业出版社 ,2003 : 84-85.
- [8] Chortyk O T ,Schlotzhauer W S ,Stedman R L. Composition studies on tobacco. XXIII. Pyrolytic and structural investigation on the polyphenol-amino acid pigments of leaf[J]. Beitr Tabakforschung ,1966 2(6): 424-429.
- [9] Omenn G S ,Goodman G E ,Thornquist M D ,et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease[J]. New Engl J Med ,1996 ,334(18): 1150-1155.
- [10] 杜咏梅 ,张怀宝 ,王晓玲 ,等 .光度法测定烟草中总类胡萝卜素的方法研究[J].中国烟草科学 ,2003(3): 28-29.
- [11] Adewusi S R A ,Bradbury J H. Carotenoids in Cassava-Comparison of open-column and HPLC methods analysis[J]. J Sci Food Agr ,1993 62(4): 375-383.
- [12] Deli J. Thin-layer chromatography of carotenoid[J]. Jpc-J Planar Chromat ,1998 ,11(4): 311-312.
- [13] 卢红梅 ,梁逸增 .高效液相色谱法测定食物中的类胡萝卜素[J]. 色谱 ,2005 23(1): 57-62.
- [14] Kimura M ,Rodriguez-Amaya D B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids [J]. Food Chem 2002 ,78 : 389-398.
- [15] Goodwin T W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments [M]. London : Academic Press ,1976 : 38.
- [16] Oliver J ,Palou A. Chromatographic determination of carotenoids in food[J]. J Chromatogr A ,2000 881 : 543-555.
- [17] Rodriguez-Amaya D B. A guide to carotenoid analysis in foods [M]. Washington D C : ILSI Press 2001 : 1-59.
- [18] Cortés C ,Esteve M J ,Frígola A ,et al. Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection[J]. J Agric Food Chem 2004 ,52 : 2203-2212.
- [19] Britton G. Carotenoid[M]. Boston : Birkhauser ,1995 : 13.
- [20] Inbaraj B S ,Chien J T ,Chen B H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*[J]. J Chromatogr A , 2006 ,1102 : 193-199.
- [21] Lee H S ,Castle W S ,Coates G A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida , USA[J]. J Chromatogr A 2001 ,913 : 371-377.
- [22] Mercadante A Z ,Rodriguez-Amaya D B ,Britton G. HPLC and Mass Spectrometric analysis of carotenoids from mango[J]. J Agric Food Chem ,1997 45 : 120-123.
- [23] De Rosso V V ,Mercadante A Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from *Dovyalis* and *Tamarillo* fruits[J]. J Agric Food Chem 2007 ,55 : 9135-9141.
- [24] Niyogi K K ,Grossman A R ,Bjorkman O. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion[J]. Plant Cell ,1998 ,10 (7): 1121-1134.
- [25] Court W A ,Hendel J G. Changes in leaf pigments during senescence and curing of flue-cured tobacco[J]. J Plant Sci ,1984 , 64 : 229-232.

表 6 烟叶中类胡萝卜素的鉴定

峰标号	类胡萝卜素	保留时间/min	吸收峰/nm								%III/II		Q 值	
			测定值 ^a				文献值				测定值 ^a	文献值	测定值 ^a	文献值
1	顺式-新黄质	4.739	–	418	440	468	–	419	441	470 ^b	66.4	63.3 ^b	–	–
2	新黄质	5.214	–	414	438	466	–	418	441	470 ^b	85.2	81.6 ^b	–	–
3	紫黄质	7.408	–	417	440	470	–	414	442	472 ^b	88.6	90.0 ^b	–	–
4	黄体黄质	8.626	–	400	422	450	–	400	424	450 ^b	98.2	97.9 ^b	–	–
5	顺式-黄体黄质	9.515	–	408	433	464	–	408	432	462 ^c	46.5	–	–	–
6	顺式-紫黄质	10.274	330	412	434	464	328	414	435	463 ^d	54.2 ^d	61.0	0.17	0.18 ^d
7	叶黄素	18.996	–	420	446	474	–	426	447	474 ^b	55.3	50.0 ^b	–	–
8	玉米黄质	20.199	–	428	454	480	–	428	452	481 ^b	27.0	28.0 ^b	–	–
9	顺式-叶黄素 ^a	21.230	330	420	443	470	332	416	440	470 ^e	42.7	–	0.13	0.13 ^e
10	顺式-叶黄素 ^b	22.563	332	420	442	468	332	421	446	– ^e	43.8	–	0.26	0.16 ^e
11	β -阿朴-8'-胡萝卜素醛	32.235	–	–	460	–	–	–	–	–	–	464 ^e	–	–
12	β -胡萝卜素	54.135	–	429	454	478	–	429	454	479 ^b	32.7	26.1 ^b	–	–

注：a 的测定条件：流动相：乙腈-水(88:12)和乙酸乙酯；流速：1.0 mL/min；柱温：25℃；检测波长：450 nm。

b 的测定条件：流动相：乙腈-甲醇(75:25)、MTBE 和水；流速：1.0 mL/min；柱温：25℃；检测波长：450 nm^[21]。

c 的测定条件：流动相：正己烷、丙酮；流速：1.0 mL/min；柱温：25℃；检测波长：450 nm^[22]。

d 的测定条件：流动相：甲醇、MTBE；流速：0.9 mL/min；柱温：22℃^[23]。

e 的测定条件：流动相：甲醇-乙腈-水(84:14:2)、二氯甲烷；流速：1.0 mL/min；检测波长：450 nm^[20]。