

HPLC - MS/MS 法测定三角帆蚌中多种 *N* - 亚硝胺类化合物

王甜^{1,2}, 王丽^{1,2}, 孙世萍^{1,2}, 陈韩飞^{1,2}, 郑亚玲^{1,2}

(1. 新疆维吾尔自治区水产科学研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000;

2. 农业部西北地区渔业资源环境科学观测实验站, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:采用基质分散固相萃取 - 同位素稀释 - HPLC - MS/MS 法同时测定三角帆蚌肉中 9 种 *N* - 亚硝胺类化合物 (NAs), 通过优化前处理和仪器条件, 使方法在 5.00 $\mu\text{g/L}$ ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好, 方法检出限为 2.58 $\mu\text{g/kg}$ ~ 8.86 $\mu\text{g/kg}$ 。对样品做 2 个质量比水平的加标回收试验, 各组分的平均回收率为 78.1 ~ 90.3%, RSD 值 \leq 6.8%。将该方法用于测定 20 个河蚌样品, 9 种 NAs 均为未检出。

关键词: *N* - 亚硝胺; 同位素稀释; 基质分散固相萃取; 液相色谱 - 串联质谱法; 三角帆蚌

中图分类号: O657.63

文献标志码: B

文章编号: 1006 - 2009 (2019) 02 - 0047 - 03

Determination of *N*-nitrosamines in *Hyriopsis cumingii* using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Tian^{1,2}, WANG Li^{1,2}, SUN Shi-ping^{1,2}, CHEN Han-fei^{1,2}, ZHENG Ya-ling^{1,2}

(1. Xinjiang Fishery Research Institute, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

2. Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources and Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of nine *N*-nitrosamines in *Hyriopsis cumingii* samples using matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by isotope dilution and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). With the optimized sampler pretreatment and instrument parameters, the method had good linearity in the range of 5.00 $\mu\text{g/L}$ ~ 200 $\mu\text{g/L}$. The detection limits were 2.58 $\mu\text{g/kg}$ ~ 8.86 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of these compounds ranged from 78.1% to 90.3% and the RSDs were below 6.8%. Applied this method to 20 *Hyriopsis cumingii* samples, the 9 *N*-nitrosamines were undetected.

Key words: *N*-nitrosamines; Isotope dilution; MSPD; HPLC-MS/MS; *Hyriopsis cumingii*

N - 亚硝胺类化合物 (NAs) 是一种典型持久性有机污染物, 在环境和机体样品内均有检出, 是目前公认的强致癌物^[1-6]。针对 NAs 的研究已成为全球科学领域的热点之一, 主要集中在环境样品的分析监测上^[7-10], 对水产品中 NAs 的残留检测方法较少。污染物会在水生生物体内累积并通过食物链放大, 对人体和生态系统产生长期潜在的毒性。河蚌是一种普通的淡水双壳类动物, 生长周期长^[11], 主要生长在水体环境的底部, 对环境中的有机污染物具有富集作用。因此, 对河蚌样品中 NAs

残留量的检测和研究, 于人类的生命健康和生态环境安全有着重要意义。

通过优化样品前处理条件, 使用基质分散固相萃取技术提高样品的净化效果, 同时采用同位素稀释法^[12-17], 有效消除基质效应, 提高结果的准确

收稿日期: 2018 - 02 - 26; 修订日期: 2019 - 01 - 06

基金项目: 农业部渔业水域环境污染与生态效益监测基金资助项目 (ZX08S322300)

作者简介: 王甜 (1982—), 女, 新疆乌鲁木齐人, 工程师, 硕士, 从事渔业生态环境及水产品质量安全研究。

度。该方法测定结果可为亚硝胺类化合物在水体环境和水产品中的来源、分布及迁移过程的研究提供可靠数据,也可对人体健康潜在危害的暴露水平研究提供技术支持。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

LC 1200型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;API4000 ESI-TQMS型三重四级杆质谱仪,AB SCIEX 公司;ZL-12TD型冷冻干燥机,上海左乐仪器有限公司。

2 000 mg/L 的 NAs 标准品(纯度 >99%):*N*-亚硝基甲乙胺(NMEA)、*N*-亚硝基吗啉(NMOR)、*N*-亚硝基二丙胺(NDPA)、*N*-亚硝基二甲胺(NDMA)、*N*-亚硝基二正丁胺(NDBA)、*N*-亚硝基二乙胺(NDEA)、*N*-亚硝基吡咯烷(NPYR)、*N*-亚硝基哌啶(NPIP)、*N*-亚硝基二苯胺(NDPhA),美国 Supelco 公司。NAs 标准品用甲醇配制成 20.0 mg/L 的标准储备液,在冰箱中 1 °C ~ 4 °C 下避光冷藏。内标物 *N*-亚硝基二丙胺- d_{14} (NDPA- d_{14}),美国 CIL 公司;乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、甲醇(色谱纯),美国 Fisher Scientific 公司;中性氧化铝(Al_2O_3-N)、无水硫酸镁、十八烷基键合硅胶吸附剂(C_{18})和 *N*-丙基乙二胺吸附剂(PSA),天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 样品采集与前处理

河蚌样品捕捞后取出肉, -80 °C 低温冷冻 48 h, 迅速取出放入冻干机冷冻干燥 24 h, 样品去水后研磨成粉状, 密封, 低温下可保存 6 个月。

准确称取河蚌样品 0.200 g(精确至 0.001 g)置于 10 mL 离心管中, 加入 50 μ L 内标(1.00 mg/L)后加入 10.0 mL 乙腈。涡旋振荡 1 min 后放入高速离心机 10 000 r/min 离心 2 min, 将上清液 5.00 mL 转入装有分散剂(C_{18} 和 PSA 各 50 mg)的离心管中。涡旋振荡 1 min 后离心, 取上清液倒入 10 mL 氮吹管后辅助加热氮气吹至近干, 用 1.00 mL 甲醇定容后过 0.22 μ m 滤膜装瓶, 避光冷藏保存, 24 h 内完成测定。

1.3 仪器条件

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m), 柱温 30 °C; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为甲醇, 流量 200 μ L/min; 梯度洗脱: 0 min ~ 1 min, $\varphi(A)$ 为

90%, 1 min ~ 8 min, $\varphi(A)$ 为 10%; 进样体积为 5.00 μ L。

电喷雾离子源正离子(ESI+)模式扫描, 多反应监测(MRM); 去溶剂温度 500 °C, 离子源温度 150 °C; 离子喷雾电压 -4.5 kV; 雾化气 345 kPa, 辅助气 345 kPa, 气帘气 138 kPa。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂选择

分别考察乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷和丙酮 4 种溶剂作萃取剂对河蚌样品添加 NAs(加标量为 0.5 mg/kg)的萃取效率。结果表明, 4 种溶剂对 *N*-亚硝胺组分的提取效率均满足实验要求, 其中二氯甲烷和乙腈的提取效率较高, 各组分的回收率分别为 70.4% ~ 88.1% 和 78.5% ~ 90.3%。由于含氯试剂对环境的污染较为严重, 目前已采用极性相似的低度试剂替代, 故选择乙腈作为提取溶剂。

2.2 样品净化

目前作为吸附作用的基质分散固相萃取剂主要是通过极性、非极性和离子作用 3 种不同机理对复杂样品中的基质干扰成分进行吸附, 从而达到净化的效果。试验选择 PSA 和 C_{18} 两种吸附剂, 其中 PSA 可有效去除样品中的有机酸、脂肪酸和糖类等干扰物, C_{18} 对极性较弱的脂肪酸、烯烃类及甾醇类、色素等大分子基质干扰物有较好的吸附效果。

2.3 质谱条件优化

质谱的定性和定量以离子碎片为选择依据, 根据 *N*-亚硝胺在 ESI+ 模式下电离的裂解方式, 选定检测灵敏度较高的离子作为母离子, 选取丰度较强的碎片离子作为子离子, 质谱参数见表 1。对于质谱确证方法必须达到 4 个确证点的要求, 低分辨液相色谱-质谱联用仪应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。通过质谱测定的要求优化碰撞电压、离子能量、质谱分辨率等质谱参数, 使用质谱仪器的多通道扫描技术对各组分检测, 结果各组分峰形良好。

2.4 方法线性和检出限

配制 5.00 μ g/L、10.0 μ g/L、20.0 μ g/L、50.0 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L 的混合标准溶液, 在 1.3 条件下测定, 重复试验 3 次取均值, 以质量浓度为横坐标, 对应的标准品和内标物的峰面积比值为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

在空白样品中添加低于方法线性质量浓度最

表 1 质谱参数及方法效能验证试验结果

Table 1 The mass spectrometry parameters and method performance verification results

| 组分 | 母离子(子离子) 质荷比 | 去簇电压 <i>E</i> /eV | 碰撞能量 <i>Q</i> /eV | 保留时间 <i>t</i> /min | 回归方程 | 相关系数 <i>r</i> ² | 检出限 ρ / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 回收率/% | RSD/% |
|----------------------|-----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|--|-------------|-------|
| NDMA | 75(57,43) | 50 | 5 | 2.34 | $y = 0.055x + 0.029$ | 0.995 4 | 8.86 | 78.1 ~ 85.1 | 3.3 |
| NDEA | 103(75) | 50 | 10 | 2.26 | $y = 0.003x + 0.005 6$ | 0.991 2 | 5.34 | 84.3 ~ 85.2 | 5.1 |
| NPIP | 115(69,41) | 55 | 15 | 2.23 | $y = 0.055 9x + 0.097 9$ | 0.998 5 | 2.58 | 81.3 ~ 84.5 | 4.4 |
| NMEA | 89(61) | 50 | 5 | 2.14 | $y = 0.005x + 0.018$ | 0.992 4 | 3.66 | 84.1 ~ 90.3 | 3.8 |
| NDPA | 131(89,43) | 55 | 10 | 2.58 | $y = 0.026 5x - 0.130 2$ | 0.996 6 | 3.52 | 79.9 ~ 83.2 | 5.6 |
| NMOR | 117(86,87) | 55 | 10 | 2.03 | $y = 0.018 2x - 0.071 1$ | 0.998 7 | 2.81 | 84.6 ~ 86.8 | 2.1 |
| NDBA | 159(103,57) | 55 | 3.98 | 15 | $y = 0.085 7x - 0.151 4$ | 0.991 0 | 6.82 | 78.4 ~ 83.8 | 6.8 |
| NPYR | 101(55,86) | 60 | 10 | 2.04 | $y = 0.046 5x - 0.084 5$ | 0.992 5 | 5.14 | 78.9 ~ 80.2 | 3.6 |
| NDPhA | 199(168,169) | 60 | 18 | 4.08 | $y = 0.052 1x + 0.305 5$ | 0.994 0 | 7.29 | 78.6 ~ 78.8 | 5.8 |
| NDPA-d ₁₄ | 145(50,97) | 55 | 5 | 2.35 | | | | | |

低点的混合标准物质,加标量为 0.05 mg/kg,按照分析的全步骤平行测定 10 次。按照公式 $MDL = S \times t_{(n-1,0.99)}$ 计算方法检出限,式中 S 为平行测定的标准偏差, $t_{(n-1,0.99)}$ 为置信度为 99%,自由度为 $n-1$ 时的 t 值, n 为重复分析的样品数,结果见表 1。分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)作为最小检出限(LOD)和定量检出限(LOQ),得到 LOD 为 0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 1.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 4.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 准确度与精密度

对不含待测化合物组分的河蚌样品分别做 2 个质量比水平的加标回收试验,加标量分别为 0.50 mg/kg 和 0.10 mg/kg,按 1.2 所述前处理,在 1.3 条件下测定(高浓度加标测定 3 个平行样品,较低浓度加标测定 5 个平行样品),结果见表 1。由表 1 可知,NA 的平均回收率为 78.1% ~ 90.3%,RSD 值均 $\leq 6.8\%$,说明方法准确度与精密度良好,符合残留分析检测的要求。

2.6 实际样品测定

用上述方法测定捕捞的 20 个河蚌样品,结果虽然有部分样品中存在 NDMA 残留,但测定值均低于方法检出限,后期将进一步对环境水体中该类物质进行监控,进而研究 NA 在生物体中富集的规律。

3 结语

基质分散固相萃取-同位素稀释-LC-MS/MS 法同时测定河蚌样品中 9 种 NA,该方法前处理过程简单,可有效提高实验操作效率,同时准确度和灵敏度符合方法学指标,满足国内对河蚌肉中 *N*-亚硝胺的残留分析和监测的要求。水生生物

中贝类因其自身的特性能够富集某些有机污染物,具有很强的生物累积效应,目前针对具有污染物富集作用的水产品对人体健康造成的损害还没有引起足够的重视。因此,建议开展食用水产品中贝类化合物残留量的监测工作。后期还将进一步解决贝类中 NA 残留水平与时间变化和积累规律等问题,系统地研究该类化合物在生物体中的富集规律及食物链传递情况,为食品安全及健康风险评估提供可靠的数据。

[参考文献]

- [1] KRASNER S W, WEINBERG H S, RICHARDSON S D, et al. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts[J]. Environ. Sci. & Technology, 2006, 40(23): 7175-7185.
- [2] HRUDEY S E. Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me[J]. Water Research, 2009, 43(8): 2057-2092.
- [3] CHOI J, VALENTINE R L. Formation of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) from reaction of monochloramine: a new disinfection by-product[J]. Water Research, 2002, 36(4): 817-824.
- [4] CHOWDHURY S. *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in food and beverages: A comparison in context to drinking water[J]. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 2014, 20(5): 1291-1312.
- [5] QIAN Y, WU M, WANG W, et al. Determination of 14 nitrosamines at nanogram per liter levels in drinking water[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(2): 1330-1336.
- [6] WANG W, HU J, YU J, et al. Determination of *N*-nitrosodimethylamine in drinking water by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(10): 1508-1512.
- [7] 李婷, 鲜啟鸣, 孙成, 等. 水中 *N*-亚硝胺类消毒副产物的污染现状及分析技术[J]. 环境化学, 2012, 31(11): 1767-1774.

(下转第 53 页)