



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108535387 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810768439.7

(22)申请日 2018.07.13

(71)申请人 国家烟草质量监督检验中心

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

(72)发明人 邓惠敏 刘珊珊 范子彦 金静静 杨飞 李中皓 卢鹏 王颖 边照阳 唐纲岭

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司 41110

代理人 姜振东

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

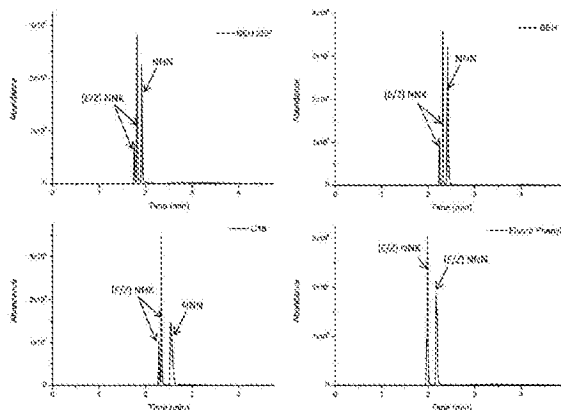
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种烟草中NNK和NNN的合相色谱串联质谱测定方法

(57)摘要

本发明涉及一种烟草中4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)和N-亚硝基降烟碱(NNN)的合相色谱串联质谱的测定方法,属于烟草化学分析领域。本发明采用含0.5%醋酸的甲醇溶液对烟草样品中的NNK和NNN进行提取,提取液过滤后,使用UPC²-MS/MS对提取液中NNK和NNN的浓度进行分析和定量。该方法的样品前处理过程简单、快速,便于批量严工的分析。且在以合相色谱串联质谱进行检测时,所用到的主要流动相为超临界流体CO₂,助溶剂使用极少量的甲醇,具有环境友好的优点。本检测方法对NNK的检出限为0.05ng/mL,定量限为0.18ng/mL,对NNN的检出限为0.04ng/mL,定量限为0.12ng/mL。该方法灵敏度高,重复性好,适用于烟草样品中NNK和NNN的同时测定。



1. 一种烟草中4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)和N-亚硝基降烟碱(NNN)的合相色谱串联质谱测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)称取1~2g烟末样品,加入100~200 μ L 1 μ g/mL的混合氘代内标NNK-d4和NNN-d4溶液,加入25~50mL含0.5%醋酸的甲醇溶液,超声提取后过滤,得到待测溶液;

(2)取待测溶液进行超高效合相色谱串联质谱(UPC²-MS/MS)分析,分析条件如下:

色谱条件:采用ACQUITY UPC²™ CSH™ Fluoro Phenyl色谱柱,规格100mm \times 3.0mm, 1.7 μ m,柱温:10 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L;流动相A:CO₂,流动相B:甲醇;流速:1mL/min;背压:2000psi;补偿溶剂:含0.1%甲酸的甲醇溶液;流速:0.3mL/min;洗脱梯度如表1所示:

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	CO ₂	甲醇
0.0	99	1
3.0	75	25
3.5	75	25
3.6	65	35
4.3	65	35
4.4	99	1
5.0	99	1

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,源温度:150 $^{\circ}$ C;毛细管电压:4.5kV;去溶剂气温度:350 $^{\circ}$ C;去溶剂气流速:800 L/h;反吹气流速:50L/h;多反应监测模式(MRM),详细参数见表2:

表2. NNK和NNN及其氘代内标(NNK-d4和NNN-d4)的MRM参数

化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能 (V)
NNK	1.65	208.00	121.91*	24	12
			106.03	24	22
NNK-d4	1.65	212.22	126.13*	28	10
			110.22	28	20
NNN	1.79	177.99	148.01*	26	10
			119.96	26	16
NNN-d4	1.79	182.08	152.04*	30	10
			123.99	30	18

注：*为定量离子；

(3) 采用内标标准曲线法定量计算样品中NNK和NNN的含量。

2. 根据权利要求1所述的测定方法,其特征在于:步骤(1)中超声提取的功率为100W,频率为40KHz,提取时间30~60min。

3. 根据权利要求1所述的测定方法,其特征在于:步骤(1)中过滤采用0.22 μ m的有机相滤膜。

4. 根据权利要求1所述的测定方法,其特征在于:步骤(3)中内标标准曲线法为:配制含NNK和NNN目标物的系列标准工作溶液,加入相应的氘代内标NNK-d4和NNN-d4,以各标准工作溶液中目标物与相应氘代内标的定量离子峰面积的比值为纵坐标,以各标准工作溶液中目标物的含量为纵坐标,制作标准工作曲线;将步骤(2)的分析结果代入标准曲线中,得到待测溶液中目标物的含量;再进一步计算得到样品中NNK和NNN的含量。

5. 根据权利要求4所述的测定方法,其特征在于:在系列标准工作溶液中,NNN的浓度分别为20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL,NNK的浓度分别为2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。

一种烟草中NNK和NNN的合相色谱串联质谱测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种烟草中4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)和N-亚硝基降烟碱(NNN)的合相色谱串联质谱的测定方法,属于烟草化学分析领域。

背景技术

[0002] 烟草特有亚硝胺是烟草特有化合物,目前人们关注较多的是4种含量较高的亚硝胺,即4-(甲基亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK),N-亚硝基降烟碱(NNN),N-亚硝基假木贼碱(NAB)和N-亚硝基新烟草碱(NAT)。其中,NNK和NNN被国家癌症研究机构(IARC)列为1类致癌物(对人具有致癌性),NAB和NAT被列为3类致癌物(可疑致癌物)。此外,鉴于NNK和NNN的致癌性,由美国食品药品监督管理局(FDA)于2012年发布的烟草制品及烟气有害及潜在有害成分清单中,NNK和NNN被列入其中,作为烟草制品及烟气有害成分管控和披露指标。因此,对于烟草中NNK和NNN的测定将为烟草产品有害成分管控及其健康风险评估提供技术支持。

[0003] 目前NNK和NNN的测定方法主要包括气相色谱法、气相色谱质谱法、液相色谱法和液相色谱串联质谱法,关于NNK和NNN测定的合相色谱或合相色谱串联质谱法均未见报道。合相色谱串联质谱其实质是基于超临界流体色谱的一种色谱技术。近年来,随着超临界流体色谱仪器上重大改善,使得其有了更广泛的应用空间,也引起了越来越多科研工作者的关注。鉴于合相色谱同样采用无毒、不易燃且不污染环境的超临界流体CO₂作为主要流动相,是一种真正的绿色环保技术,相比于液相色谱和气相色谱有很多突出优势,对于结构类似物、异构体、对映体和非对映异构体具有很好的分离度和选择性,且结合串联质谱检测器的使用,使得检测的灵敏度进一步提高。

[0004] 本发明旨在根据烟草样品的特点,通过合相色谱串联质谱法对烟草样品中的NNK和NNN进行分离分析和定量检测,方法快速且灵敏度高,将为NNK和NNN的测定提供潜在的高通量检测技术支持。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种烟草样品中NNK和NNN测定的合相色谱串联质谱(UPC²-MSMS)快速分析方法,采用酸化甲醇溶液对烟草样品中的NNK和NNN进行提取,提取液经有机相滤膜过滤后,使用UPC²-MSMS对提取液中的NNK和NNN进行分离和定量检测。本方法的样品前处理简单、环保且分析时间短,适用于烟草中NNK和NNN的检测。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

烟草中NNK和NNN的测定方法,包括以下步骤:

(1)称取1~2g烟末样品,加入100~200 μ L 1 μ g/mL的混合氘代内标(NNK-d₄和NNN-d₄)溶液,加入25~50mL含0.5%(v/v)醋酸的甲醇溶液,超声提取后过滤,得到待测溶液;

(2)取待测溶液进行超高效合相色谱串联质谱(UPC²-MS/MS)分析,分析条件如下:

色谱条件:采用ACQUITY UPC²™ CSH™ Fluoro Phenyl色谱柱,规格100mm \times 3.0mm,

1.7 μ m,柱温:10 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L;流动相A:CO₂,流动相B:甲醇;流速:1mL/min;背压:2000psi;补偿溶剂:含0.1%(v/v)甲酸的甲醇溶液;流速:0.3mL/min;洗脱梯度如表1所示。

表1. 洗脱梯度

时间 (min)	流动相 A (%)		流动相 B (%)	
	CO ₂		甲醇	
0.0	99		1	
3.0	75		25	
3.5	75		25	
3.6	65		35	
4.3	65		35	
4.4	99		1	
5.0	99		1	

[0007] 质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,源温度:150 $^{\circ}$ C;毛细管电压:4.5kV;去溶剂气温度:350 $^{\circ}$ C;去溶剂气流速:800 L/h;反吹气流速:50L/h;多反应监测模式(MRM),详细参数见表2。

[0008]

表2. NNK 和 NNN 及其氘代内标 (NNK-d4 和 NNN-d4) 的 MRM 参数

化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能 (V)
NNK	1.65	208.00	121.91*	24	12
			106.03	24	22
NNK-d4	1.65	212.22	126.13*	28	10
			110.22	28	20
NNN	1.79	177.99	148.01*	26	10
			119.96	26	16
NNN-d4	1.79	182.08	152.04*	30	10
			123.99	30	18

注: *为定量离子;

[0009] (3) 采用内标标准曲线法定量计算样品中NNK和NNN的含量。

[0010] 步骤(1)中超声提取的功率为100W,频率为40KHz,提取时间30~60min。

[0011] 步骤(1)中过滤采用0.22 μ m的有机相滤膜。

[0012] 步骤(3)中内标标准曲线法为:配制含NNK和NNN目标物的系列标准工作溶液,加入相应的氘代内标NNK-d4和NNN-d4,以各标准工作溶液中目标物与相应氘代内标的定量离子峰面积的比值为纵坐标,以各标准工作溶液中目标物的含量为纵坐标,制作标准工作曲线;将步骤(2)的分析结果代入标准曲线中,得到待测溶液中目标物的含量;再进一步计算得到样品中NNK和NNN的含量。

[0013] 本发明的有益效果

本发明首次建立了烟草中NNK和NNN两种烟草特有亚硝胺的合相色谱串联质谱测定方法。主要是根据烟草样品的特点,对前处理方法的提取方式、提取溶剂进行了选择与优化,并对影响色谱分离效果的色谱柱的选择进行了优化。该方法的样品前处理过程简单、快速,便于批量样品的分析。且在以合相色谱串联质谱进行检测时,所用到的主要流动相为超临

界流体CO₂,助溶剂使用极少量的甲醇,具有环境友好的优点。本检测方法对NNK的检出限为0.05ng/mL,定量限为0.18ng/mL,对NNN的检出限为0.04ng/mL,定量限为0.12ng/mL。该方法灵敏度高,重复性好,适用于烟草样品中NNK和NNN的同时测定。

附图说明

[0014] 图1为选用不同色谱柱分离效果对比图。

[0015] 图2为标准工作溶液总离子流图。

[0016] 图3为烟草样品提取液中NNK、NNK-d4、NNN、NNN-d4的定量离子提取色谱图。

具体实施方式

[0017] 本发明结合实例做进一步描述,但并不限制本发明。

[0018] 实例1:

(1) 仪器与试剂:

合相色谱串联质谱仪(美国Waters公司);超声仪(KQ-700DB型,昆山市超声仪器有限公司);HY-8调速震荡器(常州国华电器有限公司)。

[0019] NNK和NNN标准品(加拿大Toronto Research Chemicals);甲醇(韩国DUKSAN,色谱纯);醋酸($\geq 99.7\%$,Fisher Scientific)。

[0020] (2) 仪器工作条件:

仪器的色谱条件和质谱条件如前面所述,这里不再重复。

[0021] 其中,色谱条件里色谱柱的选择主要考察了ACQUITY UPC² CSH Fluoro Phenyl色谱柱、ACQUITY UPC² HSS C18色谱柱、ACQUITY UPC² BEH色谱柱和ACQUITY UPC² BEH 2EP色谱柱。不同色谱柱上NNK和NNN标准品的分离结果如图1所示。可见,鉴于合相色谱的优异的分效率,NNK在BEH 2EP、BEH和C18色谱柱上均分裂为两个完全分离的色谱峰,这是由NNK中的-N=O的*E*和*Z*立体异构产生的(*E*)-NNK和(*Z*)-NNK。而在Fluoro Phenyl色谱柱上,均可看到NNK和NNN的*E*和*Z*立体异构现象(肩峰),但未达到分离。因此工作主要关注烟草中NNK和NNN各自的总含量,没有必要区分其*E*和*Z*立体异构体,故最终确认的色谱柱为Fluoro Phenyl色谱柱。

[0022] 此外,为进一步改善NNK和NNN的峰型,在色谱条件中微调了梯度变化的曲线,消除了NNK和NNN的肩峰,最终优化后得到的NNK和NNN的标准工作溶液的总离子流图如图2所示。

[0023] (3) 样品前处理:

称取1g(精确至0.0001g)烟末样品于50mL的具塞三角瓶中,加入200 μ L混合内标溶液,加入25mL体积浓度为0.5%醋酸的甲醇溶液,将三角瓶盖后提取60min。用0.22 μ m水相滤膜对提取液进行过滤得到待测溶液,采用UPC²-MSMS进行测定。

[0024] 其中分别以100W超声提取和以200r/min震荡提取两种方式对样品中NNN和NNK的提取效率进行了考察。比较所测得的提取液中NNK和NNN的峰面积,知100W超声提取效率较高。故最终采用100W超声提取的方式。

[0025] (4) 标准工作溶液配制:

标准工作溶液的配制主要包括NNK、NNK-d4、NNN、NNN-d4单标储备液的配制、NNK和NNN混合标准储备液、NNK-d4和NNN-d4混合内标溶液的配制以及系列标准工作溶液的配制,具

体配制过程如下：

一级单标储备液：以甲醇为溶剂分别配制质量浓度为1mg/mL的NNK、NNK-d4、NNN、NNN-d4单标储备液。

[0026] 二级单标储备液：各移取1mL NNK、NNK-d4、NNN、NNN-d4的一级单标储备液于10mL容量瓶中，以甲醇定容至刻度，得到浓度分别为100μg/mL的NNK、NNK-d4、NNN、NNN-d4二级单标储备液。

[0027] 混标储备液：分别移取1mL100μg/mL的NNN二级单标储备液和0.1mL 100μg/mL的NNK二级单标储备液于10mL容量瓶中，以甲醇定容至刻度，得到一级混标储备液，其中NNN浓度为10μg/mL，NNK浓度为1μg/mL。

[0028] 混合内标溶液：分别移取0.1mL100μg/mL的NNK-d4和NNN-d4二级单标储备液于10mL容量瓶中，以甲醇定容至刻度，得到混合内标溶液，其中NNK-d4和NNN-d4浓度均为1μg/mL。

[0029] 系列标准工作溶液：各移取50μL、125μL、250μL、500μL、1.25mL、2.5mL混标储备液于25mL容量瓶中，各加入200μL混合内标溶液，以甲醇定容至刻度，得到系列标准工作溶液，其中NNN的浓度分别为20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL，NNK的浓度分别为2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。

[0030] (5) 样品测定

将步骤(4)所得系列标准工作溶液进行UPC²-MS/MS分析，以各标准工作溶液中目标物与相应氘代内标的定量离子峰面积的比值为纵坐标，以各标准工作溶液中目标物的含量为纵坐标，制作标准工作曲线；将步骤(2)的分析结果代入标准曲线中，得到待测溶液中目标物的含量；再进一步通过式(1)计算得到样品中NNK和NNN的含量。

$$X_i = \frac{C_i \times V}{m_i} \quad (1)$$

[0031] 其中， X_i 为烟草样品中NNK和NNN的含量，单位为ng/g； C_i 为由标线计算得到的样品猜测溶液中NNK和NNN的含量，单位为ng/mL； V 为样品提取液的体积，25mL； m_i 为所称取的烟草样品质量，1g。

[0032] 根据最低一级标准工作溶液，分别以3倍信噪比和10倍信噪比计算该方法的检出限和定量限。该方法的线性范围、线性方程、检出限和定量限结果如表3所示。

化合物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	R^2	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
[0033] NNK	2-100	$y=0.95899x+11.009$	0.9991	0.05	0.18
NNN	20-500	$y=3.01622x+262.78$	0.9993	0.04	0.13

根据标准工作曲线计算得到白肋烟样品、烤烟样品、香料烟样品中NNK和NNN三次平行测定的NNK和NNN的浓度以及换算至样品中含量的结果如表4所示。该测定结果与文献报道的LC-MSMS方法测定结果的一致性良好。

[0034]

表 4. 三类烟草样品中 NNK 和 NNN 的测定结果

样品类型	化合物	第一次 (ng/mL)	第二次 (ng/mL)	第三次 (ng/mL)	平均浓度 (ng/mL)	平均含量 (ng/g)
白肋烟	NNK	4.7	4.8	5.2	4.9	122.5
	NNN	125.1	121.7	127.2	124.7	3116.7
烤烟	NNK	5.4	5.6	5.1	5.4	134.2
	NNN	10.9	10.0	9.6	10.2	254.2
香料烟	NNK	5.7	5.1	5.2	5.3	133.3
	NNN	21.3	22.5	23.6	22.5	561.7

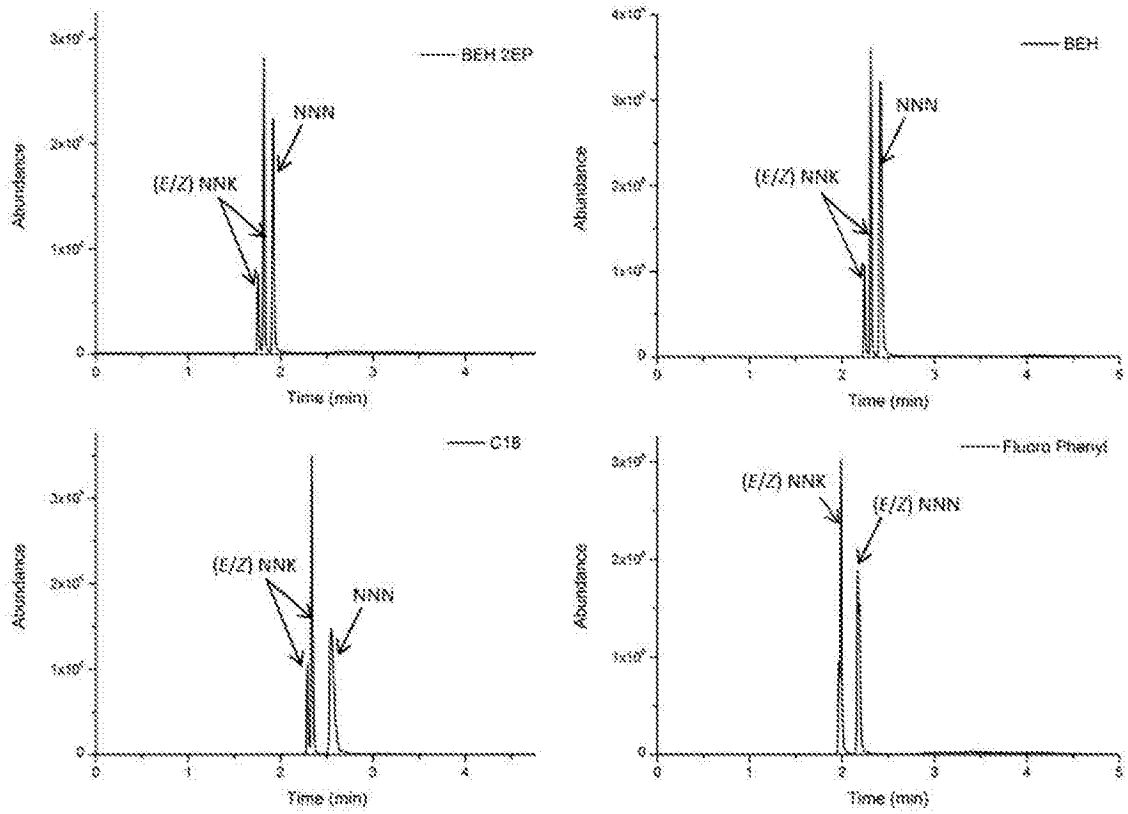


图1

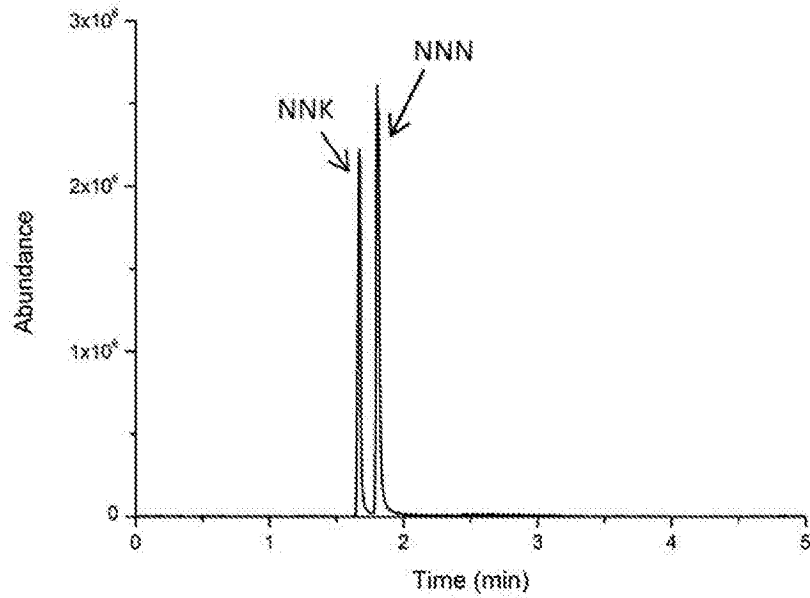


图2

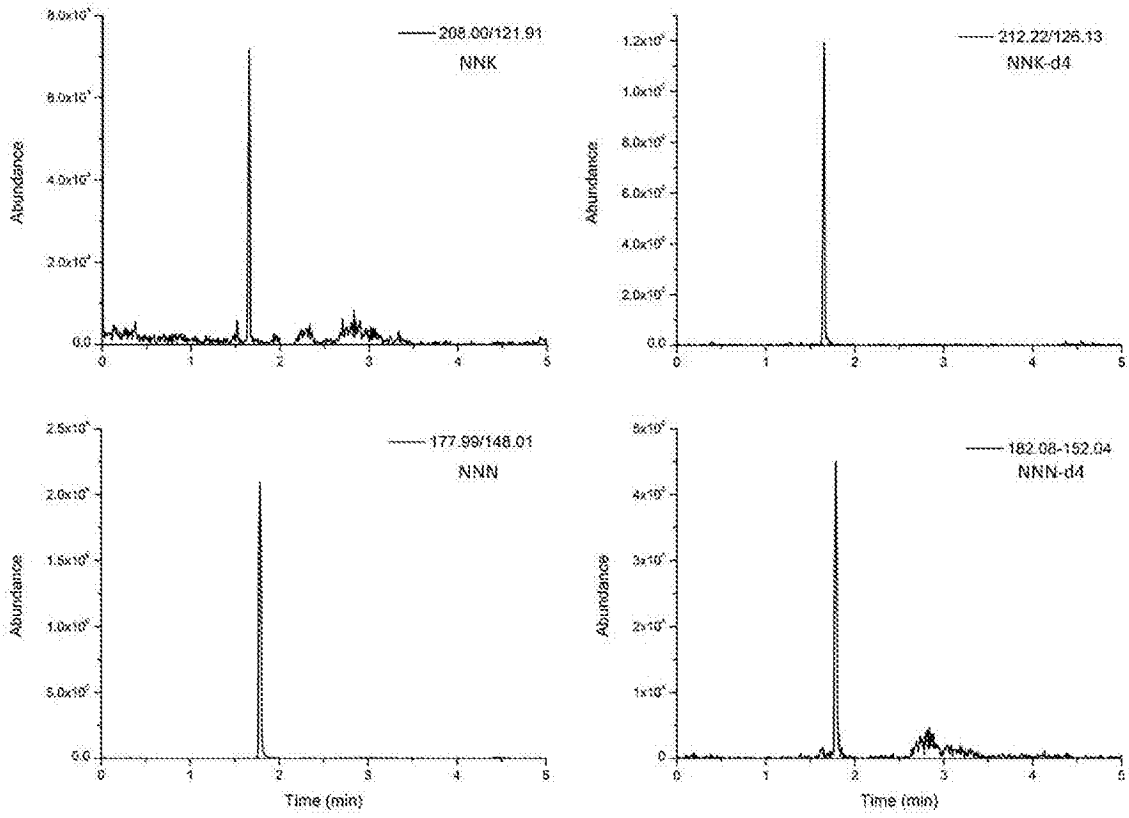


图3