

# 微柱高效液相色谱和质谱法测定烟草样品中的多酚

张 甜<sup>1</sup>, 董学畅<sup>1</sup>, 吴方评<sup>1</sup>, 张 莉<sup>1</sup>, 杨光宇<sup>2</sup>

(1. 云南民族大学 化学与生物技术学院, 云南 昆明 650031; 2. 云南烟草研究院, 云南 昆明 650106)

植物多酚是烟草中一类重要物质, 它们在烟草中的含量对烟草质量有重要影响, 因而研究烟草及其制品中的植物多酚具有重要意义<sup>[1]</sup>。高效液相色谱法是测定其常用的一种方法<sup>[2,3]</sup>。和常规高效液相色谱相比, 微柱高效液相色谱由于具有流动相消耗小, 分析时间短, 可不分流直接和质谱连用等特点, 近几年来得到了迅速发展<sup>[4]</sup>。我们研究了用 Waters Xterra™ RP<sub>18</sub> (1.0 × 50 mm, 2.5 μm) 微柱为固定相液相色谱法测定烟草中的多酚, 烟草中的主要多酚在 4.0 min 内可达到基线分离, 和常规液相色谱相比大大节约了分析时间。并用大气压电离质谱和二次质谱技术对未购到标样的绿原酸异构体作了辅助定性, 方法用于烟草样品中多酚的分析, 回收率在 97% ~ 103% 之间, RSD 在 1.4% ~ 1.9% 之间, 结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Alliance 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 英国 Micromass 公司 ESI/ API - Quattro - II MS - MS 质谱检测器。甲醇: 高效液相色谱专用 (Fisher 公司生产); 水为石英亚沸蒸馏水, 并用 Milli - Q50 超纯水仪处理, 电阻率大于等于 18 Ω · cm<sup>-1</sup>; 多酚标准分别购于 Fluka 公司和 Sigma 公司, 含量 > 99%。

### 1.2 质谱与色谱条件

质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI), 负离子检测, 雾化气体: 氮气, 流速: 6 L · min<sup>-1</sup>, ESI 电离电压: 2.8 kV, 锥孔电压: 25 V, 离子源温度: 100 °C, 二次质谱碰撞气: 氩气, 碰撞电压 50 eV。

色谱条件: 色谱柱为 Waters Xterra™ RP<sub>18</sub> (1.0 × 50 mm, 2.5 μm); 固相萃取柱为 Waters Sep - Pak - C<sub>18</sub> 固相萃取小柱; 流动相为: A 甲醇, B 1% 醋酸溶液, 按 0 min (20% A - 80% B), 3 min (80% A - 20% B), 4.0 min (80% A - 20% B) 线性递增的梯度条件; 流速为 0.1 mL/min; 进样体积 2.0 μL。

上述色谱条件下标样和烟草样品在 345 nm 波长处的色谱图见图 1。

### 1.3 样品前处理

烟样品粉碎过 80 目筛, 称取约 0.200 0 g, 加入 45 mL 80% 甲醇水溶液加热回流 40 min, 冷却, 过滤并定容到 50 mL, 取 5 mL, 以 10 mL · min<sup>-1</sup> 流速通过预处理好的 Sep - Pak - C<sub>18</sub> 固相萃取小柱, 弃去最初的 3 mL, 收集后面的 2 mL 用 0.45 μm 针头过滤器过滤, 进样 2.0 μL 分析。

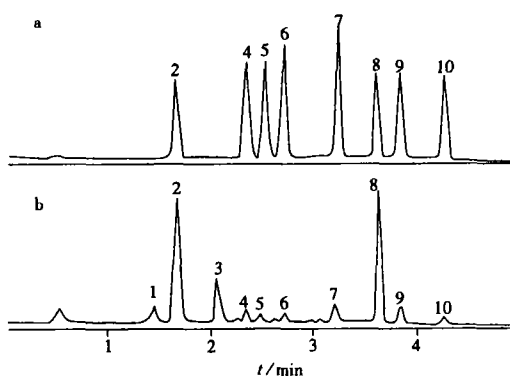


图 1 多酚标准品(a)与烟草样品(b)的色谱图

1. 5-O-咖啡-d-奎尼酸; 2. 绿原酸; 3. 4-O-咖啡-d-奎尼酸;  
4. 咖啡酸; 5. 七叶亭; 6. 莨菪宁; 7. 莨菪亭; 8. 芸香苷;  
9. 茨菲醇-3-芸香糖苷; 10. 槲皮素

## 2 结果与讨论

### 2.1 绿原酸异构体的质谱鉴定

由于未买到绿原酸异构体标样, 我们用质谱作了辅助鉴定。

绿原酸的相对分子质量为 354, 在电喷雾负离子检测 (ESI<sup>-</sup>) 条件下扫描, 应得到 [M - H]<sup>-</sup> 离子峰, 即  $m/z$  353。提取  $m/z$  353 质量数单离子流图有 3 个峰, 各峰保留时间为 1.575、1.784 min (绿原 - 274 -

酸)和 2.162 min, 和紫外检测器的色谱图相对应; 3 个色谱酚质谱图非常相似, 都有  $m/z$  353 离子峰, 将  $m/z$  353 母离子二次质谱子离子扫描, 得到的质谱图也非常相似, 均有  $m/z$  353 母离子峰和  $m/z$  191 子离子碎片峰, 可确认绿原酸以外的其它两个峰均为绿原酸异构体。结合文献[5]报道的保留时间, 根据出峰顺序可推断 1.575 min 峰为 5-O-咖啡-d-奎尼酸, 2.162 min 峰为 4-O-咖啡-d-奎尼酸。

### 2.3 样品分析结果

烟草样品按以上 2.1 中的样品前处理过程处理进样分析, 结果见表 1。

表 1 烟草样品分析结果

| 样品名称       | 绿原酸 /% | 芸香苷 /% | 香豆素类多酚 /% | 咖啡单宁类多酚 /% | 黄酮类多酚 /% | 总多酚 /% |
|------------|--------|--------|-----------|------------|----------|--------|
| 津巴布韦 L10   | 1.389  | 0.746  | 0.044     | 2.240      | 0.850    | 3.133  |
| 巴西 BBB2/T  | 1.190  | 0.775  | 0.047     | 1.987      | 0.854    | 2.888  |
| 江西 (C3F)   | 1.203  | 0.563  | 0.046     | 1.836      | 0.630    | 2.513  |
| 泰国香料烟(BAG) | 0.578  | 0.504  | 0.010     | 0.888      | 0.594    | 1.492  |
| 浙江香料烟一级    | 0.160  | 0.450  | 0.012     | 0.344      | 0.650    | 1.006  |
| 泰香一级       | 0.617  | 0.635  | 0.015     | 0.946      | 0.758    | 1.719  |

注: 香豆素类多酚为七叶亭, 茛菪宁, 茛菪苄的加合; 咖啡单宁类多酚为 5-O-咖啡-d-奎尼酸, 绿原酸, 4-O-咖啡-d-奎尼酸, 咖啡酸的加合; 黄酮类多酚为芸香苷, 荜菲醇-3-芸香糖苷, 槲皮素的加合

### 2.4 讨 论

本方法与传统方法的比较见表 2, 由于采用了微柱高效液相色谱技术, 本方法的分离时间比常规高效液相色谱法大大缩短, 流动相消耗也大为减少, 而且还可不经分流直接与质谱连用。另外本方法采用固相萃取脱脂, 克服了有机溶剂回流脱脂时间长, 环境污染大的缺点, 可使脱脂时间缩短近 2 h, 且能批量处理, 结果较常规方法大为改善。

表 2 本方法与传统方法比较

| 方法   | 流动相流速<br>$v/(mL \cdot min^{-1})$ | 分离时间<br>$t/min$ | 脱脂时间<br>$t/min$ | 与质谱联用 | 回收率<br>$R/\%$ | RSD<br>$s_r/\%$ |
|------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-------|---------------|-----------------|
| 本方法  | 0.1                              | 4               | 10              | 直接连用  | 94 ~ 103      | 1.31 ~ 2.36     |
| 传统方法 | 0.8                              | 30              | 180             | 需分流   | 88 ~ 92       | 3.39 ~ 5.95     |

#### 参考文献:

- [1] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学. 朱尊权等译. 上海: 上海远东出版社, 1993, 396.
- [2] 张槐苓, 葛翠英, 等. 烟草分析与检验. 郑州: 河南科技出版社, 1994. 243.
- [3] STOTESBURY S J. A method for the determination of polyphenols in tobacco by HPLC, its application to the analysis of various tobacco types, and to analysis of smoke[J]. CORESTA, 1993, (3): 15.
- [4] 傅若农. 高效液相色谱进展—微柱液相色谱近年的发展. 国外分析仪器技术与应用, 2000, (4): 1-10.

## Microcolumn High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Method for the Determination of Polyphenols in Tobacco

ZHANG Tian<sup>1</sup>, DONG Xue-chang<sup>1</sup>, WU Fang-ping<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, YANG Guang-yu<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Bioly Technology, Yunnan University for Nationalities, Kunming 650031, China;

2. Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming 650106, China)

**Abstract:** A microcolumn high performance liquid chromatography(HPLC) and mass spectrometry method for the determination of polyphenols in tobacco was studied. The recoveries of tobacco polyphenols are 97% ~ 103%, and the relative standard deviations are 1.4% ~ 1.9%. This method can be applied to the determination of polyphenols in tobacco with satisfactory result.

**Key words:** Microcolumn high performance liquid chromatography(HPLC); Mass spectrometry; Polyphenols; Tobacco