

闪蒸-气相色谱指纹图谱及系统聚类分析 用于烟用香精香料的测定

蒋 健¹, 杨 君¹, 黄芳芳¹, 许式强¹, 王晓晴²,
郑 晓², 潘再法², 王丽丽^{2*}

(1. 浙江中烟工业有限责任公司技术中心, 浙江 杭州 310008;
2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 采用闪蒸-气相色谱法(FE-GC)对不同黏度的烟用香精香料样品进行测定,考察了影响测定的主要因素。结果表明 0.40 mg 样品在 350 °C 下进行 FE-GC 分析,可以得到重现性良好的色谱图。与超声辅助液-液萃取-气相色谱法(ULLE-GC)分析结果比较表明,FE-GC 适用于不同黏度样品的分析。采用该法检测了中等黏度的烟用香精香料 1184 号 8 个批次样品,并建立其指纹图谱。利用系统聚类分析法可以明显区分 1184 号样品及掺兑 10%~30% 其他种类烟用香精香料的样品。FE-GC 法简便、快速、灵敏,适用于不同黏度的烟用香精香料样品的检测和质量控制分析。

关键词: 闪蒸-气相色谱法; 系统聚类分析; 指纹图谱; 烟用香精香料

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)06-0549-05

Flash evaporation-gas chromatographic fingerprints with hierarchical cluster analysis for the determination of cigarette flavors

JIANG Jian¹, YANG Jun¹, HUANG Fangfang¹, XU Shiqiang¹, WANG Xiaoqing²,
ZHENG Xiao², PAN Zaifa², WANG Lili^{2*}

(1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310008, China;
2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: A method of flash evaporation-gas chromatographic (FE-GC) fingerprints with hierarchical cluster analysis was established for the quality control of the cigarette flavor samples. An amount of 0.40 mg of the cigarette flavor sample was analyzed by FE-GC at optimized the flash evaporation temperature, 350 °C. Good reproducibility for chromatograms was obtained with the relative standard deviations (RSDs) of the retention time less than 0.22%, and the relative peak area less than 9.37%. Compared with ultrasound-assisted liquid-liquid extraction-gas chromatography (ULLE-GC), FE-GC was proved to be more suitable for the analysis of cigarette flavor samples with various viscosity. The similarity correlation coefficients were above 0.998 for the 8 batches of cigarette flavor No. 1184. Furthermore, these samples could be successfully distinguished from the ones mixed with other kinds of flavor components at the mixed levels of 10%–30% by hierarchical cluster analysis. It demonstrated that the method of FE-GC fingerprints with hierarchical cluster analysis is simple, rapid, accurate, and suitable for the quality control of cigarette flavors.

Key words: flash evaporation-gas chromatography (FE-GC); hierarchical cluster analysis; fingerprint chromatogram; cigarette flavors

* 通讯联系人: 王丽丽, 博士, 教授, 主要从事色谱分析工作. Tel: (0571) 88320416, E-mail: lili_wang2007@sina.com.

收稿日期: 2011-01-25

烟用香精香料是一个复杂的多组分化学体系,一般由多种天然香料或人工合成香料按一定的比例与丙二醇、酒精和水调配而成,可以香精或以料液为主,因此物理性状不尽相同,如黏度不一的液态、呈半固态的膏状等,并显示出不同的加香效果^[1],其主体香是内含的多种化学成分的一种综合性表现。对于烟用香精香料的质量控制,传统方法主要是通过样品的酸度、溶混度等物性指标和品香师的反复评吸来评价^[2],无法从本质上反映烟用香精香料的成分,难以准确客观地把握质量变化。因此,烟用香精香料化学成分的检测与质量评控方法的开发是十分必要的。而基于指纹图谱的质量控制模式^[3]可以反映这类复杂化学体系内在品质的稳定性。目前,关于香精香料指纹图谱研究的报道大多先采用液-液萃取法^[4,5]、同时蒸馏萃取法^[6]、固相微萃取法^[7]或液相微萃取法^[8,9]等前处理方法,将香精香料中的有效香气成分较为完整地提取出来,继而利用气相色谱法^[10]、高效液相色谱法^[11]或紫外分光光度法^[12]进行检测。这些方法为烟用香精香料的质量控制提供了较好的参考,但一般需要较为复杂的香气成分提取纯化过程。而对于黏稠状的烟用香精香料样品,由于成分复杂多样,很难找到合适的溶解和萃取溶剂。

闪蒸-气相色谱法(FE-GC)是将样品置于裂解器内,在一定温度下使样品中的挥发性或易升华组分在短时间内蒸发出来,通过载气将其带入气相色谱仪中进行分离测定。该技术因其具有对样品形态无要求、无需前处理、样品用量少等优点,已成功地应用于固体样品川芎药材^[13]、烟叶^[14]以及液体样品中药橡皮膏剂^[15]中的挥发性成分的检测中。本课题组也已将该法用于中草药莪术中挥发性成分的分析^[16]。但利用FE-GC对烟用香精香料的检测还鲜见报道。本文将FE-GC用于不同黏度的烟用香精香料的测定,考察了影响测定的主要因素,并通过与超声辅助液-液萃取-气相色谱法(ULLE-GC)进行比较,验证了本法的适用性。并采用该法检测了某牌号的8个批次样品,建立了其指纹图谱。利用系统聚类分析法可将其与掺兑了10%~30%其他种类烟用香精香料的样品区分开。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 5890/5972 气相色谱/质谱(GC/MS)联用仪;美国 Varian CP-3800 气相色谱仪;配置氢火焰离子化检测器(FID);日本 Frontier PY-

2020iD 双击式纵型微型炉裂解器。美国 SPSS 11.5 统计分析软件。

烟用香精香料样品:1148号样品(黄色透明液体状),1184号样品(深褐色黏稠状);8个批次分别以X1~X8标记,1112号样品(深褐色黏稠状),1146号样品(深褐色膏状)。取1184号X1样品3份,分别加入10%、20%、30%(质量分数)的1112号样品后记作A、B和C,作为掺兑样品。上述烟用香精香料样品均由浙江中烟工业有限责任公司提供。

1.2 实验过程

1.2.1 超声辅助液-液萃取法提取样品^[5]

称取约2g(精确至0.001g)样品,加入2mL二氯甲烷和2mL饱和氯化钠溶液,超声萃取10min,静置分层。取下层液,置于样品瓶中待测。

1.2.2 闪蒸法提取样品

称取(0.40±0.02)mg样品于样品杯中,固定于进样杆上,装入裂解器(见图1),此时样品的温度接近室温。待炉心温度稳定在350℃后,按进样按钮,样品杯迅速降落至炉心,在N₂中挥发性成分瞬间气化,由载气带入毛细管色谱柱进行分离,继而检测。

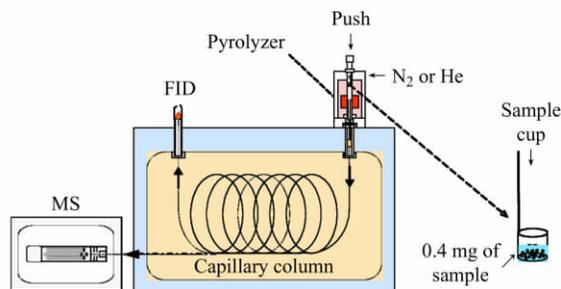


图1 FE-GC/MS分析装置示意图^[17]
Fig. 1 Scheme of the FE-GC/MS system [17]

1.2.3 检测条件

GC条件:TEKNOKROMA TBR-5石英毛细管柱(30m×0.25mm×0.25μm,西班牙TEKNOKROMA公司)。柱温升温程序:初始温度50℃,以5℃/min的速率升到270℃,并保持10min。进样口温度:300℃;载气:N₂;分流比:30:1;柱流量:1.0mL/min。FID温度:300℃。

MS条件:电子轰击离子(EI)源,电离能量70eV;传输线温度300℃;扫描范围m/z 45~500,质谱标准库为Nist 02库。

2 结果与讨论

2.1 样品量和闪蒸温度的选择

闪蒸方法只需10⁻⁴g数量级的样品就能进行分析。通常样品量过多会导致分离度下降,出现峰

叠加; 样品量过少会使峰强度降低, 不利于定量分析。通过对不同样品量(0.2 ~ 1.0 mg)的不同黏度样品的考察, 结果表明样品量为0.4 mg时, 各组分分离良好, 峰容量最大且峰强度合适, 因此选择0.4 mg为最佳样品量。此外, 将进样量控制在(0.4 ± 0.02) mg的范围内, 可以确保实验结果的重现性。

闪蒸温度的选择对实验结果亦十分重要。温度过低, 样品中的成分难以完全挥发, 且峰强度低; 温度过高则会导致一些组分的分解。在200 ~ 400 °C范围内, 分别对低黏度的1148号样品、中等黏度的1184号样品以及膏状的1146号样品进行了闪蒸温度的考察。图2为3种样品总峰面积随温度变化的曲线。结果发现, 当闪蒸温度为350 °C时, 3种不同黏度样品的总峰面积分别为最大或较大, 因此选择350 °C为3种样品的闪蒸温度。

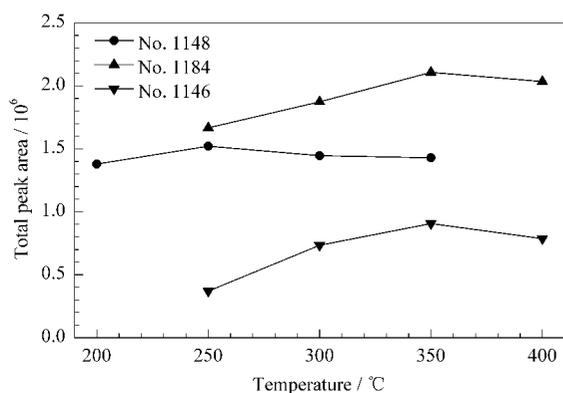


图2 3种样品的总峰面积随温度的变化曲线

Fig. 2 Curves of total peak area of the three samples with the FE temperature

2.2 不同黏度样品的考察

分别采用FE-GC和ULLE-GC对低黏度的1148号、中等黏度的1184号样品的X1样品和膏状的1146号样品进行分析, 得到的色谱图见图3。由图3可以看出, 两种方法检测到的主要成分的个数和峰强度基本一致, 表明采用FE-GC分析检测低黏

度的1148号样品, 能获得与ULLE-GC基本相同的组分信息。但ULLE-GC只能检测到中等黏度的1184号样品中的6种组分, 而FE-GC可以检测到22种组分, 且信号强度较大。对于膏状的1146号样品, 无论检测到的组分数还是色谱峰强度方面, FE-GC都明显优于ULLE-GC。结果表明, FE-GC适用于不同黏度的烟用香精香料样品的分析检测, 特别适用于较难找到合适的溶解和萃取溶剂的高黏度样品的分析。

取1184号X1样品, 重复取样并进行FE-GC测定。约22种组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.02% ~ 0.22%和0.15% ~ 9.37% ($n=5$), 表明方法的重现性良好。

2.3 指纹图谱的建立

选择中等黏度的1184号样品建立色谱指纹图谱。图4为8个批次样品(X1 ~ X8)在最佳闪蒸条件下的气相色谱图。选择8个批次样品共同含有、分离良好且较为稳定的15个组分的色谱峰作为共有峰, 即保留时间在30 min以内的1 ~ 15号峰。通过MS检测得到各共有组分的碎片离子信息, 搜索Nist 02质谱标准库(匹配度为850以上)并结合一定的人工解析得到部分组分的定性结果。图4中的2号峰为吡啶, 有增加辛辣味的效果; 4号峰和12号峰均为糠醛类物质; 10号峰为麦芽酚, 起增甜效果; 13号峰为胡椒醛, 由于其含有较强的花香、果香, 一般用于改善烟香气味; 14号峰和15号峰分别为二氢香兰素和香兰素, 此类物质可协调烟草香气, 使香味丰满。而保留时间为4 min的平头峰为该烟用香精香料调配过程中所用的溶剂1,2-丙二醇, 非香气成分; 保留时间为10 min的前伸峰为甘油, 由于其极性较大, 与保留时间在9 ~ 11 min之间的组分分离不佳; 以上两组峰不列入共有峰中。

8个批次样品的共有峰总面积分别占各总峰面积的75%以上, 可以体现各批次样品的特征性。根

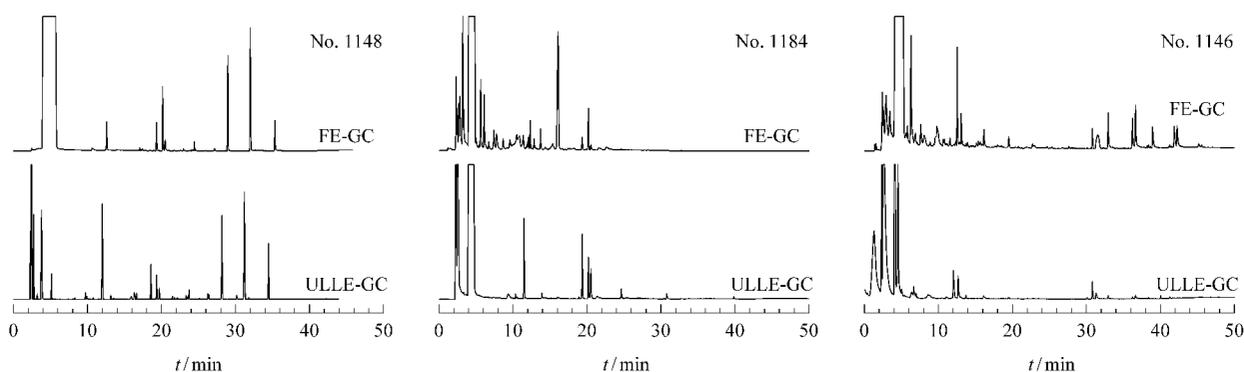


图3 1148号、1184号和1146号3种烟用香精香料样品的FE-GC和ULLE-GC谱图

Fig. 3 Chromatograms obtained of No. 1148, No. 1184 and No. 1146 samples by FE-GC and ULLE-GC methods

据中草药指纹图谱技术要求^[18],分别求出 15 个共有峰的 S 值(即各峰面积与共有峰总峰面积的比值)构成 1184 号烟用香精香料闪蒸-气相色谱指纹图谱数据(见表 1)。对于 3 个掺兑样品的色谱图,按相同方法分别求得 15 个共有峰的 S 值,其数据亦列于表 1 中。

以 X1 样品图谱为基准,其余批次样品的 S 值与之比较,最大的差值 $\Delta S(\text{Max}) \leq 3.90\%$,完全满足 $\Delta S(\text{Max})$ 不得大于 $\pm 25\%$ 的指纹图谱建立要求^[18],也说明各批次样品之间有着较大的相似性。而 A、B 和 C 这 3 个掺兑样品的 S 值与 8 个批次样品的 S 值区别较大。样品 A 为掺兑了 10% 其他种类烟用香精香料的样品,其 2 号、7 号和 12 号峰与 X1 样品中对应峰的 S 值之差分别为 5.82%、3.5%、16.05%;而样品 B、C 与 X1 的 S 值之差更大。

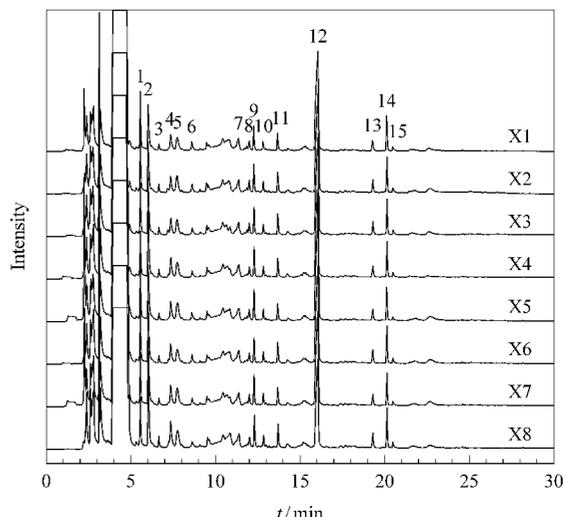


图 4 X1 ~ X8 样品的 FE-GC 指纹图谱
Fig. 4 Fingerprints of the X1 - X8 samples by FE-GC

表 1 8 个批次(X1 ~ X8)的 1184 号烟用香精香料样品及 3 个掺兑样品(A、B、C)的 S 值
Table 1 S values of 8 batches of No. 1184 samples (X1 - X8) and 3 mixed samples (A, B, C)

Peak No. in Fig. 4	$t_R /$ min	$S / \%$								$ \Delta S(\text{Max}) /$ %	$S / \%$		
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8		A	B	C
1	5.56	7.12	7.42	7.52	7.11	7.02	7.07	7.43	7.01	0.40	7.86	8.27	7.77
2	6.02	13.78	14.15	13.35	14.17	14.50	13.97	13.31	14.04	0.72	7.96	5.46	6.32
3	6.64	1.32	1.00	1.17	1.25	1.12	1.32	1.19	1.16	0.32	0.83	0.67	0.79
4	7.35	6.15	6.21	6.15	6.14	6.08	6.43	3.66	5.89	2.49	5.53	4.27	4.75
5	7.74	6.70	6.81	5.82	6.49	7.17	7.15	6.28	6.27	0.88	5.36	4.70	5.36
6	8.59	1.82	1.86	1.99	1.90	1.83	1.95	2.29	1.77	0.17	1.29	1.31	1.41
7	11.36	6.06	5.32	5.45	5.54	5.68	5.46	5.30	5.31	0.76	2.56	2.24	3.14
8	11.98	1.64	1.55	1.60	1.66	1.60	1.56	1.94	1.55	0.30	1.21	1.27	1.36
9	12.26	4.61	4.24	3.48	4.01	4.30	4.54	4.32	4.00	1.13	2.17	1.59	1.60
10	12.80	1.70	1.55	1.68	1.64	1.75	1.61	1.62	1.49	0.21	1.27	1.05	1.08
11	13.67	2.81	2.22	2.94	3.08	2.49	2.30	3.27	3.01	0.46	3.30	3.55	3.97
12	16.08	37.48	40.78	40.32	38.86	39.24	38.40	41.38	40.80	3.90	53.53	60.00	57.55
13	19.29	2.53	1.94	2.51	2.37	2.07	2.35	2.40	2.21	0.59	2.20	1.76	1.51
14	20.12	5.30	4.19	5.09	4.77	4.36	4.97	4.62	4.65	1.11	4.15	3.24	2.81
15	20.46	0.95	0.74	0.93	0.99	0.81	0.91	1.01	0.85	0.21	0.80	0.62	0.58

S : the ratio between the peak area of the component and the total peak area of the common peaks; $\Delta S(\text{Max})$: The maximum difference of S value between X1 sample and the other 7 samples.

2.4 指纹图谱的聚类分析

通过比对表 1 的数据,可以区分出掺兑样品。但比对过程比较繁琐,容易遗漏部分信息,而且也不够直观。因此,用系统聚类分析方法对表 1 数据进行了分析。采用 SPSS 11.5 软件包中的聚类分析程序对 X1 ~ X8 及 A、B、C 样品的指纹图谱数据进行聚类分组。用夹角余弦方法测量,每两个样本间用类间平均链锁法(between-groups linkage)连接,最后输出相似矩阵和系统聚类树状图(见图 5)。

由相似矩阵可知,1184 号烟用香精香料 8 个批次的样品之间的相关系数均达到 0.998 以上;而 3 个掺兑样品 A、B、C 与 X1 ~ X8 之间相关系数为

0.949 ~ 0.978,表明掺兑样品与 1184 号样品间存在明显差异。

系统聚类分析树状图中横坐标为临界值(即类间的距离)纵坐标为样品名。临界值越小,表明谱图越相似。由图 5 可知,在临界值约为 1 时,8 个批次的 1184 号样品已经聚为一类;临界值约为 2 时,掺兑了不同浓度 1112 号烟用香精香料的 A、B 和 C 样品聚为一类;临界值介于 2 到 25 之间时,8 个批次的 1184 号样品与 3 个掺兑样品分为两大类。结果表明,1184 号样品中仅掺兑 10% 的其他种类样品,就可以被成功地区分开来。

采用相同方法建立了低黏度的 1148 号、膏状的

1146号样品的闪蒸-气相色谱指纹图谱,并同样制备掺兑样品进行考察。结果表明,系统聚类方法亦可以将1148号、1146号样品和其掺兑10%~30%其他种类香精香料的样品区分开来。

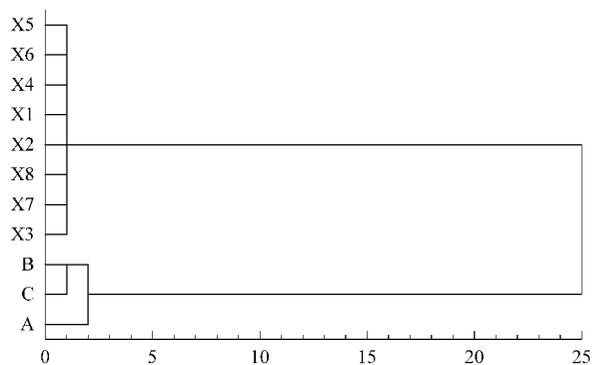


图5 11个烟用香精香料样品的系统聚类分析树状图

Fig. 5 Hierarchical cluster analysis of 11 cigarette flavor samples

3 结语

建立了烟用香精香料的FE-GC测定方法,考察了样品量与闪蒸温度对提取和分离效果的影响。结果表明,(0.40 ± 0.02) mg样品在闪蒸温度350℃时进行FE-GC分析,可以得到重现性良好的色谱图。通过与ULLE-GC的比较,表明FE-GC适用于不同黏度的烟用香精香料的分析。采用本方法可以建立不同黏度样品的指纹图谱。模式识别结果表明,FE-GC结合系统聚类分析能够成功区分掺兑10%~30%其他种类香精香料的样品。因此,该方法能适用于不同黏度烟用香精香料的测定和品质控制分析。

参考文献:

- [1] Zhao M Q. Studies of Cigarette Flavoring. Beijing: Science Press (赵明钦. 卷烟调香学. 北京: 科学出版社), 2008
- [2] Xu J Y. Tobacco Technology and Flavoring. Beijing: Textile of China Press (许建营. 烟草工艺与调香技术. 北京: 中国纺织出版社), 2007
- [3] Zhou J L, Qi L W, Li P. Chinese Journal of Chromatography (周建良, 齐炼文, 李萍. 色谱), 2008, 26(2): 153
- [4] Huang S J, Wang W G, Jiang H L, et al. Journal of Anhui Agricultural Sciences (黄世杰, 王维刚, 蒋宏霖, 等. 安徽农业科学), 2009, 37(14): 6344
- [5] Qu G F, Lu S M, Meng Z Y, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (曲国福, 陆舍铭, 孟昭宇, 等. 分析实验室), 2007, 26(11): 57
- [6] Guo Z M, Dong D Z, Li Y C, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (郭紫明, 董道竹, 李燕春, 等. 理化检验: 化学分册), 2008, 44(1): 22
- [7] Wang H Y, Guo Y L, Zhang Z X, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王昊阳, 郭寅龙, 张正行, 等. 分析化学), 2005, 33(2): 245
- [8] Liao K, Zhang Y, Xiao J. Tobacco Science & Technology (廖堃, 张翼, 肖竞. 烟草科技), 2007(6): 39
- [9] Jiang H Z, Chen H T, Sun B G, et al. Food Science (姜海珍, 陈海涛, 孙保国, 等. 食品科学), 2007, 28(9): 478
- [10] Zhu X L, Gao Y, Chen Z Y, et al. Chromatographia, 2009, 69: 735
- [11] Zhao Y, Yang H W, Zhong K J, et al. Flavour Fragrance Cosmetics (赵瑜, 杨华武, 钟科军, 等. 香料香精化妆品), 2009(4): 19
- [12] Sun Z T. Anhui Agricultural Science Bulletin (孙志涛. 安徽农学通报), 2010, 16(2): 144
- [13] Zhang C, Qi M L, Fu R N. World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine (张聪, 齐美玲, 傅若农. 世界科学技术: 中医药现代化), 2009, 11(1): 165
- [14] Liu H M, Tang G L, Li R, et al. Acta Tabacaria Sinica (刘惠民, 唐纲岭, 李荣, 等. 中国烟草学报), 2003, 9(1): 1
- [15] Ye C Y, Dai J H, Huang Z F. Chinese Traditional Patent Medicine (叶崇义, 戴剑虹, 黄镇峰. 中成药), 1989, 11(9): 15
- [16] Wang L L, Chen S, Lu L, et al. Chemistry and Industry of Forest Products (王丽丽, 陈爽, 陆璐, 等. 林产化学与工业), 2010, 30(1): 17
- [17] Wang L L, Wang C, Pan Z F, et al. Chinese Journal of Chromatography (王丽丽, 王聪, 潘再法, 等. 色谱), 2008, 26(5): 613
- [18] Hong X K, Wang Z H. Digital Chromatographic Fingerprint of Chinese Traditional Medicine. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (洪晓坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 上海: 上海科学技术出版社), 2003