

LCMS-8050 测定食品中 8 种 N-亚硝胺含量

LCMSMS-494

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定食品中 8 种 N-亚硝胺含量的方法。食品经捣碎后，采用水蒸气蒸馏法提取、浓缩，APCI 源电离，内标法测试，8 种 N-亚硝胺在 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (20 ng/mL) 浓度水平下响应良好，10~200 ng/mL 浓度范围内呈线性关系。加标回收和精密度实验测试表明，方法准确度高，重复性好；采用本方法对市售食品进行检测，在腊肠、烤鳗鱼等食品中检出含有 N-亚硝胺，浓度范围在 2.35~8.69 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法快速、有效，可为食品中 N-亚硝胺检测提供新思路。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 亚硝胺

N-亚硝胺是一类强致癌物，具有肝毒性和致癌性。在研究的 300 多种亚硝胺化合物中，90% 以上具有动物致癌作用，国际癌症研究机构 (IARC) 把许多 N-亚硝胺划分为人类“很可能” (2A) 或者“可能” (2B) 的致癌物，对 N-亚硝胺的主要关注点是其致癌性和遗传毒性。食品 N-亚硝胺的主要来源有啤酒、亚硝酸盐腌制的腊肉、加工奶酪以及鱼肉等，其它来源还有内源性合成如胃中亚硝酸盐与胺的反应等。我国在 GB 2762-2017 食品安全国家标准食品中污染物限量中对食品中 N-二甲基亚硝胺限量指标做了要求，其中肉及肉制品（肉类罐头除外）的限量为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；水产动物及其制品（水产品罐头除外）的

限量为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前食品中亚硝胺检测方法按 GB 5009.26-2016 规定的方法检测，此检测方法为 GCMS 检测法，用水蒸馏法进行样品前处理，样品需求量大，操作过程复杂、耗时长，对于批量操作存在一定的局限性；且实践证明，标准方法的回收率差，再现性差。厦门海关技术中心负责该国标方法的制修订工作，方法将包括气相色谱-串联质谱法、气相色谱-热能分析法和液相色谱-串联质谱法。其中液相色谱-串联质谱法的方法开发工作在岛津 LCMS-8050 上进行。

本文建立了 LCMS-8050 测定食品中 8 种亚硝胺的含量的方法；方法由厦门海关技术中心进行验证。

■ 实验部分

1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

序号	中文名称	CAS	英文缩写	分子式
1	N-二甲基亚硝胺	62-75-9	NDMA	$\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$
2	N-二乙基亚硝胺	55-18-5	NDEA	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$
3	N-二丙基亚硝胺	621-64-7	NDPA	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$
4	N-亚硝基吡咯烷	930-55-2	NPYR	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$
5	N-亚硝基哌啶	100-75-4	NPIP	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$
6	N-二丁基亚硝胺	924-16-3	NDBA	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$
7	N-甲基乙基亚硝胺	10595-95-6	NMEA	$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$
8	N-亚硝基吗啉	59-89-2	NMorPh	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$
IS1	N-二甲基亚硝胺-d6	17829-05-9	NDMA-d6	$\text{C}_2\text{D}_6\text{N}_2\text{O}$
IS2	N-二丙基亚硝胺-d14	93951-96-3	NDPA-d14	$\text{C}_6\text{D}_{14}\text{N}_2\text{O}$

1.2 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A
 输液泵：LC-30AD×2
 柱温箱：CTO-20A
 色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97
 脱气机：DGU-20A₅
 自动进样器：SIL-30ACMP
 质谱检测器：LCMS-8050

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：ACE C18-AR, 4.6 mm I.D.×150 mm L., 3 μm
 流动相：A相 -0.1% 甲酸水；B相 - 甲醇；
 流速：0.8 mL/min
 进样量：10 μL
 柱温：35°C

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 2。

质谱条件

分析仪器：LCMS-8050
 离子源接口电压：4.0 kV
 干燥气：氮气 5.0 L/min
 接口温度：300°C
 加热模块温度：200°C
 驻留时间：13-47 ms
 MRM 参数：见表 3
 离子化模式：APCI(+)
 雾化气：氮气 3.0 L/min
 碰撞气：氦气
 DL 温度：180°C
 扫描模式：多反应监测（MRM）
 延迟时间：3 ms

表 2 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	20
8.50	泵	B.Conc	70
10.00	泵	B.Conc	90
11.00	泵	B.Conc	90
11.10	泵	B.Conc	20
15.00	Controller	Stop	

表 3 MRM 优化参数

化合物	保留时间 (min)	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	使用内标
NDMA	3.16	75.15	58.10*	-13	18	-22	IS1
			43.1	-13	18	-16	
NMEA	4.47	89.15	61.10*	-21	-13	-23	IS1
			43.1	-29	-18	-16	
NDEA	6.79	103.1	75.2*	-17	-13	-30	IS2
			47.2	-20	-15	-19	
NDPA	10.57	131.2	89.1*	-22	-12	-16	IS2
			43.1	-24	-14	-16	
NDBA	11.61	159.25	57.15*	-11	-14	-21	IS2
			103.1	-11	-12	-21	

NPIP	7.72	115.15	69.15*	-20	-16	-28	IS2
			41.05	-20	-23	-14	
NPYR	4.88	101.1	55.15*	-17	-16	-20	IS1
			39.05	-17	-30	-13	
NMorPh	4.23	117.3	87.2*	-13	-11	-13	IS1
			45.00	-19	-18	-17	
NDMA-d6 (IS1)	3.13	81.05	46.05*	-10	-16	-18	/
			60.2	-10	-18	-17	
NDPA-d14 (IS2)	10.54	145.00	97.00*	-26	-12	-29	/
			46.00	-23	-25	-18	

注：* 表示定量离子

1.4 标准品的配制

精密吸取 8 种 N-亚硝胺标准溶液，用纯水稀释至浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，作为混合标准工作液；精密吸取 2 种 N-亚硝胺内标溶液，用纯水稀释至浓度为 100.0 $\mu\text{g/mL}$ ，作为内标工作溶液；精密吸取适量混合标准工作液和内标工作溶液，用纯水稀释至浓度为 10.0 ng/mL 、20.0 ng/mL 、50.0 ng/mL 、100.0 ng/mL 和 200.0 ng/mL 系列混合标准溶液，其中内标的浓度均为 40 ng/mL ，按浓度由低到高的顺序，进样分析。

1.5 食品样品前处理方法

液态样品摇匀；粉状样品直接测定；其他样品取可食部分组织捣碎。制备好的试样于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存，待测。

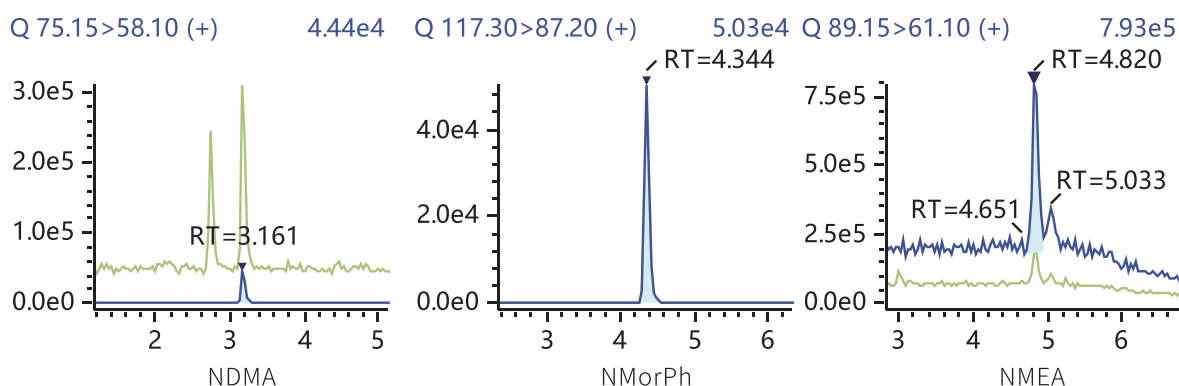
水蒸馏装置蒸馏：准确称取 20 g (精确至 0.01 g) 试样，加入 100 mL 水和 50 g 氯化钠于蒸馏管中，充分混匀，检查气密性。在 250 mL 三角烧瓶中加入 50 mL 二氯甲烷、0.5 mL 异辛烷，冷凝管出口伸入二氯甲烷液面下，并将三角烧瓶置于冰浴中；开启蒸馏装置加热蒸馏，收集 250 mL 冷凝液后关闭加热装置，停止蒸馏。

在盛有蒸馏液的三角瓶中加入 15 g 氯化钠和 2.0 mL 的硫酸 (1+3)，搅拌使氯化钠完全溶解。然后将溶液转移至 250 mL 分液漏斗中，振荡 5 min，必要时放气，静置分层后，将二氯甲烷层转移至另一平底烧瓶中，再用 120 mL 二氯甲烷分三次提取水层，合并 4 次二氯甲烷萃取液，总体积约为 170 mL。

向二氯甲烷萃取液添加纯水 1 mL 进行旋转蒸发，于冰浴条件下浓缩至无二氯甲烷，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后，上机检测。

■ 结果与讨论

2.1 N-亚硝胺标准溶液色谱图



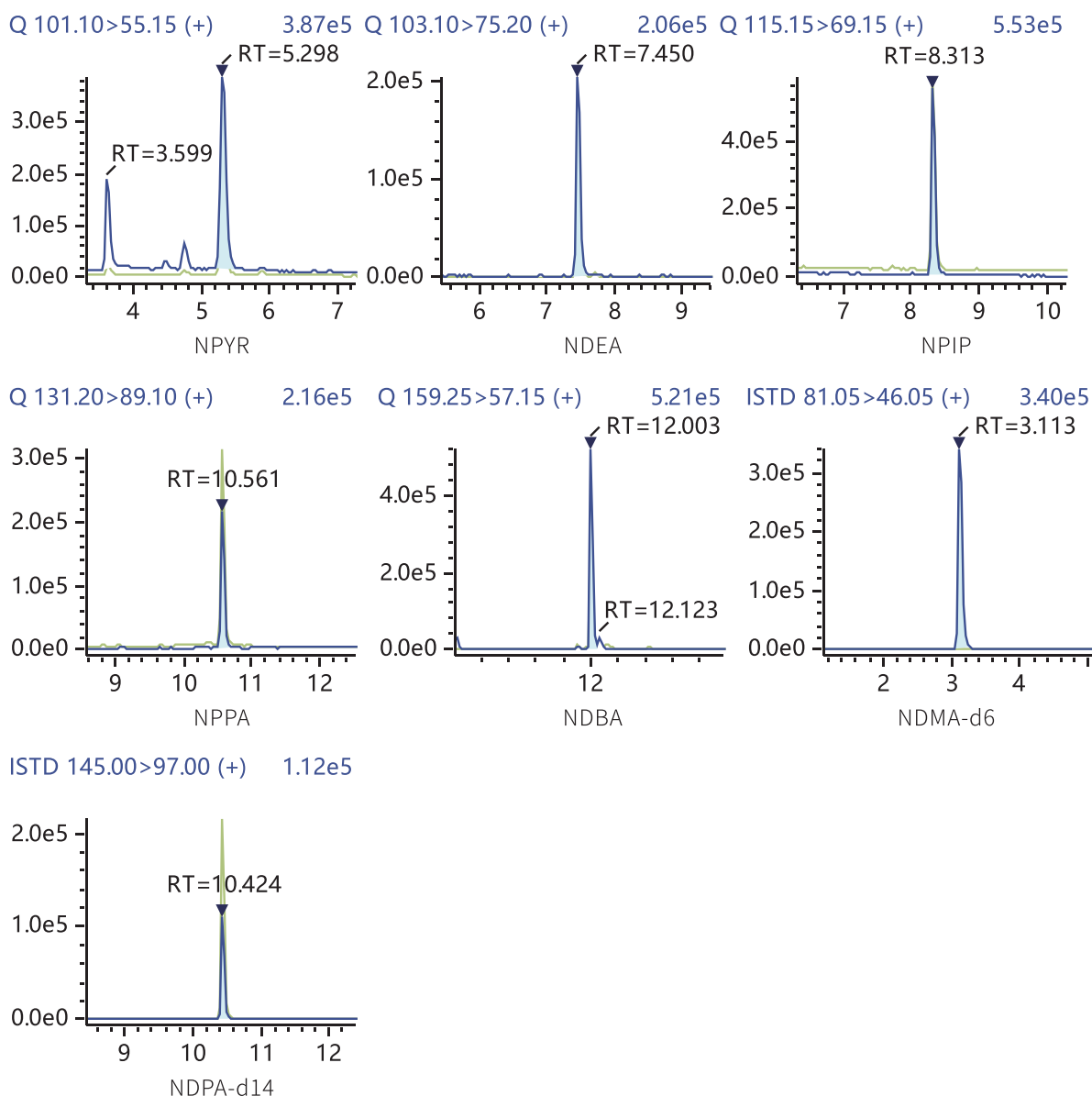
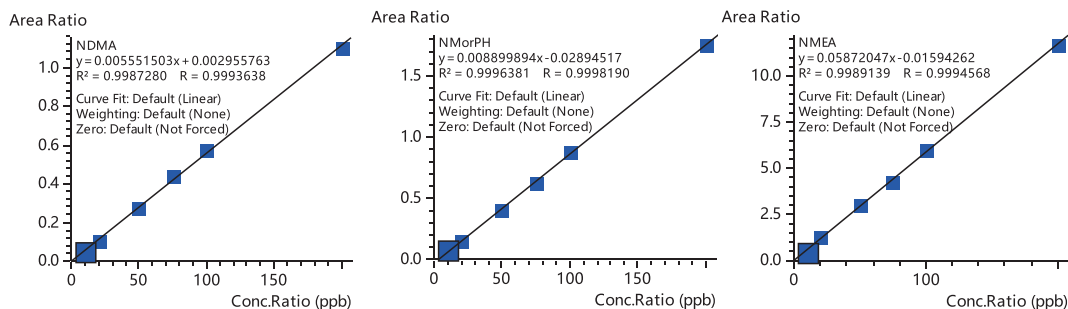


图 1 虾肉提取液中 8 种 N-亚硝胺和 2 种内标 MRM 色谱图 (亚硝胺浓度为 20 ng/mL)

2.2 线性范围

按照 1.4 项下配制方法, 以虾肉基质提取液代替水, 配制基质标准曲线, 并用同位素内标法进行分析测定。各分析物所对应的内标见表 3。

以 N-亚硝胺浓度与对应内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以 N-亚硝胺峰面积与对应内标峰面积的比值 Y 为纵坐标, 进行线性回归分析, 所得基质标准曲线见图 2, 线性回归方程及相关系数见表 4。



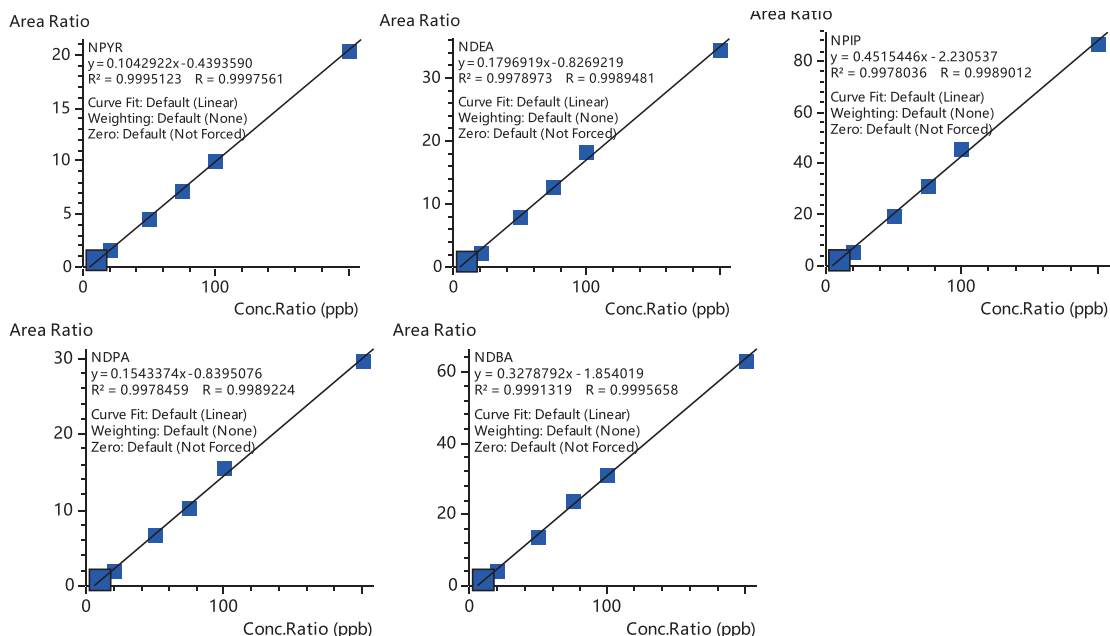


图2 8种N-亚硝胺标准曲线

表4 8种N-亚硝胺标准曲线参数(线性回归)

化合物	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
NDMA	10-200	85.3-104.2	0.9994
NMorPh	10-200	86.1-106.9	0.9987
NMEA	10-200	72.5-110.8	0.9995
NPYR	10-200	90.0-105.7	0.9991
NDEA	10-200	96.4-114.4	0.9998
NPIP	10-200	90.0-106.3	0.9989
NDPA	10-200	93.0-111.4	0.9989
NDBA	10-200	90.0-108.0	0.9996

2.3 方法准确性和精密度

在样品中分别加入低、中、高(LOQ、2 LOQ和10 LOQ)3个水平的加标量,每个水平重复6次,进行加标回收率和精密度试验。表5为实验结果,其中,8种N-亚硝胺化合物在3个浓度水平下,平均回收率为85%~101%,RSD为1.45%~7.21%。

表5 8种N-亚硝胺加标回收和精密度结果(n=6)

化合物	样品浓度 (µg/kg)	添加浓度 (µg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
NDMA	N.D.	1	87.6	6.94
		2	86.6	2.02
		10	86.3	3.45
NMEA	N.D.	1	90.1	4.34
		2	91.2	1.65
		10	86.4	4.29
NDEA	N.D.	1	88	3.44
		2	91.7	1.45
		10	86.2	5.71

NDPA	N.D.	1	97.8	7.21
		2	98.5	4.97
		10	95.9	5.73
NDBA	N.D.	1	85.3	6.73
		2	94.4	2.57
		10	92.6	3.87
NPIP	N.D.	1	101	7.11
		2	94.9	4.77
		10	90.8	5.13
NPYR	N.D.	1	83.5	6.89
		2	90.7	2.5
		10	89.4	6.93
NMorPh	N.D.	1	85	6.85
		2	89.6	2.72
		10	93.8	4.8

注：N.D. 表示未检出。

2.4 实际样品检测结果

使用本方法对市售食品中 N-亚硝胺含量进行检测。其中，烤鳗鱼中检出含有 NDMA、NMEA、NPYR，含量为 2.37~8.69 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；腊肠中检出含有 NDMA，NMEA，含量为 2.35~7.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。鱼肉中未检出含有 N-亚硝胺。

表 6 实际样品 N-亚硝胺检测结果

基质类型	N-亚硝胺含量, ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
烤鳗鱼	8.69	2.37	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.36	N.D.
腊肠 1	3.95	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
腊肠 2	7.22	2.35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
鱼肉	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

注：N.D. 表示未检出。

结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定食品中 8 种 N-亚硝胺含量的方法。该方法在 15 min 内完成 8 种 N-亚硝胺的检测。8 种 N-亚硝胺采用同位素内标法定量，线性范围 10-200 ng/mL，相关系数 > 0.9987 。样品采用水蒸气蒸馏法提取，方法定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （相当于上机浓度 20 ng/mL）。加标结果显示，8 种 N-亚硝胺化合物在 LOQ、2 LOQ 和 10 LOQ 3 个浓度水平下，平均回收率为 85%~101%，RSD 为 1.45%~7.21%；采用本方法在部分市售食品中检出含有 N-亚硝胺。本文所建立的方法快速、有效，为食品中 N-亚硝胺检测提供了一种新思路。

岛津应用云

