



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105403630 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201510707623. 7

(22) 申请日 2015. 10. 27

(71) 申请人 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司
地址 650106 云南省昆明市高新开发区海源
北路 1699 号

申请人 云南同创检测技术股份有限公司

(72) 发明人 杨式华 董胜强 孔兰芬 侯英
刘维涓 杨蕾 李伟 王玉 卫青
朱叶梅 邱昌桂 张朗 高辉
史近文

(74) 专利代理机构 昆明大百科专利事务所
53106

代理人 李云

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006. 01)

G01N 30/06(2006. 01)

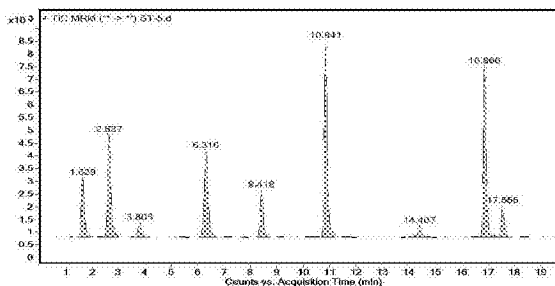
权利要求书1页 说明书6页 附图7页

(54) 发明名称

一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法

(57) 摘要

一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法, 本发明方法是制备柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红、赤藓红九种合成着色剂混合母液及样品溶液, 准备标准工作溶液, 采用液相色谱-串联三重四级杆质谱分析仪, 分析检测得到样品溶液中九种合成着色剂浓度。本发明方法准确可靠、灵敏度高, 非常适合复杂基质再造烟叶用辅料中九种合成着色剂的分析。



1. 一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法,其特征在于,方法步骤如下:

(1) 制备九种合成着色剂混合母液:分别称取柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红标准品 10mg 于 10mL 容量瓶中,称取赤藓红 100mg 于 10mL 容量瓶中,各采用去离子水溶解并定容,然后各分别移取 1mL 上述九种溶液于 100mL 容量瓶中,采用去离子水定溶得到九种合成着色剂混合母液;

(2) 准备标准工作溶液:分别移取 0.02mL、0.05mL、0.10mL、0.50mL、1.0mL 和 2.0mL 九种合成着色剂混合母液于 10mL 容量瓶中,采用去离子水定溶,得到标准工作溶液系列;标准工作溶液含柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红的浓度范围均为 0.02 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.10 μ g/mL、0.50 μ g/mL、1.00 μ g/mL、2.00 μ g/mL,赤藓红浓度范围为 0.20 μ g/mL、0.50 μ g/mL、1.00 μ g/mL、5.00 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL;

(3) 制备样品溶液:进行再造烟叶用辅料中合成着色剂的溶解、萃取与净化:称取 0.2g ~ 0.5g 再造烟叶用辅料于 50mL 锥形瓶中,加入 20mL 去离子水溶解,超声提取 10min,10000r/min 离心 5min,取 10mL 上清液上样到经 3mL 甲醇、3mL 水活化的 Strata-X-AW 固相萃取柱上,然后用 3mL 水、3mL 甲醇洗涤,洗涤后使用 5mL 5% 氨化甲醇洗脱,洗脱液在 40 $^{\circ}$ C 条件下氮气吹干,加入 2mL 去离子水溶解后,经 0.22 μ m 过滤膜后得到样品溶液;

所述再造烟叶用辅料是指再造烟叶生产过程中使用的涂布液或烟叶浸膏或烟梗浸膏或香精香料;

(4) 进行液相色谱-串联三重四级杆质谱分析:采用液相色谱-串联三重四级杆质谱分析仪,分析检测的液相色谱、质谱条件如下:

色谱柱为 Agilent SB-C18,柱温:30 $^{\circ}$ C;流动相 A 为 0.02mol/L 乙酸铵的水溶液,流动相 B 为甲醇溶液;梯度洗脱,条件为 0 ~ 5min:90% A ~ 85% A,5.1 ~ 20min:85% A ~ 30% A,20.1 ~ 23min:0% A,23.1 ~ 28min:90% A;流速:0.2mL/min,进样体积 2 μ L;

离子源:采用电喷雾电离源;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测 MRM;电喷雾电压:500V;干燥气温度:325 $^{\circ}$ C;干燥气流量:6L/min;鞘气温度:380 $^{\circ}$ C;鞘气流量:10L/min;毛细管电压:4000V;

(5) 绘制标准曲线及计算结果:分别吸取步骤 (2) 制备的不同浓度标准工作溶液进行 LC-MS/MS 分析,在步骤 (4) 确定的仪器参数下,以九种合成着色剂定量离子峰面积对其所对应的质量浓度进行线性回归,得到各目标化合物的标准工作曲线;再分别吸取步骤 (3) 制备的样品溶液进行 LC-MS/MS 分析,在步骤 (4) 确定的仪器参数下,得到九种合成着色剂定量离子峰面积,代入回归方程,计算得到样品溶液中九种合成着色剂浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法,其特征在于,所述的去离子水达到 GB/T 6682 中一级水的要求。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法,其特征在于,吹干洗脱液的氮气的纯度 \geq 99.999%。

一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法

技术领域

[0001] 本发明属于再造烟叶用辅料如再造烟叶生产过程中使用的涂布液、烟叶浸膏、烟梗浸膏、香精香料等化学成分分析测定技术领域,具体涉及一种采用液相色谱-串联质谱法检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法。

背景技术

[0002] 随着人们对卷烟安全意识的提高,卷烟合成着色剂含量也受到越来越多的关注。加强对卷烟产品及原料中合成着色剂含量的控制,已成为烟草企业和大多数消费者的共识。烟用辅料(如再造烟叶用辅料)作为卷烟生产的重要环节之一,其安全性目前已受到行业内的高度重视。特别是对于再造烟叶安全性控制更为严格,因而控制再造烟叶用辅料中合成着色剂含量,对卷烟企业质量控制及保护消费者利益具有重要意义。

[0003] 合成着色剂是指用人工化学合成方法所制的化合物,包括食用着色剂及其他用途的非食用着色剂。合成着色剂具有着色力强、色泽鲜艳、不易褪色、稳定性好、易溶解、成本低等特点,所以合成着色剂备受亲睐。为了使再造烟叶色泽艳丽,再造烟叶用辅料中通常都要添加合成着色剂。但发现不少食用合成着色剂具有致癌、致畸影响。

[0004] 目前,国内针对食品中合成着色剂的测定已经有相关国家标准,并且已经制定了食品安全国家标准来规定各种着色剂的不同种类食品中的限量。针对于烟草行业,未见国内关于合成着色剂的测定的相关国家标准。申请人通过前期探索,按GB/T 5009.35-2003《食品中合成着色剂的测定》标准进行测定卷烟辅材中合成着色剂,以及采用行业高效液相色谱法测定再造烟叶中合成着色剂方法进行测定,发现这些方法均很难适用于再造烟叶用辅料特别是膏体、液体等样品的测定,主要是由于卷烟辅料中基质较为复杂,特别是涂布液基质更为复杂,采用上述2种方法测定这些样品,均容易出现假阳性,存在严重的检测定性定量不准确,无法判定等问题。

[0005] 为此,基于液相色谱-串联三重四级杆质谱仪(LC-MS/MS)除具有普通高效液相色谱仪的分离功能,又具有质谱离子高选择性的优势,能够在定性定量时发挥更为精准的功能,探索开发采用液相色谱-串联三重四级杆质谱仪测定烟用辅料中合成着色剂含量的方法,对准确检测再造烟叶用辅料中的合成着色剂具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的是解决再造烟叶用辅料基质复杂,出现假阳性,存在严重的检测定性定量不准确问题,提供一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0008] 一种检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法,方法步骤如下:

[0009] (1) 制备九种合成着色剂混合母液:分别称取柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红标准品 10mg 于 10mL 容量瓶中,称取赤藓红 100mg 于 10mL 容量瓶中,各采用去离子水溶解并定溶,然后各分别移取 1mL 上述九种溶液于 100mL 容量瓶中,采

用去离子水定溶得到九种合成着色剂混合母液；

[0010] (2) 准备标准工作溶液：分别移取 0.02mL、0.05mL、0.10mL、0.50mL、1.0mL 和 2.0mL 九种合成着色剂混合母液于 10mL 容量瓶中，采用去离子水定溶，得到标准工作溶液系列；标准工作溶液含柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红的浓度范围均为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ ，赤藓红浓度范围为 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ ；

[0011] (3) 制备样品溶液：进行再造烟叶用辅料中合成着色剂的溶解、萃取与净化：称取 0.2g ~ 0.5g 再造烟叶用辅料于 50mL 锥形瓶中，加入 20mL 去离子水溶解，超声提取 10min，10000r/min 离心 5min，取 10mL 上清液上样到经 3mL 甲醇、3mL 水活化的 Strata-X-AW 固相萃取柱上，然后用 3mL 水、3mL 甲醇洗涤，洗涤后使用 5mL 5% 氨化甲醇洗脱，洗脱液在 40℃ 条件下氮气吹干，加入 2mL 去离子水溶解后，经 0.22 μm 过滤膜后得到样品溶液；

[0012] 所述再造烟叶用辅料是指再造烟叶生产过程中使用的涂布液或烟叶浸膏或烟梗浸膏或香精香料；

[0013] (4) 进行液相色谱 - 串联三重四级杆质谱分析：采用液相色谱 - 串联三重四级杆质谱分析仪，分析检测的液相色谱、质谱条件如下：

[0014] 色谱柱为 Agilent SB-C18，柱温：30℃；流动相 A 为 0.02mol/L 乙酸铵的水溶液，流动相 B 为甲醇溶液；梯度洗脱，条件为 0 ~ 5min :90% A ~ 85% A，5.1 ~ 20min :85% A ~ 30% A，20.1 ~ 23min :0% A，23.1 ~ 28min :90% A；流速：0.2mL/min，进样体积 2 μL ；

[0015] 离子源：采用电喷雾电离源；扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应监测 MRM；电喷雾电压：500V；干燥气温度：325℃；干燥气流量：6L/min；鞘气温度：380℃；鞘气流量：10L/min；毛细管电压：4000V；

[0016] (5) 绘制标准曲线及计算结果：分别吸取步骤 (2) 制备的不同浓度标准工作溶液进行 LC-MS/MS 分析，在步骤 (4) 确定的仪器参数下，以九种合成着色剂定量离子峰面积对其所对应的质量浓度进行线性回归，得到各目标化合物的标准工作曲线；再分别吸取步骤 (3) 制备的样品溶液进行 LC-MS/MS 分析，在步骤 (4) 确定的仪器参数下，得到九种合成着色剂定量离子峰面积，代入回归方程，计算得到样品溶液中九种合成着色剂浓度。

[0017] 本发明所述的去离子水达到 GB/T 6682 中一级水的要求。吹干洗脱液的氮气的纯度 $\geq 99.999\%$ 。

[0018] 本发明方法具有以下优点：

[0019] (1) 本发明建立了一种液相色谱 - 三重四极杆串联质谱仪同时检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂的方法，能够准确地对再造烟叶用辅料中九种合成着色剂进行定性、定量。

[0020] (2) 本发明使用 Strata-X-AW 固相萃取柱对样品进行净化，能够有效的去除复杂基质对检测信号的干扰。

[0021] (3) 本发明使用 SB-C18 色谱柱与 0.02mol/L 乙酸铵水溶液 + 甲醇流动相的选择对九种合成着色剂的分离达到了优异的分​​离效果。

[0022] (4) 本发明检出限在 0.07 $\mu\text{g/g}$ ~ 0.12 $\mu\text{g/g}$ 之间，日内精密度 RSD(n = 6) 在 1.90% ~ 6.49%，日间精密度 RSD(n = 3) 在 2.97% ~ 5.48%，稳定性好，回收率在 88.54% ~ 108.43% 之间，准确性高；液相色谱 - 串联三重四级杆质谱仪操作简单快捷、准

确可靠、重复性好。

[0023] 本发明方法准确可靠、灵敏度高,非常适合复杂基质再造烟叶用辅料中九种合成着色剂的分析。

附图说明

- [0024] 图 1 为九种合成着色剂的总离子流 (TIC) 图 ;
[0025] 图 2 为柠檬黄定量离子的 MRM 图 ;
[0026] 图 3 为苋菜红定量离子的 MRM 图 ;
[0027] 图 4 为靛蓝定量离子的 MRM 图 ;
[0028] 图 5 为胭脂红定量离子的 MRM 图 ;
[0029] 图 6 为日落黄定量离子的 MRM 图 ;
[0030] 图 7 为诱惑红定量离子的 MRM 图 ;
[0031] 图 8 为亮蓝定量离子的 MRM 图 ;
[0032] 图 9 为酸性红定量离子的 MRM 图 ;
[0033] 图 10 为赤藓红定量离子的 MRM 图 ;
[0034] 图 11 为某涂布液的总离子流 (TIC) 图 ;
[0035] 图 12 为某涂布液柠檬黄定量离子的 MRM 图 ;
[0036] 图 13 为某涂布液日落黄定量离子的 MRM 图。

具体实施方式

[0037] 下面通过实施例对本发明进行进一步说明。

[0038] 一种采用液相色谱 - 串联三重四级杆质谱法检测再造烟叶用辅料中九种合成着色剂浓度的方法,方法步骤如下 :

[0039] (1) 准备测定仪器和材料 :液相色谱 - 串联三重四级杆质谱仪 (Agilent 1290-6460, 美国);分析天平 (梅特勒 AB204-S, 瑞士);容量瓶, 10mL、100mL、锥形瓶, 50mL ;去离子水 (达到 GB/T 6682 中一级水的要求);乙酸铵 (分析纯, 西陇化工股份有限公司);甲醇 (色谱纯, Dikma 公司);氨水 (分析纯, 西陇化工股份有限公司);Strata-X-AW 固相萃取柱 (Phenomenex SPE 小柱, 60mg/3mL);高纯氮气 (纯度 $\geq 99.999\%$, 昆明梅塞尔气体产品有限公司);

[0040] (1) 准备九种合成着色剂混合母液 :分别称取柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红标准品 10mg 于 10mL 容量瓶中,称取赤藓红 100mg 于 10mL 容量瓶中,各采用去离子水溶解并定溶,然后各分别移取 1mL 上述九种溶液于 100mL 容量瓶中,采用去离子水定溶得到九种合成着色剂混合母液 ;

[0041] (2) 制备标准工作溶液 :分别移取 0.02mL、0.05mL、0.10mL、0.50mL、1.0mL 和 2.0mL 九种合成着色剂混合母液于 10mL 容量瓶中,采用去离子水定溶,得到标准工作溶液系列 ;标准工作溶液含柠檬黄、苋菜红、靛蓝、胭脂红、日落黄、诱惑红、亮蓝、酸性红的浓度范围均为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$, 赤藓红浓度范围为 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$;

[0042] (3) 制备样品溶液 :进行再造烟叶用辅料中合成着色剂的溶解、萃取与净化 :称取

0.2g ~ 0.5g 再造烟叶用辅料于 50mL 锥形瓶中,加入 20mL 去离子水溶解,超声提取 10min, 10000r/min 离心 5min,取 10mL 上清液上样到经 3mL 甲醇、3mL 水活化的 Strata-X-AW 固相萃取柱上,然后用 3mL 水、3mL 甲醇洗涤,洗涤后使用 5mL 5% 氨化甲醇洗脱,洗脱液在 40℃ 条件下氮气吹干,加入 2mL 去离子水溶解后,经 0.22 μm 过滤膜后得到样品溶液;

[0043] 所述再造烟叶用辅料是指再造烟叶生产过程中使用的涂布液或烟叶浸膏或烟梗浸膏或香精香料;

[0044] (4) 进行液相色谱-串联三重四级杆质谱(LC-MS/MS)分析:采用液相色谱-串联三重四级杆质谱分析仪,分析检测的液相色谱、质谱条件如下:

[0045] 色谱柱为 Agilent SB-C18 (50mm×2.1mm i.d., 1.8 μm),柱温:30℃;流动相 A 为 0.02mol/L 乙酸铵的水溶液,流动相 B 为甲醇溶液;梯度洗脱,条件为 0 ~ 5min :90% A ~ 85% A, 5.1 ~ 20min :85% A ~ 30% A, 20.1 ~ 23min :0% A, 23.1 ~ 28min :90% A;流速:0.2mL/min,进样体积 2 μL;可在 19min 内实现九种合成着色剂的良好分离。

[0046] 串联质谱条件是正离子模式电离,离子源采用电喷雾电离源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测模式(MRM);电喷雾电压:500V;干燥气温度:325℃;干燥气流量:6L/min;鞘气温度:380℃;鞘气流量:10L/min;毛细管电压:4000V。

[0047] 九种合成着色剂的准分子离子峰([M+H]⁺离子峰)、锥孔电压、定量离子、定性离子、碰撞能量(CE)参见表 1,九种合成着色剂标准品总离子流图和各定量离子 MRM 图见图 1 至图 10。

[0048] 表 1 各化合物的 [M+H]⁺ 离子峰、锥孔电压、定量离子、定性离子、碰撞能量

[0049]

化合物	[M+H] ⁺ 离子峰	锥孔电压(V)	定量离子(碰撞能量)	定性离子(碰撞能量)
柠檬黄	469	112	451.1 (9)	200.0 (25)
苋菜红	539	142	348.2 (29)	223.1 (21)
靛蓝	423	150	342.1 (33)	313.0 (20)
胭脂红	539	140	158.2 (33)	223.1 (25)
日落黄	409	102	173.1 (25)	236.1 (17)
诱惑红	453	97	217.0 (17)	202.0 (40)
亮蓝	749	170	458.2 (40)	306.0 (40)
酸性红	559	170	515.1 (40)	529.2 (40)
赤藓红	835.5	170	583.0 (40)	328.8 (35)

[0050] (5) 绘制标准曲线及计算结果:分别吸取步骤(2)制备的不同浓度标准工作溶液进行 LC-MS/MS 分析,在步骤(4)确定的仪器参数下,以九种合成着色剂定量离子峰面积对其所对应的质量浓度进行线性回归,得到各目标化合物的标准工作曲线;再分别吸取步骤(3)制备的样品溶液进行 LC-MS/MS 分析,在步骤(4)确定的仪器参数下,得到九种合成着色

剂定量离子峰面积,代入回归方程,计算得到样品溶液中九种合成着色剂浓度。

[0051] 对本发明方法做如下方法学验证:用3倍和10倍噪音值分别计算该方法的检测限和定量限。所得的相关数据见表2。

[0052] 表2九种合成着色剂的线性方程、相关系数、检测限、定量限

[0053]

化合物	线性方程	相关系数	检测限 ($\mu\text{g/g}$)	定量限 ($\mu\text{g/g}$)
柠檬黄	$y = 11860x + 10.01$	0.9998	0.12	0.36
苋菜红	$y = 15628x - 106.76$	0.9998	0.10	0.30
靛蓝	$y = 5934.7x - 61.22$	0.9989	0.10	0.30

[0054]

胭脂红	$y = 11871x - 147.17$	0.9998	0.08	0.24
日落黄	$y = 8704.9x + 11.84$	0.9998	0.12	0.36
诱惑红	$y = 42185x - 316.5$	0.9993	0.08	0.24
亮蓝	$y = 2673.3x - 84.29$	0.9996	0.12	0.36
酸性红	$y = 51134x - 796.35$	0.9998	0.07	0.20
赤藓红	$y = 1102.6x + 527.80$	0.9965	0.12	0.36

[0055] 选择某一再造烟叶涂布液样品,经前处理后检测结果为不含有九种合成着色剂,因此作为空白样品,然后分别添加高、中、低三个含量水平(0.50 $\mu\text{g/g}$, 1.50 $\mu\text{g/g}$, 5.00 $\mu\text{g/g}$)的九种合成着色剂混合标准母液进行加标回收实验,计算回收率;同时进行该方法的日内精密度和日间精密度测定,用测定结果的相对标准偏差(RSD)表示,见表3。

[0056] 表3九种合成着色剂的日内精密度、日间精密度、回收率

[0057]

化合物	日内精密度 (RSD, n = 6)	日间精密度 (RSD, n = 3)	回收率
柠檬黄	3.43%	4.76%	90.34%~106.43%
苋菜红	3.13%	4.93%	91.16%~99.40%
靛蓝	4.31%	5.02%	91.04%~105.65%
胭脂红	2.37%	2.97%	92.13%~96.93%
日落黄	2.86%	3.03%	93.50%~102.33%

诱惑红	1.90%	3.39%	93.10%~99.57%
亮蓝	5.79%	5.04%	88.54%~108.43%
酸性红	2.44%	3.32%	95.02%~95.18%
赤藓红	6.49%	5.48%	89.10%~93.61%

[0058] 样品测定:从待测样品的总离子流图(图 11)和 MRM 图(图 12、图 13)中可以看到样品在 1.623min 和 8.343min 处有一色谱峰与日落黄和柠檬黄的保留时间相近,样品在 $M/Z = 451.1$ 处的特征分子离子峰,与日落黄的特征分子离子峰相同,样品在 $M/Z = 173.1$ 处的特征分子离子峰,与柠檬黄的特征分子离子峰相同,可确定样品中含日落黄和柠檬黄。由于浓度较高,超出了工作曲线范围,稀释 10 倍后再进行定量。

[0059] 将稀释样品中日落黄和柠檬黄的峰面积代入线性回归方程中,即可得到样品中日落黄和柠檬黄的浓度为 $1.230 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.973 \mu\text{g/mL}$,再乘以稀释倍数和定容体积,除以称重量,得到:该涂布液含有日落黄 $123.0 \mu\text{g/g}$,柠檬黄 $97.3 \mu\text{g/g}$ 。

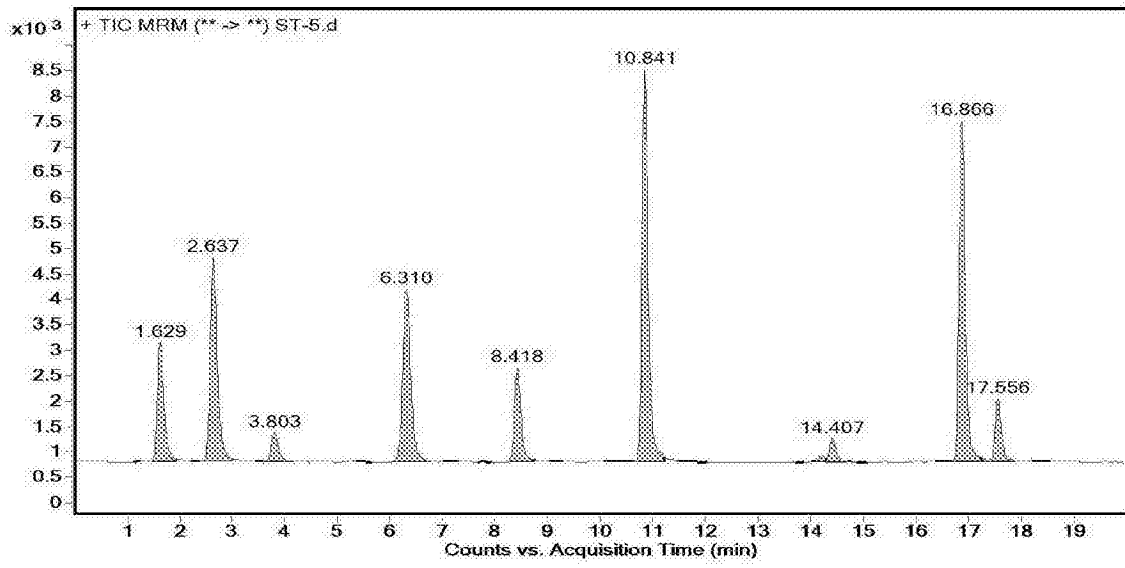


图 1

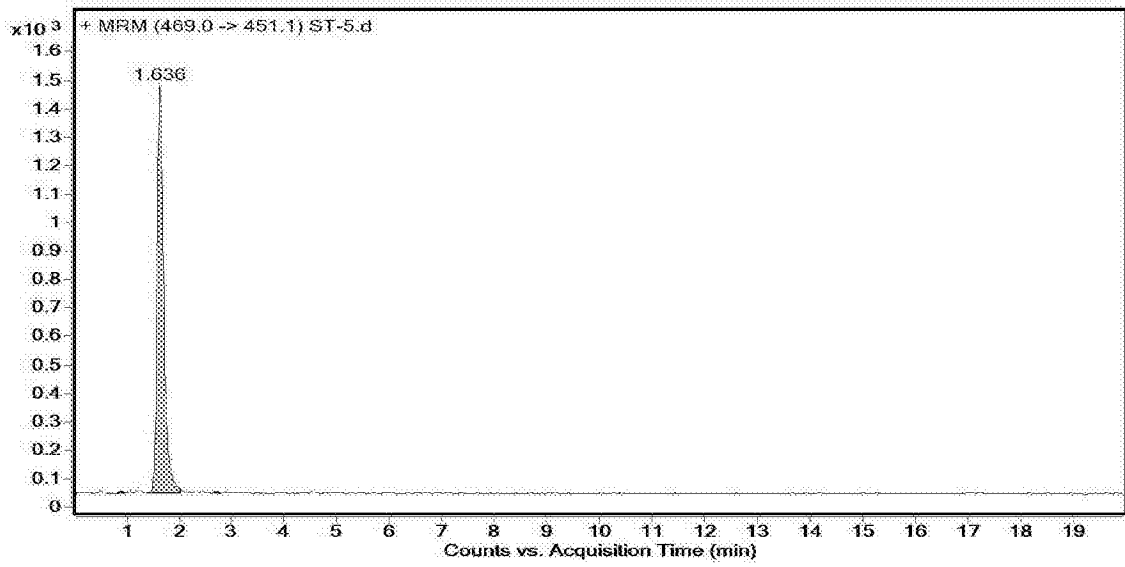


图 2

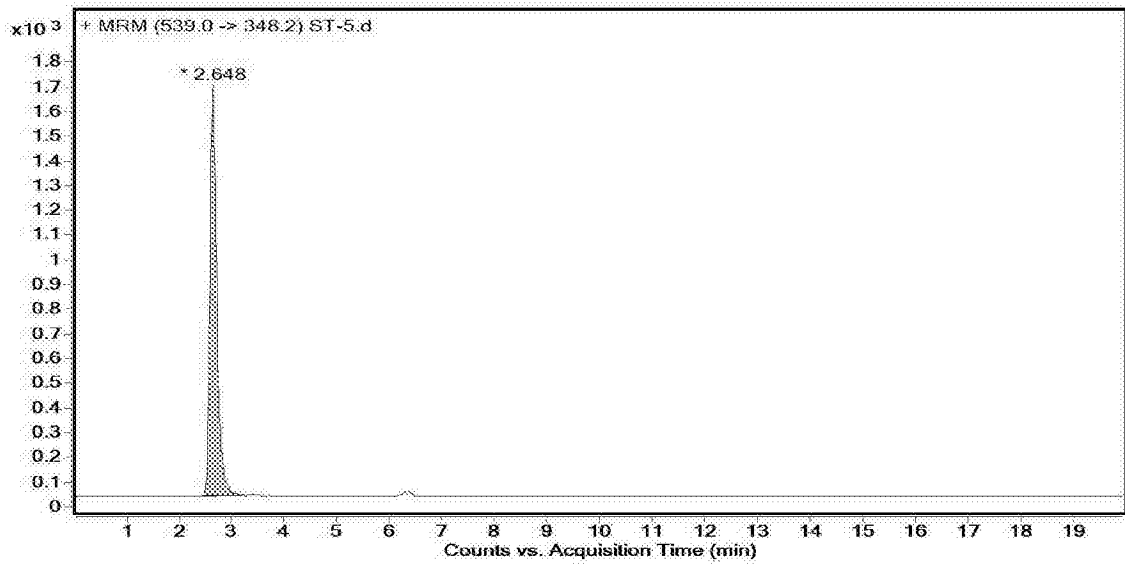


图 3

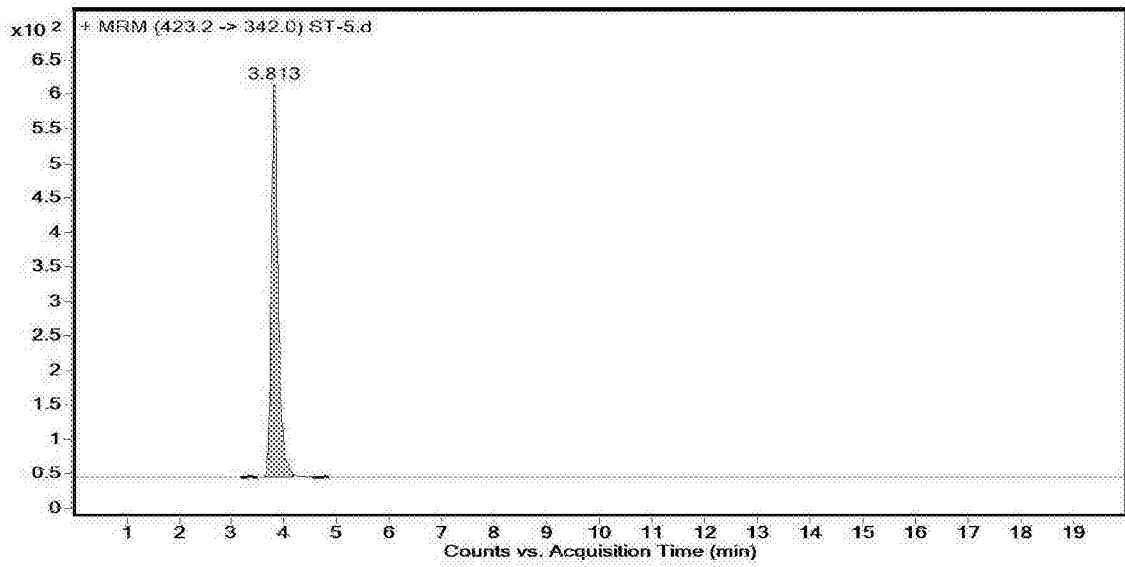


图 4

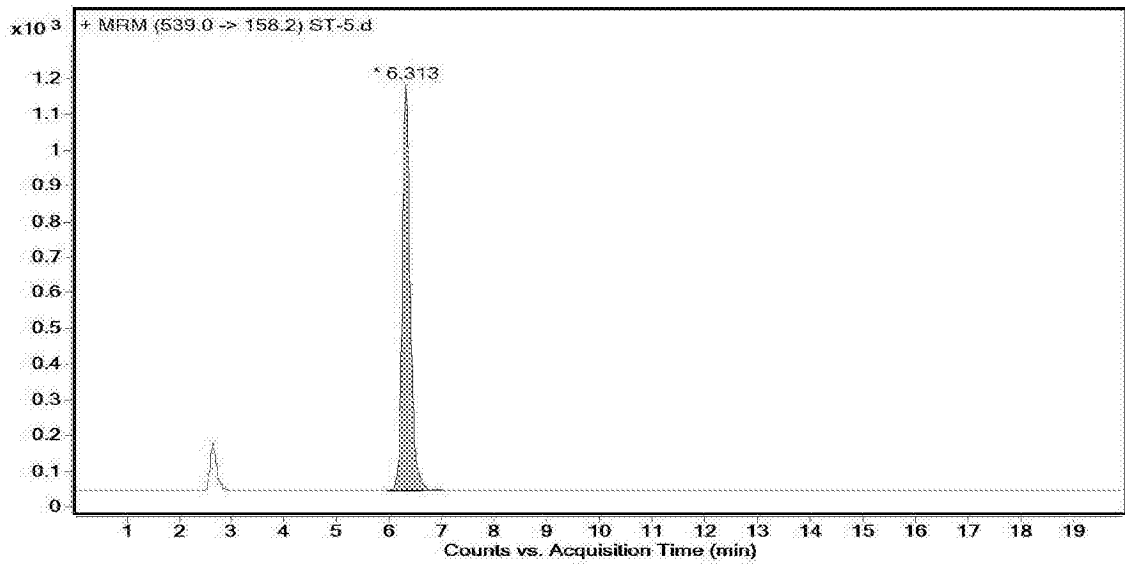


图 5

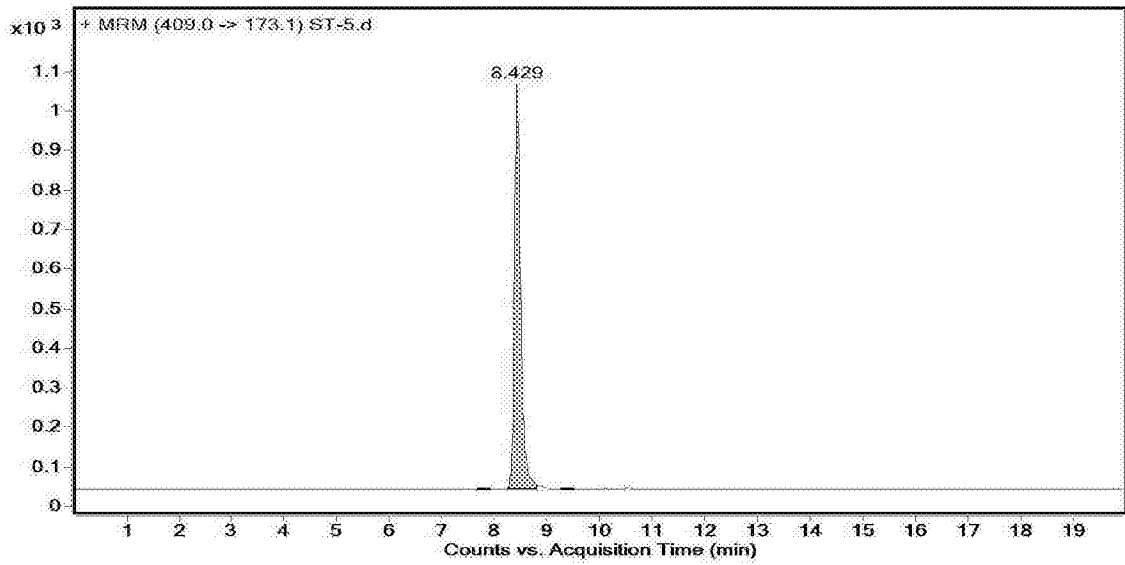


图 6

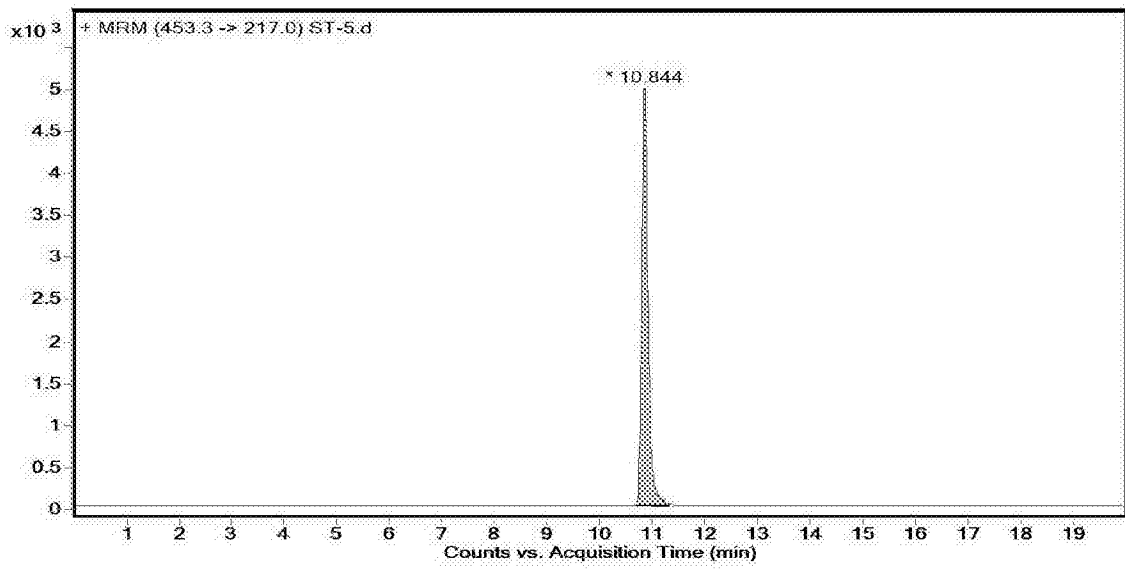


图 7

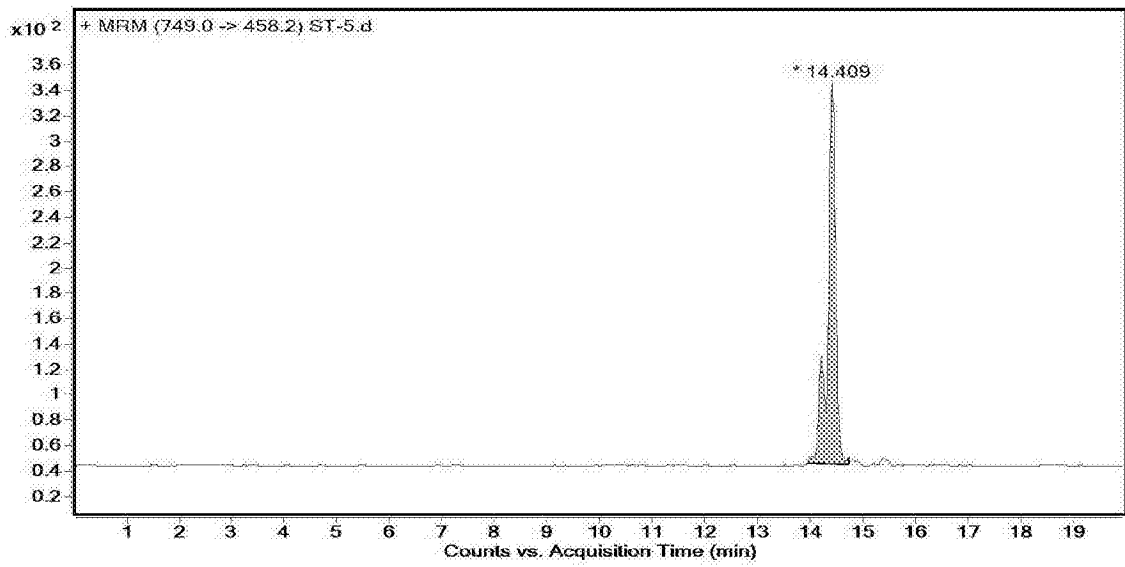


图 8

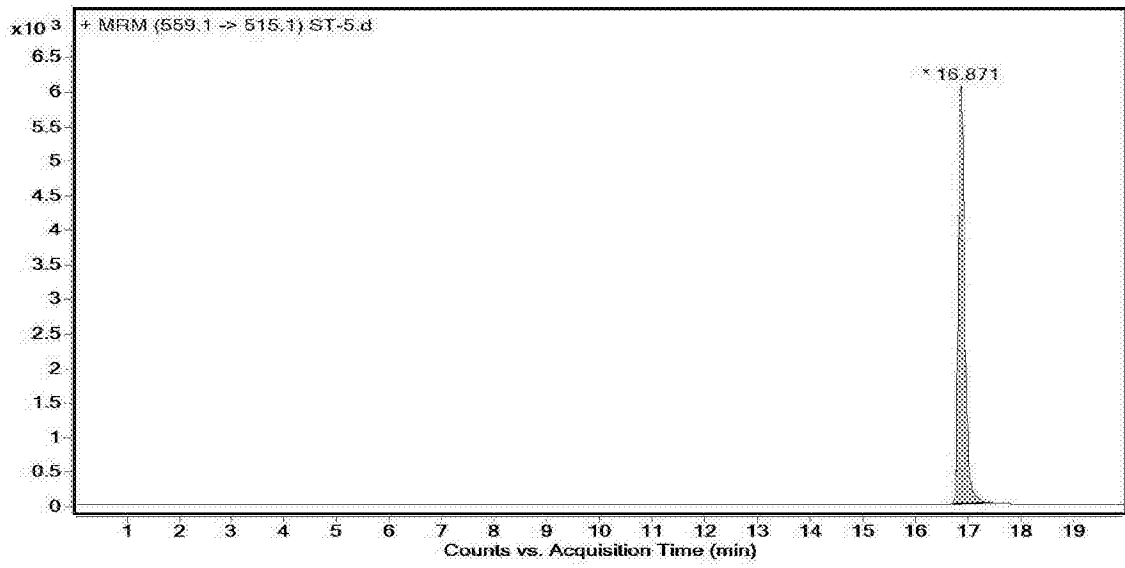


图 9

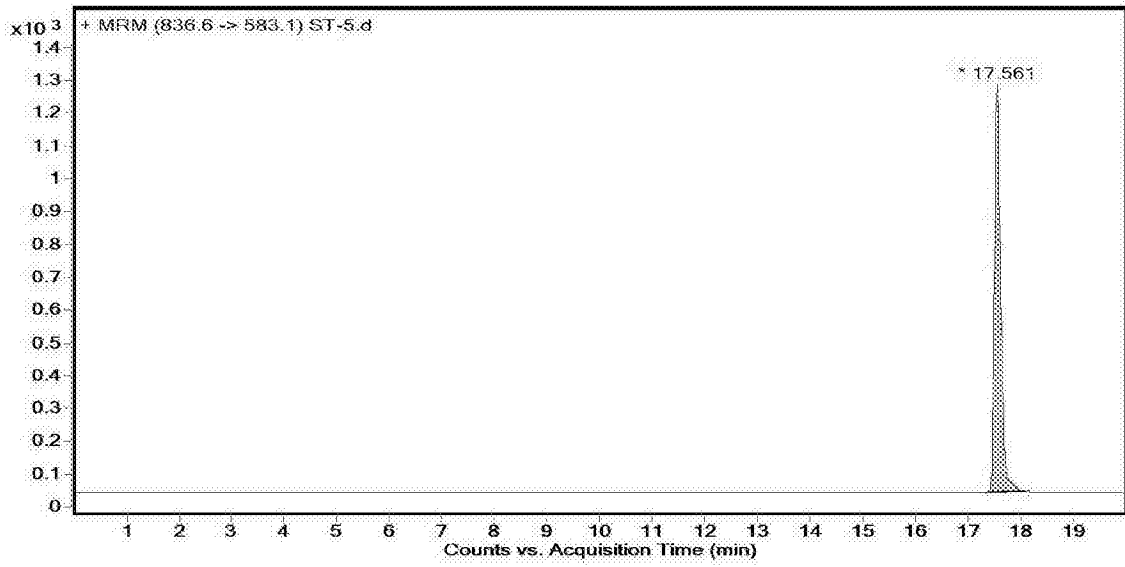


图 10

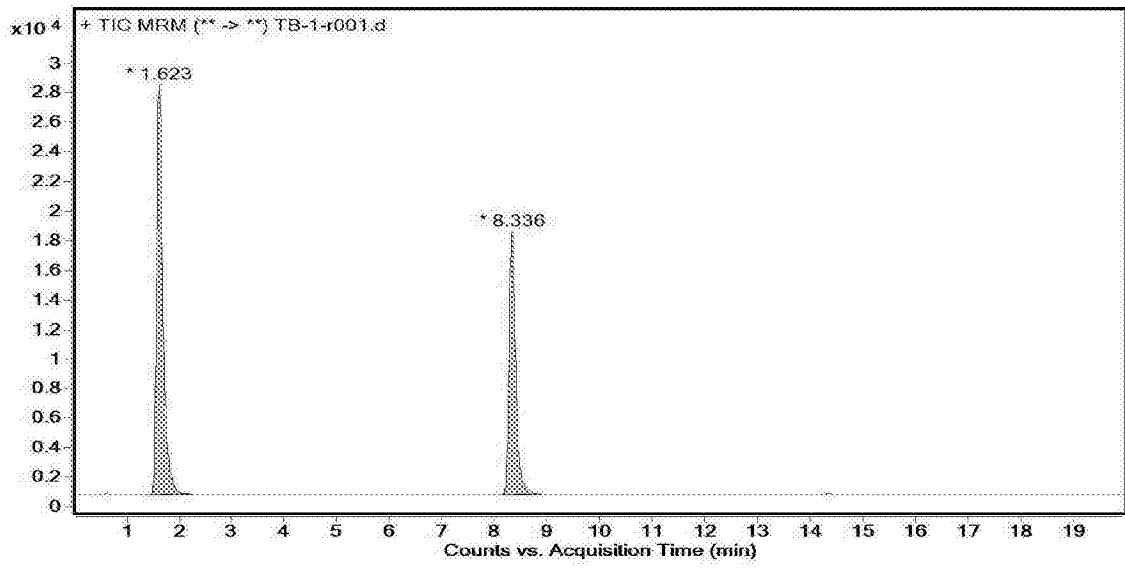


图 11

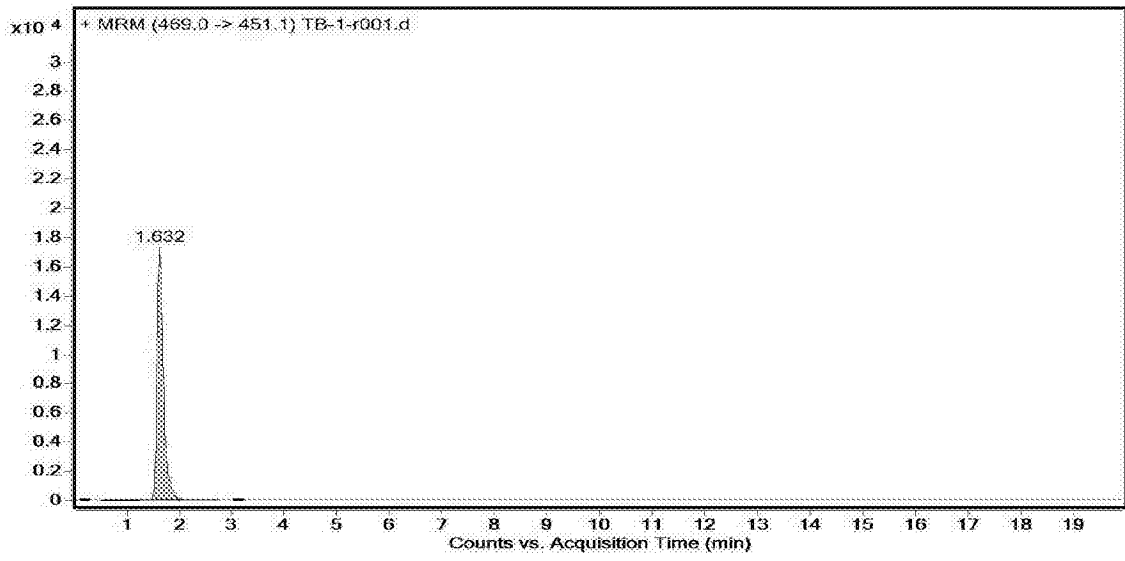


图 12

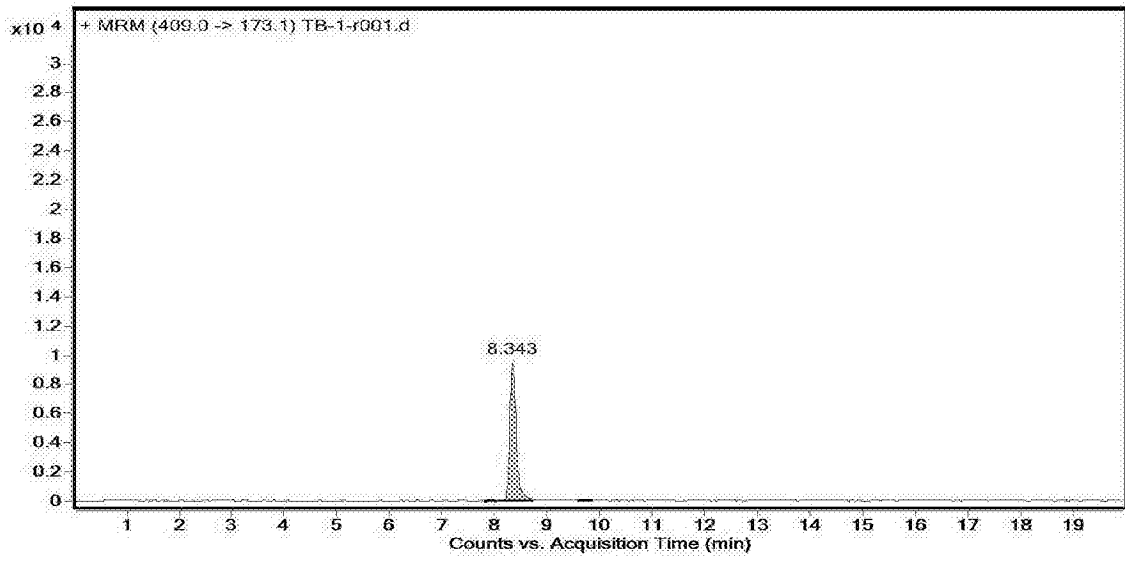


图 13