

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710189722.6

[43] 公开日 2008年2月27日

[11] 公开号 CN 101131378A

[22] 申请日 2007.9.29

[21] 申请号 200710189722.6

[71] 申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业开发区枫杨街2号

[72] 发明人 王冰 谢复炜 夏巧玲 赵晓东  
刘惠民

[74] 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司  
代理人 姜振东

权利要求书2页 说明书5页

### [54] 发明名称

烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法

### [57] 摘要

一种烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：主要是利用美国 Dionex(戴安)公司 ASE200 加速溶剂萃取仪，在设定的压力、温度、萃取时间等条件下，一次性萃取了 C1 ~ C18 的挥发性和半挥发性有机酸，萃取液经过滤，并与 N, O - 双(三甲硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)衍生，进气相色谱-质谱(GC-MS)进行分析测定。利用本发明方法测定烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸，萃取溶剂的用量少，萃取时间短，本发明方法简单便捷，重现性好，分析测定灵敏度高，能对挥发性和半挥发性有机酸实现同时测定，改变了以往测定挥发性和半挥发性有机酸要用不同分析方法的状况，特别适用于大批量样品的分析测定。

1、一种烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：它包括以下步骤：

(1) 烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的萃取：将烟叶或卷烟烟丝粉碎并过 40 目筛，得烟粉备用，称取 0.2~1 克烟粉放入加速溶剂萃取仪的萃取池中，加入 40~60 微升内标，打开加速溶剂萃取仪，萃取溶剂为  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  和  $\text{CH}_3\text{CN}$  混合萃取液，对烟粉进行萃取；

(2) 烟叶或卷烟烟丝萃取液的衍生：将萃取液过 0.45 微米的滤膜得到澄清液体，取其 1~1.5 毫升于色谱瓶中，加入衍生化试剂 100~150 微升摇匀，水浴 40~60℃ 衍生 30~50 分钟，凉至室温后直接进 GC-MS 进行检测，实现对烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸含量的测定；

气相色谱-质谱分析条件：采用 DB-5MS (50m × 0.25mm × 0.25 μm) 毛细管色谱柱分离，进样口温度：280℃，进样量 1 μL，分流比 10:1，柱流速 1.0mL/min，升温程序：40℃ 保持 3min，以 4℃ 每分钟的升温速率升至 280℃ 保持 40min，质谱条件：EI 源，电离电压 70eV，扫描方式：SIM。

2、根据权利要求 1 所述的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：加速溶剂萃取仪选用美国 Dionex (戴安) 公司 ASE200 加速溶剂萃取仪。

3、根据权利要求 1 所述的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：萃取试验条件为 1500psi、200℃、萃取时间 10~15min，循环 3 次。

4、根据权利要求 1 所述的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于： $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  和  $\text{CH}_3\text{CN}$  的混和比例为 1:1~3。

5、根据权利要求 1 所述的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：内标选择双内标即反-2-己烯酸和肉桂酸， $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  的挥发性有机酸以反-2-己烯酸为内标， $\text{C}_{10}$  以上的半挥发性有机酸以肉桂酸为内标。

---

6、根据权利要求1所述的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法，其特征在于：衍生化试剂选用N,O-双三甲硅基三氟乙酰胺。

## 烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法

### 技术领域

本发明属于化学成分的测定方法,具体说是一种烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法。该方法利用戴安 200 加速溶剂萃取装置,在一定的温度压力下,一次性萃取了 C1-C18 的挥发性有机酸和高级脂肪酸,萃取液经过滤衍生,进气相色谱-质谱(GC-MS)进行分析测定。采用本方法分析,可以同时测定挥发性和半挥发性有机酸,改变了以往测定挥发性和半挥发性有机酸要用不同分析方法的状况。

### 技术背景

我们通常所说的烟草中的有机酸主要指氨基酸以外的有机酸。通常按挥发性能的强弱把有机酸分为挥发性、半挥发性和非挥发性有机酸,通常情况下,C10 以下的低级脂肪酸和部分芳香酸是液体,也就是平常所说的挥发酸;C10 以上的为生成油脂的高级脂肪酸,属于半挥发性酸;而二元酸和三元酸则属于非挥发性有机酸。挥发性有机酸含量很低,最多达 0.1%~0.2%,有的甚至只有 0.01%~0.05%,但其对烟草的感官质量却有很大的影响,它可以增加烟香,改善吸味,使余味醇和舒适。例如 C4-C6 脂肪酸能产生果味、奶味等。半挥发酸和非挥发酸占烟叶干重的 10%左右,它们能与生物碱结合成盐,调节质子化和游离态烟碱比例,从而影响烟气的劲头和吃味。例如十四酸有柔和烟气的作用,十六酸有甜的蜡脂气息,能增加丰满度等(王瑞新,烟草化学。2003: 99-144)。因此,研究烟草中挥发、半挥发性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。

目前国际上分析有机酸的前处理方法有很多,有水蒸汽蒸馏法、固相微萃取法、顶空分离法、同时蒸馏萃取法、超声波提取法等。其中,固相微萃取法、顶空分离法适合定性分析挥发性有机酸,对定量分析来说重现性不好(陈章玉,烟草科技,2000(8));对于烟草中含量较高的甲酸、乙酸、丙酸、丁酸等低

分子量脂肪酸，由于它们水溶性强、挥发性强，采用传统的水蒸汽蒸馏法、有机溶剂提取法很难把它们与高级脂肪酸同时进行准确的定量分析，其它的液相色谱法和毛细管电泳法也很难做到这一点；并且其它分析方法所用有机溶剂多，分析时间长，过程复杂，挥发性成分损失大（李云，国产烤烟和香料烟中低级脂肪酸的研究。郑州烟草研究院硕士论文，1985。）。因此，有必要开发一种操作简便、重现性好、分析灵敏度高、适合同时分析挥发性和半挥发性有机酸的方法。

### 发明内容

本发明针对现有分析技术中存在的不足进行改进，专门设计了一种同时分析测定烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸方法，利用该方法萃取溶剂的用量少，萃取时间短，整个过程简单便捷，重现性好，分析测定灵敏度高，能对挥发性和半挥发性有机酸实现同时测定。

本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：

本发明的烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的测定方法包括以下步骤：

(1) 烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸的萃取：将烟叶或卷烟烟丝粉碎并过 40 目筛，得烟粉备用，称取 0.2~1 克烟粉若干份分别放入加速溶剂萃取仪的各萃取池中，向各池中分别加入 40~60 微升内标，打开加速溶剂萃取仪，萃取溶剂为  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  与  $\text{CH}_3\text{CN}$  的混合溶剂，对烟粉进行萃取；

(2) 烟叶或卷烟烟丝萃取液的衍生：将萃取液过 0.45 微米的滤膜得到澄清液体，取其 1~1.5 毫升于色谱瓶中，加入衍生化试剂 100~150 微升摇匀，水浴 40~60℃ 衍生 30~50 分钟，凉至室温后直接进 GC-MS 进行检测，实现对烟叶或烟丝中挥发性和半挥发性有机酸含量的测定；

气相色谱-质谱分析条件：采用 DB-5MS (50m × 0.25mm × 0.25 μm) 毛细管色谱柱分离，进样口温度：280℃，进样量 1 μL，分流比 10:1，柱流速 1.0mL/min，升温程序：40℃ 保持 3min，以 4℃ 每分钟的升温速率升至 280℃ 保持 40min，质谱条件：EI 源，电离电压 70eV，扫描方式：SIM。

在本发明中,加速溶剂萃取仪选用美国 Dionex 公司 ASE200 加速溶剂萃取仪,以满足同时对多种成分的萃取,萃取试验条件为 1500psi、200℃、萃取时间 10~15min,循环 3 次。萃取溶剂为  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  和  $\text{CH}_3\text{CN}$  的混和萃取液,混合比例为 1:1~3。

本发明中的内标选择双内标即反-2-己烯酸和肉桂酸,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  的挥发性有机酸以反-2-己烯酸为内标,  $\text{C}_{10}$  以上的半挥发性有机酸以肉桂酸为内标; 衍生化试剂选用 N, O-双(三甲硅基)三氟乙酰胺 (BSTFA)。

本方法与其它分析有机酸的方法相比主要是利用美国 Dionex (戴安) 公司 ASE200 加速溶剂萃取仪,在高温高压下,一次性萃取了  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{18}$  的挥发性和半挥发性有机酸,萃取液经过滤,并与 BSTFA 衍生后进气相色谱-质谱 (GC-MS) 进行分析测定。加速溶剂萃取法萃取溶剂得用量少,萃取时间短,简单便捷,重现性好,分析测定灵敏度高,能对挥发性和半挥发性有机酸实现同时测定,适用于大批量样品的分析。

### 具体实施方式

本发明通过以下具体实例作进一步描述,但并不限制本发明。

#### 含量测定实例:

将卷烟烟丝粉碎并过 40 目筛,得烟粉备用。分别称取 0.5 克烟粉于 Dionex200 加速溶剂萃取装置的萃取池中,向其中加入 50 微升内标,萃取条件为 1500psi、200℃、萃取时间 15min、循环 3 次。将萃取液过 0.45 微米的滤膜得到澄清液体,取其 1 毫升于色谱瓶中,加入衍生化试剂 N, O-双(三甲硅基)三氟乙酰胺 (BSTFA) 100 微升摇匀,水浴 40~60℃衍生 30~50 分钟,凉至室温后直接进 GC-MS 进行检测。内标选择双内标即反-2-己烯酸和肉桂酸 ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  的挥发性有机酸以反-2-己烯酸为内标,  $\text{C}_{10}$  以上的半挥发性有机酸以肉桂酸为内标)。

采用本方法测定国外 5 个卷烟品牌中挥发、半挥发性有机酸的含量。每个样品进行 2 次平行测定,结果取其平均值,各有机酸的定量结果如表 1 所示。

表1 五种国外卷烟烟丝中挥发、半挥发性有机酸的含量  $\mu\text{g/g}$ 

卷烟牌号	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	2-甲基 丁酸	3-甲基 丁酸	戊酸	3-甲基 戊酸	己酸
1	348.675	444.472	2.981	0.575	1.045	0.555	1.620	0.525	2.537
2	377.297	335.194	3.253	0.558	1.137	0.690	2.026	1.125	3.019
3	248.170	367.583	2.441	0.416	0.994	0.712	1.532	1.139	2.637
4	315.376	349.159	2.854	0.521	1.155	0.878	1.792	— <sup>①</sup>	3.044
5	404.868	723.564	5.449	1.064	1.765	1.609	1.923	2.707	3.058

续表

卷烟牌号	乳酸	羟基乙 酸	2-吡喃 甲酸	庚酸	苯甲酸	辛酸	壬酸	癸酸	十二酸
1	203.836	45.687	10.252	0.769	6.918	2.102	2.782	2.134	7.301
2	140.187	42.289	9.632	0.806	10.783	2.384	2.502	2.384	3.771
3	229.205	43.227	12.449	0.817	47.284	2.490	3.072	17.422	3.557
4	213.160	41.851	9.763	0.747	10.029	2.291	3.608	1.757	2.748
5	287.407	46.694	12.050	0.780	15.120	2.516	2.738	1.701	1.907

续表

卷烟牌号	十四酸	十五酸	十六酸	十七酸	亚油酸	亚麻酸	油酸	十八酸	总量
1	59.032	20.533	733.787	41.959	586.057	710.026	199.547	185.311	3621.018
2	75.756	30.648	762.357	44.127	584.690	682.716	205.578	199.975	3524.886
3	69.152	36.863	740.315	44.877	574.854	656.966	227.440	217.899	3553.514
4	60.801	22.577	677.494	40.296	546.261	620.108	183.282	172.023	3283.660
5	70.748	25.982	634.386	872.719	542.906	616.860	203.797	176.266	4660.584

注：①符号“-”表示含量太低未做定量

### 重复性、相对标准偏差以及回收率测定：

采用相同的样品分析方法对同一样品进行6次平行测定，结果如表2所示：在所测定的26个目标物中，相对标准偏差在1.73%~7.08%之间，说明方法的重复性比较好。

采用标样加入法测定回收率。将一定量的标样加入烟叶样品中，将加标样品

和未加标样品平行进行前处理和定量分析。结果(表 2)表明: 所测有机酸的回收率在 81.1%~106.4%之间, 说明方法的测定结果比较准确。

表 2 方法的回收率和重复性

有机酸	原含量 μg	相对标准偏	加入量 μg	测定值 μg	回收率 %
		差 RSD%			
甲酸	139.226	4.13%	152.463	289.628	98.6%
乙酸	158.542	3.33%	186.259	335.998	95.3%
丙酸	1.285	4.59%	0.958	2.145	89.7%
丁酸	0.229	6.18%	1.215	1.254	84.4%
2-甲基丁酸	0.870	6.07%	2.434	3.038	89.1%
3-甲基丁酸	0.499	6.44%	0.899	1.334	92.5%
戊酸	0.986	4.35%	1.156	1.923	81.1%
3-甲基戊酸	0.335	5.34%	0.909	1.173	92.2%
己酸	1.441	6.36%	2.549	3.572	83.6%
乳酸	68.706	2.11%	65.502	125.088	86.1%
羟基乙酸	25.888	4.02%	45.753	66.683	89.1%
2-咪喃甲酸	3.672	2.79%	3.952	7.092	86.5%
庚酸	0.229	4.70%	0.634	0.842	96.6%
苯甲酸	2.302	2.58%	2.350	4.556	95.8%
辛酸	0.683	5.42%	1.210	1.854	96.7%
壬酸	0.861	7.08%	1.335	2.232	102.7%
癸酸	0.541	6.06%	0.734	1.223	92.9%
十二酸	1.103	6.74%	2.561	3.829	106.4%
十四酸	29.798	5.23%	30.304	59.184	96.9%
十五酸	7.325	4.38%	2.833	9.993	94.1%
十六酸	357.639	2.83%	347.674	669.541	89.7%
十七酸	22.417	2.51%	23.337	44.020	92.6%
亚油酸	330.551	1.73%	287.274	596.714	92.7%
亚麻酸	400.998	1.85%	394.512	724.795	82.1%
油酸	95.970	1.73%	123.544	199.166	83.5%
十八酸	93.752	1.88%	109.110	185.652	84.2%

说明: 表 1 中所测样品是成品卷烟的烟丝, 在做重复性时所用样品是未加工前的烟叶, 烟叶经过加香加料处理后, 挥发酸、半挥发酸的含量有可能增加。