

基质固相分散-气相色谱热能检测法测定 电子烟烟油中的 TSNAs

张凤梅, 杨光宇, 刘志华, 朱瑞芝, 司晓喜, 刘春波, 申钦鹏, 何 沛, 王昆淼, 王 晋, 缪明明*
(云南省烟草化学重点实验室, 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650231)

摘要: 利用基质固相分散-气相色谱热能检测法测定电子烟烟油中的烟草特有亚硝胺(TSNAs)。电子烟烟油用碱性氧化铝分散处理, 然后用带柱层析净化功能的索氏提取器净化。经净化后的样品用气相色谱热能进行检测分析。在选定条件下, NNK、NNN、NAB、NAT的4种烟草特有亚硝胺检出限分别为7.6、12.8、13.2、4.0 ng/mL, 方法的回收率为89.6%~94.7%; 对样品进行7次测定, 日内相对标准偏差为3.2%~4.0%; 日间相对标准偏差为4.2%~4.6%, 结果令人满意。

关键词: 烟草特有亚硝胺; 基质固相分散; 气相色谱-热能分析法; 电子烟烟油

中图分类号: O653.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)06-0191-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.06.047

Determination of TSNAs in electronic cigarette liquids by GC-TEA with matrix solid phase dispersion

ZHANG Feng-mei, YANG Guang-yu, LIU Zhi-hua, ZHU Rui-zhi, SI Xiao-xi, LIU Chun-bo,
SHEN Qin-peng, HE Pei, WANG Kun-miao, WANG Jin, MIAO Ming-ming*
(Key Laboratory of Tobacco Chemistry, R&D Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd.,
Kunming 650231, China)

Abstract: A matrix solid phase dispersion and gas chromatography method are used to determine *N*-nitrosamines (TSNAs) in electronic cigarette liquids in combination with matrix solid phase dispersion. The electronic cigarette liquids samples are firstly dispersed with basic alumina and purified by basic alumina column chromatography combined with cable extraction. The purified samples are analyzed by gas chromatography equipped with thermal energy analyser (TEA). The detection limits for four TSNAs (NNK, NNN, NAB, NAT) are 7.6, 12.8, 13.2, and 4.0 ng/mL, respectively. The developed method provides spiked recoveries of 89.6% - 94.7% for TSNAs. The intra-day relative standard deviations are 3.2% - 4.0% and the inter-day relative standard deviations are 4.2% - 4.6%. This method is applied for the determination of TSNAs in electronic cigarette liquids with good results.

Key words: tobacco specific *N*-nitrosamines; matrix solid phase dispersion; GC-TEA; electronic cigarette liquids

烟草特有亚硝胺(TSNAs)包括 *N*-亚硝基降烟碱(NNK)、4-(甲基亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、*N*-亚硝基新烟草碱(NAT)、*N*-亚硝基假木贼碱(NAB)等, 是烟草中一类重要有害成分^[1]。目前 TSNAs 的测定特别是 NNK 的测定已列为烟草安全评价的重要检测指标^[2]。电子烟作为一种新型烟草制品, 是通过烟油直接雾化电子烟油来产生烟气; 由于避免了复杂的烟丝燃烧, 其有害成分释放量比常规卷烟大大减少^[3]。但是电子烟烟油普遍含烟草提取物, TSNAs 有可能会因烟草提取物的使用而引入到电子烟烟油中。因此电子烟油中 TSNAs 的测定对保障电子烟的安全性具有一定意义^[5-6]。

目前测定 TSNAs 的方法主要有气相色谱-热能分析联用法(GC-TEA)^[7-8]、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)^[9-10]和液相色谱-串联质谱联用法(LC-

MS/MS)^[6,11]等。LC-MS/MS 法具有较高的灵敏度, 但由于基质效应的影响, 方法重现性较差。GC-TEA 法对亚硝胺类化合物具有很好的选择性, 测定结果准确, 重现性好, 但样品前处理非常复杂, 耗时较长, 需多次的转移、浓缩, 易造成 TSNAs 的损失和转化, 影响测定的准确性; 而且有机溶剂(二氯甲烷)消耗量很大, 样品前处理过程中大量溶剂向空气中散发, 环境污染大。针对现有技术的不足, 研究了用基质固相分散处理, GC-TEA 测定电子烟烟油中 TSNAs 的方法。电子烟烟油样品浓缩后用硅胶分散, 然后用带柱层析净化功能的索氏提取器净化。经提取净化后的样品用于测定。该方法简化了样品前处理操作步骤, 提高了分析结果的精密度; 显著简化了常规 GC-TEA 分析样品前处理操作步骤, 使前处理过程中有机溶剂用量大大减少, 从而减少了样品处理过程中对环境的污染。

收稿日期: 2015-11-16

基金项目: 云南省科技厅青年基金项目(2014FD079), 国家自然科学基金项目(21365026)

作者简介: 张凤梅(1985-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向为烟草化学, zhangfm2008@126.com; 缪明明(1962-), 博士, 研究员, 研究方向为烟草化学, 通讯联系人, ygy1110@163.com。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

气相色谱-热能分析联用仪,美国 Thermo Electron 公司生产,色谱柱为弹性毛细管柱(30 m × 0.53 mm × 1 μm),固定相为 50% 甲基-50% 苯基聚硅氧烷;保护柱为弹性石英毛细管柱(1 m × 0.53 mm),经脱活处理;分析天平,感量为 0.000 1 g,瑞士 Mettler Toledo 公司生产。

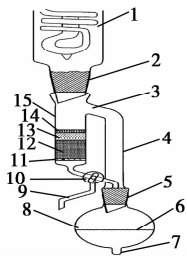
电子烟烟油购于淘宝网;氯仿、丙酮,色谱纯,购于美国 sigma 公司;无水硫酸钠、碱性氧化铝(200 目 ~ 300 目),分析纯,均购于上海国药集团化学试剂有限责任公司;亚硝酸标准品和内标 *N*-戊基-(3-甲基吡啶基)亚硝酸、NNN、NAT、NAB、NNK,纯品(纯度大于 97%),购于百灵威化学试剂公司。

1.2 标准工作溶液

配制 TSNA 标准系列工作溶液,以氯仿为溶剂,内标 *N*-戊基-(3-甲基吡啶基)亚硝酸的质量浓度均为 200 ng/mL;NNN、NAT、NNK 的质量浓度为 10、20、50、100、200、500、1 000、1 500 ng/mL;NAB 质量浓度为 5、10、20、50、100、200、500、1 000 ng/mL。

1.3 带柱层析功能的索氏提取装置

带柱层析功能的索氏提取装置由回流冷凝管、提取器和圆底烧瓶 3 部分组成,如图 1 所示。



- 1—回流冷凝管;2—磨口;3—提取器;4—溶剂汽流管;
5—磨口;6—溶剂;7—尾管;8—烧瓶(250 mL);
9—溶剂回收口;10—三通阀;11—筛板;12—碱性氧化铝;
13—样品;14—无水硫酸钠;15—填料管

图 1 新样品前处理装置的结构图

1.4 仪器条件

采用文献[7]中规定的色谱条件,具体参数如下:程序升温:初始温度为 150℃,保持 2 min;以 3℃/min 速率升至 230℃,20℃/min 速率升至 260℃,保持 20 min;进样口温度为 230℃;载气为氦气,恒流 10 mL/min 进样量为 2 μL;不分流,不分流时间为 1 min;吹扫流量为 50 mL/min;热裂解温度为 550℃;接口温度为 250℃。

TEA 参数采用 model 543:裂解温度为 500℃,接口温度为 250℃。

在该仪器条件下标样和电子烟烟油样品色谱图如图 2 所示。

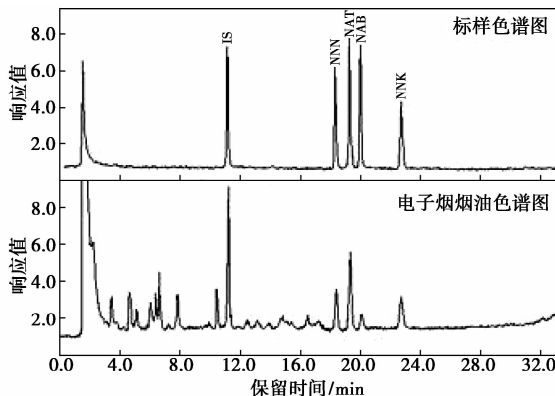


图 2 标样和电子烟烟油样品色谱图

1.5 样品前处理及检测

准确称取电子烟烟油样品 10 g,然后加入 15.0 g 的碱性氧化铝和电子烟烟油充分研磨均匀,并在烘箱中烘干。

在索氏提取装置中加入 20 g 氧化铝层,然后将附着了电子烟烟油的碱性氧化铝加到索氏提取器中,再在上面铺 5.0 g 无水硫酸钠。装好样品后,在烧瓶中加入 100 mL *V*(丙酮):*V*(氯仿) = 2:8 的混合溶剂,然后将上述样品前处理装置放入水浴锅中于 75℃ 加热回流 45 min 提取样品。样品提取完后,打开三通阀,让溶剂从溶剂回收口流出,浓缩样品并回收溶剂,当浓缩到约 1.0 mL 时停止加热,取出样品,用 0.45 μm 的针头过滤器过滤,即可供分析用。

邻苯二甲酸酯[J]. 色谱,2011,29(6):563-566.

- [3] 莫测辉,李云辉,蔡全英,等. 农用肥料中有机污染物的初步检测[J]. 环境科学,2005,26(3):198-202.
- [4] 董夫银,闫杰. 欧盟及美国禁用邻苯二甲酸酯的法规及其出台始末[J]. 检验检疫科学,2006,16(3):78-80.
- [5] 何丽芝,陆扣萍,秦华,等. 我国设施菜地邻苯二甲酸酯污染现状及防治研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(28):13973-13975,14063.
- [6] 李红,田福林,任雪冬,等. 气相色谱-串联质谱法测定土壤中的
- [7] 张小辉,王晓雁. 气相色谱-质谱联用法测定土壤中邻苯二甲酸酯类增塑剂[J]. 岩矿测试,2010,29(5):531-534.
- [8] 曹分文,马军,李云木子,等. 索氏提取-液相色谱法测定土壤中邻苯二甲酸酯类物质[J]. 地质学刊,2011,35(1):73-77.
- [9] 赵琳. 气相色谱法-质谱联用技术测定食品中邻苯二甲酸酯类的研究[D]. 河南:河南大学药物分析学,2013.
- [10] 李茜. 复杂样品中酞酸酯类化合物分析的样品前处理技术研究[D]. 武汉:华中师范大学,2009. ■

(上接第 190 页)

2 结果与讨论

2.1 方法原理

用GC-TEA法测定TSNAs,样品前处理包含了样品溶剂提取、氧化铝柱层析净化、净化后的样品浓缩等。即样品用二氯甲烷提取,提取液进行浓缩,浓缩后的样品以二氯甲烷-甲醇为洗脱剂,用氧化铝柱层析净化。氧化铝柱洗脱液再浓缩后供仪器分析用。而采用本文中的装置,启动水浴加热,蒸发后的溶剂可经回流冷凝管冷凝后再次回流到提取器中,经无水硫酸钠层干燥后,再把样品(负载了电子烟烟油的碱性氧化铝)上负载的TSNAs洗脱下来;经过装填的碱性氧化铝净化,电子烟烟油中的杂质则被吸附在碱性氧化铝柱上,而TSNAs被溶剂洗脱而下进入圆底烧瓶中。经过多次循环回流后,样品中的TSNAs被完全提取,经转换三通阀让溶剂从溶剂回收出口流出,这样圆底烧瓶中的溶液不断被浓缩,当浓缩到约1.0 mL时停止加热,取出样品,即可供分析用。

2.2 萃取、净化溶剂的选择

TSNAs测定样品前处理的关键步骤是氧化铝柱层析净化,溶剂的选择非常重要,溶剂对氧化铝柱的洗脱强度适当才能让TSNAs从氧化铝柱上洗脱下来,并让杂质更多的保留在柱上,从而达到样品净化的目的。传统方法一般用1种洗脱强度小的溶剂(二氯甲烷)和1种洗脱强度大的溶剂(甲醇)混合作为洗脱剂,通过两者的比例调节洗脱强度。在本方法中,要求2种溶剂的沸点相近,以保持在水浴加热时能达到基本同时气化。氯仿的沸点(61.3℃)和丙酮的沸点(56.5℃)非常接近,经常使用这2种溶剂混合调节溶剂强度作为正相色谱的流动相,因此选择氯仿和丙酮混合作为本实验中的提取、净化溶剂。考察了不同体积比的氯仿和丙酮混合对样品中TSNAs的萃取效率的影响,结果表明:丙酮的体积比过低会导致柱上的亚硝胺洗脱不完全,使测定结果偏低;丙酮的比例过高又会导致大量杂质洗脱而达不到预期的净化效果;丙酮和氯仿的体积比在20:80时能将样品中的TSNAs完全萃取,且能达到较好净化效果,因此,选择体积比为2:8的丙酮-氯仿作为前处理中的溶剂。

2.3 萃取剂体积的选择

在本实验中,需在提取装置中加入足够量的溶剂,以保持溶剂在前处理过程中能循环。实验结果表明,当提取装置中的溶剂量达80 mL时能保持正

常循环,但考虑到在样品前处理过程中溶剂因蒸发而有少量损失,因此选择在提取器中加入100 mL的氯仿-丙酮混合溶剂。

2.4 水浴温度的选择

在本实验中,氯仿的沸点为61.3℃,丙酮的沸点为56.5℃,当水浴温度超过70℃时,尾管烧瓶中的溶剂开始沸腾,随温度增加,溶剂蒸发速度迅速加快,当温度达到75℃时溶剂蒸发速度能达到10 mL/min左右(稍大于氧化铝柱上的流下速度),温度过高则会增加提取过程中的溶剂损失,因此,选择水浴温度为75℃。

2.5 萃取时间的选择

选取经硅胶分散、烘干后的电子烟油样品,在75℃的水浴中进行回流提取,考察提取时间对TSNAs测定结果的影响。比较了提取时间分别为20、25、30、35、40、45、50、60 min的测定结果。结果表明:萃取时间在40 min以后萃取效率达到1个稳定值,TSNAs的测定结果趋于稳定,进一步延长提取时间则会导致更多的杂质洗脱下而影响样品的净化效果。为节约时间并避免引入更多的干扰成分,选择回流45 min作为样品提取的最佳时间。

2.6 工作曲线和检测限

配制一系列不同TSNAs质量浓度标准溶液(内标质量浓度均为200 ng/mL)进行GC-TEA分析,以标样峰面积(A)和浓度(C)进行线性回归,得到线性回归方程,结果如表1所示。将最低质量浓度的标准溶液连续进样10次,测定其标准偏差,以3倍标准偏差作为检出限,以10倍标准偏差作为定量限,具体结果如表1所示。

表1 方法工作曲线、相关系数、检测限及定量限

化合物	工作曲线	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	线性相 关系数 (r)	LOD/ (ng· mL ⁻¹)	LOQ/ (ng· mL ⁻¹)
NNK	$A = 15.6C + 1.08$	20 ~ 800	0.9994	7.6	21.5
NNN	$A = 18.9C - 1.22$	28 ~ 1000	0.9992	12.8	33.8
NAB	$A = 20.6C + 1.35$	32 ~ 500	0.9990	13.2	35.6
NAT	$A = 22.5C - 1.43$	15 ~ 1500	0.9991	4.0	11.8

2.7 检测方法的回收率和精密度

日内精密度:电子烟烟油样品在相同条件下同1天内测定7次,并计算7次平行测定结果的相对标准偏差(RSD),可得4种TSNAs的RSD在3.2%~4.0%范围内,说明方法精密度良好。

日间精密度:烟草样品每天测定1次,共7天,

计算7次测定结果的相对标准偏差,可得4种TSNAs的RSD在4.2%~4.6%范围内,说明在不同时间内测定,方法精密度仍然良好。

测定时每个样品称取相同4份,其中1份不加标准品,另3份分别加入已知量的TSNAs(NNK的添加量分别为40、80、160 ng;NNN的添加量分别为50、100、200 ng;NAB的添加量分别为20、40、80 ng;NAT的添加量分别为100、200、400 ng),样品按选定的样品前处理条件处理,并按选定实验条件进样分析,通过加标样品测出量减去未加标样品测出量(本底),再除以标准加入量计算回收率。得TSNAs的回收率在89.6%~94.7%之间,说明方法回收率很高。

2.8 部分样品检测结果

选择部分有代表性的样品,按选定样品前处理方法处理后进行测定,并用标准方法^[7]与碱性氧化铝柱层析净化的GC-TEA测定方法作为对照,结果如表2所示。结果表明,该方法的测定结果和烟草行业标准基本相符合,说明该方法的样品前处理测定结果和标准方法没有显著性差异,测定结果可靠。

表2 电子烟烟油中的TSNAs检测结果比较

样品	$w(\text{NNN})/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$		$w(\text{NAT})/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	
	本方法	标准方法	本方法	标准方法
电子烟油-1	15.4	14.2	38.2	36.3
电子烟油-2	10.4	11.3	26.8	18.5
电子烟油-3	—	—	—	—
电子烟油-4	8.26	8.58	23.5	25.0

样品	$w(\text{NAB})/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$		$w(\text{NNK})/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$	
	本方法	标准方法	本方法	标准方法
电子烟油-1	6.87	6.97	12.6	11.2
电子烟油-2	4.36	4.62	7.58	7.87
电子烟油-3	—	—	—	—
电子烟油-4	—	—	6.57	6.75

注:“—”表示质量分数低于定量限。

3 结论

用基质固相分散-气相色谱热能检测法测定电子烟烟油中的TSNAs。采用硅胶基质固相分散处理,然后用带柱层析净化功能的索氏提取器净化。高效的样品净化可分离除去大量的杂质,使10 g电子烟烟油中的TSNAs浓缩到1.0 mL的待分析溶剂中,浓缩倍数达10倍,该方法可满足电子烟烟油中

低质量分数TSNAs的测定。采用新净化置可将常规方法中的提取、柱层析净化、浓缩三步在线连接起来,避免了样品前处理过程中的转移、浓缩,简化了操作步骤,还可有效减少分析误差,使测定结果更加准确。而且样品处理在相对封闭的装置中完成,避免了常规前处理方法中许多敞开操作,减少了有机溶剂向环境中的散发,降低了环境污染。总之,该方法准确可靠,重现性好,回收率满意,检出限较低,可满足电子烟烟油中TSNAs快速准确测定的要求。

参考文献

- [1] Hoffmann D, Brunnemann K D, Prokopczyk B. Tobacco-specific N-nitrosamines and ARECA-derived N-nitrosamines; Chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans[J]. J Toxicol. Environ Health, 1994, 41(1): 1-52.
- [2] 谢剑平, 刘惠民, 朱茂祥, 等. 卷烟烟气危害性指数研究[J]. 烟草科技, 2009, (2): 5-15.
- [3] 李长昱, 李明, 陈丽珠. 基于专利数据的国内外新型烟草制品发展情况分析[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(11): 350-351.
- [4] Farsalinos K E, Gillman G, Poulas K, et al. Tobacco-specific nitrosamines in electronic cigarettes: Comparison between liquid and aerosol Levels[J]. Inter J Environ Res Pub Heal, 2015, 12(8): 9046-9053.
- [5] Cho Y H, Shin H S. Use of a gas-tight syringe sampling method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in E-cigarette by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Methods, 2015, 7(11): 4472-4480.
- [6] Kim H J, Shin H S. Determination of tobacco-specific nitrosamines in replacement liquids of electronic cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2013, 1291(1): 48-55.
- [7] 谢复炜, 金永明, 赵明月, 等. GB/T 23228—2008 卷烟主流烟气总颗粒物中烟草特有N-亚硝胺的测定气相色谱-热能分析联用法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008-12-31.
- [8] 谢复炜, 金永明, 赵明月, 等. 国内外主要品牌卷烟主流烟气中烟草特有N-亚硝胺的对比分析[J]. 中国烟草学报, 2004, 10(5): 8-15.
- [9] Wu D, Lu Y F, Lin H Q, et al. Selective determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by GC coupled to positive chemical ionization triple quadrupole MS[J]. J Sep Sci, 2013, 36(16): 2615-2620.
- [10] 顾文博, 周宛虹, 陆怡峰, 等. 气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定卷烟烟气中的烟草特有亚硝胺[J]. 烟草科技, 2013, (10): 40-43.
- [11] 张凤梅, 杨柳, 孟昭宇, 等. 卷烟主流烟气中烟草特有亚硝胺的测定[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(3): 92-94. ■