

液相色谱串联质谱法测定烟用香精香料中的亚硝胺

邓其馨, 黄朝章, 张建平, 蔡国华, 吴清辉, 黄华发, 许寒春, 刘泽春, 谢卫
(福建中烟工业有限责任公司技术中心, 福建厦门 361022)

摘要: 建立了液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)测定烟用香精及料液中N-亚硝基去甲基烟碱(NNN)、N-亚硝基假木贼碱(NAB)、N-亚硝基新烟草碱(NAT)和4-(N-甲基-N-亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-丁酮(NNK)4种烟草特有亚硝胺(TSNAs)的方法。样品采用含0.1 mol/L的醋酸铵甲醇水溶液溶解提取, 在C18色谱柱上采用梯度洗脱分离目标物和干扰物, 电喷雾正离子模式下, 多反应检测模式测定。结果表明, 4种TSNAs的检测限(S/N=3)和定量限(S/N=10)分别为0.4~1.6 ng/g和1.4~4.8 ng/g, 标准工作液在1~50 ng/L的范围内线性良好, 相关系数均大于0.9995, 高中低三个浓度水平的加标回收率在93.5%~105.9%之间, 6次重复实验的RSD范围为1.8%~4.7%, 均小于5%。使用该方法分析测定了8个市售烟用香精香料样品, 其中3个样品检测到TSNAs。该方法准确、灵敏, 适用于烟用香精及料液样品中TSNAs的分析检测。

关键词: 液相色谱串联质谱法; 烟用香精及料液; 烟草特有亚硝胺

文章编号: 1673-9078(2014)1-195-199

Determination of Tobacco-Specific Nitrosamines (TSNAs) in Tobacco Essence and Flavor Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

DENG Qi-xin, HUANG Chao-zhang, ZHANG Jian-ping, CAI Guo-hua, WU Qing-hui, HUANG Hua-fa, XU
Han-chun, LIU Ze-chun, XIE Wei

(Technology Center of China Tobacco Fujian Industrial Co., Ltd., Xiamen 361022, China)

Abstract: Four tobacco-specific nitrosamines (TSNAs), including (R,S)-N-Nitrosoanabasine (NAB), (R,S)-N-Nitrosoanatabine (NAT), 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridinyl)-1-butanone (NNK), and rac N²-Nitrosornicotine (NNN) in tobacco essence and flavor were determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Sample were dissolved and extracted with 0.1 mol/L ammonium acetate methanol-water solution. The compounds were separated by gradient elution on C18 column and detected in positive ion mode using multiple reactions monitoring with a triple-quadruple MS of electrospray ionization. The results showed that the limits of detection (S/N= 3) and limits of quantity (S/N= 10) of four TSNAs were in the range of 0.4~1.6 ng/g and 1.4~4.8 ng/g, respectively. The linear correlation coefficients were above 0.9995 within 1~50 ng/L, and the recovery rates were between 93.5% to 105.9% in high, medium and low spiked levels. The relative standard deviation (RSD) of six repeat tests was below 5% (1.8~4.7%). Eight tobacco essence and flavor samples were evaluated by the method, and three samples were detected TSNAs. The method is of good efficiency, sensitivity and selectivity, and can be successfully applied to determine the TSNAs in varieties of tobacco essence and flavor.

Key words: liquid chromatography tandem mass spectrometry; tobacco essence and flavor; tobacco-specific nitrosamines

N-亚硝胺类化合物是强致癌物, 是最重要的化学致癌物之一, 也是现今四大食品污染物之一^[1], 现已确认与肺部、口腔、食道、胃、胰脏、肝脏等部位的肿瘤形成有关。迄今为止, 已发现的亚硝胺有300多种, 食物、化妆品、啤酒、香烟中都含有亚硝胺^[2]。烟草特

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 国家烟草专卖局卷烟减害技术重大专项子项目(110200902013)

作者简介: 邓其馨(1984-), 男, 工程师, 主要从事烟草化学分析研究

通讯作者: 谢卫(1970-), 男, 高级工程师, 主要从事烟草化学分析研究

有亚硝胺(TSNAs)是以N-亚硝基去甲基烟碱(NNN)、N-亚硝基假木贼碱(NAB)、N-亚硝基新烟草碱(NAT)和4-(N-甲基-N-亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-丁酮(NNK)^[3]为主。烟用香精及料液来源复杂, 且由多种香料调配而成, 通常直接添加于卷烟产品中^[4]。为了减少烟草特有亚硝胺对吸烟者和被动吸烟者健康可能的伤害, 控制其在烟草及烟草制品中的含量, 已成为一项重要的课题^[5]。

某些香精及料液的TSNAs含量较高, 但净化分离

难, 不稳定, 且背景复杂, 干扰严重, 定量分析比较困难。目前, 烟草及卷烟烟气中TSNAs的分析测试方法主要有气相色谱-氮磷检测法(GC-NPD)^[6]、气相色谱-热能分析法(GC-TEA)^[7]、气相色谱-多级质谱联用法(GC-MS)^[8]、液相色谱法(LC)^[9]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[3]。GC-NPD检测灵敏度不高; GC-TEA灵敏度高、选择性强, 但其不能有效区分共同流出的亚硝胺类化合物, 且仪器价格昂贵; GC-MS和LC均无法实现香精及料液样品中4种TSNAs和干扰物的基线分离。LC-MS/MS法灵敏度高, 选择性好, 操作简便, 重复性好, 结果准确, 是一种既能定量又能定性的检测方法, 已广泛应用于复杂基体中痕量物质的定性定量分析^[10]。本文首次建立了烟用香精及料液中TSNAs检测的LC-MS/MS法, 旨在快速准确测定烟用香精及料液中TSNAs的含量, 为烟草及烟草制品中TSNAs的分析及控制提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

安捷伦液相色谱仪1290, 美国Agilent公司; 三重四级杆质谱仪QTRAP 5500, 美国应用生物公司; AG104电子天平(感量: 0.0001 g), 瑞士Mettler Toledo公司; GFL3017型台式旋转振荡器, 德国Gesellschaft公司; Human型超纯水系统, 北京普析通用仪器有限责任公司; 0.22 μm微孔有机过滤膜, 北京颇赛科技发展有限公司。

分析用标准品 *N*-亚硝基假木贼碱(R,S)-*N*-Nitrosoanabasine (NAB), 纯度≥98%; *N*-亚硝基新烟碱(R,S)-*N*-Nitrosoanatabine(NAT), 纯度≥98%; 4-(*N*-甲基-*N*-亚硝胺)-1-(3-吡啶基)-丁酮4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridinyl)-1-butanone(NNK), 纯度≥98%; *N*-亚硝基去甲基烟碱 rac *N*'-Nitrosomnicotine (NNN), 纯度≥98%; (R,S)-*N*-Nitrosoanabasine-d4(NAB-d4), 纯度≥99%; (R,S)-*N*-Nitrosoanatabine-2,4,5,6-d4(NAT-d4), 纯度≥99%; 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK-d4), 纯度≥99%; rac *N*'-Nitrosomnicotine-d4(NNN-d4), 纯度≥99%; 甲醇、乙酸铵、乙酸(色谱纯, 百灵威化学试剂公司)。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C18柱(100 mm×2.1 mm i.d., 1.7 μm); 流动相A: 甲醇, 流动相B:

0.2% (V/V) 的乙酸水溶液, 采用梯度洗脱模式: 0 min, 10% A; 2.0 min时, 100% A; 4.5 min时, 10% A, 保持到6 min。流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积: 5 μL;

1.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾电离源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 650 °C; 辅助气Gas1压力: 60 psi; 辅助气Gas2压力: 50 psi; 各分析物的定量离子对、定性离子对及碰撞能量(CE)见表1。

表1 TSNAs的质谱参数

Table 1 MS parameters of TSNAs

分析物	定量离子对	碰撞能	定性离子对	碰撞能
	<i>m/z</i>	<i>V</i>	<i>m/z</i>	<i>V</i>
NAB	192.1/162.2	15	192.1/133.1	30
NAT	190.2/160.2	14	190.2/106.1	23
NNK	208.2/122.2	20	208.2/148.1	18
NNN	178.2/148.2	14	178.2/120.1	25
NAB-d4	196.2/166.2	16	196.2/137.2	32
NAT-d4	194.1/164.2	15	194.1/110.1	25
NNK-d4	212.2/126.1	21	212.2/110.1	35
NNN-d4	182.1/152.2	15	182.1/124.1	26

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液

称取10.0 mg的NAB、NAT、NNK和NNN标准试剂, 分别置于4只10 mL棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成浓度均为1.0 mg/mL的标准储备液。分别移取NAB、NAT、NNK和NNN的标准储备液1.0 mL至100 mL容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成NAB、NAT、NNK和NNN浓度为10.0 μg/mL的一级混合标准溶液。移取10.0 mL一级混合标准储备液至100 mL容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成NAB、NAT、NNK和NNN浓度为1.0 μg/mL的二级混合标准溶液。称取10.0 mg的NAB-d4、NAT-d4、NNK-d4和NNN-d4, 分别置于4只10 mL棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成浓度均为1.0 mg/mL的内标储备液。分别移取NAB-d4、NAT-d4、NNK-d4和NNN-d4的储备液1.0 mL至100 mL容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成NAB-d4、NAT-d4、NNK-d4和NNN-d4浓度为10.0 μg/mL的一级混合内标溶液。移取10.0 mL一级混合内标储备液至100 mL容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成NAB-d4、NAT-d4、NNK-d4和NNN-d4浓度为1.0 μg/mL的二级混合内标溶液。分别移取0.1、0.2、0.5、1.0、2.0和5.0 mL二级混合标准溶液置于不同的100 mL容量瓶中, 再分

别准确加入1.0 mL二级内标溶液。用0.1 mol/L乙酸铵水溶液定容至刻度，配制成1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL系列浓度的TSNAs标准溶液。内标浓度为10.0 ng/mL。若样品浓度超出标准工作溶液浓度范围，可适当扩展工作溶液覆盖范围。

1.3.2 样品制备

准确称取0.5 g香精或料液样品，置于50 mL锥形瓶中，准确加入10 mL含10.0 ng/mL内标的10%甲醇水溶液（含乙酸铵的浓度为0.1 mol/L）溶液，振荡萃取30 min后，静置5 min。取1 mL萃取液过0.22 μm的滤膜后，进行LC-MS/MS分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

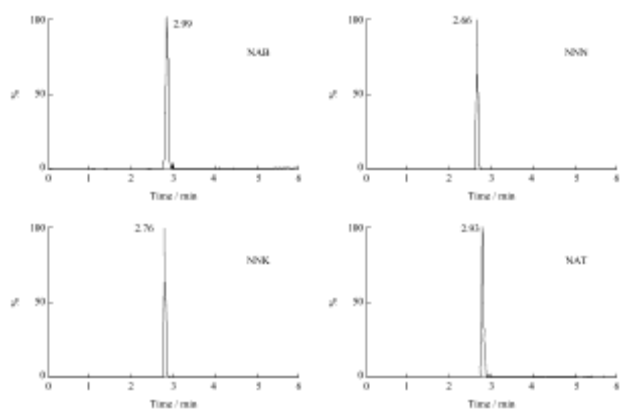


图1 标准工作溶液色谱图

Fig.1 The chromatogram of standard solution

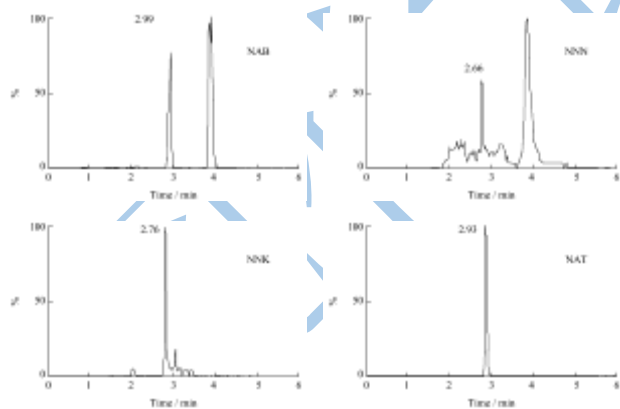


图2 实际样品的色谱图

Fig.2 The chromatogram of real sample

本实验要采用正离子模式检测，必须使用酸性流动相。因此，为选择适宜的流动相，用甲醇+0.2%乙酸溶液、甲醇+乙酸铵溶液、乙腈+0.1%甲酸溶液、乙腈+乙酸铵溶液4种流动相进行了试验。结果表明，选择甲醇+0.2%乙酸溶液作流动相时，标准样品及实际样品中的烟草特有亚硝胺，保留时间适中，峰型良好（图1，

2）。

2.2 质谱条件的选择

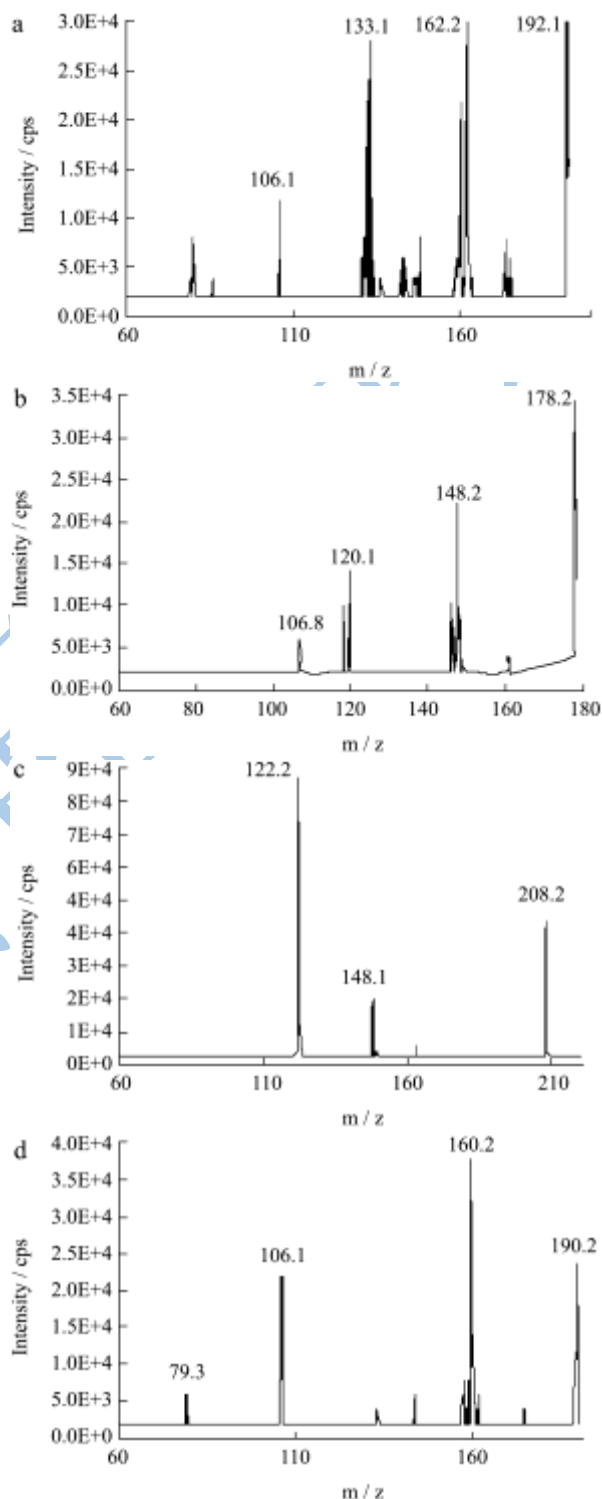


图3 TSNAs子离子扫描图

Fig.3 Product ion scans of TSNAs

注：a、b、c、d分别为NAB、NNN、NNK、NAT。

先用流动注射法对1 mg/L的4种TSNAs混合标准溶液直接进行MS分析，根据TSNAs的分子结构特征，选择电喷雾（ESI）离子源，在正离子模式在对TSNAs

进行一级质谱分析,得到TSNAs的分子离子峰,选择合适的分子离子峰进行二级质谱碎片分析,得到子离子信息。4种TSNAs的子离子扫描图见图3。定量离子选取相对丰度最大的特征子离子,结果见表1。而后,再逐个调节电喷雾电压、离子源温度、辅助器压力、去簇电压和碰撞能,使TSNAs的质谱响应最强确定质谱参数。

2.3 前处理条件的确定

大部分香精香料为醇溶性且较粘稠,因此采用甲醇水为萃取剂能提高萃取效率。实验分别考察了10%甲醇-水溶液、30%甲醇-水溶液、50%甲醇-水溶液、70%甲醇-水溶液、90%甲醇-水溶液,可以发现甲醇比例大于10%以后,杂质干扰增大,对亚硝胺的检测造成很大影响。因此前处理的萃取剂确定为10%甲醇水溶液。在萃取液中添加0.1 mol/L的乙酸铵,可以提高前处理方法的回收率。

2.4 标准曲线和检测限

选择1.3.1系列标准溶液,将其按1.2中所述条件进行LC-MS/MS分析,并对各标样的峰面积和内标的峰面积的比值(Y)和其浓度(X)进行线性回归分析,得到4种TSNAs的标准曲线,结果见表2。表2表明,1~50 ng/mL浓度范围内,4种TSNAs的工作曲线线性关系良好,适合定量分析。在本实验条件下,将标准溶液连续稀释,以3倍和10倍信噪比(S/N)来作为分析方法的检测限和定量限。数据表明方法的灵敏度高,适合用于TSNAs的测定。

2.5 回收率与重复性

采用标准加入法测定方法的回收率。取一种已知目标物含量的样品(1#),进行高、中、低三个加标水平的回收率实验,重复6次,测定其加标回收率和重复性,结果如表3所示。6次重复实验的RSD范围为1.8~4.7%,回收率范围为93.5~105.9%,可以满足定量需要。

表2 TSNAs的保留时间、线性方程、相关系数和检测限、定量限

Table 2 The retention time, calibration curves, correlation coefficient and LOD-LOQ of TSNAs

化合物	保留时间/min	内标物	回归方程	相关系数 R ²	检出限/(ng/g)	定量限/(ng/g)
NAB	2.99	NAB-d4	Y=0.0786X+0.0115	0.9996	1.2	3.6
NAT	2.93	NAT-d4	Y=0.233X+0.118	0.9998	0.6	1.8
NNK	2.76	NNK-d4	Y=0.0746X+0.0143	0.9997	0.4	1.4
NNN	2.66	NNN-d4	Y=0.0898X+0.019	0.9995	1.6	4.8

表3 方法的回收率和精密度

Table 3 The recovery rate and precision of the method

化合物	样品含量/(ng/g)	加标含量/(ng/g)	检测值/(ng/g)	RSD/%	平均RSD/%	回收率/%	平均回收率/%
NAB	23.5	10	32.6	3.5	2.9	97.3	95.6
	23.5	20	41.7	2.4		95.9	
	23.5	40	59.4	2.8		93.5	
NAT	54.2	20	72.9	4.1	3.3	98.2	96.0
	54.2	50	98.5	3.3		94.5	
	54.2	100	146.8	2.6		95.2	
NNK	46.2	20	62.1	2.9	2.3	93.8	96.0
	46.2	50	95.2	2.1		99.0	
	46.2	100	139.4	1.8		95.3	
NNN	37.9	20	61.3	4.3	4.4	105.9	104.6
	37.9	40	80.3	4.7		103.1	
	37.9	80	123.6	4.2		104.8	

2.6 实际样品分析

利用本研究建立的方法分析测定了8个市售烟用香精香料样品,实验结果见表4。由表4可知,在8个烟

用香精香料样品中, 3个样品检测到TSNAs, 但含量差异较大。

表4 实际样品的测定结果 (ng/g)

Table 4 Test results of sample (ng/g)

化合物	1	2	3	4	5	6	7	8
NAB	23.5	15.9	ND	104.5	ND	ND	ND	ND
NAT	54.2	26.8	ND	246.3	ND	ND	ND	ND
NNK	46.2	24.7	ND	233.7	ND	ND	ND	ND
NNN	37.9	20.6	ND	147.8	ND	ND	ND	ND

3 结论

本文建立了烟用香精及料液中TSNAs测定的液相色谱串联质谱法。采用液相色谱分离目标物和干扰物, 用电喷雾三重四级杆串联质谱提取特征离子, 以选择离子对通过内标法定量。该方法前处理简便, 灵敏度和准确性高, 重复性好, 分析速度快, 适用于烟用香精及料液中TSNAs的测定。

参考文献

- [1] 马俪珍,张健斌,孟培培.食品中亚硝胺类化合物的危害及控制研究进展[J].保鲜与加工,2012,12(2):1-4,45
MA Lizheng, ZHANG Jianbin, MENG Peipei. Progress of Research on the Hazards and Control of N-nitrosamines in Foods [J]. Storage and process, 2012, 12(2): 1-4, 45
- [2] 何红春.食品中N-亚硝胺类化合物及其检测方法研究进展[J].安徽农学通报,2013,19(4):132-134
HE Hongchun. Progress in Determination Method of N-nitrosamine Compounds in Food Samples [J]. Anhui agricultural science bulletin, 2013, 19(4): 132-134
- [3] WU Jingcun, JOZA Peter, SHARIFI Mehran, et al. Quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in cigarette tobacco and mainstream cigarette smoke by use of isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(4): 1341-1345
- [4] 罗崇光,莫启武,李杰明.气相色谱/质谱法测定烟用香精和料液中的烟碱含量[J].烟草科技,2012,5:48-50
LUO Chongguang, MO Qiwu, LI Jieming. Determination of Nicotine Content in Tobacco Flavor or Casing with GC/MS [J]. Tobacco science & technology, 2012, 5: 48-50
- [5] P Jha. Avoidable global cancer deaths and total deaths from smoking[J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(9): 655-664
- [6] 刘万峰,王元英.应用气相色谱-NPD测定烟叶中烟草特有亚硝胺[J].中国烟草科学,2003,24(2):19-22
LIU Wanfeng, WANG Yuanying. Determination of tobacco-specific nitrosamines in tobacco by GC-NPD [J]. Chinese tobacco science, 2003, 24(2): 19-22
- [7] ADAMS John D, BRUNNEMANN Klaus D, HOFFMANN Dietrich. Chemical studies on tobacco smoke : LXXV. Rapid method for the analysis of tobacco-specific N-nitrosamines by gas-liquid chromatography with a thermal energy analyser [J]. Journal of Chromatography A, 1983, 256: 347-351
- [8] R F Arrendale, W J Chamberlain, O T Chortyk, et al. Determination of tobacco-specific N-Nitrosamines by capillary gas chromatography/selected ion monitoring mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 1986, 58(3): 565-568
- [9] 辛慧君,谢复炜,邓大君.高效液相色谱-光水解热裂解-热能分析联用技术测定烟草中的N'-亚硝基去甲烟碱[J].分析化学,2000, 28(4):436-438
XIN Hui jun, XIE Fu wei, DENG Da jun. Determination of N'-nitrosornicotine in Tobacco by High Performance Liquid Chromatography-Photohydrolysis-Pyrolysis-Thermal Energy Analysis [J]. Chinese journal of analytical chemistry, 2000, 28(4): 436-438
- [10] HAAPALAMarkus, SUOMINEN Tina, KOSTIANEN Risto. Capillary photoionization: A high sensitivity ionization method for mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(12): 5715-5719