

# 柱前衍生/高效液相色谱法测定烟用 添加剂中的咪唑

程利侠\*, 何东香, 杨金龙, 吕长平

(甘肃烟草工业有限责任公司技术研发中心, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:** 建立了丹磺酰氯柱前衍生/高效液相色谱(HPLC)测定烟用添加剂中咪唑含量的分析方法。添加剂样品经碳酸盐缓冲溶液处理, 丹磺酰氯进行柱前衍生化后, 再经乙酸乙酯萃取, 取有机层萃取液经干燥、过滤、浓缩、乙腈定容、过滤后, 以C<sub>18</sub>柱为色谱柱, 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 荧光检测器检测。确定最佳的衍生化反应条件为: 丹磺酰氯溶液质量浓度1 000 mg/L, 反应温度45 ℃, 缓冲溶液pH值10.0, 超声振荡反应时间40 min, 咪唑衍生物用外标法进行定量分析。该方法在0.5~500 mg/L范围内线性关系良好, 相关系数(*r*)为0.999 5, 对咪唑的检出限为0.24 mg/kg, 定量下限为0.80 mg/kg, 0.5、10.0、500 mg/L 3个加标水平下的回收率为89.1%~97.2%, 相对标准偏差不大于7.5%。该方法准确可靠, 适用于烟用添加剂中咪唑含量的测定。

**关键词:** 柱前衍生; 高效液相色谱(HPLC); 烟用添加剂; 咪唑; 丹磺酰氯

**中图分类号:** O657.7; TS45 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)09-1056-05

## Determination of Imidazole in Cigarette Additives by High Performance Liquid Chromatography with Pre-column Derivatization

CHENG Li-xia\*, HE Dong-xiang, YANG Jin-long, LÜ Chang-ping

(Technology R&D Center, Gansu Tobacco Industrial Co., Ltd., Lanzhou 730050, China)

**Abstract:** An effective method of high-performance liquid chromatography(HPLC) was developed for the determination of imidazole, the harmful ingredient in cigarette additives based on pre-column derivatization with dansyl chloride(Dns-Cl). The additive samples firstly underwent the treatment of a buffer of carbonate solution, followed by the pre-column derivatization with dansyl chloride, then the extraction with ethyl acetate, dryness, evaporation, dilution with acetonitrile and filtration, separation on a C<sub>18</sub> column, elution with acetonitrile-water by gradient elution, and finally the detection with a fluorescence detector. The optimum derivatising conditions of imidazole with dansyl chloride are as follows: concentration of dansyl chloride: 1 000 mg/L; temperature of reaction: 45 ℃; pH of buffer solution: 10.0; time of reaction: 40 min. The imidazole derivative was quantified by the external standard method. There was a good linearity for the analyte in the range of 0.5-500 mg/L with a correlation coefficient of 0.999 5. The limits of detection of the method for imidazole derivative was 0.24 mg/kg, and the limits of quantitation was 0.80 mg/kg. The recoveries at three spiked levels ranged from 89.1% to 97.2% with RSDs not more than 7.5%. Results showed that the method was accurate and reliable, and was applicable to the determination of imidazole content in cigarette additives.

**Key words:** pre-column derivatization; high-performance liquid chromatography(HPLC); cigarette additives; imidazole; dansyl chloride

烟用添加剂是卷烟产品的重要组成部分, 可增强或改善烟草产品的香味或吃味, 以满足消费者的需求<sup>[1-2]</sup>。但在烟用添加剂生产过程中, 可能引入微量的有害成分, 如邻苯二甲酸酯类、工业甲醇、咪唑等化合物。其中, 咪唑(Imidazole)是一种氮杂环化合物, 又称1, 3-二氮唑, 为白色结晶固体, 易

溶于水及乙醇;易与酸生成盐,遇碱易脱去氢;分子间存在氢键缔合,沸点较高(256 ℃)。咪唑分子中存在一个6电子共轭大π键,故具有典型的芳香性<sup>[3]</sup>,工业上可由乙二醛、甲醛与氨反应或用咪唑-4,5-二羧酸经脱羧制得<sup>[4]</sup>。

目前,文献报道的甲基咪唑化合物(2-or 4-甲基咪唑)的检测方法主要有紫外光谱法<sup>[5]</sup>、气相色谱法<sup>[6-9]</sup>和液相色谱法<sup>[10-14]</sup>,而对咪唑的检测方法报道甚少。目前烟草行业使用的烟用添加剂种类繁多,成分复杂<sup>[15]</sup>,且咪唑的沸点高,采用气相色谱法分析烟用添加剂中的咪唑时,存在定性较困难、准确度较低且在色谱柱中残留严重等问题。另外,咪唑是小分子化合物,直接测定时不易分离,因此需先衍生化以引入荧光和紫外发光基团,提高其分离度,以易于色谱分析。

丹磺酰氯(Dansyl chloride, Dns-Cl)是一种常用的柱前衍生化试剂,被广泛用于生物胺<sup>[16]</sup>、组胺<sup>[17]</sup>和咪唑类<sup>[11]</sup>化合物的柱前衍生化,具有很好的专一性,可定量完成磺酰化反应,操作简单,衍生物稳定性好。其反应原理如图1所示:在一定条件下,丹磺酰氯可与仲胺基上的活泼氢反应,脱掉1分子的HCl生成具有荧光和紫外吸收的衍生物<sup>[16]</sup>。

由于咪唑在结构上具有仲胺基活泼氢,本实验先在碱性条件下用丹磺酰氯作为柱前衍生化试剂,将咪唑转化成易于检测的具有荧光和紫外吸收的衍生物,再经高效液相色谱/荧光检测器分离分析。方法灵敏度高,基体干扰小,可获得理想的实验结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,荧光检测器(美国 Agilent 公司);色谱柱为 XBridge™ Phenyl C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm × 5 μm, 美国 Waters 公司);预柱为 Acclaim® Explosive E2 C<sub>18</sub>柱(10 mm × 4.3 mm, 5 μm, 美国 Dionex 公司)。ATL-224-1 精密电子天平(德国赛多利斯公司,感量 0.1 mg);Millipore 超纯水发生器;Anke TGL-10B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-500DE 超声波清洗仪(昆山市超声波清洗仪器有限公司);LABORTA4003 旋转蒸发器(德国海道夫公司);CWF1100 马弗炉(英国 Carbolite Furnawws 公司);30 mL 离心管(PP 材质, Corning 公司);有机相滤膜(0.45 μm);TM-1 旋涡混合器(无锡沃信仪器有限公司)。

烟用添加剂:从不同生产厂家获取的烟用香精香料。丙酮(分析纯及以上,天津市光复精细化工有限公司);乙腈、乙酸乙酯(色谱纯,美国 Tedia 公司);丹磺酰氯(纯度 > 99.5%, 上海 TCI 公司);咪唑标准品(纯度 > 99.5%, 北京百灵威公司);咪唑衍生物(自制,咪唑衍生化后经层析柱分离得到);无水硫酸钠(分析纯,天津市光复精细化工有限公司)于 150 ℃ 烘至 2 h,冷却后置于干燥器中备用;实验用水为美国 Millipore 纯水系统制备的去离子水。

### 1.2 标准溶液的配制

1.2.1 咪唑标准储备液 称取 500 mg 咪唑用水溶解后定容至 100 mL 容量瓶中,配成 5 g/L 的储备液,储存于 0~4 ℃,有效期 1 个月。根据需要配制合适浓度的系列标准工作溶液。

1.2.2 标准工作溶液 以水作溶剂,将咪唑标准储备液配制成 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、500.0 mg/L 系列工作标准溶液,贮存于 0~4 ℃,有效期 7 d。

1.2.3 衍生化试剂配制 称取 1.0 g 丹磺酰氯用丙酮溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶中,质量浓度为 10 g/L,即用即配。

1.2.4 衍生化系列工作溶液 分别取咪唑系列标准工作溶液 1.0 mL 于离心管中,用 4.0 mL 衍生化试剂进行衍生化反应,然后根据样品处理方法萃取浓缩标准溶液。用衍生化标准工作溶液制备标准曲线,以保留时间定性,根据咪唑标准工作溶液的浓度及其衍生物响应峰面积,外标法定量。

### 1.3 样品处理

1.3.1 烟用添加剂样品的处理 称取约 5.0 g 样品于离心管或锥形瓶中,加入 2 mL pH 10.0 的

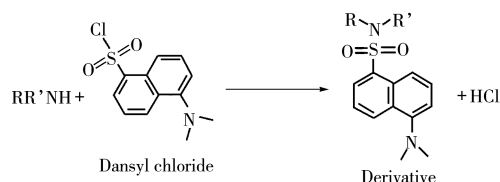


图1 丹磺酰氯与仲胺类的反应式  
Fig. 1 Reaction of Dns-Cl and secondary amine

$\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$  缓冲溶液, 涡旋并摇匀后放置 10 min, 再加入 4.0 mL 衍生化试剂, 于 45 °C 下超声振荡衍生化 40 min, 反应结束后取出离心管, 再加入 1 mL 0.5 mol/L 盐酸溶液并摇匀终止反应。再用 40 mL 乙酸乙酯分两次萃取反应液, 分出有机层, 合并有机层至 50 mL 锥形瓶中, 并用适量的  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜, 干燥后的样品过滤至 50 mL 浓缩瓶中, 滤液用旋转蒸发器于 50 °C 蒸至 0.2 mL 左右, 然后用乙腈定容至 1 mL, 并过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 滤液待测。对于难蒸干的样品, 将旋蒸残余的液体用少许乙腈清洗, 并全部转移至微量器中, 过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 滤液待测。对于萃取不分层的样品, 将溶液转移至离心管中, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 然后吸取上层清液并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜, 干燥后的样品过滤至 50 mL 浓缩瓶中, 滤液用旋转蒸发器于 50 °C 蒸至 0.2 mL 左右, 然后用乙腈定容至 1 mL, 并过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 滤液待测。

**1.3.2 空白样品的制备** 于干净离心管或锥形瓶中(不加香精香料或咪唑标准品), 加入 2 mL pH 10.0 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$  缓冲溶液, 涡旋并摇匀后放置 10 min, 加入 4 mL 衍生化试剂, 然后于 45 °C 下超声振荡衍生化 40 min, 反应结束后取出离心管, 再加入 1 mL 0.5 mol/L 盐酸溶液并摇匀终止反应。最后用乙酸乙酯萃取、浓缩、乙腈定容至 1 mL, 并过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜, 滤液待高效液相色谱分析。

#### 1.4 液相色谱条件

柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 流动相: A(水), B(乙腈), 梯度洗脱程序: 0~2 min, 30% B; 2~10 min, 30%~70% B; 10~25 min, 70% B; 25~26 min, 70%~30% B; 26~31 min, 30% B。检测波长: 335 nm( $\lambda_{\text{ex}}$ : 335 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 503 nm)。

若待测试样溶液的浓度超出标准曲线的浓度范围, 则对样品前处理适当调整后重新测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 萃取条件的选择

由于烟用添加剂样品复杂, 有些既难溶于水, 也难溶于有机溶剂。为完全萃取样品中的待测成分, 本实验选用乙酸乙酯分批萃取衍生化后的烟用添加剂样品, 并考察了萃取体积对咪唑含量测定的影响, 结果发现, 当萃取体积为 30 mL 时, 测定值达到最大, 继续增加萃取体积, 其值基本稳定。为保证萃取充分, 实验选择萃取体积为 40 mL。

### 2.2 衍生化条件

以咪唑标准品为样品, 丹磺酰氯为衍生剂, 研究了  $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$  缓冲溶液的 pH 值、衍生化时间、衍生化温度、衍生剂用量对衍生反应的影响。

**2.2.1 缓冲溶液 pH 值的影响** 咪唑在碱性条件下易失去质子, 因此研究反应体系的 pH 值至关重要。本实验考察了  $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$  缓冲溶液在不同 pH 值(8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0)下对衍生产物峰面积的影响。结果显示 pH 10.0 时衍生化产物的生成量最大, 因此本文选取缓冲溶液体系的 pH 值为 10.0。

**2.2.2 衍生化反应时间的影响** 取相同浓度(10.0 mg/L)的咪唑溶液 6 份, 分别加入过量的丹磺酰氯, 超声振荡不同时间(10、20、40、60、80、100 min), 以考察衍生化反应时间的影响。结果表明, 反应 40 min 时, 衍生产物的生成量最大, 因此选择衍生时间为 40 min。

**2.2.3 衍生温度的影响** 在固定咪唑和衍生剂用量的条件下, 考察了衍生温度分别为 15、25、35、45、55、65 °C 时衍生产物的生成量。结果表明衍生温度为 45 °C 时, 衍生产物量最多, 此后随衍生温度的继续增加, 衍生物产量不变, 因此选择衍生化温度为 45 °C。

**2.2.4 衍生剂(Dns-Cl)用量的影响** 取相同质量浓度(10.0 mg/L)的咪唑溶液 6 份, 考察了衍生剂分别为 10、50、100、500、1 000、2 000 mg/L 时对咪唑衍生程度的影响。每组做 3 次平行实验, 取 3 次测量的平均值。测定结果显示, 衍生剂浓度过量 100 倍时, 咪唑衍生化反应最好, 衍生物的生成量最多。因此选择过量 100 倍(1 000 mg/L)的衍生剂用量, 以保证既不会造成试剂浪费, 又能反应完全。

### 2.3 流动相的选择

咪唑衍生产物的极性不大, 在水中的溶解性较小, 流动相中需含有大量的有机溶剂。常用有机溶剂有甲醇(质子性溶剂)、乙腈(非质子性溶剂), 对于含氮化合物, 乙腈的洗脱能力更强。实验分别采

用乙腈-水、甲醇-水作为流动相, 发现前者作为流动相得到的峰形比后者好, 通过调节乙腈-水的体积比, 梯度洗脱程序, 使得待测成分与样品中的其它成分得到了较好的分离。在此条件下, 考察了咪唑标准品衍生化产物和烟用添加剂样品衍生化产物的液相分离色谱图(图2)。结果表明: 在选定的流动相条件下, 样品中的色谱峰得到很好的分离, 且峰形良好。

## 2.4 检测波长的选择

经荧光检测器的光谱扫描, 色谱图中衍生化产物的最大激发波长( $\lambda_{ex}$ )为335 nm, 最大发射波长( $\lambda_{em}$ )为503 nm, 实验选择335 nm为检测波长, 此时测定灵敏度较高且色谱峰分离较好。

## 2.5 标准曲线、检出限与定量下限

按优化色谱条件对系列衍生化工作溶液进行分析, 测得不同浓度标样的峰面积响应值。以峰面积响应值( $y$ )为纵坐标, 标准物质的质量浓度( $x$ , mg/L)为横坐标进行线性回归分析。咪唑在0.5~500 mg/L范围内线性关系良好, 相关系数( $r$ )为0.999 5。将空白样品溶液重复测定10次, 计算标准偏差, 以3倍标准偏差计算得到方法的检出限(LOD)为0.24 mg/kg, 以10倍标准偏差计算得到方法的定量下限(LOQ)为0.80 mg/kg。

## 2.6 回收率及相对标准偏差

选择实际样品添加0.5、10.0、500 mg/L水平的咪唑标准溶液, 按上述样品处理方法和优化色谱条件进行分析, 得到3个加标水平下咪唑的回收率为89.1%~97.2%, 相对标准偏差(RSD)为2.8%~6.2%。在相同条件下对一样品平行测定6次(每隔1 d测定1次), 计算日间精密度, 得其RSD不大于7.5%。结果表明本方法能准确测定烟用添加剂中咪唑的含量。

## 2.7 实际样品的测定

在上述实验条件下, 测定了60个不同种类的烟用添加剂样品中的咪唑含量。实验结果显示: 仅13种烟用添加剂中检出咪唑化合物(见表1), 且含量均较低(未超过25 mg/kg)。

## 3 结论

本文建立了柱前衍生/高效液相色谱测定不同烟用添加剂中咪唑含量的方法, 优化得到了最佳衍生化试剂条件。方法的检出限为0.24 mg/kg, 定量下限为0.80 mg/kg, 加标回收率为89.1%~97.2%。方法适用于烟用添加剂中咪唑含量的测定, 可为保障烟用添加剂的质量安全提供依据。

### 参考文献:

- [1] Wang H L, Meng Z Y, Lu S M. *Yunnan Chem. Technol.* (王海利, 孟昭宇, 陆舍铭. 云南化工), **2009**, 36(4): 66-70.
- [2] Wu Z Y. *Sci. Technol. Innovat. Herald* (吴志英. 科技创新导报), **2012**, 13: 12-13.
- [3] Xing Q Y, Pei W W, Xu R Q, Pei J. *Basic Organic Chemistry 3rd ed.* Beijing: Higher Education Press(邢其毅, 裴伟伟, 徐瑞秋, 裴坚. 基础有机化学第三版. 北京: 高等教育出版社), **2005**: 1029.
- [4] Ma W Z, Liu S W, Hu J. *Chem. Reagents*(马文展, 刘少文, 胡建. 化学试剂), **1997**, 19(5): 281-285.
- [5] Li J M, Wang Y J, Zou N, Yao L J. *Chin. J. Spectrom. Lab.* (李继民, 王彦吉, 邹宁, 姚丽娟. 光谱实验室), **2008**, 25(2): 84-87.

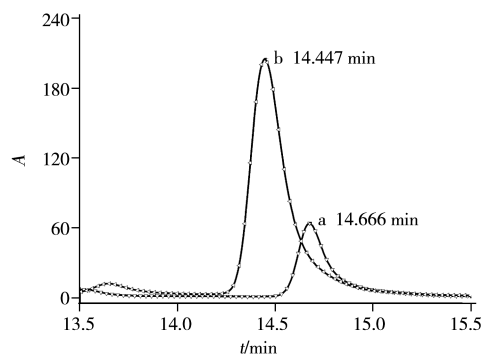


图2 咪唑标准品衍生化产物(a)和烟用添加剂样品衍生化产物(b)的分离色谱图

Fig. 2 Separation chromatograms of the imidazole standard derivative(a) and derivative of cigarette additive sample(b)

表1 不同烟用添加剂样品的测定结果

Table 1 Detection result of the different cigarette additive samples

| Sample | Content (mg/kg) | RSD/% |
|--------|-----------------|-------|
| 1      | 6.10            | 8.1   |
| 2      | 2.78            | 1.4   |
| 3      | 11.94           | 2.3   |
| 4      | 24.06           | 1.2   |
| 5      | 7.35            | 8.6   |
| 6      | 11.15           | 1.5   |
| 7      | 9.03            | 1.8   |
| 8      | 14.72           | 2.2   |
| 9      | 11.52           | 8.6   |
| 10     | 4.68            | 8.0   |
| 11     | 8.83            | 3.9   |
| 12     | 2.82            | 3.2   |
| 13     | 2.04            | 1.4   |

\* undetected samples were not listed

- [6] Li J M, Wang Y J, Zhao Y J, Zou N. *Fujian Anal. Test.* (李继民, 王彦吉, 赵彦军, 邹宁. 福建分析测试), **2009**, 18(4): 37-40.
- [7] Guo X L, Chen M, Hu J R, Zhang S X. *Food Sci.* (郭小莉, 陈敏, 胡锦涛, 张世湘. 食品科学), **2005**, 26(2): 169-171.
- [8] Lin X S, Hang Y P, Wu H Q, Huang X L, Ma Y F, Zhu Z X, Huang F, Luo H T, Deng X. *Chin. J. Anal. Lab.* (林晓珊, 杭义萍, 吴惠勤, 黄晓兰, 马叶芬, 朱志鑫, 黄芳, 罗辉泰, 邓欣. 分析实验室), **2011**, 30(11): 85-88.
- [9] Peng X Q, Feng W, Shi H Y, Xu W. *Chin. Condiment*(彭向前, 冯玮, 石海英, 徐伟. 中国调味品), **2012**, 37(8): 83-85.
- [10] Chen H X, Dai J, Chen S W, Gu Z B. *Chin. Condiment*(陈洪兴, 戴军, 陈尚卫, 顾正彪. 中国调味品), **2006**, 6: 53-56.
- [11] Wang M F, Wang Y H, Guo X D, Du Z F, Wu Y L, Zhang S H. *Food Ferment. Ind.* (王妙飞, 王永华, 郭新东, 杜志峰, 吴玉玺, 张水华. 食品与发酵工业), **2007**, 33(12): 130-132.
- [12] Wu Y L, Huangfu W G, Yang T. *J. Instrum. Anal.* (吴银良, 皇甫伟国, 杨挺. 分析测试学报), **2010**, 29(12): 1200-1204.
- [13] Liu Y, Ding T, Fei X Q, Lin H, Shen C Y, Wu B, Zhang R, Tan M R. *J. Instrum. Anal.* (刘芸, 丁涛, 费晓庆, 林宏, 沈崇钰, 吴斌, 张睿, 谭梦茹. 分析测试学报), **2015**, 34(4): 381-387.
- [14] Pang M R, Lin Q, Dai M, Ren X Y, Zhang Y. *J. Instrum. Anal.* (庞美蓉, 林钦, 戴明, 任小英, 张英. 分析测试学报), **2016**, 35(8): 943-948.
- [15] Zhao J C. *Analysis of Chemical Components and Note of Tobacco Flavor by GC-MS Combined Intelligent Assistant Perfumery System.* Changsha: Central South University(赵剑超. GC-MS 结合智能辅助调香系统解析烟用香精的成分及香韵. 长沙: 中南大学), **2012**.
- [16] Dong W F, Li X Z, Lin W X. *J. Dalian Inst. Light Ind.* (董伟峰, 李宪臻, 林维宣. 大连轻工业学院学报), **2005**, 24(2): 115-118.
- [17] Hu J W, Gao R, Cao M J, Cai Q F, Zhang L J, Su W J, Liu G M. *Food Sci.* (胡家伟, 高榕, 曹敏杰, 蔡秋凤, 张凌晶, 苏文金, 刘光明. 食品科学), **2014**, 8: 283-288.