

文章编号 :1002-1124(2010)12-0029-03

超高效液相色谱快速测定卷烟主流烟气中酚类化合物的研究*

张 婕 ,周淑平* ,耿召良 ,张长云 ,向章敏 ,李卫红 ,许冬青 ,赵瑞娟

(贵州省烟草科学研究所 测试中心,贵州 贵阳 550000)

摘 要 :以卷烟主流烟气中酚类化合物的快速分析为内容,参照现有标准分析方法 YC/T255-2008,研究了色谱条件由高效液相色谱(HPLC)变为超高效液相色谱(UPLC)的转换方法,建立了卷烟主流烟气中酚类化合物的 UPLC 快速分析方法。讨论了 UPLC 在实际应用中所遇到的问题及优缺点,为 UPLC 的应用开发提供参考。

关键词 超高效液相色谱;色谱条件转化;酚类化合物;快速测定

中图分类号 :O658

文献标识码 :B

An experimental study on rapid analysis of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke by ultra performance liquid chromatography*

ZHANG Jie, ZHOU Shu-ping*, GENG Zhao-liang, ZHANG Chang-yun, XIANG Zhang-min, LI Wei-hong,

XU Dong-qing, ZHAO Rui-juan

(Test Center, Guizhou Tobacco Science Institute, Guiyang 550000, China)

Abstract: A rapid method for the simultaneous separation and quantitation of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke has been developed by studying the conversion of chromatographic conditions from HPLC(YC/T 255-2008 standard method) to ultraperformance liquid chromatography system(UPLC). An experimental design was carried out and discussed to achieve the best elution gradient for separation of all the studied compounds with the best possible peak resolution and in the shortest possible analysis time.

Key words: UPLC; conversion of chromatographic condition; phenolic compounds; rapid analysis

超高效液相色谱(UPLC)是一种在高效液相色谱(HPLC)技术上发展起来的以 1.7 μ m 的小颗粒填料色谱柱为核心的色谱技术,因具有灵敏度高、分辨率高、分析速度快等优点,自 2004 年推出以来,在食品、制药、环境等行业得到了越来越广泛的应用。但其仪器、耗材价格较 HPLC 贵,色谱柱选择种类较少,且多数标准分析方法都建立在 HPLC 基础上,分析时需要进行方法转换,为 UPLC 的使用带来了不便^[1-3]。

本文通过 UPLC 测定卷烟主流烟气中酚类化合物方法的建立,参照 YC/T 255-2008^[4]研究了色谱条件由 HPLC 转换为 UPLC 的方法。讨论了 UPLC 在实际应用中所遇到的问题及优缺点,为 UPLC 的开发应用提供参考。

收稿日期 2010-10-28

项目来源:贵州省烟草公司科技计划项目(200920)

作者简介:张 婕(1982-),女,助理实验师,贵州大学食品科学专业硕士,现主要从事烟草化学研究工作。

指导老师:周淑平

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱配 FLR 荧光检测器及 Empower 2 色谱工作站,ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μ m, 2.1 \times 50mm)(美国沃特世公司),SM400 型 20 孔道直线式吸烟机(英国 Filtrona 公司),T701DH 型超声波振荡器(德国 Elma 公司),Milli-Q Element 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

冰醋酸;乙腈;甲醇(C.P. 美国天地公司);对-苯二酚;间-苯二酚;邻-苯二酚;间-甲酚;对-甲酚;苯酚(纯度 \geq 99%);邻-甲酚(纯度 $>$ 98%)(美国 Alfa Aesar 公司);去离子水(18.2 Ω m,使用前经 0.22 μ m 滤膜过滤);卷烟为烤烟型商品卷烟(购自贵阳当地市场)。

1.2 样品处理

将卷烟样品在 22 \pm 1 $^{\circ}$ C、相对湿度 60 \pm 2%的条件下平衡 48h,后按照 GB/T 19609^[5]的规定收集 4 支

卷烟的总颗粒物。

将捕集有总颗粒物的剑桥滤片折叠后放入 200mL 锥形瓶中, 准确加入 50mL 冰醋酸 - 甲醇 - 水(体积比 1:5:94)的萃取溶液, 室温下超声萃取 30min 静置 5min。萃取液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后进行 UPLC 分析。采用对照标样与烟气样品色谱峰保留时间和荧光光谱对酚类成分进行定性, 外标法定量。

1.3 标准溶液配制

准确称取对 - 苯二酚、邻 - 苯二酚各 100 mg, 苯酚 50mg, 对 - 甲酚、邻 - 甲酚各 10 mg, 间 - 苯二酚、邻 - 甲酚各 5mg, 萃取溶液溶解定容至 25 mL, 配制酚一级标准溶液, 再稀释为其浓度 1/10、1/100 的二、三级标准溶液。分别取三级标准溶液 0.1、0.2、1.0mL, 二级标准溶液 0.2、0.4mL 于 10mL 容量瓶用萃取溶液定容, 得各浓度酚标准工作溶液。

2 结果与讨论

2.1 HPLC-UPLC 色谱条件的转换

2.1.1 利用方法转换计算器对色谱条件进行 HPLC-UPLC 转换 根据 UPLC 与 HPLC 相同的分离原理——范德米特(van Deemeter)方程及在色谱柱与仪器构造上的差异, 沃特世公司提供了方法转换计算器, 可将 HPLC 色谱条件量化到 UPLC 上, 节约转化时间。

对 YC/T 255-2008 进行方法转换时, 计算器仅对进样量、流速及梯度洗脱时间进行了换算, 不改变流动相组成、柱温等其他条件。同时给出了 3 种梯度洗脱方案供选择, 分别是等比例缩放到 UPLC 上的梯度条件(a)、具有最佳分离度(b)和最快分析速度(c)的梯度条件。

计算得到新 UPLC 色谱条件如下: 流动相 A: 1%冰醋酸水溶液 B: 冰醋酸 - 乙腈 - 水(体积比 1:30:69); 梯度条件(a) 0min \rightarrow 13.07min :A相由 80% \rightarrow 0%; 流速 0.208mL \cdot min $^{-1}$; 梯度条件(b): 0min \rightarrow 6.7min :A相由 80% \rightarrow 0%; 流速 0.406 mL \cdot min $^{-1}$; 梯度条件(c) 0min \rightarrow 4.46min :A相由 80% \rightarrow 0%; 流速 0.611mL \cdot min $^{-1}$ 进样量 0.7 μ L。于单激发、发射波长(284nm/332nm), 30 $^{\circ}$ C 柱温^[4]条件下比较了酚混合标样的 3 种 UPLC 梯度洗脱结果, 见图 1(由于对、间 - 甲酚性质接近, 无法分开, 因此 YC/T 255-2008 和 UPLC 方法都是测定对、间 - 甲酚总量)。虽然 3 种 UPLC 方法分析时间较少(分别为 9、

4.5 和 3min), 但却存在间、对 - 甲酚与邻 - 甲酚未完全达到基线分离(分离度分别为 1.42、1.35、1.22), 其他化合物分离度过大的问题。且当以梯度条件(c) 0.611mL \cdot min $^{-1}$ 的流速分析时, 柱压最高可达 54.6MPa, 不利于仪器及色谱柱的长期使用。可见, 仅凭方法转换计算器没有得到最佳色谱分离条件。

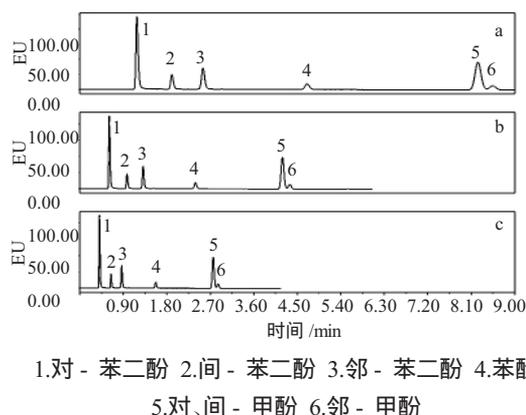


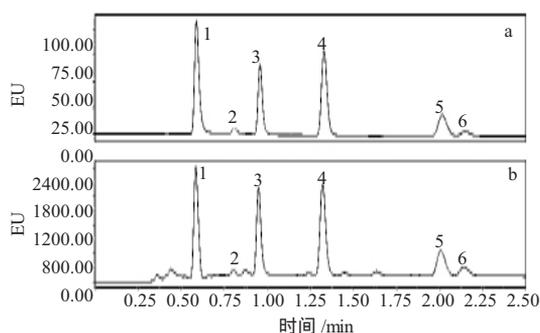
图 1 不同梯度条件酚类化合物混合标样超高效液相色谱图
Fig. 1 UPLC Chromatogram of standard phenolic compounds with different elution gradient conditions

2.1.2 最佳 UPLC 色谱条件的确定 由于方法转换计算器只能对色谱条件进行机械的几何转换及优化, 无法将 HPLC 与 UPLC 色谱柱在理化性质上的差异计算在内, 因此, 无法得到最佳色谱条件, 需进一步优化。

根据酚类化合物在 UPLC BEH C₁₈ 柱上的保留特性, 在梯度条件(b)基础上, 做了进一步优化: 首先, 将流动相 B 改为 1%的冰醋酸乙腈溶液, 增大了流动相梯度的极性选择范围, 有利于实际样品中低极性杂质的洗脱, 减少色谱柱污染; 采用适当增加有机溶剂比例而非流速的方式缩短酚类化合物的出峰时间, 节约了溶剂消耗, 降低了柱压; 最后通过延长适合对、间 - 甲酚与邻 - 甲酚出峰的流动相洗脱时间, 增加了对、间 - 甲酚、邻 - 甲酚在流动相与固定相间的交换次数, 使其达到了基线分离。

优化后的色谱条件为: 流速 0.4mL \cdot min $^{-1}$ 柱温: 30 $^{\circ}$ C 进样量 2 μ L。流动相 A: 1%冰醋酸水溶液 B: 冰醋酸 - 乙腈(体积比 1:99); 梯度条件 0min \rightarrow 0.31min :A相由 92% \rightarrow 84% 0.31min \rightarrow 0.5 min :A相由 84% \rightarrow 75% 0.31min \rightarrow 0.5 min :A相由 84% \rightarrow 75%, 0.5min \rightarrow 2min :A相 75% 2min \rightarrow 2.5 min :A相由 75% \rightarrow 0% 2.5min \rightarrow 3.5 min :A相由 0% \rightarrow 92%; 运行时间 5min。得到的酚类化合物混合标样及烟样的超高效液相色谱图见图 2。酚类化合物的在 2.5min 内实现了基线分离, 且色谱柱压较低(38MPa 以下), 是最佳

色谱条件。



1.对-苯二酚 2.间-苯二酚 3.邻-苯二酚 4.苯酚
5.对、间-甲酚 6.邻-甲酚

图2 酚类化合物的混合标样(a)烟样(b)超高效液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of phenolic compounds of standard sample (a) and sample (b)

2.2 荧光检测波长的选择

由于各个酚类化合物的最大检测波有差异,为提高分析灵敏度,通过扫描荧光激发、发射光谱的方法测定了各酚类化合物的最大激发、发射波长(表1)。

表1 卷烟样品主流烟气中酚类化合物的含量($\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1}$)

Tab.1 The phenolic compounds content in mainstream cigarette smoke

成分	对-苯二酚	间-苯二酚	邻-苯二酚	苯酚	对+间-甲酚	邻-甲酚
1	53.1	2.0	80.9	25.4	16.6	6.1
2	47.2	1.8	69.1	20.7	13.7	5.1
3	50.5	1.9	64.7	19.6	13.2	5.1
4	45.8	1.7	60.5	14.9	10.4	3.5
5	58.6	2.2	78.0	41.9	24.7	10.0

除对-苯二酚(最大激发/发射波长为284nm/332nm)外,其他酚类化合物的最大激发和发射波长相差不大,分别在270nm和300nm上下5nm内。结合这些目标化合物在UPLC条件下的出峰顺序确定了程序波长0min 激发/发射波长284nm/332nm 0.7min: 激发/发射波长270nm/300nm。

2.3 方法学验证

采用1.2的前处理方法、2.1.2、2.1.3确定的UPLC色谱分析条件建立了UPLC测定酚类化合物的方法,进行了方法学验证,并用于实际样品分析。

2.3.1 线性关系、检测限考察 取1.3各浓度酚标准工作溶液,进行UPLC分析,以峰面积(Y)与浓度(X, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行线性回归,得各酚类化合物的线性回归方程,线性关系良好($r > 0.9999$)。以信噪比为3确定检测限,对-苯二酚、间-苯二酚、邻-苯二酚、苯酚、对、间-甲酚和邻-甲酚的检出限依次为11.5、20.7、18.3、3.1、9.8和1.2 $\text{ng}\cdot\text{支}^{-1}$,远低于烟中酚

类化合物实际水平,说明本方法灵敏度较高。

2.3.2 回收率和精密度 抽吸相同卷烟10份,平均分成2组,其中1组加入一级标准溶液0.05mL,另一组不加。分别进行萃取和UPLC分析。根据标样加入量、加标前后酚类化合物测定量计算回收率,根据未加标的一组样品的平行测定量计算相对标准偏差(RSD),得6种酚的RSD为2.1%~3.6%,平均回收率90.1%~109.9%,说明本方法的准确性较高,重复性较好。

2.3.3 几种卷烟样品主流烟气中酚类化合物的测定

采用本方法测定了5种国产市售烤烟型卷烟样品主流烟气中酚类化合物的含量,结果见表1。

由表1可知,与HPLC测定样品结果比较^[6],其结果在合理的范围内。说明新建立的UPLC方法适用于卷烟样品主流烟气中酚类化合物的日常测定。

3 结论

使用UPLC建立了主流烟气中酚类化合物的快速分析方法。该方法线性关系良好($r^2 > 0.9999$),RSD为2.1%~3.6%,回收率90.1%~109.9%,检测限1.2~20.7 $\text{ng}\cdot\text{支}^{-1}$,满足检测需要,且单一样品耗时、溶剂用量仅为传统HPLC方法的1/8和1/20,适合长期、大批量酚类化合物分析。

在HPLC-UPLC方法转换上,选择与原HPLC所使用色谱柱理化性质差异小、对目标分析物有良好选择性的小颗粒填料色谱柱是实现方法快速转换、取得良好分离结果的关键,仅靠方法转换计算器无法得到最佳的色谱条件。对于大多数成分简单、使用常见色谱柱分析的化合物,通过梯度条件再优化可在UPLC上得到良好分离结果,UPLC快速、节省溶剂的优势显著;但是在对成分复杂、理化性质接近,对分离柱的选择性有特殊要求的样品进行分析时,生产厂家及种类较少,选择面窄的小颗粒填料色谱柱则会使UPLC的应用受到限制。

参 考 文 献

- [1] 梅媛,石莹莹,朱家文,等.超高效液相色谱在化妆品添加剂分析中的应用[J].生命科学仪器,2009,(7):7-11.
- [2] 周新,陈会明,白桦,等.HPLC与UPLC色谱条件转换方法研究[J].分析实验室,2008,27(4):74-76.
- [3] Gruz, J., Novk, O., Strnad, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2008, 111(3):789-794.
- [4] 全国烟草标准化技术委员会.YC/T 255-2008, 卷烟主流烟气中主要酚类化合物的测定 高效液相色谱法[S]. 北京: 国家标准出版社, 2008.

(下转第38页)

程度上讲,膜组件型式的优劣是衡量渗透蒸发分离技术研究水平高低的主要标准,最后,政府环境保护宏观政策的倾向性也会成为渗透蒸发分离技术发展的重要支配因素。

参 考 文 献

- [1] 姜忠义,徐海全,等.水溶液中挥发性有机化合物渗透蒸发分离技术[J].现代化工,2000,20(12):23-26.
- [2] 姜忠义,徐海全,等.水中 VOCs 的渗透蒸发分离技术研究进展[J].化工环保,2001,21(4):209-213.
- [3] Ming Peng, Leland M. Vane. Recent advances in VOCs removal from water by pervaporation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2003, B98:69-90.
- [4] Frank Lipnizki, Stephan Hausmanns. Organophilic pervaporation: prospects and performance[J]. Chemical Engineering Journal, 1999, 73:113-129.
- [5] Bennett M, Brisdon B J, England R, et al. Performance of PDMS and organofunctionalised PDMS membranes for the pervaporative recovery of organics from aqueous streams[J]. J. Membr. Sci., 1997, 137(1-2):63-88.
- [6] Boom J P, Pünt I G M, Zwijnenberg H, et al. Transport through zeolite filled polymeric membranes[J]. J. Membr. Sci., 1998, 138(2):237-258.
- [7] Yamaguchi T, Tomimaga A, Kimura S. Chlorinated organics removal from water by plasma-graft filling polymerized membranes[J]. AIChE J., 1996, 42(3):892-895.
- [8] Yamaguchi T, Suzuki T, Kai T, et al. Hollow-fiber-type pore-filling membranes made by plasma-graft polymerization for the removal of chlorinated organics from water[J]. J. Membr. Sci., 2001, 194(2):217-228.
- [9] Mishima S, Nakagawa T. Sorption and diffusion of volatile organic compounds in fluoroalkyl methacrylate-grafted PDMS membrane[J]. J. Appl. Polym. Sci., 2000, 75(6):773-783.
- [10] Bennett M, Brisdon B J, England R, et al. Performance of PDMS and organofunctionalised PDMS membranes for the pervaporative recovery of organics from aqueous streams[J]. J. Membr. Sci., 1997, 137(1-2):63-88.
- [11] Uragami T, Yamada H, Miyata T. Removal of dilute volatile organic compounds in water through graft copolymer membranes consisting of poly(alkylmethacrylate) and poly(dimethylsiloxane) by pervaporation and their membrane morphology[J]. J. Membr. Sci., 2001, 187(12):255-269.
- [12] Dutta B K, Sikdar S K. Separation of volatile organic compounds from aqueous solutions by pervaporation using S-B-S block copolymer membrane[J]. Environ. Sci. Technol., 1999, 33(10):1709-1716.
- [13] Hoshi M, Saitoh T, Yoshioka C, et al. Pervaporation separation of 1,1,2-trichloroethane-water mixture through crosslinked acrylate copolymer composite membranes[J]. J. Appl. Polym. Sci., 1999, 74(4):983-994.
- [14] Jou J D, Yoshida W, Cohen Y. A novel ceramic-supported polymer membrane for pervaporation of dilute volatile organic compounds[J]. J. Membr. Sci., 1999, 162(1-2):269-284.
- [15] Xiaogang Hao, Mark Pritzker, Xianshe Feng. Use of pervaporation for the separation of phenol from dilute aqueous solutions[J]. Journal of Membrane Science, 2009, 335:96-102.
- [16] Guido Busca, Silvia Berardinella, Carlo Resinia, Laura Arrighi. Technologies for the removal of phenol from liquid streams: A short review of recent developments[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 160:265-288.
- [17] Kondo M, Sato H. Treatment of wastewater from phenolic resin process by pervaporation[J]. Desalination, 1994, 98:147-154.
- [18] 平郑骅,叶匀分,等.渗透蒸发在挥发性有机污水处理中的应用[J].上海化工,1999(7):13-15.
- [19] 韩煦,刘家祺,等.渗透蒸发脱水溶液中挥发性有机物[J].化学工业与工程,2003,20(1):1-5.
- [20] M. Khayeta, C. Cojocarub, G. Zakrzewska-Trznadelc. Studies on pervaporation separation of acetone, acetonitrile and ethanol from aqueous solutions[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 63:303-310.

(上接第 31 页)

- [5] 全国烟草标准化技术委员会. GB/T 19609-2004 卷烟用常规分析用吸烟机测定总粒相物和焦油[S]. 烟草技术标准汇编(九). 北京:中国标准出版社,2006.
- [6] 谢复炜,赵明月,王昇,等.卷烟主流、侧流烟气中酚类化合物的高效液相色谱测定[J].烟草科技,2004(5):6-10.