

## 超高效液相色谱 $\beta$ -环糊精流动相添加剂法 分析卷烟主流烟气中 7 种酚类化合物

李中皓\*, 唐纲岭, 庞永强, 姜兴益, 陈再根, 胡清源

(国家烟草质量监督检验中心, 河南 郑州 450001)

**摘要:**以  $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) 作为流动相添加剂, 建立了一种超高效液相色谱 (UPLC) 快速分析卷烟主流烟气中对苯二酚、间苯二酚、邻苯二酚、苯酚、对甲酚、间甲酚、邻甲酚的方法。卷烟主流烟气中 7 种酚类化合物采用 YC/T 255-2008 标准方法收集, 萃取液经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后直接进行 UPLC 分析。采用 ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱, 以含有 4 g/L  $\beta$ -CD 的流动相进行梯度洗脱, 采用优化后的荧光检测条件进行检测, 分析时间为 10 min。实验结果表明: 与目前国内外普遍应用的 HPLC 方法相比, 该方法实现了间甲酚和对甲酚异构体的有效分离, 7 种酚类化合物的荧光响应强度显著增加。7 种酚类化合物在该方法的线性范围内线性关系良好 ( $r > 0.9999$ ), 3 个加标水平上平均回收率为 95.5% ~ 103.5%, 相对标准偏差 (RSD) 均小于 4%, 方法的检出限为 4 ~ 14 ng/cig。

**关键词:** 超高效液相色谱  $\beta$ -环糊精 卷烟主流烟气 酚类化合物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2010)08-0790-05

## Analysis of seven compounds in mainstream cigarette smoke by ultra performance liquid chromatography using a $\beta$ -cyclodextrin mobile phase additive

LI Zhonghao\*, TANG Gangling, PANG Yongqiang,  
JIANG Xingyi, CHEN Zaigen, HU Qingyuan

(China National Tobacco Quality Supervision & Test Center, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** A rapid method for the analysis of hydroquinone, resorcinol, catechol, phenol, *p*-cresol, *m*-cresol, and *o*-cresol in mainstream cigarette smoke by ultra performance liquid chromatography (UPLC) using a  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) mobile phase additive was developed. The seven major phenolic compounds in mainstream smoke were collected with YC/T 255-2008 standard method. The extract was filtrated with 0.22  $\mu$ m filtration film and then subjected to UPLC analysis. The separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column, and the mobile phase with 4 g/L  $\beta$ -CD additive was used. The fluorescence detection condition was optimized. The analysis time was 10 min for one sample. Comparing with the high performance liquid chromatography (HPLC) methods published, the *p*-cresol and *m*-cresol were completely separated. In addition, the effect of  $\beta$ -CD on fluorescence enhancement for seven major phenolic compounds was significant. The linearity were good between the peak area and the concentration in the linear ranges of seven phenolic compounds, and the correlation coefficients were greater than 0.9999. The limits of detection of the method were 4 ~ 14 ng/cig, and the recoveries were 95.5% ~ 103.5% with relative standard deviations (RSDs) less than 4%.

**Key words:** ultra performance liquid chromatography (UPLC);  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD); mainstream cigarette smoke; phenolic compounds

\* 通讯联系人: 李中皓, 硕士, 助理工程师。Tel: (0371) 67672593, E-mail: lee\_zhonghao@sina.com.

基金项目: 中国烟草总公司郑州烟草研究院自立项目“深度抽吸模式下卷烟主流烟气中有害成分的研究”(No. 502008CZ0360).

收稿日期: 2010-03-31

1990 年, Hoffmann 和 Hecht 发表了有关卷烟烟气中有害的“43 种成分”名单<sup>[1]</sup>, 挥发性酚类化合物(对苯二酚、间苯二酚、邻苯二酚、苯酚、对甲酚、间甲酚、邻甲酚)作为其中的一类重要的有害物, 同时也被列入加拿大政府 46 种有害成分名单和世界卫生组织“烟草制品管制研究小组”建议的管制成分清单<sup>[2]</sup>。目前, 卷烟主流烟气中主要酚类化合物的检测普遍采用高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3-5]</sup>。然而, 普通 HPLC 法不能将间甲酚和对甲酚同时分离, 仅能定量两种化合物的加和结果<sup>[5]</sup>。同时分析测定时间较长, 流动相消耗较多, 在批量样品分析过程中很容易导致测试样品中酚类化合物的氧化损失, 从而影响测试结果的准确性<sup>[6]</sup>。 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)分子形状为“内疏水, 外亲水”的略呈锥筒状的空腔结构, 使得其能作为“宿主”包络不同“客体”化合物, 形成特殊结构的超分子包络物<sup>[7]</sup>。研究表明通过在流动相或色谱柱固定相中添加一定量的环糊精及其衍生物可以在 HPLC 中实现芳香族化合物同分异构体和对映体等的分离<sup>[8-11]</sup>, 从而解决这些难分离化合物的定量问题。同时, 环糊精还对一些被分析物的荧光响应具有增敏作用, 从而在荧光光谱的分析中显著提高对目标化合物检测的灵敏度<sup>[12-14]</sup>。因此, 本文以  $\beta$ -CD 作为流动相添加剂, 建立了一种超高效液相色谱(UPLC)快速分析卷烟主流烟气中 7 种挥发酚类化合物的方法, 同时探讨了  $\beta$ -CD 作为流动相添加剂对 7 种酚类化合物的荧光增敏作用以及对间甲酚和对甲酚分离度的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

标准品: 对苯二酚、间苯二酚、邻苯二酚、苯酚、对甲酚、间甲酚、邻甲酚, 纯度均达到 99.5% (美国 Chem Service 公司)。

试剂:  $\beta$ -CD (分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 乙腈 (色谱纯, 德国 CNW 公司)、乙酸 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验室用水为去离子水。

SM450 直线型吸烟机(20 通道, 英国 Cerulean 公司); Waters Acquity 超高效液相色谱仪(配荧光检测器, 美国 Waters 公司); 二元溶剂管理器和 Empower2 色谱工作站(美国 Waters 公司); AE163 电子天平(瑞士 Mettler 公司); 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 样品的前处理方法

样品的前处理过程参照 YC/T 255-2008, 只换了 0.22  $\mu$ m 水相滤膜。即按照 GB/T 5606.1 抽

取卷烟样品, 用 SM450 直线型吸烟机在 ISO 抽吸条件下收集 4 支卷烟的总颗粒物。将捕集有主流烟气颗粒物的剑桥滤片折叠放入 100 mL 锥形瓶中, 准确加入 50 mL 萃取溶液(1% 乙酸水溶液), 室温下超声萃取 20 min, 静置 5 min, 取约 2 mL 萃取溶液, 用 0.22  $\mu$ m 水相滤膜过滤待测。

### 1.3 超高效液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18(50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 柱流量: 0.3 mL/min; 进样体积: 4  $\mu$ L。二元溶剂流动相的组成及梯度洗脱程序如表 1 所示。采用荧光检测器。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

Time/min	$\varphi$ (A)/%	$\varphi$ (B)/%	Curve
Initial	85	15	Initial
2.00	85	15	6
6.00	50	50	6
8.00	50	50	6
9.50	85	15	1

A: acetic acid-water (1:99, v/v) +  $\beta$ -CD (4 g/L); B: acetic acid-acetonitrile-water (1:30:69, v/v/v) +  $\beta$ -CD (4 g/L)。

### 1.4 标准溶液的配制

准确称量对苯二酚、邻苯二酚、苯酚各 100 mg, 邻甲酚、间甲酚、对甲酚各 50 mg, 间苯二酚 20 mg, 准确至 0.1 mg。将每种样品分别置于 50 mL 烧杯中, 加入约 30 mL 萃取溶液完全溶解后, 转移到 100 mL 的容量瓶中, 用萃取溶液稀释至刻度, 作为标准储备液; 准确移取 10 mL 标准储备液至 100 mL 容量瓶中, 用萃取溶液稀释至刻度作为一级标准溶液。准确移取 10 mL 一级标准溶液至 100 mL 容量瓶中, 用萃取溶液稀释至刻度作为二级储备液。分别准确移取 1、2、5 mL 二级标准溶液, 1、2 mL 一级标准溶液至 5 个 50 mL 容量瓶中, 用萃取溶液稀释至刻度, 此 5 个标准溶液以及二级标准溶液作为 6 级系列标准校准溶液。标准工作溶液在 4  $^{\circ}$ C 条件下保存(可使用 3 个月)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 荧光检测条件的优化

采用荧光 3D 检测模式, 分别固定荧光发射波长(320 nm 和 310 nm)和激发波长(260 nm 和 250 nm), 检测 7 种酚类化合物所对应的荧光最大激发波长和发射波长。在荧光激发和发射光谱强度最大时分别提取不同化合物的最优荧光发射和激发波长, 最终获得 7 种酚类化合物在该检测方法的最佳荧光检测条件, 结果如表 2 所示。表 2 结果表明, 各个目标化合物在两个固定的荧光发射和激发波长条

件下,其最大荧光激发波长和发射波长具有较好的一致性。选取不同目标化合物荧光响应较高的发射波长和激发波长,同时结合这些目标化合物在 UPLC 条件下的出峰顺序对荧光检测条件进行优化,优化结果见表 3。

表 2 3D 荧光检测结果

Table 2 Results of 3D fluorescence detection

Compound	$\lambda_{ex}(max)/nm$		$\lambda_{em}(max)/nm$	
	A	B	C	D
Hydroquinone	292.7	293.7	322.3	323.1
Resorcinol	267.6	272.3	298.1	300.3
Catechol	272.3	274.1	308.4	304.7
Phenol	264.8	266.6	294.4	291.4
<i>p</i> -Cresol	272.3	267.6	300.8	297.4
<i>m</i> -Cresol	268.6	270.4	294.4	295.6
<i>o</i> -Cresol	268.6	270.4	294.4	295.6

A:  $\lambda_{em} = 320\text{ nm}$ ; B:  $\lambda_{em} = 310\text{ nm}$ ; C:  $\lambda_{ex} = 260\text{ nm}$ ; D:  $\lambda_{ex} = 250\text{ nm}$ 。

表 3 荧光检测条件优化结果

Table 3 Optimization of fluorescence detection conditions

Time/min	$\lambda_{ex}/nm$	$\lambda_{em}/nm$
0.50	293	323
1.40	270	304
3.00	265	295
5.00	270	295

### 2.2 $\beta$ -CD 对间甲酚和对甲酚异构体分离的影响

在流动相中分别添加一定量的  $\beta$ -CD,使其质量浓度分别为 0、1、2、3、4 g/L。实验结果表明(见图 1)随着  $\beta$ -CD 添加浓度的提高,间甲酚和对甲酚分离度不断提高,添加 4 g/L 的  $\beta$ -CD 在 UPLC 系统中可同时实现 7 种酚类化合物完全分离,间甲酚和对甲酚分离度为 2.22,样品分析周期仅为 10 min,相对目前 HPLC 方法的分析时间<sup>[5,15]</sup>缩短了 30 min 以上。有研究<sup>[7,11,16-18]</sup>表明,由于芳香族化合物异构体的空间位阻不同,使得  $\beta$ -CD 对于不同异构体的包络作用不同,而正是这种差异为 HPLC 的分离提供了更强的选择性。因此,随着  $\beta$ -CD 浓度的增加,包络作用增强,从而促进了 UPLC 对于不同化合物的选择性,最终体现在间甲酚和对甲酚分离度的增加。由于过高浓度的  $\beta$ -CD 在流动相中的溶解能力下降,易导致流动相的混浊以及 UPLC 系统压力的升高,因此不再继续增加  $\beta$ -CD 的添加量。最终确定流动相中  $\beta$ -CD 添加剂质量浓度为 4 g/L。

### 2.3 $\beta$ -CD 对酚类化合物的荧光响应强度的影响

考察  $\beta$ -CD 作为流动相添加剂对 7 种酚类化合物荧光强度的影响,结果如图 2 所示。随着  $\beta$ -CD 在流动相中添加量的增加,对苯二酚、间苯二酚、邻苯二酚、苯酚和邻甲酚的荧光响应强度均逐渐增大;

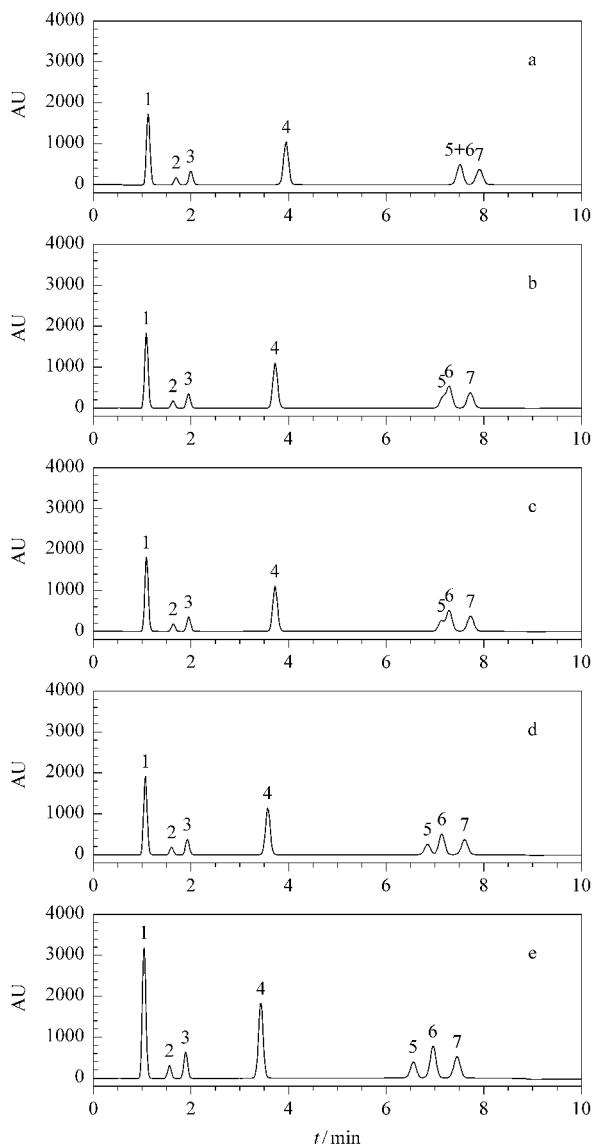


图 1 不同浓度  $\beta$ -CD 流动相添加剂对 7 种酚类化合物分离的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of  $\beta$ -CD on the separation of 7 phenolic compounds

a. 0 g/L; b. 1 g/L; c. 2 g/L; d. 3 g/L; e. 4 g/L. 1. hydroquinone; 2. resorcinol; 3. catechol; 4. phenol; 5. *p*-cresol; 6. *m*-cresol; 7. *o*-cresol.

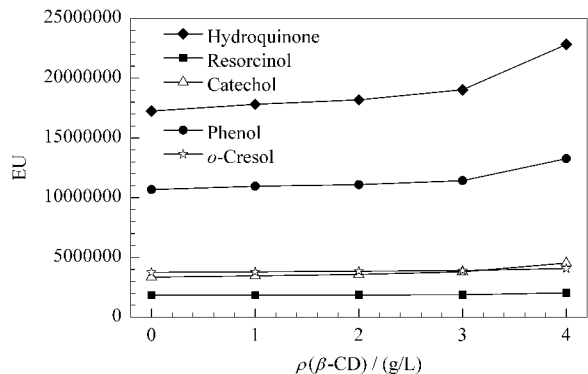


图 2  $\beta$ -CD 对酚类化合物荧光响应强度的影响  
Fig. 2 Effect of  $\beta$ -CD on fluorescence intensity of phenolic compounds

在  $\beta$ -CD 添加剂在流动相中的质量浓度达到 4 g/L 时,各化合物荧光响应强度均有显著提高,比未含有  $\beta$ -CD 流动相添加剂时,增加的幅度分别为 32.27%、10.65%、34.91%、24.24% 和 8.72%。

## 2.4 标准曲线和检出限

6 级酚类化合物的标准工作溶液经 UPLC 分析,各指标浓度最终换算为每支卷烟主流烟气中酚

类化合物的质量,以目标物的色谱峰面积对其相应浓度进行回归分析,得到标准曲线及其回归方程、相关系数。以信噪比( $S/N$ )为 3 计算 7 种酚类化合物的检出限如表 4 所示。可知所采用的色谱条件能够使 7 种酚类化合物得到较好的分离,并且均具有很好的相关性,检出限的范围为 4 ~ 14 ng/cig,低于 HPLC 方法的检出限<sup>[19]</sup>,满足定量检测要求。

表 4 卷烟主流烟气中酚类化合物的标准曲线和检出限

Table 4 Regression analysis and limits of detection of 7 phenolic compounds in mainstream cigarette smoke

Compound	Retention time/ min	Calibration equation <sup>1)</sup>	Linearity range/ ( $\mu\text{g}/\text{cig}$ )	Correlation coefficient	LOD <sup>2)</sup> / (ng/cig)
Hydroquinone	1.039	$Y = 2130000X + 377000$	2.55 ~ 127.87	0.9999	8.32
Resorcinol	1.559	$Y = 804000X + 31500$	0.67 ~ 33.87	0.9999	4.96
Catechol	1.890	$Y = 457000X + 82200$	2.59 ~ 129.87	0.9999	13.46
Phenol	3.429	$Y = 1800000X - 13000$	2.48 ~ 124.12	0.9999	9.65
<i>p</i> -Cresol	6.552	$Y = 942000X - 225000$	1.32 ~ 66.25	0.9999	11.33
<i>m</i> -Cresol	6.955	$Y = 1650000X - 231000$	1.52 ~ 76.00	0.9999	9.21
<i>o</i> -Cresol	7.445	$Y = 1590000X - 374000$	1.30 ~ 65.00	0.9999	12.57

1)  $Y$ : peak area;  $X$ : mass concentration,  $\mu\text{g}/\text{cig}$ . 2) LOD:  $S/N = 3$ .

## 2.5 回收率和精密度试验

对高、中、低不同质量浓度水平的样品标准溶液进行加标回收率试验,按 1.2 节所述方法进行样品处理后测定,每个样品测定 6 次,回收率及日内精密

度测定结果见表 5。试验结果表明,方法的平均回收率的范围为 95.5% ~ 103.5%,相对标准偏差(RSD)均小于 4%。说明本方法的回收率较高,重复性较好。

表 5 7 种酚类化合物的回收率和重复性( $n = 6$ )

Table 5 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) for 7 phenolic compounds ( $n = 6$ )

Compound	Background/( $\mu\text{g}/\text{cig}$ )	Added/( $\mu\text{g}/\text{cig}$ )	Found/( $\mu\text{g}/\text{cig}$ )	Recovery/%	RSD/%
Hydroquinone	67.14	31.97	98.15	97.01	2.96
	67.14	63.94	133.70	104.10	3.21
	67.14	127.87	206.71	109.15	2.66
Resorcinol	1.79	0.85	2.72	109.32	3.56
	1.79	1.70	3.40	94.4	3.23
	1.79	3.39	5.02	95.42	3.95
Catechol	78.26	32.47	110.87	100.44	2.68
	78.26	64.94	141.79	97.83	2.89
	78.26	129.87	218.78	108.20	3.06
Phenol	11.95	6.21	18.07	98.56	3.99
	11.95	12.41	23.84	95.83	2.36
	11.95	24.82	34.83	92.18	2.86
<i>p</i> -Cresol	5.15	3.32	8.41	98.12	3.46
	5.15	6.63	11.89	101.67	4.12
	5.15	13.25	17.66	94.45	3.69
<i>m</i> -Cresol	2.67	1.90	4.49	95.94	2.55
	2.67	3.80	6.41	98.45	2.91
	2.67	7.60	9.85	94.42	3.05
<i>o</i> -Cresol	3.11	1.63	4.65	94.18	2.11
	3.11	3.25	6.37	100.28	3.08
	3.11	6.50	9.34	95.86	4.05

## 2.6 实际样品分析

采用本研究建立的方法分析测定了 10 个卷烟样品,实验结果及典型样品色谱图见表 6 和图 3。由表 6 可知,卷烟主流烟气中的 7 种挥发性酚类化

合物中邻苯二酚、对苯二酚含量最高,其次是苯酚以及甲基酚类化合物,间苯二酚含量最低,10 个样品的 7 种挥发性酚类化合物的总量在 113 ~ 229  $\mu\text{g}/\text{cig}$  之间。

表 6 部分卷烟样品测定结果

Table 6 Analysis results of some cigarette samples

μg/cig

Sample	Hydroquinone/	Resorcinol	Catechol	Phenol	<i>p</i> -Cresol	<i>m</i> -Cresol	<i>o</i> -Cresol
1	73.62	0.66	101.41	23.77	6.50	4.11	5.87
2	65.75	0.64	83.59	10.17	4.20	2.44	3.76
3	77.04	0.43	86.32	14.81	3.96	2.03	3.44
4	62.20	0.47	95.85	14.01	3.98	1.59	2.84
5	66.38	0.50	84.80	13.83	3.06	1.52	2.56
6	51.84	0.32	71.31	16.29	6.58	4.68	6.62
7	77.81	0.05	76.75	15.71	7.05	4.88	6.29
8	75.12	0.83	100.68	21.89	7.25	4.35	5.10
9	80.33	0.61	110.07	22.54	8.66	2.08	4.27
10	41.83	0.39	58.60	7.99	2.31	1.21	1.64

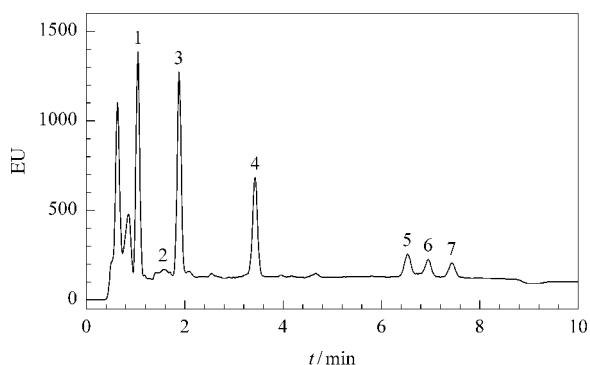


图 3 6号卷烟样品中7种酚类化合物的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of 7 phenolic compounds in mainstream cigarette smoke of sample 6

1. hydroquinone; 2. resorcinol; 3. catechol; 4. phenol;  
5. *p*-cresol; 6. *m*-cresol; 7. *o*-cresol.

### 3 结语

采用  $\beta$ -CD 作为流动相添加剂,建立了 UPLC 快速分析卷烟主流烟气中 7 种酚类化合物的方法。与目前普遍应用的 HPLC 方法相比,该方法实现了间甲酚和对甲酚异构体的有效分离,可同时实现卷烟主流烟气中 7 种酚类化合物的准确定量。本方法灵敏度和准确性高、重复性好、分析速度快,适合大批量卷烟样品中 7 种挥发性酚类化合物的快速检测。

### 参考文献:

[1] Xie J P, Liu H M, Zhu M X, et al. Tobacco Science & Technology (谢剑平, 刘惠民, 朱茂祥, 等. 烟草科技), 2009 (2): 5  
[2] Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. Chem Res Toxicol, 2001, 14(7): 767

[3] Moldoveanu S C, Kiser M. J Chromatogr A, 2007, 1141: 90  
[4] Xie F W, Zhao M Y, Wang S, et al. Tobacco Science & Technology (谢复炜, 赵明月, 王昇, 等. 烟草科技), 2004 (5): 6  
[5] YC/T 255-2008.  
[6] Liu F, Yang L, Ni C M, et al. Tobacco Science & Technology (刘芳, 杨柳, 倪朝敏, 等. 烟草科技), 2007(10): 31  
[7] Ma J G, Zhu X P, Fan J P, et al. Journal of East China Geological Institute (马建国, 朱霞萍, 范杰平, 等. 华东地质学院学报), 2003, 26(1): 73  
[8] Li M Y. Sep Purif Technol, 2008, 63: 701  
[9] Lee K P, Choi S H, Ryu E N, et al. Anal Sci, 2002, 18: 31  
[10] Ma S L, Shen S, Haddad N, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 1232  
[11] Zhang J, Peng Q R, Yang M, et al. Tobacco Science & Technology (张婕, 彭黔荣, 杨敏, 等. 烟草科技), 2008, (12): 47  
[12] Al-Kindy S M Z, Suliman F E O, Al-Hamadi A A. Anal Sci, 2001, 17: 539  
[13] Zeng F R, Xi Y Q, Zhang S Q, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (曾凡蓉, 席永清, 张淑青, 等. 分析试验室), 2007, 26(5): 76  
[14] Xia K H, Sun X Y, Liu B, et al. Journal of Huaqiao University: Natural Science (夏开豪, 孙向英, 刘斌, 等. 华侨大学学报: 自然科学版), 2008, 29(4): 550  
[15] Health Canada. Determination of Phenolic Compounds in Mainstream Tobacco Smoke. (2007-11-28) [2010-04-15]. [http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/\\_main-principal/phenoli-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/_main-principal/phenoli-eng.php)  
[16] Zhong Q Q, He L F, Beesley T E, et al. J Chromatogr A, 2006, 1115: 19  
[17] Ameyibor E, Stewart J T. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17: 83  
[18] Zukowski J, Sybilska D, Jurczak J. Anal Chem, 1985, 57: 2215  
[19] Counts M E, Hsu F S, Laffoon S W, et al. Regul Toxicol Pharm, 2004, 39: 111