

烟叶中 26 种挥发性与半挥发性有机酸的 GC - MS / SIM 法同时分析

郭 磊¹, 刘惠民², 谢复炜², 赵晓东², 廖 堃¹, 张世楠¹

(1. 江西中烟工业公司技术研发中心, 江西 南昌 330069; 2 中国烟草总公司
郑州烟草研究院 烟草化学重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘 要: 采用加速溶剂萃取, 以二氯甲烷 - 乙腈 (体积比 1 :2) 为萃取溶剂, N,O 双 (三甲基硅基) 三氟乙酰胺硅烷化, 反 -2-己烯酸和肉桂酸为内标, GC - MS/SIM 法同时测定了烟叶中的甲酸、乙酸、乳酸、苯甲酸、十六酸、十八酸等 26 种挥发性、半挥发性有机酸。方法的回收率为 81%~106%, 相对标准偏差为 1.73%~7.08%, 检出限为 0.1~13.72 $\mu\text{g/g}$ 。以该方法对部分烟叶样品中挥发性、半挥发性有机酸进行了定量分析。

关键词: 气相色谱 - 质谱; 加速溶剂萃取; 烟叶; 有机酸

中图分类号: O657.63; TS411 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)07 - 0739 - 05

Simultaneous Determination of 26 Volatile and Semi-volatile Organic Acids in Tobacco by GC - MS/SIM

GUO Lei¹, LIU Huimin², XIE Fuwei², ZHAO Xiaodong², LAO Kun¹, ZHANG Shinan¹

(1. China Tobacco Jiangxi Industrial Company Research & Development Center, Nanchang 330069, China;

2. Key Laboratory of Tobacco Chemistry, Zhengzhou Tobacco Research Institute of
China Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The volatile and semi-volatile organic acids in cigarettes were extracted with a dichloromethane - acetonitrile (1 :2, by volume) mixture solvent by accelerated solvent extraction (ASE), then derivatized with N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide. The GC - MS/SIM method for simultaneous determination of 26 organic acids, including formic acid, acetic acid, lactic acid, benzoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid etc., was developed by using *trans*-2-hexenoic acid and cinnamic acid as dual internal standards. The recoveries of the method ranged from 81% to 106% with RSDs of 1.73% - 7.08%. The limits of detection ranged from 0.1 to 13.72 $\mu\text{g/g}$. The contents of volatile and semi-volatile organic acids in some tobacco samples were determined using this method.
Key words: GC - MS/SIM; accelerated solvent extraction; tobacco; organic acids

有机酸尤其是挥发性和半挥发性有机酸对烟草和卷烟的质量有着重要的影响, 烟草中的有机酸种类繁多, 含量差异大, 研究这些有机酸的种类和含量对了解烟草的内在质量和改进卷烟配方具有重要的指导意义。烟草有机酸传统的分析方法主要有连续流动法^[1]、GC^[2]、GC - MS^[3]、HPLC^[4]、IC^[5]和 CE^[6]等, 但这些方法均不能实现挥发性和半挥发性有机酸的同时分析。尤其是烟草中含量较高的甲酸、乙酸等低相对分子质量的脂肪酸, 由于它们的水溶性、挥发性强, 采用传统的分析方法很难进行定量分析, 这是目前烟草有机酸分析中亟待解决的问题。

加速溶剂萃取法 (accelerated solvent extraction, ASE) 是将样品放在密封的萃取池中, 加热到较高的温度 (通常 50~200 $^{\circ}\text{C}$), 引起容器中压力升高, 同时给予一定压力 (通常 10 342.5~13 790 kPa), 使溶剂保持液态, 从而可以大大提高萃取效率。相比于常温和常压, ASE 的萃取溶剂用量少, 萃取时间短, 萃取效率高。

本工作采用加速溶剂萃取, N,O 双 (三甲基硅基) 三氟乙酰胺衍生化, 以 GC - MS/SIM 法实现了对挥发、半挥发性有机酸的同时定量分析。

收稿日期: 2007 - 10 - 30; 修回日期: 2008 - 01 - 19

第一作者: 郭 磊 (1982 -), 男, 河南平顶山人, 助理工程师, 硕士

通讯作者: 刘惠民, Tel: 0371 - 67672698, E-mail: liuhm@ztri.com.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

6890/5975气相色谱 质谱联用仪 (美国 Agilent公司), ASE200加速溶剂萃取仪 (美国 Dionex公司), 分析天平 (德国 Sartorius公司)。

25种常见有机酸 (Acros Organics公司); 乳酸、羟基乙酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙酸苯乙酯、反-2-己烯酸、肉桂酸 (Acros Organics公司); N,O-双 (三甲硅基) 三氟乙酰胺 (BSTFA) (Fluka公司); 二氯甲烷、乙腈为色谱纯试剂 (J & T Baker公司)。

1.2 溶液配制

根据预实验的结果, 配制有机酸母液, 以二氯甲烷-乙腈 (体积比 1 :2)定容, 其浓度如表 1所示。在同一个容量瓶中, 内标反-2-己烯酸 (IS1)和肉桂酸 (IS2)配制成 0.96 g/L和 5.19 g/L的乙腈溶液。内标 (IS3)乙酸苯乙酯配成 2.51 g/L的乙腈溶液。

准确移取有机酸母液 10 mL, 置于 25 mL容量瓶中, 加入乙酸苯乙酯溶液 20 μL, 反-2-己烯酸溶液和肉桂酸溶液 50 μL, 以二氯甲烷-乙腈 (体积比 1 :2)混合溶液定容, 摇匀, 得到工作曲线中的最高浓度有机酸标液 (用于有机酸衍生化条件优化)。

1.3 实验样品

2006年烤烟烟叶 (云烟 87, B2F); 2005年烟叶样品 (7种): 玉溪烤烟 C3F、柳州烤烟 C3F、盘县烤烟 C3F、三明烤烟 C3F、龙岩烤烟 B2F、陆良烤烟 B2F、建始香料烟 COTT/S。

1.4 实验方法

1.4.1 气相色谱与质谱条件 GC条件: DB-5MS石英毛细管柱 (50 m ×0.25 mm i.d. ×0.25 μm d.f.); 初始炉温 40 °C, 保持 3 min, 以 4 °C/min升至 280 °C, 保持 40 min; 进样口温度 280 °C; 载气为氦气, 流速 1.0 mL/min; 分流比为 10 :1。质谱条件: 采用 E源, 电子轰击能量 70 eV, 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C; SM模式检测。各有机酸衍生化产物的选择离子如表 1所示。

表 1 有机酸母液质量浓度及衍生物的选择离子
Table 1 The original concentrations of organic acids and their derivative ions selected for analysis

Compounds	Original concentration ρ/(mg · L ⁻¹)	Selected ion m/z	Compounds	Original concentration ρ/(mg · L ⁻¹)	Selected ion m/z
Formic acid (甲酸)	194.69	103	Benzoic acid (苯甲酸)	2.47	179
Acetic acid (乙酸)	236.38	117	Octanoic acid (辛酸)	1.08	201
Propanoic acid (丙酸)	1.41	131	Nonanoic acid (壬酸)	0.82	215
Butyric acid (丁酸)	1.14	145	Decanoic acid (癸酸)	0.52	229
2-Methyl butanoic acid (2-甲基丁酸)	2.60	159	Cinnamic acid (肉桂酸)*	-	161
3-Methyl butanoic acid (3-甲基丁酸)	0.84	159	Dodecanoic acid (十二酸)	1.29	257
Pentanoic acid (戊酸)	1.07	159	Tetradecanoic acid (十四酸)	31.84	285
3-Methyl pentanoic acid (3-甲基戊酸)	1.00	173	Palmitic acid (十六酸)	2.53	299
4-Methyl pentanoic acid (4-甲基戊酸)	0.55	173	Hexadecanoic acid (十六酸)	335.16	313
Lactic acid (乳酸)	66.96	117	Heptadecanoic acid (十七酸)	28.22	327
Hexanoic acid (己酸)	2.66	173	Linoleic acid (亚油酸)	251.86	337
Hydroxyacetic acid (羟基乙酸)	50.18	205	Linolenic acid (亚麻酸)	374.62	335
trans-2-Hexenoic acid (反-2-己烯酸)*	-	171	Oleic acid (油酸)	125.93	339
2-Furancarboxylic acid (2-呋喃甲酸)	3.69	125	Octadecanoic acid (十八酸)	121.22	341
Heptylic acid (庚酸)	0.60	187			

* internal standard (内标)

1.4.2 样品的处理方法与加速溶剂萃取的条件 取烟叶, 粉碎后过 425 μm 筛, 烟末装入密封袋中保存 (水分测量采用行业标准 YC/T31^[7])。准确称取 0.500 g烟末, 装入萃取池中, 加入反-2-己烯酸溶液 (IS1)和肉桂酸溶液 (IS2) 50 μL, 进行加速溶剂萃取。条件如下: 萃取池体积: 11 mL, 提取溶剂: 二氯甲烷-乙腈 (体积比 1 :2), 炉温: 100 °C, 系统压力: 10 342.5 kPa, 加热时间: 15 min, 萃取时间: 15 min, 萃取次数: 3次, 氮气吹扫时间: 90 s。

取经过 0.45 μm 滤膜过滤的提取液 1 mL, 转入色谱瓶中, 加入 100 μL BSTFA, 密封, 在 60 °C水

浴中衍生化 40 min, 取出冷却至室温, 供 GC - MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 内标物的选择

由于待测的 27 种有机酸的保留时间跨度比较大, 各成分之间的含量差异大, 单内标法不能对每种有机酸都准确定量。根据预实验的结果, 本文选择反-2-己烯酸和肉桂酸 2 个内标进行定量分析。有机酸标样和烟叶样品中有机酸衍生物的选择离子色谱图如图 1 所示。

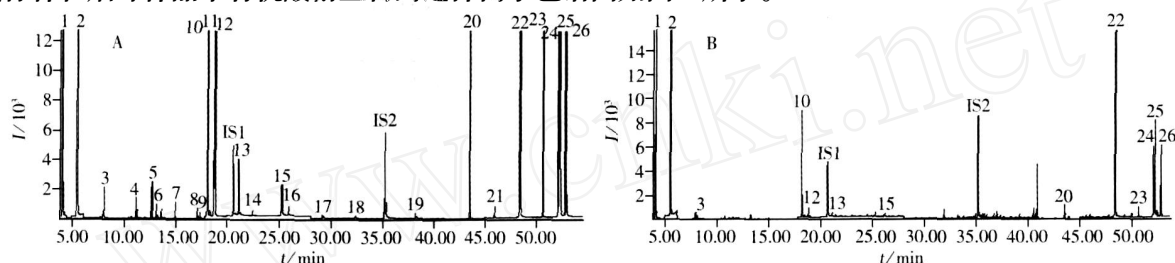


图 1 有机酸标样衍生物 (A) 及烟草样品 (B) 的选择离子色谱图

Fig. 1 Selected ion monitoring chromatograms of (A) derivatives of organic acid standard sample and (B) tobacco sample

1. formic acid; 2. acetic acid; 3. propanoic acid; 4. butyric acid; 5. 2-methyl butanoic acid; 6. 3-methyl butanoic acid; 7. pentanoic acid; 8. 3-methyl pentanoic acid; 9. 4-methyl pentanoic acid; 10. lactic acid; 11. hexanoic acid; 12. hydroxyacetic acid; IS1. *trans*-2-hexenoic acid; 13. 2-furancarboxylic acid; 14. heptylic acid; 15. benzoic acid; 16. octanoic acid; 17. nonanoic acid; 18. decanoic acid; IS2. cinnamic acid; 19. dodecanoic acid; 20. tetradecanoic acid; 21. palmitic acid; 22. hexadecanoic acid; 23. heptadecanoic acid; 24. linoleic acid; 25. oleic acid and linolenic acid (selected characterized ions m/z 339, 335 can be separated); 26. octadecanoic acid

2.2 衍生化条件的选择

实验中, 以不参与衍生化反应的乙酸苯乙酯为内标 (IS3, 特征离子为 m/z 104), 以各有机酸衍生化产物与乙酸苯乙酯峰面积的比值为指标 (选择甲酸、乙酸、己酸、2-呋喃甲酸、苯甲酸、十四酸、十六酸、油酸、十八酸 9 种有代表性的有机酸), 主要考察了衍生化温度、时间和衍生化试剂 (BSTFA) 的用量对各种有机酸衍生化效率的影响 (注: 以相同方法选择 ASE 参数)。

2.2.1 有机酸标样衍生化条件的选择 取最高浓度标准溶液 (1 mL/份), 分别于不同的衍生化温度 (25、40、50、60、70、80 °C)、不同的衍生化时间 (10、20、30、40、50、60 min) 和不同 BSTFA 用量 (10、20、30、40、50、60 μ L) 条件下进行衍生化反应, 考察有机酸标样的衍生化效率。

结果显示: 衍生化温度和时间对有机酸衍生化效率的影响不大, 而衍生化试剂的用量对衍生化效率的影响较大, 用量不足会导致衍生化反应不完全, 影响定量分析。最终确定有机酸标样的衍生化条件为: 衍生化温度 60 °C; 时间 40 min; BSTFA 用量 40 μ L。

2.2.2 样品 BSTFA 的用量 由于样品成分复杂, 如一些醇类、酚酸等也会和 BSTFA 发生反应, 消耗一定量的 BSTFA, 因此, 相应增加了 BSTFA 的用量。

取“1.4.2”中的提取液 (1 mL/份), 分别加入一定量 BSTFA (40、60、80、100、120 μ L), 按优化条件进行衍生化反应后, 进样分析。结果表明: 当 BSTFA 用量为 100 μ L 时, 样品中各种有机酸的衍生化效果较好。

2.3 提取条件的选择

实验主要对提取溶剂 (二氯甲烷与乙腈的体积比分别为 2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4)、温度 (60、70、80、90、100、110 °C) 和时间 (5、10、15、20、25 min) 3 个条件进行了优化^[8-10]。结果表明: 当二氯甲烷与乙腈体积比为 1 : 2 时, 各有机酸的提取效果均较好; 各种有机酸的提取效率随着温度的升高而增加, 当提取温度超过 100 °C 以后, 再升高温度提取效率基本上不再变化; 随着提取时间的增加, 各有机酸的提取效率有所增加, 当提取时间为 15 min 时, 各酸的提取效率均比较好。最终确定的 ASE 参数为: 提取温度 100 °C, 提取时间 15 min。

2.4 工作曲线与检出限

准确移取有机酸母液 0.25、0.5、1.0、2、5、10 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 加入 50 μ L 反 -

2-己烯酸和肉桂酸溶液，以二氯甲烷 - 乙腈 (体积比 1 :2)混合溶液定容，摇匀，得到一系列已加标的不同浓度的标准溶液。

取不同浓度的标准溶液各 1.0 mL，以优化的条件进行衍生化反应后，进样分析。以峰面积比 (甲酸~癸酸、乳酸、羟基乙酸、2-呋喃甲酸以反-2-己烯酸为内标；苯甲酸、十二酸~十八酸以肉桂酸为内标)对浓度比作图，制作工作曲线，回归方程及检出限见表 2。

表 2 有机酸的工作曲线、相关系数、检出限、相对标准偏差、样品含量和回收率

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, detection limits, relative standard deviations, contents in sample and recoveries of organic acids

Compounds	Linear regression equation (n = 2)	Correlation coefficients r	Detection limits w / (μg · g ⁻¹)	RSD (n = 6) s _r / %	Content w / (μg · g ⁻¹)	Recovery R / %
Formic acid	y = 2.491 1x - 0.592 6	0.999 4	11.5	4.13	139.2	99
Acetic acid	y = 1.988 9x - 0.386 6	0.999 7	13.7	3.33	158.5	95
Propanoic acid	y = 1.844 5x + 0.002 8	0.999 7	0.1	4.59	1.3	90
Butyric acid	y = 1.255 7x + 0.004 7	0.999 9	0.1	6.18	0.2	84
2-Methyl butanoic acid	y = 0.957 7x + 0.000 9	0.999 8	0.1	6.07	0.9	89
3-Methyl butanoic acid	y = 1.041 8x + 0.000 7	0.999 9	0.2	6.44	0.5	92
Pentanoic acid	y = 1.083 9x + 0.001 6	0.999 9	0.1	4.35	1.0	81
3-Methyl pentanoic acid	y = 0.674 2x - 0.000 6	0.999 9	0.1	5.34	0.3	92
4-Methyl pentanoic acid	y = 0.756 4x - 0.000 4	0.999 8	0.2	6.36	-	84
Hexanoic acid	y = 0.914 8x - 0.006 6	0.999 7	0.1	2.11	1.4	86
Lactic acid	y = 1.245 6x - 0.278 9	0.999 5	2.3	4.02	68.7	89
Hydroxyacetic acid	y = 0.481 2x - 0.104 5	0.999 5	1.1	2.79	25.9	86
2-Furancarboxylic acid	y = 1.263 9x - 0.018 8	0.999 4	0.2	4.7	3.7	97
Heptylic acid	y = 0.622 9x - 0.000 2	0.999 8	0.1	2.58	0.2	96
Benzoic acid	y = 4.381 5x + 0.001 1	0.999 4	0.3	5.42	2.3	97
Octanoic acid	y = 0.646 4x - 0.001 9	0.999	0.1	7.08	0.7	103
Nonanoic acid	y = 0.432x + 0.000 1	0.999 1	0.3	6.06	0.9	93
Decanoic acid	y = 0.418 4x - 0.000 1	0.999 4	0.1	6.74	0.5	106
Dodecanoic acid	y = 0.895x + 0.000 6	0.999 5	0.2	5.23	1.1	97
Tetradecanoic acid	y = 1.721x - 0.099 1	0.995 6	1.0	4.38	29.8	94
Palmitic acid	y = 0.943 8x - 0.000 4	0.999 6	0.3	2.83	7.3	90
Hexadecanoic acid	y = 4.523 5x - 3.175 9	0.997 5	3.1	2.51	357.6	93
Heptadecanoic acid	y = 2.143 1x - 0.112 9	0.994 8	0.6	1.73	22.4	93
Linoleic acid	y = 1.026 3x - 0.775 2	0.994 7	3.1	1.85	330.6	82
Linolenic acid	y = 0.627 4x - 0.559 9	0.998 5	5.4	1.73	401.0	84
Oleic acid	y = 2.490 5x - 0.589 3	0.999 1	1.4	1.88	96.0	84
Octadecanoic acid	y = 4.205 3x - 0.961 2	0.997 6	1.7	4.13	93.8	99

2.5 方法的回收率与精密度

采用标样加入法测定回收率。将与样品含量相当的一定量标样加入样品中，将加标样品和未加标样品平行进行前处理和定量分析，测定回收率在 81%~106%之间；在相同条件下对样品进行 6次平行测定，相对标准偏差在 1.73%~7.08%，结果见表 2。

2.6 部分烟叶样品中挥发、半挥发性有机酸的分析

采用本方法测定了 7种烟草样品中挥发、半挥发性有机酸的含量。每个样品进行 2次平行测定，取其平均值，各有机酸的定量结果如表 3所示。烟叶类型和部位不同，各种有机酸的含量有所变化。

表 3 7种烟草样品中挥发、半挥发性有机酸的含量 (μg/g) *

Table 3 The contents of volatile and semi-volatile organic acids in seven tobacco samples(μg/g) *

Tobacco samples (烟叶样品)	C3F (玉溪烤烟)	C3F (柳州烤烟)	C3F (盘县烤烟)	C3F (三明烤烟)	B2F (龙岩烤烟)	B2F (陆良烤烟)	COTT/S (建始香料烟)
Formic acid	744.9	770.3	791.3	901.9	450.8	709.9	168.6
Acetic acid	481.8	659.9	1 024.6	802.5	277.6	626.1	308.7
Propanoic acid	3.4	5.2	6.2	5.5	3.5	5.4	3.1
Butyric acid	0.5	0.7	0.6	0.8	0.6	0.8	0.6
2-Methyl butanoic acid	3.5	4.2	3.8	3.0	3.1	5.9	2.4
3-Methyl butanoic acid	1.5	2.2	1.8	1.4	1.8	1.8	6.7

(续表 3)

Tobacco samples (烟叶样品)	C3F (玉溪烤烟)	C3F (柳州烤烟)	C3F (盘县烤烟)	C3F (三明烤烟)	B2F (龙岩烤烟)	B2F (陆良烤烟)	COTT/S (建始香料烟)
Pentanoic acid	1.6	2.0	1.8	2.2	1.8	1.7	2.3
3-Methyl pentanoic acid	0.5	0.8	0.5	0.4	0.4	0.8	0.3
Hexanoic acid	2.8	2.9	2.5	2.8	2.9	2.9	3.6
Lactic acid	385.9	353.5	413.0	320.9	338.0	435.3	105.8
Hydroxyacetic acid	101.5	91.7	82.0	118.7	138.6	91.6	46.3
2-Furancarboxylic acid	22.6	19.5	14.9	24.0	25.3	17.6	9.1
Heptylic acid	0.6	0.7	0.5	0.6	0.7	0.6	0.8
Benzoic acid	5.6	6.7	5.4	6.3	6.8	5.7	66.0
Octanoic acid	2.4	2.6	1.9	2.4	3.0	2.6	2.6
Nonanoic acid	2.9	3.2	2.5	2.7	2.8	2.8	4.0
Decanoic acid	2.6	2.8	2.9	2.3	3.3	3.4	2.9
Dodecanoic acid	4.1	4.8	3.4	3.7	4.1	4.5	3.1
Tetradecanoic acid	69.2	69.1	65.2	59.2	64.5	70.5	54.8
Palmitic acid	29.5	28.4	25.2	24.8	27.9	28.6	37.6
Hexadecanoic acid	1 023.4	1 059.8	930.5	1 059.5	998.7	917.7	525.7
Heptadecanoic acid	53.1	57.0	49.2	53.4	54.1	47.4	36.4
Linoleic acid	793.2	803.7	700.0	746.6	787.1	764.1	473.6
Linolenic acid	1 110.5	1 054.9	989.4	1 002.3	960.8	935.3	533.9
Oleic acid	277.6	290.8	243.8	305.2	269.6	249.0	157.0
Octadecanoic acid	238.2	268.9	235.3	248.8	235.9	224.9	149.1
Tobacco samples	5 363.2	5 566.5	5 598.1	5 702.1	4 663.7	5 156.6	2 705.0

* 4-methyl pentanoic acid wasn't determined because its low concentration (4-甲基戊酸的含量很低, 未做定量分析)

参考文献:

- [1] 于瑞国, 王蕾, 孟广宇, 等. 烟草及烟草制品总挥发酸的测定——连续流动法[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 101 - 103.
- [2] 刘百战, 徐亮, 胡便霞. 卷烟中非挥发性有机酸及某些高级脂肪酸的分析[J]. 烟草科技, 2000, (1): 25 - 27.
- [3] 李炎强, 申进朝, 刘克建. GC/MS 技术分析烟草挥发性、半挥发性酸性成分[J]. 分析化学, 2004, (5): 694.
- [4] Q U Jinshu. Statistics aided optimization for HPLC analysis of organic acids in tobacco[J]. J Chromatogr. A, 1999, 859: 153 - 158.
- [5] Q U Jinshu, J N Xiaohong. Development and optimization of organic acid analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection[J]. J Chromatogr. A, 2002, 950(1/2): 81 - 88.
- [6] SADECKA J, POLONSKY J. Determination of organic acids in tobacco by capillary isotachopheresis[J]. J Chromatogr. A, 2003, 988(1): 161 - 165.
- [7] YC/T31 - 1996. 烟草及烟草制品试样的制备和水份的测定——烘箱法[S]. 1996.
- [8] CHEN S, GFRERER M, LANKMAYR E, et al. Optimization of accelerated solvent extraction for the determination of chlorinated pesticides from animal feed[J]. Chromatographia, 2003, 58: 631 - 636.
- [9] KREMER E, ROMPA M, ZYGMUNT B. Extraction of acidic herbicides from soil by means of accelerated solvent extraction[J]. Chromatographia, 2004, 60(Suppl): 169 - 174.
- [10] 徐晓勤, 李庆玲, 袁济瑞. 加速溶剂萃取 - 气相色谱质谱法测定太子参中酰胺类除草剂的含量[J]. 分析化学, 2007, (2): 206 - 210.