

高效阴离子色谱法测定卷烟主流烟气中的单糖

吕 健^{1,2}, 武超伟³, 徐海涛², 周仕禄², 张峻松¹

1 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 郑州 450002;

2 山东中烟工业有限责任公司技术中心, 青岛 266101;

3 河南中烟工业有限责任公司郑州卷烟厂, 郑州 450000

摘要: 建立了高效阴离子色谱-脉冲安培检测法同时检测卷烟主流烟气颗粒物中 6 种单糖的方法。以蒸馏水为萃取剂, 采用超声萃取吸附卷烟烟气总粒相物的剑桥滤片, 经在线超滤后, 以 2.0 mmol/L NaOH 和 0.5 mmol/L NaAc 的混合水溶液淋洗, 采用积分脉冲安培检测, 在 METROSEP Carb1 250 分离柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 上, 卷烟主流烟气总粒相物中含有的果糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、木糖共 6 种单糖达到良好分离。结果表明: 方法的重复性较好, 6 种单糖相对标准偏差 < 4.31%; 具有较高的灵敏度: 6 种单糖的检测限均低于 0.10 μg/支; 较高的准确性: 6 种单糖的回收率均在 85.10%-95.52% 之间。

关键词: 高效阴离子色谱; 卷烟主流烟气; 单糖; 分析

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2011.04.002

中图分类号: TS411.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2011)04-0008-04

Analysis of monosaccharide in mainstream cigarette smoke by high performance anion exchange chromatography

LV Jian^{1,2}, WU Chao-wei³, XU Hai-tao², ZHOU Shi-lu², ZHANG Jun-song¹

1 College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2 Technology Center, China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd., Qingdao 266101, China;

3 Zhengzhou Cigarette Factory, Henan Tobacco Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

Abstract: Analytical method of 6 monosaccharides in cigarette mainstream smoke was developed using high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) coupled with pulsed amperometric (amperometric) detector. Total particulate matter of mainstream cigarette smoke was collected on Cambridge filter pad and extracted in distilled water by ultrasonic bath. Separation was accomplished on a METROSEP Carb1 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) separation column by using elution consisting of solution of 2.0 mmol/L NaOH and 0.5 mmol/L NaAc as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Under these conditions, fructose, glucose, arabinose, mannose, galactose, and xylose in TPM were separated. Sugars were detected with amperometric detector. Excellent reproducibility was achieved with RSDs of 6 monosaccharides below 4.31%. Limit of detection for every monosaccharide compound was less than 0.10 μg/cig. The recoveries were in the range of 85.10% to 95.52%.

Key words: high performance anion exchange chromatography; cigarette mainstream smoke; monosaccharide; analysis

卷烟产品中含有大量糖类物质, 其中的水溶性糖类因在燃吸时能产生多种香气物质, 分析研究该类物质对提高烟草及其制品的质量有重要意义^[1], 因此烟

草及其制品中糖类的分析已有较多的研究^[2-7]。由于烟气为气溶胶, 可导致部分水溶性单糖同时转移到卷烟主流烟气中, 从而直接对卷烟的吸味产生影响, 因此对卷烟主流烟气中糖的分析具有重要的意义。文献表明, 国外在上个世纪 60 年代开始对烟草内在成分和烟草添加剂在卷烟烟气中的含量进行研究, 1973 年 Sakagami 研究了甘草酸、甘草次酸在卷烟主流烟气中的含量, 说明这些非挥发性成分可转移到烟气中, 从而可以直接影响烟气的吸味^[8]。上世纪 80 年代后, ¹³C 标记

作者简介: 吕健, 学士, 工程师, 主要从事烟草化学成分研究, E-mail:

lvjian@mail.etsong.com

张峻松(通讯作者), 男, 博士, 主要从事烟草化学研究, E-

mail: 1383712413@163.com

收稿日期: 2010-04-08

的方法开始在烟草成分和烟草添加剂向烟气转移量的研究中得到应用,但这些研究也主要集中在烟碱、薄荷醇、蛋白质或烷烃等成分上^[9-11],国外亦有对卷烟烟气中糖类物质的分析研究少量报道,文献报道^[12]单糖在卷烟中的转移率可达0.5%左右。

卷烟烟气中糖的浓度远低于烟草中糖的浓度,因此烟草中糖类物质的检测方法很难借用,所采用检测方法检测限应大幅降低才行。侯冰等^[13]采用柱前衍生-高效液相法仅仅分析了主流烟气的葡萄糖和甘露糖,然而所建立的方法存在前处理过程繁琐,某些含量较低的单糖的浓度达不到其检测限等不足之处。本文采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测方法测定了卷烟主流烟气粒相物中的6种单糖的含量,取得了满意结果,适于卷烟主流烟气中单糖成分的定量分析。

1 材料与方法

1.1 试剂

样品:13个牌号国产卷烟样品。标准品:D-葡萄糖(Glc.)、D-半乳糖(Gal.)、D-甘露糖(Man.)、D-木糖(Xyl.)、L-阿拉伯糖(Ara.)、D-果糖(Fru.) (98%~99.5%,Fluka公司)。其他试剂:醋酸钠(AR,上海化学试剂有限公司);NaOH(Merck公司)。实验用水均采用经过0.22 μm 滤膜过滤的二次蒸馏水(Milli-Q纯水器,美国Millipore公司)。

1.2 仪器

Metrohm离子色谱系统(瑞士万通公司),包括:850 Professional IC、817 Bioscan和863 Compact Sampler,英蓝在线渗析单元。Borgwaldt Technik RW 200型全自动转盘式吸烟机;KQ3200超声波清洗器(昆山市超声波仪器厂)。

1.3 卷烟烟气总粒相物的前处理

所用卷烟样品在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(60 \pm 2)\%$ 条件下平衡至少48 h,吸烟机按GB/T16450-2004标准^[9]条件抽吸试验卷烟,20支卷烟烟气的TPM收集于剑桥滤片上。吸毕,将滤片放入100 mL三角瓶中,向装有滤片的三角瓶中加入50 mL蒸馏水后,室温超声提取30 min。超声完毕后直接取8~10 mL的样液上样,卷烟烟气TPM水溶液中的单糖通过在线超滤池净化后进入离子色谱分析仪进行分析。

1.4 仪器条件

色谱柱:METROSEP Carb1 250 阴离子交换分离柱,包括分离柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm)和保护柱(2

mm $\times$ 50 mm);柱温30 $^\circ\text{C}$;洗脱液:NaOH和NaAc的混合水溶液,浓度分别为2.0 mmol/L和0.5 mmol/L,流速为1.00 mL/min;0.1 mol/L NaOH溶液进行柱后衍生,流速0.4 mL/min;进样体积:20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

METROSEP Carb1适用于多种基体中单糖和双糖的分离以及线性多聚糖的分离,而卷烟烟气样品中的水溶性糖类主要以单糖为主,因此选METROSEP Carb1作为本方法的色谱分离柱。

淋洗液的选择是非抑制型离子色谱仪中关键环节之一。在25 $^\circ\text{C}$ 水中,葡萄糖、果糖和蔗糖是离解常数为12-13的弱酸,在高pH的NaOH淋洗液中可使糖类化合物都能够以羟基阴离子的形式存在,因此可在阴离子交换柱上被保留并得到分离。NaOH中的OH⁻除了起淋洗的作用外,其强碱性介质也使安培检测器对糖有较高的响应灵敏度。在强碱性溶液中糖类化合物在阴离子交换色谱柱上的保留行为主要与其pKa值有关。根据文献^[15-16]报道的试验结果,随着NaOH淋洗液浓度的增加,单糖的保留时间缩短。

强碱性淋洗液使得糖、糖醇以及醇类化合物以羟基阴离子的形式存在,这与检测糖所用的脉冲安培检测器(PAD)的检测条件一致。为使烟气中各单糖实现较好的分离,试验经过优化淋洗条件,得到较佳的淋洗液条件是:较低浓度的NaOH(2.0 mmol/L)和NaAc(0.5 mmol/L)。此条件可有效提高各组分间的分离度,但单糖检测灵敏度却大大降低。为此在柱后又采用0.1 mol/L NaOH溶液进行衍生,使检测灵敏度提高。

在上述条件下,单糖标准品和烟气样品均得到了较好分离和检测效果,谱图见图1、图2。

对比图1和2可以看出,国内卷烟主流烟气总粒相物中含有标样所涉及的全部6种单糖成分。侯冰等^[13]建立的卷烟烟气中单糖紫外衍生高效液相色谱测定方法中,果糖不能与衍生剂PMP反应。本研究所采用的方法则不存在衍生的问题,果糖可以测出。此外,侯冰等^[12]的方法样品的前处理过程繁琐,某些原本含量较低的单糖的浓度可能因此达不到其检测限。其测定结果也没有可以衍生的阿拉伯糖、木糖和半乳糖等3种单糖。

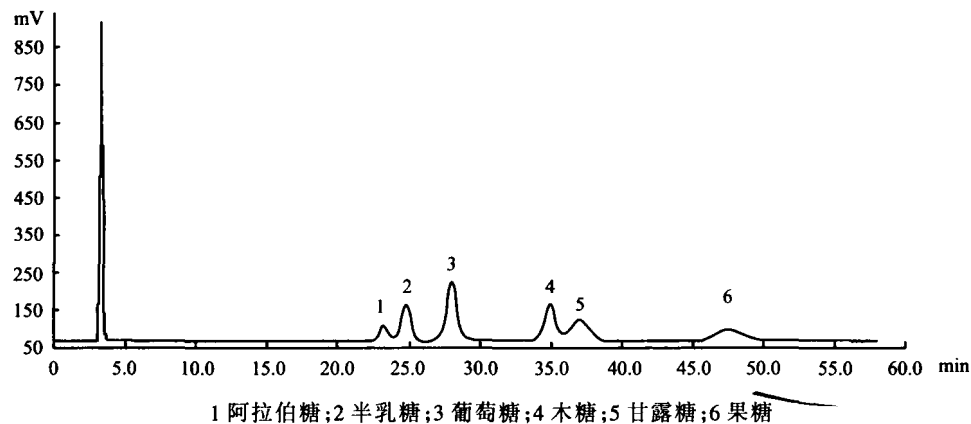


图 1 6 种单糖标准品色谱图

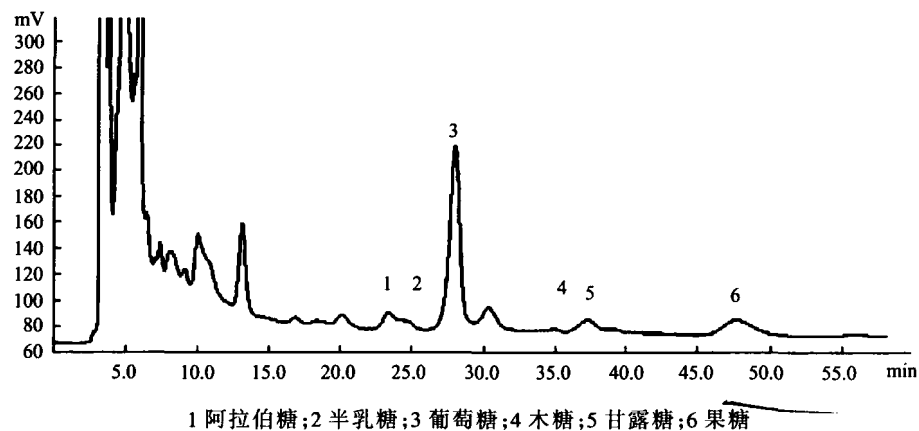


图 2 卷烟主流烟气样品色谱图

2.2 标准曲线及检测限的测定

配制葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖的标准混合溶液,采用优化的色谱条件分析后,外标

峰面积法绘制单糖的标准曲线,结果 6 种单糖在其线性范围内,线性关系良好($R^2 > 0.9999$)。以 $S/N = 3$ 时所对应的单糖浓度作为检测限,结果列于表 1。

表 1 6 种单糖标准曲线及检测限

序号	单糖	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	标准曲线	R^2	检测限/($\mu\text{g/mL}$)
1	阿拉伯糖	1 ~ 10	$Y = 0.157786x - 0.154261$	0.99996	0.04
2	半乳糖	1 ~ 10	$Y = 0.39474x + 0.316312$	0.99996	0.02
3	葡萄糖	3 ~ 30	$Y = 0.215831x - 0.582112$	0.99997	0.03
4	木糖	1.5 ~ 15	$y = 0.237113x + 0.0257574$	0.99998	0.03
5	甘露糖	1.5 ~ 15	$y = 0.19134x - 1.01604$	0.99995	0.05
6	果糖	8 ~ 80	$Y = 0.0397224x - 2.16168$	0.99991	0.10

注: y - 峰面积; x - 单糖浓度。

2.3 方法回收率及重复性试验

将单糖标准溶液加入收集有卷烟主流烟气总粒相物的剑桥滤片上($n = 6$),然后加标与未加标的滤片同时进行前处理及色谱分析,根据未加标样品含量和加标量计算回收率;方法重复性以各单糖含量的 RSD 计

算,结果如表 2 所示,由表 2 可知:6 种单糖的 $RSD < 5\%$,说明该方法的重复性较好。6 种单糖的回收率均在 $85.10\% \sim 95.52\%$ 之间,可满足测定的单糖定量分析的要求。

表2 加标回收率及方法重复性(n=5)

单糖	样品中单糖含量/ ($\mu\text{g/mL}$)	添加量/ ($\mu\text{g/mL}$)	测定值量/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收率/ %	RSD/ %
阿拉伯糖	4.03	2.0	5.73	85.10	1.61
半乳糖	0.87	1.0	89.37	88.50	1.01
葡萄糖	28.14	20.0	45.42	86.41	0.74
木糖	0.23	0.5	0.70	94.12	4.31
甘露糖	3.15	3.0	5.78	87.67	2.12
果糖	33.99	80.0	110.41	95.52	0.29

注:样品为国产卷烟8#。

表3 10个牌号卷烟样品主流烟气总粒相物中单糖含量

(μg/支)

卷烟牌号	果糖	葡萄糖	阿拉伯糖	甘露糖	半乳糖	木糖	总糖/TPM/(%)
国产卷烟1	75.06	42.10	13.48	3.71	1.78	1.18	8.33
国产卷烟2	98.14	45.85	10.14	7.21	1.48	0.37	10.48
国产卷烟3	101.85	56.29	9.75	7.29	1.96	0.83	10.37
国产卷烟4	84.96	70.36	10.08	7.87	2.18	0.58	9.48
国产卷烟5	91.34	54.58	8.84	6.96	1.69	0.53	11.26
国产卷烟6	119.55	75.22	8.72	9.338	6.80	0.41	12.53
国产卷烟7	104.36	77.86	7.72	11.42	4.34	N.D.	11.57
国产卷烟8	104.83	94.00	6.53	13.87	3.56	N.D.	12.53
国产卷烟9	100.98	78.33	6.09	11.57	3.65	N.D.	10.02
国产卷烟10	96.70	92.70	6.92	13.01	3.91	N.D.	10.71

注:N.D.表示未检出。

2.4 卷烟烟气样品中单糖的测定

综合上述分析,采用本方法可以实现对卷烟主流烟气6种单糖成分进行定量分析。本试验分析了10种牌号的国内卷烟样品主流烟气总粒相物中上述6种单糖的含量,结果如表3所示。

表3数据显示,我国烤烟型卷烟烟气中单糖成分的含量大体如下:以测定结果平均值来看,果糖浓度最高(75.06 $\mu\text{g/支}$ ~ 119.55 $\mu\text{g/支}$),其次依次是葡萄糖(42.10 $\mu\text{g/支}$ ~ 94.00 $\mu\text{g/支}$)、阿拉伯糖(6.09 $\mu\text{g/支}$ ~ 13.48 $\mu\text{g/支}$)、甘露糖(3.71 $\mu\text{g/支}$ ~ 13.01 $\mu\text{g/支}$)、半乳糖(1.48 $\mu\text{g/支}$ ~ 6.80 $\mu\text{g/支}$)和木糖(未检出 ~ 1.18 $\mu\text{g/支}$)。

试验依据上述结果计算出总糖含量,并与TPM数值相比,得到烟气中的单糖浓度,并以其中比甜度最低的半乳糖计算甜度效应。半乳糖的甜度阈值浓度为3.1%^[17],而试验结果中所有国内卷烟产品主流烟气中总糖浓度均大于这一数值,即吸食者可以因此感受到其产生的甜味。这一研究结果与普遍认可的国内卷

烟烟气微带酸甜的认识是统一的^[18],也可为中式卷烟味觉特征研究提供一定的思路。

3 结论

本文建立了以蒸馏水为萃取剂,采用超声萃取吸附卷烟烟气总粒相物的剑桥滤片,经在线超滤后,利用高效阴离子色谱-柱后衍生检测方法,可实现卷烟主流烟气总粒相物中含有的果糖、葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、木糖共6种单糖的定量分析。该方法步骤简单、灵敏度高、响应物质全面、分离效果及重现性良好,适于卷烟主流烟气粒相物中单糖成分的定量检测,所测牌号的卷烟样品烟气中总糖的浓度均能达到甜味的呈味阈值,该方法有助于为中式卷烟味觉特征研究提供参考,也可为卷烟主流烟气糖含量与卷烟品质的关系提供初步的技术依据。

【下转第15页】

Massachusetts 研究报告^[10]中,不同卷烟检测结果范围在 40~106 ng/cig 之间,平均值为 73 ng/cig,低于本试验结果,这是由于 Massachusetts 抽吸方案与本方法采用的 ISO 抽吸方案(抽吸容量从 35 mL 增大到 45 mL,抽吸间隔由 60 s 降低到 30 s)不同而导致侧流燃烧的烟草量降低所造成的。需要指出的是,虽然卷烟侧流烟气中 BaP 释放量达到了 130 ng/cig 左右,但是侧流烟气不等同与环境烟气,侧流烟气要经过 10~100 万倍稀释后才成为环境烟气,因此在环境烟气中 BaP 的含量微乎其微。

3 小结

通过试验,确定了采用 GC/MS 测定卷烟侧流烟气中 BaP 的最优化条件:采用甲醇洗脱鱼尾罩,将甲醇洗脱液浓缩干后加入捕集了侧流烟气粒相物的玻璃纤维滤片,加入内标和环己烷进行超声萃取,萃取液直接进 GC/MS 分析。本方法在简化样品前处理的同时,能够保证较高的灵敏度和精密度,适宜于卷烟侧流烟气中 BaP 的快速测定。

参考文献

- [1] 姚庆艳. 卷烟辅料研究[M]. 昆明:云南科技出版社, 2001:386-482.
- [2] 世界卫生组织烟草控制框架公约[M]. ISBN:9245591018, 2003.
- [3] Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon[R]. U.S Department of Health and Human Services, 1995.
- [4] 世界卫生组织烟草制品管制研究小组报告[R]. WHO, 2004.
- [5] Xie Fuwei, Zhao Mingyue, Li Dong, et al. Determination of benzo(a)pyrene in mainstream and sidestream cigarette smoke [C]. CORESTA, 2001.
- [6] 夏巧玲,谢复伟,王昇,等. 卷烟烟气种苯并[a]芘测定方法研究[J]. 烟草科技, 2004(8):3-7.
- [7] Determination of Benzo[a]Pyrene in sidestream tobacco smoke. Health Canada T-203, 1999. [2007-11-29]. <http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/-side-second/benzo-eng.php>.
- [8] GB/T 21130-2007 卷烟 烟气总粒相物中苯并[A]芘的测定[S].
- [9] YC/T 185-2004 卷烟 侧流烟气中焦油和烟碱的测定[S].
- [10] Borgerding M F, Bodnar J A, Wingate D E. The 1999 Massachusetts Benchmark Study Final Report[R], [2000-07-24]. <http://legacy.library.ucsf.edu/tid/yek21e00>.

【上接第 11 页】

参考文献

- [1] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州:郑州大学出版社, 2002.
- [2] 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):34-36.
- [3] 张峻松,曲志刚,贾春晓,等. 香料烟中游离糖的毛细管气相色谱分析[J]. 郑州轻工业学院学报, 2003, 18(1):71-73.
- [4] 周斌,张承明,张承聪,等. 烟草中游离糖类的 BSTFA 衍生化与气相色谱-质谱联用分析方法研究[J]. 云南民族大学学报, 2007, 16(3):239-242.
- [5] 王璐,耿永勤,王岚,等. 烟草中主要糖的高效液相色谱测定研究[J]. 云南大学学报, 2004, (26):199-202.
- [6] 杨俊,刘江生,蔡继宝,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定烟草中的水溶性糖[J]. 分析化学, 2005, 33(11):1596-1598.
- [7] Michelle B Clarke, Dawit Z Bezabeh, Caitlin T Howard. Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry: a comparison with ion chromatography and application to product discrimination [J]. J Agric Food Chem, 2006, (54):1975-1981.
- [8] Sakagami, Hatsuko. Behavior of glycyrrhizic acid and glycyrrhetinic acid added to tobacco on smoking. III. Studies on the components of licorice root used for tobacco flavoring[J]. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1973, 47(10): 623-626.
- [9] Robert W, Jenkins J, Richard J, et al. Smoke distribution and mainstream pyrolytic composition of added 13C-menthol [J]. Beitr Tabakforsch Int, 1970, (12): 299-301.
- [10] Voisine R, Cote F, Verreault J, et al. Protein Transfer in Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke[J]. Beitr Tabakforsch Int, 2004, 21(1): 9-14.
- [11] Bass R T, Brown L E, Hassam S B, et al. Cigarette smoke transfer studies: transfer of added (14C) octatriacontane [J]. Tob Chem Res Conf, 1987, 41: 29-30.
- [12] Gager F L, Nedlock J J W, Martin W J. Tobacco additives and cigarette smoke. Part I. Transfer of D- Glucose, Sucrose, and their degradation products to the smoke. [J]. Carbohydr Res, 1971, 17: 327-333.
- [13] 侯冰,齐祥明,徐海涛,等. 高效液相色谱法测定卷烟主流烟气中甘露糖和葡萄糖的含量[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26):11179-11180.
- [14] GB/T 16450-2004. 常规分析用吸烟机定义和标准条件[S].
- [15] 唐坤甜,梁立娜,蔡亚岐,等. 高效阴离子交换色谱分离-脉冲安培检测法测定烟草料液中的糖、糖醇和醇类化合物[J]. 分析化学, 2007, 35(9):1274-1278.
- [16] 胡静,沈光林,温东奇. 阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法分离测定烟草料液中的山梨醇和糖[J]. 色谱, 2007, 25(3):451-452.
- [17] Hagstrom E C, Pfaffmann C. The relative taste effectiveness of different sugars[J]. J Comp Phy Psy, 1959, 52(2): 259-262.
- [18] 武怡,张虹,赵震毅,等. 中式卷烟风格特征感官评价方法的建立与应用[J]. 中国烟草, 2008(2):69-71.