

烟用香精的超高压液相色谱指纹图谱分析

作者

湖南中烟工业有限责任公司技术中心,长沙 410007

..... 赵瑜 杨华武 钟科军 李艳春
朱卓越 黎艳玲 陈雄 苏利霞

作者简介

赵瑜,男,硕士,工程师。

Email: zhaoyu@baisha.com

摘要

为了控制烟用香精质量,利用超高压液相色谱,建立了香精的UPLC指纹图谱,并应用夹角余弦和欧式距离法计算香精的相似度。结果表明:6批次的香精指纹图谱稳定性好,相似度高,具有很强的特征性和唯一性,夹角余弦法和欧氏距离法计算简单,二者结合能够全面考察香精的质量。利用超高压液相色谱建立的色谱指纹图谱能快速、全面、综合、准确地反映烟用香精的质量状况,可以成为烟用香精质量控制的有效手段。

关键词

超高压液相色谱 香精 指纹图谱 相似度

Ultrahigh Pressure Liquid Chromatograph Fingerprint Analysis of Tobacco Flavor

ZHAO Yu YANG Huawu ZHONG Kejun LI Yanchun ZHU Zhuoyue LI Yanling CHEN Xiong SU Lixia

(Technology Center of China Tobacco Hunan Industrial Corporation, Changsha 410007, China)

Abstract In order to monitor the quality of tobacco flavor, the samples of 6 batches of flavor were analyzed by Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatograph (UPLC), and the fingerprint spectrum of the sample was established by the relative retention values and relative areas of characteristic peaks. The similarity was calculated with Included Angle Cosine and Euclidean Distance. The fingerprint spectrum of the samples presented good stability, high similarity, and excellent characteristic and uniqueness. Included Angle Cosine and Euclidean Distance were easy to calculate and program, which provided an all-round assessment of the quality of tobacco flavor. Fingerprint spectrum established by UPLC reflected the quality of tobacco flavor exactly and completely and might be an effective means for tobacco flavor quality control.

Key words ultrahigh-pressure liquid chromatograph flavor fingerprint spectrum similarity

在卷烟的生产过程中,为了提高卷烟的燃吸品质,改善卷烟口感,突出烟草风格,需要使用各种烟用香精^[1]。烟用香精是由多种香料和适量溶剂调和制成的混合物,受原料产地、加工工艺等多种因素影响,产品质量存在一定的波动性。因此,烟用香精质量的稳定性倍受香精生产企业和卷烟企业的普遍关注。目前大多数卷烟生产企业主要通过香精的酸度、溶混度等物性指标和评吸来评价其质量,但由于这些指标不能完全反映香精的本质,故很难通过这些指标准确地了解香精质量的变化。色谱指纹图谱是随着现代分析技术发展而诞生的一种从整体上研究复杂物质体系的技术,适合于考

察复杂成分重要内在质量的均一性和稳定性,已经在中药质量控制等许多领域中得到应用^[2-4],指纹图谱在烟用香精香料质量控制方面也有了一些报道^[5-6]。目前建立烟用香精的指纹图谱分析方法主要是通过气相色谱法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱法,但是这些方法都有一些不足之处。因为气相色谱只能检测香精中挥发性和半挥发性成分,而烟用香精中存在很多难挥发成分,这些成分有可能是发挥关键作用的组分。液相色谱对于这些难挥发的物质分析与气相色谱相比有比较明显的优势。但是液相色谱运用于烟用香精的分析也存在问题,主要在于普通高效液相色谱的分离能力比气相色谱要弱,而烟用香精的成分比较复杂,如要实现比较好的分离则可能需要比较长的时间(1~2小时),

收稿日期:2009-02-09

并且消耗大量的溶剂。这样将会大大降低香精质量控制效率,不符合企业质量控制的快速性和及时性要求。近年来,随着商品化 $2\ \mu\text{m}$ 填料的逐渐推广,使用填充此类填料的色谱柱构建超高效液相色谱仪器系统及其分析方法已经成为分析化学领域研究的热点之一。目前,超高压液相色谱(Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography, UPLC)已经越来越广泛地得到了应用,本文尝试利用超高压液相色谱建立烟用香精的指纹图谱,并用于烟用香精的质量控制。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

Waters超高压液相色谱仪(美国Waters公司),配备二极管阵列检测器(PDA)和Empower色谱工作站。

乙腈(色谱纯)、-甲基萘、乙酸,Alfa公司;娃哈哈瓶装纯净水;6批次0068号香精样品,由长沙卷烟厂提供。

1.2 内标溶液的制备

精密称取内标物-甲基萘 $0.2\ \text{g}$ 置于 $1\ 000\ \text{mL}$ 容量瓶中,用丙二醇-乙醇-水 $=1\ 1\ 1$ (体积比)溶剂定容,摇匀,作为内标溶液,放入冰箱冷藏保存。

1.3 样品预处理

精密称取待测香精样品 $2\ \text{g}$,加入 $10\ \text{mL}$ 内标溶液超声溶解,再用内标溶液定容至 $50\ \text{mL}$,用一次性注射器吸取 $2\ \text{mL}$ 左右溶液,使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的有机滤膜过滤,待测。

1.4 超高压液相色谱操作条件

色谱柱:Acquity UPLC IM BEHC C_{18} ($2.1\ \text{mm} \times 50\ \text{mm} \times 1.7\ \mu\text{m}$);柱温: $30\ ^\circ\text{C}$;检测波长: $254\ \text{nm}$;流动相A为 $0.1\ \%$ 乙酸水溶液,流动相B为乙腈。

表1 UPLC梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相A/%	流动相B/%
0	0.25	96	4
40	0.25	5	95
44	0.25	5	95
48	0.25	96	4

2 结果与讨论

2.1 溶解香精溶剂的选择

溶解香精是本实验的一个关键步骤,因为只有完全溶解香精才有可能通过超高压液相色谱获取

完整的香精的信息。由于香精的成分比较复杂,使用某一单一溶剂很难完全溶解香精,我们考虑到烟用香精中使用比较多的溶剂为丙二醇、乙醇,所以本实验使用水-丙二醇-乙醇 $=1\ 1\ 1$ 的溶剂为溶解香精的溶剂。经过尝试溶解40余种不同的香精,发现这种溶剂都能够完全溶解这些香精,所以本实验决定采用此混合溶剂作为溶解香精的溶剂。

2.2 色谱分离条件的优化

考虑到香精中成分复杂,为了更好地分离这些成分,我们尝试了不同的梯度程序,最终在表1所示的梯度洗脱条件下,香精中各个成分能够得到较好的分离,而且分离时间也比较短,此条件下所得到的色谱图见图1。

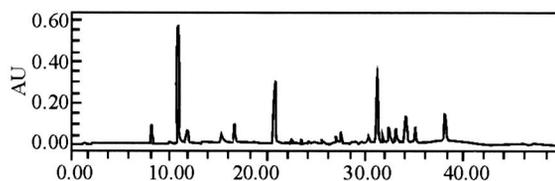


图1 0068号香精样品的UPLC指纹图谱(254 nm)

2.3 检测波长的选择

在表1所示的色谱条件下进样分析,在 $190\sim 400\ \text{nm}$ 的范围内扫描,得到样品的紫外扫描谱图,选取不同波长下的色谱图比较,发现在 $254\ \text{nm}$ 处的色谱图色谱峰最多,而且峰形较好,所以本实验选取 $254\ \text{nm}$ 为检测波长。

2.4 精密度和重复性

选取同一批次样品按照1.3和1.4所述在1日内连续进样分析5次,各个色谱峰峰面积和相对保留时间的平均相对标准偏差(RSD)分别为 $1.02\ \%$ 和 $0.66\ \%$ 。

选取同一批次样品按照1.3和1.4所述在5日内连续进样分析5次,每天一次,各个色谱峰峰面积和相对保留时间的平均相对标准偏差(RSD)分别为 $1.60\ \%$ 和 $0.88\ \%$ 。此结果表明此方法具有较高的精密度和重现性。

2.5 指纹图谱的建立和共有峰的分析

以内标乙酸苯乙酯的色谱峰为参照峰,按照式(1)和式(2)求出6批次0068号香精样品所有色谱峰的相对保留值(r)和相对峰面积(S_r),并按 r 值的大小列表,且每个 r 值与每个样品该组分的 S_r 值对应,就组成了0068号香精样品的数字化色谱指纹图谱(表2)。

$$r = \text{tri} / \text{trs} \quad \text{式(1)}$$

$$S_r = S_i / S_{IS} \quad \text{式(2)}$$

式中: S_r 为相对保留值; t_{ri} 为待测峰的保留时间; t_{rs} 为内标峰的保留时间; S_r 为相对峰面积; S_i 为待测峰的面积; S_{IS} 为内标峰的面积。

在可供比较的样品中,共有 18 个色谱峰为 6 批样品所共有 (100%), 而且这些色谱峰的峰面积占

总峰面积的 99% 以上, 可作为鉴别此香精样品的重要指标; 另有 3 个色谱峰为 5 批样品所共有 (83.33%); 1 个色谱峰为 4 批样品所共有 (66.6%)。由于 1# 样品峰数最多且具有代表性, 以此为对照计算出各批次样品的重叠率, 可作为样品鉴别的另一重要指标 (表 2)。

表 2 不同批次 0068 香精色谱指纹图谱中色谱峰的 S_r 值

序号	值	相对峰面积 S_r 值					
		1 #	2 #	3 #	4 #	5 #	6 #
1 *	0.485	1.632	1.555	1.565	1.533	1.489	1.742
2	0.595	0.263	0.395	0.270	0.200	0.210	0.279
3 *	0.649	10.095	10.071	10.131	10.199	10.102	10.99
4	0.672	0.227	-	0.203	0.259	0.288	0.238
5	0.708	0.684	0.657	0.788	0.669	0.499	0.600
6	0.916	0.517	0.540	0.578	0.509	0.325	0.588
7	0.928	0.243	0.228	0.235	0.237	0.100	0.230
8	0.948	0.293	0.268	0.298	0.299	0.251	0.243
9(内标)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10 *	1.247	2.687	2.270	2.468	2.555	2.779	2.980
11	1.524	0.164	0.165	0.168	-	-	0.162
12	1.614	0.339	0.355	0.212	-	0.327	0.316
13	1.640	0.613	0.601	0.605	0.418	0.660	0.622
14	1.819	0.290	0.279	0.287	0.295	0.227	0.283
15 *	1.868	3.208	3.199	3.175	3.298	3.287	3.275
16	1.898	0.320	0.339	0.358	0.305	0.307	0.301
17	1.944	0.955	0.999	0.994	0.925	0.907	0.912
18	1.982	0.410	0.648	0.605	0.607	0.651	0.662
19	2.049	0.956	0.965	0.970	0.960	0.955	0.953
20	2.108	0.632	0.480	0.633	0.653	0.400	0.631
21	2.269	0.342	0.340	-	0.345	0.356	0.146
22 *	2.285	1.131	1.020	1.035	1.248	1.023	1.108
重叠率 (%)		100	97.6	97.6	95.2	97.6	100
相似度 (%) 计大峰		99.9	99.1	99.9	99.9	99.9	99.9
相似度 (%) 不计大峰		99.0	99.1	99.0	99.1	98.3	99.2
欧氏距离		0.30	0.46	0.32	0.34	0.44	0.85

*大峰

2.6 指纹图谱相似性评价

相似度计算常见方法有夹角余弦法、相关系数法、欧氏距离法等^[7]。对 6 批次样品对应组分的值和 S_r 值取均值后, 以此为对照, 采用夹角余弦法 (式 3) 计算图谱之间的相似度。由于香精样品中有几个峰含量较高, 在夹角余弦算法中可能会权重比较大, 考虑到结果的可靠性, 我们将 S_r 值大于 1 的值定为大峰, 分别计算包含大峰和去除大峰的夹角

余弦值。结果 (表 2) 表明: 6 批次的香精样品的指纹图谱相似度很高, 在包含大峰和去除大峰的情况下均在 98% 以上。

$$\text{夹角余弦} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n Y_i^2}} \quad \text{式(3)}$$

(下转第 44 页)

本,会有越来越多的化妆品品牌开发出一系列以天然植物为添加剂的抗敏性舒敏性化妆品产品,为更多具有敏感性皮肤的消费者消除他们的苦恼。

参考文献

- [1] 张军,陈季武,等. 薰衣草薄荷叶非精油组分清除自由基作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(2): 159-164.
- [2] 张婧群,梅和珊,等. 假马齿苋的生物活性及其临床研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 524-528, 544.
- [3] 华晓东,巩媛媛,等. 黄酮素对皮肤过敏治疗作用的实验研究[J]. 天津中医药, 2007, 24(3): 241-244.
- [4] 戴亦晖,王小虹,等. 白芍总苷的药理作用及其应用[J]. 中华

临床医学卫生杂志, 2006, 4(5): 27-28.

- [5] 周云波. 竹叶黄酮的抗氧化性研究[J]. 文山师专学报, 2000, 11(1): 94-97.
- [6] 张英. 竹叶黄酮作为抗衰老护肤因子的应用基础研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(1): 95-100.
- [7] 黄汉生. 橄榄油在化妆品中的应用[J]. 北京日化, 2002, 66: 36-38.
- [8] 肖伟洪. 3种金缕梅科植物提取物对动物皮肤防护研究[J]. 日用化学工业, 2005, 25(1): 27-29.
- [9] 周升,等. 必需脂肪酸在美容化妆品中的应用[J]. 日用化学科学, 2005, 28(8): 45-48.
- [10] 王永奇,梁文波,等. 紫苏油抗过敏、炎症的研究[J]. 大连大学学报, 2000, 21(4): 71-76.

(上接第21页)

夹角余弦法和相关系数法都是对指纹图谱峰强度的变化进行评价,主要用于样品的真伪鉴别;而欧氏距离与指纹图谱数据的线性比例关系有关,更适合香精质量稳定性的考察。欧氏距离的计算公式为:

$$d_{ir} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - X_{rk})^2} \quad \text{式(4)}$$

式中: X_{ik} 为第 i 号样品的第 k 个峰的 S_r , X_{rk} 为 6 个批次样品第 k 个峰 S_r 的均值。

对 6 批次香精样品的 S_r 取均值后,以此为对照,计算出 6 个批次香精样品的欧氏距离变化范围在 0.30~0.85 之间(表 2),该值可作为考察日后进厂的 0068 号香精质量情况的另一重要指标。

3 结论

利用指纹图谱和超高压液相色谱技术相结合,可以快速有效地建立烟用香精的指纹图谱。尤其是引入了超高压液相色谱,不仅可以获取一些难挥发成分的含量信息,还可以大大缩短色谱分析时间,并更好地保证了实验的重现性和稳定性,从而为进一步的香精指纹图谱的建立和分析提供稳定可靠的实验数据。同时,本文利用夹角余弦法和欧

氏距离法进行相似度计算,既能鉴别香精样品的真伪,又能考查样品质量的稳定性,从而更全面地对烟用香精的品质进行监控。因此,我们认为本文提出的烟用香精的超高压液相色谱结合指纹图谱分析技术能够准确、全面地反映烟用香精的质量情况,可以应用于烟用香精质量控制。

参考文献

- [1] 金闻博,张悠金. 烟用香精香料[M]. 合肥:合肥经济技术学院, 1992.
- [2] BAUER R. Quality criteria and phytopharmaceutical: Can acceptable drug standards be achieved[J]. Drug Information Journal, 1998, 32: 101-110.
- [3] 李玉娟,王瑞,车镇涛,等. 中药材指纹图谱质量控制方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 2(3): 192-195.
- [4] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 2(3): 141-151.
- [5] 曲国福,陆舍铭,孟昭宇,詹家芬,丁中涛,缪明明. 色谱指纹图谱在烟用香精质量控制中的应用[J]. 烟草科技, 2007, (7): 46-50.
- [6] 廖堃,胡纲,肖竞. 烟用香精的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 烟草科技, 2006, (2): 37-39.
- [7] 蔡宝昌,刘训红. 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.

海外瞭望

CPL Aromas 收购行动

CPL Aromas Inc. (Somerset, 新泽西) 已完成对 Hagelin and Co. Inc. (Branchburg, 新泽西) 旗下日化香精业务的收购,并将后者的日化香精生产能力迁移至其位于 Somerset 的新工厂中。

对于收购行动, CPL Aromas 总经理 Nick Pickthall 说道:“我们非常高兴能够同 Hagelin 达成协议,同时也期待着能够为我们的新客户id提供创新的、优质的服务。”

Hagelin 将继续专注于其食用香料业务的发展,并将对新工艺的开发进行投资。

(王亮)