

# 高效液相色谱法测定烟草及烟草制品中的三种水溶性糖

黄菲, 黄翼飞\*

(广东中烟工业有限责任公司技术中心, 广州 510145)

**摘要:** 建立了高效液相色谱 (HPLC) /示差折光检测器 (RID) 测定烟草和烟草制品中葡萄糖、果糖和蔗糖的方法。样品用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液振荡提取 60 min, 以高度交联的铅型磺化苯乙烯-二乙烯苯 (SDVB) 树脂为填料的阳离子交换色谱柱为分离柱, 用纯水作流动相进行等梯度洗脱, 外标法定量。方法线性良好, 相关系数均大于 0.999。方法回收率 98.9% ~ 101.8%, 精密度 0.44% ~ 0.90%。方法测定值与离子色谱法的检定结果一致。方法适用于各种烟草和烟草制品中葡萄糖、果糖和蔗糖的分析测定。

**关键词:** 高效液相色谱; 示差折光检测器; 水溶性糖; 烟草; 烟草制品

中图分类号: TS41<sup>†1</sup>

文章编号: 1007-5119(2012)02-0047-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.02.010

## Determination of Major Soluble Sugars in Tobacco and Tobacco Products by High Performance Liquid Chromatography

HUANG Fei, HUANG Yifei\*

(Technology Center, China Tobacco Guangdong Industrial Co., Ltd., Guangzhou 510145, China)

**Abstract:** The method of determination of glucose, fructose and sucrose in tobacco and tobacco products was developed by high performance liquid chromatography with a refractive index detector. Tobacco samples were extracted for 60 min by shaking with 0.01 mol/L sodium hydroxide solution. The chromatographic separation was conducted on a cation-exchange column packed with highly cross-linked sulfonated styrenedivinylbenzene resin in the Pb<sup>2+</sup> ionic form. The eluent was pure water in isocratic gradient. The external standard method was applied in quantitation. The linearity of the method was good with correlation coefficients above 0.999 in all cases. The recoveries were between 98.9 %-101.8 % and the precision was between 0.44 %-0.90 %. The results determined by the developed method were consistent with those determined by the ion chromatography method. The method is applicable to the determination of fructose, glucose and sucrose in various tobacco and tobacco product samples.

**Keywords:** high performance liquid chromatography; refractive index detector; water soluble sugars; tobacco; tobacco product

烟草中的水溶性糖与烟草的口感、香味特征和焦油生成量关系密切。葡萄糖、果糖和蔗糖是烟草中主要的水溶性糖, 是烟草中具有代表性的糖类。

早期主要采用纸色谱法、薄层色谱法及柱层析法等经典方法进行混合糖的分析, 这些方法分辨率低、分析时间长、定量测定困难, 难以实现自动化操作。

气相色谱法也可用于对糖类物质的分离测定。气相色谱法具有选择性好, 灵敏度高等优点。但葡萄糖、果糖和蔗糖等糖的沸点高、挥发性低、难气

化, 在进行气相色谱分析时, 需要将这些糖类物质衍生为可气化的挥发性成分。但衍生操作步骤繁琐, 耗时耗力, 而且对衍生化合物的稳定性难以进行直观的评判, 这些因素都会影响对糖类物质的准确测定。基于这些不足, 现在测定单糖和二糖已较少采用气相色谱法。

对葡萄糖、果糖和蔗糖等糖类的直接测定, 高效液相色谱法 (HPLC)、离子色谱法 (IC) 和高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS) 都有报道, 这 3 种方法分析糖类物质都无需进行柱前衍生化操作。

作者简介: 黄菲, 女, 本科, 主要从事烟草质检及研究工作。\*通信作者, E-mail: hyfchem@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-28

修回日期: 2011-05-24

电喷雾离子化技术在高效液相色谱-质谱联用法对糖类物质进行定量时得到广泛的应用。HPLC-MS分析糖灵敏度很高,分析速度较快,非常适合对痕量糖类的定性定量分析。由于烟草和烟草制品中的葡萄糖、果糖和蔗糖含量较高,通常无需使用高灵敏度的HPLC-MS法。离子色谱法也较多的应用在对糖的测定中,离子色谱法测糖也可以达到较低的检测限,适合用于对微量糖类物质的测定。离子色谱法的检测灵敏度也远高于对烟草和烟草制品中的葡萄糖、果糖和蔗糖含量的检测要求,因此进样前需要对样品进行较大倍数的稀释(如稀释100倍),且离子色谱法包括柱平衡在内的分析时间较长,平均测试一个样品需要1.33 h或以上。高效液相色谱法是目前测糖使用最多的方法<sup>[1-6]</sup>。高效液相色谱法测糖较离子色谱法简便,测糖稳定性和重复性好,仪器维护简单,仪器普及率更高,检测灵敏度完全满足日常分析的应用要求。

笔者采用以高度交联的铅型磺化苯乙烯-二乙烯苯(SDVB)树脂为填料的阳离子交换色谱柱建立了测定烟草及烟草制品中葡萄糖、果糖和蔗糖的高效液相色谱方法。该方法准确、重复性和再现性好、适用性强。该方法还有一个优点是仅使用无任何污染的超纯水作为流动相即可达到理想的分离效果和得到良好的色谱峰形,无需使用乙腈等有毒有害试剂,达到经济、安全和清洁环保的要求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

蔗糖、D-(-)-果糖、D-(+)-无水葡萄糖(纯度99.5%,Sigma-Aldrich公司);乙腈(纯度99.9%,MERCK公司);超纯水。

1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配备G1378B脱气机、G1311A四元泵、G1329A自动进样器、G1316A柱温箱和G1362A示差折光检测器(RID);Varian Metacarb Pb PLUS色谱柱(300 mm × 7.8 mm)和Varian Metacarb 87P预柱柱芯(美国Varian公司);Milli-Q Element A10纯水机(美国Millipore公司);HY-5回旋振荡器(金坛市富华

电器有限公司);CP 224S电子天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 样品处理与分析

试验于2009年3月—2010年9月进行,取1.0000 g烟末,置于100 mL磨口锥形瓶中,准确加入50 mL 0.01 mol/L NaOH萃取溶液,具塞振荡萃取60 min,经0.45 μm滤膜过滤,滤液进行HPLC分析。分析条件为:Varian Metacarb Pb PLUS色谱柱和Varian Metacarb 87P预柱柱芯;柱温箱温度:80℃;流动相:水,等梯度洗脱;进样量:20 μL;流速:0.4 mL/min。

## 2 结果

### 2.1 色谱条件的确定

2.1.1 色谱柱的选择 示差折光检测器较多配合使用氨基丙基硅烷为键合相的硅胶柱(以下简称氨基柱)和阳离子交换色谱柱以及相应的流动相进行水溶性糖类的测定。由于某些烟草和烟草制品样品的葡萄糖、果糖和蔗糖含量较低,因此,能达到较低的检测限是色谱柱和流动相选择的一个重要前提。实验选用Waters公司的氨基柱(高效碳水化合物卡套色谱柱,4.6 mm × 250 mm, 4 μm)和Varian公司的Varian Metacarb Pb Plus阳离子交换色谱柱对比了分析葡萄糖、果糖和蔗糖的检测灵敏度,结果见表1。其中使用Waters公司氨基柱的优化分析色谱条件<sup>[7]</sup>为:Sentry高效碳水化合物保护柱和Sentry整合保护柱套(美国Waters公司);柱温箱温度:35℃;RID光学元件温度:35℃;流动相:72%(体积分数)乙腈/28%水预混合溶液,等梯度洗脱;进样量:10 μL;流速:1 mL/min。

由表1可见,使用Varian Metacarb Pb Plus阳离子交换色谱柱和水流动相可以达到很低的检测限,比使用高效碳水化合物卡套色谱柱和乙腈-水流动相的检测限低27倍以上。由于氨基柱在使用的过程中会逐渐流失一些键合在硅胶上的氨基碱性基团,这些持续而不稳定的柱流失造成了较大的基线波动,一般基线波动在120 nRIU范围内(nRIU为

表 1 高效碳水化合物卡套色谱柱和 Varian Metacarb Pb Plus 色谱柱测葡萄糖、果糖和蔗糖的检测限比较

Table 1 The comparison of detection limits of glucose, fructose and sucrose on the Carbohydrate High Performance cartridge column and Varian Metacarb Pb Plus column

色谱柱	高效碳水化合物卡套色谱柱/ng	Varian Metacarb Pb Plus/ng
果糖	950	22
葡萄糖	1070	18
蔗糖	1050	8

注：检测限以柱上测定量表示。

示差折光单位的十亿分之一)。这些因素造成了使用高效碳水化合物卡套色谱柱测葡萄糖、果糖和蔗糖的灵敏度较低。且由于氨基柱的持续性柱流失，对糖的分离性能下降较快。随着色谱柱的分离性能下降，对葡萄糖、果糖和蔗糖的保留逐渐减弱，3 种糖的色谱峰保留时间会逐渐减少，以至于果糖和葡萄糖无法达到较好的分离。而 Varian Metacarb Pb Plus 阳离子交换色谱柱的柱流失极小，所使用的流动相挥发性远弱于乙腈，检测基线波动可稳定在 5 nRIU 范围内，有利于提高示差折光检测器的检测灵敏度。同时，对葡萄糖、果糖和蔗糖可以实现完全的基线分离，而且各糖色谱峰的保留时间很稳

定。Varian Metacarb Pb PLUS 色谱柱通常使用去离子水作为流动相，经济、安全、清洁环保，而且方便流动相的随时更换，无需特别配制。因此，实验选用 Varian Metacarb Pb Plus 阳离子交换色谱柱。

2.1.2 流速的选择 流速对色谱柱的分离产生一定影响。高流速可以缩短分析时间，但另一方面也会使柱压大大升高，而且可能降低目标色谱峰与杂质峰的分度。Varian Metacarb Pb PLUS 色谱柱的最高耐压为 1025 psi，因此实验选用较低的流速，实验使用同一标准溶液对比了 0.1、0.3、0.4、0.6 mL/min 4 种流速。流速为 0.1 mL/min 时，果糖出峰时间在 101 min，出峰时间过长，且果糖峰高仅为流速为 0.4 mL/min 时的 71%。流速为 0.3 mL/min 和 0.4 mL/min 时，3 种糖的色谱峰形和分离效果差别不大，与邻近的杂峰分离干净，流速为 0.4 mL/min 的分离时间较短，在 27 min 内 3 种糖出峰完毕(图 1)。当流速为 0.6 mL/min 时，不利于某些样品的杂峰与目标色谱峰的分离。方法选用流速为 0.4 mL/min。

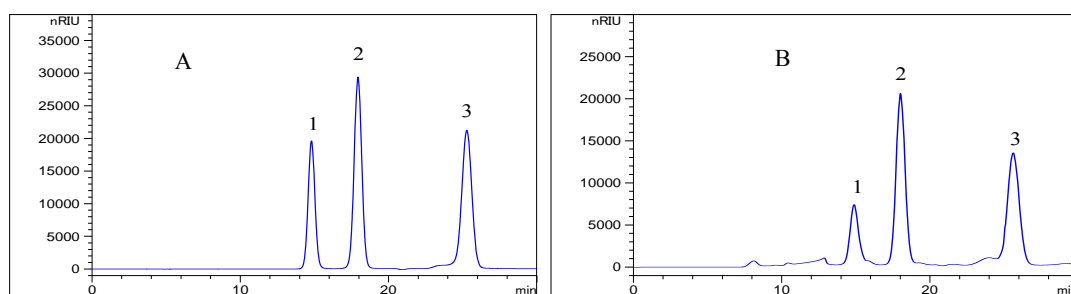


图 1 果糖、葡萄糖和蔗糖标准色谱图 (A) 和烟草样品色谱图 (B)

Fig.1 The chromatograms of fructose, glucose and sucrose of a standard solution and a tobacco sample

注：1 (果糖)；2 (葡萄糖)；3 (蔗糖)。

## 2.2 前处理条件的选择

2.2.1 萃取溶液选择 0.01 mol/L 氢氧化钠和水是提取烟草中葡萄糖、果糖和蔗糖的常用萃取溶液，两者对 3 种糖的提取效率相当。烟草中含有多种酸，烟草样品的水提取液也呈偏酸性，其中的柠檬酸、酒石酸等酸性物质可催化蔗糖分解<sup>[8]</sup>，不利于样品提取液的长时间放置，尤其对于蔗糖含量较高的样品，蔗糖的分解更为明显。当使用 0.01 mol/L 氢氧

化钠进行试样提取时，稀的氢氧化钠会中和样品提取溶液中的酸，使样品提取溶液呈碱性，可在较长的时间内有效的抑制蔗糖的分解，确保测试结果的真实性。

由表 2 可见，用水作为提取溶液时，随着样品提取溶液在室温下放置时间的延长，蔗糖含量逐渐减少，放置 9.0 h 后，蔗糖的测试含量为初始测试含量的 65%，放置 19.5 h 后，蔗糖的测试含量仅为

初始测试含量的 41%；而葡萄糖和果糖的含量则随试样提取溶液放置时间的延长逐步增加。但是 3 种糖的总量保持一致，平均含量为 27.44%。用 0.01 mol/L 氢氧化钠提取的试样溶液的 3 种糖的含量则较稳定，在 20 h 内 3 种糖的测试含量保持一致，这样有利于编制仪器进样序列对多个样品进行连续分析。因此，试验选取 0.01 mol/L 氢氧化钠作为提取溶液。

表 2 水和 0.01 mol/L 氢氧化钠的烟草提取溶液葡萄糖、果糖和蔗糖含量随放置时间的变化

Table 2 The variations of the contents of glucose, fructose and sucrose of tobacco solutions extracted by H<sub>2</sub>O and 0.01 mol/L NaOH with standing time

提取溶液	放置时间/h	蔗糖/%	葡萄糖/%	果糖/%	总量/%
H <sub>2</sub> O	0.0	5.08	12.44	9.58	27.11
	3.5	4.41	13.00	9.95	27.35
	6.9	3.74	13.41	10.41	27.56
	9.0	3.31	13.60	10.60	27.51
	11.1	2.97	13.73	10.75	27.45
	13.2	2.74	13.87	10.91	27.51
	15.3	2.45	13.90	10.98	27.34
	17.4	2.31	14.09	11.20	27.60
	19.5	2.07	14.22	11.28	27.57
0.01 mol/L NaOH	0.0	5.34	12.43	9.43	27.20
	3.5	5.37	12.53	9.38	27.28
	6.9	5.37	12.53	9.41	27.30
	9.0	5.29	12.61	9.34	27.24
	11.1	5.34	12.58	9.35	27.26
	13.2	5.32	12.55	9.32	27.18
	15.3	5.30	12.61	9.32	27.23
	17.4	5.23	12.58	9.35	27.15
	19.5	5.28	12.59	9.33	27.20

2.2.2 提取时间的选择 选取试样 A 为样品，按 1.2 进行样品处理，把提取时间分别设置为 15、30、45、60、90、120 min，结果见图 2。蔗糖在 15 min 的时候基本提取完全，葡萄糖在 30 min 时提取量比在 15 min 时的略有增加，在 30 min 后则趋于稳定，果糖在 60 min 时已经基本提取完全。兼顾 3 种糖在

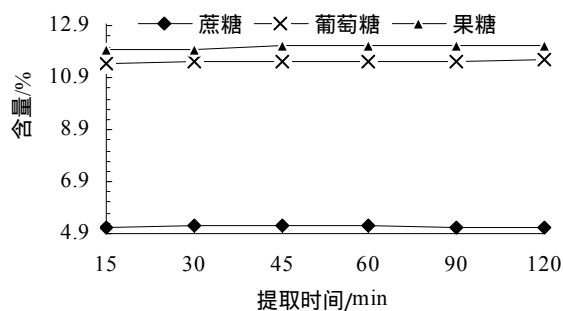


图 2 样品中果糖、葡萄糖和蔗糖在不同提取时间的提取量  
Fig.2 The extracted contents of fructose, glucose and sucrose of a sample in different extraction time

不同提取时间的提取情况，为了保证各糖的完全提取，试验把提取时间设置为 1 h。

### 2.3 标准曲线和检出限

分别称取 0.25 g 葡萄糖、0.25 g 果糖、0.20 g 蔗糖，精确至 0.0001 g，用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液溶解后转入 100 mL 容量瓶中，用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液定容至刻度。得葡萄糖、果糖和蔗糖浓度分别为 2500 μg/mL、2500 μg/mL 和 2000 μg/mL 的标准储备液。再逐级用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至所需要的浓度。表 3 为合适的工作标准溶液浓度系列。分别对工作溶液进行 HPLC 测定，并以各糖色谱峰峰面积 (y) 对其浓度 (x) 进行线性回归分析，得标准曲线回归方程(表 4)。由表 4 看出，方程的线性良好，相关系数均大于 0.999。检出限较低为 0.002%~0.006%。

表 3 工作标准溶液浓度系列 μg/mL

Table 3 A series of concentrations of working standard solutions

果糖	葡萄糖	蔗糖
2500	2500	2000
1000	1000	800
500	500	400
200	200	160
50	50	40
10	10	8

表 4 标准曲线的线性方程、相关系数、检出限

Table 4 The linear equations, correlation coefficients and limits of detections

糖	线性方程	相关系数	检出限/%
果糖	$y = 384.857x - 134.182$	1.0000	0.006
葡萄糖	$y = 439.847x - 135.077$	1.0000	0.005
蔗糖	$y = 439.021x - 281.736$	1.0000	0.002

### 2.4 方法的重复性

按 1.2 处理方法对试样 B 进行 5 次平行测定，得方法精密度，以 RSD% 表示，结果见表 5。果糖、葡萄糖和蔗糖的精密度小于 1%，方法的重复性良好。

表 5 方法重复性试验结果

Table 5 The test results of the repeatability of the method

序号	含量/%		
	蔗糖	葡萄糖	果糖
1	1.28	3.92	5.77
2	1.29	3.92	5.77
3	1.30	3.99	5.76
4	1.30	3.99	5.74
5	1.29	3.97	5.71
RSD/%	0.65	0.90	0.44

## 2.5 方法的回收率

取样品 B, 以其 5 次平行测定的平均值作为计算其果糖、葡萄糖和蔗糖原始含量的依据 (蔗糖、葡萄糖和果糖 5 次平行测定的含量平均值分别为 1.29%、3.96% 和 5.75%), 添加高、中、低 3 个浓度水平的标准进行回收试验。由表 6 可见, 果糖、

葡萄糖和蔗糖的回收率为 98.9%~101.8%, 结果理想。

## 2.6 与离子色谱方法的比对

本方法和烟草行业推荐标准<sup>[9]</sup>进行了检测数据比对, 结果见表 7。两种方法的测试数值的相对平均偏差均小于 5%, 一致性较好。

表 6 回收率试验结果

Table 6 The test results of recovery

添加水平	加标量/mg			测得量/mg			回收率/%		
	蔗糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	葡萄糖	果糖
低浓度	0.922	2.940	4.246	0.912	2.918	4.250	98.9	99.3	100.1
中浓度	4.610	14.700	21.230	4.563	14.692	21.397	99.0	99.9	100.8
高浓度	9.220	29.400	42.460	9.210	29.433	43.219	99.9	100.1	101.8

表 7 本方法 (LC) 和离子色谱方法 (IC) 的测试数据比较

Table 7 The comparison of the test data acquired with the constructed method and the ion chromatography method

样品编号	果糖/(w/w)		相对平均 偏差/%	葡萄糖/(w/w)		相对平均 偏差/%	蔗糖/(w/w)		相对平均 偏差/%
	LC	IC		LC	IC		LC	IC	
1	10.11	9.96	0.75	7.83	7.49	2.22	1.11	1.12	0.45
2	10.77	10.25	2.47	8.24	8.40	0.96	0.71	0.78	4.70
3	9.68	9.91	1.17	11.74	10.91	3.66	0.71	0.76	3.40
4	6.75	6.47	2.12	6.44	6.40	0.31	1.13	1.20	3.00
5	8.38	8.52	0.83	6.99	7.32	2.31	0.98	0.95	1.55
6	8.16	7.83	2.06	5.87	6.12	2.09	1.01	0.99	1.00
7	8.96	8.65	1.76	6.43	6.84	3.09	0.89	0.85	2.30

## 2.7 烟草和烟草制品样品的测定

应用本方法对 37 个不同地区的烟草样品和 36 个国内外不同牌号的烟草制品样品进行分析测定。烟草样品中烤烟的蔗糖、葡萄糖和果糖的含量范围分别为 0.07%~5.82%、2.78%~13.65% 和 4.99%~13.36%, 白肋烟的蔗糖、葡萄糖和果糖含量极低, 3 种糖的总含量一般不高于 0.2%。烟草制品样品的蔗糖、葡萄糖和果糖的含量范围分别为 0.26%~2.33%、1.13%~9.61% 和 2.94%~11.00%。大多数烟草和烟草制品以果糖和葡萄糖含量最高, 蔗糖含量相对较低。

## 3 小结

本方法前处理简单, 重复性好, 准确性高, 可操作性强, 易于推广。方法只用超纯水作为流动相, 无需使用乙腈等有毒有害的有机溶剂, 清洁环保。

### 参考文献

[1] Varandas S, Teixeira M J, Marques J C, et al. Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour[J]. *Anal Chem Acta*, 2004, 513:

351-355.  
 [2] Chávez-Servín J L, Castellote A I, López-Sabater M C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1043: 211-215.  
 [3] Fang Y Z, Wang Q J. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs[J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812: 309-324.  
 [4] 刘玉峰, 李黎, 李东, 等. 高效液相色谱法测定食品中的单糖、双糖[J]. *食品科学*, 2007, 28(3): 293-296.  
 [5] 董爱军, 张英春, 杨鑫, 等. 高效液相色谱法测定甜菜糖蜜中的葡萄糖、蔗糖和棉籽糖[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(12): 245-247.  
 [6] 姜岷, 雷丹, 陈可泉, 等. 纤维素水解液厌氧发酵产丁二酸发酵液中有机酸和混合单糖的测定[J]. *分析化学*, 2009, 37(4): 605-608.  
 [7] 黄翼飞. 高效液相色谱测定烟草中的果糖、葡萄糖和蔗糖[J]. *烟草科技*, 2010(1): 40-43.  
 [8] 黄立新, 余业棠. 酸水解蔗糖生产转化糖的研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(3): 24-26.  
 [9] 国家烟草专卖局. YC/T 251—2008 烟草及烟草制品 葡萄糖、果糖、蔗糖的测定 离子色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.