

高效液相色谱法测定烤烟非挥发性有机酸含量

尹莉丽¹, 赵百东², 杨虹琦^{1*}, 柳立¹, 陈丽娟¹, 费明亮¹

(1. 湖南农业大学烟草科学与健康重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 国家烟草专卖局, 北京 100053)

摘要: 采用高效液相色谱技术(HPLC)建立了一种同时快速测定烟叶中草酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸等非挥发性有机酸的方法。采用磷酸溶液, 80 °C水浴 30 min, 提取烟叶样品中的非挥发性有机酸, 回收率可达到85.37%以上; 采用 Ultimate, AQ-C₁₈ 反相色谱柱, 在 215 nm 波长下, 以 0.02 mol/L KH₂PO₄ 溶液(pH3.0)和甲醇作为流动相, 可较好地分离和测定初烤烟叶中的非挥发性有机酸含量, 相对标准偏差为 0.58%~1.99%, 最低检出限为 0.03~0.80 μg/mL。

关键词: 烤烟; 高效液相色谱法; 非挥发性有机酸

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)02-0139-05

Content determination for nonvolatile organic acids in tobacco by HPLC

YIN Li-li¹, ZHAO Bai-dong², YANG Hong-qi^{1*}, LIU Li¹, CHEN Li-juan¹, FEI Ming-liang¹

(1. The Key Laboratory of Tobacco Science and Health, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. State Tobacco Monopoly Administration, Beijing 100053, China)

Abstract: A method of reverse-phase high performance liquid chromatography(HPLC) for simultaneous and rapid determination of oxalate, malic, lactic, citric and succinic acid was established. The results showed that the recoveries of nonvolatile organic acid reached above 85.37% by phosphorous acid extracting under a water bath at 80 °C for 30 min. Using Welch Ultimate, AQ-C₁₈ column with KH₂PO₄ (0.02 mol/L, pH3.0) and methyl alcohol as mobile phase at the detection wavelength of 215 nm, the nonvolatile organic acid in tobacco were well separated and their contents were well determined with relative standard deviations being 0.58%~1.99% and detection limits being 0.03~0.80 μg/mL.

Key words: flue-cured tobacco; reverse-phase high-performance liquid chromatography; nonvolatile organic acids

烟草中存在多种非挥发性酸性致香成分, 它们不但能改善烟气酸碱度, 而且可使吃味醇和、烟气芳香。烟叶中已被鉴定出的有机酸多达 200 余种, 其中苹果酸、草酸、柠檬酸等二元酸和三元酸占烟叶总有机酸含量的 70%左右^[1-2]。这些非挥发性有机酸通过调节烟气 pH 值来平衡酸碱度^[3-5], 在卷烟配方中添加一定量的苹果酸、乳酸等能促进唾液分泌, 消除干渴口感^[6]。测定和分析烤烟中非挥发性有机酸的含量, 可作为不同产地、不同品种、不同栽培技术条件下生产烟叶的品质评价指标之一, 对

提高烤烟原料的使用效果具有重要意义。

烟叶中非挥发性有机酸含量的测定方法有气相色谱法、气谱-质谱联用法、离子色谱法、高效液相色谱法等定量分析方法^[7-11]。气相色谱和气质联用法都需要先将非挥发性有机酸衍生化, 转变为易挥发的酯, 再进行仪器分析, 样品前处理过程比较繁琐, 并容易产生误差; 离子色谱法虽可分离非挥发性有机酸, 但由于采用强酸作为淋洗液, 对仪器的某些部件有较大腐蚀作用, 导致分析成本较高; 高效液相色谱法分析非挥发性有机酸不需要对样品

进行衍生及纯化处理,操作简便、快速、误差小,特别是对难以酯化的非挥发性有机酸有较好的测定效果。易娇^[12]用超声法、李银科^[13]用高速匀浆法提取并测定出烟草中的主要非挥发性有机酸,但其均为等度洗脱,在一定程度上影响了有机酸的分离及检测效果。笔者采用梯度洗脱,并对样品前处理方法进行了优化,以期高效、简便、快速、大批量对烤烟非挥发性有机酸进行定量分析打下基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂与试验仪器

草酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸(纯度 99.5%,美国 Sigma 试剂公司产品);乳酸(纯度 85%,国药集团化学试剂有限公司产品);DIONEX -P680 高效液相色谱仪(美国热电仪器公司出品)。

1.2 方 法

1.2.1 检测波长和流动相的选择

因非挥发性有机酸中的羰基氧和羟基氧上存在孤对电子共轭作用,因而在 205 ~215 nm 处有吸收峰。对草酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸和琥珀酸的标准溶液进行波长扫描,发现它们在 215 nm 附近都有较强的吸收,且重现性好,不受流动相的干扰,故确定 215 nm 为检测波长。由于 KH_2PO_4 溶液是在 215 nm 波长处无吸收的弱酸电离抑制剂,用其作为流动相有利于有机酸的分离测定^[11],高浓度 KH_2PO_4 溶液容易在泵和色谱柱中产生气泡,影响色谱系统的稳定性,而低浓度的 KH_2PO_4 影响分离效果,因此,选择 0.02 mol/L KH_2PO_4 作为流动相较为适宜。

1.2.2 色谱条件

色谱柱, Welch Ultimate, AQ-C₁₈ 反相柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相, 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH3.0)和甲醇溶液,使用前用真空泵抽滤,并用超声波清洗器脱气;流速, 0.7 mL/min;检测波长, 215 nm;柱温: 30 °C;进样体积, 20 μL;外标法定量;梯度洗脱^[14]。

1.2.3 标准曲线制备及检出限检测

精准称取非挥发性有机酸标准品,配制成含草酸 0.4 mg/mL、苹果酸 1 mg/mL、乳酸 0.4 mg/mL、柠檬酸 1 mg/mL、琥珀酸 0.4 mg/mL 的混合标准母液。将混合标准液分别稀释 20、10、6、5、4 倍进样分析。以检测峰面积对有机酸质量浓度作标准曲线,以 3 倍信噪比计算最小检测限。

1.2.4 样品前处理的优化

将初烤烟叶粉碎,过 0.15 mm 孔径筛。准确称取样品 0.2 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加入 30 mL KH_2PO_4 溶液(0.02 mol/L, pH3.0)和磷酸溶液,置于水浴锅中加热后过滤,用流动相定容至 50 mL,摇匀,并用 0.459 μm 孔径水系纤维素膜过滤,滤液用液相色谱仪进行定量分析。

将磷酸溶液加入量设为因素 A,设 3 mL(A₁)、5 mL(A₂)、7 mL(A₃)、9 mL(A₄)4 水平;因素 B 为样品酸解温度,设 50 °C(B₁)、60 °C(B₂)、70 °C(B₃)、80 °C(B₄)4 水平;因素 C 为样品酸解时间,设 15 min(C₁)、20 min(C₂)、25 min(C₃)、30 min(C₄)4 水平,共计 16 个处理。采用 3 因素 4 水平 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,进行样品前处理的优化。

1.2.5 回收率和精密度检测

取同一烟叶样品 6 份,每份 0.2 g,其中 1 份用作空白试验,其余每份添加质量浓度分别为 0.4、1.50、0.4、0.4、0.25 mg/mL 的 5 种有机酸混合标样 2 mL。按照优化后方法进行非挥发性有机酸提取,过滤定容后进行 HPLC 分析,并连续进样 5 次,计算各有机酸的回收率和相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 样品前处理优化对分离测定烟叶非挥发性有机酸的影响

采用极差法分析样品前处理优化正交试验结果(表 1)。极差分析表明,对草酸、乳酸、柠檬酸和琥珀酸,样品酸解温度的影响大于磷酸溶液加入量和样品酸解时间;对苹果酸,样品酸解时间的影响大于样品酸解温度和磷酸溶液加入量。说明样品酸解温度和样品酸解时间对非挥发性有机酸提取量

的影响较大。

从试验各因素水平的总值上看,草酸前处理以 A3B3C2 组合提取较好;苹果酸、乳酸前处理以 A2B4C4 组合提取较好;柠檬酸前处理以 A2B2C3 组合提取较好;琥珀酸前处理以 A3B4C4 组合提取较好。由于烟叶样品中草酸、苹果酸、乳酸和柠檬

酸含量较高,琥珀酸含量极少,并且在试验过程中发现,高温条件下烟叶样品提取液的过滤速度要比低温条件快得多,因此,在不影响分离效果的前提下,样品前处理选择 A2B4C4 组合为好,即加入磷酸 5 mL,酸解温度 80 °C,酸解时间 30 min 进行烟叶样品非挥发性有机酸提取。

表 1 5 种有机酸的正交试验结果

Table 1 Analytical results of the orthogonal test

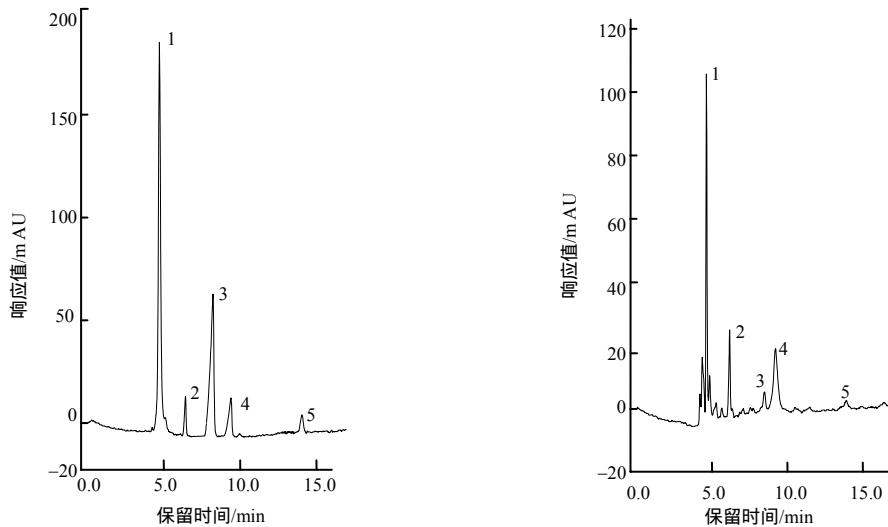
试验号	A/mL	B/°C	C/min	非挥发性有机酸含量/(mg·g ⁻¹)					
				草酸	苹果酸	乳酸	柠檬酸	琥珀酸	
1	3	50	15	8.19	31.42	4.74	5.48	2.37	
2	3	60	20	7.11	34.88	3.86	7.20	2.05	
3	3	70	25	7.37	34.42	4.92	7.41	4.82	
4	3	80	30	7.63	40.61	6.93	4.35	5.33	
5	5	50	20	7.23	34.80	4.14	4.43	3.99	
6	5	60	15	8.11	34.45	5.30	7.01	2.22	
7	5	70	30	7.67	34.01	4.06	6.43	4.65	
8	5	80	25	7.51	40.57	8.15	7.24	6.31	
9	7	50	25	7.76	33.84	4.56	4.78	3.72	
10	7	60	30	7.11	37.43	4.54	6.96	5.20	
11	7	70	15	9.12	35.67	3.50	6.50	3.84	
12	7	80	20	8.73	32.54	5.35	5.66	5.83	
13	9	50	30	8.47	35.61	6.25	8.03	4.81	
14	9	60	25	8.07	34.85	3.95	6.49	2.88	
15	9	70	20	8.88	33.02	4.89	6.37	4.69	
16	9	80	15	6.44	31.32	4.15	3.70	3.42	
草酸	K ₁	30.30	31.65	31.86	苹果酸	K ₁	141.33	135.67	132.86
	K ₂	30.52	30.40	31.95		K ₂	143.83	141.61	135.24
	K ₃	32.72	33.04	30.71		K ₃	139.48	137.56	143.68
	K ₄	31.86	30.31	30.88		K ₄	134.80	145.04	147.66
	R	2.42	3.17	1.26		R	9.03	9.37	14.80
乳酸	K ₁	20.45	19.69	17.69	柠檬酸	K ₁	24.44	22.72	22.69
	K ₂	21.65	17.65	18.24		K ₂	25.11	27.66	23.66
	K ₃	17.95	17.37	21.58		K ₃	23.90	26.71	25.92
	K ₄	19.24	24.58	21.78		K ₄	24.59	20.95	25.77
	R	3.70	7.21	4.07		R	1.21	6.71	3.23
琥珀酸	K ₁	14.57	14.89	11.85					
	K ₂	17.17	12.35	16.56					
	K ₃	18.59	18.00	17.73					
	K ₄	15.80	20.89	19.99					
	R	4.02	8.54	8.13					

2.2 样品前处理对高效液相色谱法分离测定烤烟非挥发性有机酸含量的效果

2.2.1 高效液相色谱法分离测定烤烟非挥发性有机酸图谱

采用优化前处理条件提取烟叶样品中的非挥

发性有机酸,进行 HPLC 分析,获得了分离效果好、峰形清晰的非挥发性有机酸液相色谱图谱(图 1)。由图 1 可知,提取液色谱图虽然存在一些杂峰,但对烟叶草酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸等有机酸的分析干扰不大。



左为混合标样;右为烟叶样品提取液;1 草酸;2 苹果酸;3 乳酸;4 柠檬酸;5 琥珀酸。

图 1 5 种非挥发性有机酸混合标准溶液及烟叶样品高效液相色谱

Fig.1 The chromatograms of the five mixture organic acids standard and the tobacco samples

2.2.2 标准曲线检出限、精密度及回收率

5 种有机酸的线性方程、相关系数、检出限及回收率见表 2。各有机酸的相对标准偏差(RSD)为

0.58%~1.99%,均小于2%;除琥珀酸外,其余有机酸的回收率均达到 90%以上;最低检出限为 0.03~0.80 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 5 种有机酸的最低检出限和回收率

Table 2 Detection limits and recovery efficiency for the five organic acids in tobacco

有机酸	回归方程	R^2	最低检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD
草酸	$Y = 0.1835x + 0.1758$	0.9978	0.03	90.68	1.99
苹果酸	$Y = 0.0195x + 0.3677$	0.9925	0.25	94.25	0.58
乳酸	$Y = 0.0130x + 0.0103$	0.9918	0.60	92.34	1.28
柠檬酸	$Y = 0.0262x - 0.2236$	0.9989	0.50	95.33	1.96
琥珀酸	$Y = 0.0133x + 0.0555$	0.9989	0.80	85.37	1.86

3 讨论

由于流动相中水的比例较大,有机酸在水中容易发生电离,产生多峰现象,要使有机酸得到分离检测,应选取合适的流动相 pH,使各有机酸在流动相中均以一种形式存在。用磷酸或氢氧化钾调节流动相 KH_2PO_4 的 pH 值,试验中发现,pH 越低,有机酸保留时间延长,当 pH 值为 2.6 或 2.8 时,草酸与苹果酸不能完全分离,而且低 pH 的流动相对

色谱柱寿命有更大影响。当 pH 值为 3.2 时,草酸伴有杂质峰,且草酸和苹果酸的色谱峰变宽。当 pH 值调至 3.0 时,被测组分保留时间适当,分离度良好。此外,试验采用的 Welch Ultimate 色谱柱也具备了低 pH 的适用范围,因而流动相选择 pH 值 3.0 为好。

流动相流速影响压力的大小及各有机酸的出峰时间。流速越大,压力越大,出峰时间也越快,而压力过高,则影响色谱柱的寿命^[15]。当设置柱温

为 30 °C, 流动相流速为 0.7 mL/min 时, 压力保持在 75×10^5 Pa 左右, 系统较为稳定。

采用 80 °C 水浴加温 30 min, 进行烟样前处理, 可以降低样品提取液的黏度, 使其过滤速度加快。对比试验表明, 高温条件下提取烟叶有机酸的含量与常温下相同。

与气相色谱分离有机酸相比, 采用液相色谱技术检测初烤烟叶样品中的非挥发性有机酸, 不仅可以检测出草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸, 而且还可以检测出乳酸。这是因为乳酸难以酯化, 气相色谱法无法检测烟叶中乳酸的含量, 高效液相色谱法则克服了这种缺陷。

参考文献:

- [1] 刘春奎, 陈勇健, 黄淮焕, 等. 烟草中有机酸和非挥发性有机酸分析的研究进展[J]. 农技服务, 2010, 27(10): 1329-1330.
- [2] 周正红, 高孔荣. 烟草中化学成分对卷烟色香味品质及其研究进展[J]. 烟草科技, 1997(2): 22-25.
- [3] 刘世亮, 杜君, 化党领, 等. 不同有机酸对烤烟品质和产值的影响[J]. 作物学报, 2008, 34(5): 851-858.
- [4] 杨虹琦, 周冀衡, 郭紫明, 等. 湖南不同烤烟中非挥发性有机酸含量的差异[J]. 中国烟草学报, 2006, 12(4): 44-46.
- [5] 韩富根. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [6] 陈章玉, 缪明明, 孔维松, 等. 基质固相分散——高效液相色谱法同时测定烟草中的有机酸[J]. 中国烟草学报, 2007, 13(1): 11-14.
- [7] 肖遂, 周冀衡, 杨虹琦, 等. 气-质联用(GC/MS)法测定烟草生物碱的方法优化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010(1): 22-25.
- [8] 赵景婵, 郭治安, 常建华, 等. 有机酸类化合物的反相高效液相色谱法的分离条件研究[J]. 色谱, 2001, 19(1): 260-262.
- [9] 郭亚东. 云南烟草中有机酸的气相色谱研究[D]. 昆明: 云南大学, 1988.
- [10] 郭德华, 夏琳. 离子排斥色谱法同时测定果汁中11种有机酸[J]. 色谱, 2001, 19(3): 276-278.
- [11] 刘荣森. 烟草中有机酸测定方法研究进展[J]. 科技信息, 2011, 24: 97.
- [12] 易娇, 尹笃林, 廉世勋, 等. 反相HPLC法同时测定烟草中的6种有机酸[J]. 烟草科技, 2006(7): 36-39.
- [13] 李银科, 李海燕, 何顺琴, 等. 高效液相色谱法测定烟草中有机酸[J]. 理化检验: 化学分册, 2011(1): 62-64.
- [14] 程勇, 陈玲, 邓晓春. Ultimate AQ C₁₈柱HPLC法测定烟草中有机酸含量[C]// 第八届中国香料香精学术研讨会论文集. 广州: 中国香料香精化妆品工业协会, 2010: 152-156.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维