

# 超高效液相色谱测定烟叶中的糖类化合物 及在筛选评价中的应用

Determination of sugars in fresh tobacco leaf by ultra high-performance liquid chromatography for screening evaluation

刘欣 李晶 魏玉玲 宋春满 陈建华

LIU Xin LI Jing WEI Yu-ling SONG Chun-man CHEN Jian-hua

缪恩铭 耿永勤 向明 田丽梅

MIAO En-min GENG Yong-qin XIANG Ming TIAN Li-mei

(云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650231)

(Technology Center China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650106, China)

**摘要:**利用可以快速批量前处理的新型样品萃取瓶作为前处理装置,建立了新鲜烟叶中葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖 4 种糖类化合物的超高效液相色谱快速检测方法。试验结果表明:①新开发的样品前处理装置集提取、过滤和转移为一体,可以大大提高样品前处理效率;②利用 75% 的乙腈(内含 0.2% 三乙胺)为流动相,以 ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)为色谱柱,以流速 0.2 mL/min 进行色谱分析。4 种糖类物质在 5~250 μg/mL 时具有较好的线性关系,线性相关系数 > 0.999;检出限为 1.0~3.2 μg/mL;不同添加水平下,平均回收率为 91.0%~102.0%,精密度试验 RSD < 5%;③对于不同类型的新鲜烟叶进行检测,发现糖类化合物的含量差异明显。该方法前处理简单易操作,重复性较好,可以满足烟草及相关样品检测评价的要求。

**关键词:**糖类化合物;烟叶;超高效液相色谱;筛选评价;前处理

**Abstract:** For the fast and accurate determination of sugars in tobacco leaf, a method for the determination of sugars (fructose, glucose, sucrose, maltose) in tobacco leaf by an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was established, taking a novel extraction vial as the pretreatment device. The results showed that: 1) the novel pretreatment device could make the extraction, filter and transfer as one step, make the procedure of the pretreatment more

efficient. 2) The separation of the sample was operated on ACQUITY UPLC BEH Amide column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), using 75% (v/v) acetonitrile containing 0.2% triethylamine as the mobile phase at a flow-rate of 0.2 mL/min. The 4 analytes could be separated smoothly with good linearity in the range of 5~250 μg/mL, with the correlation coefficients larger than 0.999. The limits of detection (LODs) were further evaluated (1.0~3.2 μg/mL). Under three different spiked level The mean recovery of the target compounds was 91.0%~102% for 4 sugars and the intra-day and inter-day precision were below 5%. 3) Different contents of sugars in different type tobacco leaf were found with the established method. The new method, with the novel pretreatment vial for extraction and the HPLC for separation, can be used for analysis of sugars in tobacco samples.

**Keywords:** sugars; tobacco leaf; ultra high performance liquid chromatography (UPLC); screening evaluation; pretreatment

随着烟草基因组计划重大专项第 2 个五年计划的开展,在未来 5 年,将以精准育种为核心,以突破品质为关键,着力实现从传统育种手段向以工厂化育种、模块化育种为主体的精准育种的跨越。其中基因编辑素材的筛选评价则是“优质低害”烟草品种培育的重要技术手段。糖类物质是决定烟叶品质好坏的关键化学成分,对烟叶品质有着重要影响<sup>[1-2]</sup>,一直以来都是烟草化学检测的重要项目<sup>[3-4]</sup>,也是国内外烟草行业的质量控制内容<sup>[5-6]</sup>。

糖的测定方法主要有比色法<sup>[7-9]</sup>、流动分析法<sup>[10-12]</sup>、光度法<sup>[13-14]</sup>、气相色谱法(GC)<sup>[15-16]</sup>、毛细管电泳法(CE)<sup>[17-18]</sup>和高效液相色谱法(HPLC)<sup>[19-22]</sup>等。由于比色

**基金项目:**云南中烟工业有限责任公司重点项目(编号:2018JC06)

**作者简介:**刘欣,男,云南中烟工业有限责任公司助理研究员,博士。

**通信作者:**李晶(1982—),女,云南中烟工业有限责任公司助理研究员,博士。E-mail:lijing\_1107@163.com

**收稿日期:**2018-09-26

法、流动分析法和光度法只能测定糖的总量;GC法需要衍生化前处理,操作步骤复杂;液相色谱法由于前处理简单,分离效率高,检测灵敏度高,成为烟草糖类物质分析的重要分析手段,如烟草行业标准方法<sup>[23]</sup>。但是该方法色谱分析时间较长(>30 min),前处理步骤较多,无法较好地满足大量样品的快速分析筛选评价需求,因此亟待开发快速分析方法及与之相匹配的前处理方法。

针对以上测定需求,本研究拟开展样品前处理批量化改进处理研究,设计新型样品萃取瓶,同时采用超高效液相色谱进行分离检测,旨在为新鲜烟叶中4种糖类物质(果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖)提供准确可靠、操作简单的快速筛选评估技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器设备与试剂

超高效液相色谱系统:ACQUITY UPLC型,配置ACQUITY 蒸发光散射检测器 ELSD,美国 Waters 公司;

超纯水处理系统:Milli-Q50型,美国 Millipore 公司;

电子分析天平:AE240型,精确0.0001g,美国 Mettler 公司;

超声波振荡器:SK5200型,上海科导超声仪器有限公司;

D-果糖、D-葡萄糖、麦芽糖、蔗糖:纯度>99%,美国 Supelco 公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,美国 Fisher 公司;

三乙胺:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

5个基因编辑烟草样品:基因编辑育种工厂;

3个正常烟草样品:云南中烟工业有限责任公司技术中心。

### 1.2 试验方法

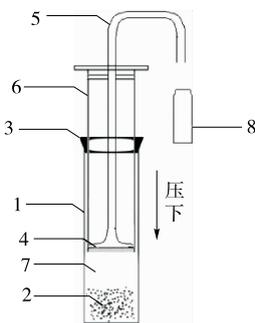
1.2.1 标准溶液配制 糖类物质(果糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖)标准溶液:分别准确称取0.5g的果糖、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖于100mL的容量瓶中,用80%的甲醇水溶液溶解并定容到刻度,配制成浓度为5.0mg/mL的4种糖物质的储备液,于4℃下避光保存;使用时分别移取合适体积的储备液,用80%甲醇稀释成一系列所需浓度的标准工作液。

1.2.2 色谱分析条件 分析柱为 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相为75%的乙腈(内含0.2%三乙胺),流速0.2 mL/min,柱温35℃;进样量5.0 μL;ELSD的漂移管温度65℃,载气为氮气,载气压力241.32 kPa。

#### 1.2.3 前处理方法

(1) 萃取瓶装置:新型萃取瓶装置主要解决适应于高通量分析的前处理技术,结构包含外套管(含密封圈)和内套管(带0.45 μm过滤筛板)。进行样品前处理时,样品直接加入外套管中,加入萃取溶剂后利用密封圈将内套管固定在管口;进行样品超声处理后,直接压入内套管,溶液通过筛板过滤和内套管相连接的弯管流出,使样品过滤和转移为一步,相较于平常前处理工作(利用注射器取样,放置过滤头,将滤

液吸入注射器,过滤头过滤,转移溶液至色谱瓶的多步骤操作)具有较强的优势,可以大大提高前处理效率;另外可以避免操作人员的人为误差,达到前处理的平行性和稳定性。萃取瓶设计:实验室前期设计了一种集样品提取、过滤净化和转移装瓶为一体,可以简化操作步骤,保持样品处理一致性的新型样品萃取瓶,结构见图1。



1. 样品萃取外管 2. 样品 3. 密封圈 4. 过滤筛板 5. 转移弯管  
6. 过滤内套管 7. 提取溶剂 8. 样品收集瓶

图1 新型样品萃取瓶结构示意图

Figure 1 Novel sample extraction vial

(2) 前处理方法:基因编辑烟叶样品,去除主干后,105℃杀青30min,60℃恒温烘干至恒重,粉碎;正常烟草样品按YC/T 381—2010的方法制备。

将样品萃取瓶的外套管固定在离心管架上,称取0.25g样品到外套管中,加入25mL的80%甲醇,然后把萃取瓶的内套管卡在外套管的口部,并利用密封圈进行固定,以防止萃取时萃取液的溅出。对外套管种的样品进行超声萃取,恒温超声35min。

萃取完毕,取出装置,直接下压在瓶口处的内套管,萃取液直接通过内套管的筛板进行过滤,并进入到管内部,过滤的滤液从弯管管口直接流出,用色谱瓶直接进行收集即可供色谱进样,操作一步实现样品的过滤和转移。

### 1.3 数据处理

数据采用 Empower 2 数据工作站进行处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件

对烟草样品中的糖一般采用水<sup>[24]</sup>、水—甲醇<sup>[25]</sup>、水—乙腈提取<sup>[22]</sup>,如果利用水来提取烟草,由于提取液中存在大量的酸性物质(如柠檬酸、酒石酸等),会导致蔗糖发生水解,从而影响检测的准确度<sup>[26]</sup>;据文献<sup>[25]</sup>报道,采用含有甲醇的水溶液可以在一定程度上避免提取液中二糖和多糖发生水解反应,经试验采用体积比为80%的甲醇水溶液为最优条件。因此本试验中不再优化提取溶剂,直接采用文献<sup>[25]</sup>优化的提取溶剂比例。

考虑到加热回流提取操作麻烦,所耗时间较长,不予采用;振荡萃取和超声萃取两相比较,超声萃取的效率更优,因此本试验中选用超声萃取为最佳提取方式。

试验表明,称取0.25g烟草样品,加入80%的甲醇25mL,超声萃取30min以上,烟草样品中水溶性糖可提取

完全(>98%)。因此本试验中选择用 80% 的甲醇超声萃取 35 min。

## 2.2 色谱条件优化

ACQUITY UPLC BEH Amide 氨基柱是糖类物质分析的常用色谱柱,根据试验需要,选用水和乙腈作为流动相,随着乙腈比例增大,4 种糖类物质的峰型可以得到有效改善;试验发现在流动相中添加三乙胺作为改进剂还可抑制色谱峰拖尾。试验表明,用 75% 的乙腈(含 0.2% 的三乙胺)为流动相,等度洗脱即可让待测组分达到基线分离。综上所述,结合分离时间和分析效果,本试验中优选色谱分析条件为:75% 的乙腈(含 0.2% 三乙胺)水溶液等度分离。

ELSD 是糖类物质检测的常用检测器,由于糖类物质的非挥发性,经过 ELSD 会产生响应的信号,因此合适的载气量和漂移管温度是 ELSD 检测器的关键优化参数。载气量的大小会影响雾化器中液滴的形成,影响 ELSD 检测器的噪音和检测灵敏度;漂移管温度影响了流动相和检测物质的气化程度,会直接影响检测效果和检测限。通过信噪比比较和信号值对比,本研究优选的检测参数为:漂移管温度 65 °C,氮气作为载气,压力 241.32 kPa。

## 2.3 方法线性关系,检出限和定量限

利用优化色谱条件进行分离,图 2 为 4 种糖的标准溶液

表 1 4 种糖的标准曲线方程、线性范围、相关系数和检出限<sup>†</sup>

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits and quantification limit of 4 analytes

组分	回归方程	线性范围/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	相关系数	检测限/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	定量限/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
果糖	$\lg A = 4.22 \lg C - 1.52$	2~300	0.999 5	1.2	4.0
葡萄糖	$\lg A = 4.36 \lg C - 0.67$	2~250	0.999 6	1.0	3.4
蔗糖	$\lg A = 3.87 \lg C + 1.15$	4~400	0.999 8	2.1	4.5
麦芽糖	$\lg A = 3.50 \lg C - 0.55$	5~400	0.999 5	3.2	4.8

<sup>†</sup> A 为峰面积;C 为分析物浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.4 方法验证实验

在需要考察的样品中进行标准溶液添加(样品含量的 0.5,1.0,1.5 倍),进行加标回收率试验,利用优化的方法进行前处理,并按选择的色谱条件进样分析,每个样品进行 7 次平行测定,4 种糖的回收率为 91.0%~102.0%,说明方法回收率较为理想,可以进行烟草中糖类物质的测定分析;考察方法的重复性( $N=7$ ),4 种糖类物质的日内精密度的 1.2%~2.5%,日间精密度的 2.0%~3.0%,综上,方法重复性较佳,稳定性较好,适合实际样品检测。

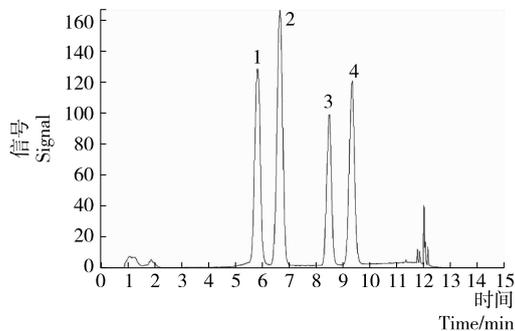
## 2.5 实际样品分析

选取 5 个基因编辑烟叶样品(1# 为水培成苗期,2# 为水培现蕾期,3# 为水培开花期,4# 为水培结实期,5# 为水培病化烟苗)以及正常烟叶样品 3 个(6#~8#),按照优化的前处理方法和色谱条件进行分离检测,图 3 为某水培成苗期新鲜烟叶实际样品色谱图。

从表 2 中可以发现,在苗期,烟株叶面较小,光合能力较弱,光合产物主要供应烟株生长发育,因此蔗糖等化合物基本处于累计状态;成熟期,大量淀粉累计于烟叶,还原糖等急剧升高。而水培病化烟苗样品(5#),果糖和葡萄糖含量是

色谱分析图。从图 2 可看出,4 种糖类物质峰型较好,达到基线分离,分析时间大大缩短,与目前的烟草行业标准相比,每个样品色谱分离时间缩短了 3 倍。

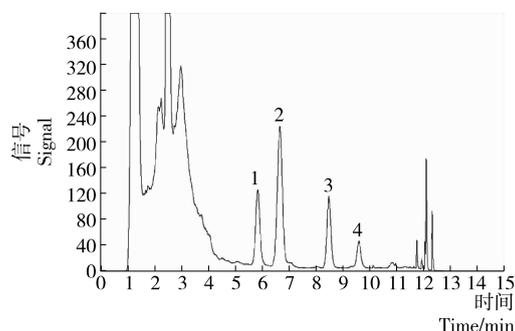
配制系列不同浓度的标准溶液,在选定色谱条件下进样 5  $\mu\text{L}$ ,根据测得的峰面积对糖的浓度( $\text{mg}/\text{mL}$ )进行线性回归,得到回归方程,结果见表 1。由表 1 中可以发现,4 种糖类物质在 5~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时具有较好的线性,线性相关系数均>0.999,检测限为 1.0~3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,可以满足烟草样品中 4 种糖类物质的快速分析。



1. 果糖 2. 葡萄糖 3. 蔗糖 4. 麦芽糖

图 2 4 种糖标准溶液色谱图

Figure 2 The chromatogram of the standards



1. 果糖 2. 葡萄糖 3. 蔗糖 4. 麦芽糖

图 3 水培成苗期新鲜烟叶样品色谱图

Figure 3 The chromatogram of a real sample in seedling stage obtained from hydroponics

异于同期的烟苗的(1#~4#),可能是代谢通路出现差异后,导致碳氮代谢等基础代谢发生变化,可以进行后续的深入分析。结果表明:利用建立的方法可以对烟苗期以及正常生长的新鲜烟叶中糖类物质进行分析检测。方法前处理简单操作,分析时间大大缩短,容易实现批量分析,可以应用于大量基因编辑样品筛选评价以及后续烟叶样品的检测分析。

表2 烟草样品中4种糖的检测结果

Table 2 The results of the contents of 4 analytes in the real tobacco samples mg/g

样品	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖
1	9.13	14.93	70.26	8.22
2	2.17	2.64	31.11	1.89
3	3.20	5.29	25.24	5.37
4	3.67	3.96	21.80	1.58
5	21.28	17.69	47.47	4.82
6	65.90	50.50	8.20	9.50
7	90.30	70.20	7.00	8.70
8	82.30	89.50	12.40	9.30

### 3 结论

鉴于糖类物质对于烟草生长情况和品质的重要关系,本研究以基因编辑工厂化育种样品为考察对象,以正常烟苗样品为参照,立足于大量样品快速分析的需求,针对目前方法存在的问题和缺点开发了一种新鲜烟叶中糖类化合物的快速检测方法。结果表明:通过前处理装置的研发和建立,可以大大简化前处理步骤,提高前处理效率,并保证了样品处理的稳定性和平行性;利用超高效液相色谱分析,4种糖类物质能在10 min内达到基线分离,和行业标准相比色谱分析效率提高3倍,新建立的方法的精密度、回收率均可满足烟草样品分析的需求。下一步将进一步应用于烟草基因编辑工厂化育种的评价流程中,扩大样本量的检测,汇总数据,总结规律,为基因编辑功能研究提供重要数据支持和技术手段。

#### 参考文献

- [1] 苏贤坤,陈松,张国平.不同烤烟品种叶片光合特性和相关酶活性的叶位差异性分析[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2009,35(5):537-542.
- [2] 孟祥东,赵铭钦,瞿永生,等.烤烟农艺性状与经济指标间的灰色关联度分析[J].甘肃农业大学学报,2009,44(5):67-71.
- [3] 张广富,赵铭钦,韩富根,等.烤烟净光合速率与生理生态因子的关系[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2011,37(2):187-192.
- [4] 张静,赵正雄,李宏光,等.红花大金元和“K326”烟苗生育及其生理指标差异比较[J].云南农业大学学报:自然科学版,2008,23(5):599-602.
- [5] 魏玉磊.烟草中糖对主流烟气成分的影响研究[J].食品工业,2010(3):62-64.
- [6] 刘仕民,程传玲,宋辉,等.烟草中水溶性总糖与还原糖的分析研究进展[J].广东化工,2013,40(21):87-88.
- [7] 李世勇,王芳,邵学广.最小二乘支持向量回归与偏最小二乘回归建立烟草总糖 NIR 预测模型比较[J].烟草科技,2006(11):45-48.
- [8] 罗志刚,曾满枝,凌晨,等.3,5-二硝基水杨酸比色法测定烟草中水溶性总糖[J].中国烟草科学,2000(2):40-42.
- [9] 陈勇,陶德欣,鲁黎明.DNS法测定烟草还原糖条件的优化[J].

江苏农业科学,2011(5):405-407.

- [10] 夏骏,陆扬,苏燕,等.烟草水溶性糖近红外定量模型中光谱范围选择方法的研究[J].中国烟草学报,2015,21(2):19-22.
- [11] 赵海娟,陈伟华.不同连续流动分析仪在烟草化学分析中的应用比较[J].中国西部科技,2012(10):33-34.
- [12] 段凯,姬厚伟,刘剑,等.贵州复烤片烟中水溶性糖和烟碱近红外速测定量模型的建立[J].安徽农业科学,2017,45(15):79-82.
- [13] 王东丹,李天飞,吴玉萍,等.近红外光谱分析技术在烟草化学分析上的应用研究[J].云南大学学报:自然科学版,2001,23(2):135-137.
- [14] 何智慧,练文柳,吴名剑,等.声光可调-近红外光谱技术分析烟草主要化学成分[J].分析化学,2006,34(5):702-704.
- [15] 陈熠熠,赵瑜,杨华武,等.离线热解-热脱附-气相色谱-质谱法用于研究烟草中主要糖类对挥发性成分的影响[J].理化检验:化学分册,2013,49(5):505-511.
- [16] 蔡凯,向章敏,张婕,等.气相色谱法同时测定初烤烟叶中的4种水溶性糖[J].分析试验室,2012,31(1):91-94.
- [17] 马强,何友昭,肖协忠,等.烟草中糖的毛细管区带电泳分离[J].色谱,2002,20(3):230-232.
- [18] 刘少民,宋立楠,张太森,等.烟草中糖类物质的高效毛细管电泳-安培检测研究[J].分析化学,2000,28(10):1233-1236.
- [19] 黄菲,黄翼飞.高效液相色谱法测定烟草及烟草制品中的三种水溶性糖[J].中国烟草科学,2012,33(2):47-51.
- [20] 孙雨安,王国庆,张应军,等.高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中水溶性糖[J].分析科学学报,2004,20(5):531-533.
- [21] 苏轶,江安庆,逯平杰,等.超声辅助萃取 HPLC 法测定烟草中蔗糖、果糖、葡萄糖含量[J].安徽农业科学,2011,39(24):14988-14989.
- [22] 程勇,李庆廷,李剑政,等.Prevail 糖柱-HPLC-ELSD 法测定烟草中水溶性糖[J].烟草科技,2010(3):32-37.
- [23] 国家烟草专卖局.YC/T 381—2010 烟草及烟草制品 葡萄糖、果糖、蔗糖的测定 高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2010:1-6.
- [24] 张弘韬,郝辉,邵明,等.烟草中水溶性糖的分析方法研究[J].安徽农业科学,2010,38(2):718-719.
- [25] 刘和平,周光雄,许彦,等.HPLC-ELSD法测定不同储存时间党参药材中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量[J].中国医药导报,2017,14(12):138-141.
- [26] 何育萍,彭军仓,杨芳,等.萃取液和标准制备液对烟草中葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖含量测定的影响[J].烟草科技,2014(3):42-45.