

# 饱和盐辅助-分散液液微萃取-气相色谱-串联质谱 法快速筛查啤酒中氨基甲酸乙酯与 9 种挥发性亚硝胺

刘方征<sup>1</sup>, 任雨鑫<sup>1</sup>, 张丽萍<sup>1,2</sup>, 王宗义<sup>1\*</sup>, 李德美<sup>1</sup>, 王雨萱<sup>1</sup>, 何世慧<sup>1</sup>

(1. 北京农学院食品科学与工程学院, 食品质量安全北京实验室, 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室, 北京 102206; 2. 国家环境分析检测中心, 北京 100029)

**摘要:** **目的** 建立饱和盐辅助-分散液液微萃取(saturation salt assisted-dispersible liquid-liquid microextraction, SSA-DLLME)快速样品前处理, 气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)检测啤酒中氨基甲酸乙酯和 9 种挥发性亚硝胺包括 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二正丙胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基哌啶、N-亚硝基吡咯烷、N-亚硝基吗啉、N-亚硝基甲乙胺、N-亚硝基二丁胺和 N-亚硝基二苯胺的检测方法。**方法** 样品经甲醇提取, 加入稳定同位素标记的目标物定量, 在饱和碳酸钠辅助萃取下, 猛力注入二氯甲烷进行 SSA-DLLME, 离心, 取下层有机相进样, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行 GC-MS/MS 检测, 内标法定量。**结果** 该方法在考察的浓度范围内线性良好( $r^2 > 0.9970$ ), 方法检出限(limits of detection, LODs)为 0.10~0.34  $\mu\text{g/L}$ , 定量限(limits of quantitation, LOQs)为 0.34~1.15  $\mu\text{g/L}$ ; 3 水平(1、5、10  $\mu\text{g/L}$ )加标回收率为 81.98%~123.50%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 0.57%~13.04% ( $n=8$ )。 **结论** 该方法极为简便、快捷, 检出限低且准确度好, 可满足啤酒中氨基甲酸乙酯和 9 种挥发性亚硝胺快速筛查检测的需要。

**关键词:** 氨基甲酸乙酯; 挥发性亚硝胺; 啤酒; 饱和盐辅助-分散液液微萃取; 气相色谱-串联质谱法

## Rapid determination of ethyl carbamate and 9 kinds of volatile nitrosamines in beer by gas chromatography-tandem mass spectrometry with saturation salt assisted-dispersible liquid-liquid microextraction

LIU Fang-Zheng<sup>1</sup>, REN Yu-Xin<sup>1</sup>, ZHANG Li-Ping<sup>1,2</sup>, WANG Zong-Yi<sup>1\*</sup>,  
LI De-Mei<sup>1</sup>, WANG Yu-Xuan<sup>1</sup>, HE Shi-Hui<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Microorganisms and Pesticide Residues in Agricultural Products, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. National Research Center for Environmental Analysis and Measurement, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a fast sample pretreatment method of saturation salt assisted-dispersible

基金项目: 北京市教委食品安全北京实验室建设项目(5075227125)

Fund: Supported by the Food Safety Laboratory Construction Project of Beijing Municipal Education Commission (5075227125)

\*通信作者: 王宗义, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangzongyi001@sina.com

\*Corresponding author: WANG Zong-Yi, Ph.D, Associate Professor, Beijing University of Agriculture, No.7, Beinong Road, Changping District, Beijing 102206, China. E-mail: wangzongyi001@sina.com

liquid-liquid microextraction (SSA-DLLME), and determine of ethyl carbamate and 9 kinds of volatile nitrosamines in beer by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), including N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodinopropylamine, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine, N-nitrosomorpholin, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodiamine. **Methods** The samples were extracted with methanol, and the target substances labeled with stable isotopes were added for quantification, under the assistance of extraction with saturated sodium carbonate, dichloromethane was forcibly injected for SSA-DLLME, which was centrifuged, and the upper organic phase was injected, and multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for GC-MS/MS detection, and internal standard method was used for quantitative determination. **Results** The linearities were good ( $r^2 > 0.9970$ ) within the concentration range investigated, the limits of detection (LODs) were 0.10–0.34  $\mu\text{g/L}$ , and the limits of quantitation (LOQs) were 0.34–1.15  $\mu\text{g/L}$ ; the recoveries at the 3 levels (1, 5, and 10  $\mu\text{g/L}$ ) were 81.98%–123.50% and the relative standard deviations (RSDs) were 0.57%–13.04% ( $n=8$ ). **Conclusion** This method is simple, rapid, with low detection limit and good accuracy, and can meet the needs of rapid screening and detection of ethyl carbamate and 9 kinds of volatile nitrosamines in beer.

**KEY WORDS:** ethyl carbamate; volatile nitrosamines; beer; saturation salt assisted-dispersible liquid-liquid microextraction; gas chromatography-tandem mass spectrometry

## 0 引言

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)和挥发性亚硝胺(volatile nitrosamines, VNAs)均是较受关注的内源致癌性食品污染物<sup>[1-3]</sup>。EC 普遍存在于酒精饮品和发酵食品中,主要由乙醇和含有氨甲酰基的化合物反应产生。目前,我国尚未制定酒类中 EC 的安全限量,联合国粮农组织也主要规定了葡萄酒的安全限量,为 30  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[4]</sup>。VNAs 包括 N-亚硝基二甲胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA)、N-亚硝基二正丙胺(N-nitrosodinopropylamin, NDPA)、N-亚硝基二乙胺(N-nitrosodiethylamine, NDEA)、N-亚硝基哌啶(N-nitrosopiperidine, NPIP)、N-亚硝基吡咯烷(N-nitrosopyrrolidine, NPYR)、N-亚硝基吗啉(N-nitrosomorpholin, NMOR)、N-亚硝基甲乙胺(N-nitrosodiethylamine, NMEA)、N-亚硝基二丁胺(N-nitrosodibutylamine, NDBA)和 N-亚硝基二苯胺(N-nitrosodiamine, NDPhA),主要在食品加工过程中由胺类前体氧化生成<sup>[5]</sup>;啤酒中最受关注的 VNAs 是 NDMA,其由麦芽干燥阶段的二甲胺转化生成,虽然通过改进干燥工艺其污染已被有效控制<sup>[6]</sup>,但仍是啤酒中重要的安全指标之一,国际上啤酒的 NDMA 限量通常为 5  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[7]</sup>。因此,建立啤酒中 EC 和 VNAs 同时检测的方法对提高食品质量安全监测效率和能力具有实际意义。

目前,关于 EC 和 VNAs 检测的实用方法,主要依赖色谱技术结合特异高灵敏检测器或质谱技术完成,例如液相色谱-荧光法(liquid chromatography-fluorescence detection, LC-FLD)<sup>[8]</sup>、气相色谱-热能分析法(gas chromatography-thermal energy analyzer, GC-TEA)<sup>[9]</sup>、气相色谱-氮磷检测

器法(gas chromatography-nitrogen phosphorus detection, GC-NPD)<sup>[10-11]</sup>、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)<sup>[9,12]</sup>、气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)<sup>[13-14]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[15-17]</sup>、气相色谱-正化学电离串联质谱法(gas chromatography-positive chemical ionization-tandem mass spectrometry, GC-PCI-MS/MS)<sup>[18]</sup>以及色谱-高分辨串联质谱法<sup>[19]</sup>。其中,GC-MS/MS 和 LC-MS/MS 具有优异的选择性和灵敏度,已经成为 EC、VNAs 检测的主要方法。由于 EC、VNAs 含量均在  $\mu\text{g/kg}$  级,且较容易挥发损失,样品前处理技术仍然是检测技术的难点。现行 GB 5009.223—2014《食品安全国家标准 食品中氨基甲酸乙酯的测定》中测定酒样中的 EC,是先将液态样品吸附到硅藻土小柱上,再经清洗、洗脱和浓缩等步骤完成<sup>[12]</sup>;同时 GB/T 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》中 VNAs 的测定仅适用于肉及肉制品、水产动物及其制品,且需要水蒸气蒸馏-液液萃取-浓缩等,过程较为烦琐冗长。

关于检测啤酒中 VNAs 的样品处理方法有固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)<sup>[5]</sup>、单滴微萃取(single-drop microextraction, SDME)<sup>[20]</sup>、冷冻熔炼法<sup>[21]</sup>、吹扫捕集<sup>[22]</sup>和 QuEChERS 技术<sup>[23-24]</sup>等,其中 SPME 的耗材成本较高,吹扫捕集则需要专门的设备,SDME 单次操作简单但批量处理相对较难;冷冻熔炼法和 QuEChERS 法样品处理时间仍然相对较长。关于 EC 和 VNAs 的同步提取检测则更加具有难度,乙腈-乙酸乙酯提取结合冰浴辅助-氢氧化钠处理进行净化<sup>[25]</sup>是近来报道的一项有效的 EC 和 VNAs 同步提取方法,显著提高了检测效率,但过程

仍然相当烦琐。液液微萃取 (dispersible liquid-liquid microextraction, DLLME) 是一种具有富集倍数高, 低成本、快速、简单, 适用于水溶液样品的经典萃取方法<sup>[26]</sup>, 但是由于 EC 和 VNAs 相对分子极性大, 弱极性的萃取剂萃取效果不佳, 另一方面啤酒中大量乙醇存在, 不利于萃取剂与样品溶液形成乳浊液, 经典的 DLLME 方法很难奏效。研究报道在饱和盐辅助条件下, 二氯甲烷能与水形成分散体系, 可进行 DLLME 并有利于极性相对较大化合物的萃取<sup>[27]</sup>, 而啤酒和葡萄酒等样品中的乙醇不会妨碍分散体系的形成<sup>[28-29]</sup>, 这为啤酒中 EC 和 VNAs 同步检测方法的开发提供了依据。

本研究拟通过建立饱和盐辅助-分散液液微萃取 (saturation salt assisted-dispersible liquid-liquid microextraction, SSA-DLLME) 样品处理方法, 通过比较不同饱和盐条件下啤酒中 EC、VNAs 的萃取效果, 结合 GC-MS/MS 的高灵敏、高选择性和稳定同位素标记目标物内标法的定量优势, 建立一种样品处理极其简单、方法灵敏可靠, 用于快速同时检测啤酒中 EC 和 VNAs 的新方法, 旨在为酒精类饮品多种污染物的快速筛查提供新的方法借鉴。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

50 mL 带螺口盖塑料离心管(中国 BIOLGIX 公司); 量程为 1000  $\mu$ L 的紧密注射器(安捷伦科技中国有限公司); 啤酒(北京市昌平区部分超市)。

硫酸钠、碳酸钠、磷酸二氢钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 美国 MREDA Technology Inc 公司); 二氯甲烷(色谱纯, 美国 J.T.Baker 公司); EC 标准品(纯度 98%, 德国 Dr.EHrenstorferGmbh 公司); EC-d5 标准品(纯度 98%, 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司); NDMA、NDPA、NDEA、NPIP、NPYR、NMOR、NMEA、NDBA 和 NDPhA 混合标准溶液(2000 mg/L, 溶剂为甲醇, 美国 o2si 公司); NDMA-d6、NMEA-d3、NDEA-d4、NDPA-d14、NPYR-d4、NPIP-d10、NMOR-d4、NDBA-d18 和 NDPhA-d10 混合稳定同位素标记内标物溶液(1000  $\mu$ g/mL, 溶剂为甲醇, 美国 Accustandard Inc 公司)。

### 1.2 仪器与设备

Agilent 7890B-7000C 气相色谱-串联质谱联用仪、DB-WAXUI 色谱柱(30 m $\times$ 250  $\mu$ m, 0.25  $\mu$ m)(美国 Agilent Technologies 公司); Centrifuge 5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司); IKA MS 3 basic 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); BSA224S-CW 电子分析天平(精度 0.0001 g, 北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

### 1.3 溶液配制

EC 和 EC-d5 标准储备液(1000  $\mu$ g/mL): 分别称取 EC

和 EC-d5 标准样品 10 mg, 分别用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 于棕色贮液瓶中-18 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。

VNAs 混合标准储备液(200  $\mu$ g/mL)和稳定同位素标记 VNAs 混合标准储备液(100  $\mu$ g/mL): 取 1 mL 2000 mg/L VNAs 混合标准溶液用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 于棕色贮液瓶中-18 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。稳定同位素标记 VNAs 混合标准储备液, 配制、储存方法相同。

EC 标准中间液: 取 EC 标准储备液适量, 用甲醇稀释至 1  $\mu$ g/mL, 于棕色贮液瓶中 4 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。

EC-d5 内标工作液: 取 EC-d5 储备液适量, 用甲醇稀释至 1  $\mu$ g/mL, 于棕色贮液瓶中 4 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。

VNAs 混合标准中间液: 取 VNAs 混合标准储备液适量, 甲醇稀释至 1  $\mu$ g/mL, 于棕色贮液瓶中 4 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。

稳定同位素标记 VNAs 混合内标工作液: 取稳定同位素标记 VNAs 混合标准溶液适量, 用甲醇稀释至 1  $\mu$ g/mL, 于棕色贮液瓶中 4 $^{\circ}$ C 储存, 使用时放置到室温。

系列标准溶液: 用二氯甲烷稀释 EC 标准中间液、VNAs 混合标准中间液、稳定同位素标记 VNAs 混合内标工作液和 EC-d5 内标工作液, 得 EC 和 VNAs 质量浓度分别为 1、5、10、25、50 和 100 ng/mL, 各内标质量浓度均为 50 ng/mL 的混合标准溶液。

### 1.4 样品前处理

取 30 mL 啤酒放到 50 mL 塑料离心管中(同时称重记录啤酒的质量), 加入 1  $\mu$ g/mL 的稳定同位素标记 VNAs 混合内标工作液 50  $\mu$ L 和 1  $\mu$ g/mL 的 EC-d5 内标工作液 50  $\mu$ L、无水碳酸钠 6 g, 手动振摇, 使无水碳酸钠充分溶解。注射器猛力注入 600  $\mu$ L 的二氯甲烷, 使其形成乳浊液, 旋紧盖子, 手动振摇 30 s, 于离心机中 8228 $\times$ g 离心 10 min, 取出, 弃去部分上层清液, 移液枪移取 100  $\mu$ L 下层二氯甲烷于装有 200  $\mu$ L 内插管的进样瓶中, 待测。

加标回收实验处理方法同上, 加标水平分别为 1、5、10  $\mu$ g/L, 每个加标水平重复 8 次。

实际样品检测处理方法同上, 采集市场上不同品牌共 28 个啤酒样品, 每个样品重复 2 次。

参数优化实验, 使用加标质量浓度为 1  $\mu$ g/L 的啤酒, 分别研究不同饱和辅助盐种类和萃取剂用量的影响, 其他条件不变。

### 1.5 色谱与质谱条件

色谱条件: DB-WAXUI 色谱柱(30 m $\times$ 250  $\mu$ m, 0.25  $\mu$ m); 进口样温度 190 $^{\circ}$ C, 进样量 1  $\mu$ L, 不分流进样; 载气(He)恒流模式, 流量 0.9 mL/min; 程序升温模式: 35 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 10 $^{\circ}$ C/min 升至 90 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C 保持 6 min; 传输线温度 250 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 电子轰击电离源(electron ionization, EI),

电离能量 70 eV; 离子源温度 230°C; 四极杆温度 150°C; 多重反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 参数如表 1 所示; 溶剂延迟 5 min。

表 1 VNAs 和 EC 的 MRM 参数  
Table 1 MRM parameters of VNAs and EC

目标物	保留时间 /min	前级离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	碰撞能 /eV
NDMA-d6	7.740	80.0	46.1, 50.2*	5, 5
NDMA	7.745	74.0	42.1, 44.1*	20, 5
NMEA-d3	8.166	91.0	74.0*, 46.1	20, 15
NMEA	8.171	88.0	71.0, 42.1*	5, 5
NDEA-d4	8.414	106.0	46.1*, 88.1	8, 8
NDEA	8.415	102.0	56.0*, 42.0	20, 20
NDPA-d14	9.301	144.1	50.2*, 126.2	5, 5
NDPA	9.344	130.0	113.1*, 58.0	5, 5
EC-d5	9.952	64.1	44.1*, 46.1	25, 25
EC	9.982	62.1	44.1*, 45.1	25, 25
NDBA-d18	10.211	176.0	110.2*, 158.2	5, 5
NDBA	10.272	158.0	141.1, 99.1*	5, 5
NPYP-d10	10.381	124.0	46.1, 94.2*	10, 10
NPYP	10.395	114.0	97.1, 84.0*	5, 5
NPYR-d4	10.503	104.0	74.1*, 58.1	10, 10
NPYR	10.516	100.0	70.0, 55.0*	6, 6
NMOR-d4	10.712	120.0	60.2, 90.1*	5, 5
NMOR	10.718	116.0	56.0, 86.0*	5, 5
NDPhA-d10	13.988	179.0	175.1, 177.2*	25, 25
NDPhA	14.013	169.0	167.1, 168.1*	25, 15

注: \*为定量离子。

## 1.6 定性、定量分析

通过对目标物保留时间、母离子以及两个二级离子与

标样相对应参数一一对照进行定性; 以各目标物与其稳定同位素标记内标物的浓度比(X), 各目标物与其稳定同位素标记内标物定量离子色谱峰面积比为(Y), 进行回归分析, 制作校正曲线, 内标法进行定量。

## 1.7 数据处理

定性、定量使用 Agilent Mass Hunter workstation Acquisition/Qualitative/Quantitative Analysis Software Version B.07.04 和 Microsoft Office Excel 2013 进行相关数据处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理

研究表明, 在近饱和和硫酸钠水溶液中, 用溶解度相对较大的二氯甲烷作萃取剂, 能形成乳浊液, 实现 DLLME, 有利于相对极性较大的目标物的萃取<sup>[27,30]</sup>。本研究以二氯甲烷为萃取剂, 考察了啤酒(30 mL, 目标物加入质量浓度为 1 μg/L)中近饱和的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 g)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 g)和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (12 g)进行 SSA-DLLME 所得 10 种目标物的萃取效果(以检测信号响应值大小表示), 结果见图 1。研究发现, 即使在乙醇含量为 2%~8%的啤酒中, DLLME 方法亦可以有效进行, 且多数目标物使用溶解度较大的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 效果较好, 但较为重要的 NDMA 和 EC 使用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 较好, 这可能是因为弱碱性的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液使 NDMA、EC、NMOR 等的质子化能力降低的缘故<sup>[31]</sup>, 因此本研究使用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 作为辅助萃取用盐。本研究条件下, 随着二氯甲烷用量增加, 目标物由于稀释作用响应变小。当萃取剂二氯甲烷用量为小于 400 μL 时不利于分离取出, 用量在 500~800 μL 时萃取效果较好。综合考虑实验的方便程度和检测灵敏度, 确定萃取剂二氯甲烷用量为 600 μL。

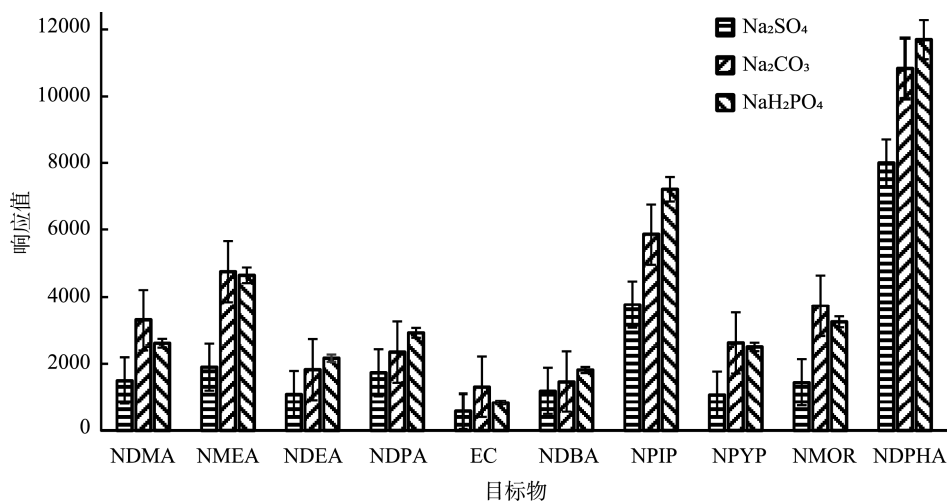


图 1 3 种饱和盐对萃取效果的影响(n=8)

Fig.1 Effects of 3 kinds of saturated salts on extraction efficiencies (n=8)

## 2.2 色谱质谱条件优化

强极性柱均有利于 EC 和 VNAs 的分离, 故本研究使用 DB-WAXUI 柱; 在本研究确定的样品前处理和色谱质谱条件下, 10 种目标物及其内标定性离子、定量离子(见表 1)色谱峰均获得良好分离, 典型 MRM 色谱图(加标浓度为 5  $\mu\text{g/L}$  的啤酒样品)如图 2 所示。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 线性方程、检出限和定量限

根据实际样品经 SSA-DLLME 富集后样品溶液中目标物的可能浓度范围, 对质量浓度范围为 1~100  $\text{ng/mL}$  标准溶液进行考察, 绘制标准曲线, 10 种目标物线性良好,  $r^2$  均大于 0.9970。检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantitation, LOQs)则根据实际样品添加低含量的目标物, 经 SSA-DLLME 处理后, 进样分析, 以定量离

子色谱峰的信噪比(S/N)分别为 3 和 10, 且定性离子的色谱峰能够被有效识别、比例接受的条件计算而得, 10 种目标物的 LODs 为 0.10~0.34  $\mu\text{g/kg}$ 、LOQs 为 0.34~1.15  $\mu\text{g/kg}$ 。线性方程、检出限和定量限详见表 2。以啤酒中 NDMA 的限量为 5  $\mu\text{g/kg}$  为参照, LODs、LOQs 能够满足啤酒中 10 种目标物筛查、定量分析的需要<sup>[7]</sup>。

### 2.3.2 准确度与精密度

在 1.4 的条件下, 以啤酒中 NDMA 国际限量(5  $\mu\text{g/kg}$ )<sup>[7]</sup> 为关注浓度, 并考虑大多目标物的定量限, 确定加标浓度为 1、5 和 10  $\mu\text{g/kg}$ , 进行 3 水平 8 重复的加标回收实验, 数据如表 3 所示。EC 和 VNAs 的平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)别分为 81.98%~123.50% 和 0.57%~13.04%, 均优于 GB/T 27417—2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的指标要求。

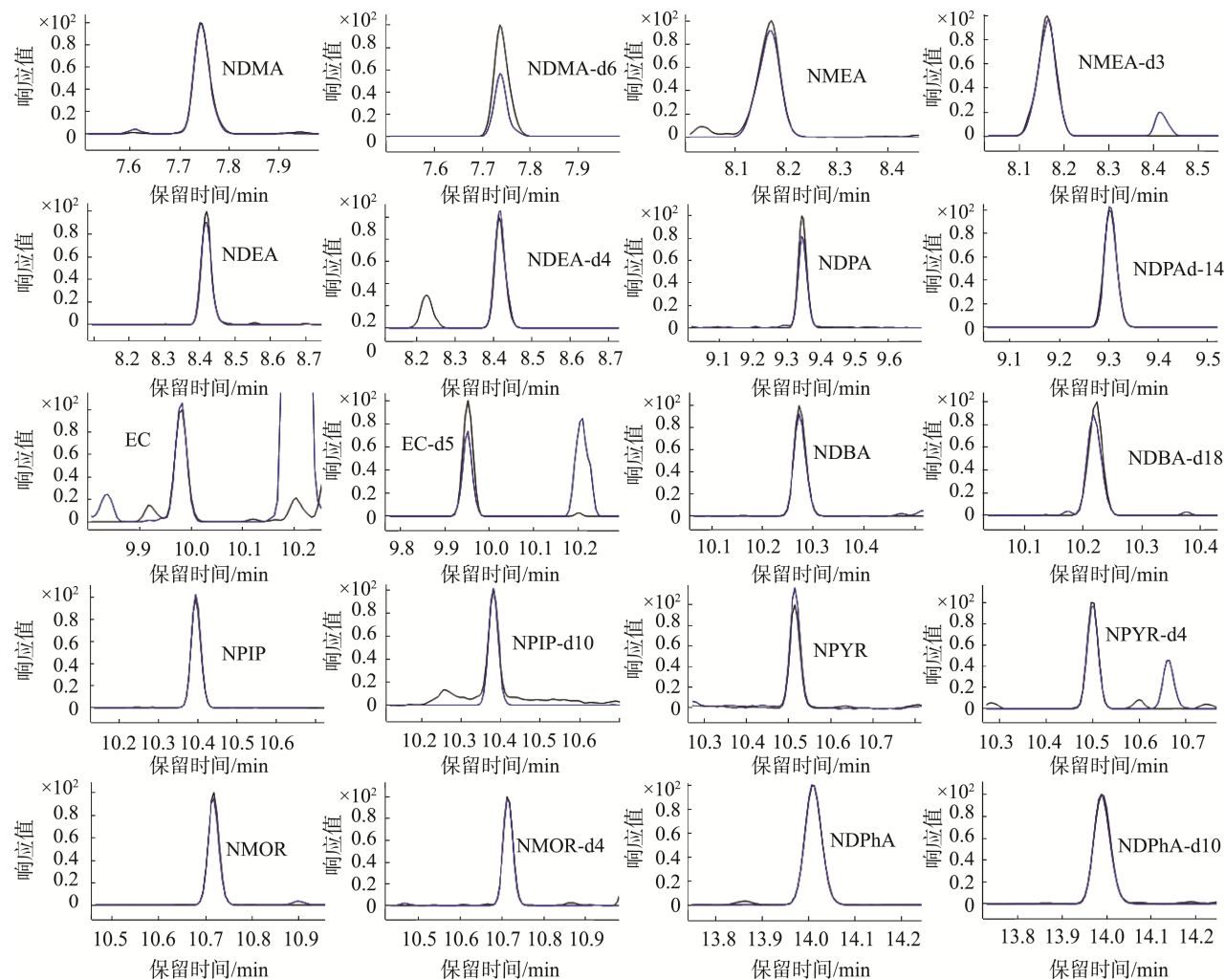


图 2 啤酒中 VNAs 和 EC 的 MRM 色谱图(5  $\mu\text{g/L}$ )

Fig.2 MRM chromatograms of VNAs and EC in beer (5  $\mu\text{g/L}$ )

表 2 啤酒中 VNAs 和 EC 的线性方程、检出限和定量限  
Table 2 Regression equations, limits of detection and limits of quantitation of VNAs and EC in beer

目标物	线性方程	$r^2$	线性范围/(ng/mL)	检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
NDMA	$Y=0.7223X-0.0173$	0.9994	1~100	0.19	0.62
NMEA	$Y=1.6650X-0.0251$	0.9985	1~100	0.34	1.15
NDEA	$Y=1.0191X-0.0030$	0.9987	1~100	0.26	0.88
NDPA	$Y=0.9432X-0.0138$	0.9979	1~100	0.18	0.62
EC	$Y=1.2366X-0.0092$	0.9968	1~100	0.29	0.97
NDBA	$Y=2.4674X-0.0782$	0.9972	1~100	0.18	0.61
NPIP	$Y=0.6664X-0.0126$	0.9990	1~100	0.12	0.41
NPYR	$Y=1.5566X-0.0335$	0.9974	1~100	0.24	0.79
NMOR	$Y=0.8920X-0.0266$	0.9950	1~100	0.16	0.53
NDPhA	$Y=1.5012X-0.0251$	0.9989	1~100	0.10	0.34

表 3 啤酒中 VNAs 和 EC 的准确性与精密度( $n=8$ )  
Table 3 Accuracies and precisions of VNAs and EC in beer ( $n=8$ )

目标物	加标水平/( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	平均回收率/%	相对标准偏差/%
NDMA	1	104.93	2.95
	5	98.18	2.82
	10	95.52	2.77
NMEA	1	119.84	5.39
	5	95.31	2.24
	10	101.33	2.40
NDEA	1	103.24	5.65
	5	99.82	2.67
	10	96.09	8.63
NDPA	1	123.50	5.78
	5	105.76	1.42
	10	103.00	3.69
EC	1	93.71	4.60
	5	81.98	5.37
	10	99.52	5.48
NDBA	1	114.87	7.79
	5	111.76	4.73
	10	93.41	11.44
NPIP	1	114.62	10.49
	5	114.35	8.87
	10	110.85	13.04
NPYR	1	112.52	6.29
	5	109.31	4.58
	10	95.66	7.38
NMOR	1	114.06	3.80
	5	99.82	1.85
	10	96.10	9.32
NDPhA	1	99.32	3.92
	5	102.90	1.75
	10	97.49	0.57

## 2.4 实际样品检测

采集市场上不同品牌共 28 个啤酒样品, 每个样品重复 2 次。结果发现, NDMA 含量在未检出至 LOQ 之间; EC 则普遍存在, 含量为 1.64~6.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 个别样品达到 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 其他目标物未检出。参照国际啤酒 NDMA 限量(5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 葡萄酒 EC 限量(30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 啤酒中 EC 和 NDMA 含量水平是安全的。

## 3 结论

本研究建立了 SSA-DLLME 快速样品前处理, GC-MS/MS 同步快速检测啤酒中 EC 和 9 种 VNAs 的分析方法。在该方法中, 使用注射器将二氯甲烷快速注入啤酒溶液中, 会产生高强度的湍流, 从而将二氯甲烷以小液滴的形式完全分散到啤酒溶液中, 形成由二氯甲烷和啤酒溶液组成的乳浊液体系。由于二氯甲烷小液滴与啤酒溶液之间极大的接触面积, 使 VNAs 和 EC 迅速在两相之间达到萃取平衡, 实现向萃取剂中的富集, 使得前处理时间大大缩短。该方法灵敏、可靠, 样品前处理极为简单、快捷便利, 可以满足啤酒中 EC 和 9 种 VNAs 同时检测的需要, 为酒精饮品中相关目标物的风险筛查和确证分析提供了有益的借鉴。

## 参考文献

- [1] 刘会昌, 石建新. 氨基甲酸乙酯诱导 HepG2 细胞凋亡的分子机制[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 159-164.  
LIU HC, SHI JX. Molecular mechanisms of ethyl carbamate-induced apoptosis in human HepG2 cells [J]. Food Sci, 2018, 39(17): 159-164.
- [2] 刘雨莹, 黄晓红, 徐晔, 等. 肉制品中 N-亚硝胺的危害、形成机制及乳酸菌对其控制效果的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 283-289.  
LIU YX, HUANG XH, XU Y, et al. The progress of carcinogenic effects of nitrosamines on meat products and its controlling by lactic acid bacteria [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(16): 283-289.
- [3] TUESUWAN B, VONGSUTILERS V. Nitrosamine contamination in

- pharmaceuticals: threat, impact, and control [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(9): 3103–3324.
- [4] 刘洋, 李运奎, 韩富亮, 等. 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 289–295.  
LIU Y, LI YK, HAN FL, *et al.* Ethyl carbamate in wine: A review [J]. *Food Sci*, 2019, 40(7): 289–295.
- [5] FAN CC, LIN TF. N-nitrosamines in drinking water and beer: Detection and risk assessment [J]. *Chemosphere*, 2018, 200: 48–56.
- [6] Sui Generis Brewing. Nitrosamines in beer. [EB/OL]. [2020-07-07]. <https://sui generisbrewing.com/index.php/2020/07/07/nitrosamines-fact-or-fiction/> [2022-04-09].
- [7] Center for Food Safety and Applied Nutrition. Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed [EB/OL]. [2018-09-20]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed> [2021-09-26].
- [8] OJEDA DA, WROBEI K, ESCOBOSA AR, *et al.* Automated pre-column derivatization with 9-xanthinol for the determination of ethyl carbamate in food matrices by high performance liquid chromatography with fluorometric detection [J]. *J Food Meas Charact*, 2019, 13(4): 2722–2728.
- [9] 马兴, 肖亚兵, 陈颖, 等. 快速水蒸气蒸馏-气相色谱热能分析仪法测定肉制品和水产制品中 13 种 N-亚硝胺[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(20): 198–203.  
MA X, XIAO YB, CHEN Y, *et al.* Determination of 13 N-nitrosamines in meat and aquatic products by gas chromatography-thermal energy analyzer with rapid steam distillation [J]. *Food Res Dev*, 2020, 41(20): 198–203.
- [10] 张甜, 樊晓盼, 熊凤娇, 等. SPME-GC-NPD 法测定肉制品中挥发性 N-亚硝胺的条件优化[J]. *肉类研究*, 2017, 31(7): 50–56.  
ZHANG T, FAN XP, XIONG FJ, *et al.* Optimization of extraction conditions for the determination of volatile N-nitrosamines in meat products using solid-phase microextraction combined with gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection [J]. *Meat Res*, 2017, 31(7): 50–56.
- [11] 江小雪, 谈惠洁, 蔡丽媛, 等. 气相色谱-热能分析仪测定汽车内饰件中 9 种 N-亚硝胺散发量[J]. *分析实验室*, 2021, 40(3): 357–360.  
JIANG XX, TAN HJ, CAI LY, *et al.* Determination of the emissions of nine N-nitrosamines from vehicle interior parts using gas chromatography with thermal energy analyzer [J]. *Chin J Anal Lab*, 2021, 40(3): 357–360.
- [12] MA LJ, TONG WZ, DU LP, *et al.* Optimization of an aqueous two-phase system for the determination of trace ethyl carbamate in red wine [J]. *J Food Protect*, 2019, 82(8): 1377–1383.
- [13] 赵依芃, 王宗义, 沙菲, 等. 稳定同位素稀释-GC-MS/MS 快速检测发酵食品中的氨基甲酸乙酯[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(4): 306–311.  
ZHAO YP, WANG ZY, SHA F, *et al.* Rapid determination of ethyl carbamate in fermented food by stable isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(4): 306–311.
- [14] WANG ZY, ZHAI MT, XIA XN, *et al.* A simple method for monitoring eight N-nitrosamines in beef jerky by gas chromatography-tandem mass spectrometry with one-step treatment coupled to active carbon solid-phase extraction [J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11(3): 933–938.
- [15] LECA JM, PEREIRA V, PEREIRA AC, *et al.* A sensitive method for the rapid determination of underivatized ethyl carbamate in fortified wine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11(2): 327–333.
- [16] 杨阳, 王帅, 贾立明, 等. 液相色谱/串联质谱法测定水中 8 种亚硝胺方法优化研究[J]. *环境化学*, 2019, 38(3): 708–711.  
YANG Y, WANG S, JIA LM, *et al.* Optimization of method for determination of 8 nitrosamines in water by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2019, 38(3): 708–711.
- [17] 柯润辉, 王丽娟, 安红梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定白酒中氨基甲酸乙酯和 8 种甜味剂[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(4): 174–178.  
KE RH, WANG LJ, AN HM, *et al.* Simultaneous determination of ethyl carbamate and eight sweeteners in Chinese distilled spirit by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(4): 174–178.
- [18] SEO JE, PARK JE, LEE JY, *et al.* Determination of seven N-nitrosamines in agricultural food matrices using GC-PCI-MS/MS [J]. *Food Anal Methods*, 2016, 9(6): 1595–1605.
- [19] 李美萍, 李蓉, 王志娟, 等. 气相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定水中 16 种痕量亚硝胺[J]. *分析化学*, 2019, 47(2): 288–296.  
LI MP, LI R, WANG ZJ, *et al.* Determination of 16 kinds of N-nitrosamines in water by gas chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2019, 47(2): 288–296.
- [20] KAILASA SK, KODURU JR, PARK TJ, *et al.* Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review [J]. *Trends Environ Anal*, 2021, 29: 113.
- [21] 彭俏容, 唐涛, 于淑新, 等. 基于冷冻熔炼的液-液萃取/气相色谱法测定啤酒中的 N-二甲基亚硝胺[J]. *色谱*, 2014, 32(4): 433–437.  
PENG QR, TANG T, YU SX, *et al.* Determination of N-nitrosodimethylamine in beer by frozen zone melting liquid-liquid extraction/gas chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(4): 433–437.
- [22] 朱铭洪. 吹扫捕集-气相色谱-质谱法测定啤酒中 8 种亚硝胺类化合物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(5): 1798–1893.  
ZHU MH. Determination of 8 kinds of N-nitrosamine compounds in beer by purge-trap and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(5): 1798–1893.
- [23] 蒙法双. GC-MS/MS 测定啤酒中的两种亚硝胺类化合物[J]. *现代食品*, 2018, 5(10): 124–127.  
MENG FS. Determination of 2 kinds of N-nitrosamine compounds in beer by GC-MS/MS [J]. *Mod Food*, 2018, 5(10): 124–127.
- [24] 田冲, 葛怡聪, 陈俏, 等. 气相色谱法测定啤酒中 N-亚硝胺类化合物[J]. *食品科技*, 2021, 46(10): 294–297.  
TIAN C, GE YC, CHEN Q, *et al.* Determination of N-nitrosamine compounds in beer by gas chromatography [J]. *Food Sci*, 2021, 46(10): 294–297.
- [25] XIAN YP, WU YL, DONG H, *et al.* Ice-bath assisted sodium hydroxide purification coupled with GC-MS/MS analysis for simultaneous quantification of ethyl carbamate and 12 N-nitrosamines in yellow rice wine and beer [J]. *Food Chem*, 2019, 300: 125200.
- [26] 施艺玮, 张宁, 操雯, 等. 分散液液微萃取技术及其在生物样品分析中的研究进展[J]. *色谱*, 2020, 38(5): 491–501.  
SHI YW, ZHANG N, CAO W, *et al.* Advances in dispersive liquid-liquid

- microextraction and its application to analysis of biological samples [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(5): 491–501.
- [27] MA HL, LI Y, ZHANG HJ, *et al.* Salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization gas chromatography-mass spectrometry for the determination of haloacetonitriles in drinking water [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1358: 14–19.
- [28] 吴天侯, 刘珊, 王宗义, 等. 盐辅助分散液液微萃取/GC-MS/MS 检测腐乳、酸乳和面包中的氨基甲酸乙酯[J]. *食品科技*, 2020, 45(10): 302–306.
- WU TY, LIU S, WANG ZY, *et al.* Determination of ethyl carbamate in fermented bean curd, yoghurt and bread by GC-MS/MS with salt assisted liquid microextraction [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(10): 302–306.
- [29] 刘珊, 吴天侯, 侯彤瑶, 等. 盐辅助分散液液微萃取结合气相色谱-串联质谱法快速检测啤酒中 N-二甲基亚硝胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(16): 5713–5718.
- LIU S, WU TY, HOU TY, *et al.* Rapid determination of N-dimethylnitrosamine in beer by salt-assisted dispersion liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(16): 5713–5718.
- [30] 侯彤瑶, 王宗义, 潘晓玉, 等. 碱处理结合盐辅助分散液液微萃取 GC-MS/MS 检测即食鱼制品中 7 种 N-亚硝胺[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(3): 176–182.
- HOU TY, WANG ZY, PAN XY, *et al.* Determination of 7 kinds of N-nitrosamines in ready-to-eat fish products by GC-MS/MS with alkali-treatment coupled salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction [J]. *J Food Sci Technol*, 2021, 39(3): 176–182.
- [31] AMELIN VG, LAVRUKHIN DK. Combination of microwave heating extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nitrosoamines in foods using gas-liquid chromatography with a mass-spectrometric detector [J]. *J Anal Chem*, 2016, 71(4): 359–364.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



刘方征, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 790453793@qq.com

王宗义, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangzongyi001@sina.com