



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106814155 A

(43)申请公布日 2017.06.09

(21)申请号 201710141461.4

(22)申请日 2017.03.10

(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 张洪非 费婷 罗彦波 陈欢  
李翔宇 姜兴益 庞永强 吴达  
戚大伟 朱风鹏 胡少东 付亚宁  
韩书磊

(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 30/06(2006.01)

G01N 30/88(2006.01)

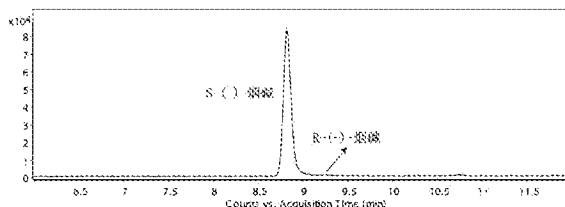
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法

(57)摘要

本发明公开了一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法。其特征在于：将西红柿样品干燥、粉碎和过筛，样品经过氢氧化钠溶液浸润后，采用甲基叔丁基醚和甲醇溶液萃取，萃取液经基质分散固相萃取净化后，使用两根手性柱串联-合相色谱串联质谱法分析，采用峰面积归一化法定量检测西红柿中S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的比例。本方法提供的检测方法，样品萃取净化方法简单高效，可降低样品液对色谱柱的污染，合相色谱串联质谱法检测方法灵敏度高，特异性好，可排除假阳性，分析时间短，能够满足大批量西红柿样品中烟碱的手性分析。



1. 一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法,其特征在于:将西红柿样品干燥、粉碎和过筛,样品经过氢氧化钠溶液浸润后,采用甲基叔丁基醚和甲醇溶液萃取,萃取液经基质分散固相萃取净化后,使用手性柱-合相色谱串联质谱分析,采用峰面积归一化法定量检测西红柿中S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的比例,具体步骤如下:

1). 标准溶液的配制:称取约100.0 mg的S-(-)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配制成浓度约为2.0 mg/mL的S-(-)-烟碱标准储备液;称取约50.0 mg的R-(+)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配制成浓度约为1.0 mg/mL的R-(+)-烟碱标准储备液;利用S-(-)-烟碱标准储备液和R-(+)-烟碱标准储备液稀释配制S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱浓度分别为100  $\mu\text{g/mL}$ 和80  $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液;

2). 西红柿样品的混匀:将西红柿样品置于40  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,1小时后将西红柿取出,使用冷冻干燥机粉碎后过0.45毫米孔径标准筛;

3). 西红柿样品的萃取:称取2 g已粉碎的样品于15 mL具塞离心管中,加入2.0 mL 5%的氢氧化钠溶液,涡旋1 min混匀后静置10 min浸润样品,取10 mL甲基叔丁基醚和甲醇溶液到上述具塞离心管中,并于旋涡混合器上以4000 rpm速度振荡30 min,过滤上清液并氮吹浓缩至2 mL;

4). 萃取液的净化:取1.5 mL萃取上清液于2 mL内含有基质分散固相萃取材料的净化离心管中,于旋涡混合器上以4000 rpm振荡2 min,以10000 rpm离心1 min,取上清液氮吹浓缩至0.3 mL后过0.22  $\mu\text{m}$ 有机相滤膜后进合相色谱串联质谱分析;

5). 串联手性柱-合相色谱串联质谱法条件:分析柱1为Trefoil CEL1柱,柱长 150 mm,内径3.0 mm,固定相粒径2.5  $\mu\text{m}$ ,分析柱2为Chiralcel OD-H液相色谱柱,柱长 250 mm,内径4.6 mm,固定相粒径5  $\mu\text{m}$ ;流动相A为: $\text{CO}_2$ ,流动相B:含0.05%异丙胺的甲醇;流速为1.1 mL/min;梯度洗脱条件为:0.0 min,97% A;0.5 min,97% A;8.0 min,92% A;10.0 min,92% A;10.2 min,97% A;12.0 min,97% A;柱温40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样室温度:10  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积2  $\mu\text{L}$ ;背压:1600 psi;ISM补偿流路流动相为含0.1%甲酸的甲醇,流速为0.3 mL/min,分析时间总计12 min;质谱条件:离子源:电喷雾源,扫描方式为正离子扫描,离子源温度为300  $^{\circ}\text{C}$ ,电喷雾电压为5000 V,雾化气压力为40 psi;检测方式:多反应监测(MRM);通过对峰面积进行归一化定量S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱占总烟碱的比例。

2. 根据权利要求1所述的西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法,其特征在于:步骤3)中甲基叔丁基醚/甲醇溶液的体积比90:10。

3. 根据权利要求1所述的西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法,其特征在于:步骤4)中所述的基质分散固相萃取材料含:150 mg无水硫酸镁,25 mg PSA吸附剂,7.5 mg GCB吸附剂。

## 一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及西红柿化学成分测定方法,具体涉及一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法。

### 背景技术

[0002] 烟碱,也叫尼古丁,是一种存在于茄科植物中的生物碱,也是烟草的重要成分。烟碱分子含有一个手性中心,即四氢吡咯环上的2位碳原子,所以烟碱有两个对映体:S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱。烟碱的两个对映体具有完全不同含量、代谢机理和生理特性。因此需进行西红柿中烟碱的手性分析。

[0003] 目前关于烟碱的手性分析,主要是采用气相色谱法进行研究,例如申请号为201610663534.1的专利《一种卷烟烟丝中烟碱的手性分析方法》,该方法前处理步骤复杂,并且检测时间达到140min,不能满足大量样品的检测,目前尚未有关于西红柿中烟碱的手性分析的方法。因此有必要开发一种灵敏度高、精密度好、适合大批量准确定量西红柿中S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的方法。手性柱-合相色谱串联质谱在异构体分离方面有着明显的优势,因此通过大量实验建立了西红柿中烟碱手性的手性柱-合相色谱串联质谱分析方法,该方法更适合用于大量样品中烟碱的手性分析。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的正是以烟碱为研究对象,对西红柿样品进行了前处理方法研究,建立了串联手性柱-合相色谱串联质谱法检测西红柿中烟碱旋光异构体的分析方法,实现了对西红柿中烟碱旋光对映体S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的准确测定。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:将西红柿样品干燥、粉碎和过筛,样品经过氢氧化钠溶液浸润后,采用甲基叔丁基醚和甲醇溶液萃取,萃取液经基质分散固相萃取净化后,使用串联手性柱-合相色谱串联质谱法分析,采用峰面积归一化法定量检测西红柿中S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的比例。具体步骤如下:

1. 标准溶液的配制:称取约100.0 mg的S-(-)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配制成浓度约为2.0 mg/mL的S-(-)-烟碱标准储备液;称取约50.0 mg的R-(+)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配制成浓度约为1.0 mg/mL的R-(+)-烟碱标准储备液;利用S-(-)-烟碱标准储备液和R-(+)-烟碱标准储备液稀释配制S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱浓度分别为100  $\mu\text{g/mL}$ 和80  $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液。

[0006] 2. 西红柿样品的混匀:将西红柿样品置于40  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,1小时后将西红柿取出,使用冷冻干燥机粉碎后过0.45毫米孔径标准筛。

[0007] 3. 西红柿样品的萃取:称取2 g已粉碎的样品于15 mL具塞离心管中,加入2.0 mL 5%的氢氧化钠溶液,涡旋1 min混匀后静置10 min浸润样品。取10 mL甲基叔丁基醚和甲醇(90:10,V/V)溶液到离心管中,并于旋涡混合器上以4000 rpm速度振荡30 min,过滤上清液并氮吹浓缩至2 mL。

[0008] 4. 萃取液的净化:取1.5 mL浓缩液于2 mL净化离心管中(内含150 mg无水硫酸镁,25 mg PSA吸附剂,7.5 mg GCB吸附剂,统称基质分散固相萃取材料),于旋涡混合器上以4000 rpm振荡2 min,以10000 rpm离心1 min。取上清液氮吹浓缩至0.3 mL后过0.22  $\mu\text{m}$ 有机相滤膜后进合相色谱串联质谱分析。

[0009] 5. 串联手性柱-合相色谱串联质谱法条件:分析柱1为Trefoil CEL1柱(柱长 150 mm,内径3.0 mm,固定相粒径2.5  $\mu\text{m}$ ),分析柱2为Chiralcel OD-H液相色谱柱(柱长 250 mm,内径4.6 mm,固定相粒径5  $\mu\text{m}$ );流动相A为:CO<sub>2</sub>,流动相B:含0.05%异丙胺的甲醇;流速为1.1 mL/min;梯度洗脱条件为:0.0 min,97% A;0.5 min,97% A;8.0 min,92% A;10.0 min,92% A;10.2 min,97% A;12.0 min,97% A。柱温40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样室温度:10  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积2  $\mu\text{L}$ ;背压:1600 psi;ISM补偿流路流动相为含0.1%甲酸的甲醇,流速为0.3 mL/min。分析时间总计12 min。质谱条件:离子源:电喷雾源,扫描方式为正离子扫描,离子源温度为300  $^{\circ}\text{C}$ ,电喷雾电压为5000 V,雾化气压力为40 psi;检测方式:多反应监测(MRM);MRM参数见下表。通过对峰面积进行归一化定量S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱占总烟碱的比例。

目标物	定量离子对				定性离子对			
	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压 (V)	碰撞能 量 (eV)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压 (V)	碰撞能 量 (eV)
S-(-)-烟碱	163	80	100	25	163	130	100	20
R-(+)-烟碱	163	80	100	25	163	130	100	20

[0010] 本发明提供了一种西红柿中烟碱的手性分析合相色谱串联质谱法,具有以下优良效果:可降低样品液对色谱柱的污染,合相色谱串联质谱法检测方法灵敏度高,特异性好,可避免假阳性,分析时间短,能实现对S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱的基线分离,R-(+)-烟碱的检出限(LOD)为0.04%,能够满足大批量西红柿样品中烟碱的手性分析。

[0011]

## 附图说明

[0012] 图1为混合标准溶液的色谱图,

图2为西红柿样品的色谱图。

## 具体实施方式

[0013] 本发明通过以下具体实施例作进一步描述,但不限制本发明。

[0014] 1. 仪器和试剂

ACQUITY UPC2超高效合相色谱仪(美国Waters公司),6410B三重串联四级杆质谱仪(美国Agilent公司),AE163电子天平(感量:0.0001 g,瑞士Mettler公司),高速粉碎机(武汉银彩科技有限公司),美国ColeparmerVortex-Genie漩涡振荡器,德国SIGMA 3-30K-高速台式冷冻型离心机。甲基叔丁基醚(色谱纯),氢氧化钠(分析纯),甲酸(色谱纯),甲醇(色谱纯),S-(-)-烟碱标准品(CAS:54-11-5),R-(+)-烟碱标准品(CAS:25162-00-9)。

[0015] 2. 标准溶液的配制

称取约100.0 mg的S-(-)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配

制成浓度约为2.0 mg/mL的S-(-)-烟碱标准储备液;称取约50.0 mg的R-(+)-烟碱标准品,用甲醇溶液稀释定容到50 mL棕色容量瓶中,配制成浓度约为1.0 mg/mL的R-(+)-烟碱标准储备液;利用S-(-)-烟碱标准储备液和R-(+)-烟碱标准储备液稀释配制S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱浓度分别为100 µg/mL和80 µg/mL的混合标准溶液。

[0016] 3. 西红柿样品的混匀:将西红柿样品置于40 °C烘箱中,1小时后将西红柿取出,使用冷冻干燥机粉碎后过0.45毫米孔径标准筛。

[0017] 4. 西红柿样品的萃取:称取2 g已粉碎的样品于15 mL具塞离心管中,加入2.0 mL 5%的氢氧化钠溶液,涡旋1 min混匀后静置10 min浸润样品。取10 mL甲基叔丁基醚和甲醇(90:10,V/V)溶液到离心管中,并于旋涡混合器上以4000 rpm速度振荡30 min,过滤上清液并氮吹浓缩至2 mL。

[0018] 5. 萃取液的净化:取1.5 mL浓缩液于2 mL净化离心管中(内含150 mg无水硫酸镁,25 mg PSA吸附剂,7.5 mg GCB吸附剂),于旋涡混合器上以4000 rpm振荡2 min,以10000 rpm离心1 min。取上清液氮吹浓缩至0.3 mL后过0.22 µm有机相滤膜后进合相色谱串联质谱分析。

[0019] 6. 串联手性柱-合相色谱串联质谱法条件:分析柱1为Trefoil CEL1柱(柱长 150 mm,内径3.0 mm,固定相粒径2.5 µm),分析柱2为Chiralcel OD-H液相色谱柱(柱长 250 mm,内径4.6 mm,固定相粒径5 µm);流动相A为:CO<sub>2</sub>,流动相B:含0.05%异丙胺的甲醇;流速为1.1 mL/min;梯度洗脱条件为:0.0 min,97% A;0.5 min,97% A;8.0 min,92% A;10.0 min,92% A;10.2 min,97% A;12.0 min,97% A。柱温40 °C;进样室温度:10 °C;进样体积2 µL;背压:1600 psi;ISM补偿流路流动相为含0.1%甲酸的甲醇,流速为0.3 mL/min。分析时间总计12 min。质谱条件:离子源:电喷雾源,扫描方式为正离子扫描,离子源温度为300 °C,电喷雾电压为5000 V,雾化气压力为40 psi;检测方式:多反应监测(MRM);MRM参数见下表。通过对峰面积进行归一化定量S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱占总烟碱的比例。

目标物	定量离子对				定性离子对			
	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压(V)	碰撞能 (eV)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压(V)	碰撞能 (eV)
S-(-)-烟碱	163	80	100	25	163	130	100	20
R-(+)-烟碱	163	80	100	25	163	130	100	20

#### [0020] 7. R-(+)-烟碱的检出限

烟碱的手性组成通常以R-(+)-烟碱占总烟碱的百分比来表示。为评估R-(+)-烟碱的检出限,本发明方法在S-(-)-烟碱的标准溶液中加入R-(+)-烟碱的标准溶液。结果表明,S-(-)-烟碱的标准溶液中即可观察到R-(+)-烟碱的响应信号,对定量离子峰面积进行归一化后,S-(-)-烟碱的标准溶液中R-(+)-烟碱的比例为0.04%(峰面积相对于总烟碱峰面积),以此作为本方法R-(+)-烟碱的检出限。

#### [0021] 8. 西红柿样品中烟碱的手性分析实例

将按照上述步骤处理的西红柿样品进行合相色谱串联质谱分析;采用西红柿中烟碱MRM离子进行定性分析,对峰面积进行归一化定量S-(-)-烟碱和R-(+)-烟碱占总烟碱的比例。

[0022] 采用该方法对2个西红柿样品进行了分析,结果见表1。

表1. 西红柿中烟碱的手性分析结果

序号	S-(-)烟碱	R-(+)烟碱
西红柿 1#	96.75%	3.25%
西红柿 2#	96.32%	3.68%

[0023] 9. 分析方法的精密度

取同一西红柿样品进行5次日内和日间平行测定,考察了本发明方法的精密度,结果见表2和表3。结果表明,西红柿样品中R-(+)-烟碱的日内和日间测定结果的变异系数分别为2.52%和2.28%,精密度较好。

表2. 实验方法的日内精密度

样品	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	标准偏差	RSD (%)
西红柿 1#	3.33%	3.41%	3.42%	3.35%	3.24%	3.22%	3.33%	2.52%

表3. 实验方法的日间精密度

样品	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均值	标准偏差	RSD (%)
西红柿 1#	3.46%	3.32%	3.44%	3.29%	3.28%	3.35%	3.36%	2.28%

[0024] 采用具体实施方式中的方法对上述2个西红柿样品进行了检测。检测得到的色谱图如图1和图2所示。

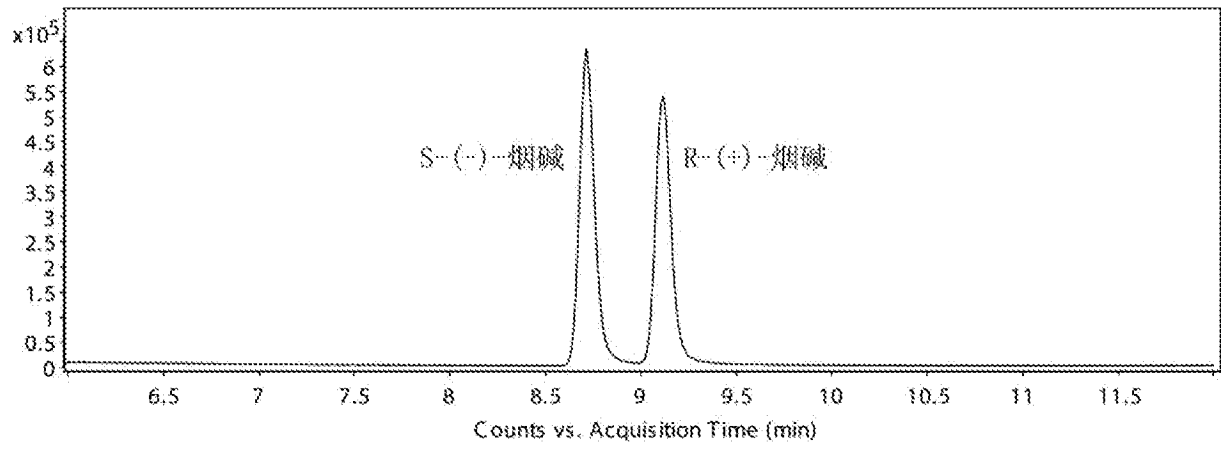


图1

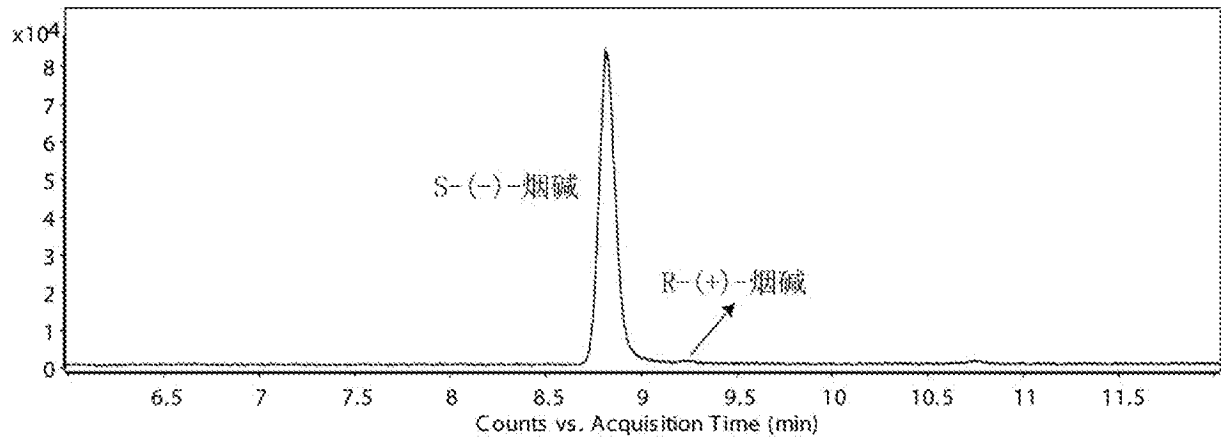


图2