

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240418002

低共熔溶剂-超高效液相色谱-大气压化学离子化-串联质谱法测定火腿肠中9种N-亚硝胺

郑鸿涛¹, 谢国丹¹, 谭贵良^{2*}, 刘子雄¹, 董海¹, 柯坚灿¹

(1. 中山市食品药品检验所, 中山 528437; 2. 电子科技大学中山学院, 中山 528402)

摘要: **目的** 建立低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES)-超高效液相色谱-大气压化学离子化-串联质谱法快速测定火腿肠中9种N-亚硝胺污染物的分析方法。**方法** 样品经水稀释, 微量DES分散萃取, 50%甲醇水复溶, Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC-C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 2.7 μm)色谱柱分离, 大气压化学电离源电离, 多反应监测模式检测, 内标法定量分析。**结果** 9种N-亚硝胺在5.0~60.0 ng/mL范围内线性关系良好, 线性相关系数(*r*)均大于0.999。方法检出限为0.1~0.3 μg/kg, 定量限为0.3~1.0 μg/kg, 回收率为72.1%~111.6%, 相对标准偏差为0.9%~8.4%。**结论** 低共熔溶剂对N-亚硝胺的萃取效果佳, 可以解决传统操作步骤烦琐的问题。本方法有机试剂用量少、绿色环保, 适用于火腿肠中9种N-亚硝胺的快速、精准检测。

关键词: 低共熔溶剂; N-亚硝胺; 绿色提取; 超高效液相色谱-大气压化学离子化-串联质谱法; 火腿肠

Determination of 9 kinds of N-nitrosamines in ham sausage by deep eutectic solvents-ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry

ZHENG Hong-Tao¹, XIE Guo-Dan¹, TAN Gui-Liang^{2*}, LIU Zi-Xiong¹,
DONG Hai¹, KE Jian-Can¹

(1. Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528437, China;
2. Zhongshan Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan 528402, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for determination of 9 kinds of N-nitrosamines in ham sausage by ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry with deep eutectic solvent (DES). **Methods** The samples were initially dissolved in water, then extracted using microscale DES, subsequently re-dissolved in 50% methanol-water before separation by Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC-C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 2.7 μm) column, and atmospheric pressure chemical ionization source ionization-multiple reaction monitoring -positive ion mode detection. Internal standard method was used for quantitative analysis. **Results** The linear relationships of 9 kinds of N-nitrosamines of 5.0–60.0 ng/mL were good. The correlation coefficients (*r*) of the 9 kinds of N-nitrosamines above 0.999, the limits of detection were 0.1–0.3

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2020A1515011308)、中山市社会公益与基础研究项目(2020B2033、2021B2061)

Fund: Supported by the Guangdong Natural Science Foundation (2020A1515011308), and the Zhongshan Social Public Welfare and Basic Research Project (2020B2033, 2021B2061)

*通信作者: 谭贵良, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: joe88tan@126.com

*Corresponding author: TAN Gui-Liang, Ph.D, Professor, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan Institute, Zhongshan 528402, China. E-mail: joe88tan@126.com

$\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantification were 0.3–1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recovery rates were 72.1%–111.6% and relative standard deviations of 0.9%–8.4%. **Conclusion** DES has a good extraction effect of N-nitrosamines, which can solve the problem of complicated traditional operation steps. The method is environmentally friendly and requires a small amount of organic reagents. It is suitable for the rapid and accurate detection of 9 N-nitrosamines in ham sausage.

KEY WORDS: deep eutectic solvent; N-nitrosamines; green extraction; ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry; ham sausage

0 引言

火腿肠在生产加工过程中,因亚硝酸盐和硝酸盐具有抑制肉毒梭菌产生肉毒毒素,赋予其特有的色泽、质地和风味,具有增色防腐作用而被广泛应用,但在一定条件下,亚硝酸盐易与肉制品中的胺类物质发生反应,产生亚硝胺。亚硝胺是国际上公认的一类强致癌物,是肉制品中危害性较高的污染物,具有极强的基因毒性,易导致急性或慢性中毒及致癌效应^[1-2]。GB 2762—2022《食品安全国家标准 食品中污染物限量》已对 N-二甲基亚硝胺限量做出了严格规定,最高限量为:肉及肉制品 $\leq 3.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,水产动物及其制品 $\leq 4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前, N-亚硝胺的分析方法主要有气相色谱法^[3]、液相色谱法^[4]、气相色谱-质谱法^[5]、气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)和超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)等^[6-8]。其中 GC-MS/MS 和 UPLC-MS/MS 具有优异的信噪比和选择性,近年来获得了较多应用。由于火腿肠富含蛋白质、脂肪等大分子物质,基质复杂,且污染物含量相对较低,通常为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级,要实现对其有效分析,样品前处理是关键因素。国家现行的亚硝胺类污染物检测方法为 GB 5009.26—2023《食品安全国家标准 食品中 N-亚硝胺类化合物的测定》,前处理采用水蒸气蒸馏提取-液液萃取净化-KD 浓缩器浓缩或旋转蒸发-氮吹浓缩的步骤,方法虽然具有适应性广和基质效应小等优点,但存在样品前处理过程烦琐,操作耗时费力,难以实现高通量处理,且需用到二氯甲烷等大量传统有机溶剂,环境污染大,实际可操作性不强,因此开发适宜的样品前处理新技术来提升工作效率和降低对分析工作者的健康危害及环境污染尤为重要。

低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES)是由一定化学计量比的氢键受体(如季铵盐)和氢键供体(如羧酸、醇、胺类和糖等)组合成的低共熔混合物,具有传统有机溶剂使用量少、萃取效率高、环境友好等特点,可作为不同物质的萃取溶剂^[9-10]。目前已有专家学者在食品合成着色剂^[11-12]、非法添加物^[13-14]、抗氧化剂^[15-16]、农兽药残留^[17-19]、重金属^[20-21]等检测领域展开研究;在环境分析^[22-24]、生物样品分析^[25]

和天然产物分析^[26-28]等方面也有相关应用报道,但对食品中亚硝胺类污染物的分析鲜未见报道。本研究拟采用氯化胆碱为氢键受体和苯酚为氢键供体合成 DES 作为萃取剂,结合超高效液相色谱-大气压化学离子化-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry, UPLC-APCI-MS/MS)建立测定火腿肠中 9 种亚硝胺化合物的方法,为拓宽熟肉制品中 N-亚硝胺类污染物的绿色提取和快速检测提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

火腿肠(市售);肉灌肠中 N-二甲基亚硝胺质控样(北京北方伟业计量技术研究院);甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司);氯化胆碱、苯酚、乙二醇、丙三醇、1,4-丁二醇(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);N-二甲基亚硝胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA, 纯度 99.8%)、N-亚硝基甲基乙胺(N-nitrosoethylmethylamine, NMEA, 纯度 97.6%)、N-亚硝基吡咯烷(N-nitrosopyrrolidine, NPYR, 纯度 99.4%)、N-二乙基亚硝胺(N-nitrosodiethylamine, NDEA, 纯度 99.9%)、N-亚硝基哌啶(N-nitrosopiperidine, NPYP, 纯度 96.2%)、N-亚硝基二异丙胺(N-nitrosodiisopropylamine, NDIPA, 纯度 99.8%)、N-亚硝基二丙胺(N-nitrosodipropylamine, NDPA, 纯度 100.0%)、N-二丁基亚硝胺(N-nitrosodibutylamine, NDBA, 纯度 99.9%)、N-亚硝基二苄胺(N-nitrosodibenzylamine, NDBzA, 纯度 99.8%)、NDMA-D₆ 甲醇溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、NDPA-D₁₄ 甲醇溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(美国 O2Si 公司)。

1.2 仪器与设备

1290/6460C 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪[带 Jet Stream 电喷雾离子源、大气压化学电离离子源、Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μm)](美国 Agilent 公司);3-18K 冷冻离心机(德国 Sigma 公司);S300 超声波清洗仪(德国 Elma 公司);MS3 digital 数显型涡旋混匀器(德国 IKA 公司);AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪(睿科股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别准确称取 9 种 N-亚硝胺标准品各 25 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成 1.0 mg/mL 混合标准储备液; 将内标 NDMA-D₆、NDPA-D₁₄ 用甲醇稀释配制成 1.0 mg/mL 内标混合液。

将亚硝胺混合标准储备液用初始流动相进一步稀释成质量浓度为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 ng/mL 的系列混合标准溶液; 将 NDMA-D₆、NDPA-D₁₄ 用初始流动相稀释成质量浓度为 1000 ng/mL 内标使用液。

1.3.2 DES 的制备

本研究以氯化胆碱为氢键受体, 乙二醇、丙三醇、1,4-丁二醇、苯酚为氢键供体, 按一定化学计量比称取于鸡心瓶中, 置于旋转蒸发器中, 并按表 1 的合成温度, 常压下, 水浴旋转搅拌至澄清透明的均一液体, 自然冷却至室温后备用。

1.3.3 样品前处理

准确称取 5.00 g 用组织捣碎机粉碎成肉糜状试样于 50 mL 离心管中, 加入 50 μ L 内标混合液、5 mL 纯水、150 μ L DES、10 mL 正己烷饱和的乙腈、1 g 氯化钠、以 3000 r/min 涡旋 2 min、超声 8 min、12000 r/min 离心 8 min 后, 取 5 mL 上清液于平行浓缩仪上 45°C 氮吹至近干, 用 50% 甲醇水复溶至 0.5 mL, 过 0.22 μ m 微孔滤膜后, 收集滤液待测。

表 1 低共熔溶剂的合成

Table 1 Deep eutectic solvent synthesis

编号	氢键受体	氢键供体	合成温度/°C	化学计量比
DES-1	氯化胆碱	乙二醇	70	1:2
DES-2	氯化胆碱	丙三醇	70	1:2
DES-3	氯化胆碱	1,4-丁二醇	70	1:2
DES-4	氯化胆碱	苯酚	50	1:2
DES-5	氯化胆碱	苯酚	50	1:3
DES-6	氯化胆碱	苯酚	50	1:4
DES-7	氯化胆碱	苯酚	50	1:5
DES-8	氯化胆碱	苯酚	50	1:6

1.3.4 仪器检测条件

色谱条件: Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱 (2.1 mm×150 mm, 2.7 μ m), 柱温: 35°C; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0.00~1.50 min, 90% A; 1.50~7.00 min, 90%~45% A; 7.00~8.50 min, 45% A; 8.50~10.50 min, 45%~10% A; 10.50~13.50 min, 10% A; 13.50~15.00 min, 10%~90% A; 后运行时间: 4.00 min; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μ L。

质谱条件: 三重四极杆质谱, APCI 离子源, 采用正离子模式, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 干燥气温度: 250°C; 干燥气流量: 6 L/min; 雾化器压力: 50 psi; 毛细管电压: 2400 V; 其他参数见表 2。

表 2 9 种 N-亚硝胺的质谱参数

Table 2 Mass spectrum parameters of 9 kinds of N-nitrosamines

化合物	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	破碎电压/V	碰撞能量/V	碰撞池加速电压/V
NDMA	3.709	75.1	43.2*	34	16	4
			58.2	34	12	4
NMEA	5.924	89.1	61.2*	29	8	4
			43.2	29	12	4
NPYR	5.998	100.9	55.2*	93	16	4
			41.0	93	30	4
NDEA	7.933	103.1	75.1*	73	8	4
			47.3	73	16	4
NPIP	8.461	115.1	69.2*	97	16	4
			41.2	97	24	4
NDIPA	10.712	131.0	43.2*	59	12	4
			89.1	59	4	4
NDPA	11.517	131.0	43.2*	78	12	4
			89.1	78	8	4
NDBA	13.254	159.0	57.2*	104	12	4
			103.1	104	8	4
NDBzA	13.588	227.3	91.1*	64	8	4
			65.1	64	56	4
NDMA-D ₆	3.643	81.1	46.2*	34	16	4
			64.2	34	12	4
NDPA-D ₁₄	11.310	145.3	50.2*	58	12	4
			97.2	58	8	4

注: *为定量离子。

1.4 数据处理

使用安捷伦 Date Acquisition B.08.00、Qualitative Navigator B.08.00 和 Quantitative Analysis B.08.00 工作站软件对 9 种 N-亚硝胺类污染物的定量定性离子进行数据处理, 保留时间和定性离子进行定性, 内标法定量分析; 用 WPS 2019 软件对样品含量、精密度、回收率数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 DES 种类及体积对目标物萃取效果的影响

本研究使用表 1 合成的 8 种 DES, 按照 1.3.3 样品前处理对 9 种 N-亚硝胺进行萃取。实验表明, DES-1、DES-2 萃取效果最差, 几乎萃取不到目标物, DES-3 的萃取效果次之, 而以苯酚为氢键供体合成的 DES-4、DES-5、DES-6、DES-7、DES-8 萃取效果较好, 其中以 DES-4 最好, 所以确定 DES-4 作为本研究萃取剂。考虑到单位体积的低共熔溶剂对目标物的萃取量是有限的, 本研究对 DES-4 的用量进行试验, 以(20、50、100、150、200、300 μL)不同体积的 DES-4 对 9 种目标物的萃取能力进行考察, 向空白基质中加入 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的混合标液, 由图 1 发现, 当 DES 的用量为 150 μL 时, 各目标化合物的响应值与同等浓度标准溶液的响应值最接近, 比率在 75%~99%, 为最佳响应比率, 从误差线也可以反映该组实验稳定性最好, 因此选用 DES-4 用量 150 μL 作为本研究最佳萃取剂体积。

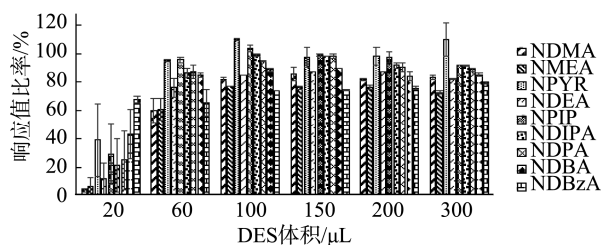


图1 9种N-亚硝胺在不同体积DES萃取溶剂与标准溶液中的响应值比率($n=3$)

Fig.1 Ratio of response values of 9 kinds of N-nitrosamines in different volumes of DES extraction solvent and standard solution ($n=3$)

2.2 超声时间对目标物萃取效果的影响

超声波辅助能够促进油状的 DES 在溶剂中更好地分散形成细小的液滴, 增大比表面积, 从而提高目标物的萃取效果。本研究将超声时间作为重点因素进行考察, 采用 150 μL DES-4 对同一混合标准溶液进行测试, 试样经涡旋 2 min 后, 分别以 0、5、8、10、15、20、25 min 进行超声萃取。结果如图 2 所示, 超声提取 8 min 后, 各目标物基本达到最佳萃取效果, 继续延长也无明显提升效果, 为了兼顾效率, 本研究将超声 8 min 作为最佳超声萃取时间。

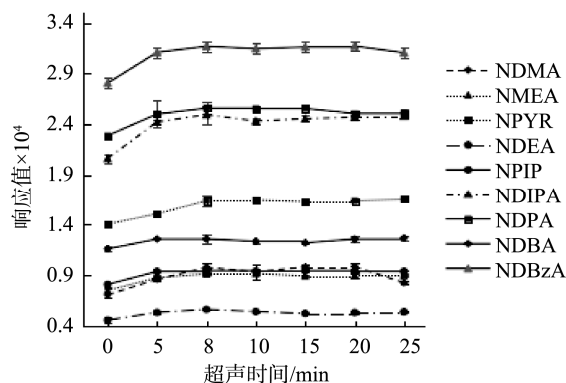


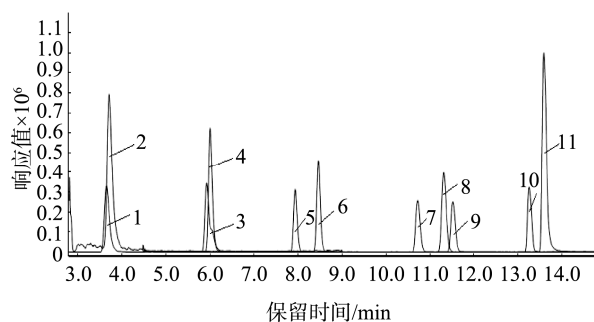
图2 超声时间对目标化合物萃取效果的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of ultrasound time on extraction efficiency of target compounds ($n=3$)

2.3 仪器参数优化

2.3.1 色谱条件的优化

综合比较了 Agilent Infinitylab Poroshell 120 CS- C_{18} (2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μm) 和 Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC- C_{18} (2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μm) 两款色谱柱, 结果发现两者对目标物均有不错的分离效果, 但后者所得的色谱响应略高且色谱峰更为匀称, 因此本研究选择 Agilent Infinitylab Poroshell 120 EC- C_{18} (2.1 mm \times 150 mm, 2.7 μm) 作为分离柱; 同时考察了水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇作为流动相对 9 种目标物的影响。结果表明, 以 0.1%甲酸水-甲醇为流动相时, 9 种目标物均能获得较好的色谱峰形、分离效果和检测灵敏度, 其定量离子提取图如图 3。因此本研究采用 0.1%甲酸水-甲醇作为流动相。



注: 1. NDMA-D₆; 2. NDMA; 3. NMEA; 4. NPYR; 5. NDEA; 6. NPIP; 7. NDIPA; 8. NDPA; 9. NDBA; 10. NDBZA; 11. NDPA-D₁₄。

图3 9种N-亚硝胺化合物的定量离子提取图

Fig.3 Quantitative ion extraction diagram of 9 kinds of N-nitrosamines

2.3.2 质谱条件的优化

由于本研究的 9 种亚硝胺类污染物均属于中等极性 or 强极性化合物, 且分子量相对较小, 离子源中的离子化效率对其测定有着显著影响。本研究以质量浓度为 50 ng/mL 亚硝胺混合标准溶液在相同色谱条件下分别对电喷雾和

APCI 离子源进行比较,在两离子源各自最优的质谱条件下,通过响应强度(峰高)和定量离子信噪比对离子源适用性进行评估。结果表明,各化合物的响应强度和信噪比在 ESI 源电离条件下的响应强度和信噪比都不如 APCI 源,印证了 APCI 源对特定小分子极性化合物适用性和抗干扰性更强^[29],因此本研究选择 APCI 源作为电离源。

2.4 基质效应考察

本研究参考文献[30],通过测定 N-亚硝胺污染物在不含待测目标物火腿肠基质匹配混合标准溶液和试剂混合标准溶液中的峰面积,按照基质效应(matrix effect, ME)公式进行计算,当 ME 为负值时,表示有基质抑制效应,ME 为正值时,表示存在基质增强效应,ME 在± 20%以内表示基质效应不明显。结果如表 3 所示,9 种 N-亚硝胺的 ME 为 -18.5%~2.6%,均表现为基质抑制效应,但都在±20%以内。由此可见,本方法基质效应不明显,无需基质液配制标准曲线,进一步简化实验过程。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系、检出限与定量限

将 1.3.1 亚硝胺混合标准储备液用初始流动相稀释成质量浓度为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 ng/mL 的系列混合标准溶液。采用内标法,以各 N-亚硝胺峰面积与对应内标峰面积的比值绘制校正曲线,其中 NDMA 以 NDMA-D₆ 为内标, NMEA 等其他 8 种 N-亚硝胺以 NDPA-D₁₄ 为内标。结果表明:9 种 N-亚硝胺的线性相关系

数(r)均大于 0.999;向空白样品中添加混合标准溶液,在最佳条件下进行测定,以定量离子信噪比为 3 倍($S/N=3$)和 10 倍($S/N=10$)时的响应定义 9 种 N-亚硝胺的方法检出限和定量限。测得 9 种 N-亚硝胺的检出限为 0.1~0.3 μg/kg,定量限为 0.3~1.0 μg/kg(表 4)。

2.5.2 回收率与相对标准偏差

本研究以火腿肠为代表进行加标实验,向空白火腿肠试样中添加(2.0、5.0、10.0 μg/kg) 3 个水平的 9 种 N-亚硝胺混合标准液,按本研究方法进行分析,每个水平平行测定 6 次。通过加标测试计算各 N-亚硝胺类的回收率以及各浓度水平的相对标准偏差,以此验证方法的准确度和精密度,由表 4 可见,本研究开发的方法,具有较高的精密度和准确度,线性关系良好,并获得与现行标准方法相当的检出限。

2.5.3 实际样品检测

为验证开发方法的适用性,对 12 批市售火腿肠和 1 批肉灌肠中 NDMA 质控样进行检测。结果有 1 批检出 NDMA,含量为 0.6 μg/kg;2 批检出 NDBA,含量分别为 1.1、0.5 μg/kg,结果与标准方法无明显差异;其余样品均未检出;质控样 NDMA 测得结果为 15.4 μg/kg,实验数据落在特性值(11.7~16.9 μg/kg)区间范围内,结果为满意。

2.5.4 与传统方法的对比

将本研究开发的方法与 GB 5009.26—2023 进行比较。由表 5 可发现,本方法具有耗时更短、传统有机试剂消耗量少、可测目标物数量更多等特点,大大降低了实验成本以及对环境污染,且能实现批量化处理。

表 3 ME 考察表(%)
Table 3 ME review table (%)

基质效应	NDMA	NMEA	NPYR	NDEA	NPIP	NDIPA	NDPA	NDBA	NDBzA
火腿肠	-13.6	-6.4	-13.1	-2.6	-16.2	-7.0	-8.3	-17.6	-18.5

注:基质效应 ME/%=(基质匹配标准溶液峰面积/试剂标准溶液峰面积-1)×100%。

表 4 9 种 N-亚硝胺的线性关系、线性范围、检出限、定量限、回收率及相对标准偏差($n=6$)

Table 4 Linear relationship, linear ranges, limits of detection, limits of quantitation, recovery rates and relative standard deviations of 9 kinds of N-nitrosamines ($n=6$)

化合物	线性 相关系数 (r)	线性范围 (ng/mL)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)	加标水平/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
NDMA	0.9996	5.0~60.0	0.3	1.0	2.0, 5.0, 10.0	106.7 102.3 102.8	8.4 5.5 5.4
NMEA	0.9996	5.0~60.0	0.1	0.3	2.0, 5.0, 10.0	76.3 74.2 78.3	4.0 1.1 3.9
NPYR	0.9994	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	87.4 108.1 111.6	7.9 6.1 3.7
NDEA	0.9996	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	87.4 81.0 86.7	5.8 2.8 8.0
NPIP	0.9998	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	102.8 103.6 106.3	7.5 5.1 2.4
NDIPA	0.9990	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	87.6 93.9 96.7	3.2 1.7 2.3
NDPA	0.9994	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	94.1 97.9 98.0	5.2 2.1 2.3
NDBA	0.9998	5.0~60.0	0.1	0.3	2.0, 5.0, 10.0	74.1 72.1 74.2	3.0 0.9 3.3
NDBzA	0.9998	5.0~60.0	0.2	0.5	2.0, 5.0, 10.0	72.7 72.4 74.6	2.1 0.9 2.9

表 5 本方法与标准方法的比较
Table 5 Comparison between the method in this paper and the standard method

检测方法	样品量/g	前处理时间/min	萃取试剂用量	分析物数量/种	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	环境污染
GB 5009.26—2023	20	120	氯化钠 65 g 无水硫酸钠 10 g 二氯甲烷 170 mL	1	0.3	大
本方法	5	45	氯化钠 1 g 乙腈 10 mL DES 0.15 mL	9	0.1~0.3	小

3 结论

本研究利用氯化胆碱-苯酚合成的 DES 为萃取剂, 乙腈为分散剂, 辅以涡旋超声萃取, 使用基于 APCI 源的 UPLC-MS/MS 技术建立火腿肠中 9 种 N-亚硝胺污染物的痕量分析方法。研究采用合成简单、低毒、可生物降解的 DES 作为萃取溶剂, 代替传统有机溶剂对火腿肠中 N-亚硝胺类污染物进行提取, 克服了传统有机溶剂毒性大、挥发性强、污染大等缺点。整个预处理过程影响因素少, 经方法学验证, 该方法检出限、回收率、准确度及精密度均能满足污染物残留分析要求。本方法操作简单、灵敏度高、稳定性好, 工作效率较 GB 5009.26—2023 有明显的提升, 适用于火腿肠中 9 种 N-亚硝胺污染物的同时测定。DES 的合成组分繁多, 本研究未能一一展开研究, 后续仍可尝试更多氢键受体和氢键供体组合来制备 DES, 寻求更佳实验方案。

参考文献

- [1] GULSUM D, ACAR NT. N-nitrosamines: A potential hazard in processed meat products [J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 104(5): 2551–2560.
- [2] 田冶, 陶晓莎, 冯媛媛, 等. 化学药品中的遗传毒性杂质的质量控制[J]. *中国抗生素杂志*, 2024, 49(1): 13–25.
TIAN Y, TAO XS, FENG YY, *et al.* Quality control of genotoxicity impurities in chemicals [J]. *Chin J Antibiot*, 2024, 49(1): 13–25.
- [3] 马兴, 肖亚兵, 陈颖, 等. 快速水蒸气蒸馏-气相色谱热分析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.
- [4] DING ZQ, CAI MD, GAN WM, *et al.* Studies on a novel method for the determination of nitrosamines in food by HPLC-UV-FLD coupling with terbium-doped carbon dots [J]. *Food Chem*, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134894
- [5] 苏广宁, 钟秀华, 邓靖, 等. 固相萃取 GC-MS 测定饮用水中 8 种亚硝胺化合物[J]. *环境卫生学杂志*, 2022, 12(1): 64–69.
SU GN, ZHONG XH, DENG J, *et al.* Determination of 8 nitrosamine compounds in drinking water by SPE-GC-MS [J]. *J Environ Hyg*, 2022, 12(1): 64–69.
- [6] 陈丽香, 陈嘉敏, 陈燕敏, 等. QuEChERS-气相色谱-三重四极杆串联质谱法测定水产干制品中 9 种 N-亚硝胺类化合物[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 295–301, 257.
CHEN LX, CHEN JM, CHEN YM, *et al.* Determination of nine N-nitrosamines in dried aquatic products by QuEChERS gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(8): 295–301, 257.
- [7] 吴香伦, 周华, 黄琴, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定饮用水中亚硝胺[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(4): 406–410, 414.
WU XL, ZHOU H, HUANG Q, *et al.* Rapid determination of nitrosamines in drinking water by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Heal Lab Technol*, 2022, 32(4): 406–410, 414.
- [8] 李登昆, 张云, 赵士权, 等. 固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定牛奶中 9 种 N-亚硝胺的含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2021, 57(6): 487–492.
LI DK, ZHANG Y, ZHAO SQ, *et al.* Determination of 9 N-nitrosamines in milk by gas chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2021, 57(6): 487–492.
- [9] ABBOTT AP, CAPPER G, DAVIES DL, *et al.* Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem Commun*, 2003, 9(1): 70–71.
- [10] 郑鸿涛, 柯坚灿, 刘子雄, 等. 低共熔溶剂在食品分析中的应用[J]. *现代食品*, 2022, 28(24): 52–56.
ZHENG HT, KE JC, LIU ZX, *et al.* Application of deep eutectic solvents in food analysis [J]. *Mod Food*, 2022, 28(24): 52–56.
- [11] ZHU SQ, ZHOU J, JIA HF, *et al.* Liquid-liquid microextraction of synthetic pigments in beverages using a hydrophobic deep eutectic solvent [J]. *Food Chem*, 2018, 243: 351–356.
- [12] 周佳, 禹洁, 朱书强, 等. 饮料及配制酒中 11 种有机合成色素的低共熔溶剂萃取/高效液相色谱法测定[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(11): 1358–1363.
ZHOU J, YU J, ZHU SQ, *et al.* Determination of 11 organic synthetic pigments in drink and compound wine by deep eutectic solvent extraction/high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(11): 1358–1363.
- [13] 袁琳, 单志卓, 桂旖淳, 等. 新型低共熔溶剂-液微萃取技术检测食品中的苏丹红类色素[J]. *化学试剂*, 2022, 44(11): 1670–1675.
YUAN L, SHAN ZZ, GUI YC, *et al.* Deep eutectic solvent assisted liquid-liquid microextraction of susan dyes from food samples [J]. *Chem Reag* 2022, 44(11): 1670–1675.
- [14] 周佳, 刘子溱, 王丽君, 等. 低共熔溶剂-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定肉制品、水产品中 3 种非法添加工业染料[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1538–1544.
ZHOU J, LIU ZZ, WANG LJ, *et al.* Determination of 3 kinds of illegally

- added industrial dyes in meat and aquatic products by hydrophobicity deep eutectic solvent-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(5): 1538–1544.
- [15] 张康迪, 刘伟. 基于低共熔溶剂的液相微萃取-高效液相色谱法测定大豆油中的 TBHQ[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(5): 32–36.
- ZHANG KD, LIU W. Deep eutectic solvent based solvent microextraction-HPLC method for determination of TBHQ in soybean oil [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2017, 38(5): 32–36.
- [16] JIAO PF, HE XM, MA SH, *et al.* Ultrasonic-assisted extraction of antioxidants from *Perilla frutescens* leaves based on tailor-made deep eutectic solvents: Optimization and antioxidant activity [J]. *Molecules*, 2023. DOI: 10.3390/molecules28227554
- [17] 郑书展, 任彩霞, 张春艳, 等. 基于低共熔溶剂的分散液液微萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定马肉中非甾体抗炎药[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(5): 760–766.
- ZHENG SZ, REN CX, ZHANG CY, *et al.* Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in horse meat by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with deep eutectic solvent based on dispersive liquid-liquid microextraction [J]. *J Instrum Anal*, 2021, 40(5): 760–766.
- [18] 张鑫鑫, 杨燕强, 康杰, 等. 低共熔溶剂固相萃取-高效液相色谱法同时测定粮谷中 7 种农药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(13): 4117–4124.
- ZHANG XX, YANG YQ, KANG J, *et al.* Simultaneous determination of 7 kinds of pesticide residues in cereal grain by deep eutectic solvents solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(13): 4117–4124.
- [19] 王华威, 陈文辉, 陈升凡, 等. 基于低共熔溶剂的分散液液微萃取法测定茶饮料中 68 种农药残留[J]. *核农学报*, 2024, 38(3): 522–531.
- WANG HW, CHEN WH, CHEN SF, *et al.* Determination of 68 pesticide residues in tea beverages by dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent journal of nuclear agricultural sciences [J]. *Acta Agric Nucl Sin*, 2024, 38(3): 522–531.
- [20] MAHBOUBE S, SAEED H, ALI A. Centrifuge-less deep eutectic solvent based magnetic nanofluid-linked air-agitated liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for simultaneous determination of cadmium, lead, copper, and arsenic in food samples and non-alcoholic beverages [J]. *Food Chem*, 2018, 281: 304–311.
- [21] PEGAH F, REZA MMA, ALI MF, *et al.* Development of salt-induced homogenous liquid-liquid extraction based on ternary deep eutectic solvent coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of heavy metals in honey [J]. *J Food Compos Anal*, 2023. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.105107
- [22] LI ZQ, LIU Q, LU XX, *et al.* Deep eutectic solvents with low viscosity for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction [J]. *Microchemical J*, 2024, 198: 110086.
- [23] LIU YJ, XU W, ZHANG H, *et al.* Hydrophobic deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous enantiomeric analysis of five β -agonists in the environmental samples [J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(21): 2828–2836.
- [24] DI X, ZHAO XJ, GUO XL. Hydrophobic deep eutectic solvent as a green extractant for high-performance liquid chromatographic determination of tetracyclines in water samples [J]. *J Sep Sci*, 2020 43(15): 3129–3135.
- [25] AMON T, YUTHAPONG U, GARETH MR, *et al.* Speciation of mercury in water and biological samples by eco-friendly ultrasound-assisted deep eutectic solvent based on liquid phase microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry [J]. *Talanta*, 2019, 197: 310–318.
- [26] 吴均, 吴俊葶, 杨碧文, 等. 超声-酶辅助低共熔溶剂提取桑叶总黄酮的工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(3): 31–39.
- WU J, WU JT, YANG BW, *et al.* Optimization of ultrasonic-enzyme-assisted deep eutectic solvents extraction process of total flavonoids from mulberry leaves and its antioxidant activity [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2024, 45(3): 31–39.
- [27] 付佳乐, 耿直, 陈革豫. 微波辅助低共熔溶剂提取葡萄果渣中原花青素及其稳定性研究[J]. *湖北农业科学*, 2023, 62(12): 145–150.
- FU JL, GENG Z, CHEN GY. Study on the microwave-assisted extraction of procyanidins from grape fruit residue with low eutectic solvent and its stability [J]. *J Hubei Agric Sci*, 2023, 62(12): 145–150.
- [28] 张媛媛, 宋萌萌, 张彬, 等. 低共熔溶剂法提取枣渣中黄酮类物质[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(8): 2658–2664.
- ZHANG YY, SONG MM, ZHANG B, *et al.* Extraction of flavonoids from jujube residue by deep eutectic solvent method [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(8): 2658–2664.
- [29] HERRMANN SS, DDUEDAHL-OLESEN L, GRANBY K. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1330: 20–29.
- [30] 吴少明, 黄永辉, 陈言凯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法直接测定啤酒中 20 种游离氨基酸含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(5): 1545–1553.
- WU SM, HUANG YH, CHEN YK, *et al.* Direct determination of 20 kinds of free amino acids in beer by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(5): 1545–1553.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介

郑鸿涛, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测与研究。

E-mail: 65130078@qq.com

谭贵良, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: joe88tan@126.com