

使用GC-Orbitrap-MS高分辨质谱对电子烟油中尼古丁成分进行定量分析

作者

Jane Cooper,¹ Chris Allen,² and Cristian Cojocariu¹
¹Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK ²Broughton
Nicotine Services, Earby, UK

介绍

电子烟出现于2007年，作为传统香烟的替代品之一，其使用在全世界有显著的增速。电子烟油(e-liquid)可能含有尼古丁，这是一种非常容易上瘾且在高剂量时有毒的物质，摄入尼古丁可能会增加心脏病发作的风险，并可能影响生殖健康。研究表明，尼古丁会影响吸烟者的注意力和记忆力，尤其是青少年。

为保护人们的健康，并履行欧盟根据《世界卫生组织烟草控制框架公约》承担的义务，烟草产品指令2014/14/EU (TPD)第20条第4款，包含含有尼古丁的电子香烟和再填充容器，药品和保健产品管理局(MHRA)负责执行第20条的大部分规定，明确规定尼古丁含量的限制不超过20毫克/毫升。

现有的电子烟油的定量分析多采用液相色谱和气相色谱技术，仪器配置为GC-FID、LC-UV以及质谱。但是这些方法的灵敏度和选择性不能满足定量分析需求。高分辨率和极高的质量精度使得GC-Orbitrap成为电子烟油定性定量分析的不二选择。

关键词

精确质量数 电子烟 烟油 气相色谱 气质联用
定量分析 气相 高分辨率 Orbitrap质谱 尼古丁

本实验通过对电子烟油中尼古丁的定量分析展现了Exactive GC Orbitrap高分辨质谱系统的高灵敏度和高质量精度。

实验

标准品与样品

本地购买尼古丁含量为0, 6, 12mg/mL的无香和有香的电子烟油用于实验分析。同样, 也分析了尼古丁含量为0mg/mL的“shortfill”无尼古丁添加烟油, shortfill”无尼古丁添加的烟油, 因其不含有尼古丁, 因此购买量不受法规限制, 单次购买量可大于10ml。“shortfill”这类烟油是一种烟油的稀释剂, 消费者在购买了该产品后, 需要另行购买尼古丁油, 在使用前, 由使用者自行进行添加勾兑。在英国, 这类零尼古丁添加的烟油不受TPD法规管制。

电子烟油的尼古丁定量分析采用分流/不分流进样。取50uL烟油样品使用乙腈做溶剂稀释至5mL (LC/MS级别), 混匀, 取100uL烟油稀释液及50uL内标物 (0.1mg/mL, 8-羟基喹啉), 直接于GC进样瓶中以乙腈为溶剂稀释至1mL上机测试。

校准曲线: 尼古丁浓度范围46ng/mL至13792ng/mL, 溶剂为乙腈, 尼古丁标品为LGC (特丁顿, 英国) 认证烟油标准物质, 内标物 (8-羟基喹啉) 浓度5000ng/mL。

仪器及方法

所有试验中采用Thermo Scientific™ Exactiv GC Orbitrap质谱仪联用Thermo Scientific™ TRACE 1310 气相色谱搭载Thermo Scienti_c™ TriPlus RSH 自动进样器并配备了Thermo Scientific™即插式分流/不分流进样口。

色谱柱采用Thermo Scientific™ TG-WaxMS 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm (P/N 26088-1420)。

使用FC43 (CAS311-89-7) 对质谱系统进行调谐和校正, 耗时 < 1.5min, 调谐结果质量精度 < 0.5ppm。质谱系统使用电子电离源 (EI) 模式, 在60,000分辨率下进行全扫描分析 (m/z200 FWHM)。仪器详细参数见表1和表2。

表1. 气相色谱和进样参数

TRACE 1310 GC 气相色谱参数				
进样体积 (μl)	1.0			
衬管	Thermo Scientific™ LinerGOLD™ 4 mm i.d. 78.5 mm length (P/N 453A1255-UI)			
进样口温度 (°C)	260			
载气 (mL/min)	He, 1.2			
进样模块及模式	分流不分流进样口, 分流模式			
分流比	10:1			
吹扫流量 (mL/min)	5.0			
色谱柱	TG-WaxMS 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film capillary column (Thermo Scientific™ TraceGOLD™ GC Column) (P/N 26088-1420)			
柱温箱条件	RT(min)	升温速率 (°C/min)	目标温度 (°C)	保持时间 (min)
初始温度	0	-	40	3.00
终止温度	3.00	13	250	6.00
运行时间	25	-	-	-

表2. 质谱参数

Exactive GC Orbitrap 质谱参数	
传输线温度(°C):	250
电离方式:	EI
离子源温度(°C):	230
电力能量(eV):	70
采集模式:	Full-scan
扫描范围(Da):	75-500
分辨率:	60,000 FWHM at m/z 200

数据处理

使用Thermo Scientific™ TraceFinder软件进行数据处理。该软件集成仪器控制、方法开发和定性定量数据处理为一体, 同时也包含高分辨数据解卷积和谱库搜索匹配功能。

结果与讨论

本实验验证了高分辨Orbitrap-GC/MS技术对电子烟油中尼古丁的定量分析能力，方案采用液体进样，优化得到本方案的仪器参数，分辨率、仪器灵敏度及线性范围。

在使用TraceFinder软件建立尼古丁的定量分析工作流程时，需要先建立一个数据库（CDB），将所需的化合物信息进行汇总，见表2.图3为尼古丁的定性定量离子的提取离子色谱图叠加谱图。

色谱结果

按照表1的色谱条件，目标物获得了良好的色谱分离结果。

尼古丁和内标物8-羟基喹啉的总离子流（TIC）见图1。

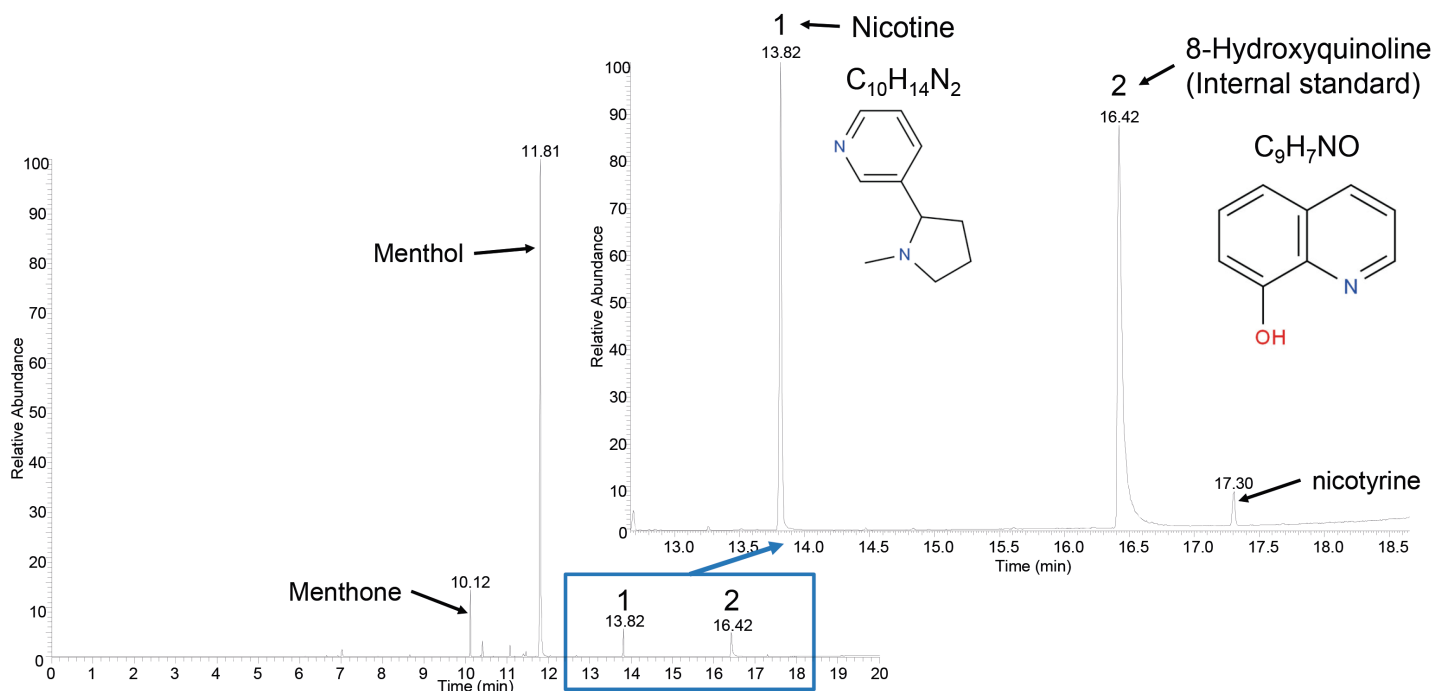


图 1. [1] 尼古丁 和 [2]8- 羟基喹啉（内标物）总离子流（TIC）特征谱图，尼古丁浓度 13,792 ng/mL，8- 羟基喹啉浓度 5000 ng/mL。保留时间在 12.12,11.81 和 17.30 的色谱峰，以及其他的色谱峰的定性结果均在扣除基质背景后按照 NIST 谱库中最高匹配度给出了定性结果

Compound Database - e-cig SSL*							
Compound Name	Peak Label	Peak Workflow	Associated Target Peak	m/z	Retention Time (min)	RT Window (sec)	Target Ratio
8-hydroxy quinoline	T1: 145.05219	TargetPeak		145.05219	16.42	30.00	15
8-hydroxy quinoline	T1C1: 117.05731	Confirming	T1: 145.05219	117.05731	16.42	30.00	15
8-hydroxy quinoline	T1C2: 89.03863	Confirming	T1: 145.05219	89.03863	16.42	30.00	15
Nicotine	T1: 84.08083	TargetPeak		84.08083	13.80	30.00	15
Nicotine	T1C1: 133.07614	Confirming	T1: 84.08083	133.07614	13.80	30.00	15
Nicotine	T1C2: 161.10740	Confirming	T1: 84.08083	161.10740	13.80	30.00	15

图 2. 尼古丁和 8- 羟基喹啉的 CDB 数据库，包含详细的定性定量特征离子（m/z），保留时间（RT），保留窗口以及特征离子比率

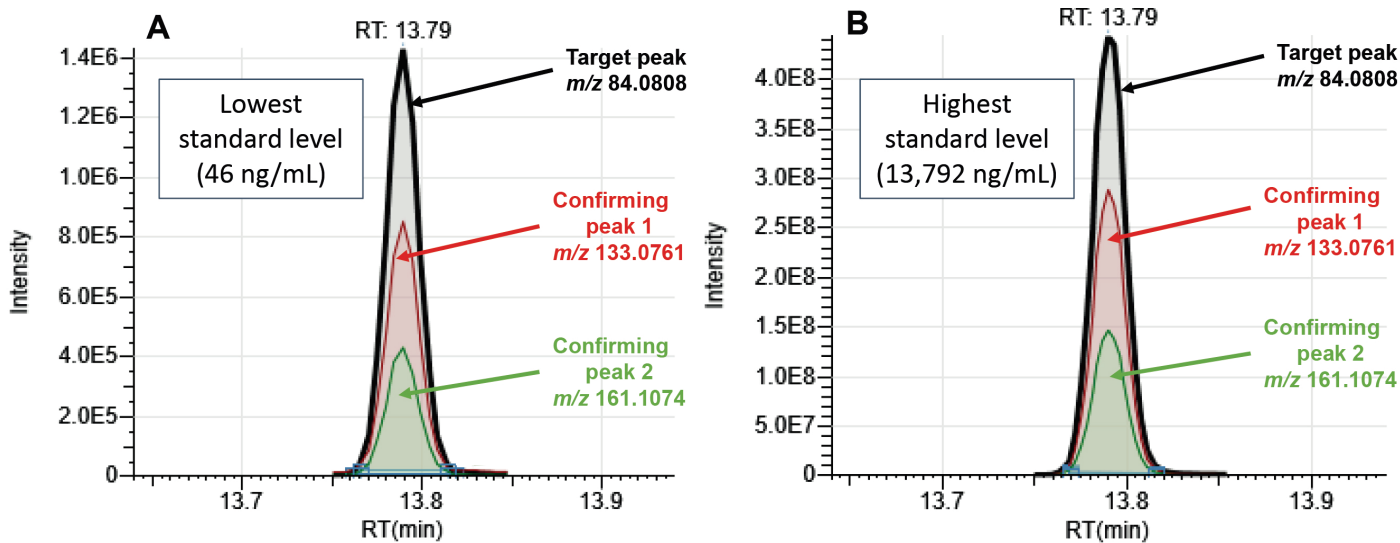


图 3 尼古丁的定性和定量离子提取离子流图 (EICs) 【A】为标曲浓度的低浓提取离子流图叠加谱图 (46 ng/mL), 【B】为标曲浓度高浓提取离子流图叠加谱图 (13792 ng/mL)

定量及灵敏度

本文使用Exactive GC Orbitrap GCMS系统进行了尼古丁的定量方法学验证, 包括系统灵敏度、线性相关系数, 峰面积重现性。此外, 还对目标化合物在线性浓度范围内的质量准确性进行了测试。线性范围在46-13792ng/mL范围内, 测试了11个浓度级别 (相当于电子烟油样品中0.046-13.79mg/mL的含量)。数据采用全扫描方式, 数据的保留时间漂移窗口 ± 0.5 min, 质量准确度允许范围 ± 5 ppm, 定性定量离子比率偏差范围 $\pm 15\%$ 。全扫描采集方式获得的数据可满足已知物

定量分析, 以及对未知物组分进行探索和进行进一步的数据挖掘工作。在46ng/ml浓度下, 尼古丁物质具有良好的检出能力 (该浓度相当于烟油中0.046mg/ml浓度)。

质量精度

质谱的质量精度和色谱的稳定性是实现电子烟油中尼古丁成分准确定量的先决条件。图4给出了在校正浓度范围内高浓度的尼古丁碎片离子的质量精度, 每一个离子碎片离子的质量精度均 < 1 ppm。

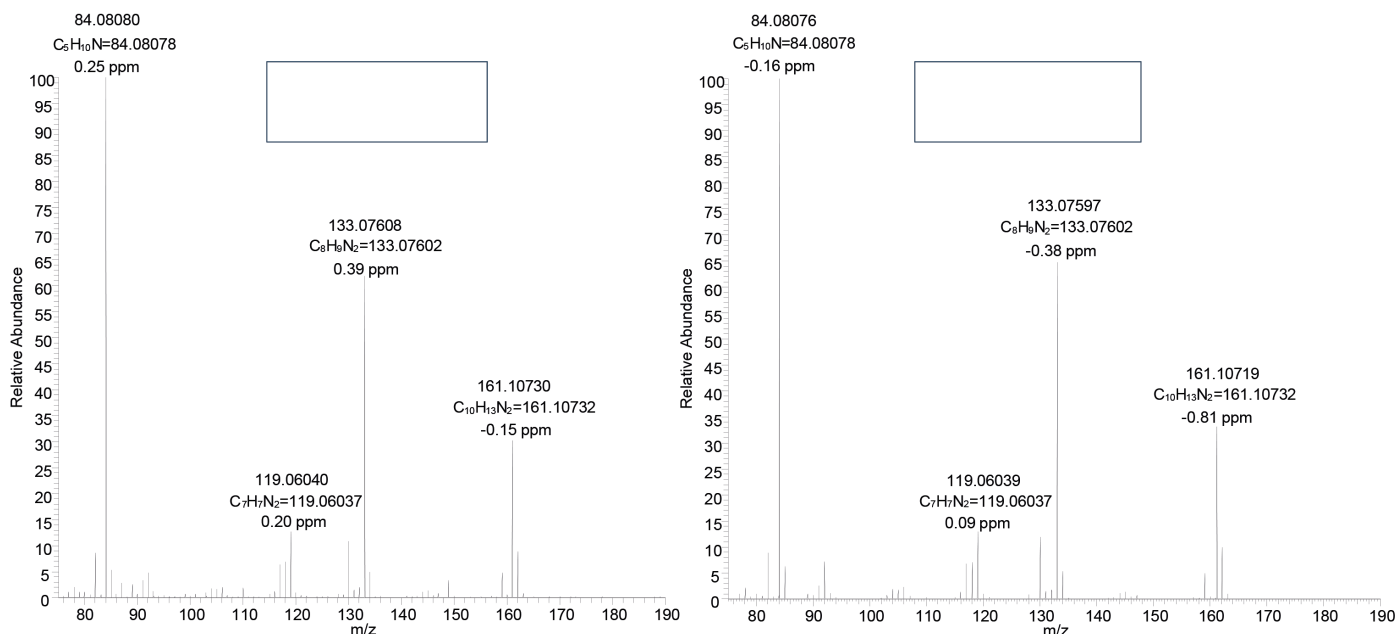


图 4, 尼古丁的低浓度 (46ng/mL) 和高浓度 (13792ng/mL) 质谱图质谱图中每一个离子碎片的质量精度均小于 1ppm, 注释内容分别是测量质量数、元素组成、理论质量数以及质量精度 (ppm)。

基质中尼古丁峰面积重现性

测定尼古丁在基质中的重现性，对准确定量尼古丁含量十分重要，本方案测试了两种烟油基质，使用6mg/mL添加浓度，重复进样三次，获得重现性数据，见表3，定量离子的峰面积重现性为3.7%至3.9%。

线性结果

内标法建立11个级别的线性结果（46-13792ng/mL），使用1/X权重因子，如图5A，获得完美的线性相关系数内标曲线（内标物8-羟基喹啉），内标物峰面积重现性RSD5.33%，尼古丁11个点的线性相关系数 R^2 为0.9991，峰面积重现性RSD4.4%，标曲上每个点的回读值偏差。图5B为尼古丁的标准曲线及线性相关系数（ R^2 ）以及峰面积重现性。

表3. 两种电子烟油样品尼古丁含量的重现性（n=3），添加浓度为6mg/mL，f代表有香味烟油，g代表无香味烟油。含量结果使用内标法计算获得。

Nicotine results summary						
Sample:	f			g		
Replicate number	Peak area	RT (min)	Conc. (mg/mL)	Peak area	RT (min)	Conc. (mg/mL)
1	227988757	13.78	5.523	274002489	13.78	7.053
2	234018241	13.77	5.619	290141336	13.77	7.422
3	245967546	13.77	5.463	29386353	13.77	7.297
Average	235991515	13.77	5.535	285993392	13.77	7.257
Std dev	9150386	0.006	0.079	10547493	0.006	0.1877
%RSD	3.88	0.042	1.422	3.69	0.042	2.59
Claimed (mg/mL)			6.00			6.00
% of claimed			92.25			120.96

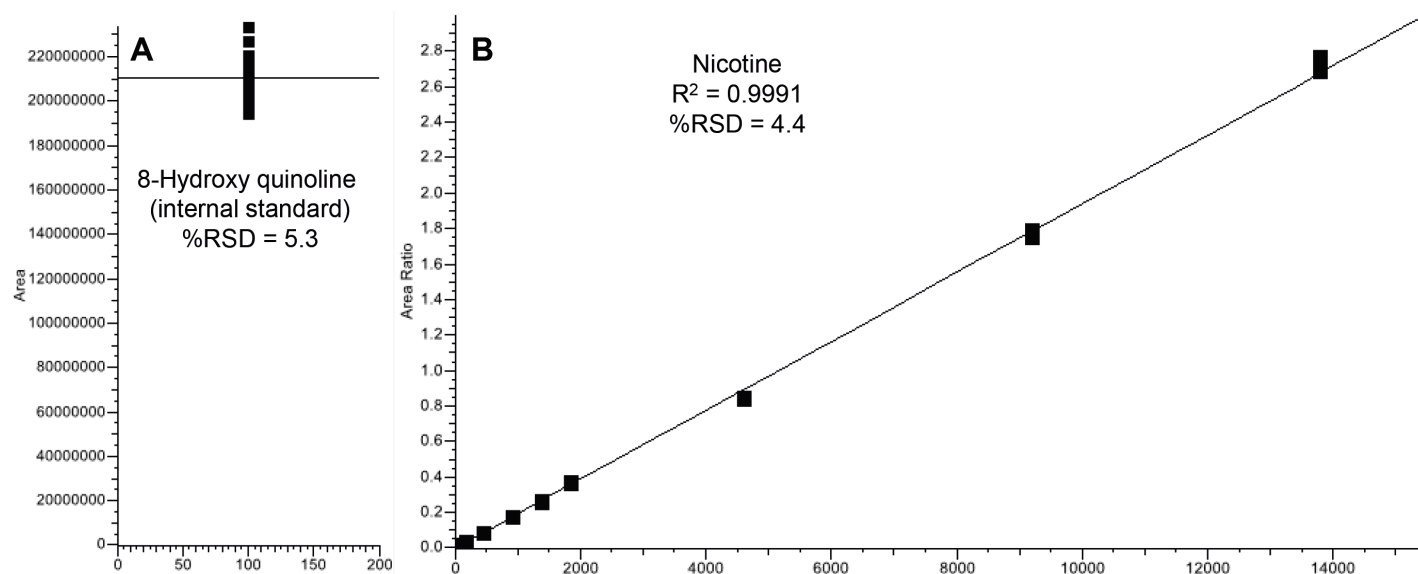


图 5. (A) 8-羟基喹啉峰面积重现性（内标物）(B) 尼古丁内标曲线，浓度范围为 46 to 13,792 ng/mL 的 11 点标曲，每个浓度点进样两次取平均

电子烟油样品中尼古丁的定量分析

本方案中一共对10个电子烟油样本进行了处理及分析，分析结果见表6A，样品的定量分析均采用内标法定量，在每个样品中均添加了内标物，使用内标曲线对尼古丁含量进行了校准。对三种标注含有尼古丁成分的烟油进行了测试，标注结果与测试结果的对比见图6B。测试结果显示，电子烟油中的尼古丁含量的实测值与说明书中的标注含量差异很大，测试结果表明，尼古丁含量的实测值与标注含量之间的含量偏差在-8%到+21%之间。

A

Sample	Description	Declared nicotine concentration (mg/mL)	Nicotine concentration (mg/mL)
a	Flavorless	0	<0.046
b	Flavored (branded)	0	<0.046
c	Flavored (branded)	0	<0.046
d	Flavored (vanilla)	0	<0.046
e	Flavored (mint)	0	<0.046
f	Flavored (branded)	6	5.5
g	Flavorless	6	7.3
h	Flavored (lemon)	12	12.2
i	Flavored (strawberry)	0	<0.046
j	Flavored (lemon)	0	<0.046

B

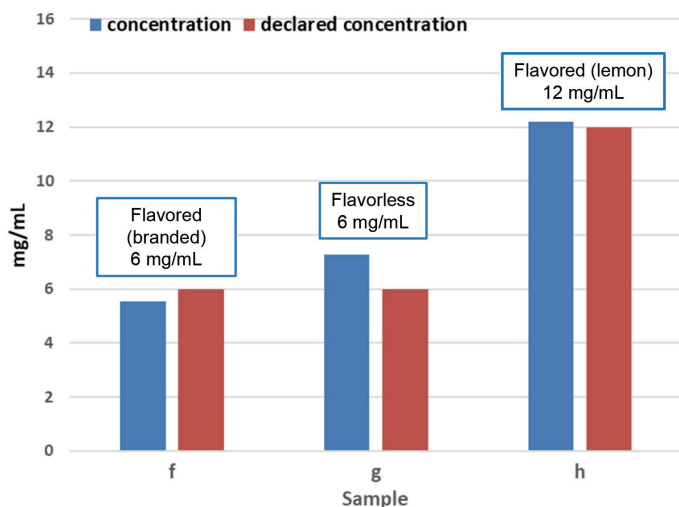


图 6.(A) 电子烟油中尼古丁实测含量，(B) 三个标注含有尼古丁的烟油中尼古丁的测试含量和标注含量对比

结论

- 该研究表明，Orbitrap GC-MS技术具有高分辨率和高质量精度的优势，是电子烟油定量分析的不二选择
- 使用液体进样对尼古丁进行目标物定量分析：线性相关系数 $R^2=0.999$ ，峰面积重现性 $RSD\%=4.4\%$ ，11个点的标准曲线浓度范围在46 至13,792 ng/mL之间（相当于烟油中尼古丁含量0.046 - 13.79 mg/mL）；全谱中各离子碎片质量数的质量精度均< 1ppm（低浓度与高浓度下均适用）
- 对种市售的电子烟油中尼古丁含量进行了定量分析，其中包含有香及无香的烟油十个烟油样品中，有2个零尼古丁的“shortfill”烟油稀释液，其余8个测试的烟油样品尼古丁标注含量为0,6,12mg/mL。在样本选择时，尼古丁的标注含量相同的情况下，又选择了不同香味的样本进行多因素的考察比对。对含有尼古丁的样品进行重现性测试，结果显示，峰面积重现性 $RSD < 3\%$ ，具有良好的重现性。

参考文献

1. United States Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: a report of the Surgeon General. Centers for Disease, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 2010.
2. Goriounova, N.A.; Mansvelter, H.D. Short-and Long-Term Consequences of Nicotine Exposure during Adolescence for Prefrontal Cortex Neuronal Network Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v.2(12), 2012.
3. World Health Organization Framework Convention on Tobacco Control signed in Geneva on 21 May 2003. [Online] <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42811/9241591013.pdf;sequence=1> (accessed Nov 15, 2018).
4. The Tobacco Products Directive (2014/14/EU). [Online] https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/tobacco/docs/dir_201440_en.pdf (accessed Nov 15, 2018).
5. E-cigarettes: regulations for consumer products. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. [Online] <https://www.gov.uk/guidance/e-cigarettes-regulations-for-consumer-products> (accessed Nov 15, 2018).
6. Flora, J. W.; Wilkinson, C. T.; Sink, K. M.; McKinney, D. L.; Miller, J. H. Nicotine-related impurities in e-cigarette cartridges and refill e-liquids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2016, 39(17-18), 821–829.
7. Liu, X.; Joza, P.; Rickert, B. Analysis of nicotine and nicotine-related compounds in electronic cigarette liquids and aerosols by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research* 2017, 27(7), 154–167.
8. Aszyk, J.; Kubica P., Kot-Wasik, A.; Namiéśnik, J.; Wasik, A. Comprehensive determination of flavouring additives and nicotine in e-cigarette refill solutions. Part I: liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* 2017, 1519, 45–54.
9. Herrington, B. J. S.; Myers, C.; Rigdon, A. Analysis of Nicotine and Impurities in Electronic Cigarette Solutions and Vapor. Restek, State College, PA, USA, 2015
10. CORESTA Recommended Method No. 62). Determination of Nicotine in Tobacco and Tobacco Products by Gas Chromatographic Analysis. 2005. [Online] <https://www.coresta.org/determination-nicotine-tobacco-and-tobacco-products-gas-chromatographic-analysis-29185.html> (accessed Dec 19, 2018).
11. Ghalop, V.V.; Kosmider, L.; Halquist, M.S. A Standardized Approach to Quantitative Analysis of Nicotine in e-Liquids Based on Peak Purity Criteria using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2018, Article ID 1720375.
12. Cooper, J.; Allen, C.; Cojocariu, C. Comprehensive chemical characterization of e-cigarette liquids using high resolution Orbitrap GC-MS. Thermo Scientific Application Note 10708, March 2019.
13. Davis, B.; Dang, M.; Kim, J.; Talbot P. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids. *Nicotine & Tobacco Research* 2015, 17(2), 134–141.
14. Trehy, M. L.; Ye, W.; Hadwiger, M. E. et al. Analysis of electronic cigarette cartridges, refill solutions, and smoke for nicotine and nicotine related impurities. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2011, 34(14), 1442–1458.



赛默飞
官方微信
热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com