

文章编号: 1673-1689(2010)04-0578-03

# 高效液相色谱法测定烟草底料中低聚糖的含量

董伟

(红塔烟草(集团)有限责任公司技术中心, 云南 玉溪 653100)

**摘要:** 建立了一种检测烟草底料中低聚糖(水苏糖、棉籽糖、蔗糖)的高效液相色谱分析方法。采用 Waters Sugar Pak1 钙型阳离子交换色谱柱(6.5mm × 300mm, 5 $\mu$ m); 流动相为纯水; 采用示差折光检测器进行检测; 流量 1.0 mL/min; 柱温 85 $^{\circ}$ C; 外标法定量。结果显示: 3 种糖的线性关系良好, 相关系数在 0.9991~0.9997 之间; 精密度、稳定性的相对标准偏差(n=5) 都低于 4.7%; 平均回收率为 96.9%~103.5%; 检出限为 3.5~4.0  $\mu$ g/mL。该方法前处理简单、快速, 应用本方法可测定烟草底料中水苏糖、棉籽糖和蔗糖的含量变化。

**关键词:** 高效液相色谱; 烟草底料; 低聚糖

中图分类号: TS 452.1

文献标识码: A

## Determination of Oligosaccharides in Tobacco Casing Materials by HPLC

DONG Wei

(Technical Center, Hongta Tobacco (Group) Corporation, Yuxi 653100, China)

**Abstract:** In this study, a method for determining the content of oligosaccharides, including sucrose, raffinose, stachyose in tobacco casing materials by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. Separation and quantification were achieved by Waters Sugar Pak1 (6.5 mm 300 mm, 5  $\mu$ m) with 1.0 mL/min pure water as the mobile phase, column temperature at 85 $^{\circ}$ C and Refractive Index Detector. The quantified analysis of external standard calibration curves was used. There were good linear correlations between the concentrations of three sugars and their chromatographic peak areas and the correlation coefficients were 0.9991–0.9997. The recoveries were 96.9%–103.5%, the RSD of the method was less than 4.7%. And the detection limits were 3.5–4.0 g/mL. This method is simple, rapid and accurate, and has been applied for the quantitative analysis of sucrose, raffinose, stachyose in tobacco casing materials.

**Key words:** HPLC, tobacco casing materials, oligosaccharide

烟草底料产品中的低聚糖主要由水苏糖、棉籽糖和蔗糖 3 种低分子糖组成, 棉籽糖又称蜜三糖, 是由半乳糖以  $\alpha$ -1,6 糖苷键与蔗糖的葡萄糖基连接所形成; 水苏糖为四糖, 是由棉籽糖的半乳糖以  $\alpha$ -1,6 糖苷键与半乳糖连接而成。

目前, 低聚糖的测定方法, 以纸层析法、薄层层析法、气相色谱法、液相色谱法为主, 除液相色谱外, 以上方法普遍存在样品前处理复杂、灵敏度低、杂质干扰大等缺陷。近些年来, 高效液相色谱法并配以氨基色谱柱已较为普遍, 该法样品前处理简单

收稿日期: 2009-06-11

作者简介: 董伟(1968-), 男, 云南玉溪人, 高级工程师, 主要从事卷烟产品开发。E-mail: dongwei@hongta.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

并能直接测定,还可减少糖的损失或偶然误差。但是,样品中还原糖易与氨基色谱柱中固定相成分发生化学反应,从而导致色谱柱使用寿命大大缩短,另外,该法使用乙腈配制流动相,大大增加了分析测试成本。作者选用 Waters Sugar Pak1 钙型阳离子交换色谱柱,以纯水作为流动相,研究建立了低聚糖的测定方法,并将其应用于烟草底料中蔗糖、棉籽糖和水苏糖的分析测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

Waters 600 高效液相色谱仪,配有 Waters600 四元输液泵,2410 示差折光检测器,7725i 进样阀,Empower2 色谱工作站;Waters Sugar Pak1 钙型阳离子交换色谱柱(6.5 mm × 300 mm),Sep-Pak Alumina Cartridges 保护柱;MilliQ50 超纯水仪处理后的纯水;EDTA 钙钠:色谱级;蔗糖、棉籽糖、水苏糖标准样品,Sigma 公司产品。

### 1.2 标准溶液的配制

分别准确称取 250 mg 水苏糖、棉籽糖和蔗糖,以纯水溶解并定容至 10 mL,得到浓度为 25 mg/mL 的储备液;然后分别配制成 3 种组分浓度均为 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mg/mL 的标准混合溶液,4℃冰箱中保存。

### 1.3 样品的制备与测定

准确称取烟草底料产品 1 g 左右至 10 mL 容量瓶中,加入 5 mL 体积分数 70% 乙醇,超声波辅助浸提 10 min,以无水乙醇定容至刻度,振摇,取上清液用 0.45 μm 有机相微孔膜过滤,滤液供 HPLC 分析。

## 2 结果与讨论

作者选用 Waters Sugar Pak1 色谱柱,该色谱柱采用 Ca<sup>2+</sup> 型阳离子交换树脂作为填料,该填料使用聚苯乙烯-二乙烯基苯高聚物做骨架,由于高聚物的多孔特性,具有体积排阻的分离机理,使得样品中的 Ca<sup>2+</sup> 物质先被洗脱出来,物质后被洗脱出来。此外,Sugar Pak1 色谱柱还具有配位交换作用,糖分子端基异构碳上所带羟基可被去质子化后带上强的负电荷,这些负电荷与色谱柱的树脂表面金属离子 Ca<sup>2+</sup> 离子所带的正电荷之间的相互作用可使糖分子在色谱柱上保留,并在洗脱时根据保留性质的强弱达到分离。通过 Sugar Pak1 色谱柱的双重分离机理,可使烟草制品低聚糖样品的糖组分得到分离,所以该实验选用 Sugar Pak1 色谱柱。

### 2.1 检测器的选择

与紫外可见吸收检测器(UVD)相比,示差折光检测区(RID)的灵敏度较低,待测组分在紫外光区无特征吸收峰,且待组分在样品中的含量较高,可选用示差折光检测器检测。

### 2.2 流动相的选择

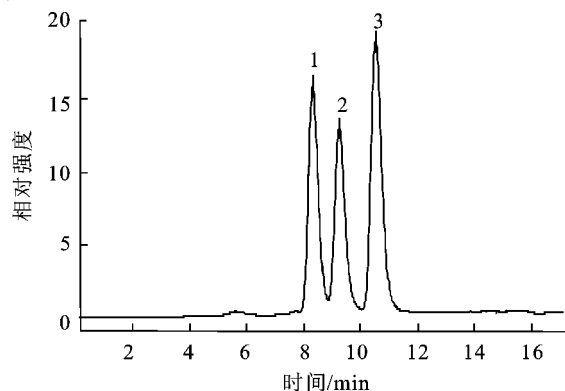
Waters Sugar Pak1 钙型阳离子交换柱一般以水作流动相,水中加入少量 EDTA 钙钠可减少柱材料上的钙离子流失,延长柱的使用寿命<sup>[1]</sup>;作者考察了流动相中加入体积分数 5% 甲醇、乙腈及四氢呋喃等亲水性有机溶剂作调节剂对分离的影响。结果显示,加有机溶剂对分离并无明显改善作用,故实验选用 0.05 g/L EDTA 钙钠水溶液作为流动相。

### 2.3 柱温的选择

在室温(18~25℃)下,低聚糖组分分离度较低,峰型较差,且色谱柱压力较大,容易损伤色谱柱。实验表明,柱温保持在 70~90℃ 之间均可使几种组分得到较好的分离且色谱柱的压力较小,本实验柱温控制为 85℃。

### 2.4 色谱条件的最终确定

根据以上实验最终确定色谱条件。在此色谱条件下将水苏糖、棉籽糖和蔗糖混合标准溶液进样,得到标准混合溶液色谱图 1。



1-水苏糖,2-棉籽糖,3-蔗糖

图 1 棉籽糖、水苏糖和蔗糖色谱图

Fig. 1 Chromatograms of oligosaccharides standard solution

### 2.5 线性关系、检测限、回收率的考察

以浓度分别为 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mg/mL 低聚糖标准品工作液进行检测,每个浓度重复 3 次,计算平均值。将 3 种低聚糖峰面积对其相应浓度进行线性回归计算,得出相关系数  $r$ ,结果见表 1。图 1 为低聚糖混合标样的色谱图,从中可以看出,3 种低聚糖能够在 15min 以前全部洗脱出来,并且分离度良好。由表 1 可见,3 种低聚糖的峰面积与其浓度呈现线性关系( $r > 0.99$ ),其中 3 种糖的相关系数都在 0.9993~0.9997 之间,说明在设定的浓度

范围内线性关系良好;通过分析稀释后的标准品储备液,以3倍信噪比(S/N)计算检测限;样品平行测定5次,考察方法精密度。结果见表1。

样品通过添加不同质量浓度(1.0、3.0、5.0 mg/mL)3种低聚糖混标进行回收试验,基质及各加标水平样品平行测定3份,以外标法进行定量,并计算3个加标水平下的平均回收率,结果如图2

表1 HPLC法检测3种低聚糖的回归方程、相关系数及检出限

Tab. 1 Regress equation, r and detection limits of oligosaccharides detected by HPLC

名称	回归方程	r	检测限/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	质量浓度线性 范围/(mg/mL)	精密度 RSD/%
水苏糖	$Y = 18.432X - 456$	0.9997	4.0	0.07~12.0	99.5
棉籽糖	$Y = 15668X + 1434$	0.9995	3.5	0.06~10.0	99.8
蔗糖	$Y = 16781X + 1054$	0.9993	4.0	0.05~12.0	98.9

表2 3种低聚糖的回收率测定

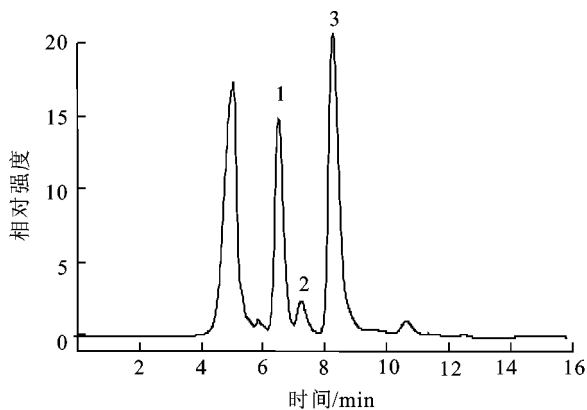
Tab. 2 Recovery tests for three kinds of oligosaccharides

名称	未加标样/(mg/mL)	加标量/(mg/mL)	实际测量值/(mg/mL)	回收率/%
水苏糖	2.1	1.0	2.2	97.5
		3.0	5.0	102.6
		5.0	7.3	102.8
棉籽糖	3.2	1.0	4.1	96.9
		3.0	6.3	103.1
		5.0	8.3	103.1
蔗糖	5.0	1.0	5.0	98.9
		3.0	8.2	103.5
		5.0	9.8	101.8

表3 低聚糖HPLC测定结果

Tab. 3 Results of oligosaccharides detected by HPLC

样品	质量分数/%			
	水苏糖	棉籽糖	蔗糖	低聚糖
烟草底料1	5.3	1.5	4.4	11.2
烟草底料2	6.6	2.1	5.3	14.0



1-水苏糖, 2-棉籽糖, 3-蔗糖

图2 烟叶底料样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of tobacco casing materials

### 3 结语

高效液相色谱法采用 Waters Sugar Pak1 钙型阳离子交换色谱柱测定烟草底料产品中低聚糖含量,能使3种低聚糖在15 min内良好分离。该法重现性好,灵敏度高,能够快速测定烟草底料产品中低聚糖的含量,可推荐用于卷烟加料工序或香精香料品质控制工序过程中的常规分析测定。

### 参考文献(References):

- [1] Kolwkar T G, Keskav V S. Determination of Sugars in Sugar Beet with High Performance Liquid Chromatography[J]. *International Sugar Journal*, 1998, 192(1): 164.

(责任编辑:朱明)