

高效液相色谱-二极管阵列检测 同时测定烟草中多酚类

白长敏^{1,2} 钟科军¹ 黄建国¹ 曹国军^{2,3} 许国旺^{*2}

¹ (湖南常德卷烟厂技术中心, 常德 415000)

² (中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心, 大连 116023)

³ (南京理工大学, 南京 210094)

摘 要 用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 建立了烟草中绿原酸、茛菪亭、芸香苷同时测定的方法。烟草样品用甲醇/水 (4:1, V/V) 超声萃取, 过滤, 上样。用 Hypersil ODS (4.6 mm (i.d.) × 150 mm, 3 μm) 色谱柱, 甲醇/TEA 水溶液梯度洗脱, PDA 光谱图辅助定性, 内标法定量。该方法预处理简单, 重现性好, 回收率 84.4% ~ 96.4%; 相对标准偏差为 1.4% ~ 6.4%。

关键词 烟草, 多酚, 超声萃取, 液相色谱

1 引言

烟叶中的多酚类物质主要包括绿原酸、芸香苷、茛菪亭等。多酚类含量随着烟草遗传类型和栽培条件的差异而不同^[1]。一般认为, 多酚类对烟气品质有重要贡献, 是烟气产生香味的重要成分之一。因此对烟草中多酚类物质进行研究, 能更好地把不同地区不同类型和等级的烟叶在化学成分上互相补充、协调, 从而获得符合质量要求的产品, 并为烟草识别、烟草制品质量控制及中式卷烟的开发提供理论依据。

由于多酚类的低挥发性, 其含量测定目前多采用毛细管电泳法^[2,3]和高效液相色谱法^[4~6]; 也有研究者采用分子印记法^[7]和流动注射电致化学发光法^[8]。液相色谱法是分析烟草中多酚类的常用方法。本实验用含苯甲酸乙酯内标的甲醇/水 (4:1, V/V) 为提取剂, 一次超声萃取, 过滤, 进行 HPLC 分析, 即可同时测定烟草中的绿原酸、芸香苷、茛菪亭, 前处理方法十分简便, 方法重现性好、回收率高。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

10AVP 液相色谱仪 (PDA 检测器) (日本岛津公司); KQ 218 超声波清洗器 (昆山市超声电子有限公司); MILLIQ 纯水机 (MILLIPORE 公司); SHZ-D () 循环水泵 (巩义市英峪仪器厂)。各等级烟叶样品由湖南常德卷烟厂技术中心提供; 绿原酸、芸香苷、茛菪亭标样及三氟乙酸均购自 SIGMA 公司; 甲醇 (色谱纯) 购自 TEDIA 公司; 实验用水均为 MILLIQ 纯净水。

2.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS 4.6 mm (i.d.) × 150 mm, 3 μm; 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% (V/V) 三氟乙酸 (TEA) 水溶液, 梯度洗脱; 190~800 nm 扫描, 光谱辅助定性, UV 235 nm 检测定量。

2.3 萃取液

以甲醇/水 (4:1, V/V) 为溶剂, 配制得到苯甲酸乙酯 (内标) 含量为 0.04945 g/L 的萃取液。

2.4 样品前处理

准确称取 0.2 g 磨碎均匀的烟叶样品于一洁

表 1 产自湘西的烟叶样品信息

Table 1 Information of tobacco leaves samples from Western Hunan

样品号 Sample No.	烟叶等级 Sample grade
1#	B ₂ F 上部烟叶 Upside of tobacco leaves
2#	C ₂ F 中部烟叶 Central part of tobacco leaves
3#	X ₄ F 下部烟叶 Underside of tobacco leaves

净干燥的 10 mL 容量瓶中, 准确加入 5 mL 内标含量为 0.04945 g/L 的萃取液, 旋涡混匀, 再用甲醇/水 (4:1, V/V) 稀释至刻度, 超声萃取 15 min, 静止数分钟, 上清液用 0.45 μm 有机膜过滤后即可上样分析。

3 结果与讨论

3.1 定性方法

采用标样与样品的保留值及相对保留值比较、标样添加、光谱图对照等方法进行定性。例如: 绿原酸标准样品与烟叶样品中所含绿原酸的全波长吸收情况一致 (见图 1), 烟叶样品中多酚类的定性结果见图 2。

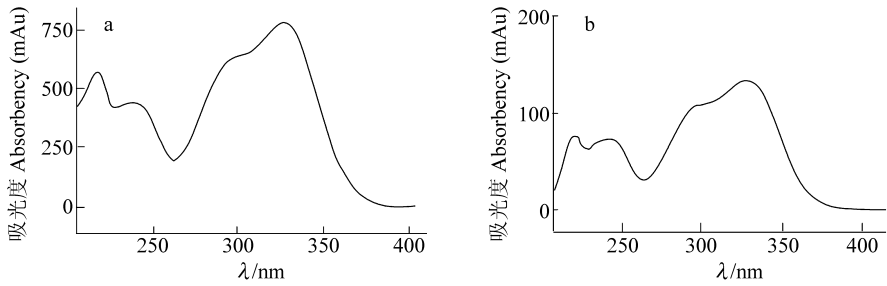


图 1 烟叶样品中绿原酸 (CA) 及标样绿原酸光谱图
Fig 1 Spectrograms of chlorogenic acid in tobacco leaves (a) and standard (b)

3.2 峰纯度检测

利用 PDA 检测器, 在 190~800 nm 范围内进行全波长扫描, 烟叶样品中目标物色谱峰各点的光谱图一致, 从而区分与目标物相同保留时间的杂质, 得到纯度更高的色谱峰, 以保证定量的准确进行。

3.3 定量分析

3.3.1 工作曲线 用甲醇/水 (4:1, V/V) 配制一定浓度的绿原酸、茛菪亭及芸香苷标准溶液, 内标法考察其线性关系, 相关结果见表 2。

3.3.2 精密度实验 取表 1 中给出的不同等级烟叶样品 1#、2#、3#, 按上述预处理条件及定性、定量方法, 平行测定 5 次。精密度和内标定量结果见表 3。

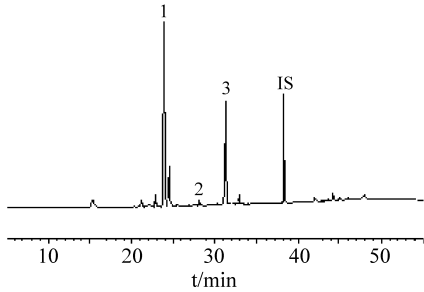


图 2 烟叶样品中多酚类 LC 色谱图
Fig 2 Liquid chromatogram of phenol in tobacco
1 绿原酸 (chlorogenic acid), 2 茛菪亭 (scopoletin),
3 芸香苷 (rutin), IS 苯甲酸乙酯 (benzoic acid ethyl ester)。

表 2 烟草中多酚类的定量参数和检出限

Table 2 Quantitative parameters and detection limits of polyphenols in tobacco leaves

标准品 Standard polyphenol	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range(mg/L)	检出限 Detection limit (S/N = 3, ng)
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 2.778X + 0.0937$	1.000	22.6~282	0.59
茛菪亭 Scopoletin	$Y = 1.102X + 0.0452$	0.999	4.04~80.8	0.98
芸香苷 Rutin	$Y = 3.161X + 0.0098$	0.999	22.3~279	0.53

表 3 精密度实验结果

Table 3 Results from replicate test

多酚类 Polyphenol	1#		2#		3#	
	含量 Content (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	11.70	5.51	12.03	6.36	11.3	1.87
茛菪亭 Scopoletin	0.28	1.40	0.20	5.66	0.31	3.59
芸香苷 Rutin	8.45	4.62	6.92	4.38	7.48	1.82

3.3.3 回收率实验 准确称取 2# 烟叶样品进行加标回收实验, 结果见表 4 结果令人满意。

表 4 回收率实验结果
Table 4 Results of recovery test

多酚类 Polyphenol	样品含量 Content (mg)	加入量 Added (mg)	测定总量 Total (mg)	回收率 Recovery (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	2.530	0.2234	2.764	93.1
		0.4469	2.936	92.0
		0.6703	3.123	96.4
		0.8938	3.349	91.0
		1.117	3.494	91.9
芸香苷 Rutin	1.431	0.2257	1.647	89.1
		0.4514	1.810	84.4
		0.6772	2.056	89.0
		0.9029	2.242	89.4
		1.129	2.425	91.1
茛菪亭 Scopoletin	0.0393	0.1616	0.1852	90.2
		0.3232	0.3283	89.5
		0.4848	0.4726	89.3
		0.6464	0.6146	89.0
		0.8080	0.7670	90.2

References

1 Smee ton B W. Genetic Control of Tobacco Quality. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, **1987**, 13: 3~26

2 Jiang H L, He Y Z, Zhao H Z, Hu Y Y. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 512: 111~119

3 Li C H, Chen A J, Chen X F, Chen X G, Hu Z D. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 39: 125~131

4 Wang X J, Tang Y H, Yao T W, Zeng S. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1036: 229~232

5 He C aixia(贺彩霞), Cui H ua(崔 华), Sun Y ugang(孙玉刚), Zhao H uazhang(赵化章), Shao X ueguang(邵学广), Zhao G uwen(赵贵文). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **1999**, 27(9): 1110

6 Tan X iaojie(谭晓杰), Jia Y ing(贾 英), Chen X iao hui(陈晓辉), Wang X i(王 玺), Bi K aishun(毕开顺). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), **2005**, 25(6): 651~653

7 Wu L ing(吴 灵), Lu Hongbing(卢红兵), Zhong Kejun(钟科军). *Tobacco Science and Technology* (烟草科技), **2004**, (6): 16~19

8 Sun Y ugang(孙玉刚), Li Y inghui(李应会), Cui H ua(崔 华). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2001**, 29(4): 495~499

Sim ultaneous Detem ination of Polyphenols in Tobacco by H igh Perform ance L iqu id Chrom atography/Photodiode Array Detection

Bai Changmin^{1,2}, Zhong Kejun¹, Huang Jianguo¹, Cao Guojun^{2,3}, Xu Guowang²
¹(Center of Science and Technology, Changde Cigarette Factory, Changde 415000)
²(National Chromatographic Research & Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)
³(Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094)

Abstract Chlorogenic acid, chrysotroic acid and rutin in tobacco were analyzed using high performance liquid chromatography(HPLC)/photodiode array detection (PDA). After the tobacco was simply treated by ultrasonic extraction using methanol/water (4:1, V/V) and filtration, the obtained liquid sample was analyzed by HPLC using hypersil ODS column (4.6 mm × 150 mm i.d., 3 μm). Methanol/trifluoroacetic acid (TFA) aqueous solution was used as mobile phase for gradient elution. PDA spectrum was used for assistant identification. Internal standard method was applied for quantitation. The recovery was in the range of 84.4% – 96.4%. The relative standard deviation of determination was 1.4% – 6.4% for three compounds.

Keywords Tobacco, polyphenol, ultrasonic extraction, high performance liquid chromatography
(Received 29 December 2005; accepted 22 May 2006)