

实验技术与方法

QuEChERS-气相色谱-串联质谱法测定熟肉制品中
9 种 *N*-亚硝胺类化合物

李玮,贾彦博,励炯,陈美春,王秀丽,林伟杰,马慧丽
(杭州市食品药品检验研究院,浙江 杭州 310022)

摘要:目的 建立同时测定熟肉制品中 9 种 *N*-亚硝胺类化合物的气相色谱-串联质谱分析方法。方法 样品采用快速基质分散净化(QuEChERS)法处理后,用 HP-INNOWax 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm)分离,经气相色谱-串联质谱多反应监测技术进行定性及定量分析。结果 9 种 *N*-亚硝胺类化合物在 0.20~50.00 μg/kg 范围内线性关系良好,相关系数均>0.997,方法检出限为 0.02~0.1 μg/kg。3 个加标水平的平均回收率为 78%~120%,相对标准偏差为 3.42%~15.24%。结论 本方法准确、快速、灵敏度高,可用于熟肉制品中 9 种 *N*-亚硝胺类化合物的检测。

关键词: QuEChERS; 气相色谱-串联质谱; 熟肉制品; *N*-亚硝胺; 食品污染物

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)02-0141-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.02.009

Determination of nine *N*-nitrosamines in cooked meat by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry

LI Wei, JIA Yanbo, LI Jiong, CHEN Meichun, WANG Xiuli, LIN Weijie, MA Huili
(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Hangzhou 310022, China)

Abstract: Objective A method was established for simultaneous determination of nine *N*-nitrosamines in cooked meat using enhance matrix removal QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by enhance matrix removal QuEChERS. The analytes were separated on a HP-INNOWax quartz capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), and ionized by electron impact ion source (EI). The data were collected by multiple reaction monitoring (MRM) mode, followed by qualitative screening and quantitative analysis. **Results** Nine *N*-nitrosamines had good linearities in the range of 0.20-50.00 μg/kg, with correlation coefficients above 0.997. The detection limits of were 0.02-0.1 μg/kg. The average recoveries of the nine *N*-nitrosamines were 78%-120% with relative standard deviations of 3.42%-15.24%. **Conclusion** The QuEChERS purification combined with GC-MS/MS method was rapid, accurate and sensitive, and suitable for the determination of nine *N*-nitrosamines in cooked meat.

Key words: QuEChERS; gas chromatography-tandem mass spectrometry; cooked meat; *N*-nitrosamines; food contamination

N-亚硝胺类物质是国际上公认的一类强致癌物,对动物具有致癌作用^[1],其在食品、饮用水、消费品以及受污染的空气中广泛存在。食品中天然存在的 *N*-亚硝胺类化合物含量极低,主要在食品加工和贮藏过程中形成,常见于腌制、烟熏、焙烤等制品中。肉制品的生产中,亚硝酸盐和硝酸盐因具有抑制肉毒梭菌产生肉毒毒素,赋予肉制品特有的颜色、风味和质地,抑制肉制品贮藏过程中出现过热

味和腐败味等作用,而被广泛应用,而亚硝酸盐能与胺类物质在适宜的条件下反应产生致癌性的亚硝胺。亚硝胺通过参与体内代谢,诱发有机体突变,而产生致畸性和致癌性^[2]。

我国在 GB 2762—2017《食品安全标准 食品中污染物限量》^[3]中对 *N*-二甲基亚硝胺限量做出了规定,肉及肉制品(肉制罐头除外)中含量≤3.0 μg/kg,水产及水产制品(水产制罐头除外)中含量≤4.0 μg/kg。目前,*N*-亚硝胺类化合物的测定前处理提取方式主要通过水蒸气蒸馏-液液萃取^[4]、固液萃取提取^[5-8],提取方式处理复杂、耗时长、回收率低,其实际可操作性不强。*N*-亚硝胺类化合物的测定方式主要有高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法^[9-10]、气相色谱-

收稿日期:2019-01-21

基金项目:杭州市农业与社会发展科研计划项目(20180432B30)

作者简介:李玮 女 高级工程师 研究方向为食品安全分析

E-mail:78459032@qq.com

热能分析仪(GC-TEA)法^[11]、气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法^[12]等。HPLC-MS法虽然有较高的灵敏度,但对低质量的 N -亚硝胺类化合物响应不好,GC-TEA仪器为专用设备,单极气相色谱-质谱法检测灵敏度较低。分散固相萃取净化技术(QuEChERS)具有简便、快速、成本低的特点,近年来广泛应用于农药残留检测中^[13-14],但在 N -亚硝胺类化合物的检测中鲜见应用,GC-MS/MS法因具有高特异性和高灵敏度,近年来被广泛应用于痕量残留的分析。

本试验利用QuEChERS结合GC-MS/MS法,建立了同时测定熟肉制品中9种 N -亚硝胺类化合物的分析方法,该方法高效、简便、快速、灵敏度高、重现性好,定量限、回收率与精密度均满足残留分析

和残留限量要求,同时对其他食品中 N -亚硝胺类化合物的检测具有参考意义。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

6890-7000QQQ三重四极杆气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦),离心机,旋转蒸发器。

9种 N -亚硝胺类化合物标准品及2种内标物均购自美国Accu Standard Inc,纯度均在99%以上,其他信息见表1。乙二胺- N -丙基硅烷(PSA),C18E粉,乙腈(色谱纯),无水硫酸镁、氯化钠、无水硫酸钠均为分析纯,所用试剂均购自杭州华东医药股份有限公司,试验用水均为蒸馏水。

表1 9种 N -亚硝胺类化合物标准品及内标物

Table 1 Standard compounds of 9 volatile nitrosamines and internal standard

中文名称	英文名称	缩写	CAS
N -二甲基亚硝胺	N -nitrosodimethylamine	NDMA	62-75-9
N -二乙基亚硝胺	N -nitrosodiethylamine	NDEA	55-18-5
N -二丙基亚硝胺	N -nitrosodipropylamine	NDPA	621-64-7
N -亚硝基吡咯烷	N -nitrosopyrrolidine	NPYR	930-55-2
N -亚硝基哌啶	N -nitrosopiperidine	NPIP	100-75-4
N -二丁基亚硝胺	N -nitrosodibutylamine	NDBA	924-16-3
N -甲基乙基亚硝胺	N -nitrosomethyl-ethylamine	NMEA	10595-95-6
N -二苯基亚硝胺	N -nitrosodiphenylamine	NDPhA	86-30-6
N -亚硝基吗啉	N -nitrosomorpholine	NMorPh	59-89-2
N -二甲基亚硝胺-D6*	N -nitrosodimethylamine-D6	NDMA-D6	17829-05-9
N -二丙基亚硝胺-D14*	N -nitrosodipropylamine-D14	NDPA-D14	93951-96-3

注:*表示内标物

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取适量各 N -亚硝胺类化合物和内标物标准品,用乙腈溶解并定容至100 ml,配制成1 000 mg/L的标准储备液,于-20℃下保存。准确移取各 N -亚硝胺类化合物和内标物的标准储备液10 ml至100 ml容量瓶中,用乙腈定容,配制成100 mg/L的各 N -亚硝胺类化合物混合标准储备液。使用时,用乙腈逐级稀释成系列浓度的混合标准工作液并各加入适量内标物,现用现配。

1.2.2 样品前处理及分析测定

称取10 g样品,匀浆,加入适量内标,加入10 ml乙腈,涡旋,-20℃冰箱中冷冻30 min,加入2个陶瓷均质子、4.0 g无水硫酸镁和1.0 g氯化钠,迅速振荡30 s,8 000 r/min(离心半径为10 cm)在0℃低温离心10 min,取上清液6 ml加入到含有50 mg PSA、150 mg C18E、900 mg无水硫酸钠的15 ml基质分散净化管中,涡旋1 min,8 000 r/min(离心半径为10 cm)在0℃低温离心10 min,取上清液过0.2 μm聚四氟乙烯(PTFE)针头式过滤膜,GC-MS/MS检测。

1.2.3 仪器条件

色谱:HP-INNOWax石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);进样体积:5 μl;衬管:不分流超惰衬管;多模式进样口(MMI)温度:程序升温,60℃保持0.05 min,以600℃/min升至250℃(冷不分流进样,空气泵冷却,如无空气泵可自然冷却);隔垫吹扫:60 ml/min;柱温:50℃保持1 min,以10℃/min升至110℃,以15℃/min升至200℃,以40℃/min升至250℃保持3.75 min;柱流速:1.2 ml/min。

质谱:溶剂延迟6 min;离子源为电子轰击离子(EI)源,温度为250℃,四极杆温度为150℃;正离子多反应监测(MRM)扫描模式进行数据采集,定性离子、定量离子及碰撞能量见表2。

2 结果

2.1 前处理条件的选择

在 N -亚硝胺类化合物的前处理提取过程中,曾有文献报道^[15]提取液采用氮吹的方式吹干后定容。9种 N -亚硝胺类化合物属于易挥发物质,尤其小分子量的NDMA和NDEA更容易挥发。本试验考察

表 2 9 种 *N*-亚硝胺类化合物及内标物的质谱分析参数

Table 2 MS parameters for 9 nitrosamines and internal standard analysis

化合物	保留时间/min	定量离子对	碰撞能量/eV	内标物
NDMA	7.53	74.0>44.1, 74.0>42.1	5,18	NDMA-D6
NMEA	8.01	88.0>71.0, 88.0>42.1	18,2	NDMA-D6
NDEA	8.33	102.0>85.1, 102.0>56.0, 102.0>44.1	2,18,10	NDMA-D6
NDPA	9.69	130.0>113.1, 130.0>58.0, 130.0>43.1	2,6,8	NDPA-D14
NDBA	11.34	116.0>99.1, 158.0>141.1, 158.0>99.1	2,6,6	NDPA-D14
NPIP	11.55	114.0>84.1, 114.0>97.1, 114.0>55.0	6,6,25	NDPA-D14
NPYR	11.80	100.0>55.1, 100.0>70.0, 100.0>43.1	6,5,8	NDPA-D14
NMorPh	12.19	116.0>86.1, 116.0>56.0, 86.0>56.0	2,15,6	NDPA-D14
NDPhA	16.43	169.0>168.1, 169.0>167.1, 167.0>139.0	18,30,30	NDPA-D14

了氮吹对 *N*-亚硝胺类化合物的影响,取一定体积的 *N*-亚硝胺类化合物混合标准工作液,室温下氮吹至 0.1 ml,定容后上机检测,结果表明,NDMA 和 NDEA 完全损失,其他化合物回收率在 50%~60% 之间;因此本试验前处理过程不采用氮吹浓缩,净化完成后,直接上机检测,结果表明,NDMA 和 NDEA 的回收率在 96%~119% 之间,其他化合物的回收率在 79%~120% 之间。

试验过程中加入陶瓷均质子,能够将所需的萃取时间由 60 s 减少到 30 s,每份样品节省近 50% 的时间,最大限度减少人员误差,防止盐的析出,并能够均匀分散样品。

考虑到 *N*-亚硝胺类化合物具有热不稳定的性质,加入硫酸镁和氯化钠等提取剂后会引起剧烈的放热效应,故试验过程中为了避免因为放热造成 *N*-亚硝胺类化合物的分解,在加入硫酸镁和氯化钠之前,先对样品溶液进行冷冻处理,在后续试验中尽量保持低温状态。结果表明,冷冻处理后,低温离心操作与室温下操作比较,*N*-亚硝胺类化合物尤其小分子量的 NDMA 和 NDEA 等回收率提高近 40%。

选用乙腈、二氯甲烷和丙酮作为提取溶剂比较提取效果,结果表明,乙腈和二氯甲烷提取效果明显高于丙酮,但二氯甲烷对熟肉制品特别是高脂肪含量食品的油脂和色素的溶解性较高,为后续的净化处理和上机测试带来极大干扰。最终选用对极性和非极性化合物具有较好提取效率的乙腈作为提取溶剂,同时也为分散固相萃取净化提供溶剂条件。

2.2 进样口进样方式的选择

在本试验中,选用大体积冷不分流进样模式进样。冷不分流模式中,MMI 将冷却至低于样品溶剂正常的沸点温度,使样品进样时不会发生汽化。进样完成后,再对进样口进行加热,使样品汽化,并将其传送到色谱柱。该进样模式的主要优点是分析物在最低的进样口温度下而不是在恒定的高温下汽化,从而使热裂解的可能性降至最低,同时仍允许大量分析物汽化。而且冷不分流操作不会对衬

管施加热应力,从而延长了使用寿命。

2.3 色谱-质谱条件的优化

选用浓度为 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 *N*-亚硝胺类化合物混合标准工作液进行全扫描分析,获得 9 种化合物的一级质谱图,选择丰度高的 2~3 个碎片离子初步定为母离子。母离子进二级质谱,对碰撞电压进行优化,确定子离子。对不同的母离子和子离子以及碰撞电压进行优化,选择响应最好的组合。每个目标化合物选取两对最具特征且响应最高的 MRM 离子及相应的仪器参数作为最终的质谱采集参数,见表 2。按照上述优化的 GC-MS/MS 条件,对 9 种 *N*-亚硝胺类化合物及 2 种内标物进行分析,得到 11 种化合物的总离子流图,见图 1。

2.4 线性范围及检出限

按照 1.2.2 处理熟肉制品,获得空白基质溶液,用空白基质溶液配制相应系列的基质标准溶液进样测定;以进样溶液浓度和内标物浓度之比为横坐标,定量离子的色谱峰面积与内标物峰面积之比为纵坐标,绘制标准曲线。9 种 *N*-亚硝胺类化合物的相关系数均 >0.997 ,方法检出限为 0.02~0.1 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.05~0.5 $\mu\text{g/kg}$,见表 3。

2.5 回收率和精密度

采用阴性的熟肉样品,分别进行添加回收率和精密度试验。样品添加低(1.5 $\mu\text{g/kg}$)、中(3.0 $\mu\text{g/kg}$)、高(10.0 $\mu\text{g/kg}$)3 个浓度的标准工作溶液,按本方法进行测定,每个浓度平行测定 6 次。试验结果表明,9 种化合物的测定受基质影响较大,采用外标法定量时,9 种化合物的回收率为 45%~151%,但采用内标法定量时,9 种化合物的回收率为 78%~120%,相对标准偏差为 3.42%~15.24% ($n=6$),见表 4 和 5;因此,本试验采用内标法定量,有效保证了定性、定量结果的准确可靠。

2.6 实际样品检测

按照建立的方法对 50 份熟肉样品进行测定,其中有 4 份样品中检出 NDBA,含量为 0.756~1.14 $\mu\text{g/kg}$;3 份样品检出 NDPhA,含量为 0.816~1.13 $\mu\text{g/kg}$ 。

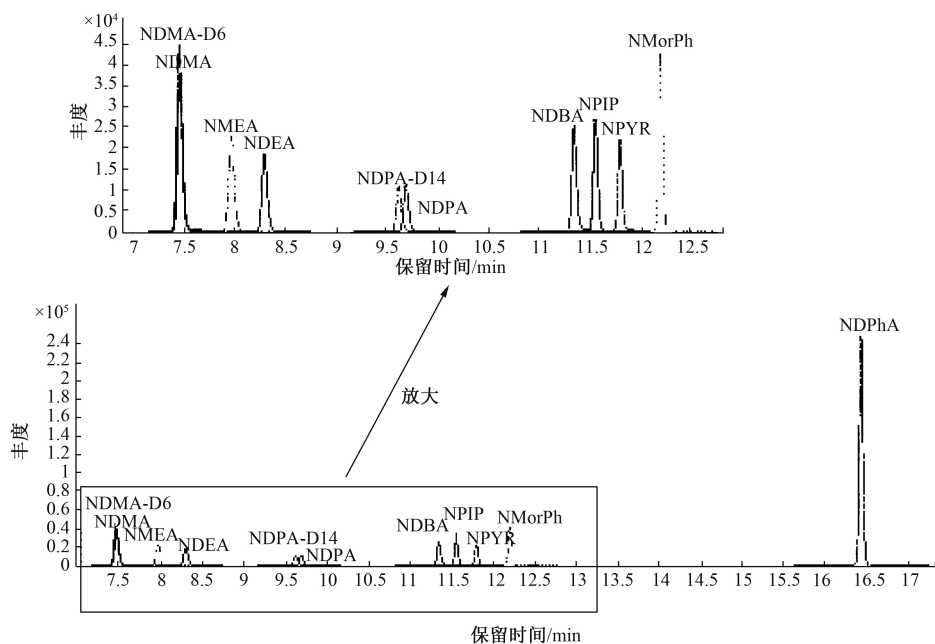


图1 9种N-亚硝胺类化合物和2种内标物的总离子流色谱图(20 μg/L)

Figure 1 Total ion chromatogram of a mixed standard solution of the nine N-nitrosamines and the two internal standards

表3 9种N-亚硝胺类化合物的检出限、定量限、线性范围及相关系数

Table 3 LOD, LOQ, liner equation and coefficient of nine N-nitrosamines

名称	线性范围/(μg/kg)	线性方程	相关系数 r ²	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
NDMA	0.20~50.00	y = 0.8349x + 0.32	0.999 8	0.05	0.2
NMEA	0.50~50.00	y = 0.4263x + 0.56	0.999 5	0.1	0.5
NDEA	0.50~50.00	y = 0.5674x + 0.86	0.999 5	0.1	0.5
NDPA	0.50~50.00	y = 0.5973x + 0.49	0.999 5	0.1	0.5
NDBA	0.50~50.00	y = 2.1771x + 1.67	0.999 1	0.1	0.5
NPIP	0.50~50.00	y = 2.1336x + 2.32	0.999 1	0.1	0.5
NPYR	0.50~50.00	y = 1.6753x + 0.94	0.999 1	0.1	0.5
NMorPh	0.20~50.00	y = 3.0331x + 1.85	0.998 7	0.05	0.2
NDPhA	0.05~50.00	y = 18.4328x + 1.37	0.997 5	0.02	0.05

表4 熟肉制品中9种N-亚硝胺类化合物的回收率(n=6,外标法定量)

Table 4 Absolute recoveries determined by external standard method of the nine N-nitrosamines in animal derived foods

样品	添加浓度 (μg/kg)	回收率/%								
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMorPh	NDPhA
鸡肉肠	1.5	128	89	97	90	151	88	87	93	102
鸡肉肠		104	97	91	98	111	92	103	92	99
纯肉制品	3.0	56	63	60	68	64	68	57	60	83
鸡肉肠		97	92	94	91	93	90	85	90	93
纯肉制品	10.0	89	93	94	45	96	94	91	82	124

表5 熟肉制品中9种N-亚硝胺类化合物的回收率(n=6,内标法定量)

Table 5 Relative recoveries determined by internal standard method of the nine N-nitrosamines in animal derived foods

样品	添加浓度 (μg/kg)	回收率/%								
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMorPh	NDPhA
鸡肉肠	1.5	101	78	84	80	116	79	80	81	97
鸡肉肠		119	108	117	106	120	107	100	107	108
纯肉制品	3.0	96	100	100	109	98	101	88	92	118
鸡肉肠		107	101	103	100	102	99	94	99	103
纯肉制品	10.0	102	107	109	92	110	108	105	94	113

3 小结

本试验采用 QuEChERS 处理后,用 HP-

INNOWax 石英毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)分离,经 GC-MS/MS 法 MRM 技术进行定性及定量分析,结果表明本方法准确、快速、灵敏度

高,能够满足熟肉制品中 9 种 *N*-亚硝胺类化合物残留的快速检测和确证分析。

参考文献

- [1] 吴永宁,江桂斌. 重要有机污染物痕量与超痕量检测技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [2] 孙敬,邹延军,詹文圆,等. 蒸煮火腿储藏期亚硝胺和亚硝酸钠含量的变化及其相关性研究[J]. 食品发酵工程,2008,34(10): 34-39.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全标准 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [4] 李玲,徐幸莲,周光宏. 气质联用检测传统中式香肠中的 9 种挥发性亚硝胺[J]. 食品科学,2013,34(14): 241-244.
- [5] 马强,席海为,王超,等. 气相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中的 10 种挥发性亚硝胺 [J]. 分析化学,2011,39(8): 1021-1027.
- [6] 胡丽芳,尹德凤,周瑶敏,等. 气质联用法测定咸鱼中 *N*-二甲基亚硝胺含量[J]. 江西农业学报,2009,21(9): 135-136.
- [7] 赵华,王秀元,王萍亚,等. 气相色谱质谱联用法测定腌制水产品中的挥发性 *N*-亚硝胺类化合物[J]. 色谱,2013,31(3): 223-227.
- [8] 杨金川,杨莎莎,黄家岭. 气相色谱-质谱法同时测定肉制品

中 9 种 *N*-亚硝胺的含量[J]. 贵州农业科学,2016, 44 (11): 155-158.

- [9] 陈婷,温裕云,欧延,等. 固相萃取净化及超高效液相色谱-串联质谱法测定橡胶制品中的 13 种 *N*-亚硝胺[J]. 色谱,2014,32(1): 89-94.
- [10] 杨宁,陈颖慧,邓莉,等. 双填料固相萃取-高效液相色谱/质谱法同时检测腌菜中 9 种 *N*-亚硝胺[J]. 分析化学,2013,41(7): 1044-1049.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中 *N*-亚硝胺类化合物的测定: GB 5009.26—2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [12] 吴燕燕,刘法佳,李来好,等. GC-MS 检测咸鱼中 *N*-亚硝胺的条件优化[J]. 南方水产科学,2012,8(4): 16-22.
- [13] IRESUEUR C, KNITTL P, GARTNER M, et al. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method [J]. Food Control,2008,19(9):906-914.
- [14] 阮华,荣维广,宋宁慧,等. QuEChERS-在线凝胶色谱-气相色谱-质谱法测定植物油中 34 种农药残留[J]. 分析化学,2014,42(8):1110-1116.
- [15] 赵博,邓美林,杨小珊,等. 分散固相萃取-气相色谱串联质谱法测定动物源性食品中 9 种 *N*-亚硝胺类化合物[J]. 色谱,2016,34(10):998-1004.

· 公告 ·

市场监管总局关于发布《食品中二甲双胍等非食品用化学物质的测定》等 4 项食品补充检验方法的公告

[2019 年 第 4 号]

按照《食品补充检验方法工作规定》有关要求,《食品中二甲双胍等非食品用化学物质的测定》《小麦粉及其制品中氨基脲含量的测定》《食品中二苯乙烯类阴离子型荧光增白剂的测定》《食品中多种动物源性成分检测实时荧光 PCR 法》4 项食品补充检验方法已经国家市场监督管理总局批准,现予发布。

特此公告。

- 附件:1. 食品中二甲双胍等非食品用化学物质的测定(BJS 201901)
2. 小麦粉及其制品中氨基脲的测定(BJS 201902)
3. 食品中二苯乙烯类阴离子型荧光增白剂的测定(BJS 201903)
4. 食品中多种动物源性成分检测实时荧光 PCR 法(BJS 201904)

市场监管总局

二〇一九年一月二十九日

(相关链接:http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/bgt/201902/t20190216_288669.html)