

doi: 10.11857/j.issn.1674-5124.201810096



液相色谱-串联质谱法同时测定烟草中的肌醇和奎尼酸

张廷贵, 邓其馨, 林艳, 周培琛, 张鼎方, 刘江生,
刘泽春, 许寒春

(福建中烟工业有限责任公司技术中心, 福建 厦门 361022)

摘要: 建立同时测定烟草中肌醇和奎尼酸的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法。采用 0.1 mol/L 的乙酸铵水溶液对烟末进行超声提取后, 经 0.22 μm 水相滤膜过滤后直接进行 LC-MS/MS 分析。结果表明: 肌醇在 0.11~25 mg/g 和奎尼酸在 0.18~25 mg/g 范围内, 线性相关系数均 $\geq 0.999 0$ 。肌醇的回收率在 95.9%~98.6% 之间, 相对标准偏差(RSD)小于 1.9% ($n=6$); 奎尼酸的回收率在 95.2%~97.4% 之间, 相对标准偏差(RSD)小于 2.1% ($n=6$)。肌醇的方法检出限(LOD)为 0.035 mg/g, 定量限(LOQ)为 0.11 mg/g; 奎尼酸的方法检出限(LOD)为 0.055 mg/g, 定量限(LOQ)为 0.18 mg/g。该方法准确、灵敏, 适用于烟草中肌醇和奎尼酸的测定。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 烟草; 肌醇; 奎尼酸

中图分类号: O657.63; TS411

文献标志码: A

文章编号: 1674-5124(2019)07-0061-05

Simultaneous determination of inositol and quinic acid in tobacco with liquid chromatography tandem mass spectrometry

ZHANG Tinggui, DENG Qixin, LIN Yan, ZHOU Peichen, ZHANG Dingfang, LIU Jiangsheng,
LIU Zechun, XU Hanchun

(Technology Center, China Tobacco Fujian Industrial Co., Ltd., Xiamen 361022, China)

Abstract: The aim was to establish a high performance liquid chromatography trap tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for simultaneous determination inositol and quinic acid in tobacco. The sample was extracted by 0.1 mol/L ammonium acetate-water solution, and the extract was directly analyzed by LC-MS/MS after filtering with a 0.22 μm aqueous phase filtration membrane. The results showed that the linear correlation coefficient of inositol was above 0.999 0 in the range of 0.11~25 mg/g, and the recovery of inositol was from 95.9 % to 98.6 %, the relative standard deviations (RSDs) lower than 1.9% ($n=6$); the linear correlation coefficient of quinic acid was above 0.999 0 in the range of 0.18~25 mg/g, the recovery of quinic acid was from 95.2 % to 97.4 %, the relative standard deviations (RSDs) lower than 2.1% ($n=6$). The limit of

收稿日期: 2018-10-21; 收到修改稿日期: 2018-11-26

基金项目: 中国科协青年人才托举工程 CAST (2016QNRC001)

作者简介: 张廷贵(1985-), 男, 福建龙岩市人, 工程师, 主要从事烟草化学研究。

通信作者: 邓其馨(1984-), 男, 福建三明市人, 高级工程师, 硕士, 主要从事烟草化学研究。

detection (LOD) and limit of quantity (LOQ) of inositol were 0.035 mg/g and 0.11 mg/g, respectively; The LOD and LOQ of quinic acid were 0.055 mg/g and 0.18 mg/g, respectively. The method is verified with good efficiency, sensitivity and selectivity, and can be successfully applied insimultaneous determination of the inositol and quinic acid in varieties of tobacco samples.

Keywords: LC-MS/MS; tobacco; inositol; quinic acid

0 引言

肌醇和奎尼酸是广泛存在于中草药和烟草等植物中的天然含氧化合物^[1]。肌醇是一种水溶性维生素,是动物、微生物的生长因子,其分子式为 $C_6H_{12}O_6$,化学结构式为1,2,3,4,5,6-环己六醇^[2]。奎尼酸是植物在有氧呼吸过程中,经莽草酸途径形成的一种环状多羟基具有光学活性的化合物,其分子式为 $C_6H_7(OH)_4COOH$,化学结构式为1,3,4,5-四羟基环己烷-1-羧酸^[3]。据报道肌醇和奎尼酸的含量与烟草品质和吃味密切相关,并且与主流烟气中的苯酚含量具有显著的相关性^[4]。肌醇的检测方法有微生物法^[5]、高碘酸钾氧化法^[6]、高效液相色谱法^[7]、气相色谱法、气相色谱质谱法^[8-11]和液相色谱质谱法^[12-14]等。其中微生物法前处理过程复杂,高碘酸钾氧化法误差较大,高效液相色谱法对于成分复杂样品分离效果差,而液相色谱质谱法灵敏度高,适用于多种基质中肌醇的检测^[15]。刘泽春等^[16]利用高效液相结合二极管阵列检测器测定了烟用香精香料中的奎尼酸,王有志等^[17]利用高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定了双黄连粉针剂中的奎尼酸。由于奎尼酸的最大紫外吸收在201 nm且吸收很弱,因此HPLC/UV法不能检测到奎尼酸,而液相色谱质谱法选择性好、灵敏度高能很好的解决奎尼酸的检测问题。目前未见对烟草中奎尼酸检测方法报道。本文建立了同时测定肌醇和奎尼酸的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,为烟草中肌醇和奎尼酸的分析测定和配方研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

肌醇(纯度 $\geq 99\%$)、奎尼酸(纯度 $\geq 98\%$)、乙酸铵(纯度 $\geq 98\%$)、醋酸(色谱纯)、甲醇(色谱纯),购自百灵威科技有限公司。

Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);三重四级杆质谱仪 QTRAP 5500(美国 AB SCIEX 公司);AG104 电子天平(感量:0.000 1 g,瑞

士 Mettler Toledo 公司);GFL3017 型台式旋转振荡器(德国 Gesellschaft 公司);Human 型超纯水系统(北京普析通用仪器有限责任公司);0.22 μm 水相滤膜(美国 Dionex 公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准工作溶液配制

分别准确称取 0.1 g 肌醇和奎尼酸于 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.1 mol/L 乙酸铵水溶液溶解和定容,配制成 1 mg/mL 标准储备液。用 0.1 mol/L 乙酸铵水溶液将标准储备液稀释为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、30.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度的肌醇和奎尼酸混合标准工作溶液。

1.2.2 样品溶液配制

准确称取 0.1 g 烟末样品,置于 150 mL 磨口三角瓶中,准确加入 50 mL 0.1 mol/L 的乙酸铵水溶液,超声振荡 30 min,经 0.22 μm 水相滤膜过滤后直接进样分析。

LC-MS/MS 条件为:色谱柱:菲罗门 Luna 5u C18 色谱柱(150.0 mm \times 3.9 mm, 5 μm);流动相:A. 甲醇, B. 0.1% 醋酸水溶液;等度洗脱:0~5 min, 1% A;流量:0.8 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:5 μL ;离子源:电喷雾电离源(ESI);扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:-4 500 V;离子源温度:550 $^{\circ}\text{C}$;辅助气(氮气) Gas1 压力:413.70 kPa(60 psi);辅助气(氮气) Gas2 压力:344.75 kPa(50 psi);去簇电压(DP):-40 V;定量离子对(m/z)和碰撞能见表 1。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

肌醇和奎尼酸的总离子流图(TIC)如图 1 所示,由图 1 可知,采用 Luna 5u C18 色谱柱对肌醇和奎尼酸进行分离时,分离度 >2 ,色谱峰的峰形较好,且在实际样品的检测中没有出现杂峰干扰。此外,本文比较了纯水和 0.1% 醋酸作为流动相。采用纯

表 1 肌醇和奎尼酸的质谱参数¹⁾

目标物	定量离子对	定性离子对	碰撞能/V
肌醇	179/87	179/59	-25
奎尼酸	191/93	191/85	-20

注: 1) 定量、定性离子对为母离子/子离子。

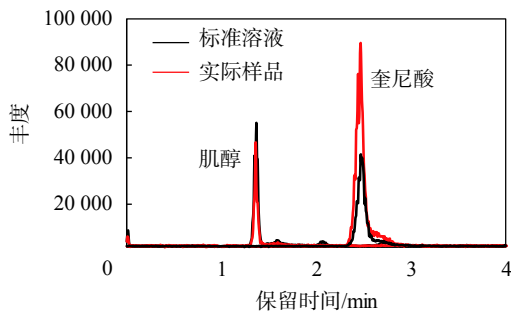


图 1 标准溶液与实际样品中肌醇和奎尼酸的 TIC 图

水作为流动相时, 奎尼酸不出峰, 且肌醇的峰强度较低, 而采用 0.1% 醋酸作为流动相时, 色谱峰型较好, 响应值较高。因此采用 0.1% 醋酸作为流动相。

2.2 质谱条件的选择

取一定量肌醇和奎尼酸的混合标准储备液, 稀释 100 倍, 得到肌醇和奎尼酸浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液。采用流动注射法对该溶液直接进行 MS 分析, 根据肌醇和奎尼酸的分子结构特征, 选择电喷雾 (ESI) 离子源, 在负离子模式下分别对肌醇和奎尼酸进行一级质谱分析, 得到肌醇和奎尼酸的分子离子峰, 选择合适的分子离子峰进行二级质谱碎片分析, 得到子离子信息。结果见图 2、图 3。然后, 以肌醇为目标物, 固定其他参数, 调节电喷雾电压为 -3 500 V, -4 000 V, -4 500 V, 响应丰度分别为 1.69×10^5 , 1.75×10^5 , 1.83×10^5 , 因此选择电喷雾电压为 -4 500 V, 调节离子源温度为 500 $^{\circ}\text{C}$, 550 $^{\circ}\text{C}$, 600 $^{\circ}\text{C}$, 响应丰度分别为 1.77×10^5 , 1.83×10^5 , 1.80×10^5 , 因此选择离子源温度为 550 $^{\circ}\text{C}$ 。自动调节去簇电压从 -10 V 到 -70 V, 步长为 5 V, 响应丰度为 -40 V 时达到最大。奎尼酸的参数设定与肌醇一致。固定上述参数分别自动调节肌醇和奎尼酸的碰撞能, 从 -10 V 到 -70 V, 步长为 5 V, 响应丰度分别在 -25 V 和 -20 V 时达到最大。因此确定上述各参数。

2.3 前处理条件的确定

不同浓度乙酸铵水溶液萃取烟末样品的结果见图 4。用纯水作为萃取溶剂的萃取效率较低, 肌醇和奎尼酸的效率 (以峰面积表示) 约分别为

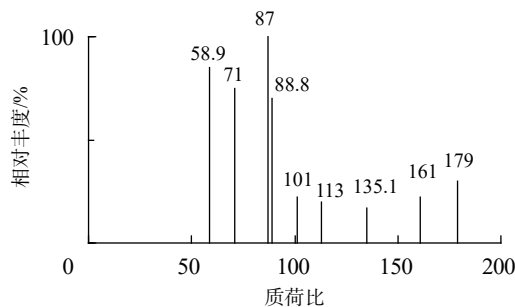


图 2 肌醇的质谱图

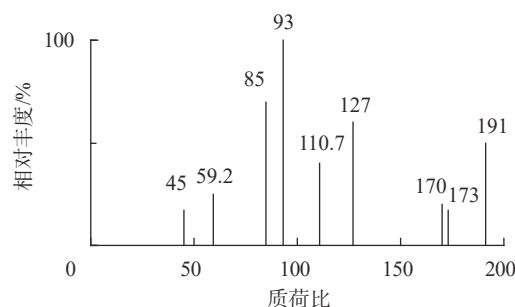


图 3 奎尼酸的质谱图

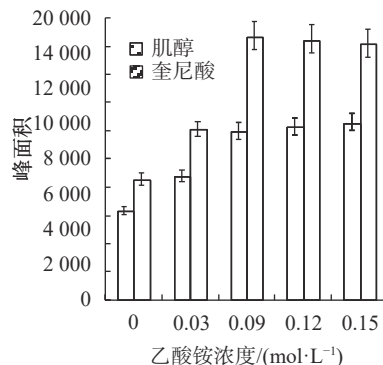


图 4 不同浓度乙酸铵萃取溶液的萃取效率

0.09 mol/L 乙酸铵体系效率的 50% 和 45%; 当乙酸铵浓度升高至 0.09 mol/L、0.12 mol/L 和 0.15 mol/L 时, 烟草粉末提取液中肌醇和奎尼酸的浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 因此选择 0.09 mol/L 乙酸铵为萃取溶剂。

2.4 工作曲线

按照 1.2 节所述条件对样品进行 LC-MS/MS 分析, 并以肌醇和奎尼酸的峰面积对其浓度值进行线性回归分析。空白样品连续测量 11 次, 计算标准偏差, 将 3 倍标准偏差记为方法的检出限, 将 10 倍标准偏差记为方法的定量限, 见表 2。可见本方法肌醇在 0.11~25 mg/g 和奎尼酸在 0.18~25 mg/g 检测范围内线性良好, 检出限和定量限能满足测定要求。

2.5 精密度和稳定性

精密性: 在相同条件下, 对同一样品平行测定

表2 肌醇和奎尼酸的线性方程、线性范围、相关系数、检测限和定量限

化合物	检测范围/(mg·g ⁻¹)	回归方程	r ²	检出限/(mg·g ⁻¹)	定量限/(mg·g ⁻¹)
肌醇	0.11~25	Y=613X+1 059	0.999 2	0.035	0.11
奎尼酸	0.18~25	Y=1 469X+952	0.999 3	0.055	0.18

6次。样品的肌醇含量结果为9.0, 9.1, 9.3, 9.2, 9.1, 9.3 mg/g, 相对标准偏差(RSD)为1.32%; 奎尼酸含量结果为5.1, 5.1, 5.3, 5.2, 5.2, 5.4 mg/g, 相对标准偏差(RSD)为2.24%, 表明方法的精密度高。

稳定性: 在相同条件下, 对同一样品的待测液, 在室温分别存放0, 12, 24 h后进行测定, 结果见图5。由图5可见, 样品按照上述方法处理后, 待测液中的肌醇和奎尼酸含量在24 h内稳定。

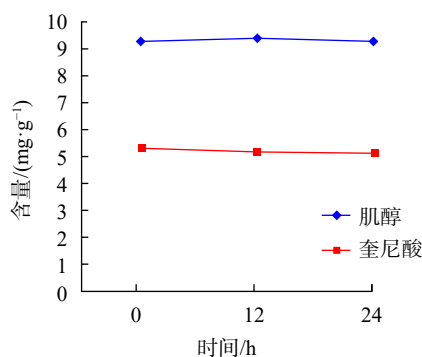


图5 不同存放时间肌醇和奎尼酸的含量变化

2.6 回收率

对同一烟末样品, 在固体烟叶粉末中分别添加5.0 mg/g、10.0 mg/g、20.0 mg/g 3种浓度水平的肌醇标样和1.0 mg/g、5.0 mg/g、10.0 mg/g 3种浓度水平的奎尼酸标样, 按照1.2节的方法对3个浓度水平的样品重复测定6次, 如表3所示。结果发现肌醇回收率在95.9%~98.6%之间, 相对标准偏差(RSD)在1.4%~1.9%之间; 奎尼酸回收率在95.2%~97.4%之间, 相对标准偏差(RSD)在1.7%~2.1%之间。可见方法的回收率和重复性较好, 可以满足样品的检测要求。

2.7 实际样品分析结果

本文采用建立的液相色谱串联质谱法测定了不同产区不同部位单料烟肌醇和奎尼酸的含量。结果(见表4)表明: 1) 肌醇的含量在6.0~10.9 mg/g之间, 奎尼酸的含量在1.1~6.7 mg/g之间。肌醇的含量高于奎尼酸的含量。2) 1[#]、3[#]产地烟叶中肌醇和奎尼酸的含量上部烟高于下部烟, 2[#]产地烟叶中肌醇和奎尼酸的含量下部烟高于上部烟。

表3 肌醇和奎尼酸的回收率 (n=6)

目标物	样品测定值/(mg·g ⁻¹)	理论加入量/(mg·g ⁻¹)	实际测量值/(mg·g ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
肌醇	9.3	5.0	13.8	96.5	1.9
		10.0	18.5	95.9	1.7
		20.0	28.9	98.6	1.4
奎尼酸	5.2	1.0	5.9	95.2	2.1
		5.0	9.8	96.1	2.0
		10.0	14.8	97.4	1.7

表4 不同产区不同部位单料烟肌醇和奎尼酸的含量

样品	肌醇含量/(mg·g ⁻¹)	奎尼酸含量/(mg·g ⁻¹)
产地1 [#]	上部	6.0
	中部	7.3
	下部	5.9
产地2 [#]	上部	6.1
	中部	8.9
	下部	8.8
产地3 [#]	上部	10.9
	中部	10.2
	下部	8.3

3 结束语

本研究主要考察了不同类型和浓度萃取液对烟草中肌醇和奎尼酸的提取效率, 优化液相色谱-串联质谱检测方法中的色谱参数和质谱参数, 建立了同时测定肌醇和奎尼酸的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。实际样品测试结果表明该方法前处理简便, 灵敏度和准确性高, 重复性好, 分析速度快, 大大提高了检测效率, 适用于烟草中肌醇和奎尼酸含量的测定。

参考文献

- [1] SERBAN C M, MICHAEL F D. Formation of dihydroxybenzenes in cigarette smoke[J]. Contributions to Tobacco Research, 2012, 25(2): 396-408.
- [2] 杨保刚, 麦成华, 张辉. 气相色谱法测定化妆品中肌醇的含量[J]. 香精香料化妆品, 2011(3): 33-34.
- [3] 刘礼兵, 徐琪寿. 奎尼酸的生物合成与应用[J]. 生物技术通

- 讯, 2005, 16(6): 693-695.
- [4] SERBAN C M, MICHAEL F D. Analysis of quinic acid and of myo-Inositol in tobacco[J]. *Contributions to Tobacco Research*, 2012, 25(4): 499-506.
- [5] 周敏, 陈亚波, 杨彤. 微生物法测定维生素功能饮料中的肌醇含量[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(7): 2123-2015.
- [6] ANAB B, ROSA MJ, ROSAM A. Simultaneous determination of five 1, 4-dihydropyridine sinpharmaceutical for mutations by high-performance liquid chromatography amperometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1031(1-2): 275-280.
- [7] 刘珊珊, 吴琼珠. 高效液相色谱法测定赖氨酸肌醇维 B12 口服溶液中维生素 B12 及肌醇的含量[J]. *药学与临床研究*, 2007, 15(5): 371-374.
- [8] 高树刚, 申书昌, 王文波, 等. 气相色谱法测定大豆磷脂中磷脂酰肌醇[J]. *理化检验-化学分册*, 2007, 43(12): 1020-1021.
- [9] 食品安全国家标准食品中肌醇的测定: GB 5009.270-2016[S]. 北京: 中国质检出版社, 2016.
- [10] JIN G, SHI YF, XU CB, et al. Data on the optimization of a GC-MS procedure for the determination of total plasma myo-inositol[J]. *Data Brief*, 2016(8): 1040-1043.
- [11] SUN S H, WANG H, XIE J P, et al. Simultaneous determination of rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, maltose in jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) extract: comparison of HPLC-ELSD, LC-ESI-MS/MS and GC-MS[J]. *Chem Cent J*, 2016(10): 25.
- [12] PERELLO J, ISERN B, COSTA-BAUZA A, et al. Determination of myo-inositol in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Lif Sci*, 2004, 802(2): 367-370.
- [13] KIM J, HOPPEL CL. Comprehensive approach to the quantitative analysis of mitochondrial phospholipids by HPLC-MS[J]. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Lif Sci*, 2013(912): 105-114.
- [14] JINHO S, JUNGMIN P, HAJUNG K, et al. Development of rapid analytical methods for inositol as a trace component by HPLC and LC-MS/MS in infant formula[J]. *Korean J Food Sci*, 2015, 35(4): 466-472.
- [15] 房子舒, 黄传峰. 食品中肌醇的检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 14-18.
- [16] 刘泽春, 黄朝章, 邓其馨, 等. 烟用香精香料中奎尼酸的测定[J]. *香料香精化妆品*, 2014, 10(4): 29-32.
- [17] 王有志, 罗奇志, 罗佳. 高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定双黄连粉针剂中奎尼酸的含量[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(2): 401-402.

(编辑:徐柳)

(上接第 45 页)

- [3] 耿烽, 王玉国, 左言言, 等. 铝合金地铁车内噪声测试及其响度分析[J]. *铁道科学与工程学报*, 2015(5): 1200-1204.
- [4] 马驰, 陈建峰, 叶永. 基于四元十字阵的分布式声源定位实验研究[J]. *传感器与微系统*, 2013, 32(11): 52-54.
- [5] 宋宫琨琨. 基于麦克风阵列的室内语音定位算法研究[D]. 南京: 南京信息工程大学, 2016.
- [6] 陆灏铭, 陈玮, 刘寿宝. 基于麦克风阵列的声源定位系统设计[J]. *传感器与微系统*, 2012, 31(4): 79-81.
- [7] 王太勇, 王正英, 胥永刚, 等. 基于 SVD 降噪的经验模式分解及其工程应用[J]. *振动与冲击*, 2005, 24(4): 96-98.
- [8] 高成文, 孙云鹏. 基于 Hankel 矩阵奇异值分解的变参数去噪方法实现及仿真分析[J]. *遥测遥控*, 2014, 35(1): 60-64.
- [9] 柴凯, 张梅军, 黄杰, 等. 基于奇异值分解 (SVD) 差分谱降噪和本征模函数 (IMF) 能量谱的改进 Hilbert-Huang 方法[J]. *科学技术与工程*, 2015, 15(9): 90-96.
- [10] 唐炬, 董玉林, 樊雷, 等. 基于 Hankel 矩阵的复小波-奇异值分解法提取局部放电特征信息[J]. *中国电机工程学报*, 2015, 35(7): 1808-1817.
- [11] 赵学智, 叶邦彦, 陈统坚. 奇异值差分谱理论及其在机床主轴箱故障诊断中的应用[J]. *机械工程学报*, 2010, 46(1): 100-108.
- [12] 王维, 张英堂, 徐章遂. 基于动态聚类的奇异值分解降噪方法研究[J]. *振动工程学报*, 2008, 21(3): 304-308.
- [13] 张超, 陈建军, 徐亚兰. 基于 EMD 分解和奇异值差分谱理论的轴承故障诊断方法[J]. *机械强度*, 2012, 34(2): 539-545.
- [14] 张前图, 房立清. 基于奇异值差分谱和对称极坐标法的轴承故障特征提取[J]. *机械设计与研究*, 2015(5): 58-61.
- [15] 姚艳丽, 吴震, 饶金涛, 等. 基于 EMD 与奇异值差分谱的侧信道信号特征提取[J]. *网络与信息安全学报*, 2016, 2(7): 69-75.
- [16] 邵克勇, 蔡苗苗, 李鑫. 基于小波分析及奇异值差分谱理论的滚动轴承故障诊断[J]. *制造业自动化*, 2013, 35(8): 79-82.
- [17] 铁道机车和动车组司机室噪声限值及测量方法: GB/T 3450-2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [18] 铁道部劳动卫生所起草. 铁路机车车辆辐射噪声测量: GB/T 5111-1995[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986.
- [19] 铁道部劳动卫生所. 铁道机车辐射噪声限值: GB 13669-1992[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [20] 张秀文, 刘岩, 杨冰, 等. 内燃机车司机室内部噪声特性分析[J]. *噪声与振动控制*, 2013, 33(6): 120-123.
- [21] 王龙. 内燃机车司机室噪声特性分析[J]. *机车车辆工艺*, 2013(5): 8-9.

(编辑:刘杨)