王冰，余晶晶，蔡君兰，等. LC-MS/MS法测定口含烟中的4种亚硝基氨基酸[J].中国烟草学报，2021，27（1）. WANG Bing, YU Jingjing, CAI Junlan, et al. Determination of four N-nitrosamino acids in oral smokeless tobacco products by LC-MS/MS [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2021, 27 (1). doi: 10.16472/j.chinatobacco.2020.110

LC-MS/MS 法测定口含烟中的 4 种亚硝基氨基酸

王冰，余晶晶，蔡君兰，王昇，刘克建，赵晓东，
刘绍锋，秦亚琼，谢复炜，王晓瑜*

中国烟草总公司郑州烟草研究院，郑州高新技术产业开封区枫杨街2号 450001

摘　要：建立了液相色谱 - 四级杆串接质谱（LC-MS/MS）测定口含烟中 N- 亚硝基肌氨酸（NSAR）、3-（N- 甲基亚硝基氨基）丙酸（MNPA）、4-（N- 甲基亚硝基氨基）丁酸（MNBA）、亚硝基氮杂环丁烷 -2- 羧酸（NAzCA）的分析方法。样品经水萃取，硅藻土液液萃取柱净化后浓缩，进 LC-MS-MS 分析。结果表明：① NSAR、NAzCA、MNPA、MNBA 的检出限分别为 5.0 ng/g、2.4 ng/g、5.7 ng/g、1.4 ng/g，日内精密度小于 6.5%，日间精密度小于 9.4%，回收率在 77.7%~111% 之间。②分析了国内外 14 种口含烟，胶基型和含化型制品未检出 4 种亚硝基氨基酸 ; 口含型样品中部分检出 NSAR、NAzCA，均检出 MNPA 及 MNBA, 含量范围分别为 ND~128.3 ng/g 、ND~141.6 ng/g 、1687.1~2424.1 ng/g、65.0~199.5 ng/g。该方法简单、准确，适用于口含烟中 4 种亚硝基氨基酸的分析。

关键词：亚硝基氨基酸；口含烟；LC-MS/MS

口含烟是一种重要的新型烟草制品，不产生烟气，又能满足尼古丁摄入的需求。随着全球控烟形势的日趋严峻，口含烟因其独特的使用方式逐渐成为烟草消费的重要补充形式以及国际烟草领域的重要发展趋势 [1-4]。目前市场上的口含烟主要有 3 类产品形式，分别为湿含烟（美式湿含烟 Moist snuff / 瑞典含烟 Snus）、含化型制品、胶基型制品；其核心成分仍然是烟草（包括烟丝、烟草碎片、烟草颗粒及烟末等）或烟草关键成分（如烟碱、烟草香味物质等）提取物 [5-6]。

在烟草加工过程和卷烟燃烧过程中共有 4 种类型的亚硝胺生成，它们包括：挥发性亚硝胺（VANs）、烟草特有亚硝胺（TSNAs）、非挥发性亚硝胺和 N- 亚硝基氨基酸 [7]。目前国内外展开了大量关于 TSNAs 测定及形成机理的研究 [8-9]，挥发性亚硝胺方面也有文献报道 [10-11]，但在国内尚未有烟草中亚硝基氨基酸方面的研究。

亚硝基氨基酸是由烟草中的氨基酸以及带有仲氨基的蛋白质发生亚硝化反应生成的。截止目前，口含烟中共有 11 种 N- 亚硝基氨基酸被测定出来，而其中 4 种 N- 亚硝基肌氨酸（N-Nitrososarcosine，NSAR）、3-（N- 甲基亚硝基氨基）丙酸（3-(N-methylnitrosamino) propionic acid，MNPA）、4-（N- 甲基亚硝基氨基）丁酸（4-(N-methylnitrosamino) butyric acid，MNBA）、亚硝基氮杂环丁烷 -2- 羧酸（Nitrosoazetidine-4-carboxylic acid，NAzCA）在动物实验中被确认为致癌物，可诱发小鼠肝癌、肺癌、膀胱癌、食道癌，被 IARC 列入无烟气烟草制品 28 种有害物质名单之中 [12-13]。国外对口含烟中 N- 亚硝基氨基酸的文献报道主要集中在 1985 年到 1999 年 [14-21]，主要采用重氮甲烷衍生 - 气相色谱 -TEA 方法对口含烟中 N- 亚硝基氨基酸含量及随存贮条件的变化进行了研究；重氮甲烷具有毒性、容易爆炸，且操作过程极为繁琐。1989 年，James 等研制了液相色谱与化

基金项目：中国烟草总公司标准预研项目“口含烟中主要有害及潜在有害物质分析方法体系研究”（312016AB0140）
作者简介：王冰（1979—），硕士，工程师，主要从事卷烟香味成分、烟气有害成分分析工作，Email：ycyjywb790211@sina.com
通讯简介：王晓瑜（1982—），Email：wangxiaoyu@iccas.ac.cn
收稿日期：2020-04-03；**网络出版日期**：2020-12-30

学发光检测器的接口[22]；1999 年，Cheng 等尝试使用离子对试剂高效液相色质谱检测 NSAR、NPRO、NTCA 及 NMTCA 四种亚硝基氨基酸[23]，从而为烟草中亚硝基氨基酸的分析提供了新的思路。

本文针对口含烟中重点关注的 NSAR、MNPA、MNBA 及 NAzCA，通过对前处理条件和仪器方法的优化，建立了一种简单、定量准确的 LC-MS-MS 分析方法。为了减少亚硝基氨基酸对口含烟吸食者健康可能造成的伤害，控制它们在口含烟中的含量提供了技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料、试剂和仪器

14 种市售口含烟样品。样品信息如表 1 所示。

表 1　14 种市售口含烟样品信息

Tab.1　Informations of 14 kinds of commercially available oral tobacco samples

编号	品牌及规格	口味	包装类型	分类
1	Copenhagen Wintergreen	冬青	散装粗丝	美式湿含烟
2	Copenhagen snuff	原味	散装细丝	美式湿含烟
3	Skoal Xtra Mint	薄荷	散装粗丝	美式湿含烟
4	Grizzly Wintergreen	冬青	散装细丝	美式湿含烟
5	金鹿（golden dear）	红茶	袋装	湿含烟
6	金鹿（golden dear）	冷冻	袋装	湿含烟
7	Camel snus	原味	袋装	美式湿含烟
8	Marlboro Tobacco Stick	薄荷	袋装	美式湿含烟
9	General classic white	原味	袋装	瑞典含烟
10	Thunder ultra Frosted	薄荷	袋装	瑞典含烟
11	Ariva Dissolvables	薄荷	药片状	含化型
12	Stonewall Dissolvables	冬青	药片状	含化型
13	stonewall	冬青	口香糖状	胶基型
14	Nicorette	香橙	口香糖状	胶基型

标准品：N- 亚硝基肌氨酸（N-Nitrososarcosine，NSAR）、3-（N- 甲基亚硝基氨基）丙酸（3-(N-methylnitrosamino) propionic acid，MNPA）、4-（N- 甲基亚硝基氨基）丁酸（4-(N-methylnitrosamino) butyric acid，MNBA）、亚硝基氮杂环丁烷 -2- 羧酸（Nitrosoazetidine-2-carboxylic acid，NAzCA）；N- 亚硝基肌氨酸 -d3（N-Nitrososarcosine，NSAR- d3）、3-（N- 甲基亚硝基氨基）丙酸 -d3（3-(N-methylnitrosamino) propionic acid，MNPA-d3）、4-（N- 甲基亚硝基氨基）丁酸 -d3（4-(N-methylnitrosamino) butyric acid，MNBA-d3）、亚硝基氮杂环丁烷 -2- 羧酸 -d5（Nitrosoazetidine-4-carboxylic acid，NAzCA-d5）（纯度≥ 98%，上海安谱公司）。

试剂：乙腈（色谱纯，美国 Dikma 公司）；乙酸（色谱纯，美国 Tedia 公司）；乙酸乙酯（色谱纯，美国 Dikma 公司）；甲酸（色谱纯，美国 Tedia 公司）。

净化柱：BIOTAGE isolute SLE（5mL）。

仪器：API55000 质谱仪（美国 AB SCIEX 公司）；Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Milli-Q50 超纯水仪（美国 MILLIPORE 公司）；KQ-700DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；CP2245 电子天平（感量：0.0001 g，德国 Sartorius 公司）；旋转蒸发仪（瑞士 BUCHI）。

1.2　样品前处理

对于胶基型口含烟，先称取 1 g 样本，加入 1 mL 正己烷分散样本；对于美式湿含烟、瑞典含烟含化型制品，直接称取 1 g 或 1 袋于 50 mL 萃取离心管中。加入 10 mL 含有内标的去离子水，于 2500 rpm 下，涡旋 30 min，取萃取液 5 mL，加于 ISOLUTE 硅藻土固相支撑液液萃取柱（BIOTAGE isolute SLE），用 30 mL 乙酸乙酯（含 2% 乙酸）分三次洗脱，每次 10 mL，收集洗脱液，45℃下浓缩至干，用 0.5 mL 去离子水复溶、混匀。混匀后进 LC-MS/MS 分析。分析条件见表 2。

表 2　高效液相色谱梯度洗脱条件

Tab. 2　Gradient elution conditions of high performance liquid chromatography

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
0.5	95	5
1	85	15
3	75	25
5	65	35
6	40	60
10	40	60
11	95	5
20	95	5

色谱柱：Waters Atlantis® T3 分析柱（150 mm ×2.1 mm，3.0 μm）；柱温：40 ℃；流动相：A：0.1%（v/v）甲酸水溶液，B：乙腈溶液，流速 0.25 mL/min，梯度洗脱条件见表 2；分析时间：5 min；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：-4500 V；气帘气压力：30 psi；辅助气 1 压力：60 psi；辅助气 2 压力：60 psi；离子源温度：500 ℃；各化合物的定量离子对、定性离子对、驻留时间、碰撞能量（CE）及去簇电压（DP）参见表 3。

表 3 亚硝基氨基酸质谱检测参数

Tab. 3 Determination parameters of N-nitrosamino acids by mass spectrometry

化合物	定量离子对	定性离子对	驻留时/ms	CE/V	DP/V
NSAR	117/32	117/73	50	-10	-40
MNPA	131/59	131/41	50	-14	-50
MNBA	145/59	145/85	50	-15	-80
NAzCA	129/73	129/85	50	-10	-40
NSAR- d3	120/32	120/76	50	-10	-40
MNPA-d3	134/62	134/42	50	-14	-50
MNBA- d3	148/62	148/85	50	-13	-70
NAzCA-d5	134/74	134/90	50	-10	-40

2 结果

四种亚硝基氨基酸的结构式如图 1 所示，可知亚硝基氨基酸中，氨基上的氮原子分别形成 N-C、N-N 共价键，常规分析氨基酸的氨基所发生的衍生反应，亚硝基氨基酸很难发生，因此，本实验选择直接分析亚硝基氨基酸原型。

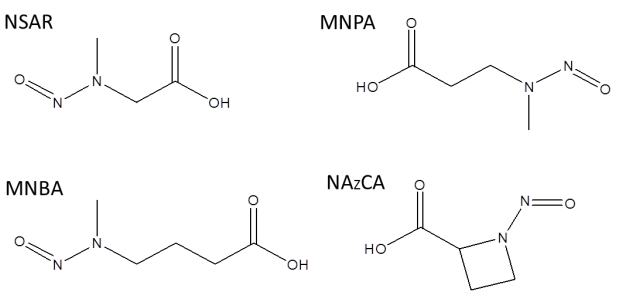


图 1 4 种亚硝基氨基酸结构式

Fig. 1 Structural formulas of four N-nitrosamino acids

2.1 色谱柱的选择

4 种亚硝基氨基酸目标物均为水溶性极性小分子，实验中首先考虑了亲水作用色谱柱 Agilent HILIC Plus（100 mm×2.1mm，3.5 μm）的分离效果，发现 HILIC 柱子并不能很好的保留四种亚硝基氨基酸。四种亚硝基氨基酸的保留时间均在 1.5min 左右。

为达到好的分离效果，选取五种高比例水相耐受柱 Agilent ZORBAX SB-AQ （100 mm × 2.1 mm，3.5 μm），Agilent ZORBAX BONUS-RP （100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm），Agilent Proshell 120 EC-C8（100 mm × 3.0 mm，2.7 μm），Waters Atlantis ® T3（150 mm × 2.1 mm，3 μm），Thermo Accucore PFP（150 mm × 2.1 mm，2.6 μm）进行了对比实验。4 种目标物在 5 种分析柱上的分离效果如图 2 所示。在 PFP 和 SB-AQ 柱上保留比较差，出峰均在 2 min 前；BONUS-RP 柱子对 NSAR、NAzCA 保留效果好，但 NSAR 出双峰，NAzCA 的灵敏度差，响应较低，而对 MNPA、MNBA 保留效果差；EC-C8 与 T3 柱子对 4 种目标物的保留效果相似，出峰均在 2 min 以后，考虑到 T3 柱子可以耐受 100% 水相，通过调整流动相可以进一步调高目标物在色谱上的分离度，实验重复性会更好，因此选 T3 柱子为最终实验用色谱柱。

2.2 流动相条件的优化

2.2.1 流动相的确定

为了得到最好的峰型和响应值，对流动相和洗脱梯度条件进行了优化。采用乙腈为流动相 B，分别采用 0.1% 甲酸水溶液，5 mmol/L 甲酸铵水溶液、1% 甲酸水溶液为流动相 A 进行试验。

研究结果表明，流动相 A 中加入一定比例的甲酸铵有助于亚硝基氨基酸化合物的离子化，质谱响应高，但出峰时间快，4 种化合物保留时间短，影响口含烟样品中 4 种目标化合物的测定。流动相 A 中加入一定比例的甲酸，亚硝基氨基酸的响应较加入甲酸铵时低，但并不影响样品中目标物的定量，而且加入一定比例的甲酸能显著提高目标物在色谱柱上的保留，使样品中 4 种目标化合物得到有效分离 , 实验结果如图 3 所示。当甲酸比例由 0.1 % 增加至 1 % 时，保留时间没有显著延长，质谱响应稍降低；因此选用 0.1% 的甲酸水溶液为流动相 A。

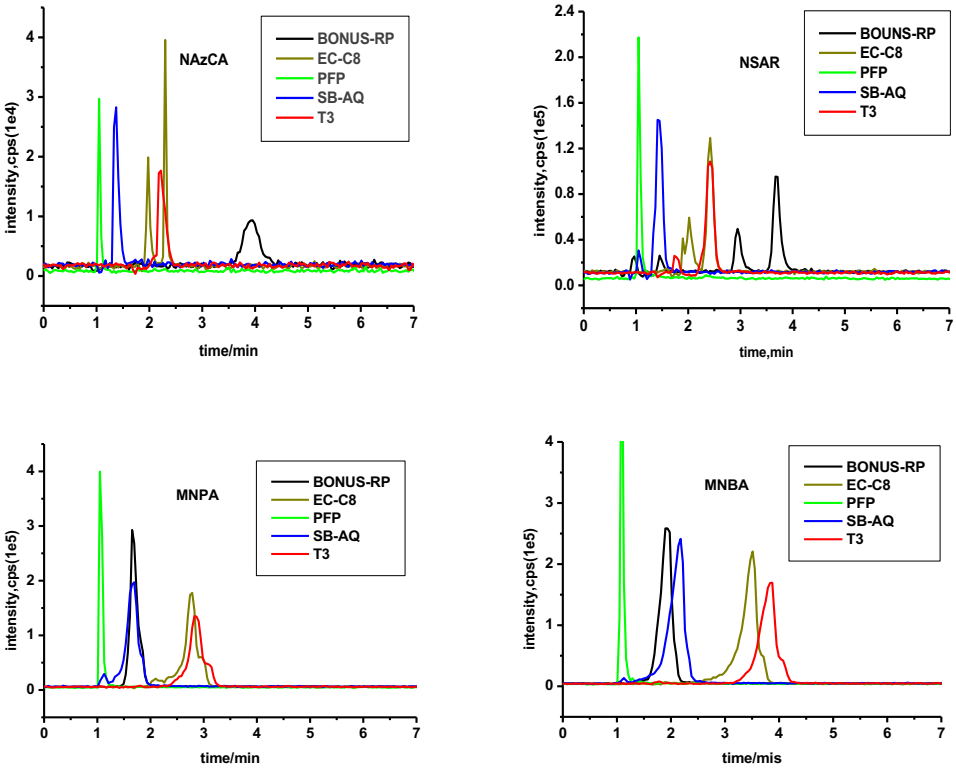


图 2　4 种亚硝基氨基酸在 5 种色谱柱上的保留

Fig.2　Retention of four N-nitrosamino acids on five chromatographic columns

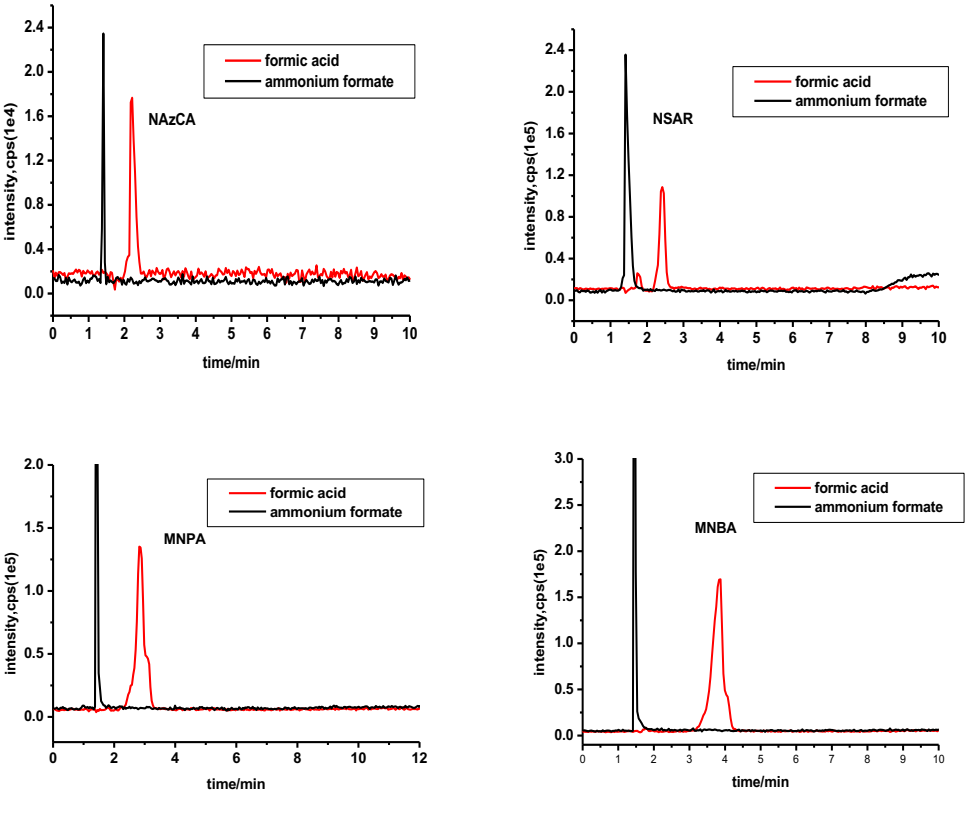
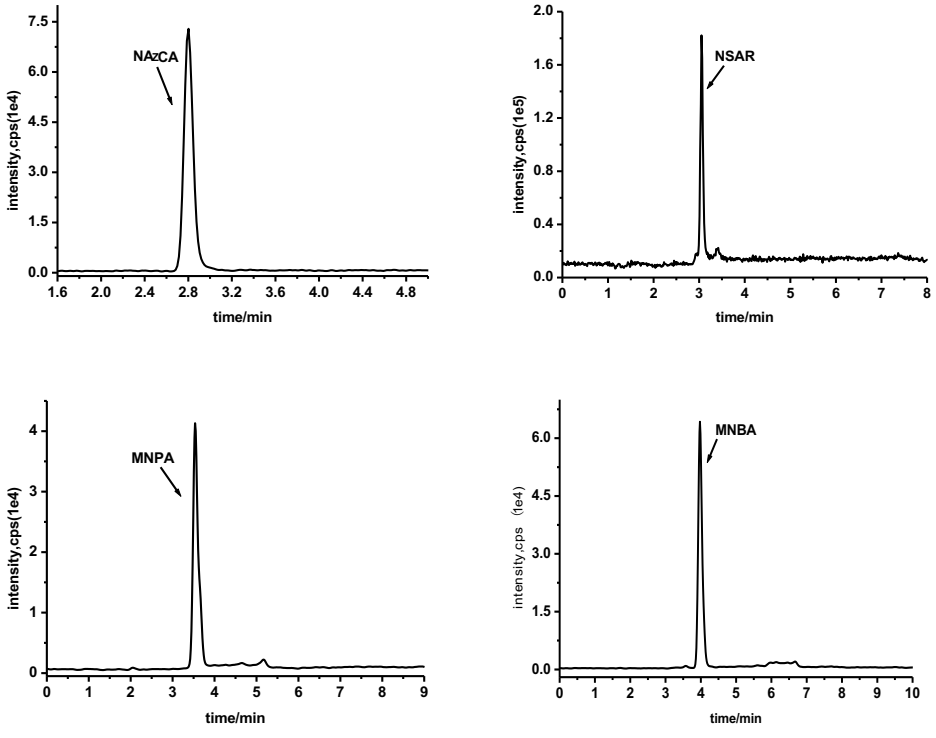


图 3　流动相中添加甲酸铵和甲酸对 4 种亚硝基氨基酸保留的影响

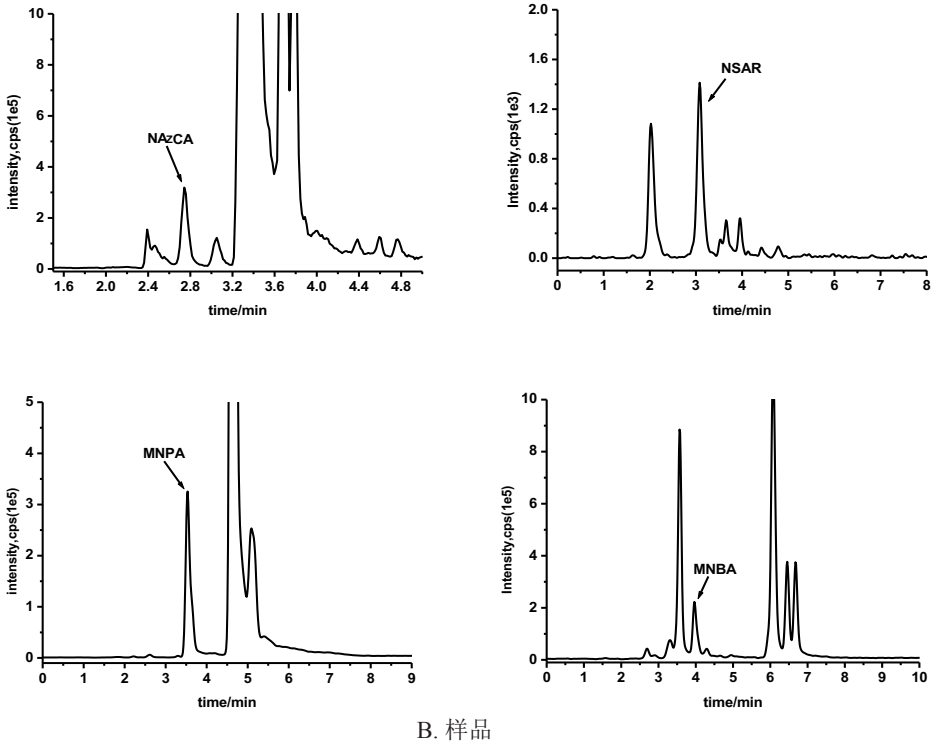
Fig.3　Effects of ammonium formate and formic acid on retention of four N-nitrosamino acids in mobile phase

2.2.2 流动相梯度条件优化结果

采用口含烟实际样品对流动相梯度条件进行优化，最终条件如表 2 所示。在实验条件下，标样、及样品中目标化合物均得到基线分离，峰形良好，分离色谱图见图 4。



A. 标样



B. 样品

图 4 标样 (A) 及样品 (B) 中四种亚硝基氨基酸色谱质谱图

Fig.4 Chromatogram mass spectrometry of four N-nitrosamino acids in standard sample(A) and tobacco sample(B)

2.3　质谱条件的确定

在正离子模式、负离子模式下以流动注射的方式对各分析物的标准溶液（5 μg/mL）进行全扫描，结果表明：目标物在负离子模式下响应远高于正离子模式下响应。因此选择负离子模式对目标物进行分析，确定了各分析物的母离子（$[M-H]^-$），然后分别以 $[M-H]^-$ 选择各分析物的子离子（碎片），每个分析物先选择 2 个碎片，再从中选取信号较强、又无互相干扰的碎片定性和定量。优化后的 MRM 条件及碰撞能和去簇电压见 1.2 中表 3 所示。

2.4　萃取溶剂、萃取方式及时间的优化

参考已有文献所用提取溶剂，对纯水、甲醇、乙腈、乙酸乙酯提取口含烟样品中亚硝基氨基酸的效果进行考察。水溶液与甲醇的萃取效率高，且萃取效率相当；乙酸乙酯萃取效率最低。比较了涡旋、超声及振荡三种方式的萃取效果。实验结果表明，涡旋、超声两种萃取方式的萃取效率基本相当，均比振荡方式萃取效率高 10% 以上。对萃取时间从 5 min 到 60 min 进行了考察，结果显示，30 min 以后，4 种亚硝基氨基酸萃取量达到平台而不再上升。每次实验平行做 3 次，取其均值作图，SD 如图示意，实验结果见图 5。

2.5 净化方式的选择

口含烟样品采用去离子水萃取后，萃取液呈深棕色液体，基质复杂；根据亚硝基氨基酸酸为极性小分子的性质，尝试了 3 种思路对样品进行净化。①借鉴 QuEChERS 方法，考察了 Bond Elut C18、Bond Elut Carbon 两种吸附剂的净化效果，结果表明：Bond Elut Carbon 对样本基质有一定的净化作用，但同时对目标化合物有一定的吸附，4 种化合物与对照样品相比，响应大幅下降。②一般氨基酸的净化多采用阳离子交换，其原理是利用了氨基的电负性，但是亚硝基氨基酸结构中亚硝基取代了氨基上的氢原子，降低了电负性，因此在净化时，首先考虑了分子结构中的羧基，选用了 Bond Elut SAX 强阴离子交换柱和具有非极性及阴离子交换两用作用的 Bond Elut Plexa PAX 两种小柱进行固相萃取，结果表明：4 种化合物在两种小柱上均不保留，也达不到净化效果。③固相支撑液液萃取（SLE）以比表面积高、化学惰性好的多孔硅藻土为液液分配载体，充分发挥硅藻土多孔性、大比表面、低表面活性等特点，快速地吸附样品基质中的水分，多孔的硅藻土表面能够形成一层薄薄的液膜，当采用有机溶剂洗脱时，在互不相溶的两相实现快速微观液液萃取。SLE 具有不易产生乳化现象、基质效应降低和需要样品量少等优点，并可实现高通量样品操作，是分析实验室的一种高效样品前处理工具。SLE 使用相应的萃取柱，仅需上样和洗脱两步，即可从水相中萃取目标化合物。从亚硝基氨基酸的结构来看，由于亚硝基取代了氨基上的氢原子，增加了亚硝基氨基酸的疏水性，其在有机溶剂乙酸乙酯中还是有相当的溶解度的。萃取溶剂优化实验表明，假设水的萃取效率是 100%，相同样品量、相同溶剂体积下，乙酸乙酯对四种亚硝基氨基酸的萃取效率是大于 50% 的。因此，4 种亚硝基氨基酸在乙酸乙酯中均具有相当的溶解度。选取 BIOTAGE isolute SLE 硅藻土

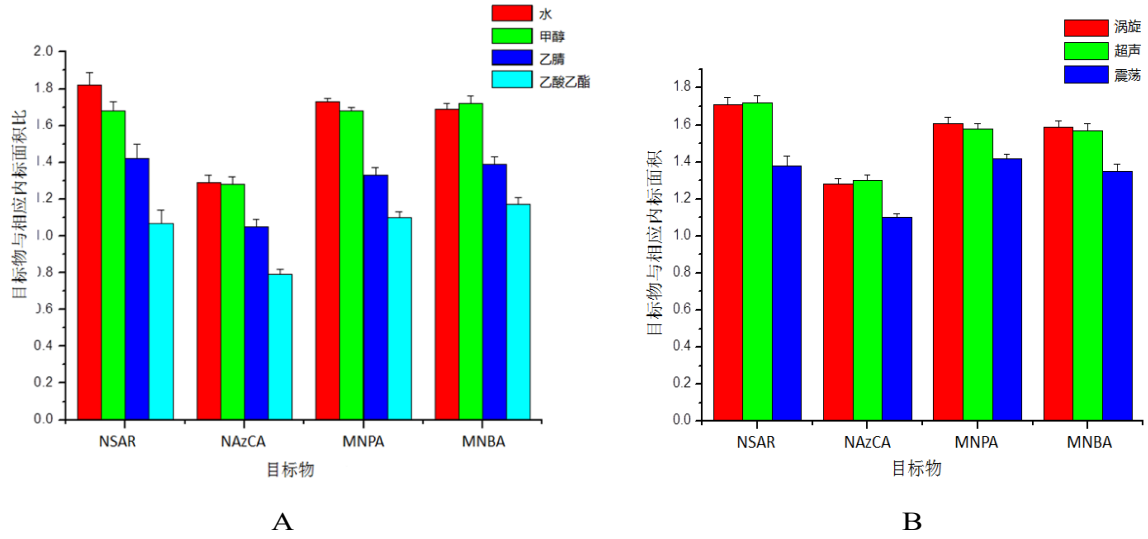


图 5　萃取溶剂 (A) 及萃取方式 (B) 的选择

Fig.5　Selection of extraction solvent (A) and extraction method (B)

液液萃取柱对样品进行净化，用乙酸乙酯（含 2% 乙酸）洗脱，实验结果表明：30 mL 乙酸乙酯可将目标物完全洗脱，样品浓缩复溶后，进 LC-MS-MS 分析，4 种亚硝基氨基酸峰形良好，可达基线分离，且灵敏度较高，完全满足样品测试需要，样本中 4 种目标物 MRM 谱图如 2.2.2 中图 4（B）所示。

2.6 标准工作曲线、检出限和定量限

N- 亚硝基肌氨酸（NSAR）、3-（N- 甲基亚硝基氨基）丙酸（MNPA）、4-（N- 甲基亚硝基氨基）丁酸（MNBA）和亚硝基氮杂环丁烷 -2- 羧酸（NAzCA）标准工作溶液浓度范围分别为 10~500 ng/mL；50~2500 ng /mL；10~500 ng /mL；10~500 ng /mL。标准工作溶液中内标 NAzCA- d5、NSAR- d3、MNBA-d3 浓度均为 50.0 ng/mL，MNPA-d3 浓度为 250.0 ng/mL。分别对标准工作溶液进行 HPLC-MS/MS 分析，并以亚硝基氨基酸化合物与内标物峰面积比对浓度比进行线性回归，得到各目标化合物的标准工作曲线。以不低于 3 倍性噪比为检出限，以不低于 10 倍性噪比为定量限，结果如表 4 所示。

表 4 4 种亚硝基氨基酸的线性方程、相关系数、检出限及定量限

Tab.4 Linear equations, correlation coefficients, limits of detection and quantitation of the four N-nitrosamino acids

化合物	线性方程	相关系数	检出限 /（ng/g）	定量限 /（ng/g）
NSAR	y = 0.0121x -0.0108	0.9999	5.0	16.7
NAzCA	y =0.0132x + 0.0296	0.9993	2.4	8.0
MNPA	y = 0.0307x - 0.0793	0.9991	5.7	18.9
MNBA	y = 0.0421x- 0.0308	0.9998	1.4	4.8

2.7 基质效应考察

分别采用口含型、含化型、胶基型制品提取溶液配制基质匹配校正溶液，比较和溶剂校正曲线斜率的差异性，以评价基质效应。实验结果表明（表 5），采用口含型、含化型、胶基型三种基质配制标准曲线方程的斜率与采用溶剂配制标准曲线方程的斜率之比值（SR）均在 94.4%~105.6% 之间，表明该方法基质效应较小，可采用溶剂配标方式。分析其原因主要是因为前处理方法中采用了 BIOTAGE isolute SLE 硅藻土液液萃取柱，通过液液萃取，及后续的浓缩复溶，净化了样本基质，部分除去了影响离子化的干扰成分，另外实验时，相应的氘代内标也起到了校正作用。

表 5 3 种口含烟的基质效应

Tab. 5 Matrix effects of three kinds of oral smokeless tobacco products

目标物	溶液配标标准曲线方程	基质类型	基质配标标准曲线方程	SR
NSAR	y=0.0109x+0.0098	口含型	y = 0.0104x +0.0108	95.4%
		含化型	y = 0.0110x +0.0124	100.9%
		胶基型	y = 0.0106x+0.0110	97.2%
NAzCA	y=0.0125x+0.0302	口含型	y =0.0132x + 0.0296	105.6%
		含化型	y =0.0130x +0.0316	104.0%
		胶基型	y =0.0127x + 0.0279	101.6%
MNPA	y=0.0316x+0.0027	口含型	y = 0.0327x +0.1624	103.5%
		含化型	y = 0.0307x +0.0084	97.2%
		胶基型	y = 0.0311x +0.0121	98.4%
MNBA	y=0.0468x+0.0246	口含型	y = 0.0482x +0.0287	103.0%
		含化型	y = 0.0442x +0.0296	94.4%
		胶基型	y = 0.0448x +0.0311	95.7%

2.8 方法精密度与准确度

选取含有 4 种亚硝基氨基酸的口含型样品 1 种，进行方法日内及日间精密度实验。一天内进行 5 平行实验以考察方法日内精密度，连续 5 天，每天进行实验以考察方法日间精密度，结果表明，4 种亚硝基氨基酸的日内精密度小 6.5%，日间精密度小于 9.4%。

在进行方法准确度考察时，考虑到样品基质的差异性，选取口含型、含化型、胶基型口含烟各 1

种，在高、中、低 3 个浓度水平进行加标回收率测定，平行测定 3 次，结果如表 6 所示。NSAR、NAzCA、MNPA、MNBA 加标回收率范围分别在 84.2%~102.3%、77.7%~102.3%、90.8%~111% 和 89.5%~101.7 % 之间。

2.9　部分口含烟样品中 4 种亚硝基氨基酸含量

国内目前还没有口含烟中亚硝基氨基酸含量的报道，国外对口含烟中 N- 亚硝基氨基酸的文献报道主要集中在 1985 年到 1999 年，基本采用的是重氮甲烷衍生 GC-TEA 检测方法。八十年代，Ohshima H 等确认了烟草制品中 MNPA 及 MNBA 的存在，并对瑞典、美国的鼻烟及比利时嚼烟进行了分析，含量范围分别为 0.1~7 μg/g、ND~2.24 μg/g。1988 年，1989 年，Tricker AR 等分别对印度 zarda、kiwam 口含烟进行了分析 NSAR、NAzCA、MNPA 及 MNBA 含量范围分别为 ND~0.35 μg/g、ND~0.14 μg/g、0.08~7.8 μg/g、0.008~1.1 μg/g。九十年代，Djordjevic MV 等研究了存储条件对烟草亚硝基氨基酸含量的影响，结果表明，随着存储时间的延长及存储温度的升高，亚硝基氨基酸含量呈增加趋势。Hoffmann DH、Djordjevic MV 等对瑞典、美国的口鼻烟中的亚硝基氨基酸含量也进行了研究，NSAR、MNPA、MNBA 含量范围分别为 ND~0.68 μg/g、1.45~14.03 μg/g、0.01~6.9 μg/g。由此可见，随着原料及加工工艺的不同，亚硝基氨基酸含量差异较大。

表 6　4 种亚硝基氨基酸的加标回收率

Tab. 6　Spiked recoveries of the four N-nitrosamino acids

口含烟类型	加标浓度水平	回收率 /%			
		NSAR	NAzCA	MNPA	MNBA
口含型	低	84.2	77.7	108.9	90.4
	中	99.8	86.5	111	94.6
	高	95.8	97.7	101.8	91.4
胶基型	低	85.2	89.5	90.8	92.4
	中	95.8	94.6	98.4	97.2
	高	102.3	102.3	106.4	101.7
含化型	低	86.2	85.7	92.4	89.5
	中	93.2	92.7	99.2	95.8
	高	101.4	96.7	102.5	100.6

采用本文所建方法测定了 14 种不同类型及口味含烟样品中 4 种亚硝基氨基酸含量，结果如表 7 所示。测试结果表明：胶基型和含化型制品中未检出 4 种亚硝基氨基酸；在其它 10 个口含型样品中，部分检出 NSAR、NAzCA，均检出了 MNPA、MNBA。NSAR、NAzCA、MNPA 及 MNBA 检出量分别为 ND~128.3 ng/g 、ND~141.6 ng/g 、1687.1~2424.1 ng/g、65.0~199.5 ng/g。与以往文献相比，袋装、散装口含

表 7　14 个口含烟样品中四种亚硝基氨基酸的含量

Tab. 7　Contents of the four N-nitrosamino acids in 14 oral smokeless tobacco product samples　ng/g

编号	品牌及规格	口味	包装类型	样品水分	NSAR	NAzCA	MNPA	MNBA
1	Copenhagen Wintergreen	冬青	散装粗丝	31.2%	/	72.7	1756.8	132.9
2	Copenhagen snuff	原味	散装细丝	29.8%	112.2	/	1760.2	133.6
3	Skoal Xtra Mint	薄荷	散装粗丝	49.7%	128.3	/	2332.6	199.5
4	Grizzly Wintergreen	冬青	散装细丝	50.2%	/	/	2424.1	196.6
5	金鹿（golden dear）	红茶	袋装	38.1%	/	/	1762.2	65.0
6	金鹿（golden dear）	冷冻	袋装	34.9%	/	/	1928.5	75.8
7	Camel snus	原味	袋装	29.8%	90.9	141.6	1687.1	131.1
8	Marlboro Tobacco Stick	薄荷	袋装	14.0%	/	86.1	1349.2	108.9
9	General classic white	原味	袋装	51.5%	101.4	/	2354.2	186.8
10	Thunder ultra Frosted	薄荷	袋装	45.0%	100.4	36.4	2029.8	168.1
11	Ariva Dissolvables	薄荷	药片状	/	/	/	/	/
12	Stonewall Dissolvables	冬青	药片状	/	/	/	/	/
13	stonewall	冬青	口香糖状	/	/	/	/	/
14	Nicorette	香橙	口香糖状	/	/	/	/	/

烟四种亚硝基氨基酸含量均在以往所报道的范围内，且偏向于含量范围的低端，这主要是因为，许多烟草公司致力于产品加工工艺改进，不断降低有害成分的含量，以至于新产品中有害成分含量显著低于传统类型的无烟气烟草制品（如嚼烟、斗烟、含烟等）[24]。对于新出现的产品类型，如：口含型片剂、胶基型口含烟，由于烟丝用量较少，及加工工艺的改进，四种亚硝基氨基酸均未检出。

3 结论

以水为溶剂，萃取口含烟中 NSAR、NAzCA、MNPA、MNBA 四种亚硝基氨基酸，经 BIOTAGE isolute SLE 硅藻土液液萃取柱进行净化浓缩，建立了简单、准确的检测口含烟中 4 种亚硝基氨基酸的 LC-MS/MS 分析方法。4 种亚硝基氨基酸工作曲线相关系数均大于 0.999，检出限、定量限分别在 1.4~5.0 ng/g 之间、4.8~18.9 ng/g 之间，回收率均在 77.7%~111% 之间。用该方法分析国内外 14 种市售品牌口含烟，结果表明胶基型和含化型制品中未检出 4 种亚硝基氨基酸；口含型样品中，部分检出 NSAR、NAzCA，均检出 MNPA 及 MNBA； MNPA 含量最高，范围为 1687.1~2424.1ng/g。该方法前处理简单，结果准确，易于推广应用。

参考文献

[1] 李鹏 , 王申 , 张东豫 , 等 . 行业标准方法测试口含烟化学指标的适用性 [J]. 烟草科技 , 2016, 49(9):57-62.
LI Peng, WANG Sheng, ZHANG Dongyu, et al. Suitability of industrial standard methods in testing chemical constituents of oral tobacco products [J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(9):57-62.

[2] 艾明欢 , 陈超英 , 郑赛晶 , 等 . 基于猪口腔黏膜模型的口含烟烟碱渗透速率的影响因素 [J]. 烟草科技 , 2017, 50(6):33-39.
AI Minghuan, CHEN Chaoying, ZHENG Saijing, et al. Factors influencing nicotine permeation rate from snus usage based on pig's oral mucosa model [J]. Tobacco Science & Technology, 2017, 50(6):33-39.

[3] 高茜 , 管莹 , 米其利 , 等 . 口含烟对人口腔致病菌的影响 [J]. 中国烟草学报 , 2018, 24(6):106-111.
GAO Qian, GUAN Ying, MI Qili, et al. Effects of oral use tobacco products on pathogenes of oral diseases [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2018, 24(6):106-111.

[4] 王超 , 杨继 , 杨柳 , 等 . 模拟溶出法研究袋装口含烟烟碱口腔释放规律 [J]. 中国烟草学报 , 2019, 25(1):8-14.
WANG Chao, YANG Ji, YANG Liu, et al. Study on release of nicotine from bagged oral tobacco products by simulated dissolution device [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(1):8-14.

[5] 邱建华 , 张展 , 李国政 , 等 . 口含烟中重金属组分向唾液转移的模拟测定方法 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2016, 42(3): 287-290.
QIU Jianhua, ZHANG Zhan, LI Guozheng, et al. Simulation testing method for transfer of heavy metal in snus into saliva [J]. Journal ofHunan Agricultural University (Natural Sciences), 2016, 42(3): 287-290.

[6] 窦玉青 , 沈轶 , 张继旭等 . 口含烟发展现状及原料研究进展 [J]. 贵州农业科学 , 2016, 44(12): 133~136.
DOU Yuqing, SHEN Yi, ZHANG Jixu, et al. Research progress on development status and raw materials of oral tobacco [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(12): 133~136.

[7] 张颖璞 . 烟草 N 一亚硝胺概述 [J]. 科技信息 , 2009, 5:340~341.
ZHANG Yingpu. An overview of N-nitrosamines in tobacco [J]. Science&Technology Information, 2009, 5:340~341.

[8] Lawler TS, Stanfill SB, Tran HT. Chemical analysis of snus products from the United States and northern Europe [J]. Plos One, 2020, 15(1): e0227837.

[9] Czoli, CD, Hammond D. Trends over time in tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) in whole tobacco and smoke emissions from cigarettes sold in Canada [J]. Nicotine & Tobacco Research ,2018, 20(5): 649-653.

[10] Dennis M, Cheng T, Steelnan D. Quantitative determination of volatile nitrosamines (VNA) in smokeless tobacco products[C]. TSRC, 2010.

[11] Lv F, Guo J W, Yu F, et al. Determination of nine volatile N-nitrosamines in tobacco and smokeless tobacco products by dispersive solid-phase extraction with GC-MS/MS[J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(11): 2123-2128.

[12] International Agency for Research on Cancer.Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans[R]. Lyon: IARC, 2007.

[13] Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds[C]. Chemistry and Biochemistry/(Developed from a Symposium Sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 204th National Meeting of the American Chemical Society, Washington, D.C., August 23-28, 1992.) [In: ACS Symp. Ser., 1994; 553]

[14] Ohshima H, Nair J, Bourgade MC, et al. Identification and occurrence of two new n-nitrosamino acids in tobacco products:3-(N-nitroso-N-methylamino) propionic acid and 4-(N-nitroso-N-methylamino)butyric acid[J]. Cancer Letters,1985, 26(2):153-162.

[15] Tricker AR, Preussmann R. The occurrence of N-nitro compounds in zarda tobacco[J]. Cancer Letters,1988, 42:113-118.

[16] Hoffmann DH, Djordjevic MV, Fan J, et al. Five leading U.S. commercial brands of moist snuff in 1994: assessment of carcinogenic N-nitrosamines[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1995, 87: 1862–1869.

[17] Djordjevic MV, Fan J , Bush LP, et al. Effects of storage conditions on levels of tobacco-specific N-nitrosamines and N-nitrosamino acids in U.S. moist snuff[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41: 1790–1794.

[18] Tricker AR, Preussmann R. The occurrence of N-nitroso compounds in kiwam tobacco[J]. Cancer Letters, 1989, 49:221-224.

[19] Hoffmann D, Djordjevic MV, Brunnemann KD. New brands of oral snuff [J]. Food and Chemical Toxicology,1991, 29:65-68.

[20] Djordjevic MV, Brunnemann KD, Hoffmann D. The need for regulation of carcinogenic N-nitrosamines in oral snuff [J]. Food and Chemical Toxicology, 1993, 41:497-501.

[21] Chakradeo PP. Ecdogenous Formation of N-nitrosoproline and other N-nitrosamino acids in tobacco users[J]. Cancer Letters 1994, 86:187-194.

[22] James JC, Joseph HH. Photolytic interface for high-performance

liquid chromatography -chemiluminescence detection of non-volatile n-nitroso compounds [J]. Analyst , 1989, 114:155-159.

[23] Cheng CF, Tsang CW. Separation of n-nitrosoamino acids by C18 reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography and compatible detection by electrospray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 1999, 849:389–402.

[24] 秦亚琼 , 王晓瑜 , 贾云祯 , 等 . 无烟气烟草制品化学成分研究进展 [J]. 烟草科技 , 2018，51(2): 95~103.
QIN Yaqiong, WANG Xiaoyu, JIA Yunzhen, et al. Research progress on characterizing chemical composition of smokeless tobacco products [J]. Tobacco Science & Technology, 2018, 51(2):95-103.

Determination of four N-nitrosamino acids in oral smokeless tobacco products by LC-MS/MS

WANG Bing, YU Jingjing, CAI Junlan, WANG Sheng, LIU Kejian, ZHAO Xiaodong,
LIU Shaofeng, QIN Yaqiong, XIE Fuwei, WANG Xiaoyu*
Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China

Abstract：A liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method has been developed for the determination of N-Nitrososarcosine（NSAR)、 3-(N-methylnitrosamino) propionic acid （MNPA)、4-(N-methylnitrosamino) butyric acid (MNBA)、Nitrosoazetidine-4-carboxylic acid (NAzCA) in oral smokeless tobacco products. The samples were extracted by water， purified by liquid - liquid diatomite extraction column and concentrated, and then analyzed by LC-MS-MS. The experimental results revealed: 1) The detection limits of NSAR、NAzCA、MNPA、MNBA were 5.0 ng/g、2.4 ng/g、5.7 ng/g、1.4 ng/g respectively, the within-day and inter-day precisions were less than 6.5% and 9.4%, the recoveries ranged from 77.7% to 111%. 2) 14 oral smokeless tobacco products were analyzed, the four N-nitrosamino acids were not detected in nicotine chewing gums and dissolvable tobacco products, NSAR and NAzCA were partially well MNPA and MNBA were entirely detected in snus and moist snuff with contents ranging from ND~128.3 ng/g、ND~141.6 ng/g、1687.1~2424.1ng/g、65.0~199.5 ng/g respectively. The method is simple, accurate and suitable for the analysis of four N-nitrosamino acids in oral smokeless tobacco products.

Keywords：*N*-nitrosamino acids; oral smokeless tobacco product; LC-MS/MS

***Corresponding author. Email**：ycyjywb790211@sina.com

《烟草科技》2021 年第 1 期目次

·烟草农学

普通烟草 *NtWRKY53* 基因克隆、鉴定及表达分析
……刘万峰，蒲文宣，杨爱国，等
分泌型烟草腺毛形态和叶面化学成分的比较
……马旭东，王召军，闫筱筱，等
基于盆栽试验的促根剂对低温条件下烤烟地上部生长和根系发育的影响……陈鹏宇，杨　超，汪代斌，等

·烟草化学

细支卷烟不同加香方式香味成分的转移行为
……吴秉宇，费　婷，罗　辰，等
卷烟滤嘴设计对爆珠单体香料成分释放行为的影响
……古君平，陶红，汪军霞，等
因子分析法评价单体香料在卷烟中的感官作用
……耿宗泽，蒋忠荣，李东亮，等
卷烟纸参数对短支卷烟主流烟气常规成分释放量及感官质量的影响……杨　松，赵永振，孙学辉，等

·烟草工艺

沉头滤棒关键成型工艺技术研究与应用
……张　源，徐　岚，叶惠民，等
环境条件对烟用爆珠力学性能的影响
……董　浩，周明珠，吴艾璟，等

·仪器与设备

卷烟爆珠拖尾缺陷检测方法……王澍，徐龙泉，董浩，等
新风独立处理系统在卷烟厂的应用及节能效果分析
……胡　波，于鲁海，黄春艳，等
GD 包装机组小盒烟包外观检测装置的改进
……赵宏生，张正华，邱宝平，等

·综述

无烟气烟草制品和烟碱口香糖烟碱依赖量表研究进展
……丁　政，李翔宇，陈　欢，等
烟叶中茄尼醇提取纯化及应用研究进展
……姚　雯，彭　健，顾丽莉，等