

HPLC-ELSD

在测定烟草糖类物质中的应用

王明锋 王海涛 王 坚 范多青 冯 雷

(昆明卷烟厂技术中心 云南 昆明 650202)

摘 要 研究了用高效液相色谱-蒸发光散射法测定烟草中部分单糖及二糖：葡萄糖、果糖、蔗糖及麦芽糖含量的分析方法。该方法采用 80%的乙醇水溶液通过加速溶剂萃取仪 (ASE) 对烟末进行萃取，用乙酸铅沉淀除去蛋白质，再经重铬酸钾除去过量乙酸铅。最后得到的处理溶液采用 HPLC 等度洗脱，ELSD 进行定量检测分析。分析结果表明，ELSD 作为一种近年发展很快的分析检测技术，在对烟草中糖类物质的分析测定上具有稳定、快速、准确的优点。

关键词 高效液相色谱 (HPLC) 蒸发光散射 (ELSD) 烟草 糖类物质

1 引言

糖类物质，即碳水化合物是烟草中的主要化学成分，早在 20 世纪初，烟草工作者就发现糖类物质含量与烟叶质量及吸味品质有密切关系，而水溶性总糖和还原糖含量一直都是反映烟叶品质及可用性的重要指标^[1]。随着研究的深入，烟草科技工作者不再满足于仅仅通过糖类物质总量来评价烟叶质量。人们渴望知道各种糖类物质成分是如何影响烟叶品质，更进一步通过测定单个糖类物质来揭示糖类物质作为底物和前驱物对烟草香气成分和卷烟焦油贡献^[2]。长期以来，糖类物质分离、纯化及检测技术一直是制约糖类物质分析研究进一步发展的主要障碍之一。

高效液相色谱分离及视差折光检测是常见分析检测糖类化合物的传统方法，但它同时也存在稳定性差、不能梯度洗脱等缺陷，从而限制了它的推广应用。而蒸发光散射检测 (ELSD) 作为一种新兴的高效液相色谱检测^[3]，在过去 20 年有了很大发展，现在已经成为高效液相色谱几种主要检测^[4]之一。ELSD 属于一种类似于视差折光 (RI) 通用型检测^[5]，理论上说，所有挥发性低于流动相化合物都能得到有效检测^[6]。在糖类化合物分析检测上，ELSD 比 RI 具有与生俱来的优势：稳定时间短、梯度洗脱时基线稳定及可以与范围更广泛的溶剂和修饰剂联合使用^[4,5,6,7,8]。

2 材料与方

2.1 仪器和试剂

ASE 200 加速溶剂萃取仪 (美国 Dionex 公司); Waters 2690 高效液相色谱分离单元 (美国 Waters 公司);

ELSD2000 蒸发光散射检测 (美国 Alltech 公司); Milli-Q 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司); R-114 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); AT261 (感量 0.0001g, 瑞士梅特勒公司); 4.5 μ m 针头过滤器 (美国安捷伦公司); 旋风式样品粉碎机 (瑞典 FOSS 公司)

蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖为 Sigma 公司标准品 (含量 \geq 99%); 乙醇为分析纯; 乙腈为 Fisher HPLC 级; PbAc₂、K₂C₂O₄ 为分析纯。

2.2 样品处理

2.2.1 取烟丝样品 50g 左右, 置于 40 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 2 小时, 取后用旋风式样品粉碎机粉碎过 40 目筛备用。用烘箱法测定烟末水分含量。

2.2.2 准确称取 1.5g 烟末样品, 置于加速溶剂萃取仪不锈钢萃取池中进行萃取, 萃取条件如下:

萃取溶剂: 80%乙醇; 预加热时间: 1 分钟; 加热时间: 5 分钟; 静置时间: 5 分钟; 冲洗溶剂: 50%萃取池体积; 吹扫时间: 60 秒; 循环次数: 3 次; 萃取压力: 1500PSI; 萃取温度: 80 $^{\circ}$ C。

2.2.3 将萃取在收集瓶中溶液转移到 250mL 圆底烧瓶中, 并用 80%乙醇洗涤收集瓶 3 次, 将洗涤液也转移到圆底烧瓶中; 用旋转蒸发仪回收溶剂 (水浴温度: 50 $^{\circ}$ C) 至干。

2.2.4 在蒸干圆底烧瓶中加入 50mL 蒸馏水, 置于 60 $^{\circ}$ C 水浴中, 加入 3mL PbAc₂ 摇匀, 产生沉淀, 10min 后用定量滤纸过滤到 100mL 容量瓶中, 并用温水洗涤圆底烧瓶及滤纸上的沉淀 3 次。

2.2.5 在容量瓶中加入 3mL K₂C₂O₄, 产生白色沉淀, 放置一段时间后, 用蒸馏水定容到刻度备用。

2.2.6 进样前用 4.5 μ m 针头过滤器对样品处理溶液进行过滤。

2.3 标准溶液的配制

2.3.1 准确称取 1g 葡萄糖、果糖, 0.5g 蔗糖、麦芽糖溶于超纯水, 转移到 100mL 容量瓶中并定容到刻度, 得到浓度为 10mg/mL 葡萄糖、果糖和浓度为 5mg/mL 蔗糖、麦芽糖混合糖标准储备液;

2.3.2 用移液管分别吸取 3、5、10、15、20、25 mL 混合糖标准储备液置于 100mL 容量瓶中, 用超纯水定容到刻度, 得到系列工作糖标准溶液。

2.4 仪器分析条件

2.4.1 液相色谱条件

色谱柱型号: Waters High Performance Carbohydrate

4.6mm \times 250mm, 60 \AA 4 μ m Cartridge

流动相: 乙腈:水 (V/V75%:25%);

流速: 1.5ml/min;

柱温: 32 $^{\circ}$ C;

进样量: 10 μ L

2.4.2 蒸发光散射检测 (ELSD) 条件

漂移温度: 81 $^{\circ}$ C;

N₂ 流速: 2.1mL/min;

2.5 分析方法的回收率确定

在第 2.2.2 中加入 5mL 混合糖标准储备液, 其余处理同。

2.6 分析方法的检测限确定

将最小质量浓度糖标准溶液再逐级稀释, 依次进样 10 μ L, 计算当信噪比为 3:1 时所对应的标准溶液的质量浓度, 以确定检测限。

3 色谱图及标准曲线的绘制

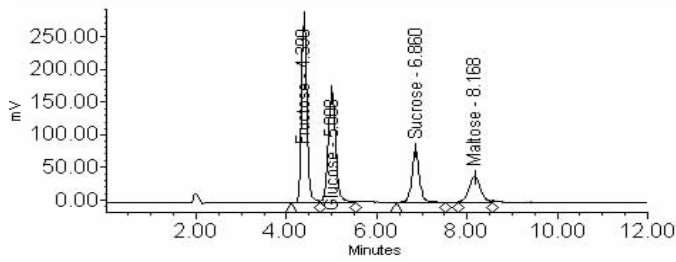


图 1 混合 3 号标样色谱图

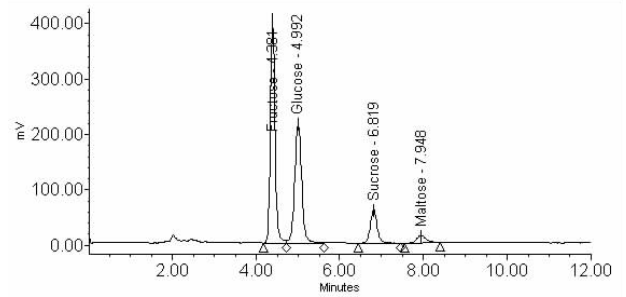


图 2 烟叶样品色谱图

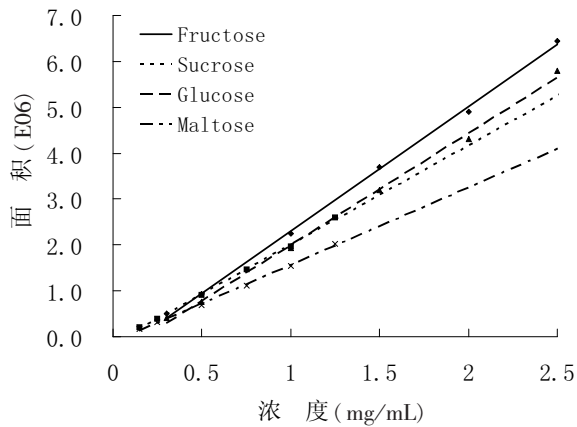


图 3 4 种糖的线性回归标准曲线图

表 1 系列混合工作标准溶液中 4 种糖的浓度

碳水 化合物	质量浓度 (mg/mL)					
	1	2	3	4	5	6
果糖	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
葡萄糖	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
蔗糖	0.15	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25
麦芽糖	0.15	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25

表 2 4 种糖的定量分析的参数

碳水化合物	线性回归方程 ^a	R ²	检测限 (mg/mL)	回收率 (%)	RSD (n = 8) (%)
果糖	$A/10^6 = 2.7025C - 0.3925$	0.9990	0.001	99.2 ~ 105.5	0.75
葡萄糖	$A/10^6 = 2.4299C - 0.4294$	0.9973	0.002	96.5 ~ 102.8	2.44
蔗糖	$A/10^6 = 2.1624C - 0.1497$	0.9985	0.002	93.7 ~ 98.4	2.78
麦芽糖	$A/10^6 = 1.6830C - 0.1221$	0.9979	0.003	97.8 ~ 103.6	4.55

备注: A: 峰面积 (mv); C: 质量浓度 (mg/mL)

4 在烤烟型卷烟和单体烟叶 4 种糖测定中的应用

试验选取昆烟部分 (15 个) 卷烟产品和部分单体烟叶原料 (46 个) 进行了 4 种糖的分析测定, 结果如下 (表 3 和表 4):

表 3 卷烟产品 4 种糖的定量分析结果

编号	烟末干重 (g)	果糖		葡萄糖		蔗糖		麦芽糖		百分比合计 (%)	常规化学测定总糖 (%)
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%		
C1	1.4257	163.9	11.49	142.4	9.99	24.6	1.72	17.5	1.23	24.43	23.21
C2	1.4255	150.8	10.58	130.2	9.13	24.0	1.69	22.1	1.55	22.95	22.06
C3	1.4256	160.6	11.27	137.4	9.64	24.2	1.70	18.7	1.31	23.91	23.52
C4	1.4268	148.5	10.41	131.4	9.21	25.7	1.80	23.8	1.67	23.09	21.04
C5	1.4254	149.0	10.45	130.7	9.17	25.1	1.76	16.5	1.16	22.54	21.23
C6	1.4250	162.8	11.43	140.6	9.87	20.4	1.43	15.8	1.11	23.83	24.82
C7	1.4268	149.2	10.46	128.9	9.03	27.0	1.89	15.7	1.10	22.48	22.04
C8	1.4312	159.6	11.15	143.0	9.99	31.3	2.18	20.6	1.44	24.77	22.59
C9	1.4297	160.1	11.20	139.0	9.72	26.6	1.86	17.6	1.23	24.01	21.77
C10	1.4310	162.5	11.36	145.6	10.38	29.0	2.03	22.8	1.59	25.36	23.37
C11	1.4238	156.6	11.00	140.4	9.86	29.4	2.07	18.4	1.29	24.22	22.98
C12	1.4313	135.0	9.43	103.4	7.23	18.9	1.32	15.4	1.08	19.06	21.14
C13	1.4305	130.7	9.14	106.0	7.41	17.8	1.25	12.8	0.89	18.69	21.41
C14	1.4270	134.6	9.43	111.8	7.84	17.9	1.26	13.9	0.97	19.50	21.05
C15	1.4327	119.2	8.32	91.6	6.39	15.7	1.09	13.2	0.92	16.73	20.81

5 结果与讨论

5.1 萃取方法的确定

本实验采用美国 DIONEX 公司 ASE200 加速溶剂萃取仪进行碳水化合物萃取, 与传统手工方法萃取相比具有快速 (整个萃取过程仅需 15 分钟)、稳定、高效、重现性好等优点; 由于萃取溶剂含有水分, 为避免水分残留对萃取系统造成腐蚀, 每次萃取完成, 均应采用无水乙醇进行冲洗。

5.2 HPLC 洗脱条件及溶剂的选择

实验选用体积比为 75%:25%乙腈水溶液作为流动相在等度洗脱时即可实现对 4 种糖有效分离, 且分析时间短 (12 分钟即可完成一次分析), 这一点对大量检测样品非常重要; 如采用梯度洗脱, 也可实现 4 种糖完全分离, 但是分析时间有所增加 (超过 15 分钟), 考虑分析效率问题, 本实验采用等度洗脱; 分析时柱温稳定性对碳水化合物保留时间有较大影响, 本实验将柱温设定为 32℃, 较好地解决了保留时间漂移的问题。

5.3 检测条件的选择

实验发现采用蒸发光散射对糖类物质进行分析检测具有平衡时间快 (开机一个小时即可进行分析)、稳定性好、灵敏度高优点, 值得推广应用。

5.4 卷烟及单体烟叶样品检测结果分析

从表 3 和表 4 可以归纳如下规律和特点:

卷烟样品总糖含量与 4 种糖含量总和比较接近, 而单体烟叶样品 4 种糖含量总和大约占到总糖含量的 50%~70% 之间, 香料烟和烤烟没有明显区别; 这说明在卷烟制丝工艺处理过程中, 水溶性总糖大部分水解为单糖及二糖, 当然在卷烟样品中还含有卷烟加料加入部分, 其中绝大部分为单糖; 而卷烟样品和单体烟叶样品 4 种糖含量上差异是哪些糖类成分还有待进一步研究。

表 4 单体烟叶原料 4 种糖的定量分析结果

编号	烟末 干重 (g)	果糖		葡萄糖		蔗糖		麦芽糖		百分比 合计 (%)	常规化学 测定总糖 (%)
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%		
T1	1.4229	115.8	8.14	83.7	5.88	12.9	0.90	13.6	0.95	15.88	23.57
T2	1.4219	106.3	7.47	94.1	6.62	22.5	1.58	13.5	0.95	16.62	24.52
T3	1.4189	117.8	8.30	82.8	5.83	15.4	1.09	13.7	0.96	16.18	21.9
T4	1.4182	120.2	8.47	113.6	8.01	39.1	2.76	18.1	1.28	20.52	26.2
T5	1.4175	103.7	7.31	87.0	6.14	20.5	1.44	19.6	1.38	16.27	23.5
T6	1.4236	124.5	8.74	104.7	7.36	9.9	0.70	18.7	1.31	18.11	22.94
T7	1.4239	101.1	7.10	63.4	4.45	20.3	1.43	13.2	0.92	13.91	19.16
T8	1.4156	85.3	6.02	51.4	3.63	31.9	2.25	12.4	0.88	12.78	18.3
T9	1.4205	73.5	5.18	57.4	4.04	15.7	1.11	15.1	1.06	11.39	15.1
T10	1.4135	136.8	9.68	97.1	6.87	21.3	1.51	25.1	1.78	19.83	24.97
T11	1.4241	114.4	8.03	77.0	5.40	10.0	0.70	23.4	1.64	15.77	21.55
T12	1.3968	111.3	7.97	86.8	6.21	13.1	0.94	28.7	2.06	17.18	21.7
T13	1.4204	106.0	7.46	88.3	6.21	25.0	1.76	24.2	1.70	17.13	24.55
T14	1.4189	128.9	9.08	122.2	8.61	20.1	1.41	21.2	1.50	20.61	32.91
T15	1.4370	125.1	8.71	101.5	7.06	17.0	1.19	19.5	1.36	18.31	26.26
T16	1.4120	60.6	4.29	51.5	3.65	17.3	1.22	11.9	0.84	10.00	21.43
T17	1.4088	137.5	9.76	123.1	8.73	30.7	2.18	24.4	1.73	22.40	30.19
T18	1.4375	92.1	6.40	95.9	6.67	34.0	2.37	17.9	1.24	16.69	31.12
T19	1.4152	138.7	9.80	39.9	2.82	39.9	2.82	22.2	1.57	17.01	34.21
T20	1.4305	122.8	8.58	107.8	7.54	30.8	2.16	18.9	1.32	19.59	29.12
T21	1.4378	83.2	5.79	64.4	4.48	23.4	1.63	13.1	0.91	12.81	23.44
T22	1.4132	110.3	7.80	146.5	10.36	15.1	1.07	21.7	1.53	20.77	30.21
T23	1.4369	124.3	8.65	158.3	11.01	13.9	0.97	21.1	1.47	22.11	33.13
T24	1.4111	86.4	6.12	88.9	6.30	49.0	3.47	22.7	1.61	17.50	27.26
T25	1.4084	113.5	8.06	102.2	7.26	18.6	1.32	16.4	1.16	17.81	25.76
T26	1.4113	121.0	8.58	108.8	7.71	21.0	1.49	21.6	1.53	19.30	26.46
T27	1.4246	100.5	7.06	74.9	5.26	19.0	1.34	14.8	1.04	14.69	22.18
T28	1.4330	129.9	9.06	120.0	8.37	38.6	2.69	19.5	1.36	21.48	35.87
T29	1.4346	94.5	6.59	90.6	6.31	46.8	3.26	18.0	1.26	17.42	31.73
T30	1.4298	112.3	7.86	95.7	6.69	23.8	1.66	17.2	1.20	17.42	26.42
T31	1.4030	130.3	9.28	146.7	10.46	73.0	5.20	32.5	2.32	27.26	29.89
T32	1.4188	67.1	4.73	64.2	4.52	13.3	0.93	18.6	1.31	11.50	18.51
T33	1.4234	85.8	6.03	78.7	5.53	43.8	3.08	11.1	0.78	15.41	22.96
T34	1.4302	109.6	7.66	116.5	8.15	84.5	5.91	15.5	1.08	22.80	28.93
T35	1.4254	97.7	6.86	84.1	5.90	66.0	4.63	13.2	0.93	18.31	24.23
T36	1.4270	94.3	6.61	89.3	6.26	84.0	5.89	15.2	1.06	19.82	25.78
T37	1.4117	104.0	7.37	92.0	6.52	45.5	3.22	17.8	1.26	18.37	23.29
T38	1.4298	109.9	7.68	97.9	6.85	56.7	3.97	13.9	0.97	19.48	26.65
T39	1.4307	97.3	6.80	90.9	6.35	91.8	6.41	15.5	1.08	20.65	27.38
T40	1.4206	128.3	9.03	135.3	9.52	110.3	7.76	16.6	1.17	27.49	28.37
T41	1.4303	154.5	10.81	155.8	10.89	73.6	5.14	16.5	1.16	27.99	35.56
T42	1.4264	140.3	9.83	143.1	10.03	64.9	4.55	17.9	1.26	25.67	35.25
T43	1.4232	148.0	10.40	156.5	10.99	71.7	5.04	17.8	1.25	27.68	31.91
T44	1.4218	116.1	8.17	118.8	8.36	80.8	5.68	19.8	1.39	23.60	33.39
T45	1.4316	122.5	8.56	138.3	9.66	61.2	4.27	20.1	1.40	23.89	34.44
T46	1.4290	161.1	11.27	164.6	11.52	67.0	4.69	20.8	1.45	28.93	34.64

参考文献

- [1] 左天觉著, 朱尊权等译. 烟草的生产、生理和生物化学 [M]. 上海: 上海远东产品出版社, 1993.
- [2] 金闻博, 戴亚. 烟草化学 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1993.53.
- [3] Young C.S., Dolan J.W. Success with Evaporative Light-Scattering Detection, Part II: Tips and Techniques [J]. LCGC NORTHAMERICA VOLUME 22 2004, 3: 244~250.
- [4] 魏泱, 丁明玉. 液相色谱/蒸发光散射测定转基因烟草提取液中的海藻糖 [J]. 色谱, 2001, (3): 226~229.
- [5] López Hernández J., González-Castro M.J., Naya Alba, I. and de la Cruz García C. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Mono- and Oligosaccharides in Vegetables with Evaporative Light-Scattering Detection and Refractive Index Detection [J]. Journal of Chromatographic Science, Volume 36, Number 6, June 1998: 293~298.
- [6] Mark J., Cary T. A High Sensitivity HPLC Assay for Glucosamine Using Evaporative Light Scattering Detection [J]. THE APPLICATION NOTEBOOK, Alltech Associates, Inc., 2004, 2: 49.
- [7] Craig S.Y., John W.D. Success with Evaporative Light-Scattering Detection [J]. LCGC NORTHAMERICA VOLUME 21 2003, 2: 120~128.
- [8] Webster Gregory K., Jensen James S., and Angel R. Diaz. An Investigation into Detector Limitations Using Evaporative Light-Scattering Detectors For Pharmaceutical Applications [J]. Journal of Chromatographic Science, Volume 42, Number 9, October 2004, 484~490.