

高效液相色谱建立烟用香精指纹图谱研究

陆舍铭 王 笛 任卓英 杨国荣 许 健 缪明明

(红塔集团技术中心 云南 玉溪 653100)

摘 要 研究并建立了 6 批次 JT-1 烟用香精的 HPLC 指纹图谱, 采用 ZORBAX Extend-C18 (5 μ m, 4.6 \times 150mm) 色谱柱, ZORBAX RX-C18 (4.6 \times 12.5mm, 5 μ m) 保护柱, 乙腈: 0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱, 流速 1mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长 254nm, 进样量 15 μ L, 硝基苯为内标, 采用欧式距离与夹角余弦相结合的方法计算其相似度, 并通过稀释实验进一步验证该指纹图谱对烟用香精质量控制的可行性, 实验结果表明: 夹角余弦方法计算的相似度不能够完全反映香精样品有效成分含量的稳定性, 而欧式距离对于样品有效含量检测问题更加有效, 夹角余弦与欧式距离相结合使所建立的高效液相指纹图谱能快速、方便的检测烟用香精的质量稳定性。

关键词 高效液相色谱 烟用香精 指纹图谱 稀释 欧式距离

香精香料是依靠所含的多种化学成分发挥致香作用的, 因此仅凭某一种化学成分的定性和定量无法对其质量进行评价^[1]。由于化学指纹图谱具有指纹特征分析、宏观推断分析等特点^[2], 故适合于分析复杂化学物质组成的稳定性, 可以成为香精香料质量评价的有效手段^[3]。指纹图谱的研究涉及质量的关键在于最终数据的处理和归类, 处理方法的选择以及对质量控制指标的显示性是数据处理方法研究的重要一环^[4]。故本文在建立烟用香精 HPLC 指纹图谱的同时, 通过稀释实验对其相似度的计算方法做了进一步探讨。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

HP1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配备二极管阵列检测器 (DAD) 和 HP 色谱工作站, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器, 电子天平 (精确 0.0001g, METTLER AE240), 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

乙腈 (色谱纯, DIMA TECHNOLOGY), 甲酸、丙二醇、无水乙醇 (分析纯, 汕头市达濠区精细化学品有限公司), 二次蒸馏水, 硝基苯 (99.9%, ABCR GmbH), 香精样品由云南红塔集团玉溪卷烟厂提供。

1.2 内标液的制备

硝基苯储备液: 准确称取 0.3g 硝基苯 (精确至 0.0001g) 于 50mL 容量瓶中, 用 1/1 (无水乙醇 / 丙二醇, V/V) 稀释至刻度, 摇匀, 4 $^{\circ}$ C 密封冷藏保存。

硝基苯内标稀释液: 准确移取 10mL 硝基苯储备液于 1000mL 容量瓶中, 用 1/1/1 (95% 乙醇 / 丙二醇 / 水, V/V/V) 稀释至刻度, 摇匀, 4 $^{\circ}$ C 密封冷藏保存。

1.3 样品的处理与分析

准确称取 0.5g 料液样品 (精确至 0.0001g), 加入 10mL 内标稀释液, 混匀, 3000r/s 的速度离心 10min,

用 0.22 μm 针头式有机膜取上清液过滤后进行 HPLC 分析。

1.4 烟用香精的稀释实验

用 1/1/1 (95%乙醇 / 丙二醇 / 水, V/V/V) 稀释液将其中任意一批次 JT-1 香精样品分别稀释为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的不同浓度样品。取 0.5g 稀释后的香精样品 (精确至 0.0001g), 加入 10mL 内标稀释液, 混匀, 3000r/s 的速度离心 10min, 用 0.22 μm 针头式有机膜取上清液过滤后进行 HPLC 分析。

1.5 采用的色谱条件为

流动相 A: 乙腈, B: 0.1%甲酸; 流量: 1mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 色谱柱: ZORBAX Extend-C18 (5 μm , 4.6 \times 15mm), ZORBAX RX-C18 保护柱 (4.6 \times 12.5mm, 5 μm); 检测波长 254nm; 进样量: 15 μL ; 洗脱方式: 梯度洗脱 (表 1)。

2 结果与讨论

表 1 梯度洗脱程序

t/time (min)	0	60	80	95	100	110
V (100%CH ₃ CN)	0	50	100	100	0	0
V (0.1%HCOOH)	100	50	0	0	100	100

2.1 精密度和稳定性实验

同一样品连续进样 5 次, 各个色谱峰峰面积和相对保留时间的平均相对标准偏差均小于 3%。每天一次, 连续 5 天对同一样品进行分析, 各个色谱峰峰面积和相对保留时间的平均相对标准偏差均小于 3%。则说明该方法具有较好的精密度和稳定性。

2.2 内标物以及色谱峰的确定

选择稳定性较好且不易与香精样品发生反应的菲与硝基苯为内标物, 比较发现硝基苯的色谱峰峰形良好, 保留时间为 31.8min, 并且不与样品峰重复, 故本实验选择硝基苯为内标物 (见图 1)。

2.3 检测波长的选择

选取 6 批次中任意一批次香精样品, 分别在 254nm, 280nm, 320nm 处检测, 发现在 254nm 下, 峰数较多, 吸收较大, 故选 254nm 为检测波长。

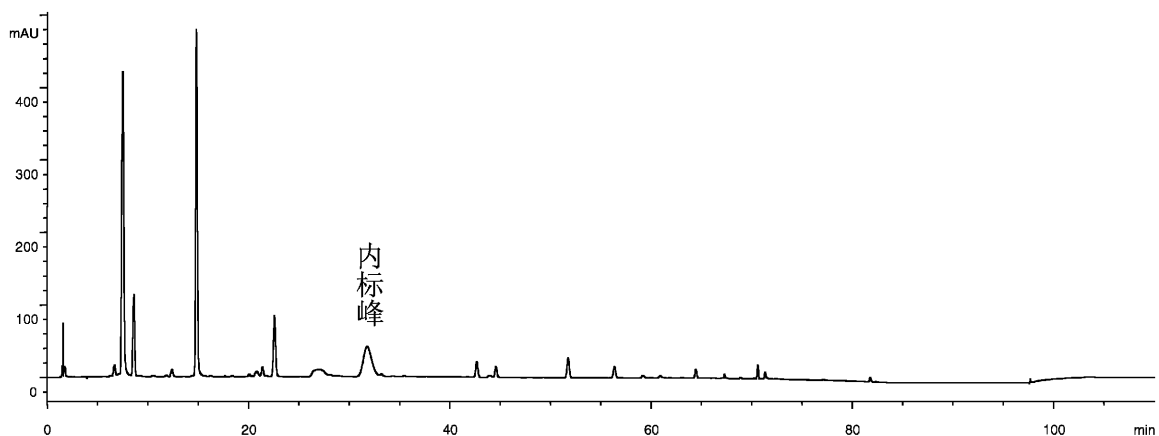


图 1 JT-1 香精样品的高效液相指纹图谱

表 2 6 批次 JT-1 香精样品的 α 、S 及欧式距离与夹角余弦值

序号	a	S						平均值
		1#	2#	3#	4#	5#	6#	
1	0.211	0.135	0.121	0.113	0.107	—	0.109	0.097
2	0.238	2.617	2.618	2.590	2.582	2.604	2.532	2.591
3	0.272	0.727	0.703	0.678	0.636	0.692	0.663	0.683
4	0.392	0.069	0.068	0.065	0.066	0.067	0.065	0.067
5	0.468	2.414	2.354	2.387	2.340	2.363	2.334	2.365
6	0.634	0.026	0.033	—	0.021	0.033	0.032	0.024
7	0.658	0.054	0.081	0.128	0.070	0.084	0.064	0.080
8	0.675	0.084	0.086	0.097	0.084	0.088	0.081	0.086
9	0.713	0.474	0.465	0.463	0.527	0.470	0.461	0.477
10	0.853	0.352	0.364	0.347	0.367	0.367	0.338	0.356
11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	1.346	0.130	0.130	0.128	0.128	0.130	0.128	0.129
13	1.385	0.021	0.022	0.023	0.022	0.022	0.034	0.024
14	1.406	0.080	0.077	0.095	0.085	0.076	0.083	0.083
15	1.633	0.174	0.173	0.171	0.175	0.173	0.172	0.173
16	1.778	0.102	0.105	0.102	0.105	0.104	0.105	0.104
17	1.867	0.031	0.030	0.034	0.030	0.030	0.036	0.032
18	1.922	0.022	0.027	0.023	0.033	0.025	0.036	0.028
19	2.034	0.066	0.074	0.064	0.067	0.066	0.068	0.068
20	2.124	0.026	0.025	0.020	0.020	0.023	0.022	0.023
21	2.174	0.014	0.017	0.008	0.008	0.009	0.012	0.011
22	2.229	0.067	0.066	0.063	0.064	0.061	0.061	0.064
23	2.251	0.054	0.050	0.045	0.045	0.046	0.045	0.047
24	2.283	0.012	0.008	0.007	0.007	0.006	0.007	0.008
25	2.434	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
26	2.580	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.021	0.025
27	2.598	0.006	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005
	A	0.0855	0.0468	0.0647	0.0755	0.0995	0.0762	
	B	1.0000	0.9999	0.9998	0.9998	0.9996	1.0000	
	C	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998	0.9997	0.9999	

注：①“#”香精批次；②“—”未出现该峰；③A：欧式距离计算结果，B：包括内标值的夹角余弦计算结果，C：不包括内标值的夹角余弦计算结果

2.4 指纹图谱的建立与共有峰的分析

以内标峰为参照峰，按照式 (1) 和 (2) 求出 6 批次 JT-1 香精样品及掺比香精所有色谱峰的相对保留值 (α) 和相对峰面积 (S)，并按 α 值的大小列表，且每个 α 值与每个样品该组分的 S 值对应，6 批次 JT-1 部分就组成了 JT-1 香精样品的色谱指纹图谱 (表 2)。

$$\alpha = t_r/t_i \quad (1)$$

$$S = S_r/S_i \quad (2)$$

式中： α ——相对保留时间值； t_r ——待测峰的保留时间 (min)； t_i ——内标峰的保留时间 (min)；S——相对峰面积； S_r ——待测峰的面积； S_i ——内标峰的面积。

在可供比较研究的样品中，具有相同相对保留值的峰，即为共有峰。由表 2 可以看出，23 个色谱峰为 6 个批次 JT-1 香精样品所共有 (即 100% 共有)；这 23 个色谱峰可作为判别 JT-1 香精的群体特征峰，可作为鉴别 JT-1 香精样品的必要条件。

稀释实验结果：从稀释的香精样品结果中可以看出，JT-1 香精的特征峰大部分都存在，而峰面积有明显变化。

2.5 香精色谱指纹图谱相似度评价

相似度分析中常用欧式距离、夹角余弦、相关系数等来计算供试品的相似度^[9]。本文建立了 JT-1 香精的 HPLC 指纹图谱, 并通过夹角余弦和欧式距离相结合的方法来计算其相似度。结果见表 2 中 A、B、C, 6 批次 JT-1 样品中欧式距离在 0.0468~0.0995 之间, 其平均值为 0.0747, 夹角余弦在 0.9996~1.000 之间, 表明 6 批次 JT-1 香精样品有效成分含量、种类都较稳定, 内标值是否包括在内的夹角余弦或者欧式距离的计算结果都能体现香精样品的质量稳定性, 所建立 HPLC 指纹图谱能够很好的检测烟用香精样品的质量稳定性。

以夹角余弦测试的相似度更适合辨别真伪, 以欧式距离为测度的相似度, 是反映特征变量值上大小差异的供试品间亲疏程度的相似性^[9]。廖堃^[7]在建立香精液相指纹图谱中单用《计算机辅助相似性评价系统》(夹角余弦计算方法)来计算相似度并不能完全反映香精样品中有效成分含量问题, 针对此种情况本文做了稀释实验(结果见表 3 中 D、E、F)。如图 2 所示, 欧式距离结果(D)在 0.7418~3.2197, 随着样品浓度降低, 欧式距离结果逐渐增大; 不包括内标值在内的夹角余弦计算结果(E)在 0.9911~1.000 之间, 不随浓度变化呈线性; 包括内标值在内的夹角余弦结果(F)随着样品含量降低而降低, 从 90%的 0.9995 降低到 10%的 0.6056; 数据结果表明: 不包括内标值在内的计算结果完全不能体现样品被稀释, 而在样品被稀释到 40%以下, 不包括内标值的计算结果才能略微体现出小不稳定。所以欧式距离计算相似度的方法在体现样品有效含量

表 3 稀释 JT-1 香精样品的 α 、S 及欧式距离与夹角余弦值

a	S								
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
0.211	0.009	0.019	0.030	0.040	0.047	0.061	0.071	0.079	0.099
0.238	0.266	0.494	0.757	1.008	1.268	1.546	1.786	2.043	2.319
0.272	0.074	0.131	0.203	0.268	0.337	0.408	0.471	0.537	0.607
0.392	0.007	0.012	0.018	0.026	0.031	0.037	0.044	0.053	0.060
0.468	0.285	0.482	0.726	0.969	1.234	1.421	1.640	1.906	2.133
0.634	0.005	0.009	0.012	0.015	0.018	0.021	0.023	0.027	0.029
0.658	0.006	0.013	0.020	0.024	0.030	0.040	0.046	0.054	0.059
0.675	0.008	0.017	0.026	0.031	0.039	0.051	0.059	0.069	0.076
0.713	0.054	0.095	0.141	0.187	0.234	0.284	0.326	0.377	0.420
0.853	0.314	0.315	0.316	0.279	0.337	0.333	0.330	0.340	0.344
1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
1.346	0.005	0.026	0.039	0.052	0.066	0.078	0.090	0.103	0.116
1.385	0.015	0.014	0.015	0.027	0.053	0.019	0.020	0.022	0.023
1.406	0.023	0.016	0.024	0.036	0.051	0.049	0.056	0.066	0.073
1.633	0.011	0.035	0.051	0.072	0.094	0.103	0.119	0.137	0.153
1.778	0.021	0.022	0.032	0.042	0.055	0.064	0.074	0.084	0.095
1.867	0.022	0.015	0.017	0.024	0.045	0.023	0.025	0.027	0.029
1.922	0.013	0.013	0.012	0.015	0.021	0.021	0.024	0.028	0.030
2.034	0.007	—	0.018	0.026	0.033	0.038	0.044	0.052	0.060
2.124	0.006	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012	0.014	0.016	0.021
2.174	0.010	0.006	0.006	0.006	0.009	0.007	0.008	0.008	0.014
2.229	—	0.005	0.005	0.027	0.042	0.038	0.044	0.005	0.059
2.251	0.026	0.023	0.026	0.030	0.032	0.034	0.036	0.050	0.046
2.283	—	0.005	0.006	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006	0.009
2.434	—	0.006	0.006	0.007	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006
2.580	0.018	0.025	0.025	0.027	0.028	0.025	0.025	0.026	0.027
2.598	0.007	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.006	0.006	0.006
D	3.2197	2.9091	2.5390	2.1791	1.7892	1.4537	1.1189	0.7418	0.3719
E	0.9911	0.9984	0.9994	0.9994	0.9990	1.0000	1.0000	0.9998	1.0000
F	0.6056	0.7754	0.8882	0.9434	0.9725	0.9867	0.9938	0.9977	0.9995

注: ① “#” 香精批次; ② “—” 未出现该峰; ③ D: 欧式距离计算结果, E: 不包括内标值的夹角余弦计算结果, F: 包括内标值的夹角余弦计算结果

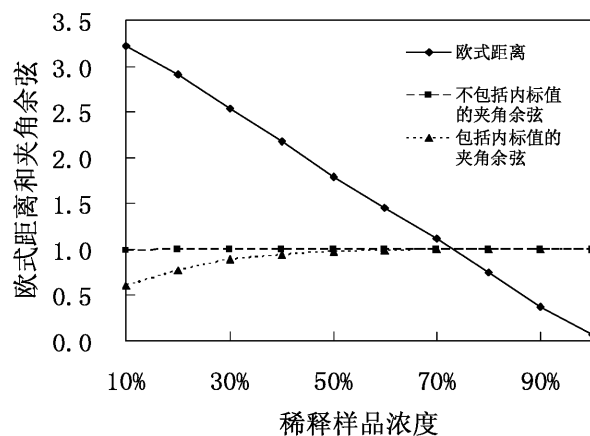


图2 稀释样品的欧式距离、夹角余弦随浓度变化曲线

问题上更加有效，表2中的A和表3中的D表明，6批次样品的欧式距离结果稳定，并且不大于0.1，在样品有效成分含量逐渐减小的情况下，欧式距离的结果逐渐增大，而且计算结果不受内标值的影响，是很好的相似度计算方法。从整体数据结果上看，以夹角余弦测试的相似度更适合辨别真伪，以欧式距离为测度的相似度，是反映特征变量含量大小的相似性，在实际应用中，夹角余弦与欧式距离相结合才能更全面的反映香精的质量信息。

3 结论

本文采用高效液相色谱法建立了JT-1香精的色谱指纹图谱，并针对烟用香精的有效含量问题进行了稀释实验，用欧式距离与夹角余弦相结合的方法来计算其相似度，结果表明：6批次香精样品有较高的稳定性。单用夹角余弦不能体现香精样品的有效成分含量，而欧式距离在这方面有更好的说服力。在实际应用中两种方法相结合能使所建立的HPLC指纹图谱更加全面的反映香精的质量信息。

参考文献

- [1]曲国福，孟昭宇，陆舍铭等. 香料指纹图谱及其在烟用香精质量控制中的应用概述[J]. 烟草科技，2006，(5)：47~50.
- [2]曲国福，陆舍铭，孟昭宇等. GC/MS法建立烟用香精指纹图谱研究[J]. 香精香料化妆品，2007，2，20~23.
- [3]赵日利. 指纹图谱对香精香料质量控制的研究[J]. 安徽烟草，2004，(11)：38~39.
- [4]郭方道，钟科军，黄建国等. 烟用香精香气成分提取方法的选择[J]. 烟草科技，2005，(12)：20~23.
- [5]程翼宇，陈闽军，吴永江. 化学学报，2002，60(11)：2017.
- [6]蔡宝昌，刘训红. 常用中药材HPLC指纹图谱测定技术[J]. 北京：化学工业出版社，2005. 185.
- [7]廖堃，胡纲，肖竞. 烟用香精的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 烟草科技，2006，(2)：37~39.