

气相色谱-正化学电离源-飞行时间质谱法 测定烟草吸食者唾液中的吡嗪和吡啶类物质

司晓喜, 张凤梅, 朱瑞芝, 刘春波, 申钦鹏,
尤俊衡, 张 涛, 缪明明, 刘志华

(云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南省烟草化学重点实验室, 云南 昆明 650231)

摘要:建立了气相色谱-正化学电离源-飞行时间质谱法(GC-PCI-TOF MS)测定烟草吸食者唾液中 9 种吡嗪和吡啶类物质。样品经二氯甲烷溶剂萃取, *N*-丙基乙二胺(PSA)吸附剂分散固相萃取净化后, 进行 GC-PCI-TOF MS 检测。结合特征离子的保留时间、精确质量数、裂解规律对目标物进行定性分析, 以外标法定量。结果表明: 9 种吡嗪和吡啶类物质的线性相关系数 R^2 均大于 0.999 1, 定量限为 3.0~7.9 $\mu\text{g/L}$, 回收率在 85%~104% 之间; 烟草吸食者唾液中含有较高的吡嗪和吡啶类物质为吡啶、2-甲基吡嗪, 二甲基吡嗪类有少量检出; 不同卷烟样品吸食者唾液中吡啶和 2-甲基吡嗪的含量存在明显差异。对不同类型卷烟样品吸食者唾液中吡嗪和吡啶类物质含量进行主成分分析, 发现同种卷烟中二者含量能很好地聚类, 不同卷烟中二者含量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 因此可以按吸食者唾液中吡嗪和吡啶类含量对卷烟进行分类。

关键词:烟草; 唾液; 烟气; 吡嗪; 吡啶; 气相色谱-正化学源-飞行时间质谱(GC-PCI-TOF MS)

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2018)04-0467-09

doi: 10.7538/zpxb.2017.0152

Determination of Pyrazines and Pyridines in Saliva of Tobacco Smokers by Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

SI Xiao-xi, ZHANG Feng-mei, ZHU Rui-zhi, LIU Chun-bo, SHEN Qin-peng,
YOU Jun-heng, ZHANG Tao, MIAO Ming-ming, LIU Zhi-hua

(Key Laboratory of Tobacco Chemistry of Yunnan,

R&D Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China)

Abstract: In order to accurately determine pyrazines and pyridines in saliva of tobacco smokers, a method of gas chromatography-positive chemical ionization-time of flight

收稿日期: 2017-09-07; 修回日期: 2017-11-02

基金项目: 云南省科技计划青年项目“烟草吸食者唾液中主要吃味物质分析技术研究”(2015FD098); 云南中烟工业有限责任公司技术中心科技项目“不同烟草制品吸食者唾液中关键化学成分的分析研究”(JSZX2014JC05)资助

作者简介: 司晓喜(1986—), 男(汉族), 云南昆明人, 工程师, 从事烟草化学和烟气化学研究。E-mail: sixiaoxi2006@126.com

通信作者: 刘志华(1974—), 男(汉族), 云南昆明人, 研究员, 从事烟草化学和烟气化学研究。E-mail: liuzh@ynzy-tobacco.com

网络出版时间: 2018-03-22; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180322.1405.018.html>

mass spectrometry (GC-PCI-TOF MS) was developed. The pre-treatment method of sample, chromatographic condition and MS condition were optimized. Saliva samples were extracted with dichloromethane by vortex mixing and cleaned up by primary secondary amine (PSA), then detected by GC-PCI-TOF MS. Retention time, precise mass data of characteristic ions and fragmentation patterns of characteristic fragment ions were employed to qualitative identification, external standard method was used for quantitative determination. The results showed that: 1) The average of extraction yield of 11 pyrazines and pyridines was 97.7% when 5 mL saliva sample was extracted by dichloromethane two times. 2) The matrix effects were studied by comparing the pyrazines and pyridines peak response in matrix standard solution and matrix-free standard solution, which performed with no significance. 3) Mass number of characteristic ions measured was in good agreement with predicted value, and the error was less than 3.12×10^{-6} . Besides, predominant molecular ion and adduct molecular ion peak were obtained in PCI mode with less fragment ions formation. The mass spectrum was simple and clear, which was easy to identify. Given the above, the accuracy of qualitative analysis for low concentrations of pyrazines and pyridines in saliva could be significantly improved. 4) The linear correlation coefficients were above 0.999 1, the limits of detection (LODs) ranged from 0.9 $\mu\text{g/L}$ to 2.4 $\mu\text{g/L}$, the limits of quantitation (LOQs) ranged from 3.0 $\mu\text{g/L}$ to 7.9 $\mu\text{g/L}$, and the recoveries ranged from 85% to 104% at three spiked levels. The quantitative method was proved to be high accuracy and high sensitivity. 5) The detection results of saliva of tobacco smokers showed that the main pyrazines and pyridines in smokers' saliva were pyridine, 2-methylpyrazine and dimethylpyrazines, and the contents of pyridine and 2-methylpyrazine in smokers' saliva was differed by cigarette type. Low concentration of trimethylpyrazine and tetramethylpyrazine were detected in specific saliva samples of tobacco smokers. 3-Ethylpyridine and 5-ethyl-2-methylpyridine were not found in experimental tobacco smokers' saliva sample. 6) Pyrazines and pyridines' contents in different smokers' saliva of 6 kind cigarettes were analyzed using principal component analysis which can distinguish different types of cigarette. Further analysis indicated that there was a significant variance ($P < 0.05$) between the pyrazines and pyridines in saliva among the 6 different kinds of cigarette, which might be a significantly characteristic of cigarette type. The method is simple, rapid and accuracy, which is superior in analyzing low level of pyrazines and pyridines in saliva of tobacco smokers and similar complex matrix. The study result will also offer accurate and scientific reference on cigarette product development.

Key words: tobacco; saliva; cigarette smoke; pyrazines; pyridines; gas chromatography-positive chemical ionization-time of flight mass spectrometry (GC-PCI-TOF MS)

目前,烟草制品的风味评价是以人体感官呼吸为主,很难排除主观产生的不确定性。卷烟抽吸过程中,主流烟气中的多种微量化学成分被口腔唾液选择性地溶解、吸收,这些被吸收的成分决定了烟草制品的风味^[1-3]。研究唾液中溶解、吸收的烟气成分,能直接、客观地评价

烟草制品的风味。

吡嗪和吡啶类化合物是卷烟烟气中一类重要的风味物质,具有炒坚果、可可、烤土豆、青椒和肉香等怡人的香味^[4-5]。该类化合物沸点较低,易气化,目前主要采用 GC/MS 法检测,且较多使用电子轰击(EI)电离技术^[5-6]。EI 技术

适用范围广,但在分析复杂基质成分时,特别是分子质量较小的分析物^[7],极易产生干扰。化学电离(CI)是一种软电离技术,碎片离子少、选择性好,其负化学源(NCI)对含电负性基团的物质具有高选择性和高灵敏度,但容易受分析物电负性强弱的影响,具有一定局限性^[8];其正化学源(PCI)在选用甲烷作为反应气时,适用范围更广泛,不受分析物电负性强弱的影响,对不同分析物的灵敏度差异较小^[9-10]。将PCI与高分辨飞行时间质谱(TOF MS)联用可提高痕量分析物鉴定的准确性^[11-12]。目前,国内外学者已将GC-PCI-MS技术成功应用于可卡因及其代谢物^[13]、N-亚硝酸胺^[14]、唑类杀菌剂^[15]等物质的分析检测,但GC-PCI-TOF MS技术除了用于测定烟气中含硫化合物,其他报道较少^[16]。

本工作拟建立气相色谱-正化学电离源-飞行时间质谱联用技术(GC-PCI-TOF MS),并结合溶剂萃取、分散固相萃取,分析烟草吸食者唾液中的吡嗪和吡啶类物质,希望为开发卷烟产品提供技术支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

气相色谱-飞行时间质谱联用仪 GCT Premier;配备正化学电离源,美国 Waters 公司产品;3K30 高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司产品;VX-200 漩涡混合仪:美国 Labnet 公司产品;Milli-Q 超纯水器:美国 Millipore 公司产品;唾液收集管:德国 Salivette 公司产品;QuEChERS 2 mL 分散固相萃取试剂盒:内含 150 mg 无水硫酸镁、50 mg N-丙基乙二胺键合固相吸附剂,美国 Agilent 公司产品;0.22 μm 有机滤膜:天津市津腾实验设备有限公司产品。

二氯甲烷、乙腈:均为色谱纯,德国 Merck 公司产品;氯化钠:分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品;人工唾液:广东省东莞市科鸿化工有限公司产品;吡啶、2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪、3-乙基吡啶、三甲基吡嗪、5-乙基-2-甲基吡啶、四甲基吡嗪标准品:纯度 $\geq 99\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;市售卷烟样品。

1.2 实验方法

1.2.1 唾液样品的采集 受试者用清水漱口 2 次后,按 5 口/支的抽吸速度抽吸 1 支卷烟。抽吸完成后,将棉棒放入口中,以每秒 1 次的频率咀嚼 2 min 后放入收集管,以 5 000 r/min 离心 15 min 后,得到唾液样品。间隔 1 h,按上述步骤重复抽吸卷烟,并采集唾液样品。同一受试者共采集 3 次,合并 3 次收集的唾液作为供试样品,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

1.2.2 样品前处理 准确移取 5.0 mL 唾液样品于具盖离心管中,加入 2.5 mL 二氯甲烷,于漩涡混合振荡仪上以 2 000 r/min 振荡 2 min,然后以 5 000 r/min 离心 5 min,吸取下层液于样品瓶中。向剩余上层液中再加入 2.5 mL 二氯甲烷,按上述方法重复萃取 1 次,离心后取下层液合并于同一样品瓶中。将收集到的样品液于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸发至近干,加入 0.5 mL 乙腈复溶。复溶液转移至 2 mL QuEChERS 分散固相萃取试剂盒,于漩涡混合振荡仪上以 2 000 r/min 振荡 2 min,以 5 000 r/min 离心 5 min,收集上层清液,待测。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:DB-35 MS 柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm);进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;载气(He)流速 1 mL/min;进样量 1 μL ;不分流进样 1 min;程序升温:35 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 7.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 125 $^{\circ}\text{C}$,再以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min。

1.2.4 质谱条件 PCI 离子源;电子能量 60 eV;离子源温度 180 $^{\circ}\text{C}$;发射电流 400 μA ;传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$;溶剂延迟 4.5 min;CI 源反应气为甲烷(纯度 $\geq 99.999\%$),流量 56%;质量扫描范围 m/z 50~400。以全氟三丁基胺为内标进行调谐,以 m/z 413.977 5 处作单点锁定校正分析物碎片的精确质量数。9 种分析物的保留时间及特征离子列于表 1。

1.3 溶液的配制

1.3.1 标准储备液 分别准确称取 10.0 mg 各标准品于 100 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,制得 9 种目标分析物的标准储备液。

1.3.2 混合标准使用液 准确移取 2.0 mL 吡啶标准储备液,0.4 mL 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪标准储备液,0.1 mL 3-乙基吡啶、2,3,5-三甲基

表 1 9 种目标分析物的保留时间和特征离子

Table 1 Retention times and characteristic ions of nine analytes

序号 No.	分析目标物 Analyte	保留时间 Retention time/ min	特征离子 Characteristic ions			
			测定值 Measured value (<i>m/z</i>)	理论值 Predicted value (<i>m/z</i>)	误差 Error/ 10 ⁻⁶	元素组成 Elemental composition
1	吡啶 Pyridine	6.26	80.0501	80.0503	3.12	C ₅ H ₆ N
2	2-甲基吡嗪 2-Methylpyrazine	7.29	95.0610	95.0610	0.53	C ₅ H ₇ N ₂
3	2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethylpyrazine	9.08	109.0766	109.0766	-0.09	C ₆ H ₉ N ₂
4	2,6-二甲基吡嗪 2,6-Dimethylpyrazine	9.18	109.0765	109.0766	-1.01	C ₆ H ₉ N ₂
5	2,3-二甲基吡嗪 2,3-Dimethylpyrazine	9.41	109.0765	109.0766	-1.01	C ₆ H ₉ N ₂
6	3-乙基吡啶 3-Ethylpyridine	10.76	108.0814	108.0816	2.13	C ₇ H ₁₀ N
7	2,3,5-三甲基吡嗪 2,3,5-Trimethylpyrazine	11.15	123.0926	123.0923	2.68	C ₇ H ₁₁ N ₂
8	5-乙基-2-甲基吡啶 5-Ethyl-2-methylpyridine	11.46	122.0972	122.0970	1.39	C ₈ H ₁₂ N
9	2,3,5,6-四甲基吡嗪 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	12.86	137.1082	137.1079	1.97	C ₈ H ₁₃ N ₂

吡嗪、5-乙基-2-甲基吡啶、2,3,5,6-四甲基吡嗪标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释并定容,制得 9 种目标分析物的混合标准使用液。

1.3.3 混合标准溶液 分别准确移取 0.05、0.25、0.5、1.0 和 2.5 mL 混合标准使用液于 5 支 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释并定容,配制系列混合标准溶液。其中,吡啶的质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0 和 5.0 mg/L; 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪的质量浓度分别为 0.02、0.1、0.2、0.4 和 1.0 mg/L; 3-乙基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、5-乙基-2-甲基吡啶、2,3,5,6-四甲基吡嗪的质量浓度分别为 0.005、0.025、0.05、0.1 和 0.25 mg/L。

2 结果与讨论

2.1 分析方法的建立

2.1.1 前处理方法的优化 使用溶剂萃取法从唾液中萃取分离吡嗪和吡啶类物质。由于这两类物质都能溶于大多数极性及其一些非极性溶剂,故选取较常用的二氯甲烷、乙腈作为萃取溶剂进行考察。由于唾液基质主要为水,二氯甲烷萃取后分层,乙腈则与唾液相溶。乙腈萃取参照经典 QuEChERS 法进行,通过加入除水剂和盐进行盐析萃取。

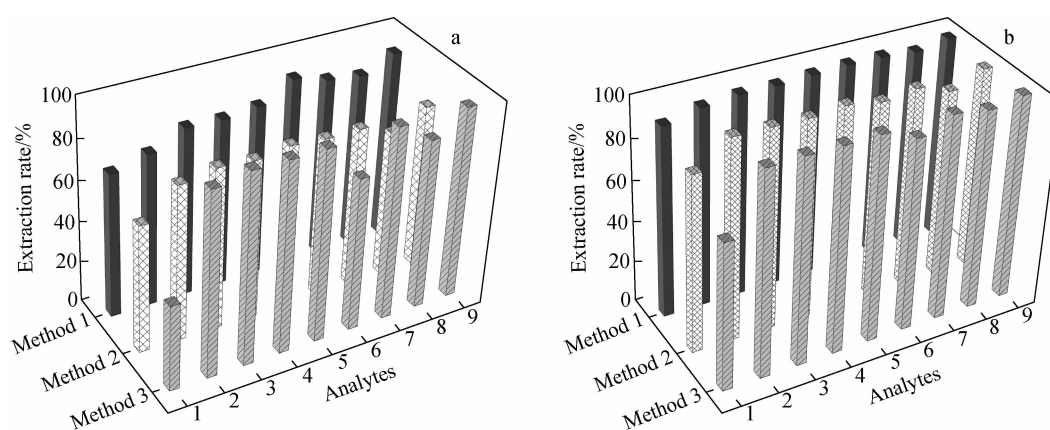
配制 9 种目标物浓度均为 2.0 mg/L 的人工唾液作为样品,以萃取率作为评价指标,考察以下 3 种萃取剂的萃取效果:1) 2.5 mL 二氯甲烷;2) 0.5 g 氯化钠、2.5 mL 二氯甲烷;3) 0.5 g 氯化钠、2.5 g 无水硫酸镁、2.5 mL 乙腈。同

时考察了萃取次数对萃取效率的影响,结果示于图 1。

由图 1a 可以看出,当萃取次数为 1 时,以二氯甲烷为萃取剂,9 种目标物的平均萃取率达 83.6%,加入盐后目标物萃取率降低;以乙腈为萃取剂,对吡嗪类物质的萃取效率优于二氯甲烷,平均萃取率达 92.9%,但对吡啶类物质的萃取率较低,平均萃取率仅为 66.4%。由图 1b 可以看出,当萃取次数为 2 时,3 种萃取剂对 9 种目标物的平均萃取率均超过 95%,以二氯甲烷萃取效果最佳,平均萃取率达到 97.7%,而乙腈对吡啶类物质的萃取率仅为 71.2%。因此,选取二氯甲烷为萃取剂,萃取次数为 2 次。

2.1.2 分析方法的建立 由于吡啶和吡嗪类物质的质量数均偏低(<200),在使用 EI 源电离时,碎片离子响应偏低,背景干扰严重。而 CI 源为软电离源,其获得的碎片离子少、背景干扰少、响应灵敏度高,而且吡啶和吡嗪类化合物具有弱碱性和亲核性,适用于 PCI 源。

吡啶和吡嗪类物质在唾液含量较低,且前处理后仍有少量干扰物,因此采用较低的初始温度和较缓慢的升温程序来实现干扰物与目标物分离。选择不分流进样,以增加目标物的响应值。选取响应值较高的分子离子(准分子离子)或碎片离子作为特征离子,9 种分析物的特征离子列于表 1。优化后的电离能为 60 eV,在优化的条件下,9 种分析物均实现良好分离,选择的特征离子响应值高,选择性好,不受唾液中其他组分的影响,抗基质干扰能力强,分析结果示于图 2。



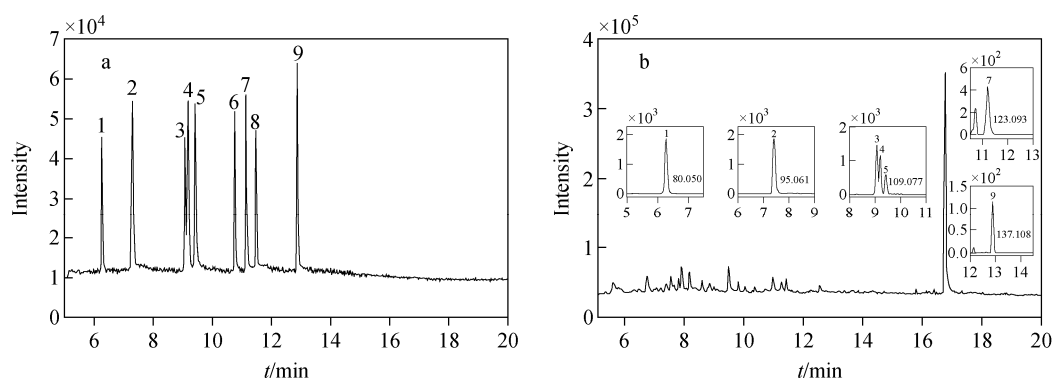
注:序号所代表化合物同表1;

Method 1. 2.5 mL 二氯甲烷; Method 2. 0.5 g 氯化钠、2.5 mL 二氯甲烷;

Method 3. 0.5 g 氯化钠、2.5 g 无水硫酸镁、2.5 mL 乙腈

图1 不同方法萃取1次(a)与2次(b)时,唾液样品中吡嗪和吡啶类物质的萃取效果

Fig. 1 Comparison of extraction effect of pyrazines and pyridines in saliva samples by different methods for one time (a) and two times (b)



注:序号所代表化合物同表1

图2 标准溶液的总离子流图(a)和烟草吸食者唾液样品的总离子流图、提取离子流图(b)

Fig. 2 Total ion chromatogram of standard solution (a) and total ion chromatogram and extraction chromatogram of tobacco smokers' saliva (b)

2.1.3 基质效应 唾液样品基质复杂,基质增强、减弱效应均会影响分析结果的准确性。在样品前处理过程中,采取有机溶剂萃取、分散固相萃取对唾液样品进行净化以去除基质,从而减少基质效应的影响。

同时,通过比较空白基质、乙腈配制的标准溶液的响应信号强度来评价基质效应。选取人工唾液作为空白基质,按照1.2.2节方法进行前处理,净化液蒸干后,加入0.5 mL标准溶液复溶,即得空白基质配制的标准溶液。选取0.05、1.0 mg/L 2个浓度混合标准溶液进行考察,乙腈、空白基质配制的标准溶液待测物响应值分别

记为R₁、R₂,基质效应(ME)=R₂/R₁,结果列于表2。可以看出,9种分析物表现出不同程度的基质增强或减弱效应,但均在95.8%~108.9%之间,基质效应并不明显,可以忽略。

2.2 PCI-TOF MS的定性鉴定

PCI电离作用下,分子离子峰和相应的加合离子峰强度高,碎片离子少。当选用甲烷作为反应气时,吡嗪和吡啶类物质同甲烷离子主要发生酸碱质子转移反应,生成准分子离子[M+H]⁺。另外,样品离子还会同反应气离子发生加合反应,生成加合离子[M+C₂H₅]⁺ ([M+29]⁺)和[M+C₃H₅]⁺ ([M+41]⁺)。

2-甲基吡嗪和 5-乙基-2-甲基吡啶的 PCI-TOF MS 质谱图示于图 3,由图可见,二者响应最强的碎片离子均为准分子离子 $[M+H]^+$,此外,

二者均有较强的加合离子 $[M+29]^+$ 和 $[M+41]^+$ 。其他 7 种目标物也有类似现象,这有利于定性分析。

表 2 基质效应考察

Table 2 Influence of matrix effects

序号 No.	分析目标物 Analyte	基质效应 Matrix effect (ME)/%	
		低浓度 Low concentration (0.05 mg/L)	高浓度 High concentration (1.0 mg/L)
1	吡啶 Pyridine	98.9	102.3
2	2-甲基吡嗪 2-Methylpyrazine	108.9	107.6
3	2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethylpyrazine	107.5	106.9
4	2,6-二甲基吡嗪 2,6-Dimethylpyrazine	107.8	107.7
5	2,3-二甲基吡嗪 2,3-Dimethylpyrazine	105.9	104.8
6	3-乙基吡啶 3-Ethylpyridine	102.3	103.6
7	2,3,5-三甲基吡嗪 2,3,5-Trimethylpyrazine	103.8	104.1
8	5-乙基-2-甲基吡啶 5-Ethyl-2-methylpyridine	98.6	96.4
9	2,3,5,6-四甲基吡嗪 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	97.4	95.8

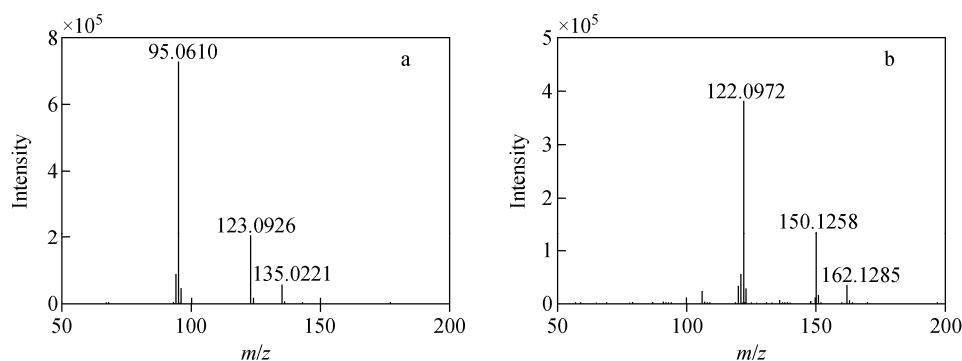


图 3 2-甲基吡嗪(a)和 5-乙基-2-甲基吡啶(b)的正化学电离-飞行时间质谱图

Fig. 3 PCI-TOF MS spectra of 2-methylpyrazine (a) and 5-ethyl-2-methylpyridine (b)

TOF MS 技术利用特征离子的精确质量数进行分析,质量精度可达 10^{-6} 级。结合原子组成的限定条件,可确定碎片离子的元素组成,进而实现目标物的定性。选择响应最高的碎片离子作为特征离子,根据测定的相对分子质量推测元素组成,结果列于表 1。9 种分析物的特征离子与理论质量数误差均小于 5×10^{-6} ,在可接受的误差范围内。

综上所述,依据 TOF MS 得到吡嗪和吡啶类物质碎片离子的精确质量数据库,结合保留时间、碎片离子与反应原理的相符性识别等信息,可实现吡嗪和吡啶类物质的定性分析。

2.3 方法验证

测定了系列混合标准溶液,以离子的响应峰面积对质量浓度绘制标准曲线。将不含 9 种分析物的空白唾液样品按 1.2.2 节方法处理后,测定 20 次,分别以空白响应的 3 倍、10 倍标准偏差确定检出限(LODs)、定量限(LOQs)。

在人工唾液样品中分别加入低、中、高 3 种混合标准溶液。吡啶的加标水平为 20.0、100.0 和 400.0 $\mu\text{g/L}$; 2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪的加标水平均为 4.0、20.0 和 80.0 $\mu\text{g/L}$; 3-乙基吡啶、2,3,5-三甲基吡嗪、5-乙基-2-甲基吡啶、

2,3,5,6-四甲基吡嗪的加标水平均为 1.0、5.0 和 20.0 $\mu\text{g/L}$ 。按优化的方法进行 6 次平行实验,计算回收率。9 种分析物的线性方程、相关系数、检出限、定量限、回收率列于表 3。结

果表明:9 种分析物的相关系数 $R^2 > 0.999\ 1$, 定量限为 3.0~7.9 $\mu\text{g/L}$,回收率在 85%~104%之间,能够满足唾液中吡嗪和吡啶类物质的分析要求。

表 3 唾液样品中 9 种分析物的线性方程、相关系数、检出限、定量限和回收率

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, LODs, LOQs and recoveries of nine analytes in saliva sample

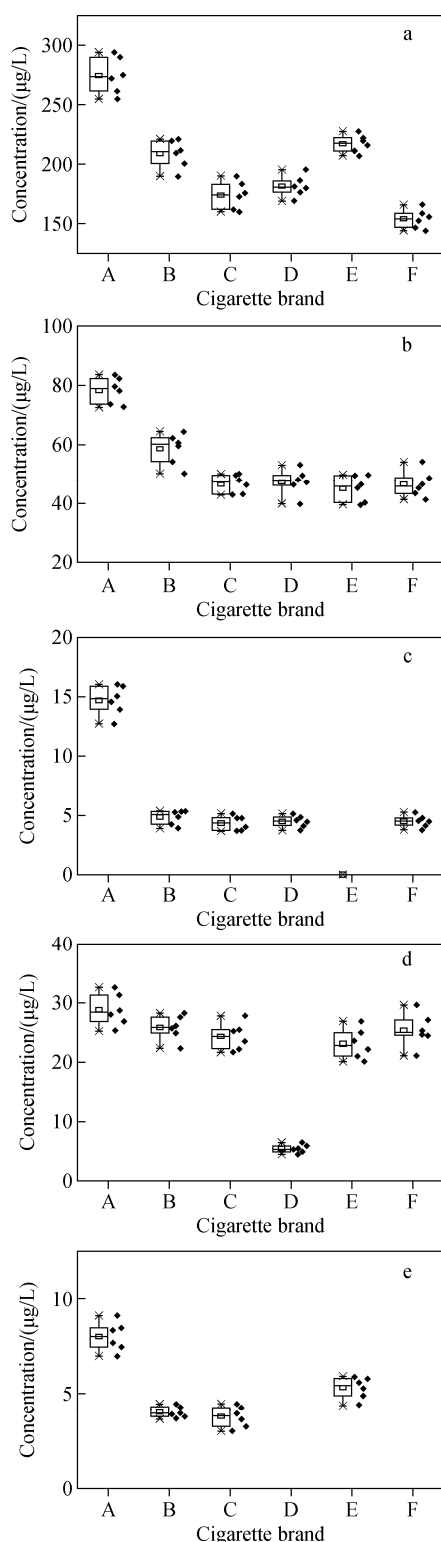
序号 No.	分析目标物 Analytes	线性方程 Linear equations	相关系数 Correlation coefficients (R^2)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQs/ ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recoveries/% ($n=6$)		
						低 Low	中 Medium	高 High
1	吡啶 Pyridine	$y=147.85x-5.64$	0.9992	2.4	7.9	88 ± 8	94 ± 7	97 ± 7
2	2-甲基吡嗪 2-Methylpyrazine	$y=192.57x-8.12$	0.9997	2.1	6.9	94 ± 7	96 ± 5	104 ± 6
3	2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethylpyrazine	$y=211.64x-9.46$	0.9992	1.3	4.3	87 ± 6	98 ± 4	96 ± 4
4	2,6-二甲基吡嗪 2,6-Dimethylpyrazine	$y=279.13x-10.24$	0.9992	1.1	3.6	91 ± 6	99 ± 5	96 ± 5
5	2,3-二甲基吡嗪 2,3-Dimethylpyrazine	$y=225.18x+9.14$	0.9994	1.0	3.3	92 ± 5	98 ± 6	95 ± 5
6	3-乙基吡啶 3-Ethylpyridine	$y=204.46x-5.25$	0.9992	1.3	4.3	102 ± 8	95 ± 8	98 ± 6
7	2,3,5-三甲基吡嗪 2,3,5-Trimethylpyrazine	$y=157.82x-1.45$	0.9998	1.3	4.3	85 ± 7	93 ± 6	98 ± 8
8	5-乙基-2-甲基吡啶 5-Ethyl-2-methylpyridine	$y=156.22x-3.24$	0.9991	1.5	4.8	86 ± 6	89 ± 6	96 ± 7
9	2,3,5,6-四甲基吡嗪 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	$y=239.12x-2.20$	0.9999	0.9	3.0	90 ± 7	94 ± 4	102 ± 6

2.4 实际样品检测

选取 6 种市售卷烟样品(分别标记为 A、B、C、D、E、F)进行检测,按照 1.2.1 节方法,每种卷烟采集 6 名吸食者唾液,分析不同卷烟样品吸食者唾液中吡嗪和吡啶类物质。结果表明:卷烟吸食者唾液中的吡啶类物质以吡啶为主,3-乙基吡啶和 5-乙基-2-甲基吡啶均未检出(低于定量限);卷烟吸食者唾液中的吡嗪类物质以 2-甲基吡嗪为主,2,6-二甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪和 2,3-二甲基吡嗪有少量检出,而 2,3,5-三甲基吡嗪和 2,3,5,6-四甲基吡嗪只在 A 样品吸食者唾液中检出,平均含量分别为 0.81 $\mu\text{g/L}$ 和 0.73 $\mu\text{g/L}$ 。不同卷烟吸食者唾

液中检出的主要吡嗪和吡啶含量以箱图示于图 4。由图可见,不同卷烟样品吸食者唾液中吡啶和 2-甲基吡嗪含量存在较大差异。

对以上 6 种卷烟吸食者唾液中吡嗪和吡啶类物质含量测定结果进行主成分分析,结果示于图 5。从图可见,同种卷烟不同吸食者唾液中的吡嗪和吡啶类含量能够较好的聚类,卷烟 A、D 与其他卷烟差异较大。进一步通过单因素方差和 Tukey 多重比较检验分析,发现不同卷烟吸食者唾液中检出的吡嗪和吡啶类含量存在显著性差异($P < 0.05$),这些物质可用于区分不同的卷烟风格。



注: a. 吡啶; b. 2-甲基吡啶; c. 2,5-二甲基吡啶;
d. 2,6-二甲基吡啶; e. 2,3-二甲基吡啶

图4 不同卷烟样品吸食者唾液中
吡啶和吡啶类物质含量箱图

Fig. 4 Box plots of pyrazines and pyridines contents
in smokers' saliva of different cigarettes

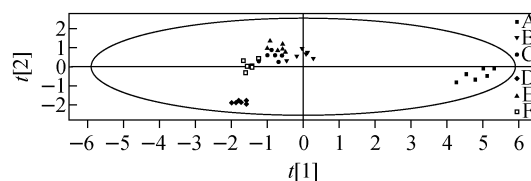


图5 6种卷烟样品吸食者唾液中吡啶
和吡啶类物质含量的主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis diagram
of pyrazines and pyridines content in smokers'
saliva of 6 kinds of cigarettes

3 结论

建立了气相色谱-正化学电离源-飞行时间质谱法(GC-PCI-TOF MS)检测烟草吸食者唾液中9种吡啶和吡啶类物质,结合特征离子的保留时间、精确质量数、裂解规律对目标物进行定性鉴定,以外标法定量。9种目标物的线性相关系数 R^2 大于0.9991,定量限为3.0~7.9 $\mu\text{g/L}$,回收率在85%~104%之间,该方法简单快速、检出限低、准确可靠。将该法用于实际样品检测,通过检测6种市售卷烟样品,发现烟草吸食者唾液中主要含有吡啶、2-甲基吡啶和二甲基吡啶类物质,且不同卷烟样品其吸食者唾液中的吡啶、2-甲基吡啶含量存在差异。对不同卷烟样品吸食者唾液中吡啶和吡啶类物质含量进行主成分分析,发现可以根据吸食者唾液中目标物含量将卷烟进行分类。该方法可为评价吡啶和吡啶类物质对烟气感官质量的影响提供科学依据。

参考文献:

- [1] MOOKHERJEE B D, WILSON R A. Tobacco constituents-their importance in flavor and fragrance chemistry[J]. Perfumer & Flavorist, 1990, 15(1): 27-49.
 - [2] 崔杨,李雪梅,杨叶昆,等. 应用搅拌棒吸附萃取-热脱附-气质联用技术分析人工唾液捕集吸收的卷烟主流烟气成分[J]. 分析化学,2010,38(2): 275-279.
- CUI Yang, LI Xuemei, YANG Yekun, et al. Analysis of chemical components of mainstream smoke trapped by artificial saliva using stir bar sorptive extraction and thermal desorption coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,

- 2010, 38(2): 275-279(in Chinese).
- [3] 刘所锋,李东方,冷绍生. 国内烟草制品香味研究近况探析[J]. 安徽农业科学,2008,36(28): 12 299-12 302.
- LIU Suofeng, LI Dongfang, LENG Shaosheng. Research stains analysis on flavor and taste of dmeestic tobacco products in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36 (28): 12 299-12 302(in Chinese).
- [4] SCHMELTZ I, HOFFMANN D. Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smoke [J]. Chemical Reviews, 1977, 77(3): 295-311.
- [5] 吴鸣,洗可法,赵明月. 云南烤烟中半挥发性碱性成分的分析[J]. 中国烟草学报,1999,5(1):11-14.
- WU Ming, XIAN Kefa, ZHAO Mingyue. The analysis of semi-volatile basic components in Yunnan flue-cured tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 1999, 5(1): 11-14(in Chinese).
- [6] 黄兰,徐迎波,田振峰,等. 气相色谱-质谱/选择离子监测法分析烟草中的重要香味物质[J]. 烟草科技,2012,45(1):34-42.
- HUANG Lan, XU Yingbo, TIAN Zhenfeng, et al. Analysis of important aroma components in tobacco by GC-MS with selective ion mode[J]. Tobacco Science & Technology, 2012, 45 (1): 34-42(in Chinese).
- [7] 鹿洪亮,钟巧霞,赵明月,等. GC/MS,GC×GC/TOF MS 分析烟草半挥发性中性成分比较[J]. 烟草科技,2007,40(1):32-37.
- LU Hongliang, ZHONG Qiaoxia, ZHAO Mingyue, et al. Comparison between GC/MS and GC ×GC/TOF MS in analyzing semi-volatile neutral constituents in tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 2007, 40(1): 32-37(in Chinese).
- [8] ZHU P, MIAO H, DU J, et al. Organochlorine pesticides and pyrethroids in Chinese tea by screening and confirmatory detection using GC-NCI-MS and GC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(29): 7 092-7 100.
- [9] KIM E, LEE J, CHOI S, et al. Analysis of ketamine and norketamine in urine by automatic solid-phase extraction (SPE) and positive ion chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry (PCI-GC-MS)[J]. Forensic Science International, 2008, 174(2): 197-202.
- [10] 幸苑娜,王欣,陈泽勇,等. 气相色谱-正化学源质谱法测定家用橡胶手套中 7 种 *N*-亚硝胺及其前体物的迁移量[J]. 分析测试学报,2011,30(5): 503-508.
- XING Yuanna, WANG Xin, CHEN Zeyong, et al. Determination of migration levels of 7 *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from household gloves by chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Instrument Analysis, 2011, 30 (5): 503-508(in Chinese).
- [11] QIU Y, CAI G, SU M, et al. Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOF MS and UPLC-Q TOF MS[J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(10): 4 844-4 850.
- [12] ORASCHE J, SCHNELLE-KREIS J, ABBA-SZADE G, et al. Technical note: in-situ derivatization thermal desorption GC-TOF MS for direct analysis of particle-bound non-polar and polar organic species[J]. Atmospheric Chemistry and Physics, 2011, 11(17): 8 977-8 993.
- [13] CAMPORA P, BERMEJO A M, TABERNERO M J, et al. Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography-positive chemical ionization-mass spectrometry (GC-PCI-MS)[J]. Journal of Analytical Toxicology, 2003, 27(5): 270-274.
- [14] 幸苑娜,倪宏刚,王欣,等. 气相色谱-正化学源质谱法测定橡胶中 *N*-亚硝胺及其前体物的迁移量[J]. 分析化学,2011,39(7):1 065-1 070.
- XING Yuanna, NI Honggang, WANG Xin, et al. Determination of migration levels of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from balloons by gas chromatography-positive chemical ionization-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39 (7): 1 065-1 070(in Chinese).
- [15] 沈伟健,毛应民,吴斌,等. 气相色谱-正化学源-质谱联用技术测定葡萄和葡萄酒中多种唑类杀菌剂的残留量[J]. 分析化学,2010,38(7):941-947.
- SHEN Weijian, MAO Yingmin, WU Bin, et al. Determination of multiple azoles fungicides residues in vegetables by offline disperse solid phase extration and gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38 (7): 941-947(in Chinese).
- [16] OCHIAI N, MITSUI K, SASAMOTO K, et al. Multidimensional gas chromatography in combination with accurate mass, tandem mass spectrometry, and element-specific detection for identification of sulfur compounds in tobacco smoke[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1 358: 240-251.