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

赵 华¹, 王秀元^{2*}, 王萍亚¹, 周 勇¹, 薛超波¹, 蒋玲波¹

(1. 国家海洋食品质量监督检验中心, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江 舟山 316000)

摘要:建立了气相色谱-质谱(GC-MS)快速测定腌制水产品中挥发性 *N*-亚硝胺含量的分析方法。采用 GC-MS 测定了 *N*-二甲基亚硝胺(NDMA)、*N*-二乙基亚硝胺(NDEA)、*N*-二丙基亚硝胺(NDPA)、*N*-亚硝基吡咯烷(NPYR)、*N*-亚硝基哌啶(NPIP)、*N*-二丁基亚硝胺(NDBA)6 种化合物,考察了样品不同提取方法、不同固相萃取小柱、不同色谱柱对分离检测的影响。结果显示:在 10 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内,线性相关系数可达 0.999 8 以上;重现性良好,相对标准偏差小于 8%;回收率可达 79% ~ 105%;灵敏度高,检出限低,除 NDPA 为 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 外,其他 5 种 *N*-亚硝胺为 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法前处理快速简捷,易于操作,适用于腌制水产品中 *N*-亚硝胺残留量的检测工作。

关键词:气相色谱-质谱;*N*-亚硝胺;腌制水产品

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)03-0223-05

Determination of volatile *N*-nitrosamine compounds in salted aquatic products by gas chromatography-mass spectrometry

ZHAO Hua¹, WANG Xiuyuan^{2*}, WANG Pingya¹, ZHOU Yong¹, XUE Chaobo¹, JIANG Lingbo¹

(1. National Marine Food Quality Supervision and Testing Center, Zhoushan 316021, China;

2. School of Food and Pharmacy & Medical School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: An analytical method was developed for the determination of the extraction of volatile *N*-nitrosamine compounds including *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), *N*-nitrosopiperidine (NPIP), and *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) from salted aquatic products by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In this experiment, the separation and detection conditions were optimized for different extraction methods, solid-phase extraction columns, and chromatographic columns. The results showed that the linear correlation coefficients (R^2) were higher than 0.999 8 within 10 – 1 000 $\mu\text{g/L}$, and the reproducibilities were good with the relative standard deviations (RSD) less than 8%. The recoveries were 79% – 105%. It is noted that this method for the determination of volatile *N*-nitrosamine compounds in salted aquatic products was much more sensitivity and with a lower detection limits (0.05 $\mu\text{g/kg}$ except NDPA) than the previously reported methods. This proposed method is rapid and convenient for the determination, and easy for the operation. It is appropriate for the determination of volatile *N*-nitrosamine compounds in various salted aquatic products.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); *N*-nitrosamines; salted aquatic products

腌制是一种传统的食品加工保藏方法,能抑制肉毒梭芽孢杆菌及其他类型腐败菌生长,从而提高食品的防腐性能,延长保质期,并且能改善食品风

味。腌制的水产品因其风味独特而深受世界各地人民的青睐^[1,2]。但腌制水产品的安全性问题一直颇具争议,曾有报道认为南方沿海地区的鼻咽癌和胃

* 通讯联系人. E-mail: xsjn_828@163.com.

基金项目:科技部公益专项课题(201210060);浙江省质量技术监督系统科研计划项目(20110243)。

收稿日期:2012-10-24

癌发病率较高与长期食用腌制水产品有关^[3,4]。研究表明,水产品在腌制过程中,会产生含有致癌作用的亚硝酸盐和由此转化生成的 *N*-亚硝胺类化合物^[5-7]。*N*-亚硝胺物质具有致癌性,其一般结构为 R2(R1)N-N=O,在食品、饮水、消费品以及受污染的空气中广泛存在,目前是国际上公认的一种强致癌物^[8,9]。美国环境保护局(USEPA)认为 *N*-二甲基亚硝胺(NDMA)在极低的质量浓度(0.7 ng/L)下就会致癌,并已将其列为优先控制的污染物^[10]。我国《食品中污染物限量》(GB 2762-2005)规定腌制生食水产品中 NDMA 和 *N*-二乙基亚硝胺(NDEA)的限量分别为不高于 4 和 7 μg/kg^[11]。

一些国内外学者和专家对腌制水产品中的 *N*-亚硝胺类物质进行了测定^[12-15],但主要集中在 NDMA、NDEA,检测方法包括热能分析仪与气相色谱仪或高效液相色谱仪联用法、气相色谱-氮磷检测器法(GC-NPD)^[16],但热能分析仪及氮磷检测器价格昂贵且专用性太强、普及面窄,不适合推广检测;气相色谱-质谱联用法(GC-MS)检测食品中的 *N*-亚硝胺含量也有相关报道^[17-20],但前处理复杂,耗时长,检测种类少。本研究建立了一种适用于腌制水产品中多种 *N*-亚硝胺的高灵敏、快速的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

气相色谱-质谱联用仪(Agilent GC7890A/MS5975C,美国 Agilent 公司),配备 7683B 自动进样器、增强型化学工作站;高速组织捣碎机(DS-1,

上海标本模型厂);高速冷冻离心机(SER JSE09L31,美国 Avanti 公司);固相萃取装置(Vi-siprep DL,美国 SUPELCO 公司);数控超声波清洗器(KQ5200DE,昆山市超声波仪器有限公司);数显型漩涡混合器(美国 Talboys 公司)。

NDMA(纯度 98.0%,美国 CIL 公司);NDEA(纯度 99.9%)、*N*-二丙基亚硝胺(NDPA)(纯度 99.9%)、*N*-亚硝基吡咯烷(NPYR)(纯度 99.9%)、*N*-亚硝基哌啶(NPIP)(纯度 99.9%)、*N*-二丁基亚硝胺(NDBA)(纯度 99.9%)(美国 SUPELCO 公司)。二氯甲烷(色谱纯);无水硫酸钠(分析纯)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:DB-WAX(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。柱温升温程序:起始温度 40 ℃,保持 3 min;以 10 ℃/min 升温至 110 ℃,再以 15 ℃/min 升温至 200 ℃,再以 40 ℃/min 升温至 240 ℃。进样口温度:250 ℃;载气:He(纯度 >99.999%);隔垫吹扫流量:3 mL/min;进样模式:不分流进样;进样量:1.0 μL。

1.2.2 质谱条件

离子源温度:230 ℃;四极杆温度:150 ℃;接口温度:240 ℃;电离方式:电子轰击(EI)离子源;电子能量:70 eV;电子倍增器电压:1 671 V;采集模式:选择离子扫描(SIM)模式;扫描质量范围:*m/z* 40 ~ 350;阈值:150;采样频率:2;溶剂延迟:4 min。

上述条件下,6 种 *N*-亚硝胺类化合物的保留时间、定性及定量离子如表 1 所示。

表 1 GC-MS 测定 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的保留时间、定性及定量离子
Table 1 Retention times, qualitative and quantitative ions for the six *N*-nitrosamines by GC-MS

<i>N</i> -Nitrosamine	CAS No.	Retention time/min	Qualitative and quantitative ions (<i>m/z</i>)
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (NDMA)	62-75-9	9.671	42, 43, 74 *
<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (NDEA)	55-18-5	10.775	42, 44, 56, 102 *
<i>N</i> -Nitrosodipropylamine (NDPA)	621-64-7	12.405	43, 70, 113, 130 *
<i>N</i> -Nitrosodibutylamine (NDBA)	924-16-3	14.137	41, 84, 116 *, 158
<i>N</i> -Nitrosopiperidine (NPIP)	100-75-4	14.389	42, 55, 56, 114 *
<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine (NPYR)	930-55-2	14.658	41, 42, 68, 100 *

* Quantitative ion.

1.2.3 标准溶液的配制

分别准确称取 6 种 *N*-亚硝胺标准品 0.1 g(精确到 0.000 1 g),用二氯甲烷定容至 50 mL,得到 2.0 g/L *N*-亚硝胺标准储备液。准确移取上述标准储备液,以二氯甲烷逐级稀释配制 10、50、100、200、1 000 μg/L 系列浓度的混合 *N*-亚硝胺标准溶液。

1.2.4 样品制备

称取粉碎的腌制水产品样品 20.0 g,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 30 mL 二氯甲烷,于混合器

上涡旋混匀 1 min,超声提取 30 min(保持温度在 30 ℃以下),低温条件下离心 10 min;分出有机相,再提取 2 次,每次用 20 mL 二氯甲烷,合并有机溶剂相;将合并液放入 150 mL 旋蒸瓶中,于 40 ℃水浴中低压浓缩至 10 mL 左右,将上述浓缩液过活性炭前处理柱净化,再用 3 mL 二氯甲烷分 3 次清洗旋蒸瓶;将清洗液过柱,收集液经无水硫酸钠去水,于 40 ℃水浴中低压浓缩至近干;用二氯甲烷溶解并定容至 1.0 mL,待测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的优化

考察了不同极性的气相色谱柱(非极性柱 DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)、强极性柱 DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μm))对6种待测 *N*-亚硝胺类化合物分离的影响。结果表明:选用非极性柱时,*N*-二甲基亚硝胺的色谱峰与溶剂峰不能分离,其他待测物的色谱峰分离度也不佳;而选用强极性柱 DB-WAX 时,获得的色谱峰峰形对称,定量准确,重现性好,分离效果好。因此,本实验选用 DB-WAX 作为色谱柱。

2.2 柱温升温速率的优化

由于 NPYR、NPIP 和 NDPA 的出峰时间比较接近,同时为了排除溶剂峰对分离的影响,因此需要优化柱温的升温速率,以获得最佳的分离效果。选择柱温的起始温度为 40 ℃,分别比较了升温速率为 15、10、5 ℃/min 时的分离效果,结果显示:当升温速率为 15 ℃/min 时,溶剂峰与 NDMA 的色谱峰分离不明显;当升温速率为 10 ℃/min 时,两者能够有效分离;继续降低升温速率为 5 ℃/min 时,色谱峰的分离效果没有明显改善,因此选择升温速率为 10 ℃/min。当柱温升高到 110 ℃时,NDMA 已出峰,为了提高分析速度,此时将升温速率提高至 15 ℃/min。当柱温升高到 200 ℃时,待测物均已出峰,因此将柱温升温速率提高到 40 ℃/min。最终优化的柱温升温程序如 1.2.1 节所述。

按照上述优化的 GC-MS 条件下对 6 种 *N*-亚硝胺类化合物混合标准溶液进行分析,得到标准品的保留时间和特征离子见表 1,总离子流图见图 1。

图 1 SIM 模式下 6 种 *N*-亚硝胺混合标准溶液 (200 μg/L) 的总离子流谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of a mixed solution of the six *N*-nitrosamine standards (200 μg/L) in SIM mode

2.3 样品前处理条件的选择

2.3.1 样品提取方法的优化

分别选用水蒸气蒸馏法和超声振荡提取法对样

品进行前处理,试验结果表明:超声振荡提取法比水蒸气蒸馏法提取更完全,且易于操作,因此本文选择超声振荡法提取样品中的 *N*-亚硝胺类化合物。

2.3.2 固相萃取净化柱的优化

本实验对 6 种固相萃取柱的净化效果进行了比较。样品中加入适量的 *N*-亚硝胺混合标准溶液,按 1.2.4 节的方法进行样品制备。平行试验 3 次。通过比较每个萃取小柱所萃取的 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的回收率来确定最佳的固相萃取柱。由图 2 可以看出,活性炭固相萃取小柱的效果最好,因此本实验采用活性炭萃取柱对样品进行净化。

图 2 6 种固相萃取柱净化效果的比较

Fig. 2 Comparison of clean-up effects with different SPE columns

SPE columns: 1. C₁₈ column (500 mg/6 mL, Waters); 2. RP column (On Guard, 1 g/6 mL; DIONEX); 3. Florisil column (1 g/6 mL, SUPELCO); 4. BESEP Alumina A column (1000 mg/3 mL, ANPEL); 5. NH₂ column (500 mg/6 mL, SUPELCO); 6. Carb column (CNW, 2 g/6 mL; ANPEL).

2.4 标准曲线和灵敏度

采用外标法定量。取配制好的 *N*-亚硝胺类化合物系列浓度的混合标准溶液进行 GC-MS 测定。每个浓度的样品测定 3 次。以目标物定量离子的峰面积(*y*)对其质量浓度(*x*, μg/L)进行线性回归,得到的 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的线性关系见表 2。由表 2 可知,本方法重现性好,线性范围广,相关系数达 0.999 8 以上;灵敏度高,除 NDPA 的 LOD 为 0.03 μg/kg 外,其他 5 种 *N*-亚硝胺类化合物的 LOD 均为 0.05 μg/kg。在 SIM 模式下 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的质谱图见图 3。

2.5 回收率及精密度

称取粉碎的腌制泥螺样品 20.0 g,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 1.0 mL 30 μg/L 6 种 *N*-亚硝胺类化合物混合标准溶液(添加水平为 1.50 μg/kg)进行加标回收试验,平行进行 6 次样品测定,同时做空白样品试验,检测其本底成分,结果见表 3。由表 3 可知,本文建立的方法能够满足 GB 2762-2005 规定的要求。

表 2 6 种挥发性 *N*-亚硝胺类化合物的线性方程、
相关系数、线性范围及检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (R^2), linear ranges and limits of detection (LODs) for the six volatile *N*-nitrosamines

<i>N</i> -Nitrosamine	Regression equation	R^2	Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)
NDMA	$y = 93.65x + 568.0$	0.9998	10 – 1000	0.05
NDEA	$y = 61.16x + 311.1$	0.9998	10 – 1000	0.05
NDPA	$y = 36.73x + 148.8$	0.9998	10 – 1000	0.03
NPYP	$y = 55.98x + 240.1$	0.9999	10 – 1000	0.05
NPIP	$y = 56.47x + 352.4$	0.9998	10 – 1000	0.05
NDBA	$y = 17.62x + 912.9$	0.9998	10 – 1000	0.05

y : peak area of the quantitative ion; x : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

表 3 腌制泥螺中 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的
加标回收率及精密度 ($n=6$)

Table 3 Recoveries and precisions of the six *N*-nitrosamines spiked in salted river snails ($n=6$)

<i>N</i> -Nitrosamine	Background/ ($\mu\text{g/kg}$)	Found/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recoveries/ %	RSD/ %
NDMA	0.66	1.95 – 2.10	85.73 – 96.17	4.16
NDEA	0.64	1.93 – 2.17	86.17 – 101.8	5.60
NDPA	0.45	1.73 – 1.96	85.23 – 100.8	6.70
NDBA	N. D. *	1.21 – 1.38	80.63 – 91.87	4.38
NPIP	0.34	1.54 – 1.80	79.80 – 97.40	6.55
NPYR	N. D. *	1.31 – 1.58	87.23 – 105.4	7.08

* N. D.: The detected concentration was below the limit of quantification. Spiked level: 1.50 $\mu\text{g/kg}$.

图 3 SIM 模式下 6 种 *N*-亚硝胺类化合物的质谱图
Fig. 3 Mass spectra of the six *N*-nitrosamines in SIM mode

2.6 样品测定分析

取 5 种比较常见的腌制水产品样品青占鱼、鳕鱼、龙利鱼、泥螺、安康鱼,按 1.2 节的方法分别测定挥发性 *N*-亚硝胺类化合物的含量,每个样品平行测定 3 次,结果如表 4 所示。检测结果满足国家标准 (GB 2762-2005) 要求,均未超标。鳕鱼腌制前后样品的色谱分析谱图见图 4。

表 4 实际腌制水产品中 6 种挥发性 *N*-亚硝胺类化合物的含量
Table 4 Contents of the six volatile *N*-nitrosamines in real salted samples

<i>N</i> -Nitrosamine	Contents/($\mu\text{g/kg}$)				
	Mackerel	Cod	Tongue fish	Bullacta	Monkfish
NDMA	2.33	2.30	2.13	1.55	1.40
NDEA	2.44	2.38	2.17	1.59	1.45
NDPA	1.97	2.11	2.17	1.57	1.58
NDBA	1.03	1.47	N. D. *	N. D. *	N. D. *
NPIP	1.78	2.07	N. D. *	2.23	1.47
NPYR	0.67	1.91	2.73	1.91	2.01

* N. D.: The detected concentration was below the limit of quantification.

图 4 腌制前后鳕鱼样品的色谱图对比
Fig. 4 Comparison of chromatograms of salted cod and unsalted cod

3 结论

本研究建立了气相色谱-质谱联用快速测定腌制水产品中挥发性 *N*-亚硝胺类化合物含量的分析方法,比较了不同提取方法、不同固相萃取小柱净

化、不同色谱柱分离的影响,优化了实验分析条件。与国家标准方法(GB/T 5009.26-2003^[17])中的 GC-MS 方法相比,本方法前处理简单快速,完成一批样品仅需 2 h(国家标准方法需要 12 h),对于批量样品分析检测 *N*-亚硝胺类化合物具有良好的应用前景,且易于操作,重现性好,灵敏度高,回收率满足测定要求。应用本方法对 5 种腌制水产品进行分析检测,结果显示腌制后的海产品中 *N*-亚硝胺类化合物的含量明显升高,但符合国家的限量标准。

参考文献:

- [1] Honikel K O. Meat Science, 2008, 78: 68
- [2] Zhang Y L, Xia W S. Chinese Agricultural Science Bulletin (章银良, 夏文水. 中国农学通报), 2007, 23(3): 116
- [3] Fan L Q, Yang X Q, Chen S J, et al. Science and Technology of Food Industry (樊丽琴, 杨贤庆, 陈胜军, 等. 食品工业科技), 2009(4): 360
- [4] Tao Y F, Huang H L, Zhang T Z. Journal of Instrumental Analysis (陶燕飞, 黄红林, 张桃芝. 分析测试学报), 2003, 22(5): 82
- [5] Lin H M, Lin Q, Zhang Y H, et al. Chinese Journal of Chromatography (林红梅, 林奇, 张远辉, 等. 色谱), 2012, 30(4): 374
- [6] Chen Y L, Xu M M, Shang Y Y. Food and Fermentation Industries Editorial Staff (陈义伦, 许苗苗, 尚艳艳. 食品与发酵工业), 2009, 35(1): 78
- [7] Zhong Y Y, Chen P, Yu X J, et al. Chinese Journal of Chromatography (钟莺莺, 陈平, 俞雪钧, 等. 色谱), 2012, 30(6): 635
- [8] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U. S. Toxicological Profile for *N*-Nitrosodimethylamine. [2012-09-10]. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp141.pdf>1989
- [9] Mitch W A, Sharp J O, Trussell R R, et al. Environ Eng Sci, 2003, 20(5): 389
- [10] US Environmental Protection Agency. *N*-Nitrosodimethylamine (CASRN62-75-9). [2012-08-10]. <http://www.epa.gov/iris/subst/0045.htm>
- [11] GB 2762-2005
- [12] Yurchenko S, Molder U. Food Chem, 2007, 100: 1713
- [13] Wang R, Ma L Z, Fang C F, et al. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (王瑞, 马偕珍, 方长发, 等. 中国食品学报), 2007, 7(2): 124
- [14] Yang Q L, Yang Q M. China Patent (杨全龙, 杨全明. 中国专利), CN 101116517A. 2008-02-06
- [15] Wei F S, Xu X L, Zhou G H. Food Science (魏法山, 徐幸莲, 周光宏. 食品科学), 2008, 29(7): 479
- [16] Wu L J. Method of Gas Chromatographic Detection. Beijing: Chemical Industry Press (吴烈钧. 气相色谱检测方法. 北京: 化学工业出版社), 2000: 127
- [17] GB/T 5009.26-2003
- [18] Zhang Q J, Guo Z P, Li M Z, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (张秋菊, 郭祖鹏, 李明珠, 等. 中国卫生检验杂志), 2009, 19(6): 1234
- [19] Hu L F, Yin D F, Zhou Y M, et al. Acta Agriculturae Jiangxi (胡丽芳, 尹德凤, 周瑶敏, 等. 江西农业学报), 2009, 21(9): 135
- [20] Ding H M, Chen B, Yang X L, et al. Food & Machinery (丁红梅, 陈彬, 杨兴龙, 等. 食品与机械), 2010, 26(6): 54