

高效液相色谱法测定烟草料液中的糖

周元清^{* 1,3}, 吴兆录^{2,3}, 史云东¹, 黄齐林¹, 申太波¹

(1. 玉溪师范学院化学与环境科学系, 玉溪 653100; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650223;
3. 云南大学生态学与地植物学研究所, 昆明 650091)

摘要: 研究了用蒸发光散射检测器检测, 高效液相色谱法测定烟草料液中糖的方法。料液中的糖用固相萃取预分离, 然后以 Waters carbohydrate 高效糖柱为固定相, $V(\text{乙腈}): V(\text{水}) = 70: 30$ 作为流动相分离, 蒸发光散射检测器检测; 样品中鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖 8 种糖的加标回收率分别为: 97.0%、95.6%、102%、102.1%、95.0%、101.8%、102.6%、97.8%; 线性范围分别为: 鼠李糖、果糖、葡萄糖、蔗糖 0.1~20 μg , 木糖、阿拉伯糖、甘露糖、麦芽糖 0.2~25 μg 。相对标准偏差均小于 3.2%。方法的检出限达: 鼠李糖 20 ng、木糖 26 ng、阿拉伯糖 28 ng、果糖 14 ng、甘露糖 20 ng、葡萄糖 10 ng、蔗糖 12 ng、麦芽糖 15 ng, 用该方法测定了烟草料液中的糖。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 烟草; 糖

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2006)09-071-04

糖是烟草料液中最重要成分, 它对调整卷烟化学成分协调, 增加卷烟的香味、吃味及调整烟焦油生成均起到重要作用。因此准确测定烟草料液中的糖量对料液品质的评价和指导准确的加料均起到重要作用^[1-3]。

目前, 糖的测定方法主要有费林试剂法、近红外分光光度法、连续流动分析法、毛细管电泳法、气相色谱法和高效液相色谱法等。其中高效液相色谱-示差折光检测法 (RID) 是一种快速、直接的糖分析方法, 但 RID 基于色谱流出物光折射率的变化来连续检测样品浓度, 要求恒温、恒流速, 对工作环境要求较苛刻, 无法进行梯度洗脱, 且检测灵敏度不高。蒸发光散射检测器 (ELSD) 是一种质量检测器, 基于不挥发的样品颗粒对光的散射程度与其质量成正比而进行检测, 对没有紫外吸收、荧光或电活性的物质以及产生末端紫外吸收的物质均能产生响应。ELSD 稳定性

好, 灵敏度高, 适宜于低含量糖类物质分析^[4-12]。本文研究了采用 Waters carbohydrate 高效糖柱为固定相、乙腈-水作流动相、蒸发光散射检测器, 实现了烟草料液中 8 种水溶性单糖和二糖的同时测定, 是目前所见报道的能同时测定烟草料液中糖的种类最多的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 Alliance 高效液相色谱系统, 包括四元梯度泵, Empower 色谱工作站, ELSD 2000 蒸发光散射检测器 (美国 Waters 公司); Milli-Q50 高纯水处理器 (美国 Millipore 公司); Waters Sep-pak- C₁₈ 固相萃取小柱 (美国 Waters 公司)。

D-果糖、D-葡萄糖、L-甘露糖 (Sigma 公司); 麦芽糖、蔗糖、D-木糖 (Supelco 公司); L-鼠李糖、DL-阿拉伯糖 (Fluka 公司); 各种糖标样的纯度均大于 99%。乙腈、甲醇为色谱纯试剂

* 收稿日期: 2005-10-31; 修订日期: 2005-12-28

基金项目: 玉溪师范学院科研基金及玉溪市科技局资助项目

作者简介: 周元清 (1974-), 女, 博士研究生

(Fisher 公司)。实验用水为高纯水。

配制质量浓度均为 5 g/L 的鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等 8 种糖的标准储备水溶液, 使用前用水稀释成所需浓度的标准工作溶液。

1.2 色谱条件

分析柱为 Waters carbohydrate 高效糖柱 (WAT044355, 250 mm × 4.6 mm i. d., 4 μm), 配有预柱 (WAT046895, 12.5 mm × 4.6 mm i. d., 4 μm), Waters 公司产品。流动相为 V(乙腈): V(水) = 70:30, 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量 10 μL; ELSD 的漂移管温度 80 °C, 氮气作载气, 流速 2.00 L/min。在该条件下糖标样及料液样品的色谱图见图 1 所示。

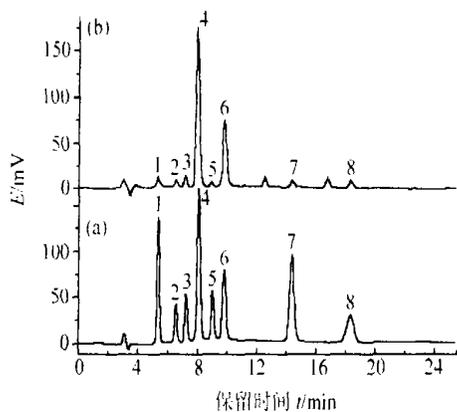


图 1 标样 (a) 和烟草料液样品 (b) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard (a) and tobacco sauce samples

1- 鼠李糖; 2- 木糖; 3- 阿拉伯糖; 4- 果糖; 5- 甘露糖;
6- 葡萄糖; 7- 蔗糖; 8- 麦芽糖

1.3 样品处理

取料液样品 0.2 g, 准确至 0.0001 g, 加入 25 mL 的水溶解并超声 10 min, 取 5 mL 溶液以 10 mL/min 的流速通过预活化好的 Sep- pak C₁₈ 固相萃取小柱, 弃去最初的 2 mL, 收集后面的 3 mL, 再用 0.45 μm 的水系滤膜过滤, 滤液供分析用。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

考察不同比例的乙腈或甲醇水溶液 (100、90、80、70 和 60%) 作为流动相的情况, 发现用水和乙腈作流动相效果好, 乙腈在流动相中比例增大, 可有效改善色谱峰形, 有利于各组分的基线分离,

但有机相比比例增加不利于糖的溶解, 分析时间也显著延长。当增加流动相中水的比例时, 分析时间变短。但水的比例过大, 组分峰相互靠近, 阿拉伯糖与果糖、甘露糖与葡萄糖不能实现基线分离; 同时, 也不利于流动相在漂移管内的汽化, 使基线噪声增大, 从而导致分析灵敏度的降低。综合考虑分离效果、分析时间等因素, 本文选择 V(乙腈): V(水) = 70:30 的体系作为流动相。

2.2 ELSD 参数的选择

漂移管温度和载气流速是 ELSD 检测器的两个重要参数^[11]。漂移管温度影响检测器的响应, 温度升高, 流动相蒸发趋于完全, 信噪比上升, 但温度过高, 可能导致分析物部分汽化, 信号响应值变小。雾化载气流速影响雾化器中液滴的形成, 从而影响检测器的响应。信噪比随流速的增加而升高。本文选择漂移管温度为 80 °C, 氮气作载气, 流速 2.00 L/min, 可达到最小的噪声信号, 色谱图基线平稳。

2.3 线性范围与检出限

将质量浓度为 10、40、120、800、1600、4000 mg/L 的各系列标准糖溶液, 在测定条件下进样 10 μL, 对应糖的绝对量为 0.1、0.4、1.2、8.0、16.0、40.0 μg。根据 ELSD 测得的峰面积 A (单位: mV·S) 对应糖的进样量 m (单位: μg) 进行线性回归, 得到曲线方程。再将最小质量浓度的标准溶液逐级稀释, 依次进样 10 μL, 计算当信噪比 S/N = 3 时所对应的标准溶液的质量浓度以确定检出限, 结果见表 1。

2.4 样品预处理

烟草料液中除了糖外, 还含有其它成分 (如醛、酮、酚、有机酸、无机盐、颗粒物等), 醛、酮水溶差, 易附着在柱材料上不被流动相洗脱而降低柱效, 有机酸和无机盐 (特别是过渡金属元素) 易腐蚀色谱柱, 所以在进样之前要预分离这些成分。我们采用 Sep- Pak- C₁₈ 固相萃取小柱预分离醛、酮等难溶成分。用 Waters SPE 真空提取装置, 每次可同时处理 20 个样, 小柱活化和样品富集的流速均为 10 mL/min, 小柱用 15 mL 甲醇活化, 再用 30 mL 水去洗去甲醇, 小柱经活化后即可用于样品预分离。通过小柱预分离后的样品用 0.45 μm 滤膜过滤, 这样可除去颗粒成分。残余少量的有机酸和无机盐等用 SEP- PAK Alumin Cartridges 保护

柱在线除去。

表 1 各种糖的标准回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Tab. 1 Regression equation, correlation coefficient, linear range and detection limit of various sugars

组分	回归方程	相关系数	线性范围 $m/\mu\text{g}$	检出限 m/ng
鼠李糖	$A = 8.15 \times 10^5 m - 1825$	0.9992	0.1~20	20
木糖	$A = 6.82 \times 10^5 m + 3654$	0.9991	0.2~25	26
阿拉伯糖	$A = 6.15 \times 10^5 m - 2652$	0.9988	0.2~25	28
果糖	$A = 9.26 \times 10^5 m - 3218$	0.9992	0.1~20	14
甘露糖	$A = 6.79 \times 10^5 m - 4128$	0.9994	0.2~25	20
葡萄糖	$A = 8.86 \times 10^5 m - 2894$	0.9989	0.1~20	10
蔗糖	$A = 8.35 \times 10^5 m + 3487$	0.9993	0.1~20	12
麦芽糖	$A = 7.04 \times 10^5 m - 2852$	0.9991	0.2~25	15

2.5 回收率与精密度

准确取烟草料液样品 5 份, 按 2.3 方法处理, 在选定的色谱条件下平行测定 5 次, 计算回收率及相对标准偏差(RSD) 结果。见表 2 所示。

2.6 样品分析结果

用该方法测定了五种烟草料液中的糖, 结果见表 3。

表 2 方法回收率及精密度 ($n = 5$)

Tab. 2 Recovery and precision

组分	加入量 m/mg	测得量 m/mg	回收率/ %	RSD/ %	组分	加入量 m/mg	测得量 m/mg	回收率/ %	RSD/ %
鼠李糖	0.5	0.485	97.0	1.6	甘露糖	0.5	0.475	95.0	2.2
木糖	0.5	0.478	95.6	1.8	葡萄糖	100	101.8	101.8	1.3
阿拉伯糖	0.5	0.512	102	3.2	蔗糖	50	51.3	102.6	1.4
果糖	100	102.1	102.1	1.1	麦芽糖	10	9.78	97.8	1.7

表 3 烟叶及卷烟烟丝中水溶性糖的分析结果 $\mu\text{g}/(\text{mg g})$ ($n = 5$)

Tab. 3 Analytical results of water-soluble sugars in tobacco leaves and cigarettes

样品	鼠李糖	木糖	阿拉伯糖	果糖	甘露糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
XFF-102	0.64	1.42	-	121	0.84	108	56.8	8.45
KYAR-60	0.92	0.83	0.47	64.8	0.84	125	36.5	-
YXHT-25	-	-	-	28.5	11.2	84.3	102	8.47
木瓜浸膏	1.28	1.52	0.47	84.3	1.18	68.5	11.8	3.26
大枣浸膏	0.46	0.87	-	158	0.74	147	8.28	4.85

参考文献

[1] 陈良元. 卷烟生产工艺技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2002, 192
 [2] 张晓兵, 唐宏. 烟草科技, 2005, 18(5): 23
 [3] 王月侠. 烟草科技, 1998, 11(4): 11
 [4] 金闻博, 戴亚. 南昌: 江西科学技术出版社, 1993, 88
 [5] 郑一新, 朱晓兰. 分析仪器, 1995, (3): 28

[6] 马强, 何友昭, 肖协忠等. 色谱, 2002, 20(3): 230
 [7] 毛多斌, 曲志刚, 张峻松等. 色谱, 2003, 21(4): 437
 [8] 李忠, 杨光宇, 黄海涛等. 分析化学, 2002, 30(6): 687
 [9] Z Svob Troje, Z Frobe, D Perovic. J Chromatogr A, 1997, 775: 101
 [10] Yang W, Ming Y D. J Chromatogr A, 2000, 904: 113
 [11] S Cardenas, M Gallego, M Valcarcel. Anal Chim Acta,

1999, 402: 1

(3): 384

[12] 施红林, 王宝兴, 杨光宇等. 分析化学, 2002, 30

Analysis of sugars in tobacco sauce by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector

ZHOU Yuan-qing^{*1,3}, WU Zhao-lu^{2,3}, SHI Yun-dong¹, HUANG Qi-lin¹ and SHEN Tai-bo¹ (1. Department of Chemistry, Yuxi Teacher's College, Yuxi 653100; 2. Kunming Division of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Kunming 650223; 3. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091), Fenxi Shiyanshi, 2006, 25(9): 71~ 74

Abstract: A new method for the determination of sugars (rhamnose, xylose, arabinose, fructose, mannose, glucose, sucrose, maltose) in tobacco sauce was established. The sugars in tobacco sauce were separated by solid phase extraction with Sep-pak-C₁₈ cartridge. Then, the sugars were analysed by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector. The 8 sugars were separated on high performance carbohydrate column using an $V(\text{acetonitrile}): V(\text{water}) = 70: 30$ at a flow-rate of 1.0 mL/min. The recoveries were high and reproducible, ranging from 95.0% to 102.6%. This method had been successfully applied to the determination of sugars in tobacco sauce with good results.

Keywords: High-performance liquid chromatography; Evaporative light scattering detector; Tobacco sauce; Sugar