

气相色谱-质谱联用法测定传统腌菜中的 N-亚硝胺

徐赛男¹, 吴祖芳^{*1}, 陈杰²

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012)

摘要: 建立了气相色谱-质谱(GC-MS)快速测定腌制蔬菜中 N-亚硝胺含量的分析方法。采用固相萃取(SPE)结合 GC/MS 检测了 N-二甲基亚硝胺(NDMA)、N-二乙基亚硝胺(NDEA), 考察了样品不同提取方法、不同固相萃取洗脱剂对比对分离效果的影响。结果表明, 固相萃取相较于超声萃取, 回收率高且峰图干净, 而固相萃取中选用 90% 的甲醇水溶液作为洗脱剂, 不仅回收率均可达 90% 以上, 同时也减少了有机溶剂的使用量, 优化后两种 N-亚硝胺的线性范围均为 0.1~10.0 mg/L; 相关系数分别达到 0.994 和 0.999; 检出限为 0.02 mg/L; 回收率为 90%~112%; 相对标准偏差(RSD)均小于 2.3%, 重现性良好。该方法前处理简便、快速, 易于操作, 适合各类腌制蔬菜中 N-亚硝胺的检测。

关键词: N-二甲基亚硝胺; N-二乙基亚硝胺; 腌制蔬菜; 固相萃取; 气相色谱-质谱

中图分类号: TS 255.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)11—1162—06

Determination of N-Nitrosamine Compounds in Traditional Pickled Vegetables by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

XU Sainan¹, WU Zufang^{*1}, CHEN Jie²

(1. Faculty of Marine, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China)

Abstract: An analytical method was developed to determine the contents of N-nitrosamine compounds in pickled vegetables by solid-phase extraction (SPE) combining gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In this study, different extraction methods and the ratios of the eluents in SPE were investigated. The results showed that solid phase extraction got not only the higher recoveries but also the cleaner spectrum figure peaks compared with ultrasonic extraction. Moreover, by eluting with 90% methanol, the solid phase extraction obtained the recoveries more than 90% as well as reducing the organic solvent usage, the linear correlation coefficients of two N-nitrosamine compounds were up to 0.994 and 0.999 respectively, within 0.1~10.0 mg/L. The detection limits were 0.02 mg/L and the recoveries were 90%~112%. The reproducibility was good with the relative standard deviations (RSD) less than 2.3%. This method is convenient and it is suitable for the determination of N-nitrosamine compounds in the pickled

收稿日期: 2014-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171735); 宁波市农业择优委托项目(2012C10016)。

* 通信作者: 吴祖芳(1963—), 男, 浙江宁波人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究,

E-mail: wuzufang@nbu.edu.cn

vegetables.

Keywords: N-dimethylnitrosamine, N-diethylnitrosamine, pickled vegetables, solid-phase extraction, gas chromatography-mass spectrometry

N-亚硝胺是当今世界公认的强致癌性食品污染物,特别是 N-二甲基亚硝胺(NDMA)和 N-二乙基亚硝胺(NDEA),经烟熏、油炸、焙烤和腌制等贮藏或加工后得到的相应食品中最容易产生^[1]。我国胃癌和食管癌高发区的居民就有喜食烟熏肉和腌制蔬菜的习惯^[2]。腌制蔬菜中,N-亚硝胺是由亚硝酸盐与生物胺在适宜条件下合成的,而这些生物胺大部分是由腌制蔬菜过程中污染的腐败菌分解蛋白质、肽类和氨基酸形成,也有部分是由蔬菜腌制发酵中常见的菌株,如肠膜明串珠菌、植物乳杆菌等降解氨基酸得来^[3-4]。

目前,根据不同原理,食品中 N-亚硝胺的测定方法较多^[5],提纯方法也主要有水蒸气蒸馏^[6-7]、低温真空蒸馏^[8]、液液萃取^[9]、超声波萃取^[10]、固相萃取^[11]及固相微萃取^[12]等。但这些提纯和测定方法主要运用于肉类制品^[13-14]、饮用水^[15-17]、烟草^[18-19]中,对腌菜中 N-亚硝胺的测定仍鲜有报道,尹利端^[20]采用了紫外和可见分光光度法测定市售泡菜中的挥发性亚硝胺;杨宁等^[21]采用 SPE/LC/MS 测定了 6 类腌菜中的亚硝胺含量。在我国,除了产业化腌菜产品之外,更广泛存在的是作坊式、家庭式的传统腌菜,就浙东地区,宁波的臭苋菜梗、臭冬瓜和臭芋茼蕻(俗称“三臭”)最为著名。这种对于蔬菜的冷加工方式在改善蔬菜风味和营养价值方面优势巨大^[22],但同时也带来了潜在的食品安全问题。为了更加简便、快捷的检测传统腌菜中危害最大的两种 N-亚硝胺,对其安全性作出评价,作者通过前处理的对比优化,选择最佳萃取条件下的固相萃取法进行传统腌菜样品中 N-亚硝胺的提取和测定,为传统腌菜体系中 N-亚硝胺的快速、便捷、准确的检测提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

LECO HRT 气相高分辨飞行时间质谱仪:美国 Agilent 公司;Rtx-1701 毛细管色谱柱(30 m×0.25

mm×0.25 μm,耐热温度:280 ℃):美国 Restek 公司;SB-4200DT 型超声波清洗器:宁波新芝生物科技股份有限公司;L-550 离心机:湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司;RE-52C 旋转蒸发器:上海普渡生化科技有限公司;HGC-12D 氮吹仪:上海启威电子有限公司;固相萃取装置:天津 Auto Science 公司;0.22 μm 有机微孔滤膜。

N-二甲基亚硝胺、N-二乙基亚硝胺标准品:纯度>98%,Sigma 公司;甲醇、二氯甲烷、丙酮:色谱纯,国药公司;其他试剂:均为分析纯,国药公司;C₁₈ SPE 小柱、LC-Alumina N SPE 小柱:迪马科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 GC/MS 条件 气相色谱条件:柱温升温程序为初始 40 ℃,保持 1 min,以 8 ℃/min 速率升温至 180 ℃,再以 30 ℃/min 速率升温至 280 ℃,保持 2 min;进样口温度:250 ℃;进样模式:PTV 进样,分流,分流比为 20:1;进样量:1 μL;载气:He(纯度>99.999%);进样流速:1 mL/min。质谱条件:离子源温度 200 ℃;接口温度 250 ℃;电离方式为 EI 正离子模式;电子能量为 70 eV;电子倍增器电压为 2 000 V;选择离子扫描(SIM)模式扫描质量范围 *m/z*: 35~250;阈值为 0;采集频率为 2;溶剂延迟 3 min。两种挥发性 N-亚硝胺的色谱与质谱分析参数见表 1。

表 1 两种挥发性 N-亚硝胺的色谱与质谱分析参数

Table 1 GC/MS parameters for two volatile N-nitrosamines analysis

N-亚硝胺	保留时间/ min	定量离子/ (<i>m/z</i>)	定性离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能/eV
N-二甲基亚硝胺	6.04	74	74	10
N-二乙基亚硝胺	8.84	102	102,56	15

1.2.2 标准溶液的配制 准确称取一定量的两种

N-亚硝胺标准品,用二氯甲烷溶解并定容至100 mL,配制成1 000 mg/L的标准储备液,于-20 ℃下保存。准确移取各亚硝胺标准储备液10~100 mL容量瓶中,用二氯甲烷定容,配制成100 mg/L的混合标准母液。使用时,准确移取上述混合标准母液,用二氯甲烷逐级稀释配制成0.01、0.05、0.10、0.20、1.00、5.00、10.00 mg/L系列质量浓度的混合N-亚硝胺混合标准溶液,现用现配,供上机测定。以各个质量浓度标准溶液测定出的峰面积对应质量浓度作图,得到标准曲线并求出回归方程。

1.2.3 样品制备与处理 采用传统腌制方法。将新鲜的冬瓜清洗干净后,去籽囊。然后切成边长8.0 cm左右的方块,放入沸水中煮至七分熟左右,捞出。将捞出的冬瓜在冷凉开水中浸泡,冷却后取出,放置稍晾干表面水分,称重。然后按照1.0 kg冬瓜加50.0 g食盐的比例加入食盐。加盐的时候要将冬瓜块的六个面都抹上食盐,以面对面、背对背的方式放入坛中;最后用塑料纸封口,放于阴凉处腌制发酵,20 d左右即可腌制成熟。

分别取出腌制发酵0、3、5、8、10、15、20、25、50、100 d的冬瓜固体样,准确称取上述天数的样品各10.0 g,加入20.0 mL纯水,浸提6 h,初滤后,8 000 r/min离心15 min,取上清液,4 ℃冷藏保存。Al₂O₃固相萃取小柱下接C₁₈固相萃取小柱后,10.0 mL甲醇活化,10.0 mL纯水平衡柱子,再将浸提的样液过柱,流速为2.0 mL/min,弃去直接流出液,用20.0 mL正己烷淋洗除杂,20.0 mL甲醇洗脱,流速为1.0 mL/min,收集洗脱液,28 ℃下经真空旋转蒸发仪浓缩近至1.0 mL,用氮气缓慢吹干,准确加入1.0 mL丙酮溶解残渣,经0.22 μm有机微孔滤膜过滤后,供GC/MS测定。

1.3 数据处理

实验数据采用SPSS软件进行方差分析处理, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

考察了不同极性的毛细管气相色谱柱对两种待测挥发性N-亚硝胺类化合物分离的影响,主要包括非极性柱Rtx-5(30 m×0.25 mm×0.25 μm)和中等极性柱Rtx-1701(30 m×0.25 mm×0.25 μm)。结果表

明,选用非极性色谱柱时,两种待测物之间的分离度不佳;而选用中等极性柱时,两者实现了很好的分离,获得的色谱峰峰形对称,见图1。

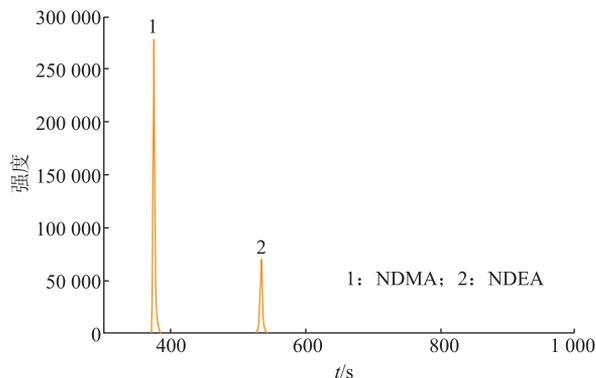


图1 两种N-亚硝胺的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of two N-nitrosamines

2.2 线性范围和方法检出限

配制一系列浓度的标准工作液,在前述GC/MS检测条件下测定,每个质量浓度的混合标准溶液测定3次。两种挥发性N-亚硝胺的线性方程、相关系数、定量限及以3倍信噪比(S/N)得出的方法检出限,见表2。

表2 两种挥发性N-亚硝胺的线性方程、相关系数和方法检出限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients and LOD for two volatile N-nitrosamines

N-亚硝胺	线性方程	相关系数	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
N-二甲基亚硝胺	$Y=2.90 \times 10^5 X - 1.08 \times 10^5$	0.994	0.02	0.10
N-二乙基亚硝胺	$Y=6.65 \times 10^5 X - 499.3$	0.999	0.02	0.10

Y:响应强度;X:进样质量浓度/(mg/L)。

2.3 样品前处理方法的选择

作者分别选用了二氯甲烷超声萃取和固相小柱萃取对样品进行前处理,比较了这两种方法对加标样品(添加水平均为1.0 mg/L)中两种N-亚硝胺的回收率,结果见表3。试验结果表明,固相萃取方法对样品中N-亚硝胺进行的富集、分离、净化作用使得其相较于超声萃取不仅获得了较高的回收率,同时,峰图也更加干净,只有一些比较小的干扰峰,几乎与基线平行,见图2。因此,作者采用了固相萃取作为前处理方法。

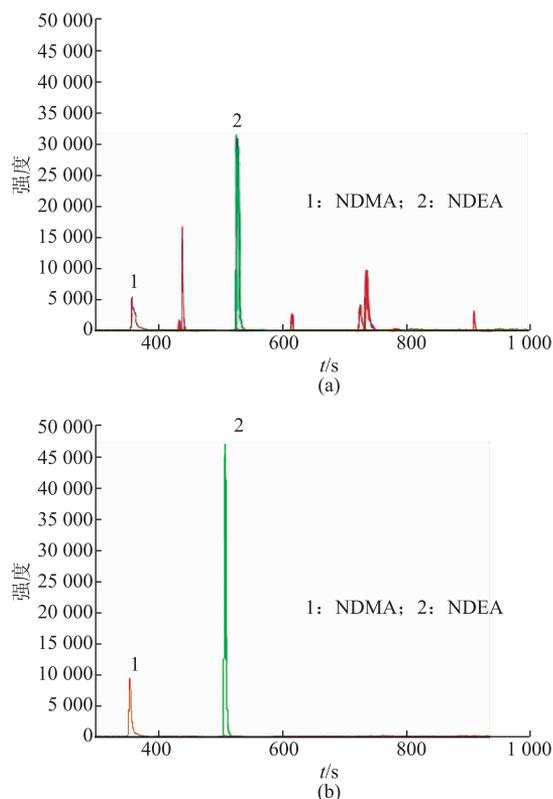


图2 超声萃取(a)和固相萃取的色谱图(b)

Fig. 2 Chromatogram of supersonic (a) and SPE extraction (b)

表3 两种不同萃取方法用于N-亚硝胺测定的回收率和相对标准偏差

Table 3 Recovery rates and RSD of N-nitrosamines determined by GC/MS with two different extractions

N-亚硝胺	超声萃取		固相萃取	
	回收率/%	RSD/% (n=6)	回收率/%	RSD/% (n=6)
N-二甲基亚硝胺	78.83	1.65	112.25	0.93
N-二乙基亚硝胺	80.62	3.46	90.33	2.28

2.4 固相萃取条件的优化

在选取固相萃取法对具有基质复杂特点的腌制蔬菜进行前处理的基础上,为了试图减少有机溶剂的使用量,进一步考察了不同配比的甲醇水溶液作为洗脱剂对加标样品(添加水平均为1.0 mg/L)中两种N-亚硝胺的洗脱效果。结果表明,低于20%和30%的甲醇水溶液分别对NDMA和NDEA无洗脱作用,但随着甲醇体积分数的增大,洗脱效果逐渐增加,当甲醇水溶液达到90%时,回收率均已达到

90%以上,且峰形对称,无杂质峰的干扰,与100%甲醇洗脱效果差异不显著($P>0.05$),同时,为了减少有毒有害的有机溶剂的使用和节约成本,所以选取90%甲醇水溶液作为洗脱剂,不同洗脱剂对N-亚硝胺的回收率见图3。

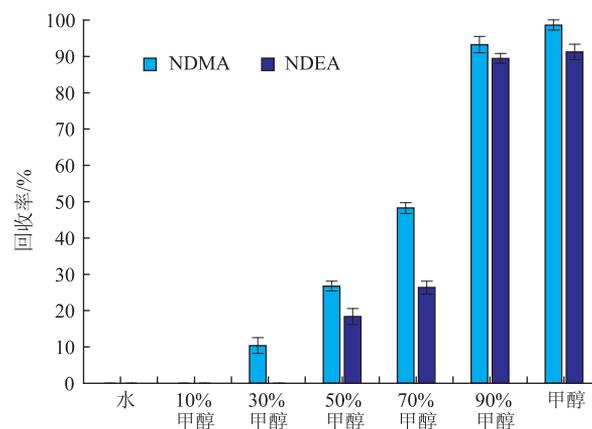


图3 不同洗脱剂配比对两种N-亚硝胺的回收率(n=6)

Fig. 3 Recovery rates of two nitrosamines by different eluent ratios(n=6)

2.5 重复性和精密度

以腌制成熟后室温保存50 d的冬瓜为材料,平行取样6份,处理后用GC/MS测定。结果表明,NDMA和NDEA相对保留时间的RSD分别为1.35%和1.18%,响应强度的RSD分别为2.21%和1.97%。取其中一份平行进行5次,NDMA和NDEA对应峰响应强度的RSD分别0.25%和0.16%。

2.6 样品测定

根据本研究前处理和检测条件优化后的方法,结合冬瓜样品腌制天数,取点采样,进行SPE小柱净化-GC/MS检测N-亚硝胺,结果见表4。实验表明,在正常情况下腌制的冬瓜,20 d内室温腌制成熟期间NDMA和NDEA的质量分数均低于检出限,而当腌制成熟后室温保藏30~80 d左右时,两者均可检测出,并且NDEA的质量分数明显大于NDMA的质量分数,但随着保存天数的增加,两者质量分数均是明显上升的,这可能是腌制成熟的冬瓜在长时间的室温放置时受到外源腐败细菌污染作用后产生了亚硝胺并且逐渐累积所致,通过冷藏保存传统腌制发酵成熟后的蔬菜应更有利于其品质的保证,这需要进一步研究。

表4 臭冬瓜腌制过程及成熟后N-亚硝胺质量分数的检测结果(n=3)

Table 4 Detection result of N-nitrosamines in pickled wax gourd (n=3)

N-亚硝胺	天数/d	质量分数/(mg/kg)	RSD/(n=3)
N-二甲基亚硝胺	0~25	ND	0
	50	0.4	1.45
	100	0.9	1.09
N-二乙基亚硝胺	0~25	ND	0
	50	2.9	2.01
	100	8.0	1.68

注:ND;未检出

3 结语

作者建立了气相色谱-质谱快速测定传统腌菜中N-二甲基亚硝胺和N-二乙基亚硝胺质量分数的分析方法。通过对比优化,采用了洗脱液为90%甲

醇水溶液的固相萃取法对腌菜中的N-亚硝胺进行净化、浓缩,并选用Rtx-1701色谱柱以及合适的温度梯度进行检测。由检测方法的评价结果得出NDMA和NDEA的线性范围均为0.1~10.0 mg/L, R^2 分别达到0.994和0.999,检出限均为0.02 mg/L。加标回收率试验结果表明,两者平均回收率均为90%以上,相对标准偏差(RSD)均小于2.3%。该方法操作简便快捷,重现性、稳定性好,回收率高,结果可靠准确。与液相色谱串联质谱法检测腌菜中的N-亚硝胺相比,该方法较大程度地降低了检出限,在检测NDMA和NDEA这两种毒性最大且最主要的N-亚硝胺时,具有更大优势。同时,比较其他食品中气相色谱串联质谱法检测N-亚硝胺的前处理多为液液萃取、超声萃取和水蒸气蒸馏,本研究的前处理更加快速、便捷、准确,为腌菜中N-亚硝胺的检测提供了更有利的参考。

参考文献:

- [1] 马偕珍, 南庆贤, 方长法. N-亚硝胺类化合物与食品安全性[J]. 农产品加工学刊, 2006, 50(12): 8-14.
MA Lizhen, NAN Qingxian, FANG Changfa. N-nitrosamine compounds and food safety [J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2006(12): 8-11. (in Chinese)
- [2] 吴永宁. 现代食品科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [3] 吴正奇, 凌秀菊. 酱腌菜生产过程中亚硝酸盐和亚硝胺的产生与预防[J]. 中国调味品, 1996(8): 8-12.
WU Zhengqi, LING Xiuju. The production and prevention of nitrite and nitrosamines during pickles process [J]. **China Condiment**, 1996(8): 8-12. (in Chinese)
- [4] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. **Food Research International**, 1996, 29(7): 675-690.
- [5] Crews C. The determination of N-nitrosamines in food[J]. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, 2010, 2(1): 2-12.
- [6] Drabik M G, Dejaeger B, De M E, et al. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat[J]. **Food Chemistry**, 2011, 126(4): 1539-1545.
- [7] Wei F, Xu X, Zhou G, et al. Irradiated Chinese Rugao ham: changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening[J]. **Meat Science**, 2009, 81(3): 451-455.
- [8] Raoul S, Gremaud E, Biauudet H, et al. Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1997, 45(12): 4706-4713.
- [9] Campillo N, Vinas P, Martinez-Castillo N, et al. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry [J]. **Journal Chromatography A**, 2011, 1218(14): 1815-1821.
- [10] 吴燕燕, 刘佳佳, 李来好, 等. GC-MS 检测咸鱼中N-亚硝胺的条件优化[J]. 南方水产科学, 2012, 8(4): 16-22.
WU Yanyan, LIU Fajia, LI Laihao, et al. Determination and optimization of N-nitrosamines in salted fish by gas chromatography-mass spectrometry[J]. **South China Fisheries Science**, 2012, 8(4): 16-22. (in Chinese)
- [11] Gloria M B A, Barbour J F. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products[J]. **Food Chemistry**, 2007, 100(4): 1713-1721.
- [12] 张秋菊, 郭祖鹏, 李明珠, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定7种亚硝胺类化合物[J]. 中国卫生检验杂志, 2009(6): 1234-1236.

- ZHANG Qiuju, GUO Zupeng, LI Mingzhu, et al. Determination of seven N-nitrosamine compounds by HS-SPME-GC-MS[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2009(6): 1234-1236. (in Chinese)
- [13] 魏法山, 徐幸莲, 周光宏. 如皋火腿中挥发性 N-亚硝胺种类和含量分析[J]. **食品科学**, 2008, 29(5): 400-404.
WEI Fashan, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Analysis on style and contents of volatile N-nitrosamines in Rugao Ham[J]. **Food Science**, 2008, 29(5): 400-404. (in Chinese)
- [14] 李玲, 徐幸莲, 周光宏. 气质联用检测传统中式香肠中的 9 种挥发性亚硝胺[J]. **食品科学**, 2013, 34(14): 241-244.
LI Ling, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Determination of nine volatile N-nitrosamines by Gas Chromatography Mass Spectrometry in traditional Chinese sausage[J]. **Food Science**, 2013, 34(14): 241-244. (in Chinese)
- [15] Zhao Y Y, Boyd J M, Woodbeck M, et al. Formation of N-nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters[J]. **Environmental Science Technology**, 2008, 42(13): 4857-4862. (in Chinese)
- [16] Charrois J W A, Boyd J M, Froese K L, et al. Occurrence of N-nitrosamines in Alberta public drinking-water distribution systems [J]. **Journal of Environmental Engineering and Science**, 2007, 6(1): 103-114.
- [17] Hung H W, Lin T F, Chiu C H, et al. Trace analysis of N-nitrosamines in water using solid-phase microextraction coupled with gas chromatograph-tandem mass spectrometry[J]. **Water, Air & Soil Pollution**, 2010, 213(1-4): 459-469.
- [18] Xiong W, Hou H, Jiang X, et al. Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines in mainstream smoke for Chinese Virginia cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and validation under ISO and "Canadian intense" machine smoking regimes[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2010, 674(1): 71-78.
- [19] Yang Y, Nie H, Li C, et al. On-line concentration and determination of tobacco-specific N-nitrosamines by cation-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography[J]. **Talanta**, 2010, 82(5): 1797-1801.
- [20] 尹利端. 几种泡菜的安全性研究与优良乳酸菌的分离鉴定[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [21] 杨宁, 陈颖慧, 邓莉, 等. 双填料固相萃取 - 高效液相色谱 / 质谱法同时检测腌菜中 9 种 N-亚硝胺[J]. **分析化学研究报告**, 2013, 7(41): 1044-1049.
YANG Ning, CHEN Yinghui, DENG Li, et al. Simultaneous determination of nine nitrosamines in pickled vegetables by solid phase extraction column of dual packing materials and HPLC/MS [J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2013, 7(41): 1044-1049. (in Chinese)
- [22] 吴祖芳, 赵永威, 翁佩芳. 蔬菜腌制及其乳酸菌技术的研究进展[J]. **食品与生物技术学报**, 2012, 7(31): 678-686.
WU Zufang, ZHAO Yongwei, WENG Peifang. Pickling process of vegetables and its lactic acid bacteria technology [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 7(31): 678-686. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 2015 中国食文化发展大会

开始日期: 2015-12-12

结束日期: 2015-12-14

具体地点: 北京师范大学

主办单位: 中国食文化研究会

承办单位: 中国食文化研究会民族食文化委员会

议题: 文化与科技 传承与创新

会议主席: 杨铭铎

联系人: 李留柱 白雪

联系电话: 01053368580

E-MAIL: cderca@163.com

通讯地址: 北京市西城区禄长街头条 4 号 202

邮政编码: 100050

会议背景介绍: 文化与科技是食品产业振兴的双翅, 建设文化强国振兴中国的食品产业离不开文化和科技相互促进作用。为推动中国食品、餐饮行业科技、生产水平的提高, 发挥食文化在行业发展中的作用, 促进行业内成果交流转化, 中国食文化研究会与北京师范大学文学院决定举办“2015 中国食文化发展大会”(主题: 文化与科技 传承与创新), 大会由中国食文化研究会民族食文化委员会承办。会议将就食文化学科建设、食文化与食科技等方面的最新研究成果开展深入探讨, 旨在加强食学研究人文社科与自然科学之间的对话, 推动食文化与人文社会科学、食品科技的互动关系的研究, 为广大科研工作者和生产者提供新的思路, 指明发展方向。本次会议诚挚邀请各大专院校、科研院所、食品和餐饮企业等单位从事食文化与食品科学研究的科研人员、管理人员、业务骨干、企业家进行深入交流、成果展示推广、寻求合作。