

烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸的测定

邓梅忠, 陈笃建, 黄胜翰, 周跃飞

(福建中烟工业有限责任公司 技术中心, 福建 厦门 361012)

摘要:建立了高效液相色谱测定烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸含量的方法:采用乙醇为萃取剂和稀释剂,样品经振荡提取后,以 C_{18} (100 mm×3.9 mm,5 μ m)为色谱柱,甲醇+0.05%磷酸水溶液(6:94)为流动相等度洗脱,用二极管阵列检测器测定,检测波长为272 nm.实验结果表明:3,4,5-三羟基苯甲酸在0.1~10.0 mg/L范围内线性相关系数为0.999 4,检出限为1.01 μ g/g,加标回收率为93.1%~103.2%, $RSD < 5\%$ ($n=5$).该方法具有灵敏度高、准确性好、操作简易等优点,适用于不同类型烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸的含量测定.

关键词:高效液相色谱;烟用香精香料;3,4,5-三羟基苯甲酸

中图分类号:TS411.2 文献标志码:A DOI:10.3969/j.issn.2095-476X.2014.04.009

Determination of 3,4,5-trihydroxy benzoic acid in tobacco essence and flavor

DENG Mei-zhong, CHEN Du-jian, HUANG Sheng-han, ZHOU Yue-fei

(Technology Center of China Tobacco Fujian Industrial Co., Ltd., Xiamen 361012, China)

Abstract: A method for the detection of 3,4,5-trihydroxy benzoic acid in tobacco essence and flavor was developed by using high performance liquid chromatography. After oscillate-extraction by ethanol, the samples were separated by a C_{18} column (100 mm×3.9 mm,5 μ m), using methanol and 0.05% phosphoric acid (6:94) as mobile phases by isocratic elution, and detected by diode array detector with the wavelength of 272 nm. The experimental results showed that: within the range of 0.1~10.0 mg/L, the linear correlation coefficient for 3,4,5-trihydroxy benzoic acid was 0.999 4, the low detection limit was 1.01 μ g/g, the recovery was 93.1%~103.2%, the $RSD < 5\%$ ($n=5$). The method was sensitive, accurate and easy-controlled, and it was suitable for quantitative determination of 3,4,5-trihydroxy benzoic acid in different types of tobacco essence and flavor.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); tobacco essence and flavor; 3,4,5-trihydroxy benzoic acid

0 引言

3,4,5-三羟基苯甲酸属于多酚类化合物,具有抗氧化、抗自由基等多种生物学活性^[1-2],该化合物与其衍生物常被用作食品抗氧化剂.烟草行业常采用天然植物提取物作为烟用香精香料,但提取物中的3,4,5-三羟基苯甲酸呈涩味,对人的眼睛、皮肤

有刺激性,因此会增加卷烟烟气的刺激感,对卷烟感官品质产生不良影响.

目前,对3,4,5-三羟基苯甲酸的分析方法主要有分光光度法、气相色谱法、毛细管电泳法和高效液相色谱法 HPLC (high performance liquid chromatography)^[3-6],其中以液相色谱法用于分析居多,但这些测试方法的应用主要集中在食品、医药等领

域,尚未拓展到烟用香精香料.由于基体的差异性和复杂性,以往的测试方法不能直接应用于分析烟用香精香料的3,4,5-三羟基苯甲酸.因此为了对烟用香精香料的品质进行有效监控,本实验拟建立HPLC测定烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸含量的方法,旨在为控制卷烟3,4,5-三羟基苯甲酸含量、提高卷烟感官品质提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:分析用标准品3,4,5-三羟基苯甲酸(CAS:149-91-7)(纯度98%),甲醇、乙醇(HPLC级),百灵威化学试剂有限责任公司产;磷酸(分析纯),上海国药集团产.

仪器:Waters Acquity液相色谱仪,配DAD检测器,Waters公司产;Luna HPLC C₁₈色谱柱(100 mm × 3.9 mm, 5 μm),菲罗门公司产;AG104电子天平(感量0.000 1 g),瑞士Mettler-Toledo仪器公司产;T660/H型超声波振荡器,德国ELMA公司产;Human型超纯水系统,Pgeneral公司产;0.45 μm微孔有机过滤膜,北京颇赛科技发展有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 称取0.5 g烟用香精香料,置于50 mL锥形瓶中,加入10 mL乙醇,振荡萃取20 min

后静置3 min,取2 mL上层清液用0.45 μm滤膜过滤,对滤液进行HPLC分析.

1.2.2 高效液相色谱条件 进样体积10 μL;流动相为甲醇+0.05%磷酸水溶液(6:94);等度洗脱,流速0.5 mL/min;柱温30 ℃;检测器为DAD检测器,检测波长272 nm.

1.2.3 标准溶液的配制 准确称取3,4,5-三羟基苯甲酸标准品50 mg,用超纯水溶解后定容于100 mL棕色容量瓶中,制备成500.0 mg/L标准储备液;标准使用液的配制:量取上述储备液适量,配制成0.1 mg/L,0.5 mg/L,1.0 mg/L,5.0 mg/L和10.0 mg/L的标准使用液备用,按照上述色谱条件进行HPLC测定.

1.2.4 样品分析 在相同条件下,分别将标准液和样品萃取液注入HPLC分析仪中,采用标样加入和保留时间对照法定性,外标法定量.

2 结果与讨论

2.1 HPLC条件优化

参照文献[3-6],选择C₁₈柱作为分析柱,甲醇+0.05%磷酸水溶液作为流动相,并设定了高效液相色谱分析条件(1.2.2).在此条件下,标准样品及实际样品中的3,4,5-三羟基苯甲酸分离效果最佳,且响应值较高(见图1和图2).

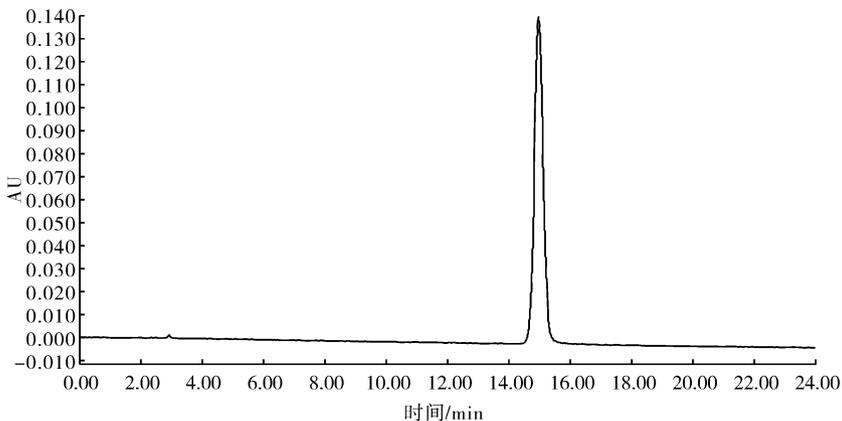


图1 3,4,5-三羟基苯甲酸标准品的色谱图

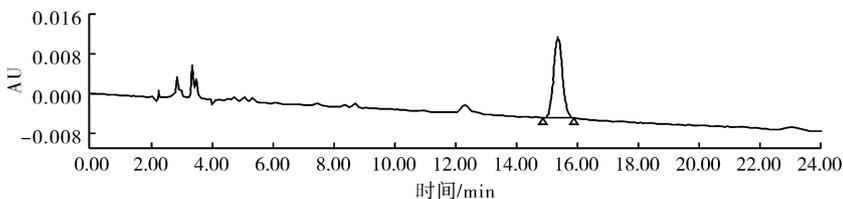


图2 实际样品中3,4,5-三羟基苯甲酸的色谱图

2.2 萃取条件的优化

2.2.1 溶剂的选择 商品化的烟用天然香精香料主要分为酊剂、浸膏和精油,其常用提取体系分别对应为乙醇、石油醚和水.由于3,4,5-三羟基苯甲酸为酸性物质,且在乙醇和水中的溶解度比其他溶剂大,因此实验考察了乙醇、水、10%醋酸和10% NaOH 提取酊剂、浸膏和精油中3,4,5-三羟基苯甲酸的效果.从图3所示不同提取溶剂的效果比较可知,对于不同类型的天然香精香料,4种试剂提取效果不同:对于醇溶性的酊剂和水溶性的精油,4种试剂提取效率接近;对于浸膏,4种试剂提取效率有较大差异,其中浸膏能均一分散在乙醇中,故乙醇对其中的3,4,5-三羟基苯甲酸提取效果最好.在后续实验中,选择乙醇作为萃取剂和稀释剂.

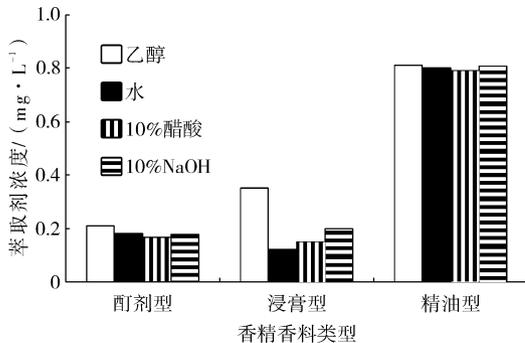


图3 不同提取溶剂的效果比较

2.2.2 萃取时间的优化 为了确定适宜的萃取时间,在其他条件不变的情况下,考察萃取时间(5~30 min)对3类烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸提取效率的影响,结果见图4.由图4可知,萃取时间 ≥ 20 min,3类烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸已完全提取,为节约时间和防止引入更多的干扰成分,选择20 min为最佳萃取时间.

2.2.3 萃取溶剂用量的选择 在萃取时间20 min和其他条件不变的情况下,考察5 mL,10 mL,15 mL,20 mL乙醇的提取效果(见表1).结果发现:随着萃取溶剂用量的增大,3,4,5-三羟基苯甲酸的测定值逐渐增大,当萃取剂用量为10 mL和15 mL时,3,4,5-三羟基苯甲酸的测定值基本一致,说明采用10 mL乙醇可以将烟用香精香料中的3,4,5-三羟基苯甲酸完全提取,因此实验采用萃取溶剂用量为10 mL.

2.3 工作曲线、检出限、重现性和回收率

将5级3,4,5-三羟基苯甲酸的标准工作溶液

经HPLC分析,对目标物的响应面积与其浓度进行回归分析,建立相应的工作曲线线性回归方程,见图5.由图5可知,在设定的浓度范围内,3,4,5-三羟基苯甲酸的响应与其浓度呈良好的线性关系($R^2 = 0.9994$).

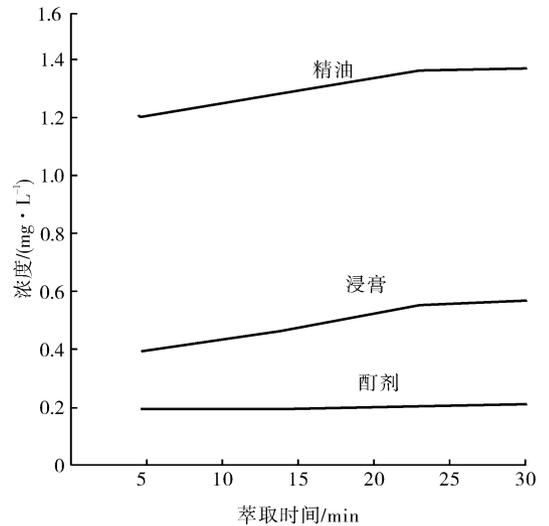


图4 萃取时间对提取效率的影响

表1 萃取溶剂用量的选择 mg/L

萃取体积	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
酊剂	4.0	4.3	4.2	4.3
浸膏	4.9	6.8	7.0	6.9
精油	13.2	16.4	16.2	16.5

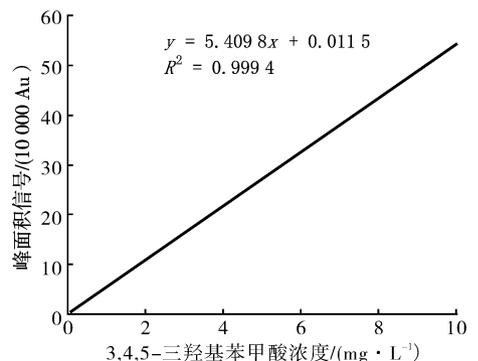


图5 3,4,5-三羟基苯甲酸系列标准溶液线性回归分析图

以在样品中所能测定的信噪比 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 计算出3,4,5-三羟基苯甲酸的测定方法检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为1.01 $\mu\text{g/g}$ 和3.04 $\mu\text{g/g}$.采用本方法分别重复测定同一类型香精香料5次,结果见表2.由表2可见,测定3,4,5-三羟基苯甲酸的相对标准偏差 $RSD < 5\%$,说明本方法重复性较好.

表2 本方法的重复测定同一类型

香精香料实验结果 $\mu\text{g/mL}$

香料类型	测定1	测定2	测定3	测定4	测定5	RSD/%
酞剂	0.20	0.21	0.22	0.20	0.20	4.3
浸膏	0.35	0.33	0.32	0.36	0.34	4.7
精油	0.81	0.85	0.79	0.82	0.80	2.8

以高、中、低不同浓度水平的标准溶液为萃取液,对同一样品进行加标回收率实验. 实验结果见表3. 由表3可知,平均回收率为93.1%~103.2%,说明本法可满足定量分析要求.

2.4 实际样品分析

采用本方法测定了10个烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸的含量,实验结果见表4. 由表4可知:不同类型香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸含量有较大差异,范围为0~122.3 $\mu\text{g/g}$;7[#]—10[#]为茶类香原料,3,4,5-三羟基苯甲酸作为茶多酚的主要活性成分,在茶作物提取物中的含量高;因此茶类香原料中3,4,5-三羟基苯甲酸的含量高于其他类型香精香料.

表3 本方法的回收率实验结果

香料类型	本底值 $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	加标量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率 /%
酞剂	4.2	2.0	100.7
		4.0	95.1
		8.0	98.5
浸膏	6.8	4.0	93.1
		8.0	94.6
		12.0	99.2
精油	16.2	10.0	93.9
		20.0	97.6
		40.0	103.2

3 结论

以乙醇为萃取剂,建立了一种分析烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸含量的HPLC法;样品经振荡提取后,以 C_{18} (100 mm \times 3.9 mm, 5 μm)为色谱柱,甲醇+0.05%磷酸水溶液(6:94)为流动相等度洗脱,用二极管阵列检测器测定,检测波长为

表4 不同香精香料中3,4,5-

三羟基苯甲酸含量水平 $\mu\text{g/g}$

编号	香料类型	测定结果
1 [#]	酞剂	—
2 [#]	酞剂	4.2
3 [#]	浸膏	—
4 [#]	浸膏	6.8
5 [#]	精油	16.2
6 [#]	精油	3.7
7 [#]	酞剂	13.2
8 [#]	精油	20.4
9 [#]	精油	110.7
10 [#]	精油	122.3

注:—表示未检出.

272 nm. 实验结果表明:3,4,5-三羟基苯甲酸在0.1~10.0 mg/L范围内线性关系系数为0.9994,检出限为1.01 $\mu\text{g/g}$,加标回收率为93.1%~103.2%, $RSD < 5\%$ ($n = 5$). 该方法具有前处理简单、灵敏度高、重复性好、分析速度快等优点;将本法应用于分析不同类型烟用香精香料中3,4,5-三羟基苯甲酸的含量,取得了满意的结果.

参考文献:

- [1] 吕喆, 龚守良, 牛凤兰, 等. 3,4,5-三羟基苯甲酸对肿瘤细胞凋亡及细胞周期进程的影响[J]. 吉林大学学报:医学版, 2008, 34(1):90.
- [2] 赵文静, 牛凤兰, 刘作家. 3,4,5-三羟基苯甲酸对H22肝癌小鼠实体瘤的抑制作用及其机制[J]. 吉林大学学报:医学版, 2010, 36(1):79.
- [3] 李俊, 周彩霞, 周小波, 等. 高效液相色谱法测定丁香酸及其杂质含量[J]. 分析科学学报, 2000, 16(2):142.
- [4] 李刚, 杨晓虹, 王艳, 等. 分离和鉴定草本水杨梅中芳香类化合物[J]. 吉林大学学报:医学版, 2006, 32(2):196.
- [5] 郝艳丽, 马颖哲, 牛凤兰, 等. HPLC测定3,4,5-三羟基苯甲酸脂质体药物含量及包封率[J]. 中国药学杂志, 2010, 15(2):101.
- [6] 韩林涛, 黄芳. 高效液相色谱法测定克淋通分散片中没食子酸含量的方法学研究[J]. 湖北中医学院学报, 2008, 10(2):46.