

PTV-GC-MS/MS 法测定肉制品中 N-亚硝胺

摘要： 本文建立了程序升温进样-三重四极杆气相色谱质谱联用仪（PTV-GC-MS/MS）同时测定肉制品中9种N-亚硝胺类化合物含量的内标方法。结果表明：在5~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内，各组分线性相关系数r均在0.9992以上。对5 $\mu\text{g/L}$ N-亚硝胺类化合物标准溶液进行重复性实验，各组分与内标物峰面积比值的相对标准偏差（RSD%）在5.27% (n=5) 以下，9种N-亚硝胺类化合物的最低检出限（LOD）分布在1.13 $\mu\text{g/L}$ 以下，在5 $\mu\text{g/kg}$ 加标浓度下，各组分的回收率分布在63.2~98.3%之间，此方法可为肉制品中N-亚硝胺类化合物的准确测定提供参考。

关键词： PTV GC-MS/MS N-亚硝胺 肉制品

亚硝胺类化合物是具有 $\text{R}_2(\text{R}_1)\text{N-N=O}$ ，结构的强致癌有机化合物，在食品加工和贮藏过程中，由亚硝酸盐和次级胺类物质经过一定的反应生成，常见于腌制、烟熏和烘烤等肉制品中。GB 2762-2012 《食品安全国家标准 食品中污染物限量》规定肉及肉制品中N-二甲基亚硝胺含量不得超过3 $\mu\text{g/kg}$ 。

N-亚硝胺检测方法有气相色谱热能分析仪联用法(GC-TEA)、气相色谱质谱联用法(GC-MS)、气相色谱串联质谱法(GC-MS/MS)、液相色谱法(HPLC)、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)。GB/T 5009.26-2003 《食品中N-亚硝胺类的测定》采用GC-TEA和高分辨GC-MS两种方法检测食品中N-亚硝胺，两种方法，样品前处理浓缩倍数高，操作复杂。

本文基于岛津程序升温进样-三重四极杆气相色谱质谱联用仪PTV-GCMS-TQ8040，建立了测定肉制品中9种N-亚硝胺类化合物的内标方法。此方法的优点是样品前处理操作简单，实验结果受化学干扰小，灵敏度高，可为肉制品中N-亚硝胺类化合物快速准确地测定提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

三重四极杆气质联用仪（GCMS-TQ8040）

1.2 分析条件

PTV 进样口温度程序：40 $^{\circ}\text{C}$ (0.07min)_200 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _240 $^{\circ}\text{C}$ (17min)

分流阀分流程序：

0-0.06min 分流比 10: 1

0.06-2.5min 分流阀关闭

2.5min-分析结束 分流比 10:1

GC-MS 条件:

色谱柱: WondaCAP WAX, 30m×0.25mm×0.25μm

柱温程序: 40°C(2.5min)_20°C/min_100°C_10°C/min_190°C_20°C/min_250(6min)

柱流量: 1.0 mL/min

溶剂切割时间: 6.5min

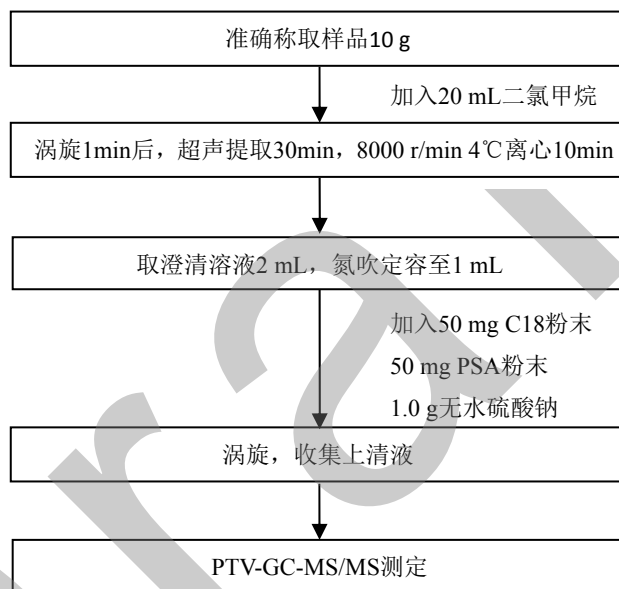
检测器电压: 调谐电压+0.6 kV

离子源温度: 200°C

接口温度: 240°C

采集方式: MRM, 见表 1

1.2 样品前处理



2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 图

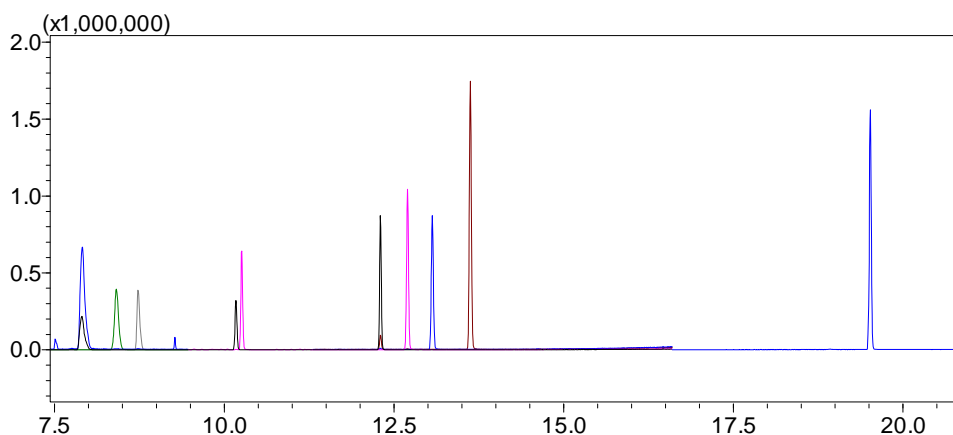


图1 N-亚硝胺类化合物 MRM 图 (200 µg/L)

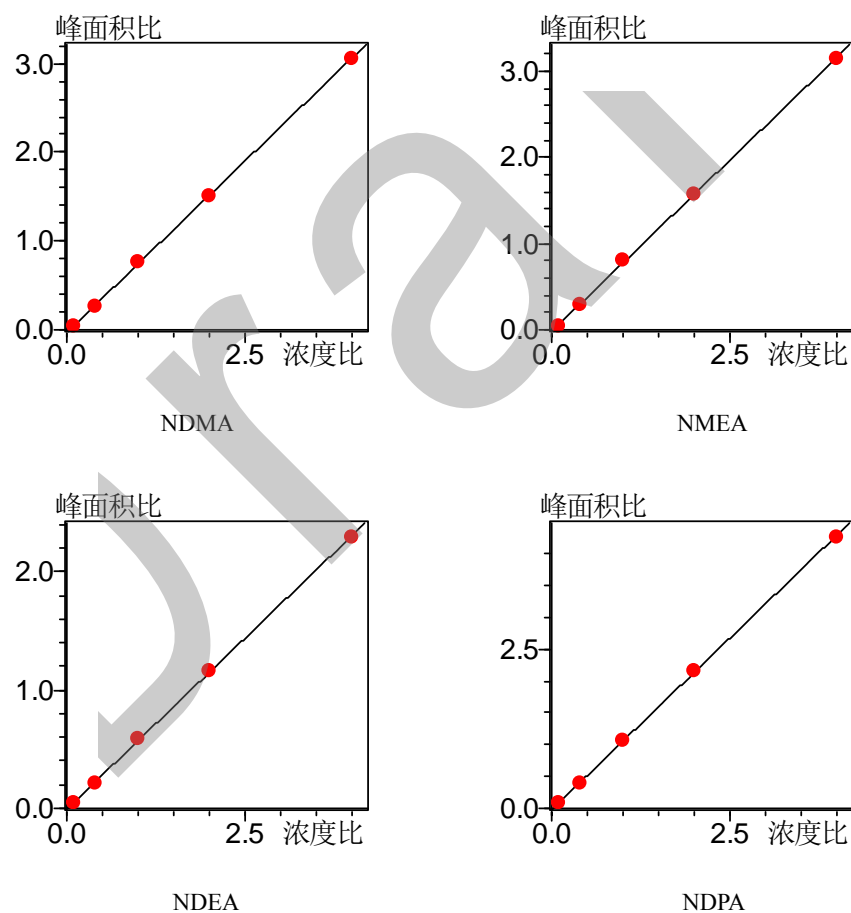
表1 N-亚硝胺类化合物及内标物保留时间及 MRM 参数

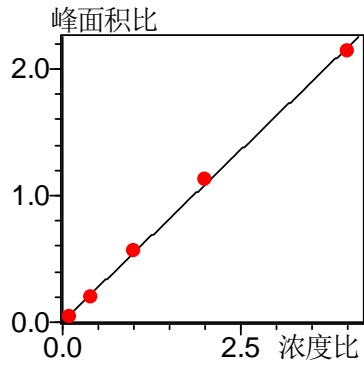
No	中文名称	英文名称	CAS 号	英文缩写	保留时间 (min)	定量离子对	CE	参考离子对
1	N-二甲基亚硝胺-d6	N-Nitroso dimethylamine-d6	17829-05-9	NDMA-d6	7.915	80.00>50.10	8	80.00>46.10
2	N-二甲基亚硝胺	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	NDMA	7.925	74.00>44.00	7	74.00>42.10
3	N-甲基乙基亚硝胺	N-Nitrosomethylethylamine	10595-95-6	NMEA	8.425	88.00>71.10	6	88.00>73.10 88.00>57.10
4	N-二乙基亚硝胺	N-Nitrosodiethylamine	55-18-5	NDEA	8.745	102.00>85.10	6	102.00>56.10 102.00>87.10
5	N-二丙基亚硝胺-d14	N-Nitrosodi-n-propylamine-d14	93951-96-3	NDPA-d14	10.185	144.00>126.20	4	144.00>50.10 126.00>78.10
6	N-二丙基亚硝胺	N-Nitrosodi-n-propylamine	621-64-7	NDPA	10.270	130.00>113.10	4	113.00>71.10 130.00>88.10
7	N-二丁基亚硝胺	N-Nitrosodi-n-butylamine	924-16-3	NDBA	12.320	158.00>99.10	8	158.00>141.20 141.00>99.10
8	N-亚硝基哌啶	N-Nitrosopiperidine	100-75-4	NPIP	12.730	114.00>84.10	8	114.00>55.10 114.00>97.10

9	N-亚硝基吡咯烷	N-Nitrosopyrrolidine	930-55-2	NPYR	13.095	100.00>55.10	8	100.00>70.10
10	N-亚硝基吗啉	N-Nitrosomorpholine	59-89-2	NMorPh	13.655	116.00>86.10	4	86.00>56.10 116.00>56.10
11	N-二苯基亚硝胺	N-Nitrosodiphenylamine	86-30-6	NDPhA	19.545	169.00>167.10	26	168.00>166.10 169.00>66.10

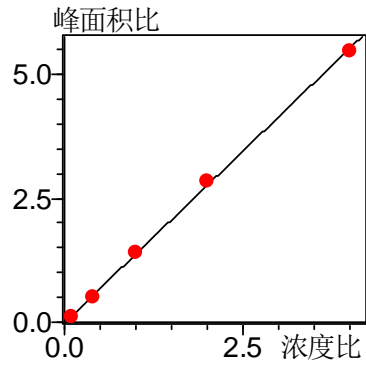
2.2 标准曲线与质量色谱图

用二氯甲烷配置浓度为5、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液，取2 μL 标准溶液进样，以目标组分与内标物浓度比值为横坐标，目标组分与内标物峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线，9种N-亚硝胺类化合物标准曲线及质量色谱图如图2所示；浓度为5 $\mu\text{g/L}$ 的混标连续进样6针，计算各组分峰面积的重复性。标准曲线方程、线性相关系数、检出限及重复性结果见表2。

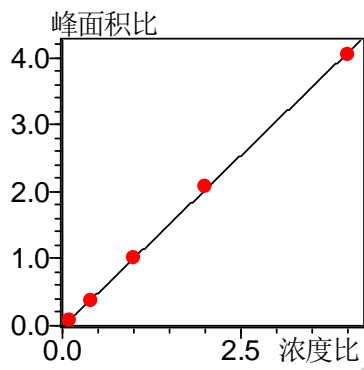




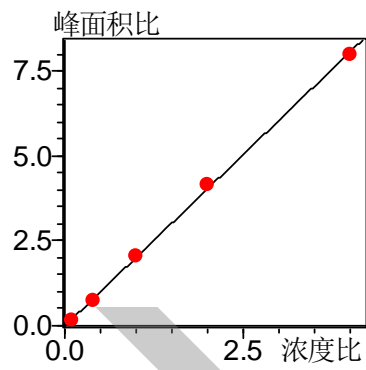
NBA



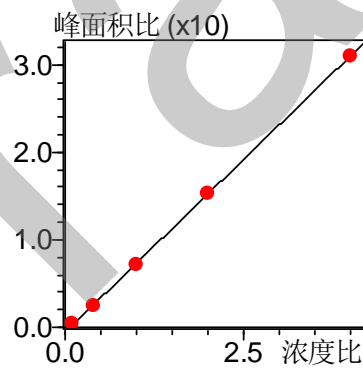
NPIP



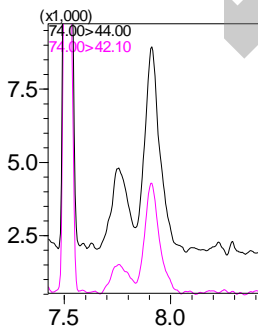
NPYR



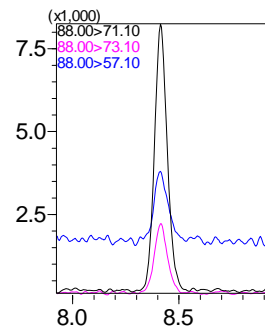
NMorPh



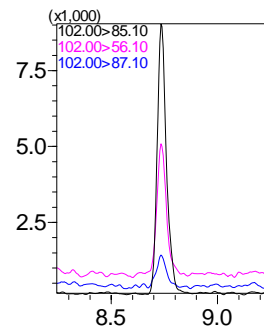
NDPhA



NDMA



NMEA



NDEA

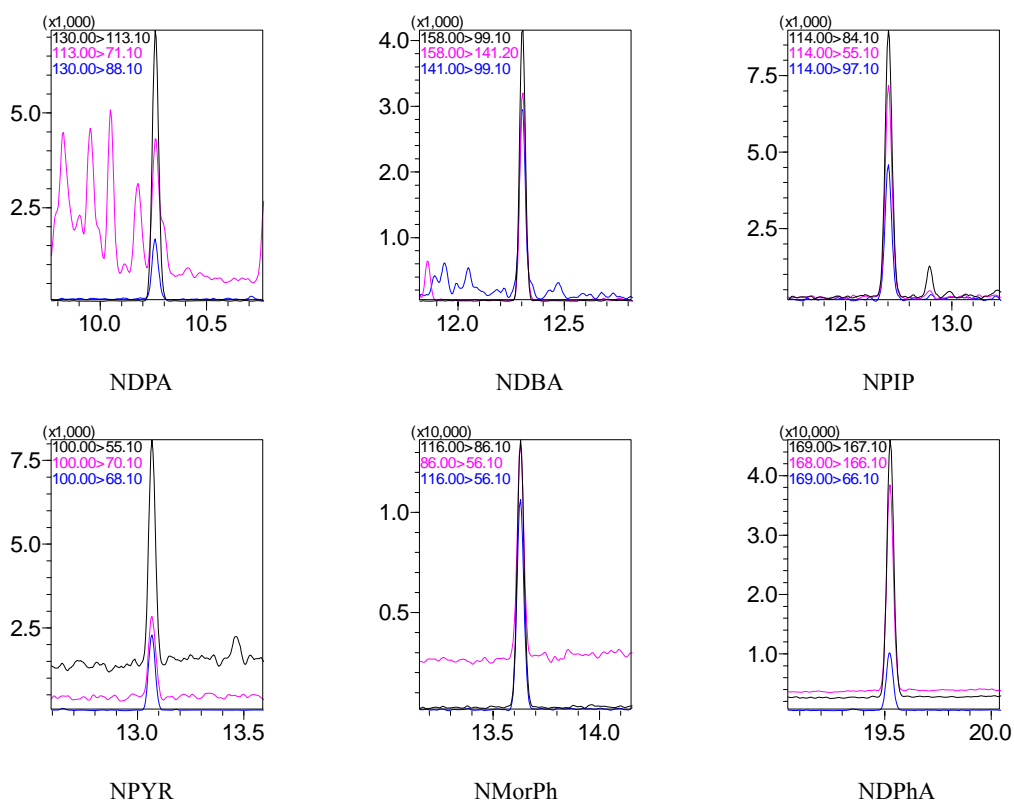


图2 N-亚硝胺类化合物标准曲线及质量色谱图 (5 $\mu\text{g/L}$)

表2 N-亚硝胺类化合物化合物标准曲线方程、线性相关系数、检出限及重复性

No.	化合物名称	标准曲线方程	相关系数 r	LOD ($\mu\text{g/L}$)	峰面积比 RSD (%, n=6)
1	N-二甲基亚硝胺-d6	-	-	-	-
2	N-二甲基亚硝胺	$Y=0.7712X - 0.0305$	0.9999	1.13	5.27
3	N-甲基乙基亚硝胺	$Y=0.7928X - 0.1786$	0.9998	0.47	1.49
4	N-二乙基亚硝胺	$Y=0.5772X - 0.6266$	0.9998	0.41	0.97
5	N-二丙基亚硝胺-d14	-	-	-	-
6	N-二丙基亚硝胺	$Y=1.075X - 0.2121$	0.9998	0.10	0.99
7	N-二丁基亚硝胺	$Y=0.5406X - 0.0062$	0.9992	0.20	2.59
8	N-亚硝基哌啶	$Y=1.382X - 0.0104$	0.9996	0.29	1.86
9	N-亚硝基吡咯烷	$Y=1.024X - 0.0211$	0.9998	0.70	4.52
10	N-亚硝基吗啉	$Y=2.017X - 0.0099$	0.9996	0.20	2.23
11	N-二苯基亚硝胺	$Y=7.877X - 0.5746$	0.9999	0.11	3.39

2.3 重复性实验

对浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 9 种 N-亚硝胺标准混合溶液连续进样 6 次, 考察重复性, 测定结果见表 2 中峰面积比 RSD%。

2.4 回收率

在待测样品中添加 9 种 N-亚硝胺标准混合溶液, 添加水平为 5 $\mu\text{g/kg}$, 加标样品平行处理 3 份, 样品的加标回收率结果见表 3。

表 3 回收率实验结果

No.	化合物名称	平均回收率(%)	RSD (%)
1	N-二甲基亚硝胺	74.4	3.98
2	N-甲基乙基亚硝胺	68.8	1.53
3	N-二乙基亚硝胺	69.3	4.47
4	N-二丙基亚硝胺	80.7	3.41
5	N-二丁基亚硝胺	63.2	4.58
6	N-亚硝基哌啶	69.5	5.62
7	N-亚硝基吡咯烷	65.5	4.22
8	N-亚硝基吗啉	75.0	3.12
9	N-二苯基亚硝胺	63.0	2.70

2.5 样品测试结果

取待测样品 10 g, 按 1.2 样品前处理流程处进行样品前处理, PTV-GC-MS/MS 测定, 样品定量结果如图 4 和表 4 所示。

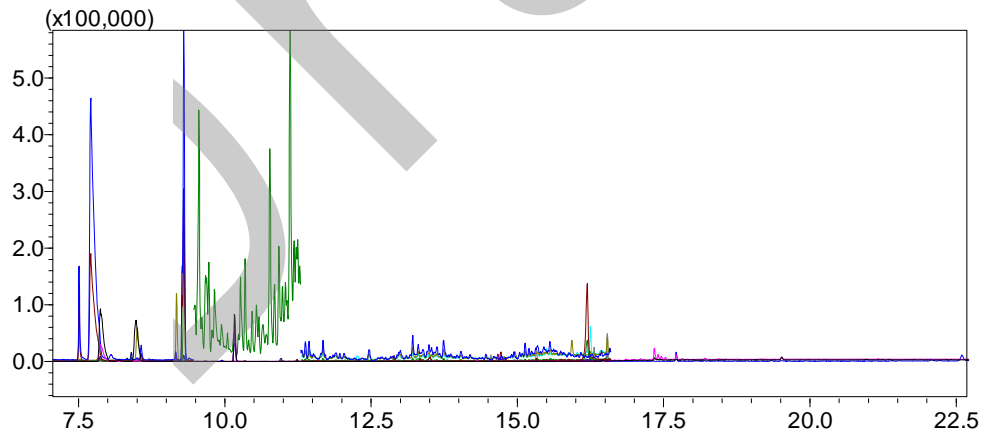


图 4 样品 MRM 图

表4 样品测试结果

No.	化合物名称	定量结果 (µg/kg)
1	N-二甲基亚硝酸胺	N.D
2	N-甲基乙基亚硝酸胺	1.48
3	N-二乙基亚硝酸胺	N.D
4	N-二丙基亚硝酸胺	N.D
5	N-二丁基亚硝酸胺	N.D
6	N-亚硝基哌啶	N.D
7	N-亚硝基吡咯烷	N.D
8	N-亚硝基吗啉	N.D
9	N-二苯基亚硝酸胺	1.11

N.D 表示未检出

3. 结论

采用岛津公司程序升温进样口-三重四极杆气相色谱质谱联用仪(PTV-GCMS-TQ8040)对肉制品中9种N-亚硝酸胺类化合物进行测定。通过PTV进样口将二氯甲烷溶剂去除,结合串联质谱多反应监测(MRM)模式,在简化样品前处理过程的前提下,可有效去除溶剂和基质干扰,9种N-亚硝酸胺类化合物的检测限分布在1.13 µg/L及以下,在5 µg/kg加标浓度下,各组分加标回收率分布在63.2~80.7%之间,此方法定量准确、灵敏度高,可满足肉制品中N-亚硝酸胺类化合物的检测要求。