

离子色谱-脉冲安培法检测卷烟主流烟气中的6种水溶性糖

黄翼飞, 胡静

(广东中烟工业有限责任公司国家认定企业技术中心, 广东广州 510385)

摘要: 阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和果糖是卷烟主流烟气中的6种主要水溶性糖。采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法对这6种水溶性糖进行了分离测定。优化了样品提取方法。捕集在剑桥滤片上的主流烟气中的水溶性糖用20 mg/L NaN₃水溶液超声提取45 min, 在分析前无需进行其它前处理。用2.5 mmol/L NaOH作为流动相在CarboPac PA20色谱柱上实现了对6种糖的有效分离。6种水溶性糖的检测限在2.47~9.82 μg/L之间, 线性相关系数均大于0.999, 日内精密度小于5.0%, 日间精密度小于6.9%, 高、中、低三种添加水平的回收率在97.1~102.4%之间。方法成功应用于多个牌号卷烟样品的检测。在所测定的样品中, 6种水溶性糖的含量在36.17 μg/支和119.5 μg/支之间。果糖含量最高, 为24.63~74.66 μg/支。其次为葡萄糖, 为8.09~38.09 μg/支。果糖和葡萄糖占了6种糖总量的90.5~94.7%。

关键词: 离子色谱; 脉冲安培法; 卷烟; 烟气; 糖

文章编号: 1673-9078(2013)10-2517-2521

Simultaneous Analysis of Six Water-soluble Sugars in the Main Stream Smoke of Cigarettes by Ion Chromatography with Pulsed Amperometric Detection

HUANG Yi-fei, HU Jing

(State-accredited Enterprise Technology Center of China Tobacco Guangdong Industrial Co., Ltd., Guangzhou 510385, China)

Abstract: Arabinose, galactose, glucose, xylose, mannose and fructose are the six major water-soluble monosaccharides in the main stream smoke of cigarette. These sugars were separated and determined by high-performance anion exchange chromatography with pulsed integrated amperometric detection. Soluble sugars of the main stream smoke trapped in a Cambridge filter were extracted with 20 mg/L sodium azide by ultrasonic wave for 45 minutes. Six sugars were effectively separated by using 2.5 mmol/L NaOH as eluent on an anion exchange column -CarboPac PA20. The detection limits were between 2.47~9.82 μg/L and the linear correlation coefficients were above 0.999 in all cases. The intra-day and inter-day precision were below 5.0% and 6.9%, respectively. The recoveries of three spiked levels ranged from 97.1% to 102.4%. The established method was successfully applied in the detection of cigarette samples of various brands. The total contents of six sugars within the tested samples were 36.17~119.5 μg/cigarette. Fructose had the highest content with the values between 24.63~74.66 μg/cigarette. And glucose showed the second highest content, which took up 8.09 to 38.09 μg/cigarettes. Both fructose and glucose accounted for 90.5~94.7% of the total contents of six sugars.

Key words: ion chromatography; pulsed amperometric detection; cigarette; smoke; sugar

水溶性糖是烟草自身含有的重要组分, 同时, 水溶性糖也作为许多香精香料的重要成分添加到卷烟生产过程中。在卷烟燃烧过程中, 水溶性糖发生一系列

收稿日期: 2013-05-29

基金项目: 广东中烟工业有限责任公司科技项目(粤烟工[2009]科学第015号)

作者简介: 黄翼飞(1976-), 男, 高级工程师, 主要从事烟草化学研究

的化学变化转化为其他物质, 但仍有少量的水溶性糖通过高温加热和蒸馏等作用, 通过烟支并透过滤嘴进入口腔中。为了探究卷烟主流烟气中的主要水溶性糖, 有必要建立一种简便、灵敏和准确可靠的检测方法。

由于主流烟气的基质复杂, 水溶性糖含量较低, 对主流烟气中多种水溶性糖(果糖、葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖和木糖)同时进行测定的分析方

法报道较少。气相色谱法可应用在糖类物质的测定中^[1-2]。由于水溶性糖不具有挥发性,必须将其衍生为挥发性物质才能进行气相色谱分析,但衍生操作复杂繁琐,而且,如衍生反应不完全或生成多种非目标衍生产物,还会影响测定的准确性。液相色谱(HPLC)和离子色谱都是直接测定单糖和低聚糖化合物常用的方法。液相色谱测定糖大多使用示差折光或蒸发光散射检测器,具有直接、快速、准确、重复性好和成本低的特点,广泛用于糖类分析^[3-9]。但液相色谱结合示差折光或蒸发光散射检测器由于检测灵敏度的限制,无法完成对微量糖组分的分析。水溶性糖也可以通过衍生化反应后使用紫外检测器进行分析^[10],侯冰等报道了用衍生法测定主流烟气中的甘露糖和葡萄糖^[11],但这种方法操作比较麻烦,耗时耗力。

离子色谱-脉冲安培法可以对水溶性糖组分进行直接测定,无需进行繁杂的衍生化前处理,通过糖分子结构中的羟基在金电极表面发生氧化反应产生的电流实现检测,具有灵敏度高、选择性好和无需使用有毒化学试剂的优点。本实验采用离子色谱-脉冲安培法对主流烟气中的水溶性糖进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

D-(+)-无水葡萄糖、D(-)-果糖、D-(+)-甘露糖、DL-木糖和 D-(+)-半乳糖(Sigma-Aldrich 公司)。D(-)-阿拉伯糖(Alfa Aesar 公司)。氢氧化钠溶液(50% *m/V*, Fisher Scientific 公司)。醋酸钠(99.9+%, 美国 Dionex 公司)。NaN₃(分析纯, 国产)。超纯水(Millipore, 电阻率为 18.2 MΩ·cm)。

ICS-2500 型离子色谱仪, 美国 Dionex 公司; 配 AS50 自动进样器; AS50 柱温箱; GP50 梯度泵; ED50 电化学检测器; Chromeleon 6.70 色谱工作站; Milli-Q Advantage A10 超纯水机, 美国 Millipore 公司; CP225D 电子天平, 德国 Sartorius 公司; 8894 超声清洗器, 美国 Cole-Parmer 公司; HY-5 回旋振荡器, 江苏金城国胜实验仪器厂; 0.45 μm 水相滤膜, 上海安谱科学仪器有限公司。

1.2 样品处理

按 GB/T16450-2004 标准^[12]抽吸卷烟, 2 支卷烟主流烟气的总粒相物收集于剑桥滤片上。将滤片置于 50 mL 三角锥形瓶中, 加入 15 mL 20 mg/L NaN₃ 萃取溶液, 室温超声提取 45 min, 样品提取液用 0.45 μm 水相滤膜过滤后待测。

1.3 标准溶液配制

根据样品中 6 种糖含量的高低, 用 20 mg/L NaN₃ 溶液配制含阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和果糖浓度分别为 140、25、1100、25、200 和 2300 mg/L 的一级混合标准溶液。一级混合标准溶液用 20 mg/L NaN₃ 溶液稀释 200 倍后, 得二级混合标准溶液。由二级混合标准溶液进一步稀释 1、2、10/3、5 和 10 倍, 配制成系列混合标准溶液。

1.4 色谱条件

美国 Dionex 公司 CarboPac PA20 分析色谱柱(150 mm×3 mm, 6.5 μm)和 CarboPac PA20 保护柱(30 mm×3 mm)。10 μL 进样环, 全环进样; 柱温箱: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: 水和 250 mmol/L NaOH; 淋洗梯度曲线类型: 线性; 淋洗条件: 0.000~33.000 min, 2.5 mmol/L NaOH, 33.999~46.000 min 200 mmol/L NaOH, 46.001~60.000 min, 2.5 mmol/L NaOH; 数据采集速率: 2.00 Hz; 金工作电极, pH/Ag/AgCl 参比电极, 脉冲安培检测方式, 四电位波形见表 1。

表 1 糖测定四位波形 (Ag/AgCl 参比电极)

Table 1 Quadruple waveform for carbohydrate detection

(Ag/AgCl reference electrode)		
时间/s	电位/V	积分
0.00	+0.1	
0.20	+0.1	On
0.40	+0.1	Off
0.41	-2.00	
0.42	-2.00	
0.43	+0.60	
0.44	-0.10	
0.50	-0.10	

2 结果与讨论

2.1 脉冲安培检测考察

糖在强碱性淋洗液中以羟基阴离子的形式存在。脉冲安培检测器(PAD)在强碱性介质中通过施加一定的电位,使羟基阴离子在金电极表面发生氧化反应。电化学检测用于测定待测分子在工作电极表面发生氧化或还原反应产生的电流。在氧化反应时,电子从有电活性的羰基化合物分子转移到在电化学池里的工作电极。卷烟主流烟气中的基质非常复杂,但脉冲安培检测对电活性物质具有高度的选择性,不能被氧化或还原的物质没有响应信号,这在很大程度上可以消除

许多杂质对 6 种糖分离造成的干扰, 有利于检测灵敏度的提高。由于 PAD 测糖的灵敏度很高, 因此, 仅需收集 2 支卷烟的主流烟气即能满足检测要求, 较稀的样品溶液也有利于延长色谱柱的使用寿命。

金电极处的碳水化合物氧化是通过金工作电极和 Ag/AgCl 参比电极间电位 (波形) 的快速调节序列进行的, 其中的电流在很短的时间间隔内的检测波形被积分测定。

需要注意的是, 氧化反应产物会污染金工作电极, 从而抑制更多待测物的氧化。这要通过重复地在高正负电位间脉冲来去除氧化产物, 同时保持电极稳定有效。四电位波形 (见表 1) 有利于长期获得最佳的再现性和检测稳定性, 并将电极的使用损坏降到最低程度。

2.2 色谱条件的选择

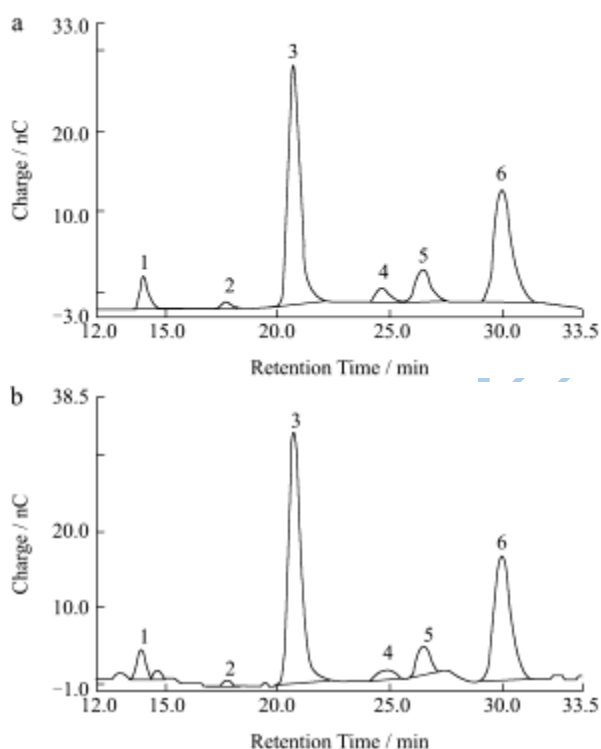


图 1 混合标准溶液 (a) 和样品溶液 (b) 中 6 种水溶性糖的色谱图

Fig.1 The chromatogram of six water soluble sugars in a mixed standard solution (a) and the mainstream smoke of a cigarette sample (b)

注: 1-阿拉伯糖, 2-半乳糖, 3-葡萄糖, 4-木糖, 5-甘露糖, 6-果糖。

糖是一种弱酸, pKa 值一般在 12~14 之间, 在 NaOH 溶液等强碱性介质中会部分或全部以阴离子形式存在^[13]。由于在强碱性溶液中糖分子的结构存在带

负电荷部分和疏水部分, 因而糖的分离机理除了阴离子交换之外, 还有疏水性吸附作用^[13]。CarboPac PA20 是阴离子交换色谱柱, 既有快速分离单糖或二糖的特点, 又具有较好的色谱分离度保障。PA20 色谱柱在 pH 0~14 时均能稳定使用, 实验选用该色谱柱进行方法开发。

糖类化合物在阴离子交换分离柱上的保留主要取决于糖类化合物所带的电荷数、分子大小和结构^[13]。较低的 NaOH 淋洗液浓度可增加 6 种糖的保留时间, 有利于获得较好的色谱分离度。分别考查了 NaOH 淋洗液浓度为 0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、5.0、10.0 mmol/L 时 6 种糖的分离情况, 在 NaOH 淋洗液浓度为 2.5 mmol/L 时, 6 种糖可以在 32 min 内实现良好的色谱分离, 其中较难分离的木糖和甘露糖在该实验条件下也达到了基线分离。混合标准溶液和样品溶液中 6 种水溶性糖的分离色谱图见图 1 a 和 b。

流速对色谱柱的分离产生一定影响。高流速可以缩短分析时间, 但另一方面也会使柱压大大升高, 而且可能降低目标色谱峰与杂质峰的分度。当流速为 0.2 mL/min 时, 待测物质色谱峰出峰较慢, 色谱运行时间较长; 当流速为 0.3 mL/min 时, 待测物质色谱峰在 32 min 内出峰完毕, 各色谱峰分离情况良好; 当流速为 0.35 mL/min 时, 柱压超过 2760 psi, 而 CarboPac PA20 色谱柱的最大耐受压力为 3000 psi, 长时间在较高压力情况下运行会缩短柱子的使用寿命。因此, 流速设定为 0.3 mL/min。

6 种糖出峰完毕后, 用 200 mmol/L 高浓度 NaOH 冲洗 12 min 后再用 2.5 mmol/L NaOH 冲洗 14 min, 可充分洗脱吸附在色谱柱中的杂质并较快的使色谱柱达到稳定状态, 有利于在连续进样分析中获得稳定的保留时间、分离度及灵敏度。

2.3 样品处理方法考察

水溶性糖易溶于水中, 因此用水配制标准溶液及制备样品溶液。由于水溶性糖在单纯的水中容易滋生微生物而被破坏而改变溶液中糖的浓度, 因此, 在水中加入少量的 NaN₃。

2.3.1 萃取方式的选择

机械振荡萃取和超声波萃取是萃取剑桥滤片捕集物的两种常用方式。按照 1.2 样品处理方法分别进行振荡萃取和超声萃取。由表 2 可见, 对于试验样品, 超声萃取方式的萃取量比振荡方式的多 16% 以上, 可能原因是捕集于剑桥滤片内部的糖在超声波的作用下更容易被溶液萃取出来, 而机械振荡无法充分提取剑

桥滤片内部的可溶性糖。

表 2 超声萃取和振荡萃取效果对比 (µg/支卷烟)

Table 2 The comparison of the effect of ultrasonic extraction and mechanical shaking extraction (µg/cigarette)

糖	振荡萃取	超声萃取
阿拉伯糖	2.36	2.93
半乳糖	0.34	0.51
葡萄糖	26.12	34.30
木糖	1.93	2.24
甘露糖	4.53	5.37
果糖	53.52	66.73

2.3.2 萃取时间的选择

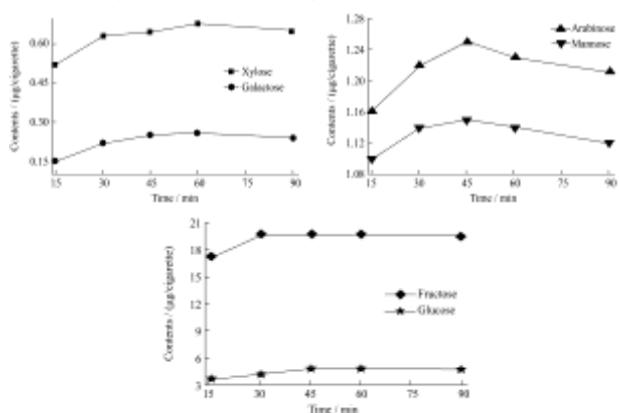


图 2 不同提取时间的水溶性糖测试含量

Fig.2 The contents of 6 water soluble sugars in different extraction time

按照 1.2 样品处理方法, 把提取时间分别设为 15 min、30 min、45 min、60 min 和 90 min。由图 2 可见, 提取时间由 15 min 到 45 min 时, 6 种水溶性糖的提取量在逐渐增加。当提取时间超过 45 min 时, 6 种组分含量趋于稳定。因此, 采取 45 min 的提取时间。

2.4 方法评价

表 3 样品中 6 种糖的回收率

Table 3 Recoveries of 6 sugars from sample

糖	样品浓度/(µg/L)	添加浓度/(µg/L)			测定浓度/(µg/L)			加标回收率/%		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
阿拉伯糖	505.637	134.066	401.400	711.936	639.600	919.500	1221.841	99.9	103.1	100.6
半乳糖	40.270	27.473	82.253	145.889	68.150	122.333	181.706	101.5	99.8	96.9
葡萄糖	3077.978	859.441	2573.200	4563.930	3958.370	5718.089	7539.031	102.4	102.6	97.7
木糖	123.578	51.948	155.530	275.862	175.040	281.407	398.485	99.1	101.5	99.7
甘露糖	934.426	120.879	361.910	641.910	1055.043	1298.435	1594.087	99.8	100.6	102.8
果糖	8803.587	2014.386	6031.100	10697.100	10848.133	14969.600	19504.496	101.5	102.2	100.0

2.5 实际样品测定

用建立的方法对多种卷烟样品主流烟气中的水溶

2.4.1 线性关系和方法检出限

表 2 线性方程、相关系数和检出限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients and limits of detection

糖	线性方程	相关系数/r	检出限/(µg/L)
阿拉伯糖	y=0.0051x-0.0260	1.0000	2.47
半乳糖	y=0.0045x-0.0045	0.9998	4.10
葡萄糖	y=0.0046x+0.3164	0.9993	3.31
木糖	y=0.0041x-0.0053	0.9996	3.06
甘露糖	y=0.0033x-0.0424	1.0000	5.14
果糖	y=0.0018x+0.0567	0.9997	9.82

取 6 种糖的标准工作溶液, 按 2.2.3 色谱条件进行测定, 以峰面积 Y 对质量浓度 X(mg/L) 进行线性回归。方法的检出限通过实际测定系列逐步稀释的低浓度标准溶液来确定。6 种糖的线性方程、相关系数和检出限列于表 2。6 种糖的检出限在 10 µg/L 以下, 检测灵敏度较高。

2.4.2 方法的精密度

按 1.2 样品处理方法对同一样品平行处理 5 份, 并在当日进行测定, 考察方法的日内精密度。对同一样品在 5 日内以大于等于 1 天的间隔进行 4 次平行处理并测定, 考察方法的日间精密度。方法的日内和日间精密度结果以糖含量值的相对标准偏差表示, 分别在 2.46~4.91% 与 2.30~6.82% 之间, 表明本方法重复性良好。

2.4.3 方法的回收率

取已知测定结果的样品, 收集主流烟气后分别添加低、中、高三个浓度水平的混合标准溶液, 按照 1.2 样品处理方法处理后进行回收试验, 结果见表 3。果糖、葡萄糖和蔗糖的回收率在 97.1~102.4% 之间, 结果理想。

性糖进行分析测定, 代表性检测数据列于表 4。在所测试的 34 个样品中, 阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和果糖的总含量范围是 36.17 µg/支~119.5

$\mu\text{g}/\text{支}$ 。在 6 种主要的水溶性糖中,果糖的含量最高,含量范围为 $24.63 \mu\text{g}/\text{支} \sim 74.66 \mu\text{g}/\text{支}$,其次为葡萄糖,含量范围为 $8.09 \mu\text{g}/\text{支} \sim 38.09 \mu\text{g}/\text{支}$,这和烟草中水溶性糖一般也以果糖和葡萄糖含量最高的情况类似,主流烟气总粒相物中果糖和葡萄糖含量占 6 种水溶性糖总量的 90.5~94.7% 之间。

表 4 代表性卷烟样品主流烟气中 6 种水溶性糖测定结果
($\mu\text{g}/\text{cigarette}$)

编号	糖含量						总量
	阿拉伯糖	半乳糖	葡萄糖	木糖	甘露糖	果糖	
#01	1.72	0.46	36.48	0.48	4.44	63.08	106.66
#02	1.33	0.48	34.42	0.62	3.03	56.44	96.32
#03	1.37	0.36	25.99	0.25	3.09	52.37	83.43
#04	1.48	0.34	18.98	0.28	4.03	59.53	84.64
#05	1.51	0.41	28.44	0.32	4.76	68.89	104.33
#06	1.57	0.41	33.21	0.88	2.61	64.06	102.74
#07	1.80	0.47	22.26	0.92	3.12	56.28	84.85
#08	0.77	0.17	8.09	0.41	2.10	24.63	36.17
#09	1.20	0.28	17.79	0.46	2.26	43.32	65.31
#10	1.35	0.39	19.94	0.55	3.54	48.45	74.22
#11	1.03	0.27	13.89	0.29	1.78	35.30	52.56
#12	1.63	0.30	25.83	0.66	2.05	53.99	84.46
#13	1.45	0.27	22.80	0.77	2.22	51.63	79.14
#14	2.47	0.41	30.15	1.01	1.93	57.42	93.39
#15	1.95	0.45	26.98	0.78	4.64	71.99	106.79
#16	2.39	0.41	30.33	1.01	2.08	58.90	95.12

3 结论

本研究建立的离子色谱-脉冲安培法同时测定了多种牌号卷烟主流烟气中的阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和果糖。该方法操作简便,检测准确,灵敏度高,选择性好,能有效的应用于卷烟主流烟气中水溶性糖的测定,并可拓展到其它多种样品(如饮料、水果等)的水溶性糖的分析检测当中。

参考文献

- [1] Katona Z F, Sass P, Molnár-Perl I. Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A.*, 1999, 847(1-2): 91-102
- [2] Zhang W, He H B, Zhang X D. Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldonitrile acetates [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39(10): 2665-2669
- [3] Eyéghé-Bickong H A, Alexandersson E O, Gouws L M, et al. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries [J]. *J. Chromatogr. B*, 2012, 885-886: 43-49
- [4] Chávez-Servín J L, Castellote A I, López-Sabater M C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection [J]. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1043: 211-215
- [5] YC/T 381-2010, 烟草及烟草制品-葡萄糖、果糖、蔗糖的测定-高效液相色谱法[S]
- [6] Sun B G, Miller G, Lee W Y, et al. Analytical method development for directed enzyme evolution research: A high throughput high-performance liquid chromatography method for analysis of ribose and ribitol and a capillary electrophoresis method for the separation of ribose enantiomers [J]. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1271(1): 163-169
- [7] Terol A, Paredes E, Maestre S E, et al. Rapid and sensitive determination of carbohydrates in foods using high temperature liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J. Sep. Sci.*, 2012, 35(8): 929-936
- [8] Fang Y Z, Wang Q J. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs [J]. *J. Chromatogr. B*, 2004, 812: 309-324
- [9] Raessler M. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants [J]. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 2011, 30(11): 1833-1843
- [10] 杨兴斌,赵燕,周四元,等.柱前衍生化高效液相色谱法分析当归多糖的单糖组成[J]. *分析化学*, 2005, 33(9): 1287-1290
Yang X B, Zhao Y, Zhou S Y, et al. Analysis of monosaccharide composition in angelica polysaccharides by precolumn derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Chinese J Anal. Chem.*, 2005, 33(9): 1287-1290
- [11] 侯冰,齐祥明,徐海涛,等.高效液相色谱法测定卷烟主流烟气中甘露糖和葡萄糖含量[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(26): 11179-11180, 11183
Hou B, Xu X M, Xu H T, et al. Determination of mannose and glucose in mainstream cigarette smoke by high performance liquid chromatography [J]. *Anhui Agric. Sci.*, 2008, 36(26): 11179-11180, 11183
- [12] GB/T 16450-2004, 常规分析用吸烟机定义和标准条件[S]
Routine analytical cigarette-smoking machine-Definitions

and standard conditions[S]

[13] 牟世芬,于泓,蔡亚岐.糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析[J].色谱,2009,27(5):667-674

Mou S F, Yu H, Cai Y Q. Analysis of sugars by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Chinese J. Chromatogr., 2009, 27(5): 667-674

