

流动相和流速对高效液相色谱分析果糖嗪的影响

程传玲¹, 宋辉¹, 汪文良², 王建民¹

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 红云红河烟草(集团)有限公司 红河卷烟厂, 云南 红河 652300)

摘要:采用高效液相色谱方法,考察了流动相和流速对果糖嗪定性分析结果的影响.结果表明在确定 Waters Carbohydrate Analysis 为分离柱,检测波长为 275 nm,进样量为 10 μ L 条件下,流动相为乙腈与水,其体积比为 80:20,流速为 1.0 mL/min 时,定性分析效果最佳.

关键词:果糖嗪;高效液相色谱分析;流动相;流速

中图分类号:O656.22 文献标志码:A DOI:10.3969/j.issn.1004-1478.2012.04.017

The effect of mobile phase and flow rate on the qualitative analysis of fructosazine with high performance liquid chromatography

CHENG Chuan-ling¹, SONG Hui¹, WANG Wen-liang², WANG Jian-min¹

(1. College of Food and Bioeng., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China;

2. Honghe Cigarette Factory, Hongyun Honghe Tobacco (Group) Co., Ltd., Honghe 652300, China)

Abstract: The effect of mobile phase and flow rate on the qualitative analysis of fructosazine with high performance liquid chromatography was investigated. The results showed that the effect of qualitative analysis was the best using acetonitrile and water as mobile phase (80:20, V/V) and flow rate 1.0 mL/min under condition as follows: Water Carbohydrate Analysis works as separation column, detection wavelength is 275 nm, and the volume of injection is 10 μ L.

Key words: fructosazine; high performance liquid chromatography analysis; mobile phase; flow rate

0 引言

果糖嗪在多种植物中均有存在^[1-3],是烟草中一类重要的潜香类化合物.果糖嗪在烟草中的含量虽然比较低(质量分数 $\leq 0.1\%$)^[4],但是对卷烟感官品质有显著的影响,需要对其进行系统的研究.国外关于果糖嗪在烟草上的应用研究,出于商业保

密的原因,一直未予公开,只有一些合成和物化性质的基础性研究成果.国内没有烟草中果糖嗪的分析方法,而对脱氧果糖嗪的分析方法报道较多,如卢斌斌等^[1]、樊瑛等^[5]采用的高效液相色谱法.黎艳玲等^[6]用硅烷衍生化后用 GC/MS 法分析糖胺反应中的脱氧果糖嗪,但因衍生化不完全,未反应的硅烷化试剂使得质谱离子源被硅烷基覆盖,导致质

收稿日期:2011-12-21

基金项目:河南省科技厅科技攻关(重点项目)(102102210135)

作者简介:程传玲(1977—),女,河南省唐河县人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为烟草化学和烟气分析.

谱响应信号发生改变,该方法不适宜作为果糖嗪和脱氧果糖嗪的分析方法.

本文拟参考文献[1,5]的方法,采用高效液相色谱方法对果糖嗪进行定性分析,选取 Waters Carbohydrate Analysis 柱(10 μm,3.9 mm×300 mm),检测波长 275 nm,进样量 10 μL,改变流动相的比例和流速的大小,从而对其进行优化选择.

1 实验

1.1 材料与设备

材料:果糖嗪(自制,纯度 95% 以上);乙腈(色谱纯),天津市康科德科技有限公司产;超纯水(HPLC 用水),郑州永盛净化设备有限公司产.

设备:Waters 1525 Binary HPLC Pump(Waters UV/visible 检测器)高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产;Waters Carbohydrate Analysis 柱(10 μm,3.9 mm×300 mm),微量注射器(10 μL),上海天美科学仪器有限公司产;电子天平,瑞士梅特勒托利多公司产.

1.2 溶液制备方法

取 100 mg 果糖嗪标样溶解于 20 mL 容量瓶,用超纯水定容至刻度,作为母液,浓度为 5 mg/mL.从母液中吸取一定量溶液依次稀释,配制成浓度为 0.01 mg/mL 的果糖嗪三级标液,作为本实验所采用的标准溶液.

2 结果与讨论

分别在 1.0 mL/min 和 2.0 mL/min 的流速下,改变乙腈与水的比例(本实验中的比例均指体积比),对果糖嗪进行高效液相色谱分析.采用标准加入法与空白对照的方式确定样品中果糖嗪的定性位置.

采用全析因的实验设计方法,流速的水平为 1.0 mL/min 和 2.0 mL/min,乙腈与水的体积比从 75:25 调整到 90:10,得到的结果见图 1—图 8.图中后一个峰,通过核磁共振和高分辨质谱确定为果糖嗪,前一个峰为杂质峰.

由图 1 可知,当流速为 2 mL/min,乙腈:水 = 75:25 时,在 6.082 min 出峰.该条件下出峰时间太短,分离不够,样品峰将出现严重重叠,不适宜作为样品的分析条件.

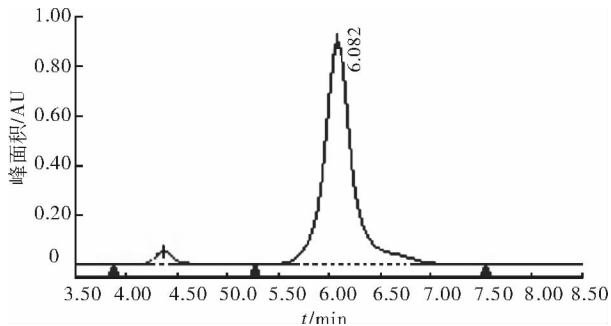


图 1 流速 2 mL/min,乙腈:水 = 75:25 时果糖嗪的 HPLC 图

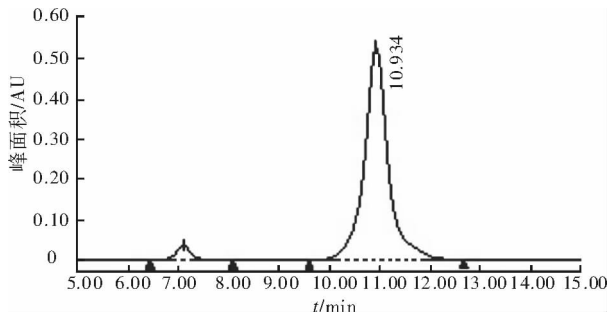


图 2 流速 2 mL/min,乙腈:水 = 80:20 时果糖嗪的 HPLC 图

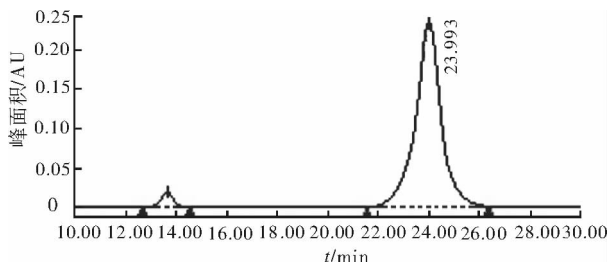


图 3 流速 2 mL/min,乙腈:水 = 85:15 时果糖嗪的 HPLC 图

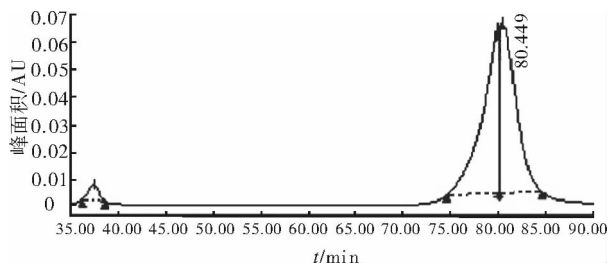


图 4 流速 2 mL/min,乙腈:水 = 90:10 时果糖嗪的 HPLC 图

80:20 时,在 10.934 min 出峰.该条件下出峰时间稍好,但分离不够,样品峰将出现部分重叠,不适宜作为样品的分析条件.

由图 3 可知,当流速为 2 mL/min,乙腈:水 = 85:15 时,在 23.993 min 出峰.该条件下出峰时间较好,分离较好,较适宜作为样品的分析条件.

由图 2 可知,当流速为 2 mL/min,乙腈:水 =

由图4可知,当流速为2 mL/min,乙腈:水 = 90:10时,在80.449 min出峰.出峰太慢,所需时间太长,溶剂消耗太多.

相关外文文献中推荐的条件为流速2 mL/min,乙腈:水 = 85:15,但所用的糖柱型号有差别.由上述的实验可以知道,随着水的比例上升,出峰时间提前,分离度减小,分析时间变短.但是对于样品而言,出的峰会比较密集,分不开,无法进行定性或定量分析.因此,在2 mL/min的流速下,85:15和80:20这2个比例比较合适,尤其以85:15更为优越,与文献吻合.出峰时间在24.00 min左右,可以使样品中的各个峰分得比较开.但2 mL/min流速下乙腈消耗稍多,相对地提高了实验的成本;且流速偏大,对柱子有较大的损害,不适宜大量样品的分析.所以本文降低流速,对其进行研究.

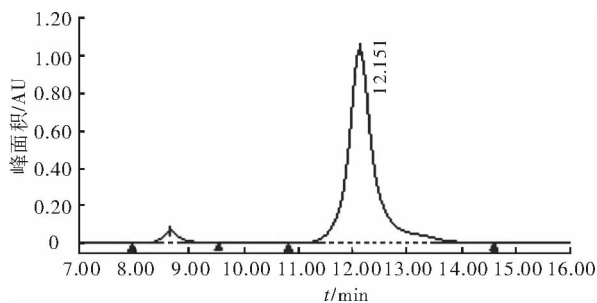


图5 流速1 mL/min,乙腈:水 = 75:25时果糖嗪的HPLC图

由图5可知,当流速为1 mL/min,乙腈:水 = 75:25时,在12.151 min出峰.该条件下出峰时间太短,分离不够,样品峰出现严重重叠,不适宜作为样品的分析条件.

由图6可知,当流速为1 mL/min,乙腈:水 = 80:20时,在22.223 min出峰.该条件下出峰时间较好,分离较好,适宜作为样品的分析条件.

由图7可知,当流速为1 mL/min,乙腈:水 = 85:15时,在50.494 min出峰.该条件下虽然分离完全,但出峰时间较长,不太适宜作为样品的分析条件.

由图8可知,当流速为1 mL/min,乙腈:水 = 90:10时,在接近100 min的时间内均未出现样品峰(前面很早出的峰有可能是柱子里残存的杂质),通过加大流量的洗脱,出现了样品峰(图中未显示),但时间太长,不适宜作为样品的分析条件.

通过上述实验可以发现:在流速为2 mL/min,

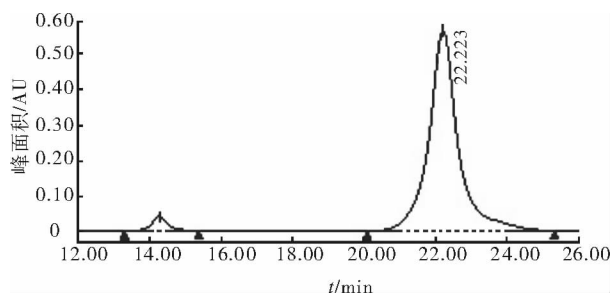


图6 流速1 mL/min,乙腈:水 = 80:20时果糖嗪的HPLC图

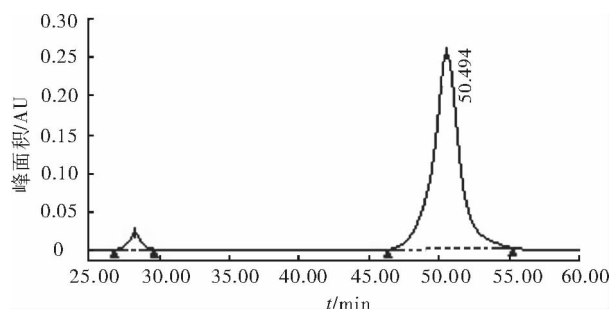


图7 流速1 mL/min,乙腈:水 = 85:15时果糖嗪的HPLC图

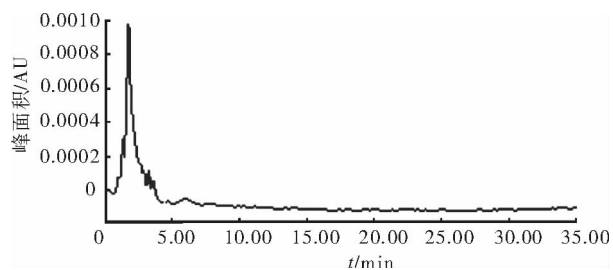


图8 流速1 mL/min,乙腈:水 = 90:10时果糖嗪的HPLC图

乙腈:水 = 85:15的条件下,以及流速为1 mL/min,乙腈:水 = 80:20的条件下结果均较好.出峰时间较为接近,分离效果也很接近.从成本的角度考虑,采用后一种条件可减少乙腈的用量,起到降低成本与危害的双重作用.故本实验采用流速为1 mL/min,乙腈:水 = 80:20的条件作为流动相的最终条件.

为确定上述结论,采取标准加入法验证该条件是否也适宜样品的分析.对烟草中果糖嗪进行超声提取,其工艺为:将1.2 g烟草样品放入50 mL的三角烧瓶中,加入20 mL超纯水进行超声萃取,时间40 min,过滤.取一定量的滤液过微孔滤膜,然后进行高效液相分析.实验结果见图9和图10.

由图9和图10可见,加标实验结果进一步验证了烟叶样品中含有微量的果糖嗪,且在上述优化条件下样品中无其他物质对果糖嗪的定性产生干扰.

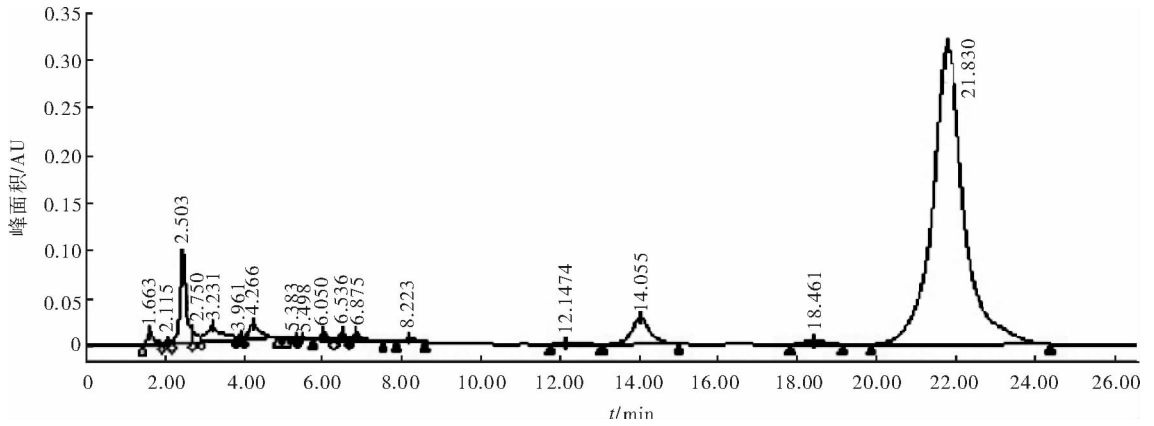


图 9 流速 1 mL/min, 乙腈: 水 = 80: 20 样品加标时果糖嗪的 HPLC 图

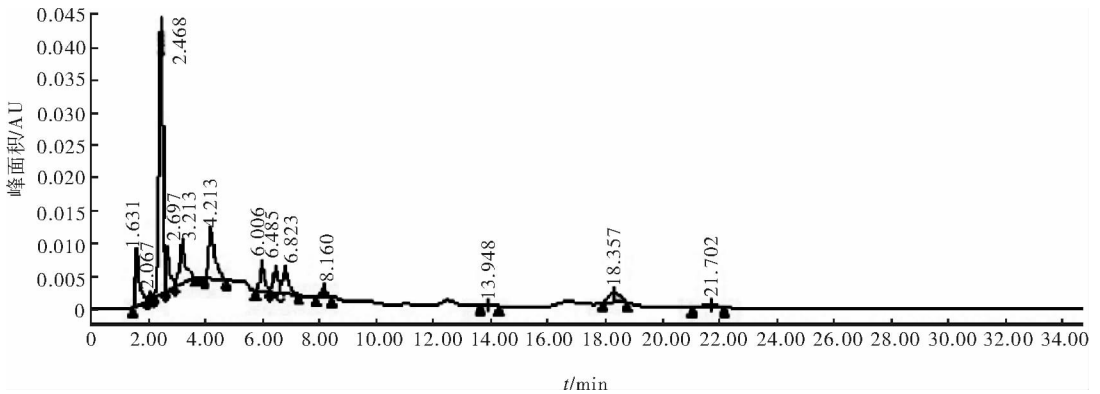


图 10 流速 1 mL/min, 乙腈: 水 = 80: 20 样品不加标时果糖嗪的 HPLC 图

最终确定流动相的条件为:分离柱选用 Waters Carbohydrate Analysis 柱(10 μm,3.9 mm×300 mm);流动相为乙腈:水 = 80: 20,流速 1.0 mL/min;检测波长 275 nm;进样量 10 μL.

3 结论

本文通过考察流动相和流速对果糖嗪定性分析的影响,确定了最佳分析条件:当分离柱为 Waters Carbohydrate Analysis 柱(10 μm, 3.9 mm × 300 mm),检测波长为 275 nm,进样量为 10 μL 条件下,采用流动相为乙腈:水 = 80: 20,流速为 1.0 mL/min 效果最佳.通过初步的实验可知,果糖嗪在烟草中的含量很低.

参考文献:

[1] 卢斌斌,李鹏,谢剑平,等.烟草及烟草制品中脱氧果

糖嗪含量分析[J].香料香精化妆品,2009,3(6):5.

[2] 李琦,叶韵华,闫爱新,等.三 七 中 2-(1',2',3',4'-四羟基丁基)-6-(2',3',4'-三羟基丁基)-吡嗪的分离、鉴定及药理活性研究[J].高等学校化学学报,2001,22(11):1824.

[3] 秦文娟,马立斌.掌叶半夏化学成分的研究[J].中草药,1995,26(1):3.

[4] Fujii S,Kikuchia R,Kushida H. Formation of fructosazine [J].J of Organic Chem,1966,31(7):2239.

[5] 樊瑛,孟昭宇,陆舍铭,等.固相萃取-高效液相色谱法测定烟草中的两种多羟基吡嗪异构体[J].分析试验室,2007,26(12):35-38.

[6] 黎艳玲,杨华武,周宇,等.硅烷化衍生-气相色谱/质谱法分析糖氨反应中的 2,6-脱氧果糖嗪[J].色谱,2006,24(2):212.