

微型液液萃取-气相色谱-质谱法测定烟用香料中丁酸和乳酸的含量

李 晶, 刘 欣, 米其利, 陈建华, 孔维松, 李雪梅, 杨光宇, 张承明, 徐济仓, 杨叶昆*

(云南中烟工业有限责任公司 技术中心, 昆明 650106)

摘 要: 样品 0.500 0 g 置于 10 mL 烧杯中, 用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钾-甲醇溶液调节 pH 至 8~9, 于 100 °C 将水分挥干。残渣用硫酸-甲醇(5+95)溶液 10 mL 溶解, 并于 70 °C 酯化反应 30 min。取甲酯化后的溶液 200 μL 采用自主设计的微型液液萃取装置, 以二氯甲烷 1 mL 为萃取剂进行萃取, 再加入水 1 mL 进行振荡萃取。所得萃取液采用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定其中丁酸和乳酸的含量。结果表明: 丁酸和乳酸的质量浓度在 0.10~50.00 mg · L⁻¹ 内与其峰面积呈线性关系, 检出限(3S/N)分别为 0.1, 0.4 mg · kg⁻¹。按标准加入法进行回收试验, 回收率为 97.7%~108%, 相对标准偏差(n=5)为 0.60%~12%。

关键词: 气相色谱-质谱法; 微型液液萃取; 丁酸; 乳酸; 烟用香料

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2018)04-0413-06

烟用香料是卷烟企业生产过程中一种重要的辅料, 是构成卷烟品牌风格的重要因素, 能起到改善卷烟产品烟气质量、改进卷烟产品品质的作用^[1-3], 其质量和品质的一致性与卷烟产品的品质和稳定性休戚相关^[4]。影响烟用香料品质的原因很多, 微生物污染是其中主要的影响因素^[5], 这是由于烟用香料具有高水分、高糖的基质特点, 是微生物发酵的“天然温床”。微生物污染普遍存在于食品的生产加工及储运过程中, 已经成为食源性疾病发生的主要原因, 是食品的首要安全风险, 引起了世界各国的关注^[6-7]。

微生物代谢组学是近年来新兴的研究方法, 旨在以定性和定量限定条件下的特定生物样品中的所有代谢组分为目标, 集中阐释代谢反映的全部信息, 可以为发现标志物、探究代谢机理提供新的方法和思路^[8-10]。烟用香料微生物代谢过程中, 会有各种有机酸产生, 其中乳酸、丁酸是其中重要的产物, 尤其是丁酸具有特征性臭味, 是品质改变的指标性物质。因此, 对烟用香料中乳酸、丁酸的测定可以及时

掌握烟用香料的变化情况和监控烟用香料的品质, 具有重要的现实意义。

目前乳酸、丁酸的测定方法主要有高效液相色谱法^[11-12]、离子色谱法^[13-14]、毛细管电泳法^[15-16]和气相色谱-质谱法^[17-18]。其中, 高效液相色谱法和离子色谱法由于不具有准确定性功能, 对于基质复杂的烟用香料来说, 具有一定的局限性, 而且有机酸的摩尔吸光系数较小, 高效液相色谱法检测灵敏度低^[19], 离子色谱法则容易受到其他有机酸以及阴离子的影响, 检测效果不佳; 毛细管电泳法同样也存在检测灵敏度低、重复性差等缺点。有机酸检测较为常见的方法就是将酸类物质进行酯化衍生处理后, 以降低其极性和沸点, 从而改善分离效果和灵敏度^[20], 而目前烟用香料中乳酸、丁酸的酯化衍生测定方法还未见报道。

本工作采用硫酸-甲酯化法对烟用香料样品中的乳酸、丁酸进行衍生, 并设计了一种微型液液萃取装置, 能对样品快速、方便地进行前处理, 再结合气相色谱-质谱法分离、测定烟用香料中乳酸、丁酸的含量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

SCION SQ 型气相色谱-质谱联用仪; Milli-Q

收稿日期: 2017-04-08

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目(110201502006); 云南中烟科技项目(2016JC03)

作者简介: 李 晶, 博士, 主要从事烟草化学分析研究工作

* 通信联系人。yangyekun@163.com

型超纯水纯化系统;AE200 型分析天平;SK5200 型超声波振荡器;0.45 μm 有机针式过滤器。

丁酸、乳酸标准储备溶液:1.000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别称取适量丁酸、乳酸标准品(精确到 0.1 mg)(乳酸需进行纯度折算后称量)于 2 个 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,备用。

混合标准溶液:50.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分别移取丁酸、乳酸标准储备溶液各 500 μL 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容。使用时,用甲醇稀释至所需质量浓度。

甲酯化溶液:硫酸-甲醇(5+95)溶液,在冰冷却和搅拌条件下,将 5 mL 硫酸缓慢加入 50 mL 甲醇中,再用甲醇定容至 100 mL,摇匀备用。

0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾-甲醇溶液:称取氢氧化钾 0.56 g,用甲醇溶解并定容至 100 mL,摇匀备用。

乳酸(纯度大于 85%),丁酸(纯度大于 99.5%);二氯甲烷、甲醇为色谱纯;硫酸、氢氧化钾为优级纯;试验用水为超纯水;试验用烟用香料取自某烟用香料企业。

1.2 仪器工作条件

1) 色谱条件 Agilent DB-624 毛细管色谱柱(60 $\text{m} \times 0.32 \text{ mm}$, 1.8 μm);柱流量 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$;载气为氮气,纯度不小于 99.999%;进样量 1.0 μL ,分流进样,分流比为 10:1。柱程序升温:初始温度 80 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min;以速率 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$;以速率 15 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。

2) 质谱条件 电子轰击离子源(EI);电子能量 70 eV;离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;选择离子监测模式;丁酸甲酯的保留时间为 9.18 min,定量离子 m/z 43,定性离子 m/z 74,丰度比为 100:77;乳酸甲酯的保留时间为 10.37 min,定量离子 m/z 45,定性离子 m/z 43,丰度比为 100:22。

1.3 试验方法

1.3.1 微型液液萃取装置

微型液液萃取装置由外套管和带毛细管的中空活塞杆组成,见图 1。萃取时将萃取剂和待萃取溶液装入外套管中,插入活塞杆,充分振荡,然后静置,把活塞杆向下推,在毛细管口处分层,然后吸出(或倒出)上层液,达到分离。

1.3.2 样品前处理

称取烟用香料样品 0.5000 g 于 10 mL 烧杯中,用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾-甲醇溶液将样品 pH 调

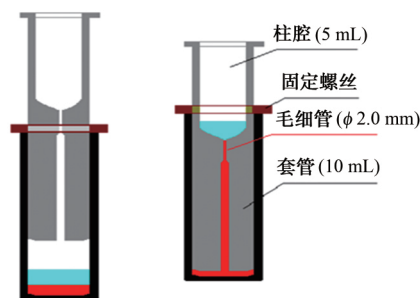


图 1 微型液液萃取装置

Fig. 1 Device of micro liquid-liquid extraction

节至 8~9,并用加热板于 100 $^{\circ}\text{C}$ 将烟用香料中的水分挥干。加入硫酸-甲醇(5+95)溶液 10 mL,将残渣进行溶解,将溶解后的溶液转移入玻璃瓶中,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下密封酯化反应 30 min。移取甲酯化后的溶液 200 μL 置于微型液液萃取装置中,加入二氯甲烷 1 mL,充分振荡后,再加入水 1 mL 进行振荡萃取,萃取液经 0.45 μm 有机滤膜过滤后按仪器工作条件进行测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

丁酸、乳酸混合标准溶液的总离子流色谱图见图 2,选择离子监测色谱图见图 3。

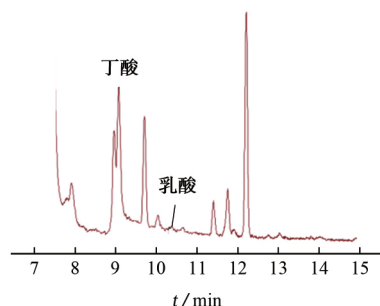


图 2 丁酸、乳酸混合标准溶液的总离子流色谱图

Fig. 2 TIC chromatogram of the mixed standard solution of *n*-butanoic acid and lactic acid

2.2 甲酯化条件的选择

干燥是样品衍生化过程中十分重要的步骤^[21],鉴于烟用香料中高水分的基质特点,高水分对于甲酯化的影响较大,试验考虑将烟用香料中的水分进行挥干。试验选择将乳酸、丁酸碱化后反应成盐,水分挥干后,再利用甲酯化溶液复溶,这样不仅可以防止乳酸、丁酸在水分挥干过程中有所损失,而且酸类物质成盐后更有利于进行甲酯化反应。

试验选择硫酸-甲醇(5+95)溶液为甲酯化溶

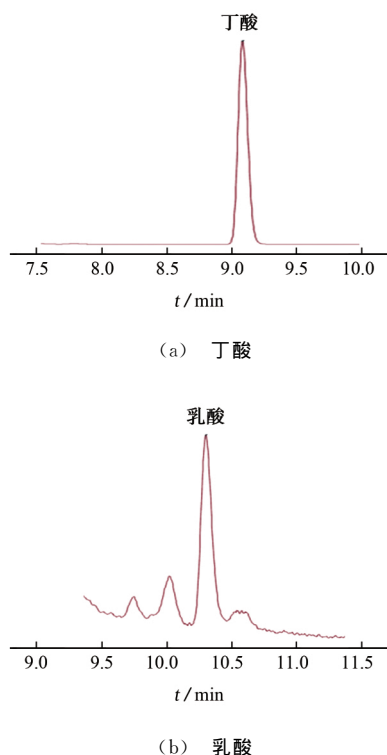


图3 丁酸、乳酸混合标准溶液的选择离子色谱图

Fig. 3 SIM chromatograms of the mixed standard solution of *n*-butanoic acid and lactic acid

液,于70℃水浴中进行酯化反应,分别考察了不同的酯化时间(15,30,45,60 min)对丁酸、乳酸的酯化效率的影响。结果表明:酯化反应30 min时,酯化效率最高。试验选择酯化反应时间为30 min。

2.3 萃取条件的选择

常见的萃取溶剂为正己烷、二氯甲烷和三氯甲烷,利用微型液液萃取装置优化后,二氯甲烷的萃取效率最佳,试验选择二氯甲烷为萃取剂。

萃取剂与待萃溶液的体积比是影响萃取效率的关键因素。试验以200 μL 甲酯化溶液为对象,考察萃取剂与待测溶液体积比分别为1:1,2:1,5:1,8:1时对萃取效果的影响。结果表明:随着萃取体积比增大,萃取效率升高,当萃取体积比为5:1时萃取效果最佳;继续增大萃取体积比,萃取效率变化不大。综合考虑目标物的质谱响应以及萃取操作,试验选择萃取体积比为5:1,即待测溶液为200 μL 时,萃取剂二氯甲烷为1 mL。

2.4 标准曲线和检出限

按试验方法分别对所配制的质量浓度为0.10, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准溶液系列进行测定,以目标物的色谱峰面积对其质量浓度进行线性回归。线性回归方程、线性范围和相关系数见表1。

按仪器的3倍信噪比计算方法的检出限(3S/N),结果见表1。

表1 线性参数和检出限

Tab. 1 Linearity parameters and detection limits

目标物	线性范围 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	线性回归方程	相关系数	检出限 $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
丁酸	0.10~50.00	$y=7.184x+48.67$	0.998 6	0.1
乳酸	0.10~50.00	$y=6.712x+25.85$	0.996 4	0.4

2.5 精密度和回收试验

选择某个香料样品进行不同浓度水平下(1.00, 5.00, 10.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的加标回收试验,每个样品平行测定5次,所得到的加标回收率和测定值的相对标准偏差(RSD)见表2。

表2 精密度和回收试验结果($n=5$)Tab. 2 Results of tests for precision and recovery($n=5$)

目标物	本底值 $w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	加标量 1.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		加标量 5.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		加标量 10.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
丁酸	2.33	98.2	9.1	101	6.7	102	0.60
乳酸	13.47	97.7	12	99.4	1.6	108	1.0

2.6 样品分析

选取某企业的20个香精香料样品,其中1~10号样品为5种烟用香料储放前后对比取样样品,11~20号样品为同一样品不同储放时间内跟踪取样样品。按试验方法进行测定,如果测定结果超过

线性范围,利用二氯甲烷稀释到合适量后进样,样品分析结果见表3。一个典型香料样品的总离子流色谱图和选择离子监测色谱图见图4和图5。

同时为了详细掌握烟用香料样品的变化情况,按照GB 4789.2—2016《食品安全国家标准食品微

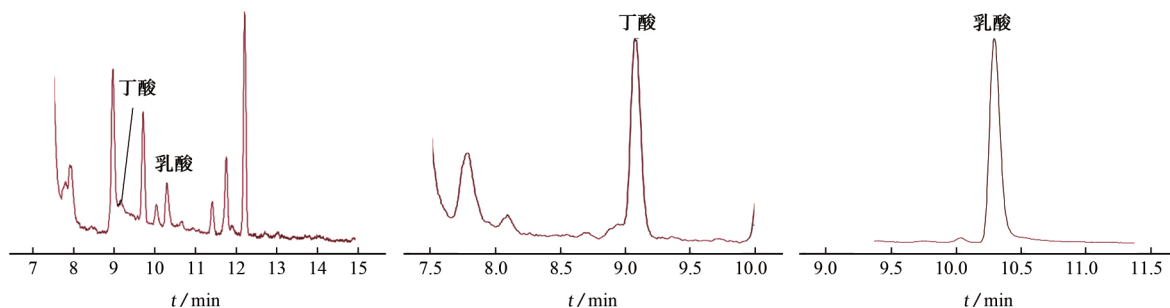


图4 样品的总离子流色谱图

Fig. 4 TIC chromatogram of the sample

(a) 丁酸

(b) 乳酸

图5 样品的选择离子色谱图

Fig. 5 SIM chromatograms of the sample

生物学检验 菌落总数测定》以及 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》方法对样品进行了细菌、霉菌和酵母菌

的检测;并参考 YC/T 164—2012《烟用香精》和 GB/T 29605—2013《感官分析 食品感官质量控制 导则》进行人工嗅辩,具体变化情况见表3。

表3 样品分析结果

Tab. 3 Analytical results of the samples

样品	储放时间/ d	测定值 $w/(mg \cdot kg^{-1})$		菌落总数 (CFU $\cdot g^{-1}$)	霉菌计数 (CFU $\cdot g^{-1}$)	酵母计数 (CFU $\cdot g^{-1}$)	嗅辩	变化情况
		丁酸	乳酸					
1#	0	2.54	0.70	5.3×10^2	0	0	无异味	未变质
2#	2	2.25	0.58	7.3×10^3	1.4×10^5	1.1×10^3	无异味	未变质
3#	0	2.23	786.62	1.1×10^3	0	0	无异味	未变质
4#	3	2.33	13.47	4.0×10^5	2.2×10^6	3.0×10^6	酸气味	已变质
5#	0	2.64	195.12	2.4×10^3	0	0	无异味	未变质
6#	4	18.41	206.18	1.3×10^8	2.9×10^4	2.0×10^4	酸臭味	已变质
7#	0	1.48	105.56	1.0×10^3	0	0	无异味	未变质
8#	9	2.52	1598.78	9.4×10^3	2.3×10^7	9.0×10^6	酸臭味	已变质
9#	0	2.15	152.90	3.7×10^2	0	0	无异味	未变质
10#	3	1.56	165.90	5.2×10^7	3.0×10^6	2.6×10^4	酸气味	已变质
11#	0	1.48	105.56	1.0×10^3	0	0	无异味	未变质
12#	1	2.15	152.94	1.0×10^3	0	0	无异味	未变质
13#	2	1.57	165.91	8.9×10^2	0	0	无异味	未变质
14#	3	1.90	180.45	1.1×10^3	0	10	无异味	未变质
15#	4	1.80	134.69	9.8×10^2	630	4.5×10^4	无异味	未变质
16#	5	1.73	79.14	8.8×10^2	8.0×10^3	6.5×10^4	无异味	未变质
17#	6	2.10	159.99	9.6×10^2	2.0×10^6	1.2×10^5	无异味	未变质
18#	7	1.80	149.66	7.3×10^3	1.1×10^7	2.6×10^5	无异味	未变质
19#	8	2.17	155.55	9.1×10^3	2.0×10^7	1.2×10^6	无异味	未变质
20#	9	2.52	1598.78	9.4×10^3	2.3×10^7	9.0×10^6	酸臭味	已变质

由表3可知:丁酸、乳酸作为烟用香料中微生物的代谢产物,与香料的变质情况休戚相关。当丁酸或者乳酸含量发生急剧变化的时候正是烟用香料变质发生的关键点,因此对烟用香料中的丁酸、乳酸进

行监测,可以实时监控烟用香料的变化情况,杜绝了单靠人工嗅闻或者微生物判定的延时性,不仅可以 将烟用香料变质判定大大提前,还可以有效预防烟用香料变质加剧,尽早进行事前预警防控,减少由于

烟用香料变质而造成的经济损失。

本工作建立了一种微型液液萃取-气相色谱-质谱法测定烟用香料中乳酸和丁酸含量的方法。该方法具有操作简单方便、溶剂消耗量少、准确度较高等优点,已经应用于生产企业实际样品中丁酸、乳酸的监测分析。该方法的应用期望能把香料变质的预判时间推前,及时掌握烟用香料的变化情况,降低产品变质风险,对生产企业具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] YC/T 164—2012 烟用香精[S].
- [2] 于明芳,李荣.烟用香精香料中重金属和砷的控制[J].烟草科技,1998(6):28-30.
- [3] 郭俊成,程晓蕾.烟用香精香料浅述[J].烟草科技,1996(2):14-15.
- [4] 张丽娜,许利平,许式强,等.生产退回烟用香精香料保质期研究[J].安徽农学通报,2013,19(16):143-146.
- [5] 党立志,张正禹,张健,等.已制备变质香精香料中微生物种群分析[J].云南农业大学学报(自然科学版),2016,31(4):707-712.
- [6] 许喜林,郭祀远,李琳.食品生产中微生物危害的分析与控制[J].微生物学通报,2002,29(2):67-71.
- [7] 张新武,杜小波,徐素玲,等.食品中微生物危害的分析和控制[J].食品安全质量检测学报,2014(10):3295-3299.
- [8] 王智文,马向辉,陈洵,等.微生物代谢组学的研究方法进展[J].化学进展,2010,22(1):163-172.
- [9] 席晓敏,张和平.微生物代谢组学研究及应用进展[J].食品科学,2016,37(11):283-289.
- [10] 赵丹,杜仁鹏,刘鹏飞,等.代谢组学技术在植物源性食品研究中的应用研究进展[J].食品科学,2015,36(3):212-216.
- [11] 王文领,王宁,宋金勇,等.反相 HPLC 法同时测定烟草中的甲酸、乙酸和乳酸[J].烟草科技,2008(6):41-43.
- [12] 白冬梅,班睿,赵学明,等.反相高效液相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中的乳酸[J].色谱,2000,18(6):527-528.
- [13] 牟豪杰,孟庆翔,任丽萍,等.离子色谱法同时测定牛瘤胃液中乳酸和挥发性脂肪酸含量[J].理化检验-化学分册,2009,45(1):52-54.
- [14] 法芸,张聪,杨海燕,等.离子色谱法同时测定嗜热厌氧菌发酵液中的有机酸与无机阴离子[J].海洋科学,2010,34(11):23-26.
- [15] 陆秀芬,黄丽雯,邓翼惠.毛细管电泳法检测五种有机酸分析方法的探讨[J].医学信息,2012,25(2):473-474.
- [16] 唐萍,田晶,苑广志,等.毛细管电泳测定乳酸发酵液中有有机酸[J].食品与发酵工业,2006,32(3):76-78.
- [17] 王冰,谢复炜,刘克建,等.烟用香料中挥发性酸的 GC/MS 分析[J].烟草科技,2009(9):32-38.
- [18] 杨虹.烟草中乳酸含量的气相色谱/质谱分析[J].烟草科技,2005(1):27-29.
- [19] L R 施耐德.实用高效液相色谱法的建立[M].2版.北京:华文出版社,2000:156.
- [20] 张伟,李晓君,张静,等.柱前衍生-气相色谱法同时测定功能食品中8种有机酸[J].分析试验室,2014,33(2):175-179.
- [21] 杜启云,何海娟.卷烟中非挥发性有机酸、糖类、某些氨基酸和磷酸的同时测定[J].烟草科技,2007(7):30-35.

Determination of *n*-Butanoic Acid and Lactic Acid in Flavouring Substance for Tobacco by Micro Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LI Jing, LIU Xin, MI Qili, CHEN Jianhua, KONG Weisong, LI Xuemei,
YANG Guangyu, ZHANG Chengming, XU Jicang, YANG Yekun*

(Technology Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650106, China)

Abstract: The sample of 0.500 0 g was placed into a baker of 10 mL, and adjusted to pH 8—9 with 0.1 mol · L⁻¹ KOH-methanol solution. Water in the sample was concentrated to dryness at 100 °C. The residue was dissolved in 10 mL of sulfuric acid-methanol (5+95) solution and esterification reaction was taken for 30 min at 70 °C. Then the reacted solution of 200 μL was extracted with dichloromethane of 1 mL as the extraction solvent in a self-designed micro liquid-liquid extraction device, and water of 1 mL was added to oscillate. *n*-Butyric acid and lactic acid were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). As shown by the results, Linear relationships between values of peak area and mass concentration of *n*-butanoic acid and lactic acid were found in the

range of 0.10–50.00 mg · L⁻¹, with detection limits (3S/N) of 0.1 mg · kg⁻¹ for *n*-butanoic acid and 0.4 mg · kg⁻¹ for lactic acid. Test for recovery was made by standard addition method, giving results in the range of 97.7%–108%, with RSDs (*n*=5) ranged from 0.60% to 12%.

Keywords: GC-MS; micro liquid-liquid extraction; *n*-butanoic acid; lactic acid; flavouring substance for tobacco

《理化检验-化学分册》2018 年专题报道征稿启事

《理化检验-化学分册》杂志将在近年开展专题报道的基础上,在 2018 年于第 5 期、第 7 期、第 9 期分别推出“食品分析”、“环境分析”、“高度关注物质检测”专题报道,热忱欢迎相关领域的检测技术人员踊跃投稿。

内容涉及:

1) 食品分析。包括为应对新时代下食品产业创新发展、消费升级、保障食品质量安全而开发的智能化检测仪器设备及应用,食品安全监测和风险评估,农产品质量控制技术,“废气、废水、废油”处理和有害物质检测技术,食品中重金属、农药残留、添加剂等成分分析的新技术和新方法,特别是多成分同时分析和快速检测技术等相关内容。

2) 环境分析。主要包括为土壤、水质、三废、大气污染物、危险废弃物、固体废弃物等环境样品中有害化学成分,如重金属、多环芳烃、挥发性有机化合物等检测而开发的新设备及应用、样品前处理新手段、检测新技术和新方法等。

3) 高度关注物质(SVHC)检测。欧盟《关于化学品注册、评估、许可和限制的法规》(REACH 法规)于 2007 年 6 月 1 日正式实施以来,其影响范围甚广。截至 2016 年 12 月 29 日,欧洲化学品管理局(ECHA)已经先后发布 REACH 法规十六批 SVHC 清单,共计有 173 种物质。本专题将聚焦于有关 SVHC 的检测新技术和新方法。

综述性文章要求能总结上述领域的研究现状、评价研究进展、提出前瞻性的发展方向;研究性文章要求能反映上述领域的最新研究成果;应用性文章要求能注重技术手段、方法新颖、内容清晰,具有实际推广价值。

请按照本刊的论文模板撰写。投稿时,请在审稿系统留言“专题报道征文”。择优录用,优先发表。

投稿网址:www.mat-test.com

电话:021-55882970;021-65556775-263

E-mail:hx@mat-test.com