

高效液相色谱-串联质谱法测定腌制肉制品中的 N,N-二甲基亚硝胺含量

吴翠华*, 杜高发, 李 婷, 陈树东, 李巧琪, 许志彬

(国家加工食品质量检验中心(广东), 广州检验检测认证集团有限公司, 广州 511447)

摘 要: **目的** 建立测定腌制肉制品中的 N,N-二甲基亚硝胺含量的高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)。**方法** 样品经乙腈超声提取后, 离心, 提取液用增强型基质去除固相吸附剂(enhanced matrix removal, EMR)进行净化, 盐析后得到处理液。在优化的色谱及质谱条件下, 采用 ESI 正离子模式电离, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描测定。**结果** N,N-二甲基亚硝胺在 2.0~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 r 为 0.9998, 方法检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 2.0 $\mu\text{g/kg}$, 平均回收率为 95.6%~102.5%, 相对标准偏差为 4.35%~6.76%。**结论** 该方法操作简便、快速高效、回收率高、灵敏度高、重复性好, 可用于实际测定腌制肉制品中的 N,N-二甲基亚硝胺含量。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 腌制肉; N,N-二甲基亚硝胺; 固相吸附剂

Determination of N,N-dimethylnitrosamine in marinated meat products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Cui-Hua*, DU Gao-Fa, LI Ting, CHEN Shu-Dong, LI Qiao-Qi, XU Zhi-Bin

(National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangdong), Guangzhou Inspection and Certification Group Co., Ltd, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of N,N -dimethyl nitrosamine content in salted meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). **Methods** After ultrasonic extraction of acetonitrile, the sample was centrifuged, the enhanced matrix removal (EMR) was used to remove the enhanced matrix removal, and the treatment solution was obtained. In the optimized chromatography and mass spectrometry conditions, the ESI cation mode was used to ionize. Multiple reaction monitoring (MRM) pattern scanning was used to measured. **Results** N,N-dimethylnitrosamine had a good linear relationship in the range of 2.0-50 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficient was 0.9989. The limits of detection and the limits of quantitation were 0.5 $\mu\text{g/kg}$ and 2.0 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The recoveries were 95.6%-102.5%, with the relative standard deviations of 4.35%-6.76%. **Conclusion** This method is easy, efficient, with high recovery, good sensitivity and high precision, which is suitable for practical determination of N,N-dimethylnitrosamine in marinated meat products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; marinated meat; N,N-dimethylnitrosamine; solid phase adsorbent

*通讯作者: 吴翠华, 中级工程师, 主要研究方向为食品理化项目分析检测。E-mail: petty_lpt@163.com

*Corresponding author: WU Cui-Hua, Engineer, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangdong), Guangzhou Inspection and Certification Group Co., Ltd, Guangzhou 511447, China. E-mail: petty_lpt@163.com

1 引言

N,N-二甲基亚硝胺是腌制肉制品中的一种污染物,是在腌制肉制品的制作工艺中,由蛋白质分解产物二甲胺在酸性条件下与亚硝酸盐反应生成。N,N-二甲基亚硝胺是一种强致癌物质,在自由基和脂质过氧化反应过程中,能经消化道在体内迅速吸收,损坏肝脏、肾脏等人体组织,严重时会使组织癌变^[1-3]。因此,长期摄入有可能导致食管癌、肝癌等疾病的发生^[4-7]。因此,GB 2762-2017《食品中污染物限量》对肉制品中N,N-二甲基亚硝胺的含量作出明确规定应小于3.0 μg/kg^[8],但由于腌制肉制品中含量较低,且样品含油脂较多,因此检测分析难度较大,难以准确定量。所以建立对腌制肉制品中的N,N-二甲基亚硝胺进行准确测定的方法,对监控食品安全和保障消费者健康有极其重要的意义^[9]。

目前,国内对亚硝胺类物质的测定主要有气相色谱法^[10]、气相色谱-质谱法^[11-13]、气相色谱-串联质谱法^[14]、高效液相色谱法^[15]和液相色谱-串联质谱法^[16-18]。但对于肉制品这类含油脂较多的样品,直接萃取分析,杂质干扰大,若采取柱层析等方法除去油脂,则有可能出现除脂不彻底或回收率低的情况。在GB 5009.26-2016《食品中N-亚硝胺类化合物的测定》中,采用的方法是气相色谱法和气相色谱-质谱法^[19],方法中的除油脂方式为水蒸气蒸馏,其缺点是称样量大,提取溶剂用量大,且浓缩过程耗时多,操作繁琐,不适合于大批量检测。本研究以乙腈提取,结合增强型基质去除固相吸附剂(enhanced matrix removal, EMR)进行净化,建立了高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)对腌制肉制品中的N,N-二甲基亚硝胺进行测定,以期对肉制品中各类化合物的分析测试研究提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 仪器及试剂

1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);三重四极杆串联质谱仪(AB4000Q Trap 美国 AB 公司);吹氮浓缩仪(美国 ZyMark 公司);SW 60 Trockner 超声波清洗器(瑞士 SONO SWISS 公司);TGL-16MH2050R 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Milli-Q 超纯水装置(美国 Millipore 公司)。

N,N-二甲基亚硝胺、d₆-N,N-二甲基亚硝胺(浓度均为1000 mg/L,上海安谱实验科技股份有限公司);乙腈、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司);EMR 净化粉末、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)、硅胶键合十八烷基(C₁₈)(美国安捷伦公

司);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,广州化学试剂厂);实验用水为经 Milli-Q 净化系统过滤的超纯水(电阻率为18.2 MΩ);

2.2 标准溶液的配制

分别取0.1 mL 1000 mg/L 的标准溶液于10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,得到10 mg/L 的N,N-二甲基亚硝胺,取10 mg/L 外标标准溶液20.0、50.0、100、200、500 μL 于5个100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,所得标准溶液浓度分别为2.0、5.0、10、20、50 μg/L。

内标溶液:取0.1 mL 1000 mg/L 的d₆-N,N-二甲基亚硝胺于10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度。内标溶液浓度为10 mg/L。

2.3 样品前处理

样品制备:采用四分法取样品200 g,绞肉机搅拌均匀后于-18℃下保存,实验前自然解冻至常温。

提取:称取样品10 g 于50 mL 离心管,加入10 mg/L 内标10 μL,加入15 mL 乙腈,涡旋混匀2 min,超声提取20 min,10000 r/min 离心5 min,转移至25 mL 比色管,然后再加入10 mL 乙腈超声提取20 min,10000 r/min 离心5 min,转移至25 mL 比色管,乙腈定容。

EMR 净化:称取EMR 净化粉末2 g 于50 mL 离心管中,加入2 mL 水活化,然后加入上述提取液10 mL,涡旋5 min,10000 r/min 离心5 min,转移上清液于另一干净的50 mL 离心管中,加入4 g 无水硫酸镁和1 g 氯化钠,涡旋1 min,10000 r/min 离心5 min,准确移取10 mL 上清液,50℃水浴下氮气吹至近干,1 mL 乙腈复溶,过0.22 μm 有机滤膜,待LC-MS/MS 测定。

2.4 色谱及质谱条件

2.4.1 色谱条件

HPLC-MS/MS: 色谱柱: Agilent Poroshell C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 2.7 μm); 流动相 A(乙腈)-B(0.1%甲酸); 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 40℃; 梯度洗脱: A:B=85:15(I:I)。

2.4.2 质谱条件

LC-MS-MS: 扫描方式: 电喷雾电离源(ESI⁺); 气帘气: 25 psi; 电离电压(IS): 5000 V; 离子源温度(TEM): 550℃; 雾化气(GAS1): 50 psi; 加热辅助气(GAS2): 50 psi; 碰撞气(CAD): medium; 采集模式: 多反应监测(MRM)模式。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

由于N,N-二甲基亚硝胺含有胺基结构,属于亲核型化合物,所以在流动相中加入甲酸有利于目标物离子化,

从而获得较好的响应。为了使目标物获得较好的色谱行为, 实验考察了乙腈-0.1%甲酸水和甲醇-0.1%甲酸水两种混合溶剂体系作为流动相时 N,N-二甲基亚硝胺的色谱保留行为。结果表明, 使用甲醇-0.1%甲酸水体系作为流动相时, N,N-二甲基亚硝胺出峰时间相对乙腈-0.1%甲酸水体系后移, 但峰型较宽, 而乙腈的洗脱能力较甲醇强, 所需时间缩短, 且峰型良好。N,N-二甲基亚硝胺和 d_6 -N,N-二甲基亚硝胺的 MRM 色谱图见图 1。

3.2 质谱条件的确定

由于 N,N-二甲基亚硝胺呈弱碱性, 在 ESI⁺模式下可获得较高响应的[M+H]⁺峰。对确定的母离子进行二级质谱扫描, 选择两个主要特征碎片离子作为定性和定量离子, 通过优化各个离子对的去簇电压(DP)和碰撞电压(CE)等参数条件, 得到最高特征碎片离子强度, 经优化的质谱条件见表 1。

3.3 超声时间对回收率的影响

实验前期对料液比对回收率的影响进行了探究, 结果发现, 在仅提取 1 次的情况下, 加入 25 mL 乙腈超声 15 min, N,N-二甲基亚硝胺的回收率要比分别用 25 mL 乙腈超声 15 min 提取 2 次的低, 而用 25 mL 乙腈超声提取 2 次, 提取液较多, 导致 N,N-二甲基亚硝胺浓度降低, 净化耗材增多, 浓缩时间增长。而分别用 15 mL 和 10 mL 乙腈分 2 次提取, 回收率同样能达到分析测定要求。因此, 在加入 15 mL 乙腈提取 1 次的条件下再对超声时间的回收率的影响进行了探究, 结果发现, 回收率随超声时间的增加而提高, 20 min 后回收率没有出现明显变化, 综合考虑, 选取 20 min 为最佳超声时间(见图 2)。

3.4 EMR 用量对回收率的影响

由于样品中含有大量的油脂, 因此实验对比了不同固相吸附剂 PSA、GCB、C₁₈ 和 EMR 的效果, 结果发现, PSA 和 GCB 对目标物吸附能力较强, 导致响应值较低, C₁₈ 对低极性杂质具有较好的去除能力, 但基质效应仍然对目标物响应影响严重。而 EMR 净化粉末为增强型基质去除固相吸附剂, 能有效地去除样品中脂质干扰, 提高结果准确性。

因此, 实验对 EMR 的用量进行了探究, 结果表明, EMR 用量的增多能有效地除去油脂, 而且能提高 N,N-二甲基亚硝胺的回收率, 当 EMR 用量超过 2 g 时, N,N-二甲基亚硝胺的回收率开始降低, 因此最终选取 2 g 为 EMR 的用量(见图 3)。

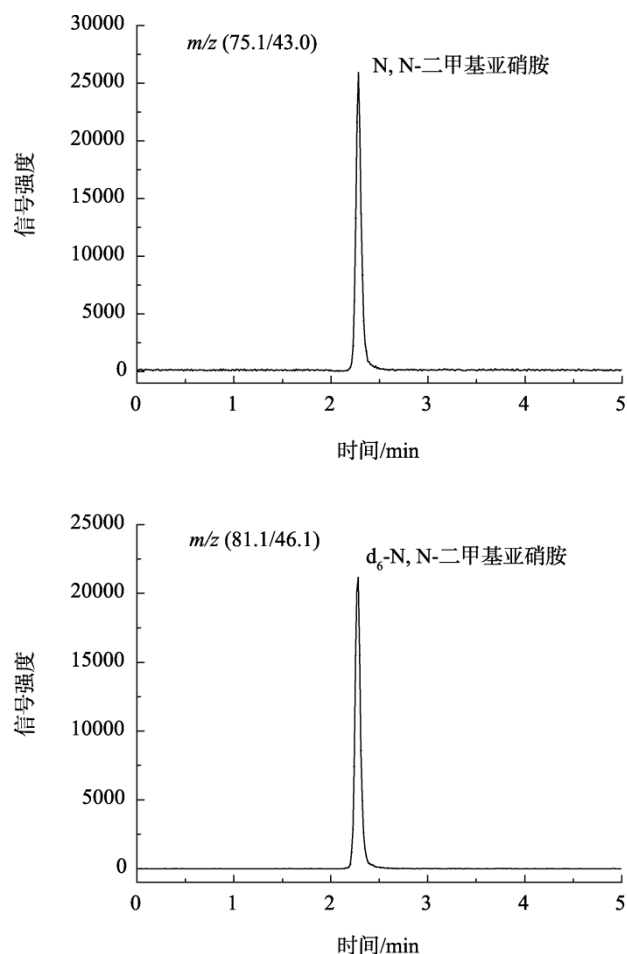


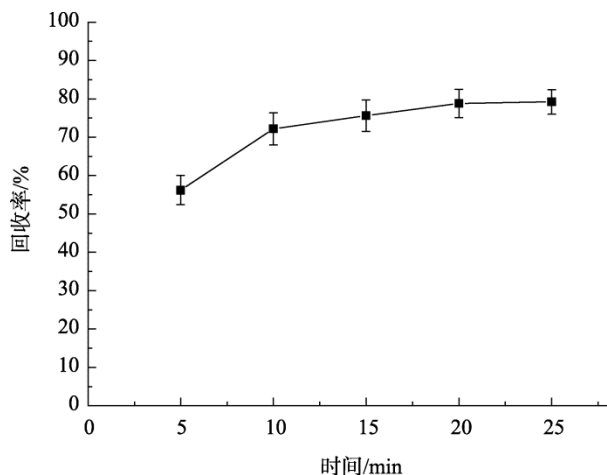
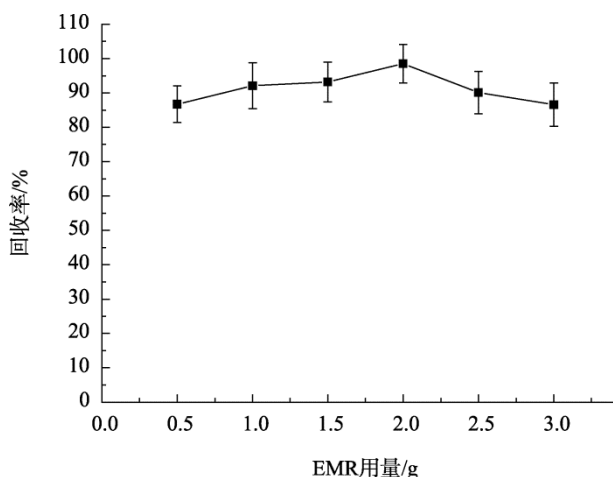
图 1 N,N-二甲基亚硝胺(50 µg/L)及 d_6 -N,N-二甲基亚硝胺(40 µg/L)MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of N,N-dimethylnitrosamine (50 µg/L) and d_6 -N,N-dimethylnitrosamine (40 µg/L)

表 1 N, N-二甲基亚硝胺和 d_6 -N, N-二甲基亚硝胺的质谱分析参数
Table 1 MS/MS parameters of N, N-dimethylnitrosamine and d_6 -N, N-dimethylnitrosamine

分析物	电离模式	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV
N,N-二甲基亚硝胺	ESI+	75.1	43.0*	40	23.0
			58.0	40	16.0
d_6 -N,N-二甲基亚硝胺	ESI+	81.1	46.1*	65	24.9
			64.1	65	19.1

注: “*”为定量离子。

图2 超声时间对回收率的影响($n=6$)Fig. 2 Effect of ultrasonic time on recovery ($n=6$)图3 EMR用量对回收率的影响($n=6$)Fig. 3 Effect of EMR dosage on recovery ($n=6$)

3.5 线性范围、检出限和定量限

采用内标法对 N,N-二甲基亚硝胺进行定量。将标准系列曲线按优化后的仪器条件进行测定, 其中内标

d_6 -N,N-二甲基亚硝胺的浓度均为 40 $\mu\text{g/L}$ 。以浓度比(目标物浓度/内标物浓度)为横坐标(X), 定量离子对峰面积比(目标物定量离子峰面积/内标物定量离子峰面积)为纵坐标(Y)进行线性回归, 所得方程为 $Y=0.0165X-0.0147$, 相关系数 r 为 0.9998。结果表明 N,N-二甲基亚硝胺在给定的范围内呈良好线性, 以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别计算出方法检出限和方法定量限分别为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 2.0 $\mu\text{g/kg}$, 表明方法灵敏度达到分析测定要求。

3.6 回收率实验

选用 N,N-二甲基亚硝胺呈阴性的腊肠、腊肉、火腿 3 种样品, 进行 3 个水平的加标回收实验, 每个加标水平分别日内进行 6 次平行测定。3 种样品的 3 个水平的平均回收率范围在 95.6%~102.5%之间, RSDs 在 4.35%~6.76%之间(表 2)。

3.7 实际样品分析

对市售 20 种腌制肉采用本方法进行测定, 重复 6 次求得平均值, 结果显示, 其中 1 个腊肠和 1 个火腿检测出 N,N-二甲基亚硝胺, 其含量分别 2.42 $\mu\text{g/kg}$ 和 1.72 $\mu\text{g/kg}$, 均低于 GB 2762-2017《食品中污染物限量》所规定的 3.0 $\mu\text{g/kg}$, 而其余 18 个样品 N,N-二甲基亚硝胺含量均低于检出限, 安全风险较低。

4 结论

本研究建立了 EMR 净化测定腌制肉制品中 N,N-二甲基亚硝胺的 HPLC-MS/MS 法。提取过程快速简单, EMR 固相吸附剂有效地去除了油脂杂质, 大大提高了 N,N-二甲基亚硝胺的回收率和灵敏度, 结合高效液相色谱, N,N-二甲基亚硝胺在 2.5 min 内出峰, 且峰型良好。利用内标物对低添加水平回收率进行校正, 方法学结果表明, 本方法具有回收率高、操作简便和重现性好等优点, 可用于实际测定腌制肉制品中的 N,N-二甲基亚硝胺含量。

表 2 N,N-二甲基亚硝胺的回收率和精密度($n=6$)Table 2 Recoveries and RSDs of N,N-dimethylnitrosamine ($n=6$)

样品	添加值($\mu\text{g/kg}$)	测得值($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
腊肠	2.0	1.96	98.2	4.64
	10	9.56	95.6	4.80
	20	20.1	100.4	4.82
腊肉	2.0	1.92	95.8	6.76
	10	10.2	102.5	4.77
	20	20.1	100.6	5.21
火腿	2.0	1.98	99.1	4.79
	10	9.89	98.9	5.05
	20	19.2	95.8	4.35

参考文献

- [1] 陈起萱, 王身笏, 许月初, 等. 二甲基亚硝胺对鼠体脂质过氧化的影响[J]. 癌症, 1997, (5): 338-340.
Chen QX, Wang SH, Xu YC, *et al.* The effects of NDMN on lipid peroxidation in rats [J]. Chin J Cancer, 1997, (5): 338-340.
- [2] 吴强强. 亚硝胺诱导食管癌变进程中 Gadd45 α 与表观遗传修饰变化的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2008.
Wu QQ. The exploration of the relationship between Gadd45 α and epigenetic modification during the process of esophageal carcinogenesis induced by nitrosamine in mice [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2008.
- [3] Demirci S, Doğan A, Başak N, *et al.* A Schiff base derivative for effective treatment of diethylnitrosamine-induced liver cancer *in vivo* [J]. Anti-Cancer Drug, 2015, 26(5): 555-564.
- [4] Lu M, Wu J, He F, *et al.* Cell expression patterns of CD147 in N-diethylnitrosamine/phenobarbital-induced mouse hepatocellular carcinoma [J]. J Mol Histol, 2015, 46(1): 79-91.
- [5] 宋艺君, 刘晓婷, 冯丽莉, 等. 二乙基亚硝胺诱发肝癌前病变大鼠模型的建立[J]. 世界华人消化杂志, 2012, (27): 2562-2575.
Song YJ, Liu XT, Feng LL, *et al.* Definition of diethylnitrosamine-induced rat hepatic precancerous lesions with atypia index [J]. World Chin J Dig, 2012, 2(27): 2562-2575.
- [6] El-Shenawy NS, Hamza RZ, Khaled HE. Protective effect of α -lipoic acid against spleen toxicity of dimethylnitrosamine in male mice: Antioxidant and ultrastructure approaches [J]. Biomed Pharm, 2017, 96: 459-465.
- [7] Cheong KO, Shin DS, Bak J, *et al.* Hepatoprotective effects of zingerone on carbon tetrachloride- and dimethylnitrosamine-induced liver injuries in rats [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(2): 279-291.
- [8] GB2762-2017 食品中污染物限量[S].
GB2762-2017 Limit of contaminants in food [S].
- [9] 董瑾, 刘爱华. N-二甲基亚硝胺检测研究进展[J]. 现代食品, 2016, (4): 77-79.
Dong J, Liu AH. Research progress of NDMA detection [J]. Mod Food, 2016, (4): 77-79.
- [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, (7): 50-56.
Zhang T, Fan SP, 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, (7): 50-56.
- [11] Frassanito R, Benfenati E, Ciotti G, *et al.* A simple method for determination of Na nitrosamine traces in trifluralin samples by gas chromatography mass spectrometry [J]. Toxicol Environ Chem Rev, 2016, 45(3-4): 199-204.
- [12] 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.
Hu LF, Yin DF, Zhou YM, *et al.* Determination of N-dimethylnitrosamine in salt fish by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Acta Agric Jiangxi, 2009, 21(9): 135-136.
- [13] 刘印平, 刘玉欣, 云鹏, 等. 啤酒和腊肠中 N,N-二甲基亚硝胺的测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3834-3838.
Liu YP, Liu YX, Yun P, *et al.* Determination of N-dimethyl nitrosamine in beer and sausage [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 3834-3838.
- [14] 周佳, 孙嘉茵, 李宇茜, 等. GC-MS/MS 同位素内标法测定肉制品中 N-二甲基亚硝胺[J]. 中国测试, 2016, 42(9): 46-49.
Zhou J, Sun JY, Li YQ, *et al.* Isotope internal standard method analysis of N-nitrosodimethylamine in meat products by GC-MS/MS [J]. Chin Measur Test Technol, 2016, 42(9): 46-49.
- [15] Lu S, Di W, Li G, *et al.* Facile and sensitive determination of N-nitrosamines in food samples by high-performance liquid chromatography via combining fluorescent labeling with dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Food Chem, 2017, 234: 408.
- [16] 梁闯, 徐斌, 夏圣骥, 等. SPE/LC/MS/MS 检测水中痕量二甲基亚硝胺[J]. 中国给水排水, 2009, 25(14): 82-85.
Liang C, Xu B, Xia SJ, *et al.* Detection of trace NDMA in drinking water by SPE/LC/MS/MS [J]. Chin Water Wastewater, 2009, 25(14): 82-85.
- [17] 朱翔, 李伟, 刘玉灿, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪同时检测水中 9 种亚硝胺[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 866-872.
Zhu X, Li W, Liu YC, *et al.* Determination of nine N-nitrosamines in water using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(8): 866-872.
- [18] 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.
Chen T, Wen YY, Ou Y, *et al.* Determination of N-nitrosamines in rubber products by solid phase extraction purification and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(1): 89-94.
- [19] GB 5009.26-2016 食品中 N-亚硝胺类化合物的测定[S].
GB 5009.26-2016 Determination of n-nitrosamines in food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



吴翠华, 中级工程师, 主要研究方向为食品理化项目分析检测。

E-mail: petty_lpt@163.com