

使用 Agilent 7000D 三重四极杆气质联用系统对食品中的 N-亚硝胺类化合物进行测定

作者

袁智泉, 冯爽, 吴霞
安捷伦科技 (中国) 有限公司

摘要

本文介绍了使用 Agilent 7000D 三重四极杆气质联用系统 (GC-MS/MS) 分析食品中 N-亚硝胺类化合物的方法。该方法采用 Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除产品进行前处理, 使用多模式进样口 (MMI) 溶剂放空模式直接进样 5 μL , 目标化合物在 0.1–10 $\mu\text{g/L}$ 的范围内具有良好的线性。在实际海鲜干制品的分析中, 回收率在 81%–117% 的范围内。该方法样品前处理简单、耗时短且灵敏度和回收率高, 适用于分析食品中的 N-亚硝胺类化合物。

前言

食品中天然存在的 N-亚硝胺类化合物含量极微, 但其前体物质亚硝酸盐和胺类广泛存在于自然界中, 在适宜的条件下可以形成 N-亚硝胺类化合物。N-二甲基亚硝胺 (NDMA) 是 N-亚硝胺类化合物中的一种, 具有肝毒性和致癌性, 是国际公认的毒性较大的污染物。NDMA 广泛存在于各种腌制、熏烤肉制品和热加工食品中, 长期食用此类食品会对健康产生潜在危害。因此, 我国《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762-2017) 对 N-二甲基亚硝胺的含量限值有相应的规定^[1]。

但是, 食品基质中含有大量的油脂和蛋白, 这些物质随 N-亚硝胺类物质一起提取时会对后续的仪器分析造成极大干扰, 因而在样品前处理中去除食品基质中的脂质干扰尤为重要。现行标准方法中规定的食品中 N-亚硝胺类化合物的测定方法是使用水蒸气蒸馏法对样品进行前处理, 然后用气相色谱质谱联用仪进行分析^[2]。虽然水蒸气蒸馏法提取出的油脂较少, 但是该方法需要几十甚至上百克样品量, 某些干制品 (特别是价值较高的海鲜制品) 可能存在难以取样的问题。另外, 该方法要使用大量的

有机溶剂进行萃取，然后浓缩至一定体积，样品前处理过程耗时较长，且容易产生乳化和过度蒸发等问题，造成强挥发性 N-亚硝胺的回收率偏低和不稳定。

Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除产品是一种新型吸附剂材料，能够选择性去除样品中的主要脂类而不损失分析物，相比传统的样品前处理技术具有快速、简单、回收率高等突出优势。肉类和海产样品基质复杂，使用气质联用系统在选择离子监测 (SIM) 模式下检测此类样品中的 N-亚硝胺化合物

时，可能因为基质干扰而出现假阳性或假阴性结果。利用三重四极杆气质联用系统在多反应监测 (MRM) 模式下可以去除基质干扰，提高方法的选择性和灵敏度。

本应用简报介绍了使用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 对高蛋白、高脂肪的蚝豉样品进行前处理，使用安捷伦多模式进样口 (MMI) 在溶剂放空模式下进样 5 μ L，并采用 Agilent 7000D 三重四极杆气质联用系统全面分析样品中的九种 N-亚硝胺类化合物（目标化合物及两种内标的信息见表 1）。

表 1. 九种 N-亚硝胺类目标化合物与两种内标的基本信息

编号	中文名称	英文名称	CAS	简写
1	N-二甲基亚硝胺	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	NDMA
2	N-甲基乙基亚硝胺	N-Nitrosomethylethylamine	10595-95-6	NMEA
3	N-二乙基亚硝胺	N-Nitrosodiethylamine	55-18-5	NDEA
4	N-二丙基亚硝胺	N-Nitrosodi-n-propylamine	621-64-7	NDPA
5	N-二丁基亚硝胺	N-Nitrosodi-n-butylamine	924-16-3	NDBA
6	N-亚硝基哌啶	N-Nitrosopiperidine	100-75-4	NPIP
7	N-亚硝基吡咯烷	N-Nitrosopyrrolidine	930-55-2	NPYR
8	N-亚硝基吗啉	N-Nitrosomorpholine	59-89-2	NMorPh
9	N-二苯基亚硝胺	N-Nitrosodiphenylamine	86-30-6	NDPhA
IS	N-二甲基亚硝胺-d6	N-Nitrosodimethylamine-d6	17829-05-9	NDMA-d6
IS	N-二丙基亚硝胺-d14	N-Nitrosodi-n-propylamine-d14	93951-96-3	NDPA-d14

实验部分

试剂和样品

本研究中使用的 N-亚硝胺类标准品及内标均购自美国 AccuStandard，乙腈（质谱纯）购自 JT Baker。样品购自本地海产市场。

仪器和设备

本实验使用 Agilent 9000 气相色谱系统和 7000D 三重四极杆气质联用系统，该仪器系统配备多模式进样口 (MMI) 和 Agilent 7693A 自动液体进样器。

样品前处理材料：Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE 增强型脂质去除净化管（部件号 5982-1010）和 Agilent Bond Elut EMR-Lipid Polish 反萃管（部件号 5982-0101）。

标准溶液的配制

使用乙腈将 N-亚硝胺类及其内标物混合并配制成 0.1–10 µg/L 的校准标样，内标浓度为 10 µg/L，进样至 GC-MS/MS 进行分析，并通过内标法进行定量。

样品前处理

使用乙腈提取，EMR-Lipid 分散固相萃取净化，详细的样品前处理流程见图 1。移取 10 g 样品加入 10 mL 乙腈中振荡提取，离心后取上层乙腈提取液加入 EMR-Lipid dSPE 增强型脂质去除净化管中，振荡离心后，将上清液倒入 EMR-Lipid Polish 反萃管中，以去除多余水分并改善分析物分配。再次振荡离心后，取 1 mL 上清液过有机相滤膜后，进样至 GC-MS/MS 进行分析。

在食品中亚硝胺类化合物的分析中，传统的样品前处理方法采用蒸馏提取，并通过液液萃取净化后再水浴浓缩^[2]。该方法取样量大 (200 g)，有机溶剂消耗量多，每处理一个样品需要使用 250 mL 二氯甲烷，耗时约 3 小时，且比较难以实现样品的批量处理。而本文所述的 EMR-Lipid 样品前处理流程简单，每个样品取样量低 (10 g)，适用于分析价值高、难以大量取样的食品样品。整个流程简单、易操作，每个样品只需消耗 10 mL 乙腈，且其中不含溶剂浓缩过程，1 小时内可以处理约 6 个样品。

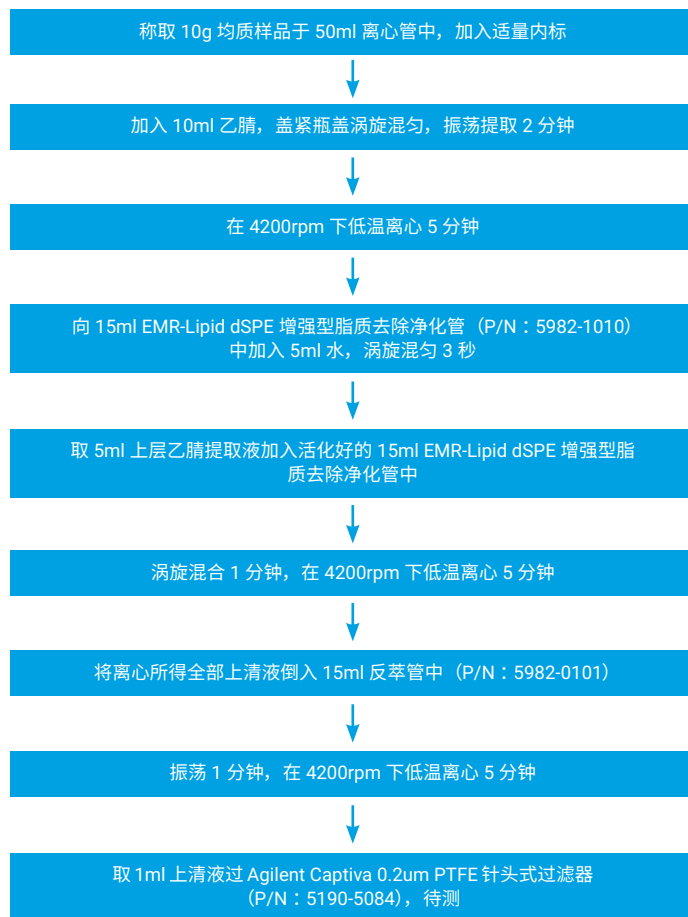


图 1. 样品前处理流程

气相色谱条件

色谱柱：Agilent HP-INNOWax 毛细管柱，30 m x 0.25 mm, 0.25 µm
进样口衬管：单锥形不分流超高惰性衬管，带玻璃毛（部件号 5190-2293）

进样体积：5.0 µL

载气：氦气，恒定流速，1.0 mL/min

进样口温度：程序升温，初始温度 60 °C，保持 0.16 min，以 900 °C /min 的速率升至 220 °C

进样方式：大体积进样（溶剂放空模式）；利用溶剂排除计算器得到进样参数（见图 2 和图 3），其中进样速率：32 µL/min；放空流量：90 mL/min；放空压力：5 psi；放空时间：0.16 min
升温程序：40 °C 下保持 0.5 min，以 15 °C /min 的速率升至 190 °C，再以 40 °C /min 的速率升至 250 °C，保持 3 min

质谱条件

溶剂延迟：5.5 min

离子化方式：EI

离子源温度：250 °C

四极杆温度：150 °C

接口温度：250 °C

检测模式：MRM（离子对信息见表 2）

增益因子：1

定量方法：内标法，各化合物定性定量离子对见表 2

表 2. N-亚硝胺类目标物及内标的保留时间和 MRM 离子对信息

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
NDMA	6.579	74	44	3
		74	42	19
NMEA	6.947	88	71	2
		88	42	17
NDEA	7.188	102	85	2
		102	44	11
NDPA	8.297	130	113	1
		130	43	9
NDBA	9.761	116	99	2
		116	74	8
NPIP	10.055	114	84	5
		114	41	13
NPYR	10.283	100	55	5
		100	43	9
NMorPh	10.665	116	86	1
		116	56	11
NDPhA	14.388	169	168	17
		169	167	30
NDMA-d6	6.573	80	50	5
		80	46	22
NDPA-d14	8.237	144	50	11
		144	126	1

结果与讨论

MMI 多模式进样口（大体积进样）

大体积进样 (LVI) 技术是改善痕量分析的最简单直接的方法。在系统中引入更多的样品，使到达检测器的分析物的含量成比例地增加，由此可以得到更大的峰面积和峰高，实现更低的系统检测限。LVI 的进样量可以从几微升到 1 毫升，甚至更大。样品溶剂在分析物转移至分离柱之前挥发而从系统中除去。LVI 的高灵敏度能够省去样品前处理时的样品浓缩过程，或减少预处理的样品量。

安捷伦多模式进样口 (MMI) 使用与标准分流 / 不分流进样口相同的衬管和消耗品，可兼容现有的热分流和不分流方法。其进样模式包括：热分流 / 不分流（以及脉冲模式）、冷分流 / 不分流（以及脉冲模式）、溶剂放空和直接进样，其中溶剂放空模式适用于实现大体积进样。在溶剂放空模式下，进样口在样品注射过程中保持在较低的初始温度，进样口处于分流模式下，气化溶剂通过分流出口排出。一旦完成所有样品的进样，进样口就切换至不分流模式，然后快速加热进样口，将衬管中浓缩的分析物闪蒸并转移到色谱柱。在样品注射和溶剂放空期间，GC 柱温箱一直保持在适当的温度，以保证分析物在色谱柱头再聚焦，之后柱温箱进行程序升温以实现分离^[3]。

可使用软件中集成的“Agilent 溶剂排除向导”工具对大体积进样的参数进行优化（见图 2 和图 3）。在该工具的第一个界面上，需要输入样品溶剂、期望的进样量以及最早流出的分析物的沸点数据（图 2）。该向导工具将计算初始进样口温度以及溶剂排出速率等参数（如图 3）并下载到方法中。图 4 比较了 1.0 µg/L 标准溶液在分流模式下进样 1 µL 与溶剂放空模式下进样 5 µL 所得到的响应。结果显示，在溶剂放空模式下采用 5 µL 的进样量明显改善了分析物的仪器响应。



图 2. 用于 MMI 溶剂放空模式的溶剂排除向导工具



图 3. 计算器根据所选进样口温度和放空流速计算进样速率和放空时间

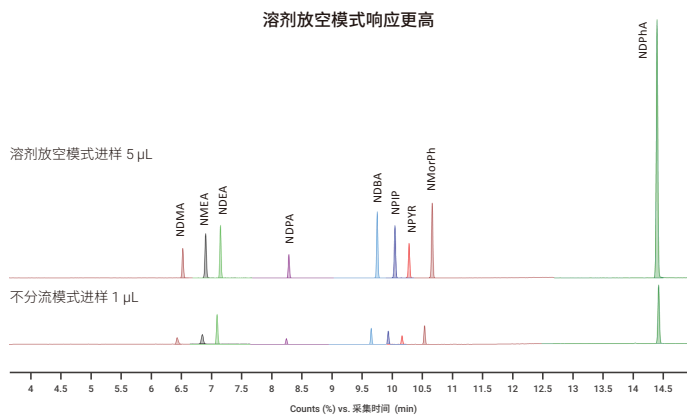


图 4. 不同进样模式下得到的色谱图的叠加 (坐标刻度一致)

色谱柱选择

亚硝胺化合物具有强极性和强挥发性，在低极性或中等极性色谱柱上保留时间较短且容易拖尾，在食品基质中更容易受干扰物质的影响。图 5 比较了沸点最低的亚硝胺化合物 NDMA 在不同色谱柱上的保留时间和峰形，最终选用了国标 GB 5009.26-2016^[2] 推荐的 HP-INNOWax 色谱柱对 N-亚硝胺类物质进行分析。所有目标物均在 15 min 内流出，最先出峰的 N-二甲基亚硝胺的保留时间也在 6 min 之后，峰形对称且不易受到基质干扰。

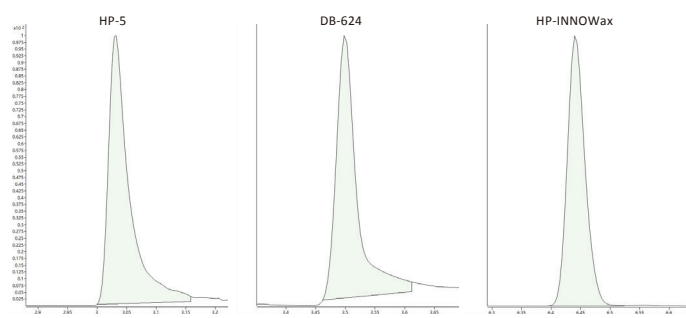


图 5. NDMA 在不同色谱柱上的保留时间及峰形

线性、精密度及检测限

配制浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、10 μg/L 的 N-亚硝胺化合物的混合标准溶液，绘制五点校准曲线。利用内标法进行定量分析。所得到的九种目标化合物的线性和检测限见表 3，所有目标化合物均具有优异的线性相关性，相关系数 R^2 高于 0.999。

取 0.1 μg/L 和 0.2 μg/L 混合标准溶液分别连续进样 8 次进行精密度测试，结果同样如表 3 所列。从中可以看出，采用 5 μL 进样量获得的结果具有良好的重现性，0.1 μg/L N-亚硝胺化合物响应的相对标准偏差 (RSD) < 9.8% (各种化合物的定量、定性离子对结果见图 6)，0.2 μg/L 目标化合物的响应 RSD < 5.8%。使用该结果计算出九种 N-亚硝胺类化合物的检测限 (IDL) 低于 0.03 μg/L (取两个浓度下计算出的较大值)，远远优于国标方法的要求 (0.3 μg/kg)^[2]，表明该方法的灵敏度极高。

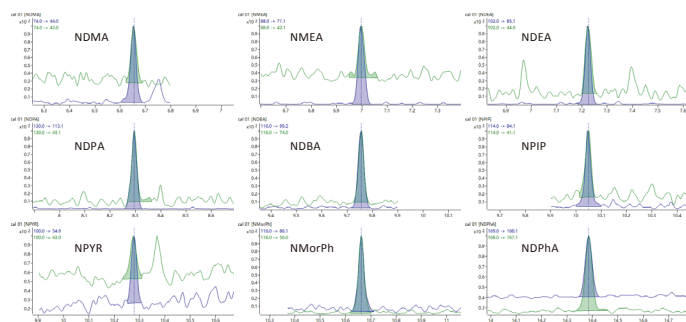


图 6. 线性最低浓度 0.1 μg/L 下各种化合物的定量、定性离子对结果

表 3. N-亚硝胺化合物及内标的线性、精密度和检测限结果 (n = 8)

化合物	R ² (0.1–10 µg/L)	RSD% (0.1 µg/L)	RSD% (0.2 µg/L)	IDL (µg/L)
NDMA	0.9998	9.1	3.3	0.03
NMEA	0.9999	5.5	2.9	0.02
NDEA	0.9999	3.8	3.5	0.02
NDPA	0.9999	7.5	3.9	0.02
NDBA	0.9993	3.4	4.5	0.03
NPIP	0.9999	5.6	3.8	0.02
NPYR	0.9996	9.8	5.2	0.03
NMorPh	0.9998	8.6	4.0	0.02
NDPhA	0.9998	6.4	5.8	0.03

实际样品加标测试结果

本应用简报以蚝豉样品为例，依照图 1 所示的流程进行前处理，对 N-亚硝胺类化合物进行加标测试。根据 GB 2762-2017 的规定^[1]，水产动物及其制品中 N-二甲基亚硝胺的限量值为 4 µg/kg。因而对蚝豉样品进行三个不同浓度的加标：1.0 µg/kg、4.0 µg/kg 和 10 µg/kg，每个浓度下平行处理三份样品。图 7 显示了加标浓度为 1.0 µg/kg 的九种 N-亚硝胺化合物的 MRM 谱图。从中可以看出，各种目标化合物的峰形对称且不受干扰。表 4 列出了不同浓度下的加标回收率与平行样品的 RSD%，回收率范围为 81%–117%，RSD 小于 14%，表明该方法具有良好的准确度和精密度的。

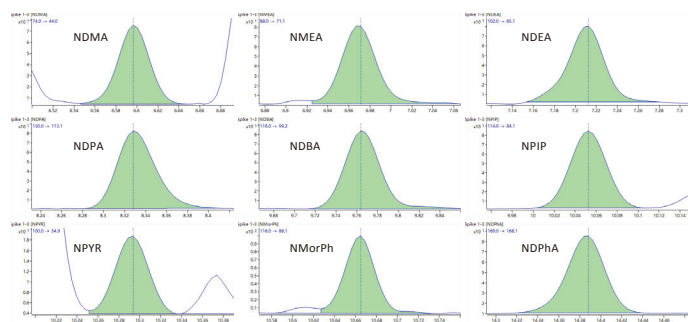


图 7. 蚝豉样品中加标浓度为 1.0 µg/kg 的各种化合物的 MRM 谱图

表 4. 蚝豉样品在不同浓度下的加标回收率平均值与相对标准偏差 (RSD) (n = 3)

化合物	1.0 µg/kg		4.0 µg/kg		10 µg/kg	
	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
NDMA	89.4	10.5	103.0	6.6	99.6	8.6
NMEA	84.2	1.5	102.9	1.5	106.5	1.9
NDEA	93.0	6.7	109.9	2.4	110.7	1.2
NDPA	87.9	7.5	104.2	12.1	117.4	4.1
NDBA	106.0	1.9	107.5	6.5	112.7	2.5
NPIP	96.3	11.7	105.5	9.8	93.1	12.6
NPYR	82.9	8.6	87.2	12.3	111.8	7.0
NMorPh	102.4	2.9	111.0	6.4	105.1	8.9
NDPhA	81.3	5.0	106.0	11.9	86.8	13.8

结论

本应用采用 Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除产品进行样品前处理，结合配备多模式进样口和 7693A 自动液体进样器的 Agilent 7000D 三重四极杆气质联用系统，提供了一种测定食品中的低浓度 N-亚硝胺类化合物的方法。该方法样品前处理过程简单、快速，且具有优异的线性范围、灵敏度、准确度和精密度的，适用于对食品中的 N-亚硝胺类化合物进行定量分析。

参考文献

1. GB 2762-2017 食品安全国家标准 食品中污染物限量
2. GB 5009.26-2016 食品安全国家标准 食品中 N-亚硝胺类化合物的测定
3. Bill Wilson 和 Chin-Kai Meng, 采用安捷伦的多模式进样口 (MMI) 容易实现更低的检测限, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-4169 CHCN, 2009

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020年7月，中国出版
5994-2222ZHCN

