

啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的测定

刘印平¹, 刘玉欣¹, 云鹏¹, 路杨¹, 王丽英¹, 常凤启¹, 杨立新^{1,2*}

(1. 河北省疾病预防控制中心, 河北省食品安全风险监测重点实验室, 石家庄 050021;

2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: **目的** 建立气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)测定啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的方法。 **方法** 试样经二氯甲烷超声提取、离心, SILICA/PSA 玻璃柱净化后气相色谱/质谱仪直接测定, D6-N,N-二甲基亚硝胺内标法定量。 **结果** 加标回收率范围为 66.9%~103.4%, 相对标准偏差(RSD)在 2.5%~7.7%。将该方法用于实际样品分析, 30 份啤酒中均未检出 N,N-二甲基亚硝胺, 8 份腊肠样品中检出 2 份阳性样品, 含量均低于肉制品中 N,N-二甲基亚硝胺限量值 3.0 μg/kg。 **结论** 此方法简便快速, 灵敏度较高, 可以用于啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的准确定量。

关键词: N,N-二甲基亚硝胺; 气相色谱-质谱法; 内标法; 啤酒; 腊肠

Determination of N-dimethyl nitrosamine in beer and sausage

LIU Yin-Ping¹, YUN Peng¹, LU Yang¹, WANG Li-Ying¹, YANG Li-Xin^{1,2*}

(1. Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hebei Provincial Key Laboratory of Food Safety Risk Monitoring, Shijiazhuang 050021, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of N-dimethyl nitrosamine in beer and sausage by gas chromatography-mass spectrometry. **Methods** Homogenized samples sequentially were extracted by methylene chloride, centrifugation, and SILICA/PSA columns cleanup before analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Quantification of N-dimethyl nitrosamine was based on the use of D6-N-dimethyl nitrosamine. **Results** The present method showed acceptable recoveries of 66.9%~103.4%, with relative standard deviation (RSD) ranging from 2.5% to 7.7%. Analysis of 30 beer samples and 8 sausage samples by the current method were successfully performed. N,N-dimethyl nitrosamine were not detected in beer samples. Two positive sausage samples were detected and the content was lower than the limited value of 3.0 μg/kg in meat products. **Conclusion** This quantitative method is demonstrated to be rapid, simple, and high sensitive, which can be applied in the accurate determination of N-dimethyl nitrosamine in beer and sausage.

KEY WORDS: N-dimethyl nitrosamine; gas chromatography-mass spectrometry; internal standard; beer; sausage

*通讯作者: 杨立新, 博士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yanglixin241@163.com

*Corresponding author: YANG Lin-Xin, Senior Technical Personnel, Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, No.97, Huai'an East Road, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: yanglixin241@163.com

1 引言

N,N-二甲基亚硝胺(NDMA), 别名 N-二甲基亚硝胺, 属于工业过程的副产物或产生的废料, 广泛存在于各种腌制、熏烤肉制品和热加工食品中如香肠、腊肉、培根、火腿、热狗、熏肉、鱿鱼干等。研究表明, 长期食用该类食品会对健康产生潜在危害^[1-3]。美国政府工业卫生学家协会(ACGIH)将 NDMA 列为人类可疑化学致癌物, 属高毒类, 经消化道、呼吸道吸收迅速, 经皮肤吸收缓慢, 主要引起肝脏损害。

N,N-二甲基亚硝胺在自然界分布很广, 在咸鱼、啤酒和某些酒精饮料以及肉和肉制品等食品中检出率都很高, 是日常饮食中潜在的安全隐患^[4,5]。因此, 建立有关亚硝胺类在食品中的标准检验方法十分必要。近年来, 食品分析方面出现了许多样品前处理新技术, 如微波协助萃取、加速溶剂萃取、固相萃取、膜萃取、超临界流体萃取、固相微萃取等, 这些方法都有各自的优势和缺陷^[4-7]。N,N-二甲基亚硝胺前处理一般采用水蒸气蒸馏后、二氯甲烷液液萃取, 气相色谱分离, 选择检测器(热能分析仪 TEA)进行测定, 外标法定量。如国标方法 GB/T 5009.26-2003 食品中 N-亚硝胺类的测定^[8]。该类方法取样量大(30~200 g)、时间长、对检测器要求高。

本研究采用气相色谱质谱法测定啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的测定, D₆-N,N-二甲基亚硝胺内标法定量。相比于国内其他方法, 本方法采用同位素内标法定量, 有效减少了样品前处理所造成的误差和基质干扰, 避免了反复提取造成的时间和溶剂消耗量大的问题^[9,10]。本方法只需提取一次, 溶剂消耗量小, 用时短, 净化效果好, 灵敏度高, 使用同位素内标法定量更为准确, 可用于食品安全风险监测中 N,N-二甲基亚硝胺的大批量准确测定。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

仪器: 气相色谱-质谱联用仪 DSQ(Thermo, USA); TDL-5-A 型离心机(上海安亭); AE200 分析天平(瑞士 METTLER 公司); SILICA/PSA 混合玻璃固相萃取净化柱(规格 1.0 g/6 mL)(购自杭州福裕科技发展有限公司)。

标准物质: N,N-二甲基亚硝胺(1 mg/mL), 购自

上海安谱科学仪器有限公司; 内标 D₆-N,N-二甲基亚硝胺(1 mg/mL), 购自 Cambridge 公司。

试剂: 甲醇、乙腈、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷(色谱级, Fisher 公司); 氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 北京化工厂)。

2.2 样品前处理

取 50 mL 啤酒, 在超声波清洗机中超声脱气 5 min, 然后量取 10 mL 至 50 mL 离心管内, 加入 100 μL D₆-N,N-二甲基亚硝胺应用液(2.0 mg/L), 混匀, 加入 3.0 g 氯化钠溶解至饱和, 加入 15 mL 二氯甲烷, 涡旋 30 s, 超声提取 10 min, 然后 10000 r/min 离心 4 min, 弃去上层水相, 二氯甲烷层经无水硫酸钠脱水后, 氮气浓缩至近干, 然后加入 1 mL 环己烷, 混匀后待净化。

准确称取 10 g 粉粹并混匀的腊肠, 加入适量无水硫酸钠混匀, 加入 40 mL 二氯甲烷, 超声提取 10 min, 然后 10000 r/min 离心 4 min, 提取液经无水硫酸钠脱水后, 氮气浓缩至近干, 然后加入 1 mL 环己烷, 混匀后待净化。

取 SILICA/PSA 玻璃柱(1.0 g/6 mL), 先用 5 mL 二氯甲烷、5 mL 环己烷淋洗活化柱子, 将提取液过柱后, 先用 5 mL 10%二氯甲烷/环己烷淋洗除杂, 最后用 5 mL 二氯甲烷洗脱收集, 氮气吹至近干, 加入 1.0 mL 甲醇复溶, 气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析, 内标法定量。

2.3 气相色谱质谱条件

色谱条件: 载气: 高纯氦(纯度 ≥99.999), DB-INNOWAX 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 流量: 1.0 mL/min; 进样口温度: 250 °C, 进样量: 1 μL, 不分流; 升温程序: 初始柱温: 35 °C, 保持 3 min, 以 10 °C/min 升温至 120 °C, 再以 15 °C/min 升温至 200 °C, 后运行温度 250 °C, 保持 5 min。

质谱条件: 接口温度: 280 °C; 离子源温度: 230 °C; 电离方式: 电子轰击源(EI); 监测方式: 选择离子监测(SIM), 监测离子见表 1。

2.4 标准储备液和标准溶液的配制

将 N,N-二甲基亚硝胺标准溶液, 用甲醇稀释, 配制成一定浓度的标准储备液。

将以上各标准储备液进一步稀释, 配成混合标准溶液(10、50、100、200、500、1000 ng/mL), 其中内标浓度为 200 ng/mL。

表1 N,N-二甲基亚硝胺监测离子
Table 1 Monitoring ions of N-dimethyl nitrosamine

保留时间(min)	化合物	定性离子	定量离子
9.80	N,N-二甲基亚硝胺	42, 43	74
9.80	D6-N,N-二甲基亚硝胺	46	80

3 结果与讨论

3.1 方法的线性范围和检出限

在优化的条件下,对所配制的10、50、100、200、500、1000 ng/mL N,N-二甲基亚硝胺系列浓度的混合标准溶液进行测定。可见,N,N-二甲基亚硝胺在以上浓度范围内与峰面积呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.00648823X$,相关系数 $r=0.9995$ 。标准色谱图和啤酒中加标色谱图分别见图1和图2。

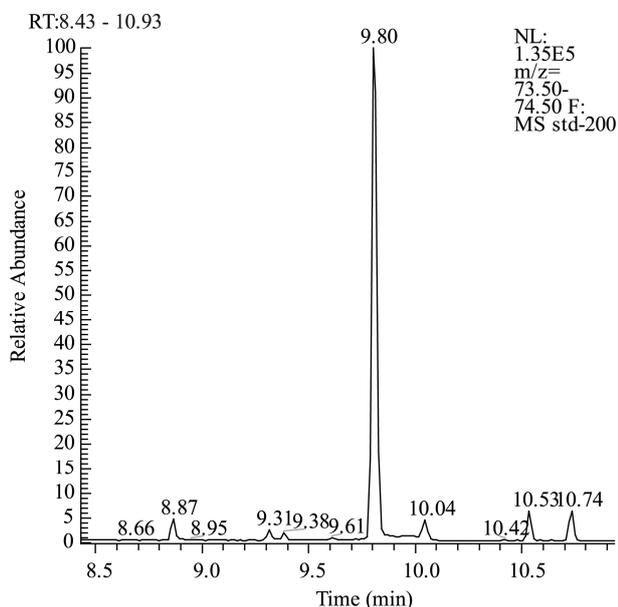


图1 N,N-二甲基亚硝胺标准色谱图(200 ng/mL)
Fig. 1 The chromatogram of N-dimethyl nitrosamine standard solution (200 ng/mL)

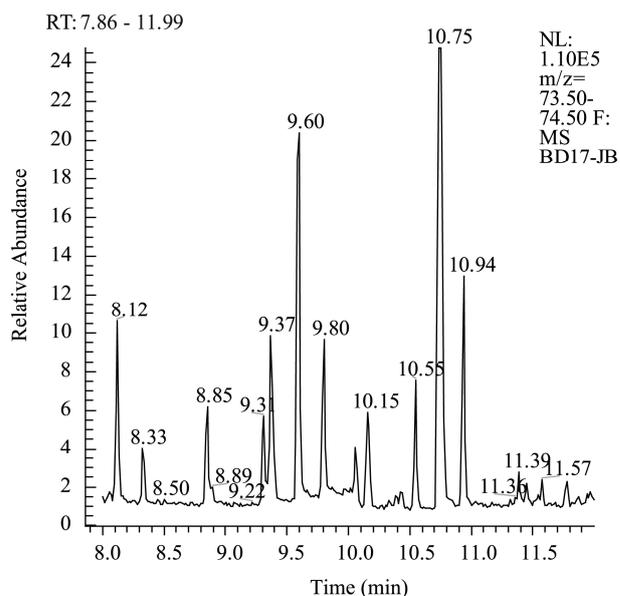


图2 啤酒中N,N-二甲基亚硝胺加标色谱图(加标水平100 ng/mL)

Fig. 2 The chromatogram of N-dimethyl nitrosamine spiking in beers at 100 ng/mL

3.2 回收率和精密度

为了保证分析结果的准确,要求在分析每批样品时,进行加标试验。在确定的实验条件下,向空白样品中添加不同水平的标准溶液,每个添加水平重复6次,进行加标回收率和精密度的测定。结果见表2,加标回收率范围为72.9%~103.4%,相对标准偏差(RSDs)在2.5%~7.7%之间,说明方法准确可靠,重现性好。

3.4 实际样品测定

分析了瓶装和罐装商品啤酒中的N,N-二甲基亚硝胺,所分析的30个样品中,均未检出N,N-二甲基亚硝胺。同时分析了8份腊肠中的N,N-二甲基亚硝胺,检出2份阳性样品,含量分别为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和2.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,低于肉制品中N,N-二甲基亚硝胺的限量值(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

表 2 测定 N,N-二甲基亚硝胺的准确度和精密度
Table 2 Accuracy and precision for N-dimethyl nitrosamine

样品	加标水平	回收率±RSD(% , n=6)	检出限	定量限
啤酒	2.5 µg/L	66.9±2.5	0.45 µg/L	1.5 µg/L
	50 µg/L	72.9±3.0		
	100 µg/L	82.2±4.1		
腊肠	2 µg/kg	74.3±7.7	0.60 µg/kg	2.0 µg/kg
	10 µg/kg	87.5±3.6		
	50 µg/kg	103.4±2.6		

与国内其他同类研究相比较, 段发森等^[11]对 72 份啤酒中 N-亚硝基化合物进行检测, N,N-二甲基亚硝胺检出率为 83.9%, 含量均在 7 µg/kg 以下。李玉民等^[12]在 20 份腌菜中测到 N,N-二甲基亚硝胺(NDMA)的最高含量为 47.78 µg/kg, 检出率为 60%~70%。可见, N,N-二甲基亚硝胺在腊肠中虽含量极微, 但亚硝基化合物属强致癌物, 为食用安全起见, 应尽量少吃该类腌制或熏制食物, 并且采取有效措施降低食品中亚硝基化合物及前体物含量。

4 结 论

本研究建立了用于测定啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的气相色谱-质谱联用法, 该法前处理步骤简单、灵敏度高, 可用于准确定性和定量。可以满足食品中 N,N-二甲基亚硝胺的残留含量的测定要求。

虽然 N,N-亚硝基化合物在食品中天然存在的含量极微, 但其前体物亚硝酸盐及仲胺等广泛存在于自然界, 在适宜条件下, 可形成亚硝胺或亚硝酰胺^[9], 因此持续监测食品中 N,N-亚硝基化合物很有必要。

参考文献

- [1] 林昆, 于世江, 张建军, 等. 食物中总亚硝基化合物及其相关危险因素研究[J]. 卫生研究, 2005, 34: 350-352.
Lin K, Yu SJ, Zhang JJ, *et al.* Study on N-nitroso compound in food and its relevant risk factors for esophageal cancer [J]. J Hyg Res, 2005, 34: 350-352.
- [2] 孙卫青, 马偲珍. 腊肉加工过程中 N-亚硝胺的分析[J]. 食品研究与开发, 2011, 32: 60-62.
Sun WQ, Ma LZ. The online detection of N-nitrosamine of preserved ham [J]. Food Res Devel, 2011, 32: 60-62.
- [3] 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, 08(4): 16-22.
Wu YY, Liu FJ, Li LH, *et al.* Determination of optimization of N-nitrosamines in salted fish by gas chromatography-mass spectrometry [J]. South China Fish Sci, 2012, 8(4): 16-22.
- [4] 张桃芝, 陶燕飞, 黄红林, 等. SDE-GC 联用分析啤酒中 N-亚硝胺[J]. 分析试验室, 2004, 23: 54-56.
Zhang TZ, Tao YF, Huang HL, *et al.* Determination of N-nitrosamines in beer samples by single drop-extraction gas chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2004, 23: 54-56.
- [5] 赵宇翔, 王翔, 胡耀铭. GC-LRMS 法测定啤酒中 3 种 N-亚硝胺化合物[J]. 分析试验室, 2011, 30: 84-87.
Zhao YX, Wang X, Hu YM. Determination of three nitrosamines in beer by GC-LRMS [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30: 84-87.
- [6] 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.
- [7] 陶燕飞, 黄红林, 张桃芝. 啤酒中 N-亚硝胺的 SPME-GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2003, 22: 82-84.
Tao YF, Huang HL, Zhang TZ. Determination of volatile N-nitrosocompounds in beer by SPME-GC-MS [J]. J Instrum Anal, 2003, 22: 82-84.
- [8] GB/T 5009.26-2003 食品中 N-亚硝胺类的测定[S].
GB/T 5009.26-2003 Method for determination of N-nitrosamines in foods [S].
- [9] 翁其香. 气质联用法测定食品中 N-二甲基亚硝胺含量[J]. 福建分析测试, 2006, 15(4): 18-23.

- Weng QX. Determination of the content of N-dimethyl nitrosamine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Fujian Anal Test, 2006, 15(4): 18-23.
- [10] 冯秀娟, 龚慧, 张学玲. GC-MS 法测定食品中 N-二甲基亚硝胺含量[J]. 中外食品工业, 2014, 8: 43-46.
- Feng XJ, Gong H, Zhang XL. Determination of N-dimethylnitrosamine in various food by GC-MS method [J]. Sino-foreign Food Ind, 2001, 28: 27-28.
- [11] 段发森, 陈恺玲, 骆和东. 啤酒、酱油、香肠中 N-亚硝基化合物含量的调查分析[J]. 现代预防医学, 2001, 28: 27-28.
- Duan FM, Chen KL, Luo HD. Study on the content of N-nitroso compound in beer, soy sauce and sausage [J]. Mod Prev Med, 2001, 28: 27-28.
- [12] 李玉民, 陈立仁, 薛群基, 等. 武威市腌菜中亚硝基化合物的测定及其胃癌高发原因的分析[J]. 分析测试技术与仪器, 2003, 9: 88-90.

Li YM, Chen LR, Xue QJ, *et al.* Determination and analysis of N-nitroso-compounds of pickles in Wuwei city of Gansu province [J]. Anal Test Technol Instrum, 2003, 9: 88-90.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘印平, 硕士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: liuyinping0930@163.com



杨立新, 博士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yanglixin241@163.com