

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

刘 珊[#], 吴天侯[#], 侯彤瑶, 王宗义^{*}, 王雅楠, 郭欣然, 何世慧

(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)

摘 要: **目的** 建立盐辅助分散液液微萃取(salt assisted dispersible liquid-liquid microextraction, SADLLME)气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)检测啤酒中 N-二甲基亚硝胺(N-dimethylnitrosamine, NDMA)的分析方法。**方法** 取 30 mL 啤酒于 50 mL 的离心管中, 加入浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NDMA-d6 甲醇溶液 50 μL , 硫酸钠 3 g, 振荡溶解, 快速打入二氯甲烷 600 μL , 振荡 1 min, 离心, 弃去上清液, 取下层有机相, 上机检测。**结果** 方法在考察浓度为 1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的范围内线性良好, 相关系数大于 0.998; 添加回收率为 97.7%~104.8%, 相对标准偏差为 4.07%~8.46%; 检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{L}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。实际样品检测显示, 啤酒样品中均检出含有 NDMA, 但含量远低于国际限量 5 $\mu\text{g}/\text{L}$, 处于较安全水平。**结论** 该方法具有样品处理简便、快速、成本低廉, 方法检出限极低, 准确度高, 可满足啤酒中 NDMA 检测的需要。

关键词: 盐辅助分散液液微萃取; 气相色谱-串联质谱法; N-二甲基亚硝胺; 啤酒

Rapid determination of N-dimethyl nitrosamine in beer by salt-assisted dispersible liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Shan[#], WU Tian-Yu[#], HOU Tong-Yao, WANG Zong-Yi^{*}, WANG Ya-Nan, GUO Xin-Ran, HE Shi-Hui

(Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Microorganisms and Pesticide Residues in Agricultural Products, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of N-dimethylnitrosamine (NDMA) in beer by salt assisted dispersible liquid-liquid microextraction (SADLLME) combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** A 30 mL beer was put into a 50 mL centrifuge tube and 50 μL NDMA-d6 methanol solution with concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3 g sodium sulfate was added. After dissolution with manual vibrating, 600 μL dichloromethane was quickly injected to forming cloudy solution; then after shaking (1 min) and

基金项目: 北京农学院“内涵发展定额——大学生科研训练”项目

Fund: Supported by “Connotative Development Quota- Scientific Research Training for college students”Project of Beijing University of Agriculture
[#]刘珊与吴天侯为共同第一作者。

[#]LIU Shan and WU Tian-Yu are Co-first Authors.

*通讯作者: 王宗义, 博士, 副教授, 研究生导师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: wangzongyi001@sina.com

*Corresponding author: WANG Zong-Yi, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China. E-mail: wangzongyi001@sina.com

centrifugation, the bottom organic phase of sample solution was used for the determination by GC-MS/MS. **Results** This method was good linear in the concentration range of 1–100 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficient was greater than 0.998. The recoveries were 97.7%–104.8% and the relative standards deviations were 4.07%–8.46%. The limit of detection (LOD) was 0.03 $\mu\text{g/L}$ and the limit of quantitation was 0.10 $\mu\text{g/L}$. The actual sample tests showed that NDMA was detected in all beer samples but the content was far below the international limited of 5 $\mu\text{g/L}$, which was within the safe level. **Conclusion** This method is simple and fast, low cost, low detection limit and high accuracy, which can meet the need of detection of NDMA in beer.

KEY WORDS: salt assisted dispersing liquid-liquid microextraction; gas chromatography-tandem mass spectrometry; N-dimethylnitrosamine; beer

1 引言

N-二甲基亚硝胺(N-dimethylnitrosamine, NDMA)是具有强致癌性的内源性食品污染物之一。我国食品中污染物限量标准对肉制品和水产品的 NDMA 限量分别为 3 $\mu\text{g/kg}$ 和 4 $\mu\text{g/kg}$ ^[1]; 啤酒亦是存在 NDMA 污染的食品之一,但目前国内未做限量规定,而国际上啤酒的 NDMA 限量通常为 5 $\mu\text{g/L}$ ^[2]。由于啤酒中 NDMA 污染主要是在麦芽干燥阶段由其中二甲胺转化而来,通过改进干燥工艺,其污染水平已被有效控制^[3];但 NDMA 仍然是啤酒质量安全的一项重要指标,亦有研究表明啤酒中 NDMA 是导致非洲黑人食道鳞状细胞瘤的病因之一^[4]。因此,研究较为简单的检测方法,仍然具有重要意义。

目前食品中 NDMA 的检测主要依赖色谱-质谱联用法^[5]或色谱-串联质谱联用法^[6,7]完成,而样品前处理技术则是检测方法的难点和关键。关于检测啤酒中 NDMA 的样品处理方法有固相微萃取(solid-phase micro-extraction, SPME)^[8]、单滴微萃取(single-drop microextraction, SDME)^[9]、冷冻熔炼法^[10]、吹扫捕集^[11]和 QuEChERS 技术^[12]等。其中 SPME 的耗材成本较高;吹扫捕集需要专门的设备;SDME 简单,但一次只能处理一个样品,效率较低;冷冻熔炼法和 QuEChERS 法过程亦相对较长。相比较而言,分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)是一种相对更为简单、快速且成本低廉的方法^[13,14],它是将级萃取剂(如四氯化碳或三氯甲烷),在分散剂(如甲醇)的作用下分散到样品水溶液中形成乳浊液,通过扩大了相界面,实现快速富集萃取,经离心分离,萃取剂即可用于检测。但应用 DLLME 检测啤酒中 NDMA 的方法报道较少,这主要是由于 NDMA 分子极性大, DLLME 使用的弱极性萃取剂萃取效果不佳,另一方面啤酒中含有大量乙醇,不利于级萃取剂与样品水溶液形成乳浊液。研究报道,使用二氯甲烷做萃取剂,在高浓度盐的条件下,可与样品水溶液形成乳浊液实现对极性相对较大的目标物进行有效的 DLLME,即盐辅助液液微萃取(salt assisted dispersing liquid-liquid microextraction, SADLLME)^[15,16],

使用 SADLLME 检测啤酒中 NDMA 的方法研究也较少。

本研究通过优化 SADLLME 方法结合气相色谱-串联质谱(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)快速检测啤酒中 NDMA,以 NDMA-d6 为内标,建立了一种样品处理简单,方法灵敏可靠,用于定性、定量啤酒中 NDMA 的新方法,为快速测定啤酒样品中的 NDMA 提供了有效手段。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 7890B7000C 气相色谱-串联质谱联用仪(美国 Agilent Technologies 公司);Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

硫酸钠、碳酸钠、硝酸钠、磷酸二氢钠和氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);二氯甲烷(色谱纯,美国 J.T.Baker 公司);N-亚硝基二甲胺(NDMA)甲醇标准溶液(2000 mg/L, 1 mL, 美国 O2si 公司);NDMA-d6 甲醇标准溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$, 1 mL, 美国 Accustandard Inc 公司)。

啤酒为市售样品。

2.2 方法

2.2.1 标准溶液配制

将盛标样的玻璃安瓿瓶,于室温竖直放置 10 min,使上部溶液充分下流,用锉刀于瓶颈处锉拉几次,并于锉痕处向外折断瓶颈,用移液枪转移标样溶液至 10 mL 容量瓶中,再用二氯甲烷洗涤标样瓶 3~4 次,合并洗涤液于容量瓶中,并稀释至刻度。按此分别获得 NDMA 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 、NDMA-d6 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液和内标储备液,转移至棕色贮液瓶中-18 $^{\circ}\text{C}$ 储存。用甲醇稀释标准储备液和内标储备液,获得浓度分别为 1、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 NDMA 标准中间工作液和浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 NDMA-d6 内标溶液。用二氯甲烷稀释混合标准中间工作液和内标溶液,获得 NDMA-d6 浓度为 50 ng/mL, NDMA 浓度分别为 1、5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 系列混合工作液。

2.2.2 样品前处理

取 30 mL 啤酒于 50 mL 离心管中, 加入无水硫酸钠 3 g, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 NDMA-d6 内标溶液 50 μL , 旋紧盖子, 手动振荡, 溶解混匀。注射器猛力注入 600 μL 的二氯甲烷, 形成乳浊液, 手动振荡 1 min, 于离心机 8000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 移取 100 μL 下层二氯甲烷于装有 200 μL 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 5、20、50 $\mu\text{g/L}$, 每个加标水平重复 8 次。

参数优化实验, 使用加标浓度为 30 $\mu\text{g/L}$ 的啤酒, 分别试验不同辅助用盐、盐用量和萃取剂用量的影响, 其他条件不变。

2.2.3 色谱条件

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

2.2.4 质谱条件

电子轰击电离源(EI); 电离能量: 70 eV; 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 采集模式: 多重反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 参数见表 1; 溶剂延迟: 5 min。

2.2.5 定性、定量分析

定性、定量分析使用 MassHunter B.07.01 软件完成。

即通过对目标物保留时间、母离子及 2 个二级离子响应比值与标样相应参数进行对照进行定性分析; 以 NDMA 和 NDMA-d6 定量碎片离子的响应比与浓度比建立校正曲线, 进行定量。

3 结果与分析

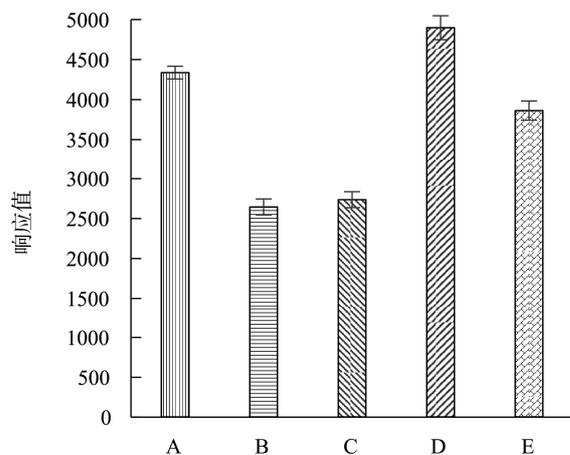
3.1 样品前处理

由于二氯甲烷水中溶解度相对较大, 而啤酒中的乙醇会进一步增大二氯甲烷的溶解度, 使得少量二氯甲烷与啤酒混合后不能形成乳浊液和通过离心进行分离, 进行 DLLME; 但在高浓度盐存在下, 可实现 SADLLME^[15,16]。本实验表明, 乙醇含量为 10%~15% 的啤酒试样不影响 SADLLME 的进行。为进一步优化 SADLLME 参数, 实验比较了同物质的量浓度(按啤酒-硫酸钠体积质量比为 10:1 时计算)的 3 种中性盐(硫酸钠、硝酸钠和氯化钠)、一种碱性盐(碳酸钠)和一种酸性盐(磷酸二氢钠)的作用效果。结果如图 1 所示, 硫酸钠的效果最好(NDMA 加入浓度为 30 ng/mL), 因此本实验以硫酸钠为辅助用盐。实验进一步对硫酸钠用量进行了优化, 结果如图 2 所示, 在本实验啤酒试样用量的条件下(30 mL), 硫酸钠为 1~6 g 时 NDMA 响应有逐步升高的趋势; 但硫酸钠用量超过 6 g 时, 有结晶析出, 不利于少量二氯甲烷的分离取出。由于方法灵敏度已足够, 为进一步简化操作, 硫酸钠用量为 3 g, 此时, 通过手动摇动硫酸钠即可溶解, 避免用量过大需要长时间超声处理。

表 1 NDMA 和 NDMA-d6 的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of NDMA and NDMA-d6

N-亚硝胺	保留时间/min	前级离子(m/z)	碎片离子(m/z)	碰撞能/eV
NDMA	7.858	74	42, 44*	20,5
NDMA-d6	7.853	80	46, 50*	15,5

注: *定量碎片离子。



注: A.Na₂CO₃; B.NaNO₃; C.NaH₂PO₄; D.Na₂SO₄; E.NaCl。

图 1 同物质的量浓度盐对萃取效果的影响($n=3$)

Fig.1 Effect of the same substance concentration salt on the extraction effect($n=3$)

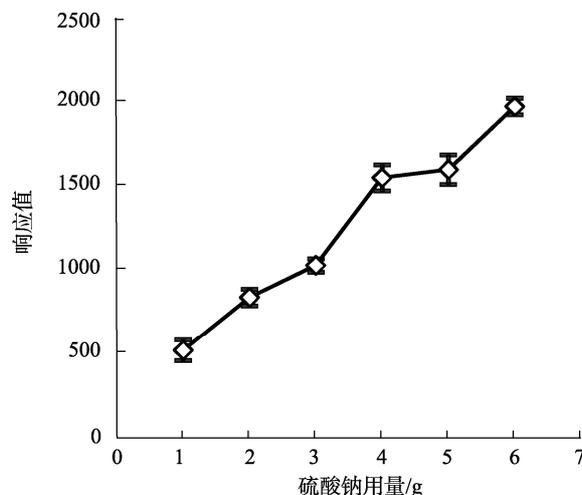


图 2 硫酸钠用量对 NDMA 萃取效果的影响($n=3$)

Fig.2 Effect of sodium sulfate dosages on NDMAE extraction efficiency ($n=3$)

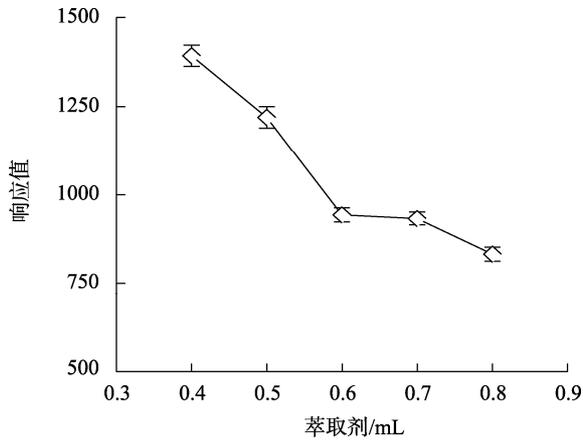


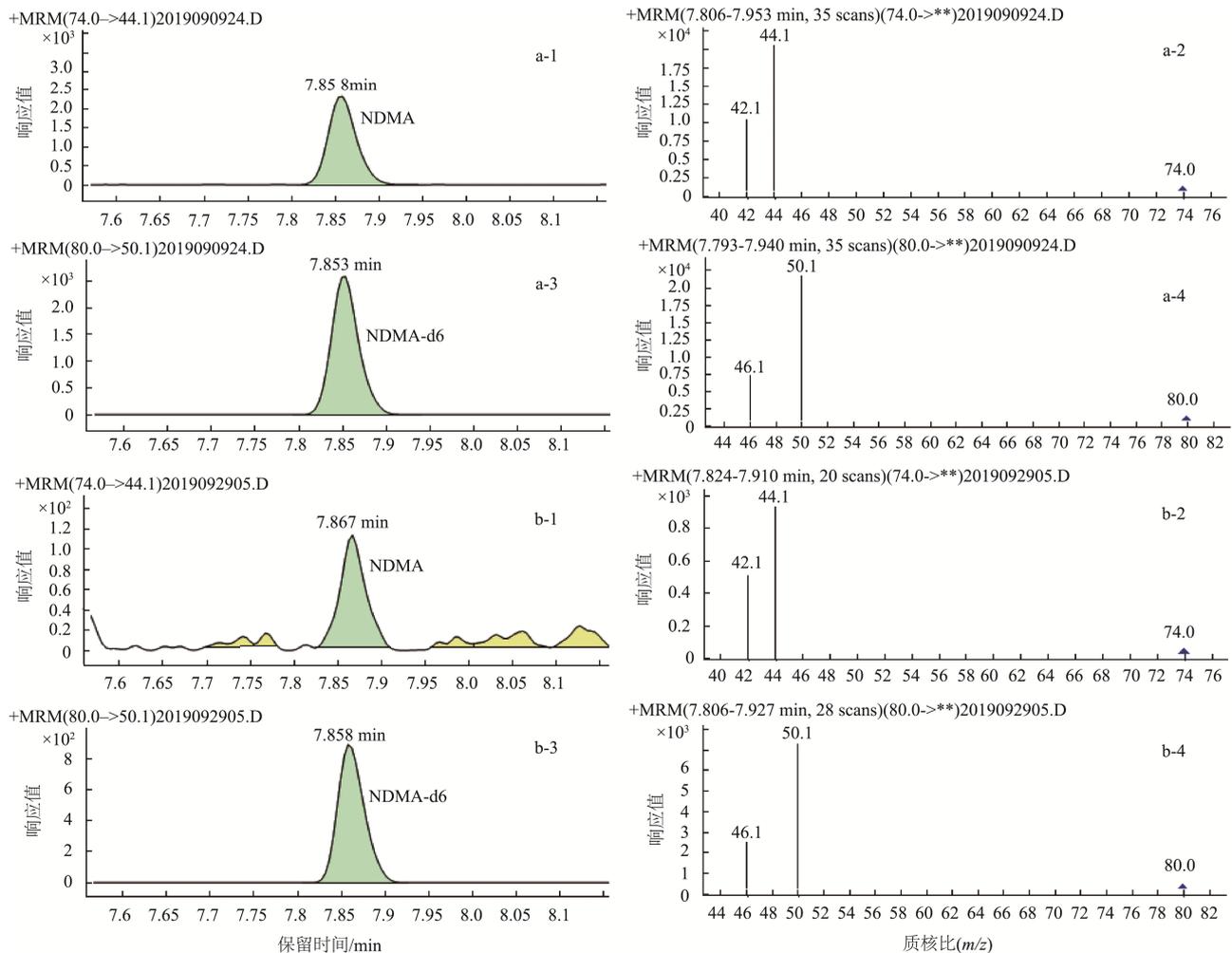
图 3 萃取剂体积对 NDMA 萃取效果的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of extractant volume on the NDMA extraction efficiency ($n=3$)

实验进一步在 2.2.2 的条件下,考察了萃取剂体积的影响,结果如图 3 所示,二氯甲烷体积在 400~800 μL 时,NDMA 响应呈下降趋势。当二氯甲烷用量低于 400 μL 离心后体过小,不便于取出,也不能满足自动进样分析时,样品瓶(带 200 μL 内插管)中液位高度的要求;体积过大,不利乳浊液的形成;当萃取剂用量为 600 μL 时,下层有机相相对较多且透亮,也较方便取出,亦能保证相当较高检测灵敏度,故本实验确定萃取剂二氯甲烷用量为 600 μL 。

3.2 色谱分离与质谱检测

NDMA 分子极性较大,使用极性的 DB-WAXUI 柱能够获得较好的分离;实验结果表明啤酒样品经 SADLLME 处理,在本实验的检测条件下无干扰。一标样和实际样品的 MRM 色谱图和质谱,见图 4。



注: a-1~a-4: 浓度为 25 ng/mL 的 NDMA 标样(NDMA-d6 为 50 ng/mL); b-1~b-4: 啤酒样品(30 mL 啤酒样品 NDMA-d6 加入量为 50 ng)。

图 4 典型 MRM 色谱图

Fig.4 Typical MRM chromatograms

3.3 方法学考察

3.3.1 线性、检出限和定量限

对考察浓度为 1~100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液直接进样分析, 以 NDMA 与 NDMA-d6 的响应比对浓度比建立标准曲线, 得 $Y=0.934914X-0.024619$ (Y 为响应比, X 为浓度比), $r^2=0.9985$, 线性良好。通过对实际样品进行分析, 在本实验确定的试样用量体积和处理条件下, 分别按 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算试样中 NDMA 检出限和定量限, 检出限为 0.03 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g/L}$ 。

3.3.2 准确度与精密度

在 2.2.2 的实验条件下, 进行 3 水平 8 重复的加标回收实验, 结果见表 2, 回收率为 97.7%~104.8%, 相对标准偏差为 4.07%~8.46%。

3.4 实际样品检测

采集市场上 4 个品牌的啤酒, 每品牌随机抽取 4 个样品。每个样品测定 2 次, 检测结果列于表 3, 结果表明啤酒样品中均检出含有 NDMA, 但含量远小于国际限量 5 $\mu\text{g/L}$, 说明 NDMA 的安全风险非常低。

表 2 啤酒中 N-二甲基亚硝胺的准确性与精密度($n=3$)
Table 2 Accuracy and precision of N-dimethylnitrosamine in beer ($n=3$)

添加水平/(ng/30 mL)	加标前空白含量/(ng/30 mL)	加标后含量/(ng/30 mL)	回收率/%	相对标准偏差/%
5		20.4	97.7	5.49
20	15.5	36.5	104.8	8.46
50		66.5	102.0	4.07

表 3 不同品牌啤酒中含 N-二甲基亚硝胺的检测结果
Table 3 Analytical results of N-dimethylnitrosamine in different brands of beer

品牌	含量/ $(\mu\text{g/L})$			
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
品牌 1	0.34	0.60	0.29	0.32
品牌 2	0.26	0.24	0.23	0.21
品牌 3	0.14	0.10	0.11	0.11
品牌 4	0.29	0.25	0.29	0.31

4 结 论

在硫酸钠做辅助用盐的条件下, 不用辅助溶剂, 少量二氯甲烷可与啤酒试样形成乳浊液进行 SADLLME, 实现对 NDMA 的有效富集和萃取, 再结合 GC-MS/MS 的高选择、高灵敏特点建立了啤酒中 NDMA 检测的新方法。该方法具有样品处理简便、快速、成本低廉, 方法检出限极低, 准确度高, 可满足啤酒中 NDMA 检测的需要。

参考文献

- [1] GB 2762-2017 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S]. GB 2762-2017 National food safety standard-Limits of contaminants in food [S].
- [2] FDA [EB/OL]. [2020-04-13]. <http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-detrimental-substances-human-food-and-animal-feed#dime>.
- [3] 刘士勋, 丁家华. 啤酒中的亚硝胺[J]. 食品科学, 1981, 7: 46-47. Liu SL, Ding JH. Nitrosamines in beer [J]. Food Sci, 1981, 7: 46-47.
- [4] Pillay V, Isaacson C, Mothobi P, et al. Carcinogenic nitrosamines in

traditional beer as the cause of oesophageal squamous cell carcinoma in black South Africans [J]. S Afr Med J, 2015, 105(8): 656-658.

- [5] 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 [S]. GB 5009.26-2016 National food safety standard-Determination of N-nitrosamines in food [S].
- [6] 朱萌萌, 叶群, 周婷婷, 等. 气相色谱-串联质谱法测定肉制品中 10 种挥发性 N-亚硝胺类化合物[J]. 色谱, 2019, 37(2): 207-215. Zhu MM, Ye Q, Zhou TT, et al. Determination of 10 volatile N-nitrosamines in meat products by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(2): 207-215.
- [7] Wang ZY, Zhai MM, 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 Method, 2018, 11(3): 933-938.
- [8] Fan CC, Lin TF. N-nitrosamines in drinking water and beer: Detection and risk assessment [J]. Chemosphere, 2018, 200: 48-56.
- [9] 张桃芝, 陶燕飞, 黄红林, 等. SDE-GC 联用分析啤酒中 N-亚硝胺[J]. 分析实验室, 2004, 23(7): 54-56. Zhang TZ, Tao YF, Huang HL, et al. Determination of N-nitrosamines in beer samples by single drop-extraction gas-chromatography [J]. China J

- Anal Lab, 2004, 23(7): 54–56.
- [10] 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 XR, 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.
- [11] 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): 1789–1793.
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): 1789–1793.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Ramezani H, Hosseini H, Kamankesh M, *et al.* Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Eur Food Res Technol, 2015, 240(2): 441–450.
- [15] 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.
- [16] 王雅楠, 郭欣然, 王宗义, 等. 盐辅助分散液液微萃取-气相色谱-串联质谱法检测葡萄酒中的氨基甲酸乙酯[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1364–1368.
Wang YN, Guo XR, Wang ZY, *et al.* Determination of ethyl carbamate in wine by salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction –gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1364–1368.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

刘 珊, 主要研究方向为食品检验。
E-mail: 1549424280@qq.com

吴天侯, 主要研究方向为食品检验。
E-mail: wutianyu0918@163.com

王宗义, 博士, 副教授, 研究生导师,
主要研究方向为食品检验。
E-mail: wangzongyi001@sina.com