

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240723002

溶剂提取/水蒸气蒸馏-分散液液微萃取-稳定同位素稀释-GC-MS/MS 测定咸鱼中的挥发性亚硝胺

刘方征^{1#}, 陈 晨^{1#}, 王宗义^{1*}, 张丽萍², 吴建欣¹, 王玉纯¹, 何世慧¹

(1. 北京农学院食品科学与工程学院, 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** 建立一种溶剂提取(solvent extraction, SE)、水蒸气蒸馏(steam distillation, SD)分别与分散液液微萃取(dispersing liquid-liquid microextraction, DLLME)有效组合进行样品前处理、稳定同位素稀释-气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)检测咸鱼中挥发性亚硝胺(volatile nitrosamine, VNA)的方法。**方法** 样品加入 9 种 VNA 稳定同位素标记物, 分别进行 SE(甲醇-水为溶剂)和 SD 处理, 提取液和蒸馏液分别进行 DLLME, 以 GC-MS/MS 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行检测。**结果** 方法在 1~100 ng/mL 范围内各 VNA 线性良好, 相关系数(r^2)为 0.9920~0.9999; SE-DLLME 处理简便快速, 二甲基亚硝基胺(nitroso dimethylamine, NDMA)检出限(limit of detection, LOD)为 0.79 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限(limit of quantification, LOQ)为 2.63 $\mu\text{g/kg}$, 其他 VNA 的 LOD 为 0.03~0.43 $\mu\text{g/kg}$ 、LOQ 为 0.10~1.44 $\mu\text{g/kg}$, 可满足咸鱼中 VNA 合格性快筛的需要; SD-DLLME 处理, NDMA 的 LOD 为 0.06 $\mu\text{g/kg}$ 、LOQ 为 0.21 $\mu\text{g/kg}$, 其他 VNA 的 LOD 为 0.01~0.40 $\mu\text{g/kg}$ 、LOQ 为 0.03~1.30 $\mu\text{g/kg}$, 可满足关注浓度以下 VNA 定量检测的需要; 总体加标回收率分别为 89.81%~105.10%, 相对标准偏差为 2.70%~7.30%。**结论** 该方法样品处理成本低廉、准确性好, 为咸鱼 VNA 的合格性快筛和低含量水平试样的定量提供了有价值的参考方法。

关键词: 挥发性亚硝胺; 组合式经典样品前处理; 咸鱼; 气相色谱-串联质谱法

Determination of volatile nitrosamines in salted fish by stable isotope dilution-gas chromatography-tandem mass spectrometry with solvent extraction/steam distillation connecting with dispersion liquid-liquid microextraction

LIU Fang-Zheng^{1#}, CHEN Chen^{1#}, WANG Zong-Yi^{1*}, ZHANG Li-Ping²,
WU Jian-Xin¹, WANG Yu-Chun¹, HE Shi-Hui¹

(1. Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control for Spoilage Organisms and Pesticides, College of Food Sciences and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;
2. National Research Center for Environmental Analysis and Measurement, Beijing 100029, China)

基金项目: 北京市教委-北京农学院都市农林学交叉学科平台建设项目(2023)

Fund: Supported by the Beijing Municipal Education Commission-Beijing University of Agriculture Urban Agriculture and Forestry Interdisciplinary Platform Construction Project (2023)

#刘方征、陈 晨为共同第一作者

#LIU Fang-Zheng and CHEN Chen are Co-first Authors

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

*Corresponding author: WANG Zong-Yi, Associate Professor, College of Food Sciences and Engineering, Beijing University of Agriculture, No.7, Beinong Road, Shigezhuang Street, Changping District, Beijing 102206, China. E-mail: wangzongyi001@sina.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of volatile nitrosamine (VNA) in salted fishes by stable isotope dilution-gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with combining solvent extraction (SE) and steam distillation (SD) to dispersing liquid-liquid microextraction (DLLME) respectively. **Methods** Nine VNA stable isotope markers were added to the samples and treated with SE (methanol water as solvent) and SD, respectively. The extraction and distillation solutions were subjected to DLLME and detected using GC-MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** Good linearity for each VNA was obtained within the range of 1–100 ng/mL, r^2 were ranging from 0.9920 to 0.9999. With SE-DLLME, the limits of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.79 $\mu\text{g/kg}$ and 2.63 $\mu\text{g/kg}$ respectively for dimethylnitrosamine (NDMA); LODs were 0.03–0.43 $\mu\text{g/kg}$ and LOQs were 0.10–1.44 $\mu\text{g/kg}$ for other VNAs; the qualification fast screening could be met with this combined sample pretreatment. With SD-DLLME, the LOD and LOQ were 0.06 $\mu\text{g/kg}$ and 0.21 $\mu\text{g/kg}$ respectively for NDMA; LODs were 0.01–0.40 $\mu\text{g/kg}$ and LOQs were 0.03–1.30 $\mu\text{g/kg}$ for other VNAs; quantification for the samples with VNAs concentrations below the concerning concentration with this combined sample pretreatment. Overall recoveries were 89.81%–105.10% with relative standard deviations ranging from 2.70% to 7.30%. **Conclusion** This method is low cost, accurate and provides a valuable reference for monitoring the VNA risk of salted fish.

KEY WORDS: volatile nitrosamine; combining classic sample pretreatments; salted fish; gas chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

挥发性亚硝胺(volatile nitrosamine, VNA)是大气^[1]、水体^[2–3]、医药^[4–6]、化妆品^[7–8]和食品^[9–10]领域被持续关注的一类具有“三致”毒性的污染物。食品中的 VNA 主要是由生物胺和亚硝酸盐在弱酸性条件下通过亚硝化反应生成,容易在加工肉制品^[9,11–12]和水产品^[10,13–14]中污染累积,常见报道有亚硝基二甲基胺(nitroso dimethylamine, NDMA)、亚硝基甲基乙基胺(nitroso methyl ethylamine NMEA)、亚硝基二乙基胺(nitroso diethyl amine, NDEA)、亚硝基二丙基胺(nitroso dipropyl amine, NDPA)、亚硝基哌啶(nitroso piperidine, NPIP)、亚硝基吡咯烷(nitroso pyrrolidine, NPYR)、亚硝基吗啉(nitroso morpholine, NMOR)、亚硝基二丁基胺(nitroso dibutyl amine, NDBA)和亚硝基二苯胺(nitroso diphenyl amine, NDPhA),其中 NDMA、NDEA 为 2A 类致癌物, NDBA、NPIP 和 NPYR 为 2B 类致癌物。近年来,随着食品产业的快速发展,人们营养健康意识的不断提升,相关食品中 VNA 高效检测方法的研究,一直是较为关注的课题。

目前,检测食品及相关样品中微量 VNA,主要通过选择和研究适宜的样品前处理方法,使用气相色谱-热能检测器(gas chromatography-thermal energy analyzer, GC-TEA)^[15–16]、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[17–18]、气相色谱-串联质谱(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)^[19–20]、液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[21–22]或高分辨质谱(high-resolution mass

spectrometry)^[23]等仪器分析技术完成。

样品前处理技术一直是研究的热点,也是提高检测效率的关键。水蒸气蒸馏(steam distillation, SD)结合液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)和氮吹浓缩的方法,是 GB 5009.26—2023《食品中 N-亚硝胺类化合物的测定》使用的主要前处理方法;SD 具有样品适用范围广、处理量大、基质干扰小的优势,但效率较低,后续 LLE 还存在二氯甲烷用量大的问题。SD 结合活性炭柱固相萃取(solid phase extraction, SPE)^[24]、碱热处理结合分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)^[25]、QuEChERS^[26–28]和直接盐析提取^[29]等技术都是近年来报道的针对固态食品的有效改进方法。但活性炭 SPE 小柱对 NDPhA 永久吸附不能洗脱,仅适用部分 VNA;QuEChERS 和直接盐析提取方法较为方便,但都需要对乙腈提取液进行氮吹浓缩,仍然存在耗时长的问题。DLLME 是具有有机试剂用量小(小于等于 1 mL)、浓缩倍数大、萃取液可直接进样分析的优势,操作简单方便,但需要合适的方法将固态样品中的目标物转移到水溶液中才能进行;碱热处理是一种有效的方法^[25],但碱热条件下 NDPhA 和 NDBA 不稳定,测定值偏低或不能检出;使用经典的溶剂提取(solvent extraction, SE)方法和 SD 方法,将样品中 VNA 转移到水溶液中,再结合 DLLME 进行富集的方法,鲜有报道。

本研究针对 VNA 污染累积风险较高的干咸鱼样品,将经典的 SE 和 SD 方法,分别与 DLLME 方法有效结合,再利用 GC-MS/MS 的高选择性、高灵敏性和稳定同位素稀释技术定量准确性的优势,进行组合创新;建立 SE-DLLME 样品前处理,以 NDMA 为主要目标物的 VNA

合格性快速筛查方法; 建立 SD-DLLME 样品前处理的更低含量 VNA 的定量方法, 以期降低实验成本, 提高相关食品质量安全监测效率提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

各类咸鱼样品, 网络购物平台购置。

Agilent 7890B-7000C 型气相色谱-串联质谱联用仪(美国 Agilent Technologies 公司); Centrifuge5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司); IKA MS 3 basic 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); FSH-2 可调节高速均质机(常州国华有限公司); BSA224S 电子分析天平(精度 0.1 mg, 0.01 mg, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); 全玻璃水蒸气蒸馏装置(北京 POMEX 公司); 50 mL 塑料离心管(中国 BIOLGIX 公司)。

氯化钠、碳酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 二氯甲烷、乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 MREDA Technology Inc 公司); NDMA、NMEA、NDEA、NDPA、NPIP、NPYR、NMOR、NDBA 和 NDPhA 混合标准溶液(2000 mg/L, 溶剂甲醇, 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物标准溶液(1000 µg/mL, 美国 Accustandard Inc 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

取定值 9 种亚硝胺混合标准溶液和 9 种稳定同位素标记物混合标准溶液各 1 mL, 分别用甲醇稀释至 10 mL 容量瓶中, 得质量浓度分别为 200 µg/mL 和 100 µg/mL 的混合标准溶液和混合稳定同位素标记物溶液, 作为储备液, 于棕色贮液瓶中-18 °C 储存, 于室温下使用。亚硝胺混合标准中间液和稳定同位素标记物混合标准中间工作液, 用甲醇稀释储备液获得, 质量浓度均为 1 µg/mL。系列标准溶液用二氯甲烷稀释中间液获得, 质量浓度分别为 1、5、10、25、50 和 100 ng/mL, 稳定同位素标记物质量浓度均为 50 ng/mL。

1.2.2 样品处理

(1) SE-DLLME

称取 5 g(精确至 0.001 g)经粉碎的咸鱼样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 µL 稳定同位素标记物混合标准工作液, 随后加入 10 mL 甲醇, 30 mL 纯水, 用高速均质机均质至无明显颗粒物, 8000 r/min 离心 10 min。立即将分离得到的上层清液倾倒入另一个 50 mL 离心管中, 加入 2.5 g 碳酸钠, 摇匀直到全部溶解, 使用精密注射器快速注入 1000 µL 的二氯甲烷, 使溶液呈雾状, 旋紧离心管盖, 漩涡 1 min, 8000 r/min 离心 10 min, 弃去上层水相, 取下层 100 µL 二氯甲烷于带有内插管的进样瓶中待检。

(2) SD-DLLME

称取 100 g 粉碎样品到 500 mL 蒸馏瓶中, 加入 1 mL

稳定同位素标记物混合标准工作液、100 g 超纯水、50 g 氯化钠, 充分混合均匀, 进行水蒸气蒸馏, 收集约 200 mL 蒸馏液, 停止蒸馏。取 40 mL 蒸馏液于 50 mL 离心管中, 加入 2.5 g 碳酸钠后摇匀直到全部溶解, 进行分散液液微萃取, 操作同前。

1.2.3 仪器条件

(1) 色谱条件

DB-WAXUI 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 µm), 初始温度 35 °C (1 min), 10 °C/min 升至 90 °C, 30 °C/min 升至 240 °C (6 min); 载气为高纯氦气, 恒流模式, 流速 1 mL/min; 进样口温度 190 °C, 进样量 1 µL, 不分流进样。

(2) 质谱条件

电子轰击源(electron impact, EI), 电离能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 传输线温度 250 °C, 四极杆温度 150 °C。多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描, 参数见表 1。

表 1 GC-MS/MS 法测定 VNA 的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters for the determination of VNA with GC-MS/MS

目标物	保留时间/min	前级离子(m/z)	碰撞能/eV	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
NDMA-d6	7.735	80	5, 5	50.2	46.1
NDMA	7.741	74	5, 20	44.1	42.1
NMEA-d3	8.170	91	20, 15	74.0	46.1
NMEA	8.174	88	5, 5	42.1	71.0
NDEA-d4	8.418	106	8, 8	46.1	88.1
NDEA	8.418	102	20, 20	56.0	42.0
NDPA-d14	9.305	144	5, 5	50.2	126.2
NDPA	9.343	130	5, 5	113.1	58.0
NDBA-d18	10.219	176	5, 5	110.2	158.2
NDBA	10.267	158	5, 5	99.1	141.1
NPIP-d10	10.379	124	10, 10	46.1	94.2
NPIP	10.396	114	5, 5	84.0	97.1
NPYR-d4	10.503	104	10, 10	74.1	58.1
NPYR	10.514	100	6, 6	55.0	70.0
NMOR-d4	10.712	120	5, 5	90.1	60.2
NMOR	10.718	116	5, 5	86.0	56.0
NDPhA-d10	13.990	179	25, 25	177.2	175.1
NDPhA	14.012	169	15, 25	168.1	167.1

1.3 数据处理

仪器数据采集、定性和定量分析使用 Mass hunter Workstations Software B.07.00 进行; 数据处理与统计分析

使用 Excel 2021 进行。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的确定

2.1.1 SE-DLLME 方法提取溶剂的选择

样品经氢氧化钡热处理,可将 VNA 有效转移至水溶液中,以二氯甲烷为萃取剂,可通过 DLLME 方法进行有效提取并富集^[25],但实验过程也相对较长。在此基础上,本研究针对干咸鱼样品中脂肪含量较低的特点,采用溶剂均质提取的方法,更为简便有效地将 VNA 转移至水溶液中,同时避免了碱热不稳定 VNA 的损失,建立了 SE-DLLME 组合样品前处理方法。

为更好地使 SE 与后续 DLLME 方法兼容,提取液加入一定比例的甲醇或乙腈,以加强提取效果,同时在后续 DLLME 时起到分散剂的作用。但加入乙腈会在 DLLME 时由于盐的作用而使溶液分层,导致无法进行,故选择加入适量的甲醇,不同比例甲醇对 VNA 信号响应的影响见图 1,随甲醇比例的增加,VNA 信号响应先随甲醇比例的上升而增强后下降,当甲醇含量超过 25%时,呈现下降趋势,原因是甲醇比例的上升,萃取剂二氯甲烷的溶解度增大,导致 DLLME 时二氯甲烷分散成小液滴的效果变差所致,故选择 25%甲醇作为提取溶剂。

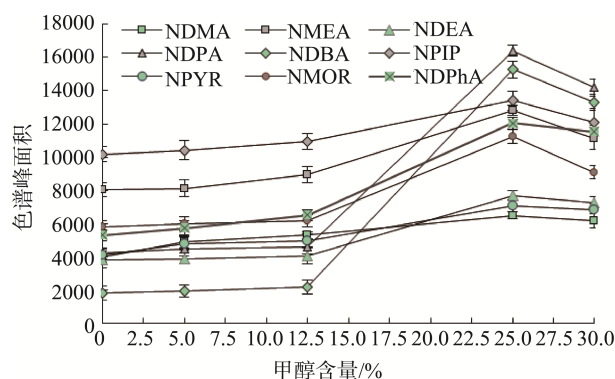


图 1 甲醇含量对 SE-DLLME 富集效果的影响

Fig.1 Effects of methanol content on the enrichment effect of SE-DLLME

2.1.2 SD-DLLME 方法样品用量和蒸馏液收集量的确定

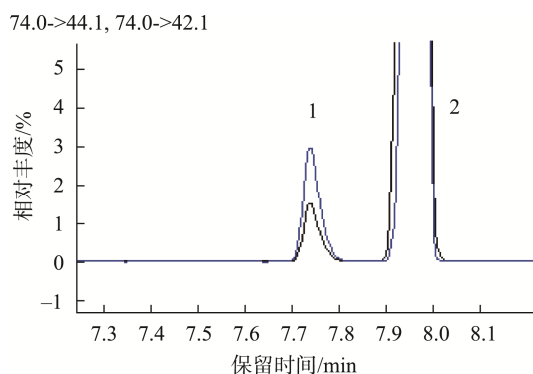
本研究进一步将 SD 与 DLLME 进行有效组合,建立了 SD-DLLME 组合样品前处理方法。考虑试样的代表性和对低含量 VNA 定量的要求,本研究称样量为 100 g;为使 VNA 被充分蒸馏出来,参照 GB 5009.26—2023《食品安全国家标准 食品中 N-亚硝胺类化合物的测定》收集冷凝液 200 mL,但由于稳定同位素稀释技术利用待测物与其标记物的比值进行定量,在有足够灵敏度的条件下,与取样体积无关,故本研究取蒸馏液 40 mL 用于 DLLME。

2.1.3 SE/SD-DLLME 方法萃取条件的确定

研究表明,以硫酸钠为辅助盐,二氯甲烷为萃取剂,对水溶液中的 VNA 进行 DLLME,获得了满意的萃取效果^[25],但在饱和盐的条件下以碳酸钠为辅助盐效果更佳^[30],故本研究以二氯甲烷为萃取剂,以碳酸钠为辅助盐,在饱和条件下进行 DLLME。优化的萃取条件[1.2.2(1)]已在实验室前期工作中^[30]进行了讨论,这里不在赘述。又由于 SD 方法样品处理量大,且能有效去除基质的影响,蒸馏液中目标 VNA 浓度也相对较高,后续在饱和盐条件下进行 DLLME 时不需要加入甲醇或乙醇做分散剂,即可获得满意的 DLLME 富集效果,萃取用二氯甲烷用量也减少到标准方法的 1/170。

2.2 仪器分析条件的确定

结合样品处理方法,在文献[25]和[30]的基础上进行了微调,优化的分析条件见 1.2.3 小节。NDMA 是目前最为关注的亚硝胺,研究发现,萃取剂中的 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)污染可能会给 NDMA 的检测带来干扰,由于 DMF 与 NDMA 前级离子和碎片离子核比的整数部分相同,低分辨质谱不能区分,这是 NDMA 检测需要十分注意的问题。在本研究优化的条件下,或者适当改变升温程序后,二者均可获得满意的色谱分离,如图 2 所示;同样在本研究样品前处理条件下,其他亚硝胺也未见干扰,见图 3。



注: 1. NDMA; 2. DMF。

图 2 NDMA 和 DMF 的 MRM 分离色谱图

Fig.2 MRM chromatograms for separating NDMA and DMF

2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系、检出限和定量限

根据最终样品溶液中可能的目标物浓度,考察了 VNA 质量浓度范围为 1~100 ng/mL 时的线性,结果相关系数(r^2)为 0.9920~0.9999,线性关系良好,见表 2。LOD 和 LOQ 通过实际样品和加标样品的检测,按 3 倍和 10 倍信噪比计算获得,结果列于表 2。使用 SE-DLLME 进行样品处理,方法 LOQ 高于 GB 5009.26—2023 的 LOQ (1 μ g/kg),

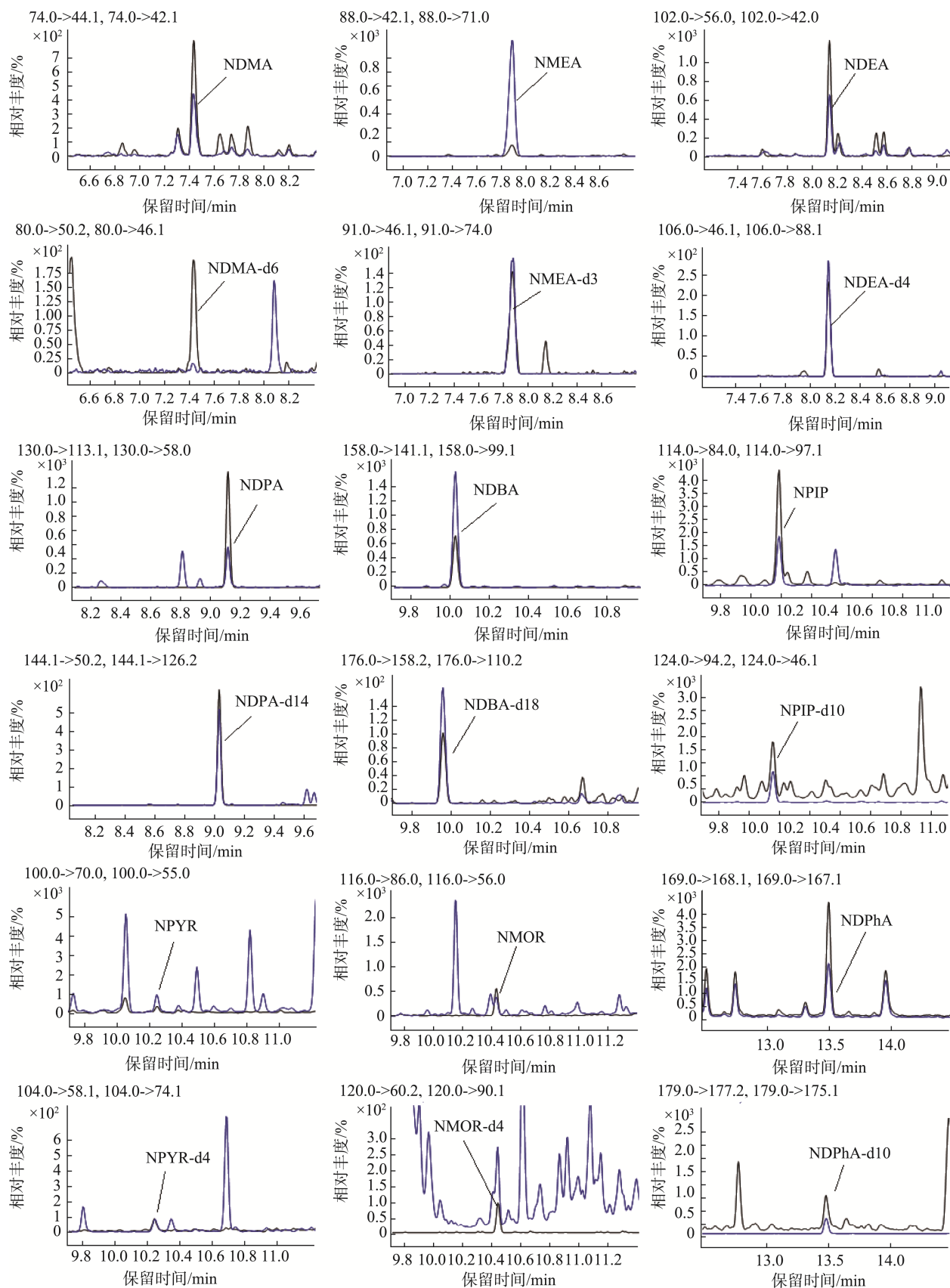


图 3 添加 4 µg/kg VNAs 咸鱼样品的 MRM 色谱图

Fig.3 MRM chromatograms of salted fish samples spiked with 4 µg/kg of VNAs

表 2 线性关系、检出限和定量限
Table 2 Linear relationship, limits of detection and limits of quantification

目标物	线性方程	r^2	线性范围/(ng/mL)	SE-DLLME		SD-DLLME	
				LODs/(ng/g)	LOQs/(ng/g)	LODs/(ng/g)	LOQs/(ng/g)
NDMA	$Y=0.855296X-0.022381$	0.9970	1~100	0.79	2.63	0.06	0.21
NMEA	$Y=2.300455X-0.071157$	0.9927	1~100	0.07	0.25	0.07	0.23
NDEA	$Y=1.317327X-0.012517$	0.9920	1~100	0.21	0.70	0.01	0.03
NDPA	$Y=0.977224X-0.054314$	0.9948	1~100	0.03	0.10	0.01	0.03
NDBA	$Y=0.999638X-0.063746$	0.9996	1~100	0.30	0.99	0.10	0.18
NPIP	$Y=0.701370X-0.004989$	0.9997	1~100	0.15	0.51	0.07	0.26
NPYR	$Y=1.202337X-0.086733$	0.9992	1~100	0.43	1.44	0.40	1.30
NMOR	$Y=0.169045X-0.022076$	0.9999	1~100	0.35	1.15	0.05	0.17
NDPHA	$Y=1.408790X-0.032250$	0.9997	1~100	0.34	1.14	0.04	0.14

注: X 是分析物与其稳定同位素标记化合物的浓度比; Y 是分析物与其稳定同位素标记化合物的峰面积比; 检出限(limit of detection, LOD); 定量限(limit of quantification, LOQ)。

但远低于 GB 2762—2022《食品安全国家标准 食品中污染物限量》关于产品中 NDMA 的限量 4 $\mu\text{g/kg}$, 样品前处理 10 min 内可完成, 可满足咸鱼产品 NDMA 合格性快筛的需要; 使用 SD-DLLME 样品处理, 在本研究 100 g 试样处理量的条件下, NDMA 的 LOQ 可达 0.21 $\mu\text{g/kg}$, 可满足更低亚硝胺含量样品的定量检测, 又由于水蒸气蒸馏处理去除基质干扰能力强的优势, 还可用于合格快筛中可疑样品的进一步确认。

2.3.2 加标回收率与精密度

由于咸鱼中多数亚硝胺有本底值, 理论定量限水平

的加标样不易获得, 故本研究参照样品本底值和水产品中 NDMA 的限量, 分别设计高中低 3 水平 6 重复进行加标回收实验, 结果见表 3, 使用两种不同前处理, 总体回收率为 89.81%~105.10%, 相对标准偏差为 2.70%~7.30%, 优于相关方法学评定指南的指标要求^[25], 具有满意的准确度和精密度。

此外, 由于实验样本中加入 9 种稳定同位素标记的亚硝胺为内标, 操作误差和基质效应得到很好的校正, 操作过程可以相对粗放, 也使得整个样品处理方法获得有效简化, 使得方法有较好的稳健性。

表 3 两种样品处理的方法准确度和精密度($n=6$)
Table 3 Accuracies and precisions with 2 kinds of sample pretreatment ($n=6$)

样品前处理方法	咪表无	加标水平/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	RSDs/%
SE-DLLME	NDMA	1, 4, 20	-, 99.40, 100.50	-, 5.20, 2.90
	NMEA		98.10, 103.50, 103.60	7.20, 6.40, 3.60
	NDEA		98.20, 96.60, 104.10	7.30, 6.41, 3.58
	NDPA		105.10, 102.60, 103.50	3.50, 4.00, 3.61
	NDBA		100.70, 100.10, 103.10	3.90, 5.20, 3.10
	NPIP		99.60, 102.00, 101.00	4.70, 4.10, 3.40
	NPYR		-, 98.20, 101.50	-, 3.10, 3.70
	NMOR		98.90, 102.40, 99.60	4.50, 2.70, 2.80
	NDPHA		100.40, 100.60, 101.20	3.20, 4.00, 3.20
	NDMA		95.91, 97.59, 90.18	5.40, 5.21, 2.90
SD-DLLME	NMEA	0.2, 4.0, 10.0	99.82, 95.51, 95.63	4.20, 3.40, 3.30
	NDEA		97.30, 90.28, 89.81	3.30, 3.41, 3.60
	NDPA		98.76, 101.10, 102.80	3.50, 4.01, 3.20
	NDBA		97.70, 95.89, 101.90	2.90, 5.02, 3.10
	NPIP		98.79, 96.65, 93.84	3.70, 4.10, 3.40
	NPYR		-, 101.00, 91.33	-, 3.10, 3.70
	NMOR		97.14, 92.66, 92.04	3.50, 2.70, 2.80
	NDPHA		96.87, 100.10, 100.70	3.20, 3.80, 3.10

注: -表示未检出, 下同; 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.4 实际样品的检测

对市售 21 个不同种类的大小咸鱼样品, 使用 SE-DLLME 处理, 以限量值为参照对 NDMA 含量进行合格性快筛检测和 SD-DLLME 处理进行定量检测, 经测结果见表 4。结果显示 SE-DLLME 处理, 有 2 个样品的 NDMA 超过限量值 4 μg/kg, 与 SD-DLLME 处理定量检测的结果一致。

表 4 两种样品前处理方法实际样品中 VNA 的检测结果
Table 4 Determining results of VNA in the actual samples with two sample pretreatments

样品编号	VNA	含量/(μg/kg)	
		SE-DLLME	SD-DLLME
1	NDMA	>4	10.65
2	NDMA	>4	12.17
3-21	NDMA	-	0.47~3.37
1-21	NDPA, NPIP	-	-
1-21	NMEA, NDEA, NDBA, NPYR, NMOR, NDPhA	-	0.30~3.89

3 结 论

本研究建立了 SE-DLLME 和 SD-DLLME 样品前处理、稳定同位素稀释-GC-MS/MS 快筛和定量检测咸鱼中 VNA 的方法, 该方法灵敏, 准确度、精密度良好, 为提高相关食品 VNA 监测效率提供有效的方法参考。其中, SE-DLLME 方法简单快速, 能够满足咸鱼样品中 NDMA 为主的 VNA 合格性筛查检测的需要, 但是否具有更广泛的样品适用性, 特别是高脂肪含量样品, 尚需进一步实验验证; SD-DLLME 方法, 则将 SD 和 DLLME 进行了有效结合, 即发挥了 SD 样品处理量大、适用范围广和基质干扰小的特点, 又发挥了 DLLME 操作简单、有机试剂用量小的优势, 可满足低 VANs 含量可疑试样定量检测的需要, 是现行标准方法很好的补充。进一步研究样品适用广泛、简单的 VANs 提取方法, 再结合使用离子液、低共熔溶剂等新型萃取剂进行 DLLME, 是此类方法未来发展的主要趋势。

参考文献

[1] 杨振, 何婷婷, 张忠堂, 等. 基于硅酸镁前处理富集的气相色谱-串联质谱分析方法检测空气中 9 种挥发性 N-亚硝胺[J]. 分析科学学报, 2024(3): 350-355.
YANG Z, HE TT, ZHANG ZT, *et al.* Determination of 9 kinds of volatile nitrosamines in air by magnesium silicate as adsorbent in combination with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2024(3): 350-355.

[2] 李晓, 叶志伟, 曹梦茹, 等. 亚硝胺前体物来源和解析方法研究进展[J]. 中国给水排水, 2023, 39(10): 10-16.

LI X, YE ZW, CAO MR, *et al.* Research progress on the source and analysis method of nitrosamine precursors [J]. China Water Waste Water, 2023, 39(10): 10-16.

[3] BREIDER F, GACHET ACG, VON GU. A survey of industrial N-nitrosamine discharges in Switzerland [J]. J Hazard Mater, 2023, 450: 131094.

[4] 刘晶晶, 梁智渊, 梁爱仙, 等. GC-MS/MS 测定替米沙坦片中 10 种亚硝胺类基因毒性杂质[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(9): 1224-1229.
LIU JJ, LIANG ZY, LIANG AIX, *et al.* Determination of ten nitrosamine genotoxic impurities in telmisartan tablets by GC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(9): 1224-1229.

[5] ZHENG J, BROOKES A, MOSERC J, *et al.* On the risk of nitrosamine contamination during drug product blister packaging [J]. J Pharm Sci, 2023, 112: 2321-2325.

[6] WICHITNITHAD W, NANTAPHOL S, NOPPAKHUNSOMBOON K, *et al.* An update on the current status and prospects of nitrosation pathways and possible root causes of nitrosamine formation in various pharmaceuticals [J]. Saud Pharm J, 2023, 31: 295-311.

[7] 李静, 周智明, 陈张好, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 12 种 N-亚硝胺类物质[J]. 分析试验室, 2024, 43(4): 528-534.
LI J, ZHOU ZM, CHEN ZH, *et al.* Determination of 12 N-nitrosamines in cosmetics by performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2024, 43(4): 528-534.

[8] 汪毅, 梁文耀, 何国山, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 15 种 N-亚硝胺化合物[J]. 分析测试学报, 2023, 42(11): 1469-1478.
WANG Y, LIANG WY, HE GS, *et al.* Determination of fifteen N-nitrosamine compounds in cosmetics by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2023, 42(11): 1469-1478.

[9] XIE YF, GENG YQ, YAO JB, *et al.* N-nitrosamines in processed meats: Exposure, formation and mitigation strategies [J]. J Agric Food Res, 2023, 13: 100645.

[10] HUANG ST, FU WS, FANG QM, *et al.* Occurrence and carcinogenic risk assessment of N-nitrosamines in some dried aquatic products in China [J]. Food Control, 2023, 152: 109845.

[11] NIKLAS AA, HERRMANN SS, PEDERSEN M, *et al.* The occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in cured meat products from the Danish market [J]. Food Chem, 2022, 378: 132046.

[12] DEVECI G, TEK NA. N-nitrosamines: A potential hazard in processed meat products [J]. J Sci Food Agric, 2023. DOI 10.1002/jsfa.13102

[13] WU YX, QIN LR, CHEN JW, *et al.* Nitrite, biogenic amines and volatile N-nitrosamines in commercial Chinese traditional fermented fish products [J]. Food Addit Contamin, 2022, 15(1): 10-19.

[14] WANG SY, SUN FL, WANG SH, *et al.* N-nitrosamines in Qingdao dried aquatic products and dietary risk assessment [J]. Food Addit Contamin, 2023, 16(2): 120-129.

[15] 林睿, 徐敦明, 黄旖珏, 等. 气相色谱-热能分析仪法同时测定食品接触材料及制品中 15 种 N-亚硝胺在酒精类食品模拟物中的迁移量[J]. 分析测试学报, 2022, 41(10): 1542-1547.
LIN R, XU DM, HUANG QY, *et al.* Simultaneous determination of specific migration amounts of 15 N-nitrosamines in food contact materials and products by gas chromatography-thermal energy analyzer with alcoholic food simulants [J]. J Instrum Anal, 2022, 41(10): 1542-1547.

- [16] ANDRADE R, REYES FGR, RATH S. A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA [J]. Food Chem, 2005, 91(1): 173–179.
- [17] NABIZADEH S, BARZEGAR F, BABAEI M, *et al.* New and efficient direct-SLM two-phase hollow fiber electromembrane extraction coupled to GC/MS for the analysis of nitrosamines in different types of sausage: Investigation of meat type, meat percent and cooking methods [J]. Food Chem, 2023, 416: 135759.
- [18] SUN CX, WANG R, WANG TY, *et al.* Primary evaluation of nine volatile N-nitrosamines in raw red meat from Tianjin, China, by HS-SPME-GC-MS [J]. Food Chem, 2020, 310: 125945.
- [19] DONG H, LI H, LIANG M, *et al.* Rapid determination of nine N-nitrosamines in dry-cured mackerel (*Scomberomorus niphonius*) using salting out homogeneous phase extraction with acetonitrile followed by GC-MS/MS [J]. LWT Food Sci Technol, 2020, 130: 109716.
- [20] 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(B·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]. Phy Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2021, 57(6): 487–492.
- [21] YANG Z, LIAO G, WAN D, *et al.* Combined application of high-throughput sequencing and LC-MS/MS-based metabolomics to evaluate the formation of Zn-protoporphyrin in Nuodeng ham [J]. Food Res Int, Part B, 2022, 162: 112209.
- [22] 孙铭, 古其会, 张菊梅, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用检测饮用水中 N-亚硝胺类消毒副产物[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 310–315.
- SUN M, GU QH, ZHANG JM, *et al.* Determination of N-nitrosamine disinfection byproducts in drinking water by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Food Sci, 2022, 43(2): 310–315.
- [23] 何强, 张亚莉, 郭家琪, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定奶粉中 10 种 N-亚硝胺类化合物[J]. 分析实验室, 2021, 40(12): 1451–1454.
- HE Q, ZHANG YL, GUO JQ, *et al.* Determination of 10 N-nitrosamines in milk powder by ultra performance liquid chromatography- quadrupole/ electrostatic field orbitrap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2021, 40(12): 1451–1454.
- [24] 夏晓楠, 王宗义, 赵依芃, 等. 水蒸气蒸馏-活性炭柱固相萃取/GC-MS/MS 法测定火腿中 8 种 N-亚硝胺[J]. 分析实验室, 2015, 34(12): 1475–1479.
- XIA XN, WANG ZY, ZHAO YP, *et al.* Steam distillation combined with active carbon solid phase extraction for the determination of eight volatile N-nitrosamines in ham products by GC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(12): 1475–147.
- [25] 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 seven N-nitrosamines in ready-to-eat fish products by GC-MS/MS with alkali-treatment coupled salt-assisted dispersion liquid-liquid microextraction [J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(3): 176–182.
- [26] QIU YS, CHEN JH, YU WJ, *et al.* Contamination of Chinese salted fish with volatile N-nitrosamines as determined by QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2017, 232: 763–769.
- [27] 戴裕杰, 关荣发, 黄海智, 等. 改进的 QuEChERS-气相色谱-质谱法测定中式腊肉中 8 种挥发性 N-亚硝胺[J]. 食品科学, 2021, 42(20): 266–273.
- DAI YJ, GUAN RF, HUANG HZ, *et al.* Determination of eight volatile N-nitrosamines in Chinese bacon by modified QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2021, 42(20): 266–273.
- [28] 孔祥一, 庄丽丽, 方恩华, 等. QuEChERS-同位素稀释-气相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 9 种 N-亚硝胺类化合物[J]. 色谱, 2021, 39(1): 96–103.
- KONG XY, ZHUANG LL, FANG ENH, *et al.* Determination of nine N-nitrosamine in animal derived foods by QuEChERS-isotopdilution combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(1): 96–103.
- [29] DONG H, LI H, LIANG M, *et al.* Rapid determination of nine N-nitrosamines in dry-cured mackerel (*Scomberomorus niphonius*) using salting out homogeneous phase extraction with acetonitrile followed by GC-MS/MS [J]. LWT Food Sci Technol, 2020, 130: 109716.
- [30] 刘方征, 任雨鑫, 张丽萍, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(12): 3945–3952.
- LIU FZ, REN YX, ZHANG LP, *et al.* 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 [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(12): 3945–3952.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)

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

陈晨, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: chenchens2020@163.com

王宗义, 副教授, 主要研究方向为食品营养与安全检测。

E-mail: wangzongyi001@sina.com