

UPLC - MS/MS 对卷烟烟气中 4 种烟草 特有亚硝胺的快速测定

朱文静^{1,2}, 杨 俊^{1,2}, 刘百战², 苏庆德¹, 陆怡峰², 周宛虹²

(1. 中国科学技术大学 烟草与健康研究中心, 安徽 合肥 230052; 2 上海烟草 (集团)
公司技术中心 烟草行业卷烟烟气重点实验室, 上海 200082)

摘 要: 建立了卷烟主流烟气中烟草特有亚硝胺的超高效液相色谱 - 电喷雾串联质谱 (UPLC - MS/MS) 测定方法。在标准吸烟条件下, 采用剑桥滤片收集卷烟烟气颗粒物, 用醋酸铵缓冲液提取颗粒物, 经固相萃取净化后, 以电喷雾正离子多反应监测方式, 实现了烟气中 N-亚硝基降烟碱、4-甲基亚硝基吡啶基丁酮、N-亚硝基新烟草碱和 N-亚硝基假木贼碱的基线分离和快速测定。4 种烟草特有亚硝胺在 0 ~ 400 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好线性, 相关系数大于 0.998, 定量下限为 0.08 ~ 0.15 $\mu\text{g/L}$, 加标回收率为 72% ~ 104%, 相对标准偏差为 3.8% ~ 9.7%。该方法灵敏、快速、准确, 适用于卷烟烟气中烟草特有亚硝胺的测定。

关键词: 超高效液相色谱 - 串联质谱; 烟草特有亚硝胺; 卷烟烟气; 固相萃取

中图分类号: O657.63; TQ226.37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2010)01 - 0026 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1004 - 4957.2010.01.006

Rapid Determination of 4 Tobacco-specific Nitrosamines in Mainstream Cigarette Smoke by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHU Wen-jing^{1,2}, YANG Jun^{1,2}, LIU Bai-zhan², SU Qing-de¹, LU Yi-feng², ZHOU Wan-hong²

(1. Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, China;

2 Key Laboratory of Cigarette Smoke of State Tobacco Monopoly Administration, Technical Center of
Shanghai Tobacco Corporation, Shanghai 200082, China)

Abstract: A specific and sensitive method had been developed to rapidly separate and determine 4 tobacco-specific nitrosamines (TSNAs), including N'-nitrosanonicotine (NNN), 4-(N-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), N'-nitrosanatabine (NAT) and N'-nitrosanabasine (NAB), in mainstream cigarettes smoke by employing ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC - MS/MS). Total particulate matters in mainstream smoke were trapped by Cambridge filter pad under standard smoking condition, extracted by using ammonium acetate buffer as solvent, cleaned up on solid phase extraction (SPE), and then analyzed by UPLC - MS/MS with positive electrospray ionization (ESI) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The super-sonic extraction time, experimental conditions of UPLC and MS were also optimized. Under the optimal conditions, the calibration curves showed good linearity for 4 TSNAs in the concentration ranges of 0 - 400 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficients above 0.998. The limits of quantitation (LOQ) were between 0.08 and 0.15 $\mu\text{g/L}$ ($S/N = 10$), and average recoveries ranged from 72% to 104% with RSDs of 3.8% - 9.7%. The method was sensitive, rapid and accurate, and was suitable for the determination of TSNAs in mainstream cigarette smoke.

Key words: UPLC - MS/MS; tobacco-specific nitrosamines (TSNAs); mainstream cigarette smoke; solid phase extraction

烟草特有亚硝胺 (TSNAs) 是卷烟烟气中诱发癌症的主要活性成分之一, 包括 N-亚硝基降烟碱

收稿日期: 2009 - 09 - 22; 修回日期: 2009 - 12 - 08

基金项目: 烟草行业卷烟烟气重点实验室开放基金资助项目 (SZBCW200900506)

第一作者: 朱文静 (1984 -), 女, 安徽庐江人, 硕士研究生

通讯作者: 杨 俊, Tel: 0551 - 3492065, E-mail: yjun8202@ustc.edu.cn

(NNN)、4-甲基亚硝基吡啶基丁酮 (NNK)、N-亚硝基新烟草碱 (NAT) 和 N-亚硝基假木贼碱 (NAB) 等^[1]。灵长类和啮齿类动物的体内和体外试验研究表明, NNN 和 NNK 在代谢过程中能产生与 DNA 和血红蛋白形成共价加合物的亲电中间体, 引起动物鼻腔、肺、肝、胰等组织癌变^[2]。随着吸烟与健康问题研究的深入, 准确测量卷烟烟气中的 TSNA_s 生成量具有重要意义。

卷烟烟气中 TSNA_s 含量极微, 一般浓度在 ng/支数量级, 同时其背景复杂、干扰严重, 给定量分析带来难度^[3]。目前, 检测烟草及卷烟烟气中 TSNA_s 的分析方法主要有气相色谱-氮磷检测法 (GC-NPD)^[4]、气相色谱-热能分析法 (GC-TEA)^[5]、气相色谱-多级质谱联用法 (GC-MS)^[6] 和液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS/MS)^[7-10] 等。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 一般用于检测 TSNA_s 含量较高的烟叶、烟丝或烟气样品; HPLC-MS/MS 灵敏度高、稳定性好^[11-12], 但常规 HPLC 难以实现 4 种 TSNA_s 的基线分离^[13]。超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 具备高效快速分离和高灵敏度等优点, 已广泛应用于复杂基体中痕量物质的定性定量分析^[14-15]。本文采用 UPLC-MS/MS 测定卷烟烟气颗粒物中的 TSNA_s, 实现了样品中目标化合物的快速检测, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 液相色谱-质谱联用仪, 配有 Agilent 1200 型液相色谱仪和 Agilent 6410 型三重四极杆质谱仪 (美国 Agilent 公司); RM20/CS 吸烟机 (德国 Borgwaldt 公司); 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司); 机械振荡器 (德国 GFL 公司); 自动固相萃取仪 (法国 Gilson 公司); 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); PCX 固相萃取柱 (60 mg/3 mL, Agela 公司); 0.22 μm 滤膜 (北京捷特澳科贸有限公司)。

乙腈 (色谱纯, 美国 Burdick & Jackson 公司); 甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 醋酸、醋酸铵、盐酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氨水 (分析纯, 上海振兴化工二厂有限公司); Millipore 二次去离子水 (18 MΩ·cm); 标准样品 NNN、NNK、NAT、NAB (加拿大 Toronto 公司, 纯度不低于 98%), 分别用乙腈配成 1.0 g/L 的储备液。

1.2 样品前处理

卷烟烟气的捕集按国家标准 GB/T 16450-2004 进行。使用多孔道标准吸烟机抽吸 20 支样品卷烟, 用剑桥滤片截留主流烟气总颗粒物, 然后将剑桥滤片放入 250 mL 具塞三角瓶中, 准确加入 40 mL (100 mmol/L) 醋酸铵水溶液, 在室温下超声提取 40 min。使用甲醇、水、30 mmol/L 盐酸各 3 mL 预先活化 PCX 固相萃取小柱, 将 10 mL 提取液酸化上样至活化后的 PCX 小柱上, 依次以 3 mL 的 50% (体积分数) 甲醇-水溶液淋洗, 3 mL 的 5% (体积分数) 氯化甲醇洗脱后收集洗脱液, 并用甲醇定容至 5 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.3 仪器条件

色谱条件: 分析柱为 Agilent 公司 XDB-C₁₈ 超高压柱 (50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm); 柱温为 50 °C; 流动相为水-甲醇 (体积比 68:32, 含 0.1% 醋酸), 等度洗脱; 流速为 0.4 mL/min; 进样量 10.0 μL; 总分析时间为 8 min。

质谱条件: 电离方式为电喷雾离子化正离子模式 (ESI+); 喷雾电压 3 000 V; 锥孔电压 35 V; 离子源温度 350 °C; 辅助气 N₂ 的流速为 11 L/min; 碰撞室压力 3.27 × 10⁻³ Pa; 多反应监测 (MRM) 模式。4 种化合物优化后的质谱参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

采用 400 μg/L 的 NNN、NNK、NAT、NAB 混合标样在正离子模式下进行母离子全扫描, 确定每种物质 [M+H]⁺ 峰, NNN、NNK、NAT、NAB 的母离子峰 (*m/z*) 分别为 178.1、208.1、190.1 和 192.1 (见表 1)。

表 1 4种亚硝胺优化后的质谱参数
Table 1 Optimized MS parameters of 4 nitrosamines

Analyte	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i>	Fragment energy <i>U</i> /V	Collision energy <i>U</i> /eV	Dwell time <i>t</i> /s
N'-nitrosomycotine (NNN)	178.1	148.1, 120.1	50, 50	5, 12	0.2, 0.2
4-(N-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	208.1	178.1, 122.1	60, 60	4, 8	0.2, 0.2
N'-nitrosoanatabine (NAT)	190.1	160.1, 106.0	60, 60	4, 10	0.2, 0.2
N'-nitrosoanabasine (NAB)	192.1	162.1, 133.0	60, 60	4, 16	0.2, 0.2

将 50 μg/L 的 NNN、NNK、NAT、NAB 单标通过子离子模式优选出合适的碎裂电压和碰撞电压，其优选原则是在碎裂电压和碰撞电压一定的情况下，使定量离子的丰度最大，定性离子的丰度次之。4 种化合物在子离子模式下的质谱图如图 1 所示，碎裂电压和碰撞电压如表 1 所示。其可能的碎裂方式如图 2 所示。

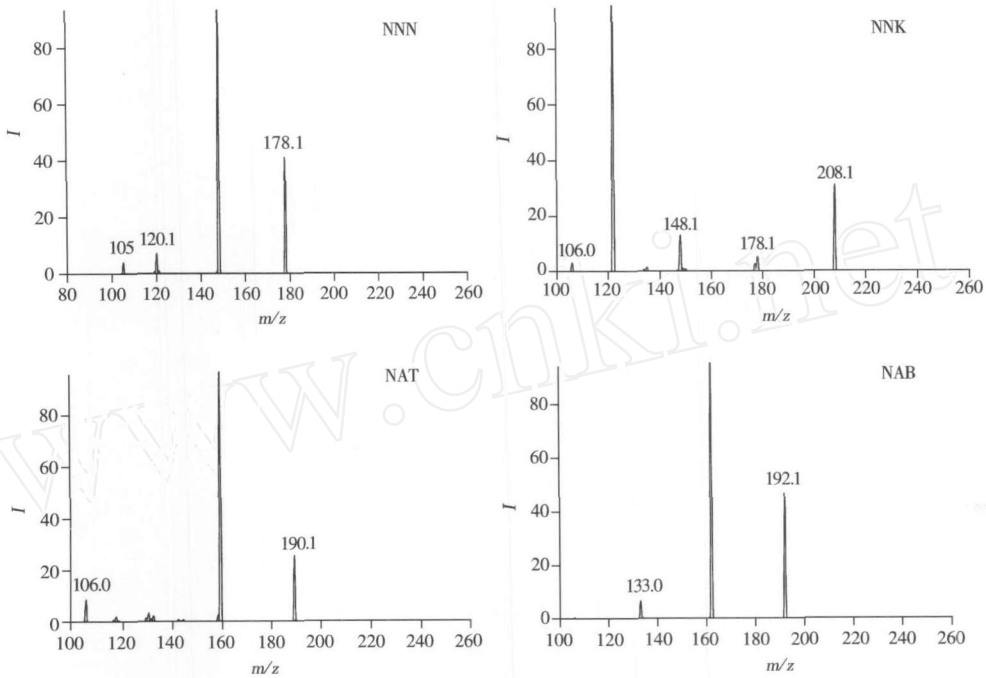


图 1 NNN、NNK、NAT、NAB 的子离子模式质谱图
Fig. 1 Product-ion mass spectra of NNN, NNK, NAT and NAB

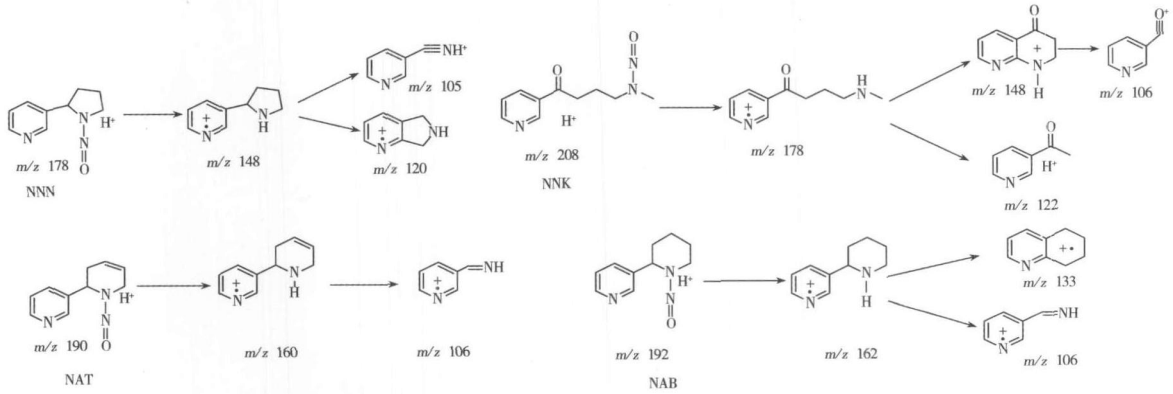


图 2 NNN、NNK、NAT、NAB 可能的碎裂机理
Fig. 2 Possible fragmentation mechanisms for NNN, NNK, NAT and NAB

2.2 超声提取时间的优化

将截留烟气冷凝物的剑桥滤片置于室温下用 40 mL 醋酸铵缓冲液超声萃取，考察萃取时间分别为 20、30、40、60、120 min 时对 TSNA_s测定结果的影响。结果表明，萃取时间为 40 min 时效果最好，

萃取时间为 20 min 时, 由于萃取不完全导致结果偏低, 大于 60 min 后萃取效率明显下降, 原因可能是随着超声时间延长, 水温升高导致萃取出的 TSNA s 发生氧化^[4]。因此, 选择萃取时间为 40 min。

2.3 净化条件的优化

比较了固相萃取小柱 C₁₈柱、碱性氧化铝柱和 PCX 柱对 4 种目标成分的净化效果。C₁₈柱采用水和甲醇活化、水淋洗、甲醇洗脱; 碱性氧化铝柱采用二氯甲烷活化、二氯甲烷 - 丙酮 (体积比 20 : 80) 淋洗、丙酮洗脱; PCX 柱采用水和甲醇及盐酸活化、甲醇 - 水 (50 : 50) 淋洗、氨化甲醇 (体积比 5 : 95) 洗脱。结果表明, 经自动固相萃取仪上样 3 mL 50 μg/L 的混合标样, PCX 柱洗脱后 4 种目标化合物的回收率均超过 96%, 而 C₁₈柱和碱性氧化铝柱的洗脱回收率均低于 50%。TSNA s 是有机弱碱, 在酸性条件下能以质子结合态的形式存在溶液中^[7]。PCX 柱是以水可浸润型聚合物为基质, 具有阳离子交换和反相混合机理的萃取柱, 可提供离子交换和反相保留的双重保留模式, 具有大的表面积和柱容量。因此, PCX 柱适于净化卷烟烟气中的 TSNA s。

2.4 色谱条件的优化

2.4.1 色谱柱的选择 比较了 Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 4.6 mm i. d., 1.8 μm) 和 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) 对 4 种亚硝胺的分离效果。结果表明, 选用 1.8 μm 粒径 C₁₈ 超高压柱可以实现 4 种化合物的完全分离。而选用柱填料粒径为 5.0 μm 的 C₁₈ 柱时, NNN 和 NNK, NAB 和 NAT 之间峰形重叠^[16], 保留时间相差不足 0.5 min, 4 种物质不能同时分离。这是因为超高压柱的填料粒径通常小于 2 μm, 具有大的比表面积和柱压, 能保持很高的分离度, 改善峰形的对称性, 使柱效得以显著提高^[17-18]。

2.4.2 流动相的选择 考察了流动相 (水 - 甲醇、水 - 乙腈及其含乙酸体系) 和柱温对分离效果的影响。实验表明, 采用水 - 甲醇 (68 : 32, 含 0.1% 醋酸) 等度洗脱, 4 种化合物得到较好分离。水相比比例增加, 4 种目标化合物的保留时间延长。柱温 50 °C 时可有效消除 NNN 和 NNK 的对映异构体产生的肩峰, 从而得到对称的色谱峰形。

在优化条件下, 标准样品及实际样品的 MRM 图如图 3 所示。

2.5 TSNA s 的标准曲线

配制 NNN、NNK、NAT、NAB 质量浓度分别为 0、0.5、5、10、25、50、100、200、400 μg/L 的系列混合标准溶液, 进行 UPLC - MS/MS 分析。标准曲线方程、相关系数及定量下限 (S/N = 10) 见表 2。结果表明, 4 种目标化合物在 0 ~ 400 μg/L 范围内, 具有良好的线性关系。

2.6 精密度与回收率

取同一牌号卷烟样品分为 5 组, 按 “1.2” 方法进行样品前处理, 在优化条件下进行 UPLC - MS/MS 分析, 获得样品卷烟烟气中目标化合物的平均含量与相对标准偏差 (RSD); 将一定量 NNN、NNK、NAT、NAB 混合标样加入该样品提取溶液中, 外标法定量并计算其回收率, 结果见表 2。

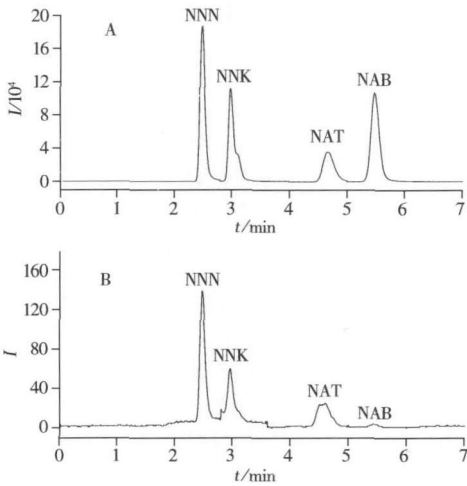


图 3 混合标准溶液 (A) 与卷烟烟气样品 (B) 的 MRM 图
Fig. 3 MRM chromatograms of mixed standard solution (A) and smoking sample (B)

表 2 NNN、NNK、NAT、NAB 的分析参数及其在卷烟样品中的相对标准偏差与回收率

Table 2 Analytical parameters of NNN, NNK, NAT, NAB and their RSDs and recoveries of in mainstream smoke samples								
Sample	Linear equation *	r	LOQ	Original	Added	Found	RSD (n = 5) s _r / %	Recovery R / %
			ρ / (μg · L ⁻¹)	ρ ₀ / (μg · L ⁻¹)	ρ _A / (μg · L ⁻¹)	ρ _F / (μg · L ⁻¹)		
NNN	Y = 210.7X + 204.7	0.999 5	0.08	0.51	0.50	0.97	6.3	92
NNK	Y = 135.0X - 129.8	0.998 2	0.15	1.02	1.00	2.06	5.5	104
NAT	Y = 220.2X - 183.2	0.999 8	0.10	1.04	1.00	1.93	3.8	89
NAB	Y = 198.8X - 96.5	0.999 6	0.15	0.32	0.50	0.68	9.7	72

* Y: peak area; X: mass concentration, μg/L

2.7 部分国产卷烟烟气中 TSNA s含量的测定

采用本方法测定了 6 种国产卷烟主流烟气中的 TSNA s 含量，结果见表 3。结果表明，国产卷烟烟气中的 NNN、NNK 含量较多，NAT、NAB 含量较低。目前，NNK 已被我国烟草行业列为最重要的卷烟烟气 7 种有害成分之一，并严格限制其烟气生成量。

3 结 论

本文采用超高效液相色谱 - 串联质谱法快速测定卷烟主流烟气中的 4 种烟草特有亚硝胺。以醋酸铵缓冲液为提取溶剂，经过 PCX 固相萃取柱净化，有利于降低质谱基体效应对分析结果的影响。采用超高效液相色谱方法，实现了 4 种目标化合物的基线分离，缩短了分析时间，方法的定量下限为 0.08 ~ 0.15 μg/L，可满足复杂卷烟烟气背景下，低含量 TSNA s 样品的快速、准确测定。

表 3 国产卷烟主流烟气中 NNN、NNK、NAT、NAB 的含量
Table 3 Contents of NNN, NNK, NAT and NAB in the mainstream smoke of domestic cigarettes w/(ng·cig⁻¹)

No.	NNN	NNK	NAT	NAB
1	2.15	6.13	2.24	0.32
2	4.09	3.77	1.60	0.65
3	2.03	5.33	1.92	0.24
4	5.52	10.47	1.21	0.28
5	2.95	4.20	0.54	0.20
6	3.26	8.24	0.54	0.35

参考文献：

[1] BRUNNEMANN K D, HOFFMANN D. Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke [J]. Crit Rev Toxicol, 1991, 21(4): 235 - 240.

[2] HECHT S S, HATSUKAMID K, BONLLA L E, et al Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl) butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl) butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism [J]. Chem Res Toxicol, 1999, 12(2): 172 - 179.

[3] 张峻松, 许小博, 陈芝飞, 等. 烟草特有亚硝胺分析研究进展 [J]. 郑州轻工业学院学报, 2007, 22(4): 13 - 16

[4] 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

[5] 李文寿. 用气相色谱 - 热能分析仪同时测定挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺 [J]. 中国烟草学报, 1999, 5: 12 - 19

[6] ZHOU Jun, BAIRuoshi, ZHU Yongfa Determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by gas chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(24): 4086 - 4092

[7] WU W J, ASHLEY D L, WATSON C H. Simultaneous determination of five tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2003, 75(18): 4827 - 4832

[8] 毛友安, 钟科军, 魏万之, 等. LC/MS/MS 法同时测定卷烟主流烟气中 4 种 TSNA s [J]. 化学研究与应用, 2005, 17(4): 571 - 573

[9] 李勇, 吴名剑, 练文柳, 等. SPE - LC - MS/MS 快速测定卷烟丝中的烟草特有亚硝胺类化合物 [J]. 分析试验室, 2007, 26(6): 65 - 68

[10] 丁时超, 杜文, 任建新, 等. LC - MS/MS 定量分析卷烟中的烟草特有亚硝胺 (TSNA s) [J]. 中国烟草学报, 2005, 11(6): 17 - 22

[11] 张朝晖, 罗生亮, 吴少林, 等. 鱼肉类罐头中双酚 - 二环氧甘油醚的固相萃取 /HPLC - MS/MS 法检测 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 714 - 719.

[12] 滕久委, 李德良. 田七花提取物中 22 种皂苷类成分的液相色谱 - 质谱测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(8): 851 - 855

[13] WAGNER KA, GILLMAN IG, FOSSETT J E, et al Development of a quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2005, 77(4): 1001 - 1006

[14] 刘正才, 杨方, 李耀平, 等. UPLC - MS/MS 对鳗鱼中 26 种喹诺酮类及磺胺类抗生素药物残留的快速测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 1171 - 1175

[15] 周新, 张新祥, 王磊, 等. UPLC - MS/MS 测定鱼干中的呋喃唑酮代谢物 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 262 - 264

[16] WU Jingcun, JOZA P, SHARIFIM, et al Quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in cigarette tobacco and main stream cigarette smoke by use of isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2008, 80(4): 1341 - 1345

[17] CHURCHWELL M I, TWADDLEN C, MEEKER L R, et al Improving LC - MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC - ES/MS/MS to HPLC - ES/MS/MS [J]. J Chromatogr. B, 2005, 825(2): 134 - 143

[18] VAN DE STEENE J C, LAMBERTW E. Comparison of matrix effects in HPLC - MS/MS and UPLC - MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters [J]. Am Soc Mass Spectrom, 2008, 19(5): 713 - 718