

## 气-质联用(GC/MS)法测定烟草生物碱的方法优化

肖遂, 周冀衡\*, 杨虹琦, 彭艳, 柳立, 尹光庭

(湖南农业大学 烟草科学与健康重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 采用气相色谱-质谱法(GC/MS), 通过优化相关技术参数建立了能够快速准确测定烟草中烟碱和微量生物碱(降烟碱、麦斯明、假木贼碱和新烟草碱)含量的方法。经正交试验确定了超声提取和有机溶剂萃取前处理方法的最佳条件, 结果表明: 烟碱、降烟碱、麦斯明和假木贼碱的线性范围分别为 20~600、30~300、3.2~12、16~60 mg/L, 检测限分别为 0.11、0.09、0.02 和 0.04 mg/kg, 回收率介于 88.5%~105.4%, 相对标准偏差( $n=5$ )介于 2.4%~9.2%。该方法具有检测烟草生物碱灵敏度高和重现性好的特点, 且操作简便, 解决了已有方法存在的生物碱各个组分提取不完全和含量极低的麦斯明检测效果不理想等问题。

**关 键 词:** 气相色谱-质谱法; 烟草; 生物碱

中图分类号: S572; Q946.88 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0022-04

## An improvement of method for tobacco alkaloids determination by chromatography-mass spectrometry

XIAO Sui, ZHOU Ji-heng\*, YANG Hong-qi, PENG Yan, LIU Li, YIN Guang -ting

(Key Laboratory of Tobacco Science and Health, HNAU, Changsha 410128, China)

**Abstract:** A quick and efficient method for simultaneous determination of nicotine, normicotine, myosmine, anabasine and anatabine by GC-MS was developed. The optimum conditions of ultrasonic extraction and organic solvent extraction were radicated by the orthogonal design and volume of the extraction solvent was optimized. Regression function, recovery and precision of the method were reviewed. The results show that the linear ranges of nicotine, normicotine, myosmine and anabasine were 20—600, 30—300, 3.2—12 and 16—60 mg/L, respectively, and the detection limits were 0.11, 0.09, 0.02 and 0.04 mg/kg, respectively. The recoveries were in the range of 88.5%—105.4% and the method precisions were in the range of 2.4%—9.2%. The test shows that the method comes on with high sensitivity, good precision good reproductibility and convenient operation. The method has solved the problem that alkaloids extraction was imperfect and the myosmine detection was ineffective.

**Key words:** GC-MS; tobacco; alkaloids

烟草生物碱是评价烟草及其制品感官质量的重要指标<sup>[1]</sup>。目前, 中国对烟叶生物碱的组成含量研究还不系统, 主要是由于其中的微量生物碱含量极低, 运用常规方法无法准确检测, 使用气相色谱-质谱联用(GC/MS)法是解决这一问题的有效方法, 该技术在烟草生物碱的分析测定中的应用已有相关报道<sup>[2-5]</sup>。但目前已有的方法在提取分离的相关技术参数上并无系统研究, 存在不能确保烟叶生物碱各个组分完全提取和对含量极低的麦斯明检测效果不理想等问题, 需要优化提取分离技术和测定方

法的相关技术参数, 建立起准确、快捷、可靠的检测方法。笔者对气-质联用(GC/MS)法测定烟草生物碱的方法进行了优化, 现将结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材 料

供试烟叶为云南省大理弥渡样品。

美国Agilent公司6850-5975C气相色谱-质谱联用仪, 配自动进样器; 意大利Finnigan公司Trace GC ultra气相色谱仪, 配自动进样器; MS条件: 电离方式为

收稿日期: 2009-09-20

作者简介: 肖遂(1984-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事烟草化学研究, xiaosui@yahoo.cn; \*通讯作者, jhzhou2005@163.com

电子轰击(EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 连接管温度 280 °C, 溶剂延迟 3 min, 采用全扫描方式(Scan); 升温程序: 初温 90 °C, 以 15 °C/min 升至 140 °C, 保持 20 min, 再以 15 °C/min 升至 260 °C, 保持 5 min. GC 条件: DB-5MS 色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度 250 °C; 氢火焰离子检测器温度 280 °C. 载气为高纯氮(纯度>99.999%), 流速 2.0 mL/min; 不分流进样. 升温程序同上.

郑州长城科工贸有限公司 R201D-II 旋转蒸发仪, KQ-100DE 型数控超声波(昆山市超声仪器有限公司).

NaOH、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、无水硫酸钠均为分析纯试剂(国药集团化学试剂有限公司); 烟碱、降烟碱、麦斯明、假木贼碱等标样均购于美国 SIGMA 公司, 纯度>98%.

## 1.2 方法

### 1.2.1 生物碱提取分离技术的优化

(1) 提取方法的正交优化<sup>[6-7]</sup>. 样品提取分离过程中 NaOH 溶液的浓度(A)、NaOH 溶液的用量(B)、浸泡时间(C)和超声时间(D)是影响被分析物是否被提取完全的主要因素. 采用正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)(表 1)法, 准确称取 0.5 g 样品置于 100 mL 带塞三角瓶中, 加 10 μL 喹啉(5 mg/mL)内标, 按表 1 加入 NaOH 溶液, 浸泡一定时间后超声, 超声后离心取上清液, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取 3 次, 合并有机层, 加少量无水硫酸钠, 放置冰箱中冷藏过夜, 用旋转蒸发仪于 45 °C 水浴中将萃取液浓缩至 1 mL, 进行 GC 分析, 记录选定的烟碱、降烟碱、麦斯明、假木贼碱和新烟草碱 5 个组分的峰面积之和. 正交试验结果采用 DPS V2.00 统计软件进行分析.

(2) 萃取溶剂体积的确定. 在其他前处理条件不变的情况下, 考察不同萃取溶剂体积(10、15、20、25、30 mL(萃取 3 次))对萃取量的影响, 进行 GC 分析, 记录选定的烟碱、降烟碱、麦斯明、假木贼碱和新烟草碱 5 个组分的峰面积之和.

### 1.2.2 GC-MS 测定烟叶生物碱含量

(1) 生物碱的定性定量. 采用 GC-EI/MS 全扫描方式(Scan)对烟草生物碱进行定性. 内标法相对定量, 由于新烟草碱无标样, 利用保留时间与之

相近的假木贼碱响应因子定量.

(2) 线性回归方程及检测限的确定. 准确量取烟碱 24.75 μL 溶于 1 mL 二氯甲烷, 配成 25 mg/mL 的烟碱标准液; 准确称取降烟碱 25 mg 溶于 1 mL 二氯甲烷, 再量取 80 μL 溶于 1 mL 二氯甲烷, 配成 2 mg/mL 的降烟碱标准储备液; 分别准确称取麦斯明、假木贼碱各 25 mg 溶于 1 mL 二氯甲烷, 再各量取 40 μL 溶于 1 mL 二氯甲烷, 配成 1 mg/mL 的麦斯明和假木贼碱标准储备液. 分别准确移取上述烟碱、降烟碱、麦斯明和假木贼碱的标准储备液 80、500、40、200 μL, 再定容至 1 mL, 配成混标母液. 取混标母液 300、200、100、80、60、40、20、10 μL, 各加入 10 μL 喹啉(5 mg/mL)内标, 再定容至 1 mL, 制备成系列标准溶液. 按色谱条件测定, 以分析物峰面积和内标峰面积的比(Y)对相应的质量浓度(X)(μg/mL)进行线性回归; 将逐级稀释的标准溶液分别进样 1 μL, 以 3 倍基线噪声作为检出限.

(3) 回收率及重现性试验. 将烟碱、降烟碱、麦斯明和假木贼碱的标样分别配制成高、中、低 3 个浓度添加到样品中, 样品生物碱含量及添加标样量见表 4. 每个添加浓度重复 5 次, 计算各生物碱的平均回收率和相对标准偏差, 以分别考察方法的准确度和精密度.

### 1.2.3 样品测定

取已知烟碱含量(常规方法检测<sup>[8]</sup>)的样品 5 份, 烟碱含量为 1.80%~4.05%, 其含量范围符合优质烤烟烟碱含量标准, 每份样品测定 3 次, 记录样品中不同生物碱组分峰面积的 RSD.

## 2 结果与分析

### 2.1 生物碱提取的最佳条件

正交试验结果(表 1)表明, 各因素对试验结果影响的强弱次序为 B、C、A、D, 较优的水平组合为 A<sub>4</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, 即用 2 mol/L 的 NaOH 溶液 40 mL, 浸泡样品 3 h 后再超声提取 1 h, 得到样品各组分的峰面积之和最大.

不同的萃取溶剂体积对萃取量的影响结果表明, 当萃取溶剂体积由 10 mL 增加到 20 mL 时, 各生物碱组分峰面积之和随着萃取溶剂体积的增加

而大幅增加,而由 20 mL 增加到 30 mL 时各生物碱组分峰面积之和略有下降,这可能是由于萃取溶剂体积过大导致浓缩步骤对目标成分造成少量损

失. 为确保各个组分提取完全,选取 20 mL 作为最佳的萃取溶剂体积.

表 1 正交试验结果

Table 1 Results of the orthogonal test

| 编号    | A/mol·L <sup>-1</sup> | B/mL           | C/h            | D/min          | 总峰面积       |
|-------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| 1     | 1                     | 30             | 1              | 30             | 29 434 316 |
| 2     | 1                     | 40             | 2              | 45             | 52 999 487 |
| 3     | 1                     | 50             | 3              | 60             | 62 208 538 |
| 4     | 2                     | 30             | 2              | 60             | 54 711 588 |
| 5     | 2                     | 40             | 3              | 30             | 75 013 935 |
| 6     | 2                     | 50             | 1              | 45             | 52 404 353 |
| 7     | 4                     | 30             | 3              | 45             | 49 711 910 |
| 8     | 4                     | 40             | 1              | 60             | 61 238 233 |
| 9     | 4                     | 50             | 2              | 30             | 39 656 993 |
| $K_1$ | 144 642 341           | 133 857 814    | 143 076 902    | 144 105 244    |            |
| $K_2$ | 182 129 876           | 189 251 655    | 147 368 068    | 155 115 750    |            |
| $K_3$ | 150 607 136           | 154 269 884    | 186 934 383    | 178 158 359    |            |
| $k_1$ | 48 214 114            | 44 619 271     | 47 692 301     | 48 035 081     |            |
| $k_2$ | 60 709 959            | 63 083 885     | 49 122 689     | 51 705 250     |            |
| $k_3$ | 50 202 379            | 51 423 295     | 62 311 461     | 59 386 120     |            |
| $R$   | 12 495 845            | 18 464 614     | 14 619 160     | 11 351 038     |            |
| 最优水平  | A <sub>4</sub>        | B <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | D <sub>3</sub> |            |

## 2.2 定性定量结果及检出限

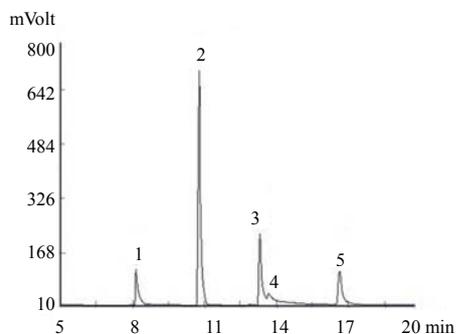
经 GC-MS 分析鉴定,各生物碱的保留时间及匹配度见表 2,得到标准样品总离子流图(图 1)和样品总离子流图(图 2).线性回归方程、相关系数及检出限见表 2.结果表明:各生物碱呈现较好峰型,

无重叠无拖尾,匹配度均达到定性要求,且当烟碱、降烟碱、麦斯明和假木贼碱的质量浓度分别为 20~600、30~300、3.2~12.0、16~60 mg/L 时,呈现良好的线性关系.

表 2 各生物碱的定性定量分析结果

Table 2 Qualitative and quantitative investigation of alkaloids

| 烟草生物碱 | 保留时间/min | 匹配度 | 回归方程                                | $R^2$   | 检出限/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-------|----------|-----|-------------------------------------|---------|----------------------------|
| 烟碱    | 10.772   | 97  | $Y=0.015\ 710\ 29X - 0.187\ 781\ 0$ | 0.998 6 | 0.11                       |
| 降烟碱   | 13.228   | 95  | $Y=0.051\ 282\ 22X - 2.133\ 588\ 0$ | 0.999 8 | 0.09                       |
| 麦斯明   | 13.595   | 86  | $Y=0.038\ 262\ 08X - 0.149\ 195\ 8$ | 0.999 9 | 0.02                       |
| 假木贼碱  | 16.477   | 93  | $Y=0.040\ 478\ 02X - 0.172\ 022\ 1$ | 0.999 9 | 0.04                       |



1 喹啉(内标); 2 烟碱; 3 降烟碱; 4 麦斯明; 5 假木贼碱; 6 新烟草碱. 图 2 同.

图 1 生物碱混合标准液总离子流色谱图  
Fig.1 Total ion chromatogram of standard samples

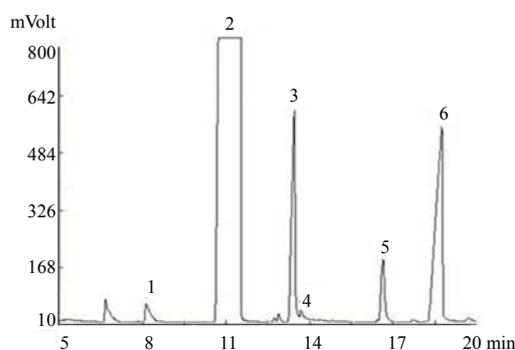


图 2 样品生物碱总离子流色谱图  
Fig.2 Total ion chromatogram of tobacco sample

### 2.3 回收率和重现性

回收率和重现性试验结果(表3)表明,各生物碱质量浓度在5.1~14 650  $\mu\text{g/mL}$ 时,加标回收率为88.5%~105.4%, $RSD$ 为2.4%~9.2%,说明本方法的重复性较好,准确度和精密度均符合分析要求。

表3 方法的添标回收率和精密度 ( $n=5$ )

Table 3 Recovery and precision of the method ( $n=5$ )

| 烟草生物碱 | 样品含量    | 标准添加量 | 检测值      | 平均回收率 | $RSD$ |
|-------|---------|-------|----------|-------|-------|
|       | /mg     | /mg   | /mg      | /%    | /%    |
| 烟碱    | 14.51   | 5     | 19.78    | 105.4 | 2.4   |
|       | 14.43   | 10    | 24.58    | 101.5 | 5.9   |
|       | 14.45   | 15    | 28.97    | 96.8  | 6.7   |
| 降烟碱   | 0.362   | 0.1   | 0.466    | 104.0 | 8.9   |
|       | 0.357   | 0.2   | 0.544    | 93.5  | 9.2   |
|       | 0.361   | 0.3   | 0.634    | 91.0  | 4.2   |
| 麦斯明   | 0.005 4 | 0.002 | 0.007 19 | 89.5  | 7.5   |
|       | 0.005 3 | 0.005 | 0.009 92 | 92.4  | 8.2   |
|       | 0.005 1 | 0.010 | 0.014 64 | 95.4  | 5.3   |
| 假木贼碱  | 0.061   | 0.02  | 0.078 7  | 88.5  | 5.7   |
|       | 0.058   | 0.05  | 0.104 0  | 92.0  | 3.1   |
|       | 0.061   | 0.10  | 0.158 9  | 97.9  | 3.3   |

### 2.4 样品的测定结果

由表4可知,5份样品的烟碱占总生物碱含量平均为95.4%。微量生物碱的含量从大到小依次为新烟草碱、降烟碱、假木贼碱、麦斯明,其检测的含量范围和各组分含量所占比例与已有报道<sup>[9-11]</sup>基本一致。另外,同一样品的3次测定结果在不同组分的峰面积的 $RSD$ 平均值小于9.6%,说明该方法能有效地应用于生物碱含量差异明显的烟叶样品检测。

表4 烟叶样品生物碱含量测定

Table 4 The alkaloids content of flue-cured tobacco samples  $n=3$

| 样品编号 | 生物碱质量分数/% |       |          |         |       | $RSD$ /% |
|------|-----------|-------|----------|---------|-------|----------|
|      | 烟碱        | 降烟碱   | 麦斯明      | 假木贼碱    | 新烟草碱  |          |
| 1    | 1.80      | 0.039 | 0.000 99 | 0.004 7 | 0.059 | 7.1      |
| 2    | 2.20      | 0.037 | 0.000 79 | 0.005 4 | 0.061 | 7.8      |
| 3    | 2.58      | 0.044 | 0.001 02 | 0.007 1 | 0.065 | 6.3      |
| 4    | 2.77      | 0.032 | 0.000 81 | 0.005 4 | 0.069 | 5.8      |
| 5    | 4.05      | 0.077 | 0.001 58 | 0.012 2 | 0.117 | 9.6      |

## 3 结 论

通过试验对影响超声提取和有机溶剂萃取的几个关键因素的参数进行了优化,得到的优化条件是:用2 mol/L的NaOH溶液40 mL,浸泡样品3 h后超声提取1 h,再分别用20 mL二氯甲烷萃取3

次,浓缩至1 mL进GC-MS分离鉴定。样品添加标样回收率测定的不同组分峰面积 $RSD$ 平均值小于9.2%,说明所建立方法的重现性较好。应用优化的分析技术对烟碱含量为1.80%~4.05%的5份样品进行生物碱组成和含量分析,证明该技术可较好地检测出生物碱含量差异明显的烟叶样品中的烟碱、降烟碱、麦斯明、假木贼碱和新烟草碱, $RSD$ 平均值小于9.6%。该方法具有检测烟草生物碱灵敏度高和重现性好的特点,且操作简便,能确保烟叶生物碱各个组分提取完全,可有效应用于烟草生物碱的分析检测。

### 参考文献:

- [1] 明宁宁,郭俊成,刘强,等.烟草中生物碱的提取和分析方法研究进展[J].中国烟草学报,2007,13(6):64-70.
- [2] 侯英,杨伟祖,陈章玉,等.应用SPME与GC/MS测定烟叶中的生物碱[J].云南化工,2003,30(2):34-37.
- [3] 许燕娟,白长敏,钟科军,等.气相色谱/质谱分析烟草中的主要生物碱[J].分析化学,2006,34(3):382-384.
- [4] 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.
- [5] 廉芸芸,王允白,邱军,等.不同产区烤烟中主要生物碱含量和组成比例分析[J].中国烟草科学,2008,29(4):6-9.
- [6] 侯英,杨蕾,王保兴,等.应用搅拌棒吸附萃取-热脱附-气相色谱-质谱分析烟用香料的化学成分[J].色谱,2006,24(11):601-605.
- [7] 慕俊泽,李宣,张斌,等.气相色谱法测定纺织品中的三种有机磷阻燃剂[J].色谱,2007,25(5):389-391.
- [8] 史宏志.烟草生物碱[M].北京:中国农业出版社,2004:40-42.
- [9] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003:52-56.
- [10] 高志强,邓小华,周清明,等.湖南烤烟生物碱含量及其相关性分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(3):288-293.
- [11] 周冀衡,肖志新,杨虹琦,等.不同品种烤烟主要品质和安全性指标分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(6):640-642.

责任编辑:娄 敏

英文编辑:罗文翠