

高效液相色谱法测定新鲜烟叶中的多酚含量

黄丽佳¹, 梁梦洁¹, 吴双凤¹, 罗娜¹, 季云瑞², 王雪¹, 郭亚东¹, 邓亮^{1*}

(1. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500;

2. 昆明医科大学计划财务处, 云南昆明 650500)

摘要: 运用 HPLC 法测定新鲜烟叶中 10 种多酚的含量, 色谱柱为 CAPCELL PAK CR (4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 μm), 柱温为 30 ℃, 二极管阵列检测器, 检测波长 340 nm. 流动相流速 0.8 mL/min, 梯度洗脱. 10 种多酚在 1 ~ 50 μg/mL 范围内具有良好的线性 ($r > 0.999$), 加标回收率在 90.0% ~ 101.4% 之间, $RSD < 5\%$. 测定结果显示, 新鲜烟叶中多酚含量分别为: 绿原酸 7 106 μg/g, 云香苷 5 441 μg/g, 隐绿原酸 5 237 μg/g, 山奈酚苷 1 159 μg/g, 新绿原酸 975 μg/g, 咖啡酸 723 μg/g, 香豆素 256 μg/g, 茛菪苷 89 μg/g, 茛菪亭 38 μg/g, 阿魏酸 28 μg/g.

关键词: 新鲜烟叶; 高效液相色谱法; 多酚; 测定

中图分类号: S527 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2020) 03 - 0024 - 03

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.03.005

Determination of Polyphenols in Fresh Tobacco Leaves by High Performance Liquid Chromatography

HUANG Lijia¹, LIANG Mengjie¹, WU Shuangfeng¹, LUO Na¹, JI Yunrui², WANG Xue¹, GUO Yadong¹, DENG Liang^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Nature Products, Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500; 2. Planning and Finance Division, Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: The contents of ten polyphenols in fresh tobacco leaves were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with chromatographic column CAPCELL PAK CR (4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 μm); column temperature 30 ℃; DAD detector with detection wavelength 340 nm and mobile phase flow rate 0.8 mL/min for gradient elution. Ten polyphenols have good linearity ($r > 0.999$) in the range of 1—50 μg/mL, and the spiked recoveries were between 90.0%—101.4%, $RSD < 5\%$. The measurement results showed that the contents of the polyphenols in fresh tobacco leaves were (μg/g): chlorogenic acid 7 106, rutin 5 441, cryptogenic acid 5 237, kaempferol 1 159, neochlorogenic acid 975, caffeic acid 723, coumarin 256, guanidine 89, scopoletin 38 and ferulic acid 28.

Key words: fresh tobacco leaves; HPLC; polyphenols; determination

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 为双子叶植物 (Dicotyledoneae), 属管花目 (Tubiflorae) 茄科 (Solanaceae) 烟草属 (*Nicotiana*), 原产于美洲、澳大利亚和南太平洋岛屿, 目前我国各省均有广泛种植. 烟草中含有多种多酚类物质^[1], 而该物质是影响烟草生长发育、烟叶色泽、烟气香味及其

生理强度等方面的重要物质. 此外, 多酚类物质是烟草重要的香气前体物, 与烟叶香气量和香气类型密切相关^[2-4], 因此多酚类物质是决定烟叶品质的重要因素之一. 有研究^[5-7]报道了烤烟中多酚类化合物含量的测定, 所用测定方法主要是采用高效液相色谱法. 基于上述分析, 本文采用高效液相色谱

收稿日期: 2020 - 01 - 02

基金项目: 云南省科技厅科学研究基金资助项目 (2018FB150); 云南中烟工业有限责任公司资助项目 (2018539200370184).

作者简介: 黄丽佳 (1996—), 女, 云南文山州人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草化学研究.

* 通讯作者: 邓亮 (1979—), 女, 湖北恩施人, 副教授, 主要从事药物分析研究, E-mail: dengliangkmmc@163.com.

法同时测定了新鲜烟叶中 10 种多酚的含量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

对照品莨菪苷、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、新绿原酸、芸香苷、莨菪亭、香豆素、山奈酚苷（纯度 > 98%）（均购于加拿大 Toronto Research Chemicals 公司）；甲酸（色谱纯，北京百灵威科技有限公司），乙腈、甲醇（色谱纯，德国 Merck 公司）；实验用水为超纯水。

1.1.2 样品

采自云南省石林县耀奇香草谷的红花大金元新鲜烟叶。

1.1.3 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（配置有二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和色谱工作站，美国 Agilent 公司）；AE240 电子天平（精度为 0.000 1 g，瑞士 Mettler Toledo 公司）；Milli-Q50 超纯水仪（美国 Millipore 公司）。

1.1.4 色谱条件

色谱柱：CAPCELL PAK CR（4.6 mm I. D. × 250 mm，5 μm）；柱温：30 ℃；进样量：10 μL；检测波长：340 nm；流动相流速：0.8 mL/min；流动相 A[V(乙酸):V(甲醇):V(水)=2:10:88]，流动相 B[V(乙酸):V(水):V(甲醇)=2:10:88]；梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% |
|--------|---------|---------|
| 0.0 | 20 | 80 |
| 1.0 | 25 | 75 |
| 12.0 | 45 | 55 |
| 13.0 | 90 | 10 |
| 14.0 | 90 | 10 |
| 14.5 | 20 | 80 |

1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取莨菪苷、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、新绿原酸、芸香苷、莨菪亭、香豆素、山奈酚苷等 10 种多酚对照品各 10.0 mg，置于 10 mL 棕色容量瓶中，用分析纯甲醇溶解并定容至刻度，从而得到质量浓度为 1 mg/mL 的多酚标准储备液。

1.3 样品溶液的制备

精密称取新鲜烟叶冻干粉末 50.0 mg，置于 15 mL 的离心管中，然后加入 80% 甲醇溶液 5 mL，盖塞密封，超声提取 45 min，在常温下，以 10 000 r/min 离心 10 min，通过 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤，备用。

2 结果与分析

将多酚对照品和样品溶液进样后在 1.1.4 色谱条件下分析，其 HPLC 色谱图见图 1 和图 2，10 个多酚分离良好，峰形对称。

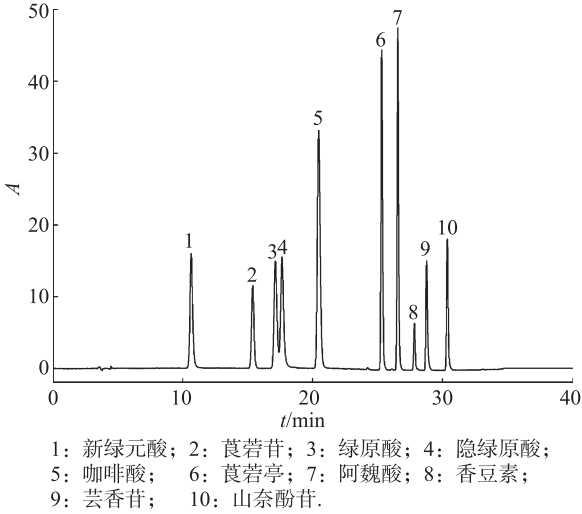


图1 对照品多酚色谱图

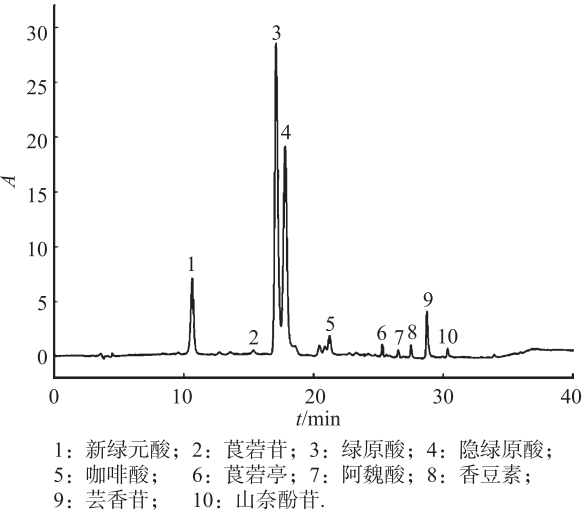


图2 样品多酚色谱图

2.1 线性关系考察

通过对标准储备液逐级稀释，配制一系列标准工作溶液，并采用选定色谱条件对 10 种多酚的系列标准溶液进行测定，以对应各组分的质量浓度 C 为横坐标 (X)，各组分峰面积 A 为纵坐标 (Y)，

绘制工作曲线, 得回归方程及相关系数. 检出限和定量限分别取最低质量浓度标准溶液连续 10 次进

样, 计算当信噪比 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 时所对应的检测限和定量限, 结果见表 2.

表 2 10 种多酚的回归方程、回归系数、检出限和定量限

| 多酚 | 线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 线性方程 | 相关系数 (r) | 检出限 | 定量限 |
|------|--|--------------------------|--------------|------|------|
| 新绿原酸 | 1 ~ 50 | $A = 30.5633C - 4.2732$ | 0.999 0 | 0.04 | 0.14 |
| 萆薢苷 | 1 ~ 50 | $A = 18.6746C - 1.9982$ | 0.999 2 | 0.06 | 0.20 |
| 绿原酸 | 1 ~ 50 | $A = 31.3803C - 6.1414$ | 0.999 2 | 0.04 | 0.14 |
| 隐绿原酸 | 1 ~ 50 | $A = 32.1905C - 7.5960$ | 0.999 4 | 0.04 | 0.14 |
| 咖啡酸 | 1 ~ 50 | $A = 59.6790C - 9.4413$ | 0.999 1 | 0.03 | 0.10 |
| 萆薢亭 | 1 ~ 50 | $A = 50.6844C - 5.2757$ | 0.999 0 | 0.02 | 0.07 |
| 阿魏酸 | 1 ~ 50 | $A = 54.1532C - 10.3475$ | 0.999 5 | 0.02 | 0.07 |
| 香豆素 | 1 ~ 50 | $A = 7.6787C + 1.5137$ | 0.999 2 | 0.11 | 0.38 |
| 芸香苷 | 1 ~ 50 | $A = 18.5863C - 9.2571$ | 0.999 6 | 0.06 | 0.20 |
| 山奈酚苷 | 1 ~ 50 | $A = 21.4268C - 2.9498$ | 0.999 5 | 0.05 | 0.17 |

由表 2 可以看出, 10 种多酚在 1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有较好的线性关系 ($r > 0.999$), 其检出限在 0.02 ~ 0.11 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 定量限在 0.07 ~ 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 之间.

2.2 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 得到新绿原酸、萆薢苷、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、萆薢亭、阿魏酸、香豆素、芸香苷、山奈酚苷 10 种多酚的 RSD 值分别为 0.9%, 0.4%, 0.5%, 0.7%, 1.2%, 0.7%, 0.6%, 1.3%, 1.1%, 0.7%, 表明仪器测定的精密度良好.

2.3 重复性实验

取同一批次样品 6 个, 按 1.3 项下方法制备后, 再按 1.1.4 项下色谱条件分别进样, 测定新绿原酸、萆薢苷、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、萆薢亭、阿魏酸、香豆素、芸香苷、山奈酚苷对应的峰面积, 计算其平均质量分数, 得到其 RSD 值分别为 1.3%, 0.6%, 1.7%, 2.1%, 1.3%, 1.2%, 1.9%, 1.2%, 1.5%, 1.4%, 表明该实验方法重复性良好.

2.4 加标回收率

在已经测定 10 种多酚含量的新鲜烟叶样品中, 分别按高、中、低 3 个质量浓度水平添加一定量的多酚混合标准溶液, 连续进样 6 次, 测定多酚的回收率. 由表 3 可以看出, 多酚在新鲜烟叶中的平均加标回收率为: 90.0% ~ 101.4%, RSD 为 2.0% ~ 4.8%.

表 3 10 种多酚的加标回收率和 RSD ($n = 6$)

| 多酚 | 平均加标回收率/% | RSD /% |
|------|-----------|----------|
| 新绿原酸 | 90.0 | 2.0 |
| 萆薢苷 | 95.0 | 4.4 |
| 绿原酸 | 91.1 | 2.8 |
| 隐绿原酸 | 91.7 | 3.3 |
| 咖啡酸 | 100.4 | 3.3 |
| 萆薢亭 | 100.4 | 3.5 |
| 阿魏酸 | 101.4 | 3.4 |
| 香豆素 | 91.3 | 2.8 |
| 芸香苷 | 90.3 | 4.3 |
| 山奈酚苷 | 94.9 | 4.8 |

2.5 样品含量测定

取新鲜烟叶冻干粉, 按 1.3 项下进行样品前处理, 在 1.1.4 色谱条件下进样分析, 按回归方程计算样品中多酚的含量, 得到其平均含量从高到低的顺序为: 绿原酸 7106 $\mu\text{g/g}$, 芸香苷 5441 $\mu\text{g/g}$, 隐绿原酸 5237 $\mu\text{g/g}$, 山奈酚苷 1159 $\mu\text{g/g}$, 新绿原酸 975 $\mu\text{g/g}$, 咖啡酸 723 $\mu\text{g/g}$, 香豆素 256 $\mu\text{g/g}$, 萆薢苷 89 $\mu\text{g/g}$, 萆薢亭 38 $\mu\text{g/g}$, 阿魏酸 28 $\mu\text{g/g}$.

3 讨论

多酚是烟叶中的重要物质之一, 本文建立的方法可以同时测定新鲜烟叶中 10 种多酚的含量, 所用方法的精密度、重复性都较好, 在设定的范围内, 线性关系良好. 回收率测定结果显示, 可以满足实验需要.

(下转第 31 页)

本研究整合了云南中烟现有的卷烟产品质量检验管理工作中的工作内容、工作流程、检测标准以及数据标准等, 合理规划各级部门质量管理工作职责及工作内容, 建立了云南中烟卷烟产品质量检验标准体系、数据管理规范、垂直管理模式、业务联动机制等, 从而保障各层级间产品质量检验管理业务的上下贯通, 提高云南中烟产品质量检验信息反馈效率, 为快速高效推动产品质量持续改进提供有力保障。

[参考文献]

[1] 韦建国. 浅议地级市级公司质量管理体系建设工作

[J]. 广西烟草, 2010 (9): 53-55.

[2] 金梦. 烟草商业企业贯标与对标“两标结合”问题研究 [J]. 学理论, 2010 (11): 87-88.

[3] 杨葆华, 赵庆亮, 陈戈. 基于质量管理体系的检测实验室全面质量控制和管理 [J]. 科技创新导报, 2019, 13 (10): 178-179.

[4] 王靖. SHZ 市烟草专卖局 (公司) 质量管理体系建设研究 [D]. 西安: 西安电子科技大学, 2013.

[5] 邱剑, 任海燕. 烟草行业质量体系建设与信息化融合的思考 [J]. 计算机光盘软件与应用, 2011 (4): 25.

[6] 何微. 探索基于风险思维和 PDCA 循环的过程方法在质量管理体系构建过程的应用 [J]. 科技与创新, 2019 (18): 156-157.

(上接第 26 页)

[参考文献]

[1] 徐文秀, 李兰, 杨光宇, 等. 烟草中酚类化合物的研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2015, 30 (6): 965-968.

[2] 余文怡, 邓亮, 李兰, 等. 云南地方晾晒烟化学成分研究 [J]. 昆明学院学报, 2015, 37 (6): 25-27.

[3] 朱小茜, 徐晓燕, 黄义德, 等. 多酚类物质对烟草品质的影响 [J]. 安徽农业科学, 2005 (10): 132-133.

[4] 许自成, 秦璐, 邵惠芳, 等. 烤烟钾含量与多酚、有机酸含量及评吸品质的关系 [J]. 河南农业大学学

报, 2010, 44 (4): 383-389.

[5] 张启发, 聂琼, 邹序生, 等. HPLC 法同时测定烟叶中 6 种多酚类物质 [J]. 山地农业生物学报, 2018, 37 (3): 21-26.

[6] 刘萍萍, 卢紫舒, 罗朝鹏, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定烟叶中 10 种多酚类化合物 [J]. 烟草科技, 2019, 52 (6): 42-49.

[7] 王晋, 黄海涛, 刘欣, 等. 快速高效液相色谱法测定烟草中的多酚 [J]. 烟草科技, 2018, 51 (11): 66-72.

