

# 紙菸菸葉中亞硝胺檢驗方法之建立及背景值調查

許哲綸 蔡佳芬 江靜芸 曾素香

研究檢驗組

## 摘要

本研究以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)建立檢測紙菸中4種菸草特异性亞硝胺(tobacco specific nitrosamines, TSNAs)之檢驗方法，分別為*N*-亞硝基降菸鹼(*N*'-nitrosonornicotine, NNN)、4-甲基亞硝胺-1-3-吡啶基-1-丁酮(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK)、*N*-亞硝基新菸鹼(*N*'-nitrosoanatabine, NAT)及*N*-亞硝基新菸草鹼(*N*'-nitrosoanabasine, NAB)。取均質後之菸葉以乙酸乙酯利用超音波萃取，過濾後濃縮至乾，以甲醇回溶後以LC/MS/MS進行分析，層析分離部分採用Waters Atlantis T3管柱，以含10 mM甲酸胺之甲醇及水溶液為移動相進行梯度沖提，質譜分析為利用多重反應偵測模式(multiple reaction monitoring, MRM)進行TSNAs之偵測，回收率介於88.2-113.5%，CV值介於1.4-6.0%均小於10%。應用本研究所建立之方法檢測51件市售紙菸，11件國產紙菸菸葉TSNAs檢出量為0.12-0.69 mg/kg，9件大陸紙菸菸葉檢出量為0.03-1.07 mg/kg，31件進口紙菸菸葉檢出量為0.08-0.94 mg/kg，皆未超過歐盟建議限量標準10 mg/kg。

**關鍵詞：**菸草、亞硝胺、液相層析串聯質譜儀

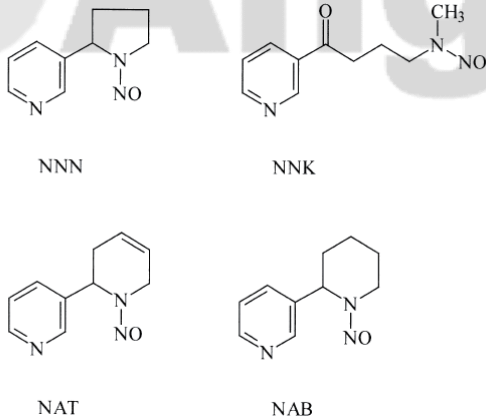
## 前言

菸葉中含4種菸草特异性亞硝胺(tobacco specific nitrosamines, TSNAs)為*N*-亞硝基降菸鹼(*N*'-nitrosonornicotine, NNN)、4-甲基亞硝胺-1-3-吡啶基-1-丁酮(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK)、*N*-亞硝基新菸鹼(*N*'-nitrosoanatabine, NAT)及*N*-亞硝基新菸草鹼(*N*'-nitrosoanabasine, NAB)(圖一)。亞硝胺被發現存在於未燃燒菸葉(unburnt tobacco)、主流煙(mainstream)、側流煙(sidestream)及咀嚼菸草產品者的唾液中<sup>(1-3)</sup>。

菸葉中自然就存在亞硝胺，而菸葉中的尼古丁在菸草固化(curing)、老化、加工及吸菸的過程經由氧化及亞硝基化反應也會生成亞硝胺，此

外唾液中或微生物發酵產生的亞硝酸鹽(nitrite)和煙草中的生物鹼(alkaloids)尼古丁(nicotine)反應也會導致亞硝胺之產生<sup>(2-5)</sup>。

關於亞硝胺之安全性研究，在動物實驗中發現NNN具有致癌性，會導致上消化道之癌症，及鼻腔、氣管、肺臟之腫瘤，也容易使DNA產生突變。而NNK同樣具有致癌性，NNK會使肝臟及肺臟細胞DNA產生突變，且NNK及其代謝物可通過胎盤屏障(placental barrier)傳至胎兒體中，研究也發現NNN及NNK的暴露量皆和罹病率呈正比關係。在動物實驗中也證實NAB具致癌性，會導致食道癌及乳頭狀瘤(papilloma)。NAT在動物實驗中並未證實其暴露會增加腫瘤發生率及致突變性。在人類的流行病學研究及報告中並無證據說明NNK、NAB、NAT及NNN和人類癌症之關係<sup>(6)</sup>。



圖一、4種TSNAs之化學結構式

由於紙菸菸葉中亞硝胺含量並無相關法規限量標準，乾燥菸草與紙菸菸葉同樣皆為菸葉，因此參考歐盟(European Union, EU)的相關規定，而歐盟僅對於無菸菸品中TSNAs有建議限量標準，乾燥菸草TSNAs之含量不得超過10 mg/kg(表一)<sup>(7)</sup>。

常用於偵測菸品中亞硝胺的儀器有氣相層析熱能分析儀(gas chromatograph/thermal energy analyzer, GC/TEA)及液相層析串聯式質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)。GC/TEA對於亞硝胺具有很高之選擇性及靈敏度，但TEA只能用於此類含氮物質之分析，應用性較不廣泛，且前處理較為複雜，本實驗使用LC/MS/MS進行亞硝胺之偵測，參考Jansson等人(2003)檢測鼻煙(snuff)中亞硝胺之方法進行菸葉中亞硝胺之檢驗，以乙酸乙酯(ethyl acetate)進行萃取，此方法不需額外淨化程序即可利用LC/MS/MS分析<sup>(8)</sup>。

依據菸品資料申報辦法，亞硝胺為應申報成

表一、菸草製品中成分之建議限量標準<sup>(7)</sup>

Constituent	Limit (dry weight basis)
TSNA (tobacco-specific nitrosamines)	10 mg/kg
NDMA (nitrosodimethylamine)	10 µg/kg
B(a)P (benzo(a)pyrene)	20 µg/kg
Lead	2 mg/kg
Cadmium	2 mg/kg

分，而本研究之目的在於建立菸葉中4種特異性亞硝胺之檢驗方法，評估其回收率、重複性等，並同時進行市售香菸菸葉亞硝胺含量分析，提供行政管理參考。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

99年4-7月間請各縣市政府衛生局抽樣51件市售紙菸，含國產紙菸11種、進口紙菸31種及9種大陸紙菸，計51種產品。

### 二、化學試藥及器材

標準樣菸(CORESTA approved monitor No.6, CM6)，購自Filtrona Instruments & Automation Limited, London, UK。亞硝胺標準品N-亞硝基降菸鹼(N'-nitrosornicotine, NNN)、4-甲基亞硝胺-1-3-吡啶基-1-丁酮(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK)、N-亞硝基新菸鹼(N'-nitrosoanatabine, NAT)及N-亞硝基新菸草鹼(N'-nitrosoanabasine, NAB)，購自Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada)純度為98%以上，亞硝胺同位素內部標準品(NNN-d4、NNK-d4、NAT-d4、NAB-d4)購自Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada)純度為99%。甲酸(formic acid, 90%)採用試藥特級，購自和光純藥工業株式會社(大阪市，日本)。氨水(ammonia solution, 25%)，購自Merck公司(Darmstadt, Germany)。甲醇(methanol)採用液相層析級，購自Merck公司(Darmstadt, Germany)。乙酸乙酯(ethyl acetate)採用殘量級，購自J. T. Baker (NJ, USA)。無水硫酸鈉(sodium sulphate anhydrous)採用試藥特級，購自Nacatai Tesque. Inc. (Kyoto, Japan)。無灰濾紙Whatman NO. 40(直徑90 mm)，購自Whatman International Ltd (Maidstone, UK)。針筒式濾頭(syringe filter)採用耐龍材質，大小為13 mm，孔徑為0.22 µm。50 mL塑膠離心管採用PP材質。Coresta Approved Monitor No. 6 CM6購自Borgwaldt Technik, Germany。

### 三、儀器與裝置

(一)液相層析串聯式質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)  
美國Waters公司出品之AcQuity™液相層析儀，搭配Waters Micromass Quattro Premier XE質譜儀及MassLynx V4.1數據分析軟體之電腦系統

(二)純水製造機  
Milli-Q SP Advantage A10 System (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA)

(三)離心減壓濃縮裝置  
EZ-2 (Genevac Inc., New York, USA)

(四)旋渦混合器  
Type 37600 mixer (Thermolyne Co., IA, USA)

(五)超音波震盪器  
Transonic TP 690 (Elma Group Inc., Pforzheim, Germany)

(六)酸鹼值測定儀  
Orion 720A+ (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)

(七)快速粉碎機  
DM-6 (佑崎機械有限公司，彰化，台灣)

### 四、方法

(一)標準溶液(TSNAs)之配製

精確稱取NAT、NNN、NNK、NAB各5 mg，分別以二氯甲烷溶解並定容至2 mL，作為2500 µg/mL標準原液，置於-18°C保存。取適量個別標準原液混合後，以甲醇定容，作為1000 ng/mL混合標準液，貯存於-18°C。

(二)內部標準溶液(TSNAs-d4)之配製

精確稱取NAT-d4、NNN-d4、NAB-d4、NAT-d4各1 mg，分別以二氯甲烷溶解並定容至1 mL，作為1000 µg/mL內部標準原液，置於-18°C保存。取適量個別內部標準原液混合後，以甲醇定容，作為1000 ng/mL內部混合標準液，貯存於-18°C。

(三)移動相溶液之配製

1. 移動相A，取900 mL甲醇加入0.31 mL甲酸以25%氨水調整酸鹼值至pH 4.0 (約10滴氨水)，再與100 mL水混合以濾膜過濾，取濾液作為移動相A溶液。
2. 移動相B，取900 mL水加入0.31 mL甲酸以25%氨水調整酸鹼值至pH 4.0 (約10滴氨水)，之後與100 mL甲醇混合以濾膜過濾，取濾液作為移動相B溶液。

(四)檢液之製備

香菸檢體2包取出菸葉以快速粉碎機進行均質，取均質後檢體約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入2 g無水硫酸鈉，再加入乙酸乙酯10 mL及1000 ng/mL之TSNAs-d4溶液50 µL (TSNAs-d4 50 ng)，搖晃均勻後置於室溫10 min，超音波水浴萃取10 min，再以濾紙過濾，以乙酸乙酯清洗離心管3次(3 × 3 mL)，濾液併入玻璃試管中濃縮至乾，以1 mL甲醇回溶，經0.22 µm濾膜過濾供作檢液，以LC/MS/MS偵測之。

(五)鑑別試驗

精確量取檢液及標準溶液各10 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀，參照下列條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間(retention time)、偵測離子、多重反應偵測相對離子強度及訊噪比(S/N ratio)鑑別之。

液相層析串聯質譜儀測定條件：

液相層析儀部分，層析管柱為Waters Atlantis T3 (2.1 × 100 mm, 3 µm)管柱，管柱溫度設定30°C，移動相由含10 mM甲酸胺之甲醇及水溶液所組成，兩通道之移動相溶液組成分及時間梯度見表二，流速為0.3 mL/min。自動注射器之溫度設定為10°C，注射量為10 µL。質譜儀部分，以電灑離子化(electron spray ionization, ESI)搭配多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式進行正離子之偵測，碰撞氣體(collision gas)為氬氣，流速設定為0.15 mL/min。離子源之參數設定見表三，MRM偵測方法之參數及分析物之滯留時間見表四，每一偵測通道(channel)

表二、液相層析之線性梯度條件

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.00	20	80
5.00	60	40
5.01	100	0
10.00	100	0
10.01	20	80
12.00	20	80

A: methanol/water (9 : 1, v/v) + 10 mM HCOONH<sub>4</sub>

B: methanol/water (1 : 9, v/v) + 10 mM HCOONH<sub>4</sub>

表三、質譜儀參數

Source (ESI+)	Settings	Analyser	Settings
Capillary (kV)	3.0	LM1 resolution	13.0
Extractor (V)	3.0	HM1 resolution	13.0
RF lens (V)	0.0	Ion energy 1	1.0
Source temp. (°C)	120	Entrance	1
Desolvation temp. (°C)	500	Exit	1.0
Cone gas flow (L/hr)	50	LM2 resolution	13.0
Desolvation gas flow (L/hr)	700	HM2 resolution	13.0
		Ion energy 2	1.0

之停留時間(dwell time)設定為0.1 sec。

(六)含量測定(內部標準品法)

標準曲線之製作，將TSNAs (1000 ng/mL) 0、1、2、5、50、100、200、500及900 μL分別加入褐色樣品瓶中，並加入TSNAs-d4 (1000 ng/mL) 50 μL (TSNAs-d4 50 ng)，再加入甲醇使體積皆為1000 μL，混合均勻，配製得TSNAs標準溶液濃度為0、1、2、5、50、100、200、500及900 ng/mL。

精確量取10 μL檢液注入液相層析串聯質譜儀中，參照上述方法進行分析。以定量離子波峰面積與內部標準品波峰面積比，與對應之濃度，製作成標準曲線，並依下列計算式求得檢體中亞硝酸胺之含量(ng/g)：

$$\text{檢體中各亞硝酸胺之含量(ng/g)} = \frac{C \times V}{M}$$

C：由各標準曲線求得檢液中各亞硝酸胺之濃度(ng/mL)

V：甲醇回溶體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

(七)回收率及重複性試驗

菸葉亞硝酸胺之檢測由於無空白檢體，所以回收率試驗使用標準樣菸CM6做為檢體，CM6中TSNAs檢測值分別為NAT 61.4 ng/g，NAB 3.4 ng/g，NNN 42.3 ng/g，NNK 34.9 ng/g，相較於多數市售紙菸，CM6的TSNAs含量為偏低。

稱取均質後之CM6菸葉1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入2 g無水硫酸鈉及乙酸乙酯10 mL，再分別添加1000 ng/mL TSNAs混合標準原液50、100、200 μL及1000 ng/mL TSNAs-d4混合標準溶液50 μL，搖晃均勻後置於室溫10 min，超音波水浴萃取10 min，再以濾紙過濾，乙酸乙酯清洗離心管3次(3 × 3 mL)，濾液併入玻璃試管中濃縮至乾，以1 mL甲醇回溶，經0.22 μm濾膜過濾後以LC/MS/MS分析，三種濃度之添加回收試驗皆為3重複，並同時做CM6之含量測定，依上述流程進行檢液調製、儀器分析及含量測定，求得3重複間之平均回收率及變異係數(coefficient of variation, CV)，以評估本研究建立之分析方法之回收率及重複性。回收率之計算依下列計算式求得：

$$\text{檢體中各添加濃度之回收率(\%)} = \frac{C_f - C_u}{C_a} \times 100$$

C<sub>f</sub>：由各標準曲線求得添加後檢液中各亞硝酸胺之濃度(ng/mL)

C<sub>u</sub>：由各標準曲線求得未添加檢液中各亞硝酸胺之濃度(ng/mL)

C<sub>a</sub>：添加之各亞硝酸胺濃度(ng/mL)

(八)統計分析

平均值、標準偏差及變異係數運用Microsoft Excel 2003軟體進行計算。線性迴歸及相關係數(r)由MassLynx 4.1軟體中之QuanLynx產生。

(九)市售紙菸分析

以建立之方法進行紙菸菸葉中亞硝酸胺含量檢

測，包含NAT、NAB、NNN及NNK。

## 結果與討論

### 一、液相層析串聯質譜儀參數

實驗以電噴灑離子化(electron spray ionization, ESI)，正離子模式進行偵測，藉由改變毛細管電壓(capillary voltage)、去溶劑(desolvation)溫度及氣體流速、樣品椎(sample cone)電壓及碰撞能量等，使分析物的母離子及產生之子離子具有最大的偵測感度，表三為實驗所設定的質譜儀參數。MRM模式中，偵測之子離子，選擇訊號大之主要離子片斷為定量離子，選擇另一離子為定性離子。

由於實驗所採用之質譜儀屬低解析度質譜，串聯質譜分析時，依據歐盟之鑑別規定，LC/MS/MS鑑別系統必須包含1個母離子(1 IP)及2個子離子( $1.5 \times 2 = 3$  IPs)，獲得4 IPs才得以有效鑑別。實驗設定之TSNAs、TSNAs-d4 MRM偵測參數及滯留時間列於表四，其錐電壓為17-20 V、碰撞能量為10-25 eV，本方法12分鐘內即可完成分析。菸品中檢出亞硝酸胺之多重反應偵測層析圖譜見圖二。

### 二、TSNAs萃取及偵測方法

TSNAs存在於菸葉及菸葉燃燒的煙流中，煙流中TSNAs之偵測首先需以吸菸機中濾片收集吸煙過程中產生的總固狀微粒物質(total particulate matter, TPM)，再以溶劑萃取TPM中之TSNAs，英裔英美菸草公司(British American Tobacco)<sup>(9)</sup>、加拿大衛生署<sup>(10-11)</sup>及中國(中國國家煙草質量監督檢驗中心)<sup>(12)</sup> 都有上述萃取香菸主煙流TSNAs之方法。而本研究主要是針對菸葉中TSNAs進行檢測，菸葉中TSNAs常使用緩衝溶液及二氯甲烷進行萃取，加拿大衛生署<sup>(1)</sup>測定菸葉中TSNAs之方法，是以緩衝溶液(citrate-phosphate buffer containing L-ascorbic acid)進行萃取，並以二氯甲烷沖提淨化管柱收集TSNAs，以GC/TEA分析含量，本研究也曾經嘗試以此方法進行分析，發現

GC/TEA對於TSNAs的選擇性相當高，但是靈敏度欠佳，所以改以LC/MS/MS分析。由於並未收集到以LC/MS/MS檢測菸葉中TSNAs之方法，故參考Jansson等人(2003)(8)檢測鼻煙中亞硝酸胺之方法進行探討，Jansson等人在實驗中使用三種不同的萃取及淨化方法，二氯甲烷萃取後管柱淨化、乙酸乙酯萃取再濾紙過濾淨化及緩衝溶液萃取後以固相萃取淨化，實驗發現乙酸乙酯萃取出的TSNAs含量最高，且相對於其他兩者方法省時，回收率為79-89%，Jansson等人(2003)也比較不同移動相的分析效果，分析感度甲酸胺又優於醋酸胺，因此本實驗將Jansson等人之最佳分析方法加以修飾及應用，發現此分析方法相當快速、簡便且靈敏度高，適合用於紙菸中菸葉TSNAs之檢測。

### 三、回收率及重複性試驗

實驗測試TSNAs於標準樣菸CM6之回收率，添加濃度50、100、200 ng/g，回收率分別為88.2-109.3、91.2-112.0及94.4-113.5%，變異係數分別為2.0-6.0、1.5-4.1及0.9-3.8%，回收率範圍為88.2-113.5%，變異係數小於10%(表五)，顯示方法整體之回收率及重複性良好。

### 四、標準曲線之測定

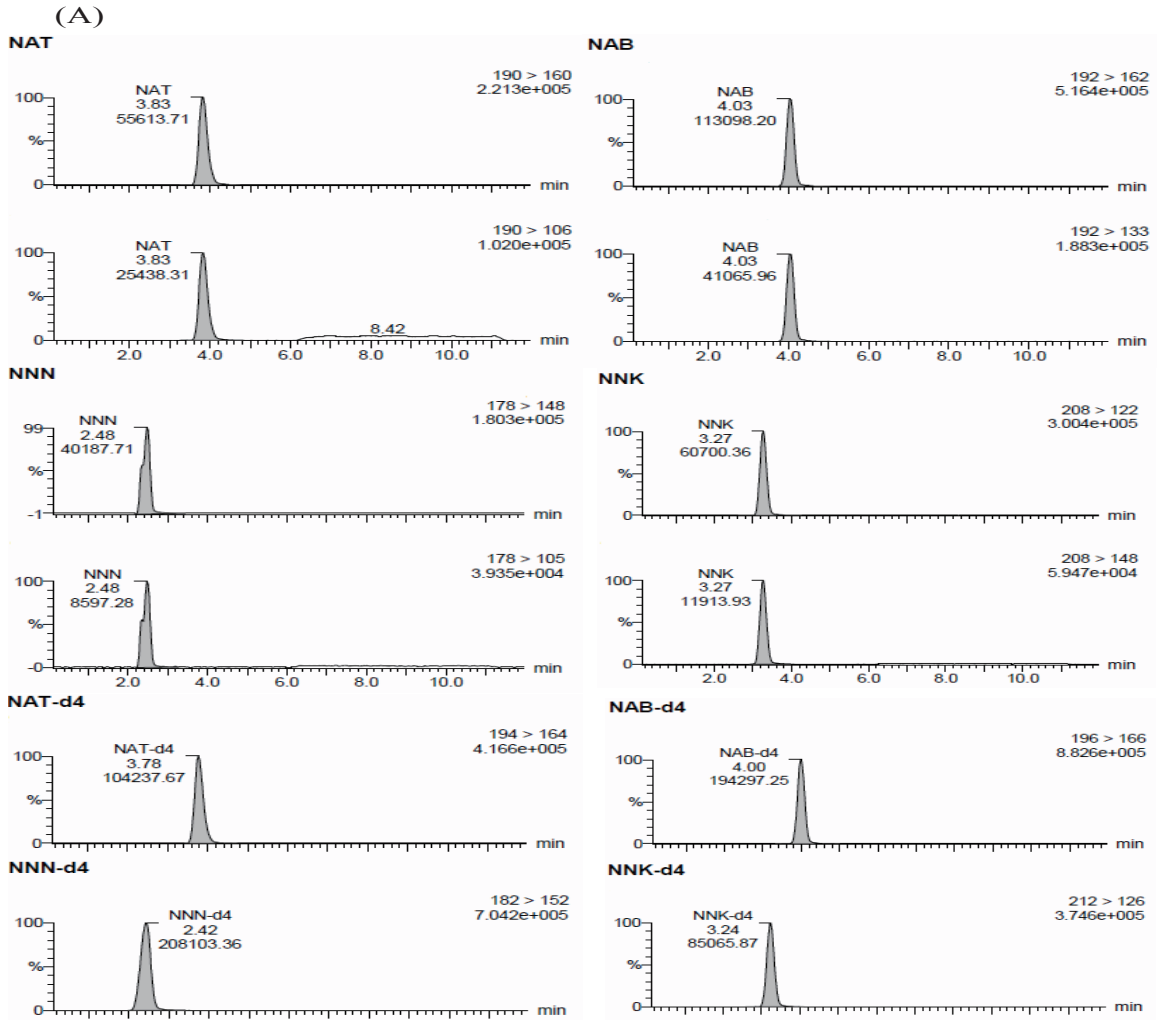
表六為TSNAs於LC/MS/MS偵測之標準曲線，以加權方式(calibration weighting function 1/X)進行線性迴歸，由於TSNAs於菸葉中的含量分布相當廣泛，所以設定兩組標準曲線範圍，濃度低於50 ng/mL者帶入線性範圍1-50 ng/mL之方程式，濃度高於50 ng/mL者，則直接以線性範圍1-900 ng/mL之方程式進行計算，相關係數(r)皆可達0.9995以上，顯示其濃度與積分面積具有良好線性關係。

### 五、市售紙菸中菸葉TSNAs含量檢驗結果

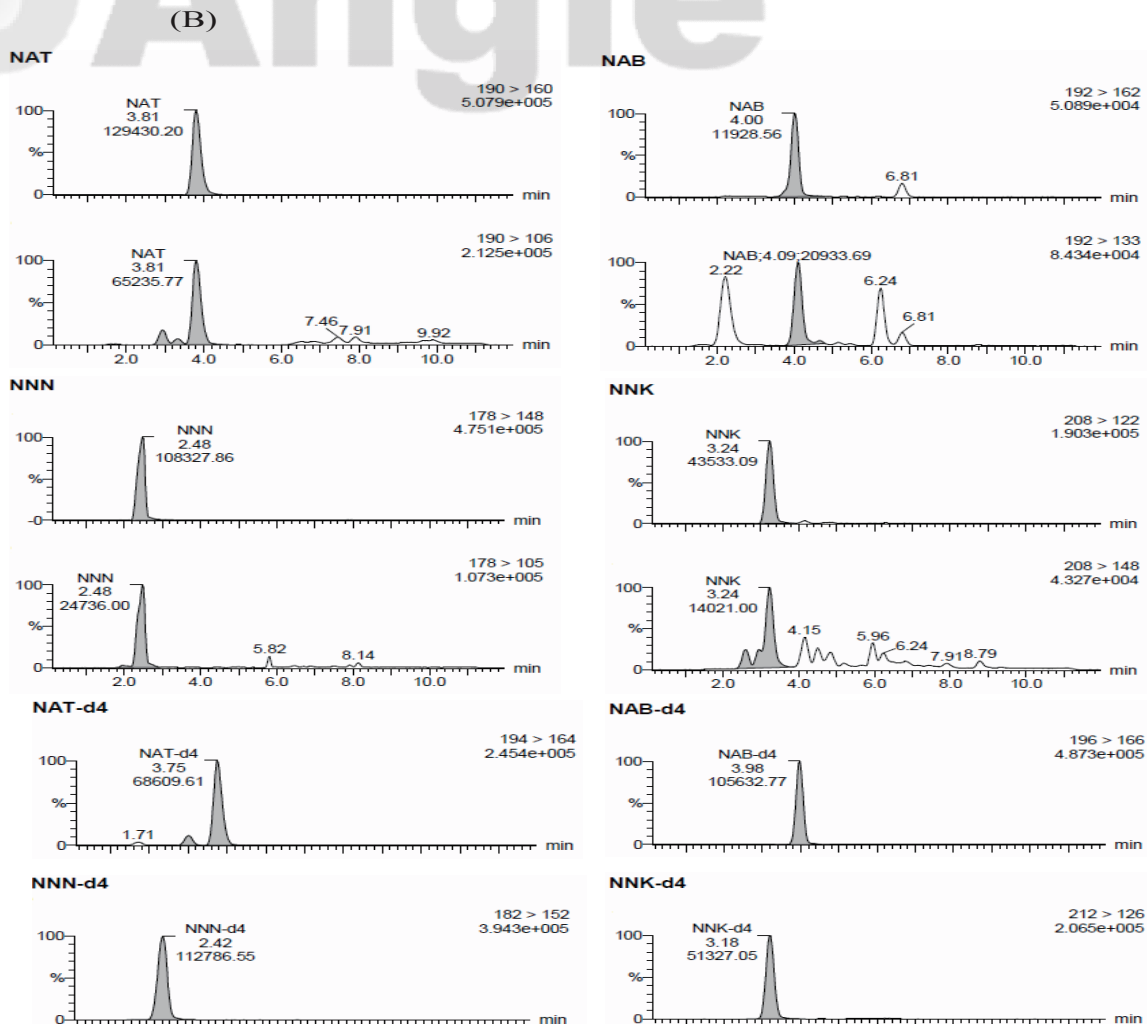
本次抽樣51件市售紙菸，其中國產紙菸11件，大陸紙菸9件，進口紙菸31件，檢驗結果分別

表四、TSNAs及TSNAs-d4之LC/MS/MS MRM偵測參數

分析物	定量			定性		
	偵測離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	偵測離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
NAT	190 > 160	20	10	190 > 106	20	18
NAB	192 > 162	17	13	192 > 133	17	20
NNN	178 > 148	20	10	178 > 105	20	18
NNK	208 > 122	17	12	208 > 148	17	12
NAT-d4	194 > 164	17	10	-	-	-
NAB-d4	196 > 166	17	12	-	-	-
NNN-d4	182 > 152	17	10	-	-	-
NNK-d4	212 > 126	17	13	-	-	-



圖二、菸品檢體檢出亞硝酸胺之多重反應偵測層析圖譜



圖二、菸品檢體檢出亞硝胺之多重反應偵測層析圖譜(續)

表五、添加TSNAs於CM6之回收率

Spiking level (ng/g)	Mean recovery (%)			
	NAT	NAB	NNN	NNK
200	99.3 ± 1.4 (1.4)	94.6 ± 0.9 (0.9)	113.5 ± 4.3 (3.8)	94.4 ± 4.4 (4.7)
100	96.3 ± 2.3 (2.4)	91.2 ± 3.1 (3.4)	112.0 ± 1.7 (1.5)	93.5 ± 3.9 (4.1)
50	93.9 ± 5.6 (6.0)	88.2 ± 3.8 (4.3)	109.3 ± 3.9 (3.5)	92.7 ± 1.8 (2.0)

Mean ± SD (CV) N = 3

列於表七、表八及表九。

國產紙菸菸葉NAT檢出範圍為42.2-235.5 ng/g, NAB檢出範圍為2.2-10.9 ng/g, NNN檢出範圍為52.5-397.0 ng/g, NNK 檢出範圍為21.1-59.3 ng/g。大陸紙菸菸葉NAT檢出範圍為15.3-332.0 ng/g,

NAB檢出範圍為0.8-10.7 ng/g, NNN檢出範圍為11.3-711.4 ng/g, NNK檢出範圍為 5.5-37.6 ng/g。進口紙菸菸葉NAT檢出範圍為32.7-374.8 ng/g, NAB檢出範圍為1.6-14.6 ng/g, NNN檢出範圍為34.7-470.0 ng/g, NNK檢出範圍為8.3-108.0

紙菸菸葉中亞硝酸胺檢驗方法之建立及背景值調查

ng/g，TSNAs中NAB的檢出量為最低，其次為NNK。

國產紙菸菸葉TSNAs檢出量為0.12-0.69 mg/kg，大陸紙菸菸葉TSNAs檢出量為0.03-1.07 mg/kg

表六、TSNAs於LC/MS/MS之線性範圍測定

TSNAs	Linear range (ng/mL)	y=ax+ b	r
NAT	1-50	y = 0.0148x + 0.0043	0.9994
	1-900	y = 0.0138x + 0.0069	0.9973
NAB	1-50	y = 0.0149x + 0.0046	0.9996
	1-900	y = 0.0157x + 0.0039	0.9993
NNN	1-50	y = 0.0053x + 0.0023	0.9998
	1-900	y = 0.0054x + 0.0022	0.9998
NNK	1-50	y = 0.0116x + 0.0043	0.9994
	1-900	y = 0.0118x + 0.0043	0.9996

kg，進口紙菸菸葉TSNAs檢出量為0.08-0.94 mg/kg，大陸紙菸菸葉的TSNAs檢出量範圍最廣，其次為進口紙菸，國產紙菸的TSNAs含量範圍最小。51件的市售紙菸中，TSNAs檢出濃度最低者為編號C8「紅雙喜硬盒20支」(0.03 mg/kg)，檢出濃度最高者為編號C4「都寶香煙-7 mg」(1.07 mg/kg)，國產紙菸菸葉TSNAs的平均檢出量為0.38 ± 0.16 mg/kg，大陸紙菸為0.61 ± 0.37 mg/kg，進口紙菸為0.45 ± 0.23 mg/kg (圖三)。

本次所抽驗之51件檢體，TSNAs檢出量為0.03-1.07 mg/kg，皆未超過歐盟建議限量標準10 mg/kg。

結 論

表七、國產紙菸中菸葉TSNAs含量

編號	NAT (ng/g)	NAB (ng/g)	NNN (ng/g)	NNK (ng/g)	TSNAs (mg/kg)
D1	152.9 ± 11.5	7.8 ± 0.6	201.9 ± 15.7	56.0 ± 2.2	0.42
D2	164.5 ± 9.8	7.2 ± 0.4	152.0 ± 13.7	59.3 ± 4.9	0.38
D3	44.2 ± 1.1	2.2 ± 0.1	61.2 ± 2.4	21.1 ± 0.7	0.13
D4	42.2 ± 0.9	2.2 ± 0.1	52.5 ± 1.7	22.1 ± 1.3	0.12
D5	117.4 ± 4.3	5.7 ± 0.2	190.2 ± 11.8	37.7 ± 2.1	0.35
D6	180.6 ± 3.3	8.3 ± 0.2	282.3 ± 11.3	44.2 ± 0.5	0.52
D7	235.5 ± 4.3	10.9 ± 0.5	397.0 ± 8.2	50.7 ± 1.7	0.69
D8	189.0 ± 11.6	9.0 ± 0.4	250.4 ± 19.5	41.8 ± 2.3	0.49
D9	132.7 ± 1.9	6.4 ± 0.2	169.8 ± 11.3	41.0 ± 1.3	0.35
D10	118.4 ± 2.6	7.2 ± 0.4	164.1 ± 6.4	44.1 ± 4.0	0.33
D11	135.5 ± 3.7	7.6 ± 0.1	175.3 ± 2.9	47.5 ± 1.7	0.37

Mean ± SD N = 3

表八、大陸紙菸中菸葉TSNAs含量

編號	NAT (ng/g)	NAB (ng/g)	NNN (ng/g)	NNK (ng/g)	TSNAs (mg/kg)
C1	210.1 ± 5.0	7.9 ± 0.6	392.0 ± 9.6	37.5 ± 2.5	0.65
C2	266.0 ± 9.5	10.1 ± 0.3	437.4 ± 19.7	30.6 ± 2.0	0.74
C3	291.6 ± 9.9	10.7 ± 0.2	711.4 ± 9.2	16.3 ± 0.5	1.03
C4	332.0 ± 14.5	10.2 ± 0.5	709.9 ± 44.4	18.7 ± 1.0	1.07
C5	231.5 ± 2.2	8.0 ± 0.1	343.3 ± 8.9	25.2 ± 0.7	0.61
C6	220.3 ± 13.6	7.6 ± 0.3	297.2 ± 20.7	19.1 ± 1.3	0.54
C7	15.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1	11.5 ± 0.2	7.7 ± 0.6	0.04
C8	15.4 ± 0.3	0.9 ± 0.0	11.3 ± 0.8	5.5 ± 0.2	0.03
C9	258.9 ± 2.3	10.0 ± 0.5	447.3 ± 28.2	37.6 ± 2.0	0.75

Mean ± SD N = 3

表九、進口紙菸中菸葉TSNAs含量

編號	NAT (ng/g)	NAB (ng/g)	NNN (ng/g)	NNK (ng/g)	TSNAs (mg/kg)
I1	154.4 ± 7.6	7.0 ± 0.4	98.2 ± 4.9	55.1 ± 3.2	0.31
I2	64.0 ± 1.6	4.5 ± 0.2	361.5 ± 12.3	21.5 ± 0.9	0.45
I3	255.8 ± 2.1	14.2 ± 0.4	297.9 ± 13.7	87.5 ± 3.5	0.63
I4	129.7 ± 2.5	7.1 ± 0.3	319.6 ± 5.3	60.3 ± 2.0	0.52
I5	97.5 ± 4.6	5.0 ± 0.2	175.9 ± 6.1	17.8 ± 0.6	0.30
I6	43.6 ± 1.0	1.9 ± 0.2	34.9 ± 1.3	15.1 ± 1.4	0.10
I7	226.1 ± 14.5	9.3 ± 0.6	316.0 ± 23.9	31.1 ± 2.3	0.58
I8	93.0 ± 2.2	5.2 ± 0.1	152.8 ± 5.2	48.4 ± 1.5	0.30
I9	205.2 ± 6.9	9.4 ± 0.4	237.7 ± 7.5	63.4 ± 2.7	0.52
I10	374.8 ± 20.9	14.6 ± 0.6	448.3 ± 25.8	102.1 ± 9.5	0.94
I11	294.9 ± 1.9	13.2 ± 0.7	389.4 ± 14.0	108.0 ± 4.7	0.81
I12	255.7 ± 16.3	12.3 ± 0.9	470.0 ± 39.7	71.1 ± 5.0	0.81
I13	349.9 ± 10.4	14.2 ± 0.8	449.4 ± 20.0	59.9 ± 0.8	0.87
I14	196.6 ± 13.8	6.6 ± 0.5	314.2 ± 28.7	41.5 ± 3.4	0.56
I15	32.7 ± 1.6	2.3 ± 0.1	37.9 ± 1.8	11.3 ± 0.3	0.08
I16	45.6 ± 1.6	1.6 ± 0.1	34.7 ± 2.1	14.2 ± 0.1	0.10
I17	233.3 ± 15.1	9.6 ± 0.2	292.5 ± 27.6	59.1 ± 4.8	0.59
I18	144.7 ± 2.8	5.8 ± 0.3	244.7 ± 7.5	37.6 ± 1.0	0.43
I19	165.9 ± 8.9	7.1 ± 0.1	182.3 ± 3.4	45.3 ± 2.1	0.40
I20	235.7 ± 4.7	7.9 ± 0.3	287.6 ± 17.5	47.7 ± 2.6	0.58
I21	276.4 ± 7.9	9.6 ± 0.4	300.1 ± 12.0	49.3 ± 1.5	0.64
I22	224.5 ± 6.4	8.8 ± 0.2	323.3 ± 18.5	45.8 ± 1.1	0.62
I23	143.9 ± 4.6	7.0 ± 0.2	90.6 ± 2.2	46.4 ± 1.4	0.29
I24	109.5 ± 1.6	7.1 ± 0.2	74.0 ± 2.6	33.2 ± 1.4	0.22
I25	158.5 ± 13.4	5.7 ± 0.5	259.5 ± 24.4	38.0 ± 3.7	0.46
I26	73.2 ± 2.1	3.1 ± 0.2	82.6 ± 2.4	16.7 ± 0.9	0.18
I27	151.4 ± 4.8	5.9 ± 0.3	280.0 ± 9.1	45.6 ± 2.4	0.48
I28	149.6 ± 8.3	7.2 ± 0.2	290.3 ± 23.3	85.7 ± 5.6	0.53
I29	66.2 ± 2.5	3.1 ± 0.1	112.6 ± 4.0	8.3 ± 0.4	0.19
I30	105.1 ± 3.5	7.8 ± 0.2	147.7 ± 5.2	47.6 ± 1.7	0.31
I31	67.2 ± 0.8	5.6 ± 0.3	91.1 ± 3.3	32.6 ± 2.7	0.20

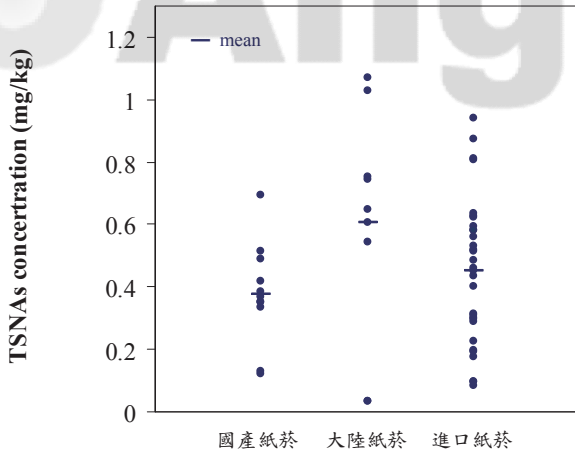
Mean ± SD N = 3

本研究建立之液相層析串聯質譜儀分析方法應用於市售紙菸菸葉中NNN、NNK、NAT及NAB 4種TSNAs 之分析，此方法只需萃取、減壓濃縮，操作簡便、省時、成本低，且回收率、重複性及靈敏度皆相當良好，適於使用於市售紙菸菸葉之分析，本次檢驗之結果，51種市售紙菸均有

檢出 NNN、NNK、NAT及NAB，TSNAs檢出量皆未超過歐盟建議限量標準。

### 誌 謝

本計畫經費係由行政院衛生署菸害防制及衛生保健基金補助，特致謝忱。



圖三、市售紙菸菸葉TSNAs含量分布情況

### 參考文獻

1. Health Canada. 1999. Determination of nitrosamines in whole tobacco. Ottawa. Canada. [[http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/\\_whole-entier/nitrosamines-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/_whole-entier/nitrosamines-eng.pdf)].
2. National Toxicology Program. 2005. 4-(*N*-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. NC. USA. [<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/elevnth/profiles/s135nson.pdf>].
3. National Toxicology Program. 2005. *N*-nitrosornicotine. NC. USA. [<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/elevnth/profiles/s135nson.pdf>].
4. 行政院衛生署國民健康局。2009。菸品化學物質-成分說明。 [[http://tobacco-information.bhp.doh.gov.tw/ch\\_list.aspx](http://tobacco-information.bhp.doh.gov.tw/ch_list.aspx)].
5. Hecht, S. S. and Hoffmann, D. 1988. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9: 875-884.
6. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. 2010. Volume 37 Tobacco

habits other than smoking; betel-quid and areca-nut chewing; and some related nitrosamines. Lyon. France. [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol37/volume37.pdf>].

7. ESTOC. 2010. Proposed regulation of smokeless tobacco products within the European Union. Brussels. Belgium. [<http://www.estoc.org/>].
8. Jansson, C., Paccou, A. and Osterdahl, B. G. 2003. Analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines in snuff by ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1008: 135-143.
9. British American Tobacco Group Research & Development. 2008. Method-Determination of Tobacco-Specific Nitrosamines in Mainstream Smoke. London. UK.
10. Health Canada. 1999. Determination of nitrosamines in mainstream tobacco smoke. Ottawa. Canada. [[http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/\\_main-principal/nitrosamines-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/_main-principal/nitrosamines-eng.pdf)].
11. Health Canada. 1999. Determination of nitrosamines in sidestream tobacco smoke. Ottawa. Canada. [[http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/\\_side-second/nitrosamines-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/alt_formats/hecs-sesc/pdf/tobac-tabac/legislation/reg/indust/method/_side-second/nitrosamines-eng.pdf)].
12. Xiong, W., Hou, H., Jiang, X., Tang, G. and Hu, Q. 2010. Simultaneous determination of four tobacco-specific *N*-nitrosamines in mainstream smoke for Chinese Virginia cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and validation under ISO and "Canadian intense" machine smoking regimes. *Anal. Chim. Acta.* 674:71-78.

## Investigation of Nitrosamines in Tobaccos

CHE-LUN HSU, CHIA-FEN TSAI, CHING-YUN CHIANG AND SU-HSIANG TSENG

Division of Research and Analysis

### ABSTRACT

This study investigated 4 tobacco specific nitrosamines (TSNAs) of cigarettes, including *N*'-nitrosonornicotine (NNN), 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), *N*'-nitrosoanatabine (NAT) and *N*'-nitrosoanabasine (NAB) by liquid chromatograph/tandem mass spectrometer (LC/MS/MS).

Homogenized tobacco was extracted with ethyl acetate by ultrasonic. The extract was evaporated to dryness and re-dissolved in methanol prior to analysis on LC/MS/MS. Waters Atlantis T3 column was used for separation with gradient elution between 10 mM ammonium formate and water solution. The mass spectrometry analysis of TSNAs was taken in the multiple reaction monitoring (MRM) modes. The recovery of TSNAs was between 88.2 and 113.5%. Fifty-one commercial cigarettes were investigated by this method. The results showed that the contents of TSNAs in 11 domestic cigarettes was 0.12-0.69 mg/kg, 9 cigarettes imported from China 0.03-1.07 mg/kg and 31 imported cigarettes 0.08-0.94 mg/kg. The contents of TSNAs in tobacco did not exceed the proposed limits 10 mg/kg of European Union.

Key words: nitrosamines, LC/MS/MS, cigarettes