

烟草中9种有机酸的梯度离子色谱法测定研究

胡 静^{*}, 赵瑞峰, 施文庄, 李 峰, 沈光林

(广东中烟工业有限责任公司, 广东 广州 510145)

摘 要: 采用淋洗液自动发生-梯度离子色谱分离, 电导检测法分离测定了烟草中的甲酸、乙酸、乳酸、丙酸、丁酸、苹果酸、丙二酸、草酸和柠檬酸, 并研究了9种有机酸在阴离子交换色谱中的保留行为。以淋洗液自动发生器生成的 KOH 为淋洗液, 样品经提取、过滤稀释后, 在 IonPac AS11-HC 阴离子交换色谱柱上分离, 抑制电导检测器进行检测, 一次进样可同时分离烟草中的常见有机酸。9种有机酸在优化条件下线性良好, 相关系数 $r \geq 0.9986$, 检出限 ($S/N=3$) 为 $0.013 \sim 0.065 \mu\text{g/L}$, 相对标准偏差 (RSD) 为 $0.7\% \sim 3.0\%$, 加标回收率为 $93\% \sim 103\%$ 。方法简单、准确、灵敏度高, 能够满足实际样品的测试要求。

关键词: 离子色谱; 淋洗液自动发生; 测试; 烟草; 有机酸

中图分类号: O657.75; O611.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)10-1171-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.10.018

Determination of Nine Organic Acids in Tobacco by Gradient Ion Chromatography

HU Jing^{*}, ZHAO Rui-feng, SHI Wen-zhuang, LI Feng, SHEN Guang-lin

(China Tobacco Guangdong Industrial Co. Ltd., Guangzhou 510145, China)

Abstract: A direct, simple and sensitive method was developed for the simultaneous separation and detection of nine organic acids, including lactate, acetate, propionate, formate, butyrate, malate, malonate, oxalate and citrate, in tobacco by anion exchange chromatography with eluent autogenerator and suppressed conductivity detection. The retention behaviors of organic acids on the anion exchange column were investigated using potassium hydroxide produced by EGC-II KOH eluent autogenerator as eluent and the optimized gradient elution condition was obtained. The samples were prepared through extraction, filtration and dilution. The separation was performed on a Dionex IonPac AS11-HC anion exchange column. Under the optimized conditions, the calibration curves of all the analytes had good linearity. The detection limits ranged from $0.013 \mu\text{g/L}$ to $0.065 \mu\text{g/L}$, and the relative standard deviations (RSDs) were in the range of $0.7\% - 3.0\%$. The spiked recoveries of nine organic acids were in the range of $93\% - 103\%$. The method was simple, accurate and sensitive, and could meet the actual requirements for the analysis of tobacco samples.

Key words: ion chromatography; eluent autogeneration; detection; tobacco; organic acids

烟叶中的有机酸是碳水化合物代谢中三羧酸循环的中间产物, 与烟草的生长发育、新陈代谢密切相关^[1-2], 可分为挥发性和非挥发性两类。其中挥发性有机酸包括乙酸、甲酸、丙酸等, 挥发性有机酸能产生烟草的香气, 对烟草的影响正相关; 非挥发性有机酸主要有柠檬酸、苹果酸和草酸等二元酸和三元酸, 其含量占有机酸总量的大半以上, 且大部分以盐的形式存在, 与其化合的物质有烟碱、氨以及金属离子钙、钾、钠等。烟草的醇和度与草酸和柠檬酸的比值有关, 比值高则烟草相对醇和。苹果酸、柠檬酸、草酸等有机酸还是卷烟加料的常用成分。同时, 有机酸也是植物合成高级脂肪酸、氨基酸、蛋白质的初级物质, 其对烟草的香气和吃味有重要影响。因此对烟草中有机酸含量的分析具有重要意义。

目前烟草行业测定有机酸的经典方法是将其酯化后进行气相色谱或气相色谱-质谱分析^[3], 但方法存在费时、繁琐和试剂用量大等缺点, 也有报道采用反相高效液相色谱法和离子色谱法测定烟草中的有机酸^[4]。Perini 等^[5]用离子色谱法测定烟草及烟草制品辅助材料中的小分子量羧酸如甲酸、乙酸、丙酸、乳酸; 王娟等^[6]利用离子色谱法测定了卷烟纸中的有机酸根和无机酸根; Qiu 等^[7]利用离子色谱法测定了烟草中的有机酸根离子, 但未采用淋洗液自动发生装置, 且方法存在流动相配制较复杂、

检出限较高等缺点。食品行业中已有采用梯度离子色谱技术测定有机酸^[8-14]的报道。但尚无采用梯度离子色谱法一次进样对烟草中的甲酸、乙酸、乳酸、丙酸、丁酸、苹果酸、柠檬酸、草酸、丙二酸等有机酸进行同时测定的报道。

离子色谱技术已成为分析无机阴、阳离子的首选方法^[15]。本实验利用梯度离子色谱法,一次进样对烟草中的甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸、草酸、丙二酸共9种有机酸进行了同时测定,对于提高卷烟品质、加强烟草质量控制具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器

DIONEX ICS-3000 离子色谱仪(美国戴安公司),EGC-II KOH 淋洗液自动发生装置,ED50A 电化学检测器(电导检测),ASRS-ULTRA II (2 mm) 阴离子自再生抑制器,AS50 自动进样器,Chromeleon 6.8 色谱工作站,BP-210S 型电子天平(感量 0.1 mg,北京赛多利斯公司),HY-5 回旋振荡器(金坛市富华仪器有限公司),Milli-Q Element A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂与标准溶液

有机酸离子的标准溶液分别采用优级纯的乳酸锂、乙酸钠、丙酸钠、甲酸钠、丁酸钠、苹果酸、丙二酸、柠檬酸和草酸钠配成 1 000 mg/L 的标准储备液,于 4 °C 冰箱中保存,用时根据需要将标准储备液稀释成系列混合标准使用溶液。实验用水为超纯水(电阻率为 18.2 MΩ·cm),0.45 μm 微孔滤膜。

1.3 样品制备

按 YC/T 31-1996^[16] 制备试样,并测定水分含量。

准确称取 0.5 g 烟草样品(精确至 0.000 1 g)于 250 mL 磨口三角瓶中,加入 50.0 mL 超纯水,盖上瓶塞,置于振荡器上振荡萃取 30 min。萃取液用定性滤纸过滤,弃去前几毫升滤液,收集续滤液。移取 10.0 mL 滤液于 100 mL 容量瓶中,用纯水稀释定容至刻度,溶液经 0.45 μm 滤膜过滤后进行离子色谱分析。做 5 次平行实验,同时做 1 组空白和回收。

1.4 离子色谱测试条件

阴离子交换柱: IonPac AS11-HC (2 mm×50 mm) 和 AG11-HC (2 mm×250 mm); 柱温: 30 °C; 淋洗液: 1~50 mmol/L KOH; 流速: 0.30 mL/min; 进样量: 25 μL; 抑制器电流: 50 mA。

由于待测有机酸离子对阴离子交换色谱柱 AS11-HC 固定相的亲合力有较大差异,为保证一次进样同时分离 9 种离子并缩短分析时间,采用 EGC-II KOH 淋洗液自动发生装置产生的 1~50 mmol/L KOH 进行梯度淋洗,可在 50 min 内完成测试和色谱柱平衡,梯度淋洗程序见表 1。

表 1 离子色谱同时分析烟草中有机酸的梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution for the analysis of organic acids in tobacco

Time <i>t</i> /min	<i>c</i> _{KOH} /(mmol·L ⁻¹)	Curve*	Description
0.000	1.0	5	Start analysis(开始分析)
8.000	1.0	5	Analysis of weak retention compounds(弱保留组分分析)
28.000	30	5	Analysis of medium retention compounds(中等强度保留组分分析)
35.000	50	5	Analysis of strong retention compounds(强保留组分分析)
40.000	50	5	Purge system(清洗系统)
40.001	1.0	5	Balance system(平衡系统)
50.000	1.0	5	End analysis(结束分析)

* the shapes of gradient elution curves, curve 5 is linear

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

离子色谱测试样品中的水溶性离子时,可直接用纯水提取,经微孔滤膜过滤后进样分析。由于烟草中的有机酸多以结合态存在,与金属离子或有机碱结合成盐,大都能溶于水,仅很少一部分如草酸钙等不溶,因此可用水浸提样品中的盐和游离的有机酸。将 0.5 g 烟草样品以 50 mL 超纯水超声浸提

30 min, 采用此前处理方法测得样品中的草酸结果为游离态草酸含量。

2.2 流动相的选择

梯度淋洗技术是通过改变淋洗液的浓度来改变淋洗强度, 从而在一次进样中完成对不同离子的同时分离。因此, 淋洗液的选择尤为重要, 其基本要求为: 淋洗液经抑制后背景电导低, 且浓度改变后背景波动小; 梯度程序转换时系统平衡时间短。

乳酸、乙酸和甲酸对阴离子交换色谱柱而言是极性相近的弱保留阴离子组分, 为使其得到分离, 必须选用强度较弱的淋洗液。常见的弱淋洗离子有 HCO_3^- 、 OH^- 和 $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, 但 HCO_3^- 易吸收空气中的 CO_2 , 而 CO_2 在碱性溶液中会转变成 CO_3^{2-} , CO_3^{2-} 的淋洗强度较 HCO_3^- 大, 不利于上述弱保留离子的分离。 $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 亦为弱淋洗离子, 但 $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ 的抑制产物为硼酸, 其本底电导比水高。虽然 OH^- 也易吸收空气中的 CO_2 , 但实验采用淋洗液自动发生装置自动生成不同浓度的 KOH , 减少了 OH^- 和空气的接触, 且抑制产物为水, 背景电导较低。因此实验选用 KOH 为最佳流动相。

2.3 梯度洗脱程序的确定

为优化梯度洗脱程序, 研究了不同浓度的 KOH 溶液对各组分保留时间的影响。由于 9 种有机酸根离子在色谱柱上的保留差异较大, 为确保弱保留组分乳酸、乙酸、丙酸、甲酸和丁酸得到良好分离, 需要的 KOH 淋洗液浓度较低, 综合考虑各组分之间的分离度并缩短分析时间, 选择梯度洗脱程序的初始 KOH 浓度为 1 mmol/L。

对于中等保留和强保留的离子(如苹果酸、丙二酸、草酸、柠檬酸), 需要提高淋洗液浓度。因此, 淋洗液浓度在 8~28 min 内, 从 1 mmol/L 升至 30 mmol/L, 以使强保留组分快速洗脱。对于草酸和柠檬酸, 需再次提高氢氧化钾浓度至 50 mmol/L, 随后进行系统的清洗和平衡。具体的洗脱程序见表 1。

2.4 方法的定性定量参数

以各组分的标准贮备液配制系列混合标准溶液, 进行离子色谱分析。根据保留时间定性, 峰面积外标法定量, 得到各组分的线性回归方程及相关系数(见表 2), 标准溶液和烟草样品的色谱图见图 1。

表 2 方法的线性方程、相关系数、检出限、相对标准偏差与回收率

Table 2 Linear equation, correlation coefficient, detection limit, relative standard deviation and recovery of the method

Analyte	Regression equation	<i>r</i>	LOD $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD $s_r/\%$	Recovery <i>R</i> /%
Lactate(乳酸)	$A = 0.244\ 0\rho + 0.001\ 9^*$	0.999\ 5	0.021	2.2	93
Acetate(乙酸)	$A = 0.209\ 8\rho + 0.066\ 0$	0.999\ 6	0.015	3.0	97
Propionate(丙酸)	$A = 0.155\ 8\rho + 0.032\ 3$	0.999\ 9	0.030	2.1	97
Formate(甲酸)	$A = 0.389\ 1\rho + 0.041\ 2$	0.998\ 6	0.013	1.8	103
Butyrate(丁酸)	$A = 0.122\ 7\rho + 0.011\ 4$	0.999\ 8	0.025	1.3	96
Malate(苹果酸)	$A = 0.156\ 8\rho + 0.027\ 8$	0.999\ 9	0.018	0.7	103
Malonate(丙二酸)	$A = 0.268\ 8\rho + 0.070\ 0$	0.999\ 0	0.032	1.3	95
Oxalate(草酸)	$A = 0.474\ 7\rho + 0.038\ 2$	0.999\ 9	0.029	0.9	97
Citrate(柠檬酸)	$A = 0.149\ 5\rho + 0.059\ 4$	0.999\ 6	0.065	1.0	95

* *A*: peak area; ρ : mass concentration($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

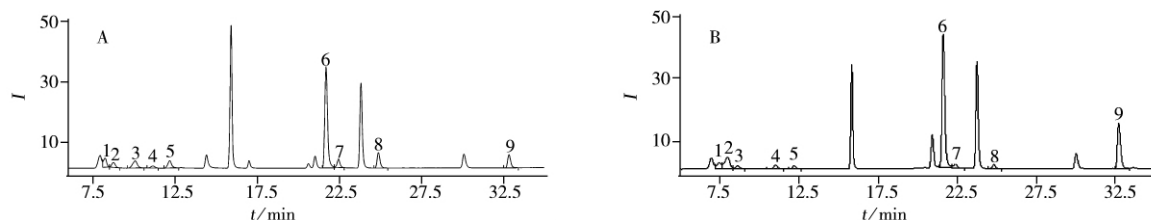


图 1 有机酸混合标准溶液(A)及实际样品(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of organic acid standards mixture(A) and tobacco sample(B)

concentration of standard: 1. lactate(8.0 mg/L); 2. acetate(8.0 mg/L); 3. propionate(1.0 mg/L); 4. formate(10 mg/L); 5. butyrate(1.0 mg/L); 6. malate(20 mg/L); 7. malonate(0.5 mg/L); 8. oxalate(0.5 mg/L); 9. citrate(5 mg/L)

以 3 倍信噪比($S/N = 3$) 计算各组分的检出限为 0.013~0.065 $\mu\text{g/L}$ 。取同一烟草样品, 按照“2.1”方法进行处理后进样测定 5 次, 重复性测试结果见表 2。从表 2 可知, 各有机酸组分的相关系数 $r \geq 0.998\ 6$, 测试的相对标准偏差不大于 3%, 加标回收率为 93%~103%。

2.5 实际样品的分析

按照本研究的样品前处理方法制备样品,在优化的色谱条件下进行测定(见表3)。从表3可知,烟草样品中含量最高的有机酸为苹果酸,其次为柠檬酸等。

表3 烟草样品分析结果
Table 3 Detection results of the tobacco samples

Analyte	Amount <i>w</i> /%				
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Lactate	0.186	0.146	0.052	0.089	0.161
Acetate	0.462	0.431	0.286	0.349	0.309
Propionate	0.033	0.021	0.019	0.094	0.018
Formate	0.016	0.011	0.007	0.036	0.009
Butyrate	0.174	0.147	0.132	0.110	0.144
Malate	3.677	3.666	3.984	3.513	4.442
Malonate	0.091	0.100	0.143	0.128	0.134
Oxalate	0.066	0.048	0.060	0.074	0.065
Citrate	1.633	0.488	0.636	0.764	5.021

3 结 论

本实验探讨了离子色谱同时测定烟草中9种有机酸根离子的分析方法,采用淋洗液自动发生装置产生的浓度为1~50 mmol/L的氢氧化钾溶液进行梯度洗脱,可在50 min内完成对9种有机酸根离子的测定。结果表明,该方法具有样品前处理简单、快速、准确等优点,能够满足实际样品中有机酸的测定要求。

参考文献:

- [1] Jin W B, Dai Y. *Tobacco chemistry*. Beijing: Tsinghua University Press(金闻博,戴亚.烟草化学.北京:清华大学出版社), **1994**: 36–39.
- [2] Xiao X Z. *Tobacco chemistry*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press(肖协忠.烟草化学.北京:中国农业科技出版社), **1997**: 38–39.
- [3] Yang Z Q, Yu A X, Hou J D, Xu Z G. *J. Anal. Technol. Instrum.* (杨忠乔,虞爱旭,侯镜德,徐子刚.分析测试技术与仪器), **2003**, 9(1): 38–42.
- [4] Wu Y P, Song C M, Lei L P, Wang D D, Fang D H. *J. Tobacco Agric. Sci.* (吴玉萍,宋春满,雷丽萍,王东丹,方敦煌.烟草农业科学), **2005**, (1): 68–71.
- [5] Perini F R. Small carboxylate ion resolution by ion chromatography. 51st Tob. Chem. Res. Conf., **1997**: 1–6.
- [6] Wang J, Zheng Q, Zhang H, Yue H B. *J. Tobacco Sci. Technol.* (王娟,郑琴,张华,岳海波.烟草科技), **2009**, (8): 42–45.
- [7] Qiu J S, Jin X H. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 950: 81–88.
- [8] Lin H Y, Lin F H, Sheng L N, Li Y D, Zhang Q. *Chin. J. Chromatogr.* (林华影,林凤华,盛丽娜,李一丹,张琼.色谱), **2007**, 25(1): 107–111.
- [9] Shi Y L, Liu J S, Cai Y Q, Mou S F, Wen M J. *Chin. J. Anal. Chem.* (史亚利,刘京生,蔡亚岐,牟世芬,温美娟.分析化学), **2005**, 33(5): 605–608.
- [10] Xu W, Yu G, Xue C H, Ren Y, Gao R C. *J. Food Sci.* (徐伟,于刚,薛长湖,任艳,高瑞昌.食品科学), **2008**, 29(4): 306–309.
- [11] Liu X, Zheng T, Shi C O, Li J. *J. China Feed*(刘霞,郑婷,施超欧,李静.中国饲料), **2009**, (8): 39–41.
- [12] Mi S L, Xia N, Huang L, Wei B Y, Teng J W. *J. Food Ind. Technol.* (米顺利,夏宁,黄丽,韦保耀,滕建文.食品工业科技), **2010**, 31(12): 123–126.
- [13] Wang H L, Li X P, Chen W X. *Chin J. Trop Crops*. (王海蓝,李雪萍,陈维信.热带作物学报), **2010**, 31(10): 1720–1725.
- [14] Dong L, Feng Z G, Wang L, Chen F H. *J. Food Res. Develop.* (董乐,冯珍鸽,王力,陈发河.食品研究与开发), **2010**, 31(1): 103–105.
- [15] Mou S F, Liu K N, Ding X J. *Ion chromatography method and application*. 2th ed. Beijing: Chemical Industry Press(牟世芬,刘克纳,丁晓静.离子色谱方法及应用.2版.北京:化学工业出版社), **2005**: 71–72.
- [16] YC/T31–1996. Tobacco and tobacco products – Preparation of test sample and determination of water content – Oven method. Industry Standards of the People's Republic of China(烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法.中华人民共和国行业标准).