

文章编号:1006-6144(2008)02-0167-06

烟草中挥发性和非挥发性有机酸的快速测定

杨式华¹, 王保兴^{*1,2}, 许国旺², 武怡³, 邹悦¹, 李璐芸¹, 刘静¹

(1. 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 昆明 650106; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连 116023; 3. 红云烟草(集团)有限责任公司, 昆明 650202)

摘要:建立了气相色谱-质谱(GC-MS)法快速测定烟草中22种非挥发性、挥发性有机酸的分析方法。采用对甲苯磺酸-硫酸-甲醇(PTSA/H₂SO₄/CH₃OH)酯化试剂对烟草样品进行一次酯化,生成的有机酸酯用GC-MS进行分析。结果表明,酯化时间从20 h缩短到1 h,非挥发酸回收率在93.4%~103.2%之间,相对标准偏差(RSD)小于4.2%;挥发性有机酸回收率在89.2%~99.1%之间,RSD小于3.5%。该方法具有简便、快速、结果准确等特点,用于测定部分烟草样品的挥发性、非挥发性有机酸,取得了满意的结果。

关键词:烟草;挥发性有机酸;非挥发性有机酸;气相色谱-质谱;酯化

中图分类号:O657.63 **文献标识码:**A

有机酸广泛存在于烟草中,含量约为10%~16%,对卷烟的香气和吃味具有重要作用^[1],烟草有机酸包括非挥发性酸和挥发性酸,非挥发性有机酸(Nonvolatile Organic Acids, NVOAs)含量达7%左右,挥发性有机酸(Volatile Organic Acids, VOAs)则只有0.1%~0.2%^[2]。

对于烟草中有机酸的测定,有高效液相色谱法和气相色谱法^[3,4]。但是一次酯化测定烟草中非挥发酸和挥发酸的报道并不多见^[5],而且文献报道方法存在前处理较繁琐^[5,6]、酯化时间长^[6-9]、需要有机酸分析专用极性柱^[10]等不足。因此,参照文献^[11],本文使用PTSA/H₂SO₄/CH₃OH酯化试剂,对烟草中挥发性和非挥发性有机酸进行一次酯化,然后用正己烷萃取,并用气相色谱-质谱(GC-MS)分析非挥发酸;同时移取部分萃取液,用氮吹仪浓缩,在GC-MS上分析挥发酸。结果显示,该方法大大缩短了样品酯化时间^[8],具有快速、简单、准确等特点,适用于烟草非挥发酸和挥发酸的常规分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

6890/5973N 气-质联用仪,7683 自动进样器(美国,Agilent 公司);N-EVAP 111 氮吹仪(美国,Organo-mation Associates, Jnc. 公司);AB204-S 型电子天平(瑞士,METTLER TOLEDO 公司);13 mm × 0.45 μm 针筒式微孔滤膜过滤器(天津腾达过滤器件厂)。

甲醇,正己烷(色谱纯,美国 DIKMA 公司);浓硫酸,对甲基苯磺酸(分析纯,成都化学试剂厂)。

标准品:山梨酸(挥发酸内标)、己二酸(非挥发酸内标)。丁酸,异戊酸,戊酸,3-甲基戊酸,己酸,辛酸,苯甲酸,苯乙酸,壬酸,癸酸,草酸,丙二酸,丁烯二酸,丁二酸,苹果酸,柠檬酸,棕榈酸,亚油酸,油酸,硬脂酸和二十酸(分析纯,美国 ChemService 公司)。混合内标溶液:用己二酸和山梨酸配制相应的混合内标甲醇溶液;酯化溶液:配制含10% H₂SO₄和10%对甲苯磺酸的甲醇溶液。

样品为大理地区2005年三个县种植的红大品种,并且是自然陈化半年的烟叶。将样品分为A、B、C三个区域。A为大理巍山县,B为大理祥云县,C为大理弥渡县。

收稿日期:2007-03-12 修回日期:2007-05-15

* 通讯联系人:王保兴,男,博士,副研究员,主要从事烟草化学研究。

1.2 仪器条件

色谱柱:DB-5MS(30 m ×0.25 mm ×0.25 μm);进样口温度 260 ;接口温度 280 ;载气:He,流速 1.0 mL/min;程序升温:50 下保持 1 min,以 5 /min 的速率升至 275 ,保持 3 min;进样量:1.0 μL,分流比 10:1,扫描范围:35~350 amu,离子源温度:230 ,EI 电子能量:70 eV。

1.3 实验方法

烟草样品在 45 下烘 1 h,粉碎,过 60 目筛备用。称取 0.50 g 样品放入锥形瓶中,加 1.0 mL 混合内标溶液和 5.0 mL 酯化溶液,于 55 下酯化 1 h,冷至室温,加 20 mL 正己烷,振荡萃取 15 min,静置分层后,取上层正己烷清液约 1.0 mL,用 GC/MS 分析烟草中的非挥发酸;另移取上层清液 10 mL,用氮吹仪浓缩至约 1.0 mL,用针筒式微孔滤膜过滤器过滤后上 GC/MS 分析挥发酸。采用 NIST2005 标准图谱库定性,双内标法定量。

2 结果与讨论

2.1 测定条件的确定

文献^[8]报道的有机酸酯化方法需要 22 h。使用 PTSA^[11]/H₂SO₄/CH₃OH 酯化试剂,大大缩短了酯化时间,较刘百战等^[8,9]报道方法快速。对样品酯化条件进行了优化,最终选取了 5 mL 酯化液、温度 55、时间 1 h 的酯化方法。文献^[9]报道酯化后多用二氯甲烷萃取,乳化效果严重,必须加水或盐才能良好分层;本文选择色谱纯的正己烷萃取,分层良好。非挥发酸含量一般较高,因此采取萃取液直接进样分析;而烟草中挥发酸含量(μg 级)远远低于非挥发酸(mg 级),而且挥发性较强,因此采用 N-EVAP 111 氮吹仪,对萃取液进行氮气吹扫低温浓缩后分析。

使用 MS 进行定性,双内标法同时对 12 个非挥发酸、10 个挥发酸进行了定量分析。所选择的有机酸代表了烟草中有机酸的典型分布,样品非挥发性、挥发性有机酸总离子流图(TIC)见图 1 和图 2(图 2 中的己二酸为非挥发酸内标)。

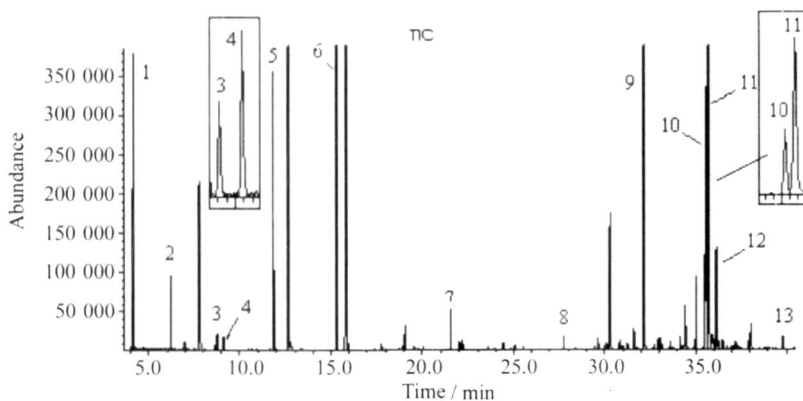


图 1 烟草中酯化非挥发性有机酸的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatogram of esterifiable NVOAs in tobacco sample

1. Oxalic, 2. Malonic, 3. Fumaric, 4. Succinic, 5. Malic, 6. Adipic (IS), 7. Citric, 8. Myristic, 9. Palmitic, 10. Linoleic, 11. Oleic, 12. Stearic, 13. Arachidic acid.

2.2 标准曲线

配制一系列不同浓度的非挥发性、挥发性有机酸标准品溶液,按照 1.3 样品处理方法酯化标准溶液,并用 GC-MS 测定,图 3、图 4 为非挥发酸、挥发酸标准品的总离子流图(图 3 中的己二酸为非挥发酸内标)。并根据内标法制作标准曲线。回归方程、相关系数列于表 1 中。从表 1 可以看出,非挥发酸的 R^2 除二十酸稍低(0.9985)外,均在 0.999 以上;挥发酸的 R^2 在 0.9994~1.0000 之间。方法线性关系良好。

2.3 重现性和回收率的测定

2.3.1 重现性 取同一烟草样品 5 份,按 1.3 方法进行测定,并计算 RSD,结果列于表 2 中。由表可知,非挥发酸中除柠檬酸的 RSD 为 4.18%,其它的有机酸 RSD 都小于 4.00%,这可能是由于柠檬酸含有三个羧基,其酯化没有其它有机酸完全,所以 RSD 略大。挥发酸的 RSD 除苯乙酸为 3.47%外,其他的都小

于 3.00 % ,完全满足样品分析精度要求。

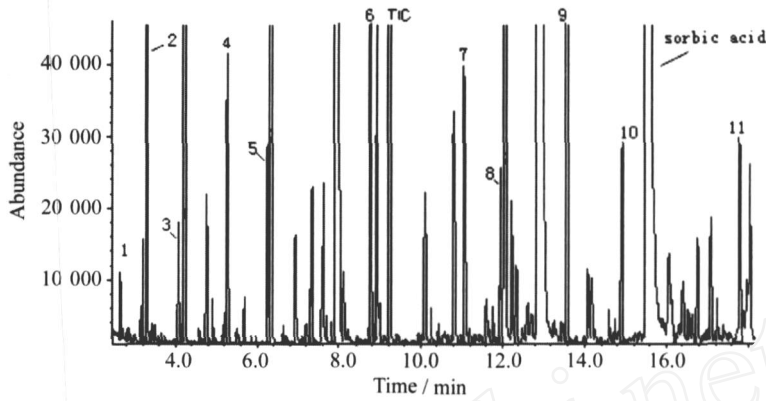


图 2 烟草中酯化挥发性有机酸的总离子流图

Fig. 2 TIC chromatogram of esterifiable VOAs in tobacco sample

1. Butyric, 2. Isovaleric, 3. Valeric, 4. 3-Methylpentanoic, 5. Caproic, 6. Sorbic (IS), 7. Benzoic, 8. Caprylic, 9. Phenyl acetic, 10. Pelargonic, 11. Capric acid.

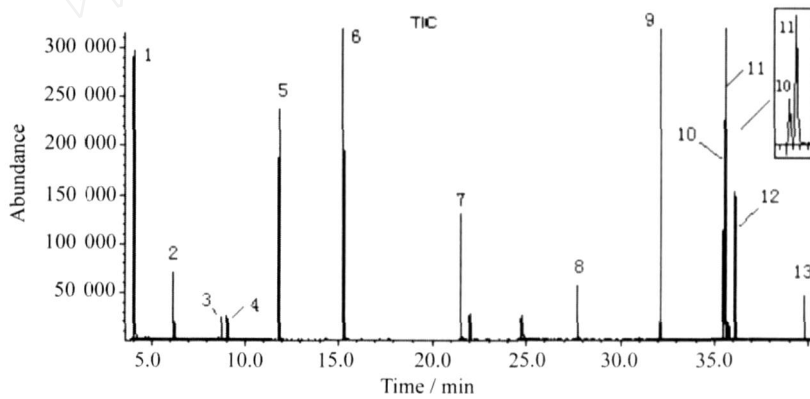


图 3 酯化标准非挥发性有机酸总离子流色谱图

Fig. 3 TIC chromatogram of esterifiable standard NVOAs

1. Oxalic, 2. Malonic, 3. Fumaric, 4. Succinic, 5. Malic, 6. Adipic (IS), 7. Citric, 8. Myristic, 9. Palmitic, 10. Linoleic, 11. Oleic, 12. Stearic, 13. Arachidic acid.

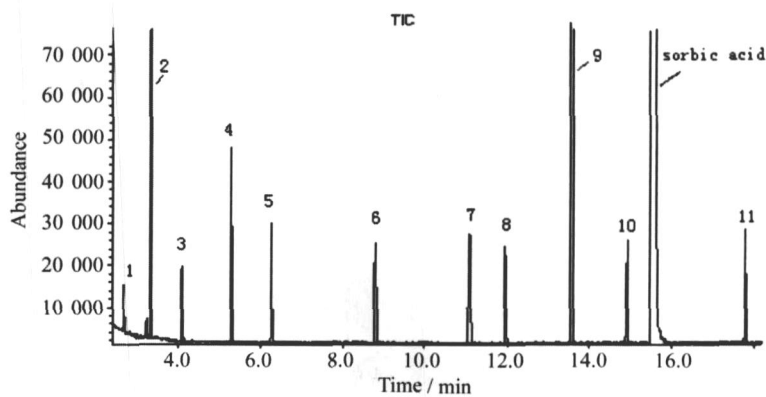


图 4 酯化标准挥发性有机酸的总离子流图

Fig. 4 TIC chromatogram of esterifiable standards VOAs

1. Butyric, 2. Isovaleric, 3. Valeric, 4. 3-Methylpentanoic, 5. Caproic, 6. Sorbic (IS), 7. Benzoic, 8. Caprylic, 9. Phenyl acetic, 10. Pelargonic, 11. Capric acid.

表 1 NVOAs 和 VOAs 的回归方程和相关系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficients of NVOAs and VOAs

NVOAs				VOAs			
No.	Compounds	Equations	R ²	No.	Compounds	Equations	R ²
1	Oxalic acid	$A_R = 0.726c_R - 0.0239$	0.9997	1	Butyric acid	$A_R = 0.64c_R + 0.0403$	0.9994
2	Malonic acid	$A_R = 0.716c_R - 0.0124$	1.0000	2	Isovaleric acid	$A_R = 2.01c_R - 0.439$	0.9998
3	Fumaric acid	$A_R = 2.51c_R - 0.0038$	0.9997	3	Valeric acid	$A_R = 2.89c_R - 0.0080$	1.0000
4	Succinic acid	$A_R = 1.37c_R - 0.0041$	1.0000	4	3-Methyl pentanoic acid	$A_R = 4.83c_R - 0.0137$	1.0000
5	Malic acid	$A_R = 0.086c_R - 0.0692$	1.0000	5	Caproic acid	$A_R = 4.96c_R - 0.0029$	1.0000
6	Adipic acid	internal standard (IS)		6	Sorbic acid	internal standard (IS)	
7	Citric acid	$A_R = 0.159c_R - 0.0621$	0.9999	7	Benzoic acid	$A_R = 5.82c_R - 0.0205$	0.9999
8	Myristic acid	$A_R = 5.03c_R - 0.0222$	0.9994	8	Caprylic acid	$A_R = 6.94c_R - 0.0261$	1.0000
9	Palmitic acid	$A_R = 5.59c_R - 0.2550$	0.9991	9	Phenyl acetic acid	$A_R = 6.95c_R - 0.199$	0.9999
10	Linoleic acid	$A_R = 1.50c_R - 0.0593$	0.9992	10	Pelargonic acid	$A_R = 7.98c_R - 0.0035$	1.0000
11	Oleic acid	$A_R = 1.91c_R - 0.0923$	0.9998	11	Capric acid	$A_R = 7.70c_R - 0.0292$	1.0000
12	Stearic acid	$A_R = 5.33c_R - 0.0816$	0.9991				
13	Arachidic acid	$A_R = 3.54c_R - 0.0358$	0.9985				

A_R:Relative peak areas;c_R:Relative concentration.

2.3.2 回收率的测定 采用标准加入法,称取 11 份样品,其中 5 份中分别加入不同量的非挥发酸混合标品,5 份中加不同量的挥发酸混标,1 份用作对照,按 1.3 处理样品的方法进行处理,并进行 GC/MS 检测,根据分析结果,按加入量计算回收率,结果(表 2)显示,非挥发酸的回收率在 93.4%~103.1%之间;挥发酸除 3-甲基-戊酸为 89.2%外,其它都大于 90.0%,表明该方法对烟草有机酸的酯化较完全、萃取效率高,可用于烟草样品非挥发酸、挥发酸的定量分析。

表 2 NVOAs 和 VOAs 的重现性和回收率结果(n=5)

Table 2 Stability and Recovery results of NVOAs and VOAs(n=5)

NVOAs				VOAs			
No.	Compounds	RSD(%)	Recovery(%)	No.	Compounds	RSD(%)	Recovery(%)
1	Oxalic acid	0.27	97.5	1	Butyric acid	1.05	96.8
2	Malonic acid	3.31	101.4	2	Isovaleric acid	0.95	96.3
3	Fumaric acid	2.59	98.2	3	Valeric acid	0.58	93.9
4	Succinic acid	3.45	93.4	4	3-Methylpentanoic acid	1.50	89.2
5	Malic acid	0.61	101.0	5	Caproic acid	0.94	90.4
7	Citric acid	4.18	98.1	7	Benzoic acid	2.98	93.3
8	Myristic acid	1.54	97.9	8	Caprylic acid	2.08	94.6
9	Palmitic acid	0.70	102.5	9	Phenyl acetic acid	3.47	99.1
10	Linoleic acid	0.88	103.2	10	Pelargonic acid	1.61	98.4
11	Oleic acid	2.42	101.5	11	Capric acid	1.75	95.7
12	Stearic acid	1.13	100.3				
13	Arachidic acid	1.99	99.9				

2.4 样品分析

使用该方法对烟草样品进行了分析,结果见表 3、表 4。由表中数据可以看出,非挥发酸含量高的,其相应的挥发酸含量就低。烟叶非挥发酸含量与刘百战^[12]等报道的规律一致,即上部、中部烟叶非挥发酸含量低,下部烟叶高;B 地区的上部与中部烟叶非挥发酸含量差别较大,A、C 地区上部和中部非挥发酸含量基本相同。挥发酸含量的规律是:上部烟叶 > 中部烟叶 > 下部烟叶。

表3 烟草中 NVOAs 的含量(mg/g)

Table 3 Contents of NVOAs in tobacco (mg/g)

Compound	A			B			C		
	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL
Oxalic acid	16.08	13.07	14.82	11.84	15.30	15.50	12.60	10.88	11.34
Malonic acid	2.76	2.38	2.06	2.34	2.45	1.86	2.50	2.39	2.06
Fumaric acid	0.16	0.18	0.20	0.20	0.15	0.14	0.22	0.19	0.14
Succinic acid	0.20	0.25	0.32	0.20	0.20	0.26	0.22	0.21	0.24
Malic acid	45.10	48.8	72.32	50.54	48.5	80.42	52.88	55.1	85.66
Citric acid	8.14	6.90	10.20	6.84	8.37	11.70	7.10	6.81	10.86
Myristic acid	0.10	0.08	0.06	0.06	0.08	0.06	0.06	0.06	0.06
Palmitic acid	1.74	1.92	2.10	1.60	1.80	1.88	1.74	1.70	1.90
Linoleic acid	1.54	1.55	1.56	1.30	1.50	1.34	1.38	1.30	1.18
Oleic acid	0.28	0.32	0.34	0.30	0.29	0.30	0.32	0.31	0.34
Stearic acid	0.10	0.10	0.12	0.08	0.10	0.10	0.08	0.09	0.10
Arachidic acid	1.46	1.83	2.08	1.64	1.56	1.82	1.76	1.81	2.08
Total	77.66	77.41	106.18	76.94	80.33	115.38	80.86	80.84	115.96

表4 烟草中 VOAs 的含量(μg/g)

Table 4 Contents of VOAs in tobacco (μg/g)

Compound	A			B			C		
	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL	B ₂ F	C ₂ F	X ₂ FL
Butyric acid	3.3	2.95	2.5	4.1	3.10	3.0	2.9	3.45	3.1
Isovaleric acid	31.0	21.65	12.6	38.4	23.50	18.4	31.4	29.80	20.7
Valeric acid	1.6	1.35	1.1	1.5	1.45	1.6	1.3	1.55	1.5
3-Methylpentanoic acid	1.5	1.30	1.0	1.0	1.40	1.3	1.0	1.00	0.9
Caproic acid	2.2	1.90	1.4	1.1	1.65	1.4	1.0	1.10	1.5
Benzoic acid	12.9	12.65	10.7	9.2	13.20	12.7	9.2	9.45	10.1
Caprylic acid	4.9	3.60	3.3	3.4	3.50	3.2	3.5	2.90	2.9
Phenyl acetic acid	1.7	1.35	1.0	1.0	1.35	1.0	1.1	0.90	0.7
Pelargonic acid	8.5	6.25	5.3	7.1	6.00	5.2	7.8	5.90	5.3
Capric acid	0.4	0.35	0.6	0.3	0.40	0.3	0.4	0.30	0.3
Butyric acid	0.5	0.50	0.6	0.4	0.45	0.5	0.4	0.40	0.4
Total	68.6	53.85	40.1	67.6	56.1	48.7	59.8	56.65	47.3

3 结论

建立了使用 PTSA/H₂SO₄/CH₃OH 作为酯化试剂一次甲酯化烟草中挥发和非挥发性有机酸,然后采用 GC/MS 定性定量的快速分析方法,大大缩短了分析时间^[8]。该方法具有简便、快速、重现性好等优点,用于烟草样品的测定,取得了满意的结果。

参考文献:

- [1] LI Yan-qing(李炎强), XIAN Ke-fa(洗可法), ZHAO Ming-yue(赵明月), XIA Qiao-ling(夏巧玲). Acta Tabacaria Sinica(中国烟草学报) [J], 2000, 6(1): 1.
- [2] MAO De-lun(毛德伦), XIE Jin-lun(谢金伦), GUO Ya-dong(郭亚东). Journal of Yunnan University(云南大学学报) [J], 1990, 12(2): 156.
- [3] YI Jiao(易娇), YIN Du-lin(尹笃林), LIAN Shi-xun(廉世勋), LI Cheng-zhi(李承志), LIU Jian-fu(刘建福). Tobacco Science & Technology(烟草科技) [J], 2006(7): 36.
- [4] SHEN Jin-chao(申进朝), XIAN Ke-fa(洗可法). Tobacco Science & Technology(烟草科技) [J], 2003, (8): 29.

- [5] LI Yan-qing(李炎强), SHEN Jin-chao(申进朝), LIU Ke-jian(刘克建), QU ling-bo(屈凌波), XIANG bing-ren(相秉仁). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2004, 32(5): 694.
- [6] QI Xiur-xiang(祁秀香), CHAI Yuan-wu(柴元武), LENG Chao-feng(冷超峰). Henan Science(河南科学) [J], 1999, 17(4): 392.
- [7] YANG Zhong-qiao(杨忠乔), YU Ai-xu(虞爱旭), HOU Jing-de(侯镜德), XU Zi-gan(徐子刚). Analysis and Testing Technology and Instruments(分析测试技术与仪器) [J], 2003, 9(1): 38.
- [8] JIN Yong-ming(金永明), ZHANG Ming-fu(张明福), LIU Bai-zhan(刘百战). Tobacco Science & Technology(烟草科技) [J], 2002, (4): 21.
- [9] LIU Bai-zhan(刘百战), XU liang(徐亮), HU bian-xia(胡便霞), ZHANG Ying(张映), ZHUANG Ya-dong(庄亚东). Tobacco Science & Technology(烟草科技) [J], 2000, (1): 25.
- [10] SUN Min(孙敏), YANG Jin-hui(杨金辉), ZHANG Cheng-cong(张承聪), YANG Wen-fan(杨文凡), YANG Yeng(杨艳), CHENG Run-qiong(陈润琼), WANG Dong-dang(王东丹), LI Tian-fei(李天飞). Journal of Yunnan University(云南大学学报) [J], 2001, 23(5): 394.
- [11] DING Yuan-chen(丁元晨), REN Yu-bei(任玉贝), ZHAO Xiao-ling(赵小苓), HAN Jun(韩俊), Laboratory Research and Exploration(实验室研究与探索) [J], 1991, 3: 89.
- [12] LIU Bai-zhan(刘百战), XU Liang(徐亮), ZHAN Jian-bo(詹建波), ZOU Wei(邹薇), YAN Cong-heng(严从亨), HU bian-xia(胡便霞). Chinese Tobacco Science(中国烟草科学) [J], 1999, (2): 28.

Rapid Determination of Volatile and Nonvolatile Organic Acids in Tobacco by GC/MS

YANG Shi-hua¹, WANG Bao-xing^{*1,2}, XU Guo-wang², WU Yi³,
ZOU Yue¹, LI Lu-yun¹, LIU Jing¹

(1. Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co., Ltd, Kunming 650106;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023;

3. Kunming Cigarette Factory of Hongyun Group, Kunming 650202)

Abstract: A rapid method for determining volatile and nonvolatile organic acids in tobacco by GC/MS was established. Volatile and nonvolatile organic acids in tobacco were derivatized into methyl esters by using *p*-toluene sulfuric acid and sulfuric acid and methanol (PTSA/ H₂SO₄/ CH₃OH), and extracted with hexane. The esterifying time was only 1h by using the present method instead of 20 h by using traditional method. The methyl ester derivatives of the acids were determined qualitatively and quantitatively on a capillary column (DB-5MS, 30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 mm d. f.) by GC/MS. The average recoveries of nonvolatile acids were 93.4% ~ 103.2% with the relative standard deviations (RSDs) less than 4.2%, and the average recoveries of volatile acids were 89.2% ~ 99.1% with the RSDs less than 3.5%. The developed method is applicable to the determination of volatile and nonvolatile organic acids in various tobacco samples, and it is simple, rapid and accurate.

Key words: Tobacco; Volatile organic acids; Nonvolatile organic acids; GC/MS; Esterification