2025 年 11 月 色 谱 Vol.43 No.11
November 2025 Chinese Journal of Chromatography 1252~1261

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.01010

异丙酯化衍生-气相色谱-质谱法测定烟草中 29 种有机酸

于 洁, 高 扬, 吴 达, 曹宇奇, 戚大伟*

(上海烟草集团有限责任公司技术中心, 上海 201315)

摘要:烟草中有机酸的组成与含量测定对烟草的品质评价具有重要意义,为实现烟草中挥发性、半挥发性和非挥发性有机酸的同时、准确、快速测定,本研究开发了一种异丙酯化衍生-气相色谱-质谱法同时测定烟草中 29 种有机酸的方法。研究系统优化了酯化衍生反应条件及实验参数,最终确定以 10% 硫酸异丙醇溶液(含 0.1 g/mL 对甲苯磺酸)为异丙酯化衍生试剂,衍生反应温度为 70 ℃,反应时间为 3 h,反应结束静置至室温后,加入 10 mL 去离子水,2 mL 正己烷作为萃取溶剂,选用 DB-FASTFAME 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)进行程序升温分离,气相色谱-质谱法定量检测。在既定仪器参数及衍生化条件下进行方法验证,结果表明:29 种有机酸在检测范围内线性良好,相关系数(r^2)均大于 0.99,不同加标水平下的回收率为 81.8%~118.7%,日内重复性为 0.5%~8.1%,日间重复性为 0.9%~8.2%,检出限(S/N=3)为 0.01~49.02 μg/g,定量限(S/N=10)为 0.03~163.41 μg/g。针对烟草中半挥发性及非挥发性有机酸,本方法与经典的甲酯化衍生法测定结果一致。将新开发的方法应用于烤烟、雪茄烟、白肋烟 3 种类型烟草样品的测定,均成功检出 29 种有机酸。该方法操作简便,检测通量高,实现了烟草中挥发性、半挥发性及非挥发性 29 种有机酸的同时、准确、快速测定,满足大规模检测的需求,为烟草有机酸研究与烟叶品质评价提供了新的方法支撑。

关键词:异丙酯化衍生;气相色谱-质谱法;烟草;有机酸

中图分类号:O658 **文献标识码**:A

Determination of 29 organic acids in tobacco based on isopropyl esterification derivatization by gas chromatography-mass spectrometry

YU Jie, GAO Yang, WU Da, CAO Yuqi, QI Dawei*

(*Technical Center, Shanghai Tobacco Group CO., LTD., Shanghai 201315, China*)

Abstract: Organic acids are important components of dry tobacco and significantly affect its sensory properties. Therefore, determining the organic-acid composition and content in tobacco is greatly significant for evaluating its quality. Organic acids in tobacco are classified according to volatility as either volatile, semi-volatile, or non-volatile, with semi-volatile and non-volatile organic acids typically methylated for identification purposes. However, volatile acids cannot be determined in this manner owing to their low molecular weights. Therefore, a comprehensive, efficient, and accurate method for rapidly and simultaneously determining volatile, semi-volatile, and non-volatile organic acids in tobacco needs to be established. Herein, an innovative gas-chromatography–mass-spectrometry-based (GC-MS-based) isopropyl-esterification method was developed for simultaneously determining 29 volatile, semi-volatile, and non-volatile organic acids in tobacco. The developed method provides esterified small-molecule acids of lower volatility than those obtained using classical methylation and avoids interference from byproducts obtained via the esterification reaction.

收稿日期:2025-01-16

* **通讯联系人**.Tel:(021)61661237,E-mail:qidw@sh.tobacco.com.cn.

基金项目:中国烟草总公司重大科技项目(110202201033〔XJ-04〕).

Foundation item: Major Science and Technology Project of China National Tobacco Corporation (No. 110202201033〔XJ-04〕).

Experimental conditions and GC parameters were optimized, which ultimately led to 10% sulfuric acid in isopropanol (containing 0.1 g/mL *p*-toluenesulfonic acid) as the esterification reagent, with the reaction performed for 3 h at 70 °C and 500 r/min. The mixture was then cooled to room temperature, 10 mL of deionized water and 2 mL of *n*-hexane were added, and the mixture was vortexed for 30 s (4×), after which the supernatant was collected for analysis. The DB-FASTFAME (30 m×0.25 mm×0.25 μm) and DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) chromatographic columns were compared, with the former finally selected for GC-MS separation and quantitative detection. All method-validation experiments were subsequently performed under the established instrumental and derivatization conditions. The 29 organic acids exhibited good linearities within the detection range, with all correlation coefficients (r^2) exceeding 0.99. All recoveries at three spiked levels ranged from 81.8% to 118.7%. The intra-day repeatabilities (RSD, n=6) ranged from 0.5% to 8.1%, and the inter-day repeatabilities (RSD, n=6) ranged from 0.9% to 8.2%. The limits of detection (*S/N*=3) were 0.01-49.02 μg/g, and the limits of quantification (*S/N*=10) were 0.03–163.41 μg/g, respectively. Comparative experimental results revealed that the developed method is highly consistent with the classical methylation-based derivatization method for the detection of semi- and non-volatile organic acids in tobacco. Furthermore, the new method is able to simultaneously determine volatile organic acids that cannot be analyzed using the classical methylation method. Therefore, the developed method is more widely applicable for determining acids in tobacco. The newly developed method was used to determine three types of tobacco sample: flue-cured tobacco, cigar tobacco, and burley tobacco, with all 29 organic acids successfully detected. Cigar tobacco leaves were found to contain significantly more volatile organic acids than flue-cured tobacco, especially 3-methylvaleric acid; they also contain less semi-volatile organic acids and more non-volatile organic acids than flue-cured tobacco. The developed method is simple, accurate, and suitable for the large-scale simultaneous determination of volatile, semi-volatile, and non-volatile organic acids in tobacco; it also provides additional technical support for the study of organic acids in tobacco and evaluating tobacco quality.

Key words: isopropyl esterification; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); tobacco; organic acids

烟草中的有机酸一般指烟草中除氨基酸外的多元酸、脂肪酸、芳香酸等[1]。按照挥发性，烟草中的有机酸又划分为以 C10 以下、低级脂肪酸为主的挥发性小分子有机酸，如 2-甲基丁酸、异戊酸、3-甲基戊酸等[2,3]，以及以多元酸和脂肪酸为主的非挥发性、半挥发性有机酸，如草酸、苹果酸、柠檬酸，以及棕榈酸、硬脂酸和油酸等[4,5]。有机酸具有独特的香味和酸性，挥发性的小分子有机酸可以直接转移至烟气中，对烟草香气有直接贡献[6]；半挥发性和非挥发性有机酸可以与烟草中的碱性物质结合，起到调节烟气酸碱平衡的作用[7]，对卷烟感官品质具有重要影响[8]。因此，准确、快速测定烟草中的多种有机酸，对烟草品质评价具有重要意义。

目前已报道多种有机酸测定的分析技术。如，相分离萃取后进行离子色谱-串联质谱法分析[9-12]、涡旋提取后进行超高效液相色谱-串联质谱法分析[4,13,14]，这类方法无需进行衍生化处理，多用于测定样品中的半挥发性和非挥发性有机酸。气相色谱-质谱联用法(GC-MS)，因其灵敏度高、分离效果好、快速方便，是最常用的有机酸分析技术[15]，但一般需衍生化前处理以降低有机酸的沸点，改善其色谱分离性能。常用的有机酸衍生化方式主要包括

引用本文：于洁，高扬，吴达，曹宇奇，戚大伟. 异丙酯化衍生-气相色谱-质谱法测定烟草中29种有机酸. 色谱，2025，43(11)：1252-1261.
YU Jie, GAO Yang, WU Da, CAO Yuqi, QI Dawei. Determination of 29 organic acids in tobacco based on isopropyl esterification derivatization by gas chromatography-mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(11): 1252-1261.

硅烷化[16,17]与甲酯化[5,8]，硅烷化衍生多涉及溶剂浓缩、皂化等步骤[7,18]，前处理过程较为繁琐，不适于大批量样品的检测。相比之下，甲酯化衍生因其试剂易得、操作简单、结果准确等特点，已成为测定有机酸的传统经典方法，被广泛应用于烟草[19,20]、食品[21,22]等不同行业，并已作为国家和行业标准方法进行推广应用[23-25]。但由于挥发性有机酸甲酯的沸点低，易与溶剂共流出而无法实现分离测定，因此甲酯化衍生的前处理方式并不适于挥发性有机酸的测定，仅能测定半挥发性、非挥发性有机酸[7]。而在目前的有机酸酯化衍生体系研究中，除甲酯化衍生外，其他更长碳链的酯化衍生方式鲜有报道。因此，亟需开发一种操作简便、结果准确、检测通量高的酯化衍生方法，实现烟草中挥发性、半挥发性及非挥发性有机酸的同时、准确、快速测定。

基于上述问题，本研究基于硫酸异丙醇衍生体系，通过优化衍生反应中的关键参数，包括对甲苯磺酸添加量、衍生温度、时间、萃取溶剂等，建立了一种可以同时测定烟草中 29 种挥发性、半挥发性及非挥发性有机酸的异丙酯化衍生-气相色谱-质谱分析方法。并将该方法成功应用于不同类型烟草样品的分析，为烟草中有机酸类的测定提供了准确、快速的方法支撑。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

气相色谱-质谱联用仪（7890B-5977A，Agilent），具有选择离子监测（SIM）功能；毛细管柱（DB-FASTFAME，Agilent），规格为（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；Agitator 振荡孵育器（G7379A，Agilent）；分析天平（XP603S，Mettler Toledo）；涡旋振荡仪（Vortex-Genie 2，Scientific Industries）。

29 种有机酸标准品（纯度均≥98%，百灵威科技有限公司）；反式-3-己烯酸、己二酸标准品（纯度≥98%，上海安谱实验科技股份有限公司）；正己烷、异丙醇（色谱纯，Sigma-Aldrich 公司）；浓硫酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；去离子水（Millipore 纯水机制备）。

1.2 标准工作曲线配制

内标溶液：准确称取 50.0 mg 反式-3-己烯酸和 1.0 g 己二酸（精确至 0.1 mg），用异丙醇定容至 100 mL。

混合标准储备液：准确称取适量各有机酸标准物质，用异丙醇定容至刻度线，混匀，得到 0.8 μg/mL~50.0 mg/mL 的有机酸混合标准储备液。

标准工作溶液：分别移取 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 mL 混合标准储备液置于 10 mL 容量瓶中，用异丙醇定容至刻度线，混匀。分别移取 1.0 mL 上述溶液，置于 20 mL 顶空瓶中，依次加入 100 μL 内标溶液，2 mL 10% 硫酸异丙醇溶液（含 0.1 g/mL 对甲苯磺酸），涡旋 2 min，在 70 ℃条件下振荡加热 3 h，转速 500 r/min。静置至室温后，加入 10 mL 去离子水、2 mL 正己烷，涡旋振荡 4 次、每次 30 s，静置分层，取上层清液加入 2 mL 色谱瓶中，得到标准工作溶液。

1.3 样品前处理

烟草样品在 40 ℃下烘干 10 h，磨粉后过孔径 0.178 mm 的筛网。准确称取 0.1 g（精确至 0.1 mg）样品粉末于 20 mL 具盖顶空玻璃瓶中，加入 100 μL 内标溶液，2 mL 10% 硫酸异丙醇溶液（含 0.1 g/mL 对甲苯磺酸），涡旋 2 min，在 70 ℃条件下中振荡加热 3 h，转速 500 r/min。静置至室温后，加入 10 mL 去离子水、2 mL 正己烷，涡旋振荡 4 次、每次 30 s，静置分层，取上层清液加入 2 mL 色谱瓶中，进行 GC-MS 上机分析。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

DB-FASTFAME 色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），进样口温度 280 ℃；采用分流进样模式，分流比 5∶1，进样量 1 μL；载气为氦气（He，纯度>99.9%），采用恒流模式，流量为 1.2 mL/min；程序升温条件设置如下：初始温度 40 ℃，保持 2 min，以 5 ℃/min 的速率升温至 240 ℃，保持 15 min。

1.4.2 质谱条件

传输线温度 280 ℃；电离方式为电子轰击源（EI），电离能量 70 eV；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；扫描模式为选择离子监测与全扫描，全扫描范围为 *m/z* 33~550；溶剂延迟设置为 2.7 min。29 种有机酸异丙酯保留时间及离子信息见表 1。

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 酯化试剂的选择

有机酸酯化衍生是在强酸环境下，有机酸与醇类试剂反应生成相应的有机酸酯，可降低待测物沸点、改善目标化合物色谱分离性能，满足有机酸的

表 1　29种有机酸异丙酯的保留时间、定量及定性离子

Table 1　Retention times, quantitative and qualitative ions of isopropyl esters of the 29 organic acid isopropyl esters

No.	Compound	Retention time/min	Quantitative ion (*m/z*)	Qualitative ion (*m/z*)	IS
1	formic acid isopropyl ester	3.03	73.0	45.0	IS1
2	acetic acid isopropyl ester	3.60	87.0	61.0	IS1
3	propanoic acid isopropyl ester	4.73	75.0	57.0	IS1
4	isobutyric acid isopropyl ester	5.00	89.0	71.0	IS1
5	butyric acid isopropyl ester	6.32	89.0	71.0	IS1
6	2-methylbutyric acid isopropyl ester	6.81	85.0	57.0	IS1
7	isovaleric acid isopropyl ester	7.22	103.0	85.0	IS1
8	valeric acid isopropyl ester	8.59	103.0	85.0	IS1
9	3-methylvaleric acid isopropyl ester	9.78	117.0	99.0	IS1
10	4-methylvaleric acid isopropyl ester	10.01	117.0	99.0	IS1
11	hexanoic acid isopropyl ester	10.97	117.0	99.0	IS1
12	heptanoic acid isopropyl ester	13.36	131.0	113.0	IS1
13	octanoic acid isopropyl ester	15.68	145.0	127.0	IS1
14	oxalic acid isopropyl ester	16.66	59.0	43.0	IS2
15	nonanoic acid isopropyl ester	17.89	159.0	141.0	IS1
16	propandioic acid isopropyl ester	18.33	105.0	129.0	IS2
17	benzoic acid isopropyl ester	19.67	123.0	105.0	IS1
18	decanoic acid isopropyl ester	19.99	173.0	155.0	IS1
19	phenylacetic acid isopropyl ester	21.99	178.0	91.0	IS1
20	dodecanoic acid isopropyl ester	23.87	183.0	200.0	IS2
21	malic acid isopropyl ester	26.14	131.0	89.0	IS2
22	myristic acid isopropyl ester	27.35	211.1	228.0	IS2
23	palmitic acid isopropyl ester	30.52	239.0	256.0	IS2
24	stearic acid isopropyl ester	33.43	267.0	284.0	IS2
25	oleic acid isopropyl ester	33.68	265.0	324.0	IS2
26	citric acid isopropyl ester	33.77	171.0	189.0	IS2
27	linoleic acid isopropyl ester	34.45	279.0	263.0	IS2
28	α-linolenic acid isopropyl ester	34.80	175.0	277.2	IS2
29	γ-linolenic acid isopropyl ester	35.29	261.0	277.0	IS2
30	*trans*-3-hexenoic acid isopropyl ester (IS1)	11.82	114.0	69.0	
31	adipic acid isopropyl ester (IS2)	24.99	129.0	171.0	

检测需求。酯化反应的碳原子数越多,其生成的酯化产物沸点越高,越有利于小分子有机酸的检测[26]。实验发现甲醇、乙醇、丙醇等醇类试剂在强酸催化下,会产生甲酸甲酯、乙酸乙酯、丙酸正丙酯等副产物,干扰小分子挥发性有机酸的检测。本研究发现,异丙醇也可用作酯化反应的醇类试剂,反应生成有机酸异丙酯,且其在强酸催化下的副产物是异丙醚,不干扰丙酸的测定,因此本方法最终采用异丙醇的强酸溶液作为酯化试剂进行研究。

2.1.2　色谱柱的优化

目前在有机酸甲酯化衍生的应用中,研究者多用 DB-5MS 或类似填料色谱柱[5,7,30]。本研究优先考察了 DB-5 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)对有机酸异丙酯类的分离效果,发现甲酸异丙酯在 DB-5 色谱柱中与异丙醇共流出,且无法通过选择离子监测的方式对其进行有效分离、定量。DB-FASTFAME (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 及 DB-FATWAX(30 m×0.25 mm×0.25 μm)色谱柱均是为快速分离脂肪酸甲酯而设计的专用色谱柱,实验考察了两种色谱柱对 29 种有机酸异丙酯的分离效果。对两种色谱柱的升温程序分别进行优化后,结果发现 DB-FASTFAME 和 DB-FATWAX 色谱柱均

能较好分离各有机酸异丙酯，而 DB-FASTFAME 色谱柱峰形略好，且异丙醇与前后目标化合物的分离效果也略好，因此选用 DB-FASTFAME 色谱柱用于后续研究。DB-FASTFAME 柱对 29 种有机酸异丙酯的分离色谱图如图 1 所示。总离子流图中 29 种有机酸异丙酯均可在 DB-FASTFAME 色谱柱上实现良好分离。

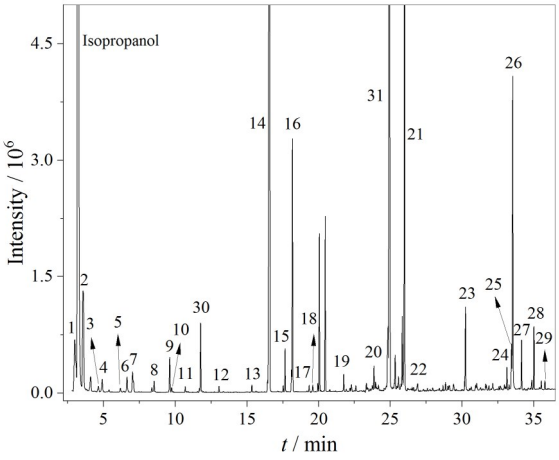


图 1 DB-FSATFAME 色谱柱分离 29 种有机酸异丙酯的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the 29 organic acid isopropyl esters separated by DB-FSATFAME column

For peak Nos. 1–31, see Table 1.

2.1.3 酯化衍生条件的优化

对甲苯磺酸是常见的有机强酸，文献报道适量添加对甲苯磺酸有助于提高酯化反应效率，缩短反应时间[27]。文章以 10% 硫酸异丙醇溶液的酯化体系为基础，考察了不同对甲苯磺酸添加量对酯化衍生的影响。对甲苯磺酸添加量分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 g/mL，反应时间均为 3 h，反应温度均为 70 ℃。将不同对甲苯磺酸添加量时各物质响应值除以对甲苯磺酸含量为 0 时各物质响应值，对数据进行归一化处理，实验结果如图 2a 所示。大多数挥发性、半挥发性和非挥发性有机酸异丙酯的响应随着对甲苯磺酸的加入而升高，且当含量为 0.1 g/mL 时响应最高，再增加对甲苯磺酸，挥发性有机酸异丙酯的响应无明显变化。而苹果酸、棕榈酸和硬脂酸等半挥发性及非挥发性有机酸异丙酯，当对甲苯磺酸含量升至 0.2 g/mL 或以上时，其响应明显逐步下降，表明更高的酸性会导致其有机酸异丙酯的分解。因此，最终采用含 0.1 g/mL 对甲苯磺酸的 10% 硫酸异丙醇作为酯化试剂。

考察了反应温度对酯化衍生的影响，衍生反应温度分别为 50、60、70、80 ℃，时间均为 3 h。将不同反应温度时各物质响应值除以 50 ℃各物质响应值，对数据进行归一化处理，实验结果如图 2b 所示。结果表明，各有机酸异丙酯响应随着反应温度升高而逐步升高，绝大部分有机酸异丙酯在 70 ℃时响应达到最高，且进一步升高温度各化合物响应提升并不明显，因此最终的酯化反应温度确定为 70 ℃。

考察了反应时间对酯化衍生的影响，衍生反应时间分别为 1、2、3、4、5 h，温度均为 70 ℃。将不同反应时间时各物质响应值除以加热时间为 1 h 时各物质响应值，对数据进行归一化处理，实验结果如图 2c 所示。结果表明，对挥发性有机酸异丙酯来说，延长反应时间可提高其响应，而当反应时间长至 3 h 或更长，部分半挥发性、非挥发性有机酸异丙酯的响应出现下降，因此最终的酯化反应时间确定为 3 h。

2.1.4 萃取条件的优化

正己烷[23,24]、二氯甲烷[25]是有机酸酯化后的常用萃取溶剂，因此，文章考察了正己烷、二氯甲烷对有机酸异丙酯的萃取效果。实验固定加入 2 mL 萃取溶剂与 10 mL 去离子水，结果表明，在二氯甲烷萃取体系中，甲酸异丙酯无法在初始阶段与溶剂实现分离，且在后续有机溶剂与水层的液液萃取中，正己烷处于液面上层，更便于实验操作，因此本方法选用正己烷作为萃取溶剂。

在本衍生体系中，异丙醇的出峰位置在甲酸异丙酯和乙酸异丙酯中间，如萃取液含有较多异丙醇，会对目标物的色谱分离产生较大影响。因此在酯化反应完成后加入适量去离子水，一是快速终止酯化反应，二是降低萃取溶剂对异丙醇的萃取效率。研究分别考察了添加 2、5、10 mL 去离子水对检测结果的影响，萃取溶剂均为 2 mL 正己烷，结果如图 3 所示。随着去离子水体积的增加，异丙醇响应明显降低，且异丙醇与相邻的甲酸异丙酯、乙酸异丙酯的分离度明显改善，当去离子水添加量升至 10 mL 时，异丙醇与其前后的甲酸异丙酯、乙酸异丙酯实现完全基线分离，具备良好的分离效果，因此最终确定的去离子水添加量为 10 mL。

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线、检出限及定量限

在优化条件下，对 1.4 节中的 29 种有机酸混合标准工作溶液进行测定，以不同有机酸衍生产物与内标物峰面积的比值（y）为纵坐标，其对应的有机

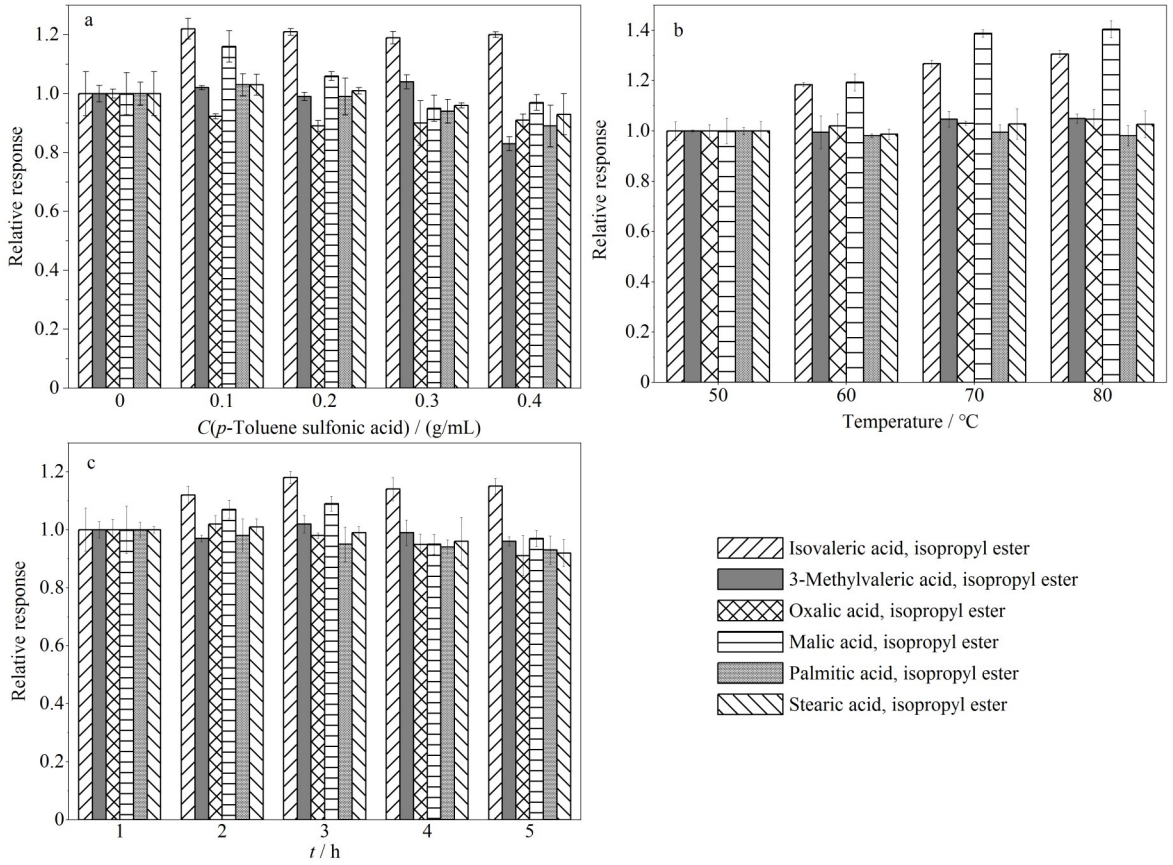


图 2　不同酯化衍生化条件对响应强度的影响(*n*=3)

Fig. 2　Effects of different derivatization conditions on the intensity responses (*n*=3)

a. mass concentration of *p*-toluene sulfonic acid; b. derivatization temperature; c. derivatization time.

酸含量(x, μg/g)为横坐标,绘制标准工作曲线。结果表明,29 种有机酸在表 2 所示的各自含量范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均大于 0.99。分别以色谱峰 *S/N*=3 和 *S/N*=10 对应的目标物含量确定方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),分别为 0.01~49.02 μg/g 和 0.03~163.41 μg/g,结果如表 2 所示。

表 2　29种有机酸的线性方程、相关系数、线性范围、检出限及定量限

Table 2　Linear equations, correlation coefficients (r^2), linear ranges, LODs and LOQs of the 29 organic acids

Compound	Linear equation	r^2	Linear range/(μg/g)	LOD/(μg/g)	LOQ/(μg/g)
Formic acid	y=0.0015x+0.07863	0.9992	80–20000	13.81	46.03
Acetic acid	y=0.0034x+0.24825	0.9988	80–20000	13.22	44.06
Propanoic acid	y=0.0239x+0.02091	0.9962	0.48–12	0.14	0.45
Isobutyric acid	y=0.0104x+0.00574	0.9981	0.8–40	0.27	0.80
Butyric acid	y=0.0503x+0.00363	0.9954	0.16–8	0.05	0.15
2-Methylbutyric acid	y=0.0051x+0.00589	0.9974	8–200	1.37	4.57
Isovaleric acid	y=0.0044x+0.00415	0.9977	4–200	1.04	3.45
Valeric acid	y=0.0013x+0.27194	0.9975	0.4–20	0.08	0.25
3-Methylvaleric acid	y=0.0096x+0.00013	0.9985	0.8–400	0.22	0.77
4-Methylvaleric acid	y=0.0087x−0.00017	0.9973	0.04–4	0.01	0.03
Hexanoic acid	y=0.5057x+0.03611	0.9965	0.08–40	0.01	0.04
Heptanoic acid	y=0.0923x+0.00443	0.9982	0.32–8	0.08	0.26
Octanoic acid	y=0.1172x+0.01051	0.9998	0.32–8	0.08	0.26
Oxalic acid	y=0.1179x+0.23751	0.9987	300–150000	19.02	63.40

表 2 （续）
Table 2 （Continued）

Compound	Linear equation	r^2	Linear range/(μg/g)	LOD/(μg/g)	LOQ/(μg/g)
Nonanoic acid	y=0.0448x+0.00189	0.9978	0.48–12	0.12	0.40
Propandioic acid	y=0.2615x+0.23752	0.9986	40–10000	6.53	21.77
Benzoic acid	y=0.0171x+0.00961	0.9997	0.8–200	0.19	0.63
Decanoic acid	y=0.0413x+0.00175	0.9990	0.08–8	0.03	0.08
Phenylacetic acid	y=0.0013x+0.00004	0.9990	0.8–400	0.20	0.66
Dodecanoic acid	y=0.2738x–0.00623	0.9984	40–2000	9.24	30.80
Malic acid	y=0.1217x+0.15064	0.9992	500–250000	37.27	124.23
Myristic acid	y=0.3433x–0.01063	0.9983	20–2000	3.62	12.07
Palmitic acid	y=0.3657x–0.04351	0.9990	100–10000	28.30	94.33
Stearic acid	y=0.4339x–0.00549	0.9994	100–5000	16.38	54.69
Oleic acid	y=0.1065x–0.00134	0.9993	50–5000	8.78	29.27
Citric acid	y=0.3215x+0.00475	0.9972	200–100000	49.02	163.41
Linoleic acid	y=0.0853x–0.00733	0.9992	100–10000	15.42	51.41
α-Linolenic acid	y=0.1004x–0.00153	0.9994	40–10000	9.68	32.27
γ-Linolenic acid	y=0.0904x–0.00201	0.9991	40–1000	11.23	37.43

y: peak area ratio of analyte to internal standard; x: content, μg/g.

2.2.2 重复性和回收率

以烤烟、雪茄烟和白肋烟质量比 1∶1∶1 混合作为研究基质，按照 1.3 节所述处理样品，每 2 h 进样一次，连续进样 6 次，考察方法的日内重复性；同时，每隔 24 h 进样一次，连续进样 6 次，考察方法的日间重复性。根据研究基质中各有机酸实际浓度，添加低、中、高 3 个加标水平的有机酸混合标准溶液进行加标回收率考察。结果表明，29 种有机酸的加标回收率均介于 80%~120%，满足定量检测要求（见表 3）。29 种有机酸检测结果的日内、日间重复性均在 10% 以内，且大多在 5% 以内，满足方法学考察的要求，适用于烟草中有机酸的含量测定。

2.2.3 与甲酯化衍生法的比对

甲酯化衍生-气相色谱法作为测定半挥发性及非挥发性有机酸的经典方法[28]，在烟草行业具有广泛的应用，也是研究烟草中半挥发性及非挥发性有机酸含量特性的首选检测方法[29]。采用甲酯化衍生法[25]与本文所建立异丙酯衍生化方法对烟草样品中的半挥发性及非挥发性有机酸进行定量检测，甲酯化衍生-气相色谱法未检测到含量较低的肉豆蔻酸、月桂酸和 γ-亚麻酸，其余有机酸检测结果见图 4。由图 4 可知，在测定半挥发性及非挥发性有机酸方面，本方法与经典的甲酯化衍生法的测定结果具有高度一致性。除此之外，对于甲酯化衍生法无法检测的挥发性有机酸，本方法可以实现其与半挥发性及非挥发性有机酸的同时定量检测，比甲酯化衍生法具备更广泛的检测范围，可以同时测定更多种类的有机酸。

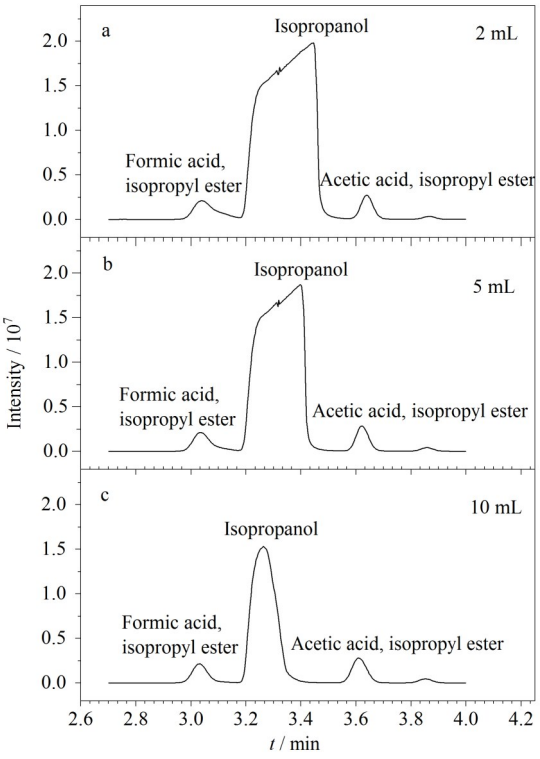


图 3 加水量对响应强度的影响
Fig. 3 Effects of the amount of added water on the intensity responses

表 3　29种有机酸的加标回收率与日内、日间重复性 (n=6)

Table 3　Recoveries, intra-day RSDs and inter-day RSDs of the 29 organic acids (n=6)

Compound	Low		Medium		High		RSDs/%	
	Added/(μg/g)	Recovery/%	Added/(μg/g)	Recovery/%	Added/(μg/g)	Recovery/%	Intra-day	Inter-day
Formic acid	1000.0	91.4	2000.0	111.3	6000.0	88.2	1.7	2.1
Acetic acid	1000.0	117.4	2000.0	108.2	6000.0	92.7	2.4	2.4
Propanoic acid	1.2	95.5	2.4	83.5	7.2	107.1	4.0	3.5
Isobutyric acid	4.0	89.7	8.0	108.3	24.0	93.5	8.1	7.9
Butyric acid	0.4	99.5	0.8	112.6	2.4	94.7	7.8	8.2
2-Methylbutyric acid	20.0	98.0	40.0	118.7	120.0	100.2	3.9	3.6
Isovaleric acid	10.0	96.9	20.0	107.6	60.0	83.7	2.9	3.0
Valeric acid	1.0	89.1	2.0	84.5	6.0	84.9	5.4	5.6
3-Methylvaleric acid	40.0	100.1	80.0	114.3	160.0	95.6	5.9	4.9
4-Methylvaleric acid	0.2	90.7	0.4	102.5	1.2	113.2	3.1	4.3
Hexanoic acid	2.0	102.8	4.0	88.4	12.0	92.4	7.1	8.1
Heptanoic acid	0.4	90.5	0.8	89.2	2.4	90.1	4.9	5.3
Octanoic acid	0.4	81.8	0.8	100.0	2.4	93.4	2.4	3.6
Oxalic acid	7500.0	97.9	15000.0	111.3	45000.0	115.1	0.5	1.1
Nonanoic acid	1.2	100.2	2.4	104.2	7.2	101.7	7.2	7.1
Propandioic acid	500.0	89.0	1000.0	93.2	3000.0	98.7	0.6	1.0
Benzoic acid	10.0	86.0	20.0	98.4	60.0	112.7	4.0	3.7
Decanoic acid	0.8	98.6	1.6	94.2	4.8	97.3	3.8	6.1
Phenylacetic acid	20.0	97.4	40.0	96.3	120.0	82.6	3.0	2.1
Dodecanoic acid	100.0	96.3	200.0	98.8	600.0	106.7	8.1	7.6
Malic acid	12500.0	110.5	25000.0	103.1	75000.0	96.2	0.9	0.8
Myristic acid	100.0	112.1	200.0	107.9	600.0	103.2	4.2	5.8
Palmitic acid	500.0	83.9	1000.0	110.2	3000.0	108.7	0.8	1.0
Stearic acid	250.0	93.2	500.0	99.7	1500.0	116.4	1.8	3.2
Oleic acid	250.0	99.5	500.0	101.5	1500.0	104.8	4.2	6.2
Citric acid	5000.0	103.0	10000.0	109.2	30000.0	115.6	0.8	1.0
Linoleic acid	500.0	88.1	1000.0	104.7	3000.0	116.3	1.7	2.1
α-Linolenic acid	500.0	110.2	1000.0	85.8	3000.0	116.7	2.6	1.9
γ-Linolenic acid	50.0	103.9	100.0	109.2	300.0	96.1	1.9	2.1

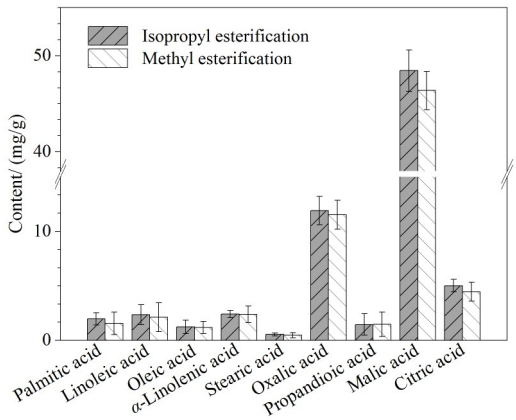


图 4　异丙酯化与甲酯化检测结果的比较(n=3)

Fig. 4　Comparison of results detected by isopropyl and methyl esterification (n=3)

2.3　实际样品的检测结果

采用新方法对烤烟、雪茄烟、白肋烟 3 种不同类型烟叶样品中的有机酸进行了检测,其具体检测结果如表 4 所示。由表中数据可以看出,烤烟中甲酸、乙酸、2-甲基丁酸等的含量高于雪茄烟和白肋烟,雪茄烟中 3-甲基戊酸、苯乙酸的含量显著高于白肋烟和烤烟;雪茄烟、白肋烟中草酸、月桂酸、肉豆蔻酸、柠檬酸等有机酸含量大多显著高于烤烟,而棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、α-亚麻酸等的含量显著低于烤烟,这与朱玲等[30]采用甲酯化衍生法对雪茄烟与烤烟中半挥发性及非挥发性有机酸含量的检测结果基本一致。

表 4 不同类型烟叶样品中29种有机酸的检测结果

Table 4 Determination results of the 29 organic acids in different types of tobacco samples

Compound	Contents/(μg/g)		
	Flue-cured tobacco	Cigar tobacco	Burley tobacco
Formic acid	4040.12	915.35	833.92
Acetic acid	2990.62	2840.36	1842.75
Propanoic acid	1.79	2.17	4.51
Isobutyric acid	4.06	10.89	15.34
Butyric acid	1.27	0.55	0.66
2-Methylbutyric acid	77.21	29.82	46.82
Isovaleric acid	39.82	15.73	45.12
Valeric acid	1.13	3.44	3.56
3-Methylvaleric acid	1.65	332.62	2.43
4-Methylvaleric acid	0.21	0.34	0.19
Hexanoic acid	2.25	5.29	2.61
Heptanoic acid	1.05	0.72	1.08
Octanoic acid	1.95	1.42	0.78
Oxalic acid	11912.24	43740.71	27642.30
Nonanoic acid	2.28	3.96	2.19
Propandioic acid	1455.76	3207.07	1095.43
Benzoic acid	21.40	21.55	13.73
Decanoic acid	0.87	0.56	1.83
Phenylacetic acid	13.31	111.97	52.60
Dodecanoic acid	230.27	542.73	373.21
Malic acid	48292.83	33982.35	79813.62
Myristic acid	122.22	279.94	314.14
Palmitic acid	1971.21	1046.90	895.36
Stearic acid	452.12	298.69	282.36
Oleic acid	822.23	422.12	70.78
Citric acid	5026.46	38582.12	46874.52
Linoleic acid	2354.47	838.69	1682.12
α-Linolenic acid	2422.73	330.71	720.71
γ-Linolenic acid	134.91	133.74	124.55

3 结论

本研究开发了一种异丙酯化衍生-气相色谱-质谱法同时测定烟草中 29 种有机酸的高通量方法。该方法基于 10% 硫酸异丙醇溶液(含 0.1 g/mL 对甲苯磺酸)的异丙酯化衍生体系,具有良好的反应效率和分离效果,操作简单,灵敏度高,稳定性强,适用于不同类型烟草样品中挥发性、半挥发性及非挥发性有机酸的同时快速定量检测,为烟草中有机酸的研究提供了全新的方法手段,为烟草的品质评价提供了新的技术支撑。

参考文献:

[1] Liu X Y, Liu Y, Zu Q X, et al. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(3): 46
刘晓云, 刘燕, 祖庆学, 等. 中国农业科技导报, 2020, 22(3): 46

[2] Peng Y, Zhou J H, Yin G T, et al. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(34): 212
彭艳, 周冀衡, 尹光庭, 等. 中国农学通报, 2013, 29(34): 212

[3] Chen S A, Zhang H W, Chen B, et al. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(2): 54
陈思昂, 张环纬, 陈彪, 等. 河南农业科学, 2019, 48(2): 54

[4] Li Y X, Liu F F, Liu H, et al. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2023, 59(6): 626
李颖雪, 刘峰峰, 刘辉, 等. 理化检验-化学分册, 2023, 59(6): 626

[5] Wang B, Yu J J, Cai J L, et al. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(11): 49
王冰, 余晶晶, 蔡君兰, 等. 烟草科技, 2020, 53(11): 49

[6] Yu T M, Jiang X T, Li J Z, et al. Guangxi Journal of Light Industry, 2014, 30(1): 115
于铁妹, 姜兴涛, 李剑政, 等. 轻工科技, 2014, 30(1): 115

[7] Yu J J, Wang B, Cai J L, et al. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(6): 7
余晶晶, 王冰, 蔡君兰, 等. 中国烟草学报, 2019, 25(6): 7

[8] Fu Q J, Hao X W, Du Y M, et al. Tobacco Science &Technology, 2024, 57(9): 24
付秋娟, 郝贤伟, 杜咏梅, 等. 烟草科技, 2024, 57(9): 24

[9] Li M L, Xi H, Fu Y J, et al. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(6): 42
李明雷, 席辉, 付英杰, 等. 烟草科技, 2022, 55(6): 42

[10] Xu G Y, He X Y, Zhang L N, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(8): 805
许高燕, 何歆滢, 张丽娜, 等. 色谱, 2024, 42(8): 805

[11] Li H Y, Li X Y, Liu N, et al. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(10): 44
李华雨, 李晓瑜, 刘宁, 等. 烟草科技, 2022, 55(10): 44

[12] Mu Y Q, Wu Y X, Wang X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(12): 1128
穆瑛琦, 吴奕萱, 王逍, 等. 色谱, 2022, 40(12): 1128

[13] Xiang G, Yang L, Zhang X, et al. Chromatographia, 2009, 70(5/6): 1007

[14] Moldoveanu S C, Poole T, Scott W A. Beiträge Zur Tabakforschung Int Contrib to Tob Res, 2018, 28(1): 30

[15] Fu H Y, Li H D, Wang B, et al. Anal Methods, 2016, 8(4): 747

[16] Huang W N, Lin Z A. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(1): 1
黄维妮, 林子俺. 色谱, 2021, 39(1): 1

[17] Li W X, Gu L L, Yang F R, et al. Tobacco Science & Technology, 2024, 57(1): 13
李伟雪, 顾丽莉, 杨发容, 等. 烟草科技, 2024, 57(1): 13

[18] Wang Z Y, Shi H W, Ma C Y, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(6): 581
王紫颖, 施海蔚, 马聪玉, 等. 色谱, 2024, 42(6): 581

[19] Shen Y F, Zhao C S, Zhao L H, et al. Chemical Reagents,

2018, 40(3): 244
沈艳飞, 赵常山, 赵立恒, 等. 化学试剂, 2018, 40(3): 244
[20] Li D K, Tian N, Wu R X, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2021, 40(4):454
李登科, 田楠, 吴若昕, 等. 分析试验室, 2021, 40(4): 454
[21] Wang X Y, Ming M, Lian L L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(2):250
王希越, 明明, 连丽丽, 等. 色谱, 2020, 38(2): 250
[22] Shen Z D, Huang D M, Fang C L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(12): 1340
申兆栋, 黄冬梅, 方长玲, 等. 色谱, 2021, 39(12): 1340
[23] GB 5009.257-2016
[24] NY/T 3566-2020
[25] YC/T 288-2009
[26] Schmeltz I, Miller R L, Stedman R L. J Chromatogr Sci, 1963, 1: 27
[27] Zhang P Q, Xu G Z, Du X M, et al. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2017, 23(1): 96
章平泉, 徐光忠, 杜秀敏, 等. 安徽农学通报, 2017, 23(1): 96
[28] Wu J Z, Yang W W, Zheng W, et al. Shandong Chemical Industry, 2023, 52(15): 110
吴进芝, 杨文武, 郑伟, 等. 山东化工, 2023, 52(15): 110
[29] Liu R H, Pan L N, Wang X Y, et al. Chemical Analysis and Meterage, 2022, 31(12): 22
刘瑞红, 潘立宁, 王晓瑜, 等. 化学分析计量, 2022, 31(12): 22
[30] Zhu L, Zheng J, Yang J, et al. Tobacco Science & Technology, 2015, 48(9): 56
朱玲, 郑健, 杨涓, 等. 烟草科技, 2015, 48(9): 56