



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101963604 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 201010524711. 0

审查员 李哲

(22) 申请日 2010. 10. 29

(73) 专利权人 川渝中烟工业有限责任公司

地址 610017 四川省成都市龙泉驿区国家级
成都经济技术开发区新区成龙路 2 号

(72) 发明人 薛芳 宋光富 戴亚 李东亮
施丰成 朱立军

(74) 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任
公司 51200

代理人 舒启龙

(51) Int. Cl.

G01N 30/72 (2006. 01)

(56) 对比文件

张峻松等. 毛细管气相色谱法测定烟草
中的甾醇类化合物. 《烟草科技》. 2007, (第 8
期), 27-31.

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

烟草中甾醇的测定方法

(57) 摘要

本发明公开了烟叶中甾醇的测定方法, 包括以下步骤: 1) 配置不同浓度的含内标的甾醇标准样版, 经衍生化后进行 GC-MS 分析; 用甾醇与内标峰面积比值与甾醇与内标浓度比值作图获得标准曲线; 2) 将待测样品分别经酸水解、碱皂化以及直接超声萃取, 衍生化后取 1 μ L 进行 GC-MS 分析; 3) 用测得的甾醇与内标峰面积比值在标准曲线中读出甾醇与内标浓度比值, 再计算出甾醇量。本发明可以同时分析烟叶中多种形态的胆甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇, 豆甾醇和 β -谷甾醇, 测试准确、操作简便, 可以广泛应用在烟草行业中。

1. 一种烟叶中甾醇的测定方法,其特征在于,按照以下步骤进行:

步骤1:配置以二氯甲烷为溶剂、甾醇浓度分别为16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$,内标浓度均为10 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液作为样板;取上述标准溶液200 μL 经过0.45 μm 滤膜过滤后,用氮气吹干,加入200 μL 的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及2 μL 的三甲基氯硅烷,于80 $^{\circ}\text{C}$ 加热45 min进行衍生操作,取1 μL 进行GC-MS分析;用上述系列标准溶液中各甾醇的含量与内标量之比对色谱图中各甾醇峰面积与内标峰面积的比值作图,得到标准曲线;

步骤2:将待检测烟叶置于烘箱中40 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,粉碎,过40目筛,称取0.5g烟末样品于50mL圆底烧瓶中,加入200 μg 内标及2.5mL、4mol/L HCl的乙醇溶液,在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流60min,结束后用水浴冷却至室温,并在上述酸水解得到的溶液中或在加入含有200 μg 内标的0.5g烟末样品中加入7mL、4.0mol/L氢氧化钾的乙醇溶液,在80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流120min,结束后冷却至室温,取2mL上述皂化液加入5mL正己烷和1mL去离子水,室温下超声振荡10min,取2mL正己烷萃取液,用氮气吹干,加入200 μL 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及2 μL 三甲基氯硅烷,于80 $^{\circ}\text{C}$ 加热45 min进行衍生操作,取1 μL 进行GC-MS分析;

步骤3:取0.5g烟末样品于25mL试管中,加入100 μg 内标及10mL二氯甲烷,超声萃取45min,取4mL过0.45 μm 有机膜,用氮气吹干,加入200 μL 的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及2 μL 的三甲基氯硅烷,于80 $^{\circ}\text{C}$ 加热45 min进行衍生操作,取1 μL 进行GC-MS分析;

步骤4:根据标样色谱图、标样加入和对照保留时间的方法进行定性,用内标法定量。

2. 根据权利要求1所述的烟叶中甾醇的测定方法,其特征在于,所述系列标准溶液中的甾醇为纯度大于95%的胆甾醇或纯度大于95%的豆甾醇或纯度大于95%的 β -谷甾醇或纯度大于98%的麦角甾醇或纯度大于97%的菜油甾醇,或纯度大于98%的去氢胆甾醇或纯度大于97%的5a-胆甾醇或纯度大于95%的正三十二烷中任意一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的烟叶中甾醇的测定方法,其特征在于,步骤1至步骤3的GC-MS分析时采用的色谱柱是HP-ultra2 50m \times 0.20mm \times 0.33 μm 。

4. 根据权利要求1所述的烟叶中甾醇的测定方法,其特征在于,步骤1至步骤3的GC-MS仪器条件为载气:He,恒流模式1.2ml/min;进样口分流比:10:1;进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;程序升温:初始温度100 $^{\circ}\text{C}$ 然后以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至280 $^{\circ}\text{C}$ 保留44min;质谱采用SIM,30-40min选择M/Z=329、368(胆甾醇),41-45min选择M/Z=343、382(菜油甾醇),45-50min选择M/Z=255、394(豆甾醇),50-55min选择M/Z=357、396(β -谷甾醇),离子源、四级杆温度230 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $^{\circ}\text{C}$ 。

烟草中甾醇的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及甾醇的测定方法,特别是烟草中的甾醇的测定方法。

背景技术

[0002] 甾醇是烟草中一类重要化合物,被认为是卷烟烟气中稠环芳烃的前体物,对烟草的品质和安全性有着较大的影响,全面了解烟草中甾醇含量、存在形式对卷烟减害降焦具有一定的指导意义。甾醇约占烟草重量的 0.1-0.3%,主要有菜油甾醇、豆甾醇、胆甾醇和 β -谷甾醇,霉变烟叶中还含有麦角甾醇。前四种甾醇主要以酯类、糖苷类、酰基糖类化合物形式及游离态形式存在。目前报道的同时测定烟草中游离态及结合态甾醇的定量分析方法主要是气相色谱法,这种分析方法的缺点就是只能检测麦角甾醇、菜油甾醇,豆甾醇和 β -谷甾醇,而不能同时测定胆甾醇。因此改进现有方法并建立一种能够同时检测烟草中麦角甾醇、菜油甾醇,豆甾醇和 β -谷甾醇及胆甾醇的分析方法,具有重要意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种测试准确、操作简便的烟草中甾醇的测定方法。

[0004] 本发明采用以下的技术方案来实现:

[0005] 烟草中甾醇的测定方法,其特征在于按照步骤 1 至步骤 4 进行:

[0006] 步骤 1:配置以二氯甲烷为溶剂、甾醇浓度分别为 16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$,内标浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液作为样板;取上述标准溶液 200 μL 经过 0.45 μm 滤膜过滤后,用氮气吹干,加入 200 μL 的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及 2 μL 的三甲基氯硅烷,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 45 ~ 60min 进行衍生操作,取 1 μL 进行 GC—MS 分析;用上述系列标准溶液中各甾醇的含量与内标量之比对色谱图中各甾醇峰面积与内标峰面积的比值作图,得到标准曲线;

[0007] 步骤 2:将待检测烟叶置于烘箱中 40 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,粉碎,过 40 目筛,称取 0.5g 烟末样品于 50mL 圆底烧瓶中,加入 200 μg 内标及 2.5mL、4mol/L HCl 的乙醇溶液,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流 60min,结束后用水浴冷却至室温,并在上述酸水解得到的溶液中或在加入含有 200 μg 内标的 0.5g 烟末样品中加入 7mL、4.0mol/L 氢氧化钾的乙醇溶液,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流 120min,结束后冷却至室温,取 2mL 上述皂化液加入 5mL 正己烷和 1mL 去离子水,室温下超声振荡 10min,取 2mL 正己烷萃取液,用氮气吹干,加入 200 μL 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及 2 μL 三甲基氯硅烷,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 45 ~ 60min 进行衍生操作,取 1 μL 进行 GC—MS 分析;

[0008] 步骤 3:取 0.5g 烟末样品于 25mL 试管中,加入 100 μg 内标及 10mL 二氯甲烷,超声萃取 45min,取 4mL 过 0.45 μm 有机膜,用氮气吹干,加入 200 μL 的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺以及 2 μL 的三甲基氯硅烷,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 45 ~ 60min 进行衍生操作,取 1 μL 进行 GC—MS 分析;

[0009] 步骤4:根据标样色谱图、标样加入和对照保留时间的方法进行定性,用内标法定量。

[0010] 更进一步的技术方案是步骤1至步骤3中选择内标有去氢胆甾醇、5a-胆甾烷或正三十二烷。

[0011] 更进一步的技术方案是步骤1至步骤3的分析时采用的色谱柱是HP-ultra2 50m×0.20mm×0.33 μm。

[0012] 更进一步的技术方案是步骤1至步骤3的仪器条件为载气:He,恒流模式1.2ml/min;进样口分流比:10:1;进样口温度:250℃;程序升温:初始温度100℃然后以30℃/min升温至280℃保留44min。质谱采用SIM,30-40min选择M/Z=329、368(胆甾醇),41-45min选择M/Z=343、382(菜油甾醇),45-50min选择M/Z=255、394(豆甾醇),50-55min选择M/Z=357、396(β-谷甾醇),离子源、四级杆温度230℃、150℃。

[0013] 更进一步的技术方案是步骤1至步骤3的样品衍生条件为:加入200 μL双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和2 μL三甲基氯硅烷(TMCS),于80℃加热45min。

[0014] 更进一步的技术方案是甾醇标准液体样板由纯度大于95%的胆甾醇或纯度大于95%的豆甾醇或纯度大于95%的β-谷甾醇或纯度大于98%的麦角甾醇或纯度大于97%的菜油甾醇,或纯度大于98%的去氢胆甾醇或纯度大于97%的5a-胆甾烷或纯度大于95%的正三十二烷中任意一种或几种溶解于二氯甲烷后形成的溶液。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是同时测定烟草中多个种类、多种形式存在的甾醇、测试准确、操作简便,便于卷烟生产企业的技术人员对烟草中的甾醇进行定量测定。

具体实施方式

[0016] 下面通过实施例对发明作进一步阐述:

[0017] 分别将纯度大于95%的胆甾醇、纯度大于95%的豆甾醇、纯度大于95%的β-谷甾醇、纯度大于98%的麦角甾醇、纯度大于97%的菜油甾醇、纯度大于97%的5a-胆甾烷溶解于二氯甲烷后形成的溶液,配置成5个不同浓度的甾醇(含内标)的标准溶液样板(标准液1~标准液5),其对应的浓度分别为16、32、64、128、256 μg/mL,内标浓度均为10 μg/mL。对上述标准液取200 μL经过0.45 μm滤膜过滤后,用氮气吹干,加入200 μL双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(含1% TMCS),于80℃加热60min,取1 μL进行GC-MS(气质色谱联用分析仪)分析。分析条件为:He,恒流模式1.2ml/min;进样口分流比:10:1;进样口温度:250℃;程序升温:初始温度100℃然后以30℃/min升温至280℃保留44min。质谱采用SIM,30-40min选择M/Z=329、368(胆甾醇),41-45min选择M/Z=343、382(菜油甾醇),45-50min选择M/Z=255、394(豆甾醇),50-55min选择M/Z=357、396(β-谷甾醇),离子源、四级杆温度230℃、150℃,色谱柱为HP-ultra2 50m×0.20mm×0.33 μm或类似型的分析柱,得到如下表1的标准液体样峰面积比值(甾醇峰面积/内标峰面积)表:

[0018] 表1 标准液体峰面积比值对照表:

[0019]

形态 \ 甾醇 (μg/g)	胆甾醇	麦角甾醇	菜油甾醇	豆甾醇	β-谷甾醇
酯类结合态	142.20	-	112.43	227.14	118.30
糖苷、酰基糖类 结合态	-	-	328.99	397.50	255.40
游离态	91.46	-	175.09	255.40	140.63
总量	233.66	-	616.51	995.30	514.34

[0020] 用表 1 内的峰面积比值分别与其对应的甾醇与内标浓度比值作图, 得到标准曲线。

[0021] 将某单等级待检测烟叶置于烘箱中 40℃ 下烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛。称取 0.5g 烟末样品于 50mL 圆底烧瓶中, 加入 200 μg 内标及 2.5mL 4mol/L HCl 的乙醇溶液, 于 80℃ 水浴中加热回流 60min, 结束后用水浴冷却至室温。在酸水解得到的溶液中(或 0.5g 加入含有 200 μg 内标的烟末样品中)加入 7mL 4.0mol/L 氢氧化钾的乙醇溶液, 于 80℃ 水浴中加热回流 120min, 结束后冷却至室温, 取 2mL 皂化液加入 5mL 正己烷、1mL 去离子水, 室温下超声振荡 10min, 取 2mL 正己烷萃取液, 用氮气吹干, 加入 200 μL 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(含 1% TMCS), 于 80℃ 加热 60min, 取 1 μL 进行 GC-MS 分析。

[0022] 取 0.5g 烟末样品于 25mL 试管中, 加入 100 μg 内标及 10mL 二氯甲烷, 超声萃取 45min, 取 4mL 过 0.45 μm 有机膜, 用氮气吹干, 加入 200 μL 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(含 1% TMCS), 于 80℃ 加热 60min, 取 1 μL 进行 GC-MS 分析。

[0023] 根据测得的各甾醇峰面积与内标峰面积比值查询标准曲线, 得到样品与内标浓度比值, 再计算出甾醇与烟叶的质量比, 计算公式为: $W = (a \times m_1) / m_2$

[0024] W — 样品中甾醇质量分数, μg/g;

[0025] a — 从工作曲线中计算出的甾醇与内标浓度比值;

[0026] m_1 — 样品溶液中内标量, μg;

[0027] m_2 — 样品质量, g;

[0028] 对某烟样进行测定, 结果如下:

[0029]

标准液编号 甾醇/内标	标准液 1	标准液 2	标准液 3	标准液 4	标准液 5
胆甾醇/内标	0.7676	1.6198	3.3373	7.0637	14.1969
菜油甾醇/内标	0.4897	1.0593	2.2189	4.3721	8.3924
麦角甾醇/内标	1.8281	3.7933	6.9802	15.0734	30.5213
豆甾醇/内标	0.3309	0.7042	1.4977	3.24114	6.8871
β -谷甾醇/内标	0.5347	1.1543	2.6896	5.3609	10.7816