

氢氧化钡处理-分散液液微萃取结合气相色谱-串联质谱法测定肉制品中 9 种 N-亚硝胺

李芳芳, 梁秀清, 王艳丽, 陈倩倩, 鞠 香, 陈克云, 李 洁, 田其燕, 刘艳明*

[山东省食品药品检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(肉及肉制品监管技术),
山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 济南 250101]

摘 要: **目的** 建立氢氧化钡碱溶液-分散液液微萃取结合气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)同时测定肉制品中 9 种 N-亚硝胺类化合物的分析方法。**方法** 肉制品样品在 80°C 水浴中经氢氧化钡碱溶液皂化, 去除油脂干扰, 进一步将 N-亚硝胺提取到水溶液中, 再加入甲醇(分散剂)和二氯甲烷(萃取剂)进行高效萃取富集, 在多反应监测模式下分析, 稳定同位素内标法定量。对影响萃取效率的因素进行考察, 如样品提取步骤中的皂化条件, 无机盐、萃取剂和分散剂的种类及体积等。通过优化色谱、质谱参数和前处理条件, 获得最佳检测结果。**结果** 除了 N-亚硝基二甲胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA)的线性范围为 2.5~50.0 ng, 其他 8 种 N-亚硝胺类化合物在 1.0~50.0 ng 范围内线性关系良好, 9 种 N-亚硝胺类化合物的相关系数(r^2)范围为 0.9954~0.9999, 方法检出限和定量限分别为 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.2~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在火腿、五香鸡肉和牛肉样品中分别进行 0.5、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度水平的加标实验, 所有分析物的平均回收率为 78.2%~120.4%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.3%~11.2%。**结论** 该方法样品使用量少, 前处理操作简单, 不需要长时间蒸馏提取, 并且有机试剂的使用量也较低, 对环境绿色友好。所建立的方法准确、灵敏, 可为肉制品中 9 种 N-亚硝胺的同时测定提供技术支持。

关键词: 碱液处理; 分散液液微萃取; 气相色谱-串联质谱法; 肉制品; N-亚硝胺

Determination of 9 kinds of N-nitrosamines in meat products by gas chromatography-tandem mass spectrometry with barium hydroxide treatment followed dispersive liquid-liquid microextraction

LI Fang-Fang, LIANG Xiu-Qing, WANG Yan-Li, CHEN Qian-Qian, JU Xiang,
CHEN Ke-Yun, LI Jie, TIAN Qi-Yan, LIU Yan-Ming*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the simultaneous determination of 9 kinds of N-nitrosamines in meat products by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) coupled with barium hydroxide

基金项目: 山东省药品监督管理局科研项目(SDNMPAFZLS202202)、山东省食品药品检验研究院科研项目(SDIFDC-KY-2021011)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Shandong Medical Products Administration (SDNMPAFZLS202202), and the Scientific Research Project of Shandong Institute for Food and Drug Control (SDIFDC-KY-2021011)

*通信作者: 刘艳明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: msyliu@163.com

*Corresponding author: LIU Yan-Ming, Ph.D, Professor, Shandong Institute of Food and Drug Control, No.99, Tianluo Road, Gaoxin District, Jinan 250101, China. E-mail: msyliu@163.com

alkali solution and dispersive liquid-liquid microextraction. **Methods** The meat samples were saponified by barium hydroxide alkali solution at 80°C in a water bath to remove the oil interference, and then the N-nitrosamines were extracted into the aqueous solution, followed by the addition of methanol (dispersant) and dichloromethane (extractant) for efficient extraction and enrichment, which were analyzed in multiple reaction monitoring mode and quantified by stable isotope internal standard method. The factors affecting the extraction efficiency were investigated, such as the saponification conditions in the extraction step, inorganic salts, types and volumes of extractants and dispersants. The chromatographic and mass spectrometric parameters and pre-treatment conditions were optimized to obtain the best detection results. **Results** In addition to the linear range of N-nitrosodimethylamine (NDMA) of 2.5–50.0 ng, the other 8 kinds of N-nitrosamines had a good linear relationship in the range of 1.0–50.0 ng. The correlation coefficients (r^2) of the 9 kinds of N-nitrosamines ranged from 0.9954 to 0.9999, and the limits of detection and limits of quantification were 0.1–0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.2–0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The average recoveries of all analytes were 78.2%–120.4% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.3%–11.2% in ham, spiced chicken and beef samples spiked at the concentration levels of 0.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. **Conclusion** The method is environmentally green with low sample usage, simple pretreatment operation, no need for long time distillation and extraction, and low usage of organic reagents. The established method is accurate and sensitive, and can provide technical support for the simultaneous determination of 9 kinds of N-nitrosamines in meat products.

KEY WORDS: alkali solution treating; dispersive liquid-liquid microextraction; gas chromatography-tandem mass spectrometry; meat products; N-nitrosamines

0 引言

肉制品在人们的日常生活中必不可少,为了提高肉制品的色泽和风味,通常加入亚硝酸盐作为防腐剂和护色剂^[1]。肉制品中的蛋白质和氨基酸在微生物作用下会降解为胺类物质。在一定的条件下,肉制品中的亚硝酸盐会与这些胺类物质发生亚硝基化反应,从而生成 N-亚硝胺类化合物^[2–3]。国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IRAC)将 N-亚硝基二甲胺和 N-二乙基亚硝胺认定为 2A 级致癌物^[4]。目前,我国 GB 2762—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量(含第 1 号修改单)》规定肉制品(除肉类罐头外)中的 N-亚硝基二甲胺的限量为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其他种类的 N-亚硝胺化合物限量尚未规定。

N-亚硝胺类化合物的检测方法主要有气相色谱-热能分析法^[5–6]、气相色谱法^[7–8]、气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)^[9–11]和超高效液相色谱-串联质谱法^[12–13]等。热能分析仪灵敏度高、专一性强,但仪器价格昂贵、对难分离 N-亚硝胺类物质的选择性较差。气相色谱-质谱法定性不准确,易造成假阳性。液相色谱法适合非挥发性、相对分子质量较大的 N-亚硝胺类化合物的分析。气相色谱-串联质谱法具有较高的准确性、灵敏性和抗干扰能力,对痕量物质的检测有很好的分析能力。N-亚硝胺化合物含量较低,在检测过程中为了减少其他杂质造成的干扰,需要对样品进行有效的前处

理过程。文献报道的前处理方式主要有水蒸气蒸馏-液液萃取法^[14]、固相萃取^[15–17]、分散固相萃取^[18–19]、QuEChERS^[20–21]等,这些方法各有优势,但水蒸气蒸馏法取样量大、费时费力、有毒试剂用量大,其他 3 种方法均存在有机试剂用量大、对环境不友好、耗材贵等特点。近年来,随着绿色化学理念的推广,分散液液微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)因有机试剂使用量为微升级别、富集倍数高、操作简单等特点,已广泛应用于农药残留^[22–24]、邻苯二甲酸酯^[25–27]和多环芳烃^[28–29]的测定。但目前为止,分散液液微萃取在肉制品中亚硝胺化合物的检测方面的研究鲜少被报道。因此建立一种高效快速、绿色环保、定性准确和灵敏度高的检测方法尤为重要。

本研究采用氢氧化钡碱溶液对肉制品进行加热皂化,除去油脂干扰,将 N-亚硝胺化合物提取到水溶液中,进一步优化 DLLME 参数,建立一种有机试剂使用量低、绿色环保和高效富集的前处理方法。以稳定同位素为内标,再结合 GC-MS/MS 的高选择性和高灵敏性,实现对肉制品中的 9 种 N-亚硝胺化合物的准确分析,并进行实际应用,以为肉制品中 N-亚硝胺化合物的风险评估提供方法支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

肉制品购自当地超市。

N-亚硝基二甲胺(N-nitrosodimethylamine, NDMA)、N-亚硝基甲基乙基胺(N-nitrosodiethylamine, NMEA)、N-二乙基亚硝胺(N-nitrosodiethylamine, NDEA)、N-二丙基亚硝胺(N-nitrosodipropylamine, NDPA)、N-亚硝基哌啶(N-nitrosopiperidine, NPIP)、N-亚硝基吡咯烷(N-nitrosopyrrolidine, NPYR)、N-亚硝基吗啉(N-nitrosomorpholin, NMOR)、N-亚硝基二异丙胺(N-nitrosodiisopropylamine, NDIPA)、N-亚硝基乙基异丙基胺(N-nitrosoisopropylethyl amine, EIPNA)(分析纯, 北京曼哈格检测技术股份有限公司); NDMA-d6 甲醇溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、NDPA-d14 甲醇溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、NPYR-d4 甲醇溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(上海安谱实验科技股份有限公司); 二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇、丙酮、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 四氯化碳、无水硫酸钠、氢氧化钡(八水)[$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$](分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent8890-7010B 气相色谱-串联质谱仪[配有电子轰击源(electron impactation, EI)、HP-INNOWAX 柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm)](美国安捷伦公司); DK-S26 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); SQP-电子天平(精度 0.01 g, 美国塞多利斯科学仪器有限公司); Milli-Q 超纯水机(德国 Merck 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线溶液配制

分别准确称 9 种 N-亚硝胺各 10 mg 至同一 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度。配制成质量浓度为 1 mg/mL 的混合标准储备液。用甲醇进一步稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液。

分别准确移取 3 种内标标准品溶液(NDMA-d6、NDPA-d14、NPYR-d4)各 100 μL 至同一 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度。配制成质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合内标储备液。用甲醇进一步稀释成 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合内标工作液。

上述标准溶液均置于 -18°C 避光保存。

1.3.2 样品前处理

(1) 样品提取

称取经均质的火腿样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 25 μL 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3 种同位素内标工作溶液, 静置 10 min, 使内标溶液充分吸收, 加入 1.5 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 和 30 mL 超纯水, 摇匀, 于 80°C 水浴处理 2 h(每隔 30 min 摇匀一次)。8000 r/min 离心 2 min, 取出上清液于另一 50 mL 离心管, 并加入 4 g 无水硫酸钠, 迅速摇匀涡旋 2 min, 8000 r/min 离心 2 min, 取上清液于另一 50 mL 离心管中待用。

(2) DLLME 处理

在上述 50 mL 离心管中加入 1 mL 甲醇和 500 μL 二氯甲烷, 涡旋 2 min, 8000 r/min 离心 2 min, 取出二氯甲烷萃取液于进样瓶中上机分析。

1.3.3 仪器检测条件

色谱条件: 色谱柱: HP-INNOWAX 柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温: 初始温度为 50°C , 保持 1 min, 以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 120°C , 保持 1 min, 以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 220°C , 保持 3 min, 以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C , 保持 12 min; 后运行温度为 270°C ; 后运行时间为 5 min; 进样口温度 250°C ; 进样模式: 不分流; 进样量: 2 μL ; 载气为氦气; 柱流量: 1 mL/min。

质谱条件: EI 离子源; 电离能量: 70 eV; 采集模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 离子源温度: 230°C ; 四极杆温度: 150°C ; 传输线温度: 260°C ; 溶剂延迟为 5 min, 参数见表 1。

表 1 9 种 N-亚硝胺的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of 9 kinds of N-nitrosamines

目标物	定量离子对	碰撞能量 /eV	定性离子对(m/z)	碰撞能量 /eV
NDMA	74.0>44.1	5	74.0>42.1	20
NDMA-d6	80.0>50.1	5	80.0>46.1	20
NMEA	88.0>71.1	5	88.0>42.1	20
NDEA	102.0>85.1	5	102.0>44.1	15
EIPNA	116.0>99.1	5	116.0>44.1	15
NDIPA	130.0>42.1	10	130.0>88.1	5
NDPA	130.0>113.1	3	130.0>43.1	10
NDPA-d14	143.9>126.2	5	143.9>50.1	15
NPIP	114.0>84.1	5	114.0>42.1	20
NPYR	100.0>55.0	5	100.0>70.1	5
NPYR-d4	104.0>74.1	5	104.0>58.1	5
NMOR	116.0>86.1	3	116.0>56.1	15

1.3.4 基质效应评价方式

在 GC-MS/MS 分析中, 肉制品中的基质可能会影响 N-亚硝胺的离子化效率, 从而造成分析结果的偏差, 因此需对本研究的基质效应(matrix effects, ME)进行评价, 按照 $\text{ME} = [\text{基质峰面积}/\text{纯溶剂峰面积}] \times 100\%$ 计算基质效应^[30]。 $|\text{ME}-1| > 50\%$ 为强基质效应, $|\text{ME}-1| \leq 20\%$ 为弱基质效应, $20\% < |\text{ME}-1| \leq 50\%$ 为中等基质效应。

1.4 数据处理

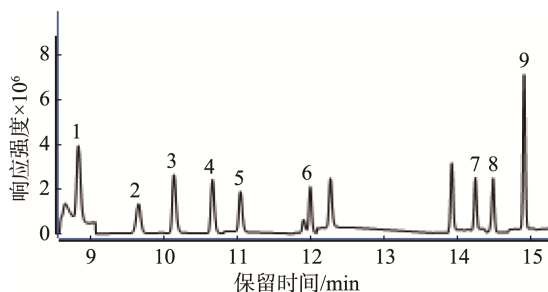
采用 Origin 9.0 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 色谱、质谱条件的选择

N-亚硝胺化合物种类繁多, 含量较低, 极性相差较大。GC-MS/MS 法具有强抗干扰性、高灵敏性和高特异性的特点, 所以适用于 N-亚硝胺化合物的分析测定。参考孔祥一等^[4]的研究结果, 本研究选用强极性的聚乙二醇石英毛细管柱

HP-INNOWAX 柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)对肉制品中 9 种 N-亚硝胺进行分离与分析。通过对升温速率、前级离子、碎片离子的优化,所有分析物获得了良好的分离效果和较高的灵敏度。9 种 N-亚硝胺的总离子流色谱图如图 1 所示。



注: 1. NDMA 和 NDMA-d6; 2. NMEA; 3. NDEA; 4. EIPNA; 5. NDIPA; 6. NDPA 和 NDPA-d14; 7. NPIP; 8. NPYR 和 NPYR-d4; 9. NMOR。

图 1 9 种 N-亚硝胺类化合物的总离子流色谱图(5 μg/kg)

Fig.1 Total ion chromatogram of 9 kinds of N-nitrosamines standard working solution (5 μg/kg)

2.2 样品提取步骤的选择

2.2.1 皂化条件的选择

肉制品中脂肪含量较高,易对目标物的检测产生干扰。本研究选用碱溶液对肉制品中的脂肪进行充分皂化,使 N-亚硝胺化合物提取至水溶液。研究现象表明,使用氢氧化钠皂化后得到的提取液浑浊并且黏稠,离心后也不易取出,这一结果与翟孟婷等^[31]的研究结果相吻合。相比较而言, Ba(OH)₂·8H₂O 的溶解性比较低,并且能使肉制品中的脂肪彻底皂化,蛋白沉淀完全,提取液黏度小,离心后澄清。所以本研究选择 Ba(OH)₂·8H₂O 作为皂化条件的碱溶液。

Ba(OH)₂·8H₂O 用量和皂化时间影响油脂的皂化程度,本研究对 Ba(OH)₂ 用量(0.5、1.0、1.5、2.0 g)和皂化时间(1、2、3 h)进行考察。结果发现,当 Ba(OH)₂·8H₂O 用量低于 1.5 g 时,油脂皂化不彻底;当 Ba(OH)₂·8H₂O 用量大于 1.5 g

时,提取液皂化完全且澄清,便于进行后续实验。当皂化时间为 1 h 时,提取液未皂化完全,溶液上方有油层;当皂化时间为 2 h 时,提取液中油层消失。随着皂化时间变长,提取液出现褐变现象。本研究选择 Ba(OH)₂·8H₂O 用量为 1.5 g,皂化时间为 2 h。

2.2.2 无机盐的选择

无机盐的选择对于本研究起着关键作用,主要为:(1)样品提取步骤中,碱溶液对样品皂化后,为了使提取溶液更加澄清,需要去除剩余的氢氧化钡。(2)在 DLLME 步骤中,加入无机盐会改变溶液的离子强度,离子强度会影响 N-亚硝胺在样品水溶液和萃取剂之间的分配系数,有利于目标物由水溶液转移至萃取剂。综合考虑,本研究选择无水硫酸钠作为最佳无机盐种类。

本研究考察了不同质量(1、2、3、4、5、6 g)的硫酸钠对萃取效率的影响。结果发现,当硫酸钠的质量 1~4 g 范围内,皂化离心后的溶液浑浊,硫酸钠不能将 Ba(OH)₂·8H₂O 沉淀完全,并且在 DLLME 中乳化较严重。当硫酸钠质量大于 4 g 时,由于离子强度过大,所有 N-亚硝胺的响应随硫酸钠质量增大而相应降低。这是因为离子强度有两方面作用:(1)降低 N-亚硝胺在水相中的溶解度,提高有机相的萃取效率;(2)会增大水的黏度,使得 N-亚硝胺在水相中的传质系数降低,进而造成萃取效率下降。本研究中无水硫酸钠的质量为 4 g。

2.3 DLLME 的选择

2.3.1 萃取剂的选择

选择合适的萃取剂对提高 N-亚硝胺萃取效率至关重要。在 DLLME 中,萃取剂需满足:(1)在样品溶液中溶解度较小;(2)对目标物有较强的萃取能力;(3)有良好的色谱行为,与目标物的色谱峰能较好地分开^[5]。本研究分别考察了二氯甲烷、三氯甲烷和四氯甲烷作为萃取剂时对目标物的响应。图 2a 结果显示,二氯甲烷对所有 N-亚硝胺的响应均高于其他优化试剂,故选择二氯甲烷作为萃取剂。

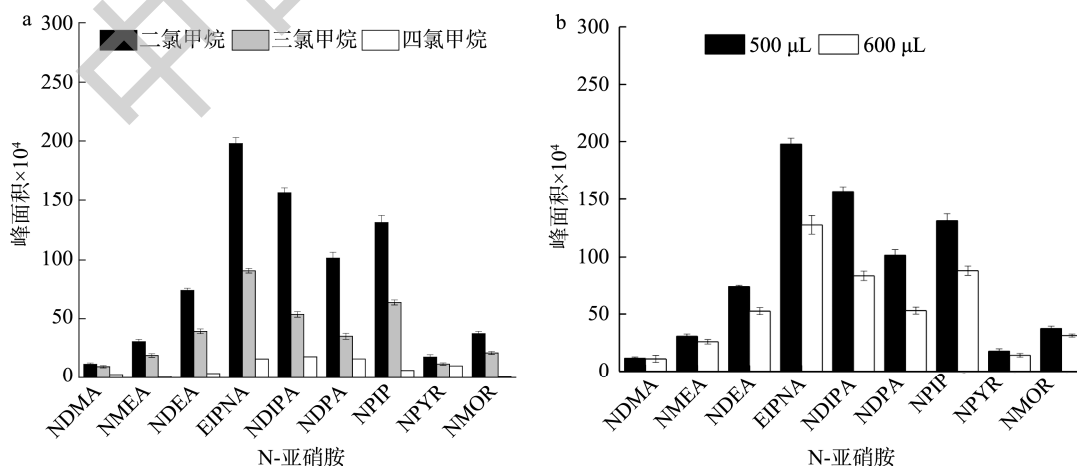


图 2 萃取剂种类(a)和体积(b)对提取效率的影响(n=3)

Fig.2 Influence of extraction solvents types (a) and volumes (b) on extraction recoveries (n=3)

萃取剂体积决定了 DLLME 的萃取效率。本研究考察了二氯甲烷体积为 300、400、500、600 μL 的萃取效率。实验过程中发现,当二氯甲烷体积分别为 300 和 400 μL 时,最后上机液体积不易取出。主要原因是萃取剂和分散剂存在一定的互溶性,有部分体积的二氯甲烷溶解于分散剂中,导致上机液的体积少于 300 和 400 μL ,实验操作不易。图 2b 表明,当二氯甲烷的体积为 500 μL 时,所有 N-亚硝胺的响应均最高。因此萃取剂二氯甲烷的体积选择 500 μL 。

2.3.2 分散剂的选择

在 DLLME 中,分散剂作为目标物从样品水溶液转移到萃取剂中的媒介,分散剂的选择需满足以下特点:(1)能够使萃取剂以微小的液滴均匀分散在样品水溶液中,与分析物充分接触,提高萃取效率;(2)与目标物分离度大,具有良好的色谱行为;(3)能完全溶解萃取剂,易溶于样品水溶液^[24]。综合以上特点,本研究分别考察了乙腈、甲醇和丙酮分别作为分散剂时所有目标物的响应。图 3a 结果表明,对于所有目标物,甲醇作为分散剂时萃取效率最高,因此在后续实验中选择甲醇作为 DLLME 的分散剂。

分散剂体积会直接影响样品水溶液、萃取剂和分散剂乳浊液的形成,进而影响萃取剂在样品水溶液中的分散及萃取效率。本研究分别考察了 0.5、1.0、2.0 和 3.0 mL 的甲醇对萃取效率的影响。实验结果如图 3b 所示,当甲醇体积小于 2.0 mL 时,所有 N-亚硝胺的提取效率随体积增大而增大,当甲醇体积在 1.0~3.0 mL 范围内,所有目标物的提取效率随分散剂体积的增大而降低。主要原因为随着甲醇体积在一定范围内增大,萃取剂二氯甲烷在样品水溶液中容易形成更均匀的小液滴,提取的更充分;当甲醇体积过大时,会增大 N-亚硝胺在甲醇中的溶解度,进而导致二氯甲烷的萃取效率降低。因此选择甲醇体积为 1.0 mL。

2.4 方法学考察

2.4.1 定量方式、方法线性范围与灵敏度

本研究采用内标法定量,按照 1.3.4 节的定义计算目

标物和 3 种内标化合物的基质效应。根据目标物与内标基质效应的相近程度确定每种目标物的内标(表 2)。其中 NDMA、NPYR 以 NDMA-d6 为内标,EIPNA、NDEA、NPIP、以 NDPA-d14 为内标,NDIPA、NDPA、NMEA、NMOR 以 NPYR-d4 为内标。

按照 1.3.2 前处理过程配制所有 N-亚硝胺的混合空白基质标准溶液(1.0、2.5、5.0、15.0、50.0 ng),按 1.3.3 节仪器分析条件进行测定,以所得分析物峰面积对分析物浓度做标准曲线。在优化的条件下,通过向空白样品中添加不同水平浓度的目标化合物来确定方法的检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantitation, LOQs),以 3 倍和 10 倍信噪比对应的目标物含量作为 LOD 和 LOQ。结果如表 2 所示:除了 NDMA 的线性范围为 2.5~50.0 ng,其他 8 种 N-亚硝胺在 1.0~50.0 ng 范围内线性关系均良好,9 种 N-亚硝胺的相关系数(r^2)范围为 0.9954~0.9999,LODs 为 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,LOQs 为 0.2~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。表明所建立方法的灵敏度较高,适合肉制品中 N-亚硝胺的同时检测。

2.4.2 方法回收率和精密度

采用最佳实验条件,在空白火腿、五香鸡肉和牛肉样品中添加目标物进行回收率实验,添加水平为 0.5、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每个水平重复测定 6 次,按优化的方法测定 9 种 N-亚硝胺的含量。N-亚硝胺的回收率为 78.2%~120.4%,相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.3%~11.2%,详见表 3。表明所建立方法具有良好的准确度和精密度,可满足肉制品中 N-亚硝胺的检测要求。

2.5 实际样品测定

采用本研究建立的方法对随机抽取的 45 批次肉制品(包括 15 批次香肠和火腿、10 批次牛肉制品、10 批次扒鸡、10 批次腊肉等)进行 N-亚硝胺检测,研究结果表明,有 1 批次腊肉样品中 NDMA 有检出(1.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$),与标准方法的结果一致(1.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$),其他样品中 9 种 N-亚硝胺均未检出。

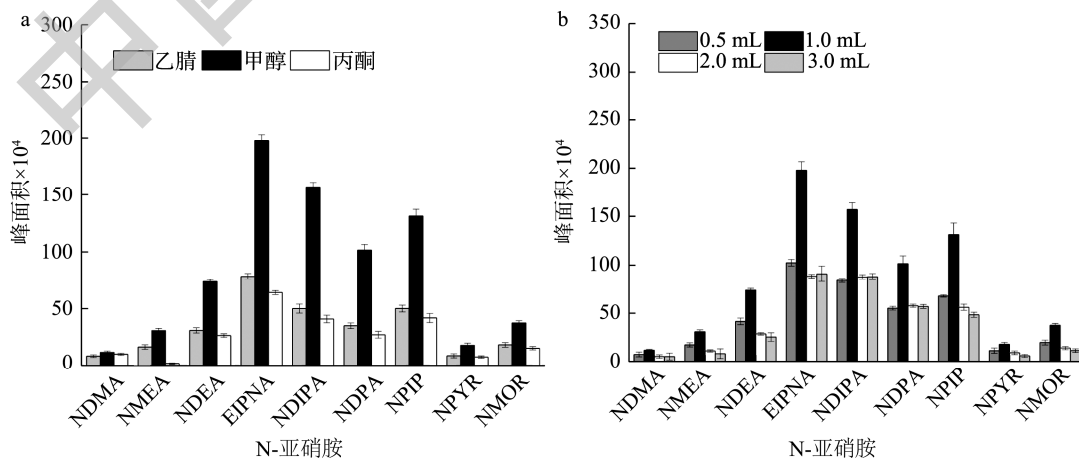


图3 分散剂种类(a)和体积(b)对 DLLME 提取效率的影响($n=3$)

Fig.3 Influence of dispersive solvents types (a) and volumes (b) on extraction recoveries ($n=3$)

表 2 9 种 N-亚硝胺的线性关系、 r^2 、LODs、LOQs 和 MEs
Table 2 Linear ranges, r^2 , LODs, LOQs and MEs for 9 kinds of N-nitrosamines

目标物	线性范围/(ng)	线性方程	r^2	LODs/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQs/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ME-1 /%
NDMA	2.5~50.0	$Y=0.6806X+0.3040$	0.9954	0.2	0.5	10.5
NDMA-d6	/	/	/	/	/	12.1
NMEA	1.0~50.0	$Y=2.1824X-0.0726$	0.9998	0.1	0.2	26.9
NDEA	1.0~50.0	$Y=5.3240X+0.4086$	0.9998	0.1	0.2	4.5
EIPNA	1.0~50.0	$Y=0.3127X-0.0019$	0.9998	0.1	0.2	8.6
NDIPA	1.0~50.0	$Y=2.4644X-0.0384$	0.9999	0.1	0.2	24.5
NDPA	1.0~50.0	$Y=1.1150X+0.2227$	0.9992	0.1	0.2	16.8
NDPA-d14	/	/	/	/	/	5.7
NPIP	1.0~50.0	$Y=1.5930X+0.2054$	0.9994	0.1	0.2	5.5
NPYR	1.0~50.0	$Y=1.8192X+0.1944$	0.9998	0.1	0.2	15.8
NPYR-d4	/	/	/	/	/	25.6
NMOR	1.0~50.0	$Y=2.4442X+0.1727$	0.9998	0.1	0.2	24.9

注: /表示无数据。

表 3 火腿、五香鸡肉和牛肉样品中 9 种 N-亚硝胺的加标回收率和 RSDs($n=6$)
Table 3 Spiked recoveries and RSDs of the 9 kinds of N-nitrosamines in ham, spiced chicken and beef samples ($n=6$)

目标物	加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	火腿		鸡肉		牛肉	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
NDMA	0.5	82.4	5.3	105.5	4.4	95.5	5.1
	5.0	81.4	1.9	109.6	2.6	101.0	3.7
NMEA	0.5	108.1	10.3	87.5	3.2	84.9	5.8
	5.0	95.4	1.8	104.0	2.9	97.4	4.3
NDEA	0.5	91.2	2.3	78.2	3.5	85.6	6.4
	5.0	91.3	2.7	93.0	6.1	97.4	2.3
EIPNA	0.5	99.9	9.0	105.3	5.8	105.7	6.0
	5.0	117.5	4.3	112.5	3.9	98.0	4.5
NDIPA	0.5	110.3	1.3	105.3	10.0	97.8	4.2
	5.0	98.7	2.1	112.3	1.6	98.0	4.3
NDPA	0.5	96.1	3.0	105.3	5.0	97.8	3.5
	5.0	79.9	2.3	118.4	5.4	105.4	7.3
NPIP	0.5	120.4	1.6	79.0	4.7	97.8	5.0
	5.0	112.9	2.7	85.0	3.9	86.4	6.0
NPYR	0.5	116.4	6.2	79.8	4.8	84.9	5.7
	5.0	104.8	1.4	93.0	4.1	97.4	11.2
NMOR	0.5	98.5	8.7	87.0	5.3	86.4	7.7
	5.0	98.2	5.9	104.0	7.7	86.9	6.8

3 结论

本研究建立了碱液处理-DLLME 结合 GC-MS/MS 测定肉制品中 N-亚硝胺的检测方法,同时对影响样品提取和 DLLME 步骤的因素分别进行了考察,确定了最佳实验条件。该研究选用氢氧化钡作为碱溶液将肉制品皂化,进而把 N-亚硝胺类目标物提取到水溶液中,再通过加入微量二氯甲烷为

萃取剂进行高效富集萃取。在本研究中,除了 NDMA 的线性范围为 2.5~50.0 ng,其他 8 种 N-亚硝胺在 1.0~50.0 ng 范围内线性关系均良好,9 种 N-亚硝胺的 r^2 范围为 0.9954~0.9999,LODs 为 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,LOQs 为 0.2~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在火腿、五香鸡肉和牛肉样品中 9 种 N-亚硝胺的回收率为 78.2%~120.4%,RSDs 为 1.3%~11.2%。该方法使用的有机试剂体积非常低,具备低毒和对环境绿色友好等特点,并

且具有良好的准确性和精密性,适用于肉制品中9种N-亚硝胺化合物的同时测定。

参考文献

- [1] DRABIK-MARKIEWICZ G, JAEGHER B, MEY E, *et al.* Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 657(2): 123–130.
- [2] CINTYA H, SILALAH J, PUTRA EL, *et al.* Analysis of nitrosamines in processed meat products in medan city by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(8): 1382–1387.
- [3] 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-nitrosamine in meat products by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(2): 207–215.
- [4] 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-nitrosamines in animal derived foods by QuEChERS-isotope dilution combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(1): 96–103.
- [5] 林睿, 徐敦明, 黄旖珺, 等. 气相色谱-热能分析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 YJ, *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.
- [6] 马兴, 肖亚兵, 陈颖, 等. 快速水蒸气蒸馏-气相色谱热能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.
- [7] 陆正, 陈红波, 林刚健, 等. QuEChERS-EMR结合GC-MS检测干制水产品中N-二甲基亚硝胺含量[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(22): 181–184.
LU Z, CHEN HB, LIN GJ, *et al.* Detection of N-dimethylnitrosamine in dried aquatic products by QuEChERS-EMR combined with GC-MS [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2020, 48(22): 181–184.
- [8] 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.
- [9] 蒋玲波, 高卓瑶, 唐雷鸣, 等. QuEChERS技术结合气相色谱-串联质谱法同时测定水产品中10种亚硝胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(1): 27–33.
JIANG LB, GAO ZY, TANG LM, *et al.* Simultaneous determination of 10 kinds of nitrosamines in aquatic products by QuEChERS combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(1): 27–33.
- [10] ZHU M, YE Q, ZHOU T, *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.
- [11] HUANG M, ZENG Q, LIU Z, *et al.* Development of a fully automated analytical platform based on static headspace-gas chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of five N-nitrosamines in dried aquatic products of animal origin [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(15): 7107–7114.
- [12] 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 by-products in drinking water by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2022, 43(2): 310–315.
- [13] 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 Anal Lab*, 2021, 40(12): 1451–1454.
- [14] 张伟伟, 赵春华, 付萌, 等. 水蒸气蒸馏分离-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中N-二甲基亚硝胺的含量[J]. *理化检验*, 2019, 55(9): 1028–1031.
ZHANG WW, ZHAO CH, FU M, *et al.* HPLC-MS/MS determination of N-dimethyl nitrosamine in food with separation by steam distillation [J]. *Phys Test Chem Anal*, 2019, 55(9): 1028–1031.
- [15] ASTUTI MP, JASEMIZAD T, PADHYE LP. Surface modification of coconut shell activated carbon for efficient solid-phase extraction of N-nitrosodimethylamine from water [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(2): 618–627.
- [16] 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*, 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*, 2021, 57(6): 487–492.
- [17] PANG YQ, CHEN XJ, LI XY, *et al.* Magnetic solid-phase extraction of tobacco-specific N-nitrosamines using magnetic graphene composite as sorbent [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(19): 3119–3125.
- [18] 赵博, 邓美林, 杨小珊, 等. 分散固相萃取-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*, 2016, 34(10): 998–1004.
ZHAO B, DENG ML, YANG XS, *et al.* Determination of nine

- N-nitrosamines in animal derived foods by dispersive solid-phase extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, 34(10): 998–1004.
- [19] 姚瑞雄. 分散固相萃取-同位素稀释-气相色谱-质谱法测定酱油中 5 种 N-亚硝胺[J]. *分析实验室*, 2018, 37(2): 183–187.
- YAO RX. Simultaneous determination of five N-nitrosamines in soy sauces by dispersive solid-phase extraction and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin Anal Lab*, 2018, 37(2): 183–187.
- [20] KONG X, ZHUANG L, FANG E, *et al.* Determination of nine N-nitrosamines in animal derived foods by QuEChERS-isotope dilution combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(1): 96–103.
- [21] 李玮, 贾彦博, 励炯, 等. QuEChERS-气相色谱-串联质谱法测定熟肉制品中 9 种 N-亚硝胺类化合物[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(2): 141–145.
- LI W, JIA YB, LI J, *et al.* Determination of nine N-nitrosamines in cooked meat by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(2): 141–145.
- [22] FAREJZADEH MA, FAZLI N, PEZHANFAR S, *et al.* Combination of a dispersive solid phase extraction method based on octadecylamine modified magnetic nanoparticles with dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction and preconcentration of pesticides [J]. *Anal Methods*, 2022, 14(24): 2376–2388.
- [23] MARDANI A, AFSHARMOGADDAM MR, FARAJZADEH MA, *et al.* A three-phase solvent extraction system combined with deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of some organochlorine pesticides in cocoa samples prior to gas chromatography with electron capture detection [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(18): 3674–3682.
- [24] 李芳芳, 田其燕, 陈克云, 等. 基于疏水性低共熔溶剂的分散液液微萃取结合气相色谱-串联质谱法测定肉及肉制品中拟除虫菊酯农药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(17): 5679–5687.
- LI FF, TIAN QY, CHEN KY, *et al.* Determination of pyrethroid pesticide residues in meat and meat products by gas chromatography-tandem mass spectrometry with hydrophobic deep eutectic solvent-dispersive liquid-liquid microextraction [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(17): 5679–5687.
- [25] ORTEGA-ZAMORA C, JIMENEZ-SKRZYPEK G, GONZALEZSALAMO J, *et al.* Extraction of phthalic acid esters from soft drinks and infusions by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the floating organic drop using a menthol-based natural deep eutectic solvent [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1646: 462132.
- [26] ORTEGA-ZAMORA C, GONZALEZ SALAMO J, HERNANDEZ-SANCHEZ C, *et al.* Menthol-based deep eutectic solvent dispersive liquid-liquid microextraction: A simple and quick approach for the analysis of phthalic acid esters from water and beverage samples [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2020, 8: 8783–8794.
- [27] 梁志森, 岑建斌, 区硕俊, 等. 分散液液微萃取结合气相色谱-四极杆/飞行时间质谱法同时测定饮料中 21 种邻苯二甲酸酯[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3507–3514.
- LIANG ZS, CEN JB, OU SJ, *et al.* Simultaneous determination of 21 kinds of phthalic acid esters in beverage by dispersive liquid-liquid micro-extraction with gas chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3507–3514.
- [28] ERCAN MSF, AYYIDIZ MF, YAZICI E, *et al.* Development and validation of dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons in 200 Antarctica samples by gas chromatography mass spectrometry [J]. *Environ Monit Assess*, 2022, 194(5): 328.
- [29] CALDEIRAO L, FERNANDES JO, GONZALEZ MH, *et al.* A novel dispersive liquid-liquid microextraction using a low density deep eutectic solvent-gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soft drinks [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1635: 461736.
- [30] 门雪, 吴兴强, 全凯旋, 等. 改进的 QuEChERS 法结合液相色谱-高分辨质谱筛查热带水果中 33 种新烟碱类杀虫剂及杀菌剂[J]. *分析测试学报*, 2022, 41(6): 820–826.
- MEN X, WU XQ, TONG KX, *et al.* Screening of 33 neonicotinoid insecticides and fungicides in tropical fruits by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry with a modified QuEChERS method [J]. *J Instr Anal*, 2022, 41(6): 820–826.
- [31] 翟孟婷, 王宗义, 徐芮, 等. 碱液处理-活性炭柱固相萃取结合 GC-MS/MS 法检测鱼干、虾皮和虾仁中 8 种 N-亚硝胺[J]. *质谱学报*, 2018, 39(3): 351–359.
- ZHAI MT, WANG ZY, XU R, *et al.* Determination of 8 N-nitrosamines in dried fish, dried small shrimp and shrimp meat by GC-MS/MS with alkali solution treating followed active carbon cartridge solid phase extraction [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2018, 39(3): 351–359.

(责任编辑: 黄周梅 郑 丽)

作者简介



李芳芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lifangfyc@163.com



刘艳明, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: msymliu@163.com