

# GC/MS/MS 在烟草生物碱分析中的应用研究

申进朝<sup>1</sup>, 林玉红<sup>2</sup>, 堵劲松<sup>2</sup>, 王潇磊<sup>1,4</sup>, 邵学广<sup>3</sup>

(1.河南省环境监测中心, 河南 郑州 450004; 2.中国烟草总公司 郑州烟草研究院, 河南 郑州 450001; 3.中国科技大学 化学系, 安徽 合肥 230026; 4.郑州大学 化学系, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 以烟草为分析对象, 研究离子阱质谱在植物样品分析中的应用。结果表明, GC/MS/MS 通过选择特定的先驱离子, 具有很高的特异性, 基本排除了样品中其它物质的干扰。6 种烟草生物碱相对标准偏差为 0.45%~4.52%; 最低检出限达到 0.33  $\mu\text{g/g}$ 。

**关键词:** 烟草; 生物碱; 离子阱质谱

中图分类号: O657.71 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0599-04

## Application of GC/MS/MS in the Analysis of Alkaloids in Tobacco

SHEN Jin-chao<sup>1</sup>, LIN Yu-hong<sup>2</sup>, DU Jin-song<sup>2</sup>,

WANG Xiao-lei<sup>1,4</sup>, SHAO Xue-guang<sup>3</sup>

(1.Henan Environmental Monitoring Center, Zhengzhou 450004, China; 2.Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China; 3.Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 4.Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003)

**Abstract:** The application of ion trap mass spectrum in the analysis of plant samples was studied taking tobacco samples as the object. GC/MS/MS has perfect specificity and eliminates the interference from other substances by selecting given precursor ions. The relative standard deviations were 0.45%~4.52% and the LOD was 0.33  $\mu\text{g/g}$ .

**Key words:** tobacco; alkaloids; ion trap mass spectrum

串联质谱(MS/MS)是 20 世纪 70 年代初出现的质谱技术, 它从复杂的一级质谱中选择一个或几个特定的母离子进行二次分裂, 再对产生的子离子碎片进行检测得到二级质谱图。二级质谱图比一级质谱图要简单的多, 最大程度的排除了基体干扰, 提高了选择性和灵敏度。目前, GC/MS/MS 对复杂环境样的分析显示了巨大的优势, 已经应用于环境中二噁英<sup>[1]</sup>、农残<sup>[2-4]</sup>、PCBs<sup>[5-6]</sup>、PAHs<sup>[7]</sup>、环境激素<sup>[8]</sup>等污染物的控制分析。此外, 在减肥药物<sup>[9]</sup>、氯代血红素<sup>[10]</sup>、毒品<sup>[11]</sup>等的分析中, GC/MS/MS 也显示了其高灵敏度及高选择性特点。

近年来, 相关学者开展了植物中生物碱的含量研究<sup>[12-14]</sup>。然而, 对于烟草等复杂植物样品的分离分析, 尚未见到 GC/MS/MS 应用的相关报道。本文以烟草为分析对象, 检测分析了其中的 6 种生物碱, 并与 GC/MS 和 GC/MS(SIM)的分析结果进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和试剂

各等级烟叶取自国家烟草质量监督检验中心, 于 40  $^{\circ}\text{C}$  烘干 2 h, 研磨, 过 40 目筛, 备用。

内标十七烷(德国 Sigma 公司, 分析纯); NaOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CH}_3\text{OH}$ (中药集团上海试剂公司, 分析纯)。

收稿日期: 2011-09-29 修回日期: 2012-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(20325517)

作者简介: 申进朝(1977—), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事环境监测、环境分析研究, E-mail: zhengsjc@126.com。

## 1.2 烟草中生物碱的萃取

准确称取 0.5 g 烟末于 50 mL 具塞三角瓶中, 加入 5 mL 5% NaOH, 摇匀, 再一次加入 0.2 mL 内标 (7.376  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  十七烷) 和 20 mL 萃取溶剂  $V(\text{CH}_2\text{Cl}_2):V(\text{CH}_3\text{OH})=3:1$ , 超声 15 min 后, 静置, 过滤, 取 1  $\mu\text{L}$  清液直接进样。

## 1.3 仪器及工作条件

Trace GC 和 Polaris Q 气质联用仪 (美国 Finnigan 公司)。毛细管柱: CP-Sil 8CB Low Bleed/MS, 30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  内径 (美国 Varian 公司); 进样口温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ 。载气为氦气, 恒流模式, 流速 1 mL/min, 不分流进样; 升温程序: 100  $^{\circ}\text{C}$  保持 3 min, 以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 280  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 2 min。质谱工作条件: 传输线和离子源温度分别为 280  $^{\circ}\text{C}$  和 200  $^{\circ}\text{C}$ , 电离方式 EI, 电离电压 70 eV, Damping gas 流速为 0.3 mL/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GC/MS/MS 参数优化

表 1 Finnigan Polaris Q GC/MS/MS 保留时间及母离子

Tab.1 Finnigan Polaris Q GC/MS/MS retention time and precursor ions

| 保留时间/min<br>Retention time | 生物碱<br>Alkaloids | 分子量<br>MW | 母离子/( $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ )<br>Precursor ions | 诱导碰撞电压/eV<br>Excitation voltage energy | 扫描时间范围/min<br>Scan time range |
|----------------------------|------------------|-----------|--|--|-------------------------------|
| 7.15                       | 尼古丁              | 162       | 162  | 0.4                                    | 4.0~7.5                       |
| 7.81                       | 去甲基尼古丁           | 148       | 147  | 0.4                                    | 7.5~7.9                       |
| 8.13                       | 二烯烟碱             | 158       | 158  | 0.4                                    | 7.9~8.17                      |
| 8.21                       | 新烟碱              | 162       | 162  | 0.4                                    | 8.17~8.3                      |
| 8.42                       | 去氢新烟碱            | 160       | 160  | 0.4                                    | 8.3~8.5                       |
| 8.55                       | 2,3-二联吡啶         | 156       | 156  | 0.4                                    | 8.5~9.0                       |
| 9.30                       | 内标               | 240       | 85   | 0.4                                    | 9.0~14.0                      |

在离子阱二次质谱的工作过程中, 阻尼气流 (Damping gas)、母离子、诱导碰撞电压等参数对分析结果产生重要的影响。由于已有仪器的阻尼气流在选购时设置为不可调, 本文只对母离子和诱导碰撞电压进行了优化。各化合物的保留时间及母离子信息见表 1。

以去甲基尼古丁 (Normicotine) 为例说明诱导碰撞电压 (Excitation voltage energy) (优化范围为 0~2 eV) 优化过程。将不同诱导碰撞电压下所得色谱峰面积作图 (图 1)。由图可见, 0.4 eV 的诱导碰撞电压所给出的色谱信号最强, 并在本研究中得以使用。其它成分与之类似 (表 1)。

### 2.2 GC/MS/MS 与 GC/MS 和 GC/MS(SIM) 的比较分析

本文对 GC/MS/MS 与 GC/MS 和 GC/MS(SIM) 在烟草生物碱检测中的灵敏度和准确性进行了

对比分析。表 2 为 GC/MS(SIM) 所选用的工作参数。不同质谱扫描方式所得色谱图见图 2。

表 2 Finnigan Polaris Q GC/MS 选择离子扫描方式参数

Tab.2 Finnigan Polaris Q GC/MS (SIM) parameters

| 保留时间/min<br>Retention time | 生物碱<br>Alkaloids | 定量离子/( $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ )<br>Quantitation ion | 定性离子/( $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ )<br>Qualitative ion | 扫描时间范围/min<br>Scan time range |
|----------------------------|------------------|---|--|-------------------------------|
| 7.15                       | 尼古丁              | 133   | 162  | 4.0~7.5                       |
| 7.81                       | 去甲基尼古丁           | 70  | 119  | 7.5~7.9                       |
| 8.13                       | 二烯烟碱             | 157   | 158  | 7.9~8.17                      |
| 8.21                       | 新烟碱              | 133   | 106  | 8.17~8.3                      |
| 8.42                       | 去氢新烟碱            | 160   | 131  | 8.3~8.5                       |
| 8.55                       | 2,3-二联吡啶         | 155   | 156  | 8.5~9.0                       |
| 9.30                       | 内标               | 57  | 85   | 9.0~14.0                      |

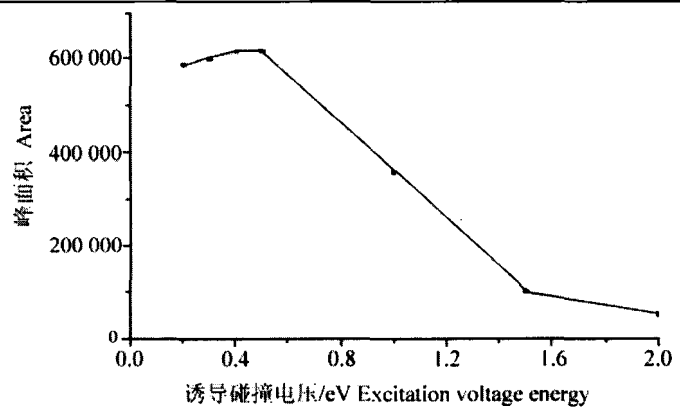


图 1 不同诱导碰撞电压下去甲基尼古丁的峰面积  
Fig.1 Effect of the excitation voltage energy on the area of normicotine

从图 2 可以看出, 由于 GC/MS(SIM) 和 GC/MS/MS 的高选择性, 所得的色谱图更为纯净, 色谱峰基线远低于全扫描方式。将色谱图局部放大 (7.5~9.0 min) (图 3) 可以看出, 全扫描方式所得到的色谱峰基线明显劣于其他 2 种扫描方式。另外由于相邻成分的干扰, 色谱峰重叠严重, 使得准确定量分析存在一定的困难。选择离子扫描方式则明显改善了这一不利因素, 基线较为平整, 相邻色谱峰也得到了较好的分离。而 GC/MS/MS 方式所得的目标分析物色谱峰峰型更为标准, 这进一步提高了定量分析的准确性。

比较图 3 中选择离子扫描方式和二次质谱扫描方式的色谱峰可以发现, 尽管都较全扫描方式有较大的改善, 使得原来重叠的色谱峰得到了较好的分离, 但所得的定量结果却存在较大差异。以 Anatabine (峰 4) 和 2,3-Bipyridyl (峰 5) 为例可以看出, 在选择离子扫描方式中, 二者峰面积差别较大, 而在二次质谱扫描方式中, 二者峰面积几乎相等, 这说明选择离子扫描方式或多次质谱扫描方式在某种程度上都存在类似于全扫描方式的相邻色谱峰干扰问题。比较二者由全扫描方式所得质谱 (图 4) 发现, 二者的质谱碎片都对另一成分特征离子和二次质谱母离子存在不同程度的干扰, 即存在与所选择离子具有相同质荷比的碎片。这就说明对于保留时间相近而又具有相似结构特征的化合物来说, 很难从检测技术上完全排除另一方的干扰。为比较 GC/MS(SIM) 和 GC/MS/MS 灵敏度的差异, 本文将 Anatabine (峰 4) 和 2,3-Bipyridyl (峰 5) 的特征离子和二次质谱母离子进行互换扫描, 所得色谱图见图 5。由图 5 明显可以看出, 在同时存在干扰因素的情况下, GC/MS/MS 的检测结果要优于 GC/MS(SIM)。进一步以内标法定量发现, 在交换特征离子和二次质谱母离子的情况下, 由选择离子扫描和二次质谱扫描方式所定量的结果 (目标化合物峰面积/内标峰面积) 分别为 0.320(SIM)、0.095(MSn)(Anatabine<sup>\*</sup>) 和 0.065(SIM)、0.060(MSn)(2,3-Bipyridyl<sup>\*</sup>)。这些数据进一步表明, 由于干扰因素的存在, 由选择离子扫描方式造成的误差较大, 即 GC/MS/MS 的选择性更高。

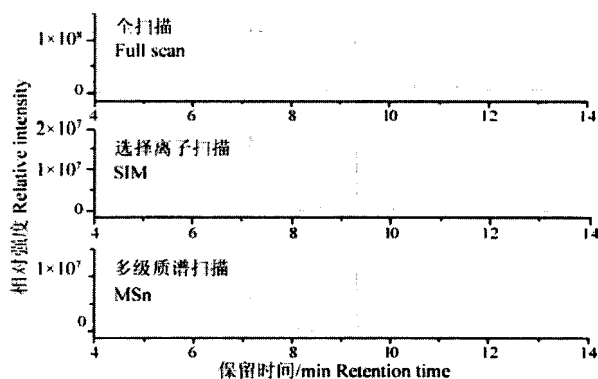
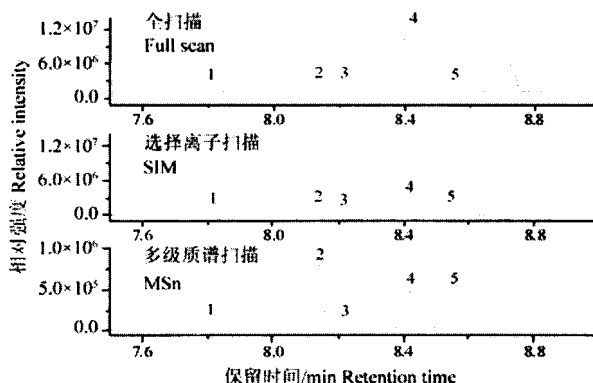


图 2 不同质谱扫描方式下的色谱图  
Fig.2 Chromatograms by different scan modes



1: 去甲基尼古丁; 2: 二烯烟碱; 3: 新烟碱; 4: 去氢新烟碱;  
5: 2, 3-二联吡啶。

1:nornicotine;2:Nicotyrine; 3:Anabasine; 4:Anatabine; 5:2,3-Bipyridyl

图 3 不同质谱扫描方式下的色谱图 (7.5~9.0 min)

Fig.3 Chromatograms (7.5-9.0 min) by different scan modes

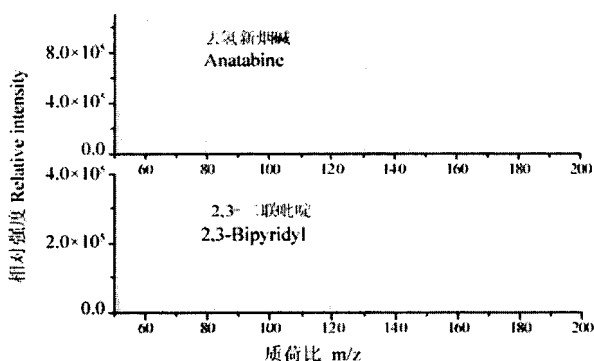


图 4 去氢新烟碱和 2,3-二联吡啶的全扫描质谱图

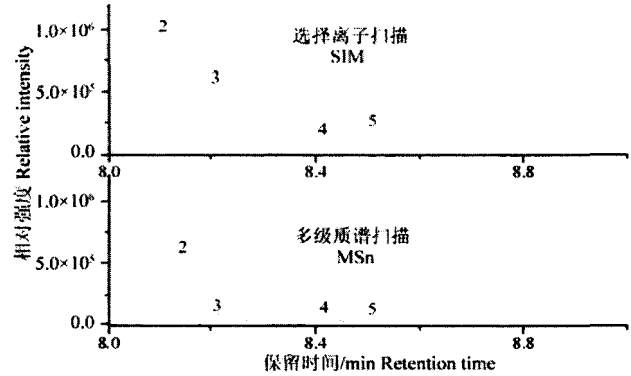
Fig.4 Mass spectra of Anatabine and 2,3-Bipyridyl by GC/MS

2.3 检测限与精密度

关于萃取方法的加标回收率,丁丽等<sup>[15]</sup>已有相关报道。本文仅对方法的检出限和精密度进行研究。取同一样品,按所选定的萃取方法处理,以 GC/MS/MS 进行分析,平行测定 6 次。实验结果见表 3。由表 3 可以看出,由于 GC/MS/MS 的高选择性和灵敏度,烟草生物碱分析的检测限低至 0.330 μg/g (Nicotyrine),即使检出限最高的 Nornicotine 也达到了 1.50 μg/g,这对微量生物碱的测定提供了强有力的支持。

2.4 样品分析

取不同等级的 4 个烤烟烟样,按上述方法以内标法定量测定,结果见表 4。测定结果表明,烟草生物碱因烟株生长环境不同、部位不同及颜色变化不同,其含量存在一定的差异。



2: 二烯烟碱; 3: 新烟碱; 4: 去氢新烟碱; 5: 2, 3-二联吡啶  
2: Nicotyrine; 3: Anabasine; 4: Anatabine; 5: 2,3-Bipyridyl  
图 5 交换特征离子和二次扫描母离子后去氢新烟碱与 2,3-二联吡啶的色谱图

Fig.5 Chromatograms by exchanging SIM and precursors of Anatabine and 2,3-Bipyridyl

表 3 烟草样品含量测定的平行测定结果 (n=6)  
Tab.3 Results from replicate analysis of a flue-cure tobacco sample (n=6)

| 生物碱<br>Alkaloids       | 平均含量/(mg·g <sup>-1</sup> )<br>Average content | 相对标准偏差/%<br>RSD | 最低检出限/(μg·g <sup>-1</sup> )<br>LODs |
|------------------------|---|-----------------|-------------------------------------|
| 尼古丁 Nicotine           | 17.9  | 0.450           | 1.20                                |
| 去甲基尼古丁 Nornicotine     | 0.330   | 1.91            | 1.50                                |
| 二烯烟碱 Nicotyrine        | 0.520   | 1.57            | 0.330                               |
| 新烟碱 Anabasine          | 0.078   | 2.67            | 0.630                               |
| 去氢新烟碱 Anatabine        | 0.550   | 1.30            | 0.570                               |
| 2,3-二联吡啶 2,3-Bipyridyl | 0.390   | 4.52            | 0.400                               |

表 4 样品分析结果  
Tab.4 The content of individual alkaloid in the four tobacco samples

| 生物碱<br>Alkaloids          | 样品编号 Sample number |       |       |       |
|---------------------------|--------------------|-------|-------|-------|
|                           | 1                  | 2     | 3     | 4     |
| 尼古丁<br>Nicotine           | 17.0               | 19.1  | 25.2  | 21.8  |
| 去甲基尼古丁<br>Nornicotine     | 0.330              | 0.410 | 0.240 | 0.470 |
| 二烯烟碱<br>Nicotyrine        | 0.520              | 0.590 | 0.620 | 0.520 |
| 新烟碱<br>Anabasine          | 0.078              | 0.087 | 0.120 | 0.110 |
| 去氢新烟碱<br>Anatabine        | 0.550              | 0.690 | 0.610 | 0.680 |
| 2,3-二联吡啶<br>2,3-Bipyridyl | 0.390              | 0.450 | 0.460 | 0.460 |

参考文献:

[1] Bui H A, Cooks R G. Windows version of the ion trap simulation program, ITSIM: A powerful heuristic and predictive tool in ion trap mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 1998, 33(4): 297-304.

[2] Martinez J L, Pablos E M C, Garrido F A, et al. Pesticide trace analysis using solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and tandem mass spectrometric detection in water samples[J]. J Chromatogr A, 2000, 867(1): 235-245.

(下转第 618 页)

量遵循奥多~哈金斯法则,轻稀土元素相对重稀土元素富集度很高,表现为非常明显的轻稀土富集型。研究区轻稀土元素高度富集,预示着外源轻稀土元素对包头市污灌区农田土壤生态环境具有重大影响,应该引起重视。

#### 参考文献:

- [1] 何江,米娜,匡运臣,等.黄河沉积物对稀土元素的吸附特性研究[J].环境科学学报,2004,24(4):607-612.
- [2] 何江,米娜,匡运臣,等.黄河包头段水环境中稀土元素的形态及分布特征[J].环境科学,2004,25(2):61-66.
- [3] 李金霞,王继仁,程莉.稀土尾矿坝毗邻区大型土壤动物与土壤因子关系研究[J].干旱区资源与环境,2010,24(10):171-177.
- [4] LI Jinxia,HONG Mei,YIN Xiuqin,et al.Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community[J].Journal of the Rare Earths,28(2010)6:957-963.
- [5] 黄红兰,曾斌,王胜,等.赣州市农业面源污染的区域空间分异性研究[J].江西农业大学学报,2010,32(4):835-841.
- [6] 王振平,余辉,汪怀建,等.大港河小流域土地利用方式对土壤肥力影响的研究[J].江西农业大学学报,2011,33(5):1017-1022.
- [7] 徐清,刘晓端,汤奇峰,等.包头市表层土壤多元素分布特征及土壤污染现状分析[J].干旱区地理,2011,34(1):91-99.
- [8] 张杰,赵小敏,郭大千,等.基于生态足迹法的吉安市生态承载力研究[J].江西农业大学学报,2010,32(4):829-834.
- [9] 揣小伟,黄贤金,王倩倩.基于循环经济的区域土地可持续利用评价研究[J].江西农业大学学报,2009,31(1):166-172.
- [10] 郭鹏然,贾晓宇,段太成,等.稀土工业污染土壤对外源钐的吸附行为研究[J].环境科学,2009,30(10):3060-3066.
- [11] 张庆辉,王贵.包头市郊区农用地表层土壤重金属锌含量的调查与评价[J].安徽农业科学,2008,36(11):4674-4675.
- [12] 张成龙,邬光剑,高少鹏.青藏高原砂质表土样品稀土元素特征的初步探讨[J].冰川冻土,2008,30(2):261-262.
- [13] Boynton W V.Cosmochemistry of the rare earth elements:meteorite studies [M]//Henderson P.Rare Earth Element Geochemistry.Amsterdam:Elsevier,1984:63-114.
- [14] 丁士明,梁涛,张自立,等.稀土对土壤的生态效应研究进展[J].土壤,2004,36(2):157-163.
- [15] 朱永懿,陈景信,宋桂兰.小麦对稀土元素吸收、分布及积累规律的研究[J].中国稀土学报,1987,5(2):61-65.
- [16] 刘亚力,刘俊华,王子健,等.外源稀土在土壤中的形态转化研究[J].环境化学,1999,18(5):393-397.
- [17] 黄圣彪,李德成,王东红,等.外源稀土在土壤中各形态的动态变化[J].环境科学,2002,23(2):117-119.
- [18] 耿安朝,章申.稀土元素与腐殖酸在水合氧化铁体系中的吸附机制[J].暨南大学学报:自然科学版,2006,27(1):99-101.
- [19] Mélanie Davranche,Malgorzata Grybos,Gérard Gruau,et al.Rare earth element patterns:A tool for identifying trace metal sources during wetland soil reduction[J].Chemical Geology,284(2011)127-137.

#### (上接第 602 页)

- [3] 周善,赵立文,雒丽娜.GC-MS-MS 测定蔬菜中八种有机磷农药[J].环境化学,2006,25(6):683-687.
- [4] 魏立青,郭杰,蒋华宇,等.自动故乡微萃取 (SPME) GC-MS、GC-MS-MS 法检测环境水中有机磷杀虫剂的研究[J].分析测试学报,2004,23(S1):226-230.
- [5] Leonards P E G, Brinkman U A T, Cofino W P.The use of gas chromatography with ion-trap MS/MS detection for the determination of planar PCBs in biota and sediment[J].Chemosphere,1996,32(12):2381-2387.
- [6] 张景明,胡冠九,周春宏,等.多氯联苯的气相色谱/质谱/质谱 (GC/MS/MS) 法测定[J].中国环境监测,2003,19(3):5-8.
- [7] Mosi A A, Reier K J, Eigendorf G K.Analysis of polyaromatic quinones in a complex environmental matrix using gas chromatography ion trap tandem mass spectrometry[J].Talanta,1997,44(6):985-1001.
- [8] Temes T A, Aandersen H, Gilberg G D.Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS[J].Anal Chem,2002,74(14):3498-3504.
- [9] 王宇晓,许书学.新型减肥药利莫那班的离子阱质谱和电子轰击质谱研究[J].分析测试学报,2007,26(S1):50-52.
- [10] 朱天强,杨华,王冰,等.氯代血红素的多极质谱研究 (MS1~MS7) [J].分析测试学报,2004,23(5):78-81.
- [11] 沈敏,沈保华,向平.GC/MS/MS 法在头发中毒品及其代谢物的筛选分析中的应用[J].质谱学报,2002,23(1):11-16.
- [12] 袁菊红,胡锦好,夏冰.石蒜属不同种间生物碱含量差异性研究[J].江西农业大学学报,2010,32(3):560-565.
- [13] 陈志慧,宋光泉,周家容.酸性染料比色法测定断肠草总生物碱的含量[J].江西农业大学学报,2006,28(3):440-443.
- [14] 周兵,刘国伟,闫小红,等.碎米莎草根总生物碱的化感活性及抑菌活性的研究[J].江西农业大学学报,2009,31(1):85-90.
- [15] 丁丽,盛良全,童红武,等.溶剂萃取-毛细管气相色谱法测定烟草中主要生物碱[J].分析化学,2004,32(9):1161-1164.