



## 应用资料

### 液相色谱仪

作者：

Andy Tipler

PerkinElmer, Inc.

Shelton

CT 06484 USA

## 用 Clarus680 气质联用仪和 D-swafer 系统检测啤酒中微量的亚硝胺

### 引言

亚硝胺是一种经常在食品和其他有机产品中发现的化合物。它们有强致癌性，许多国家都对食品中此类化合物的可接受水平进行了控制。食品中的亚硝胺是由胺和亚硝酸盐加

热反应生成，这些胺和亚硝酸盐有时是作为防腐剂添加到食品中的。麦芽及其制品受到特别的关注，其中啤酒（同油煎培根和烟草一起）是人体摄入亚硝胺的主要来源。从历史上看，麦芽在开放火焰上烤炙，烟雾中的氮氧化合物气体会与麦芽中的胺反应生成亚硝胺。现在的麦芽制品用间接火焰烤制，其亚硝胺含量因此大幅度下降——比20年前的麦芽制品减少了超过50倍。

麦芽制品产生的亚硝胺会传递到啤酒中。啤酒中亚硝胺的最大允许含量为：美国为5  $\mu$ g/kg，意大利、瑞士和德国为0.5  $\mu$ g/kg，俄罗斯为2-15  $\mu$ g/kg。

在麦芽和啤酒中检测到的主要化合物为亚硝基二甲胺（NDMA）。该化合物及其同系物亚硝基二乙胺（NDEA）是本应用报告中的目标化合物。

检测啤酒中微量的NDMA和NDEA通常需要使用液液萃取，以及多步骤的繁琐样品净化处理，然后用接有高选择性检测器，例如热能检测器（TEA）的气相色谱仪进行检测，。

在这份应用报告中，我们提出了更加有效和快速的分析方法。即使用一种快速、简单的单步骤液液萃取技术处理样品，然后直接进样至GC/MS系统进行样品分离和定量。

Swafer™ 中心切割系统用来选择切割流出物的时间，分析物从第一根色谱柱流出，进入固定相不同的第二根色谱柱。这项技术用来去除溶剂，并且经第二根色谱柱，把从样品基质提取的其它化合物进行分离，提高了分析的选择性，简化了样品净化过程。

用四级杆质谱检测器系统的电子轰击电离模式来监测第二根色谱柱的被分析物。这意味着随着时间的推移，会有更多的样品残留累积在进样口内衬管中。但更换进样口内衬管要比进行多步骤的繁琐样品净化过程要简单得多。为达到检测限要求，用选择离子扫描（SIR）记录采集数据。这样提供了另一种去除基质效应、提高选择性的渠道。

另一个检测器（FID）用于监测预柱上的被分析物，用来确定切割和反吹的时间。

## 实验

### 仪器设备

图1给出了1张分析体系的示意图，这源自于开发此方法的 Swafer 实用软件。表1列出了最终方法的全部操作条件。

表1. 检测啤酒中亚硝胺的分析条件	
气相色谱仪	PerkinElmer Clarus 680
柱温	35 °C保持1 min., 10 °C/min.升温至185 °C (运行16min.)
进样口	带温度程序升温功能分流/不分流进样口(PSS)
进样口温度	35 °C保持1 min., 200 °C/min.升温至250 °C 并保持至运行结束
载气	氦气
进样口压力	起始压力 27 psig , 12.81 min.压力变为2 psig 2 psig保持至冷却。
进样口分流流量	起始时关闭, 3min时开启, 流量为25 mL/min。
检测器	a) 火焰离子化检测器(FID) b)质谱 (MS)
FID 温度	250 °C
FID 燃烧气	空气: 450 mL/min., 氢气: 45 mL/min.
FID 范围	x1
FID 衰减	x4
MS传输线温度	200 °C
MS灯丝温度	200 °C
MS数据采集	a) 12.00 – 13.50 min.扫描m/z74 的离子(检测NDMA) b) 15.00 – 16.00 min 扫描m/z 102 的离子 (检测 NDEA) 停留时间0.5 sec 通道间延迟0.02 sec
切换/反吹系统	配置D4模式的D-Swafer
预柱	30 m x 0.250 mm x 0.25 µm PerkinElmer Elite™ 1
分析柱	30 m x 0.250 mm x 0.25 µm PerkinElmer Elite Wax (与MS连接)
阻尼管	51 cm x 0.100 µm惰性石英 (与FID连接)
(中点) D-Swafer的压力	整体压力为18 psig
时间事件	-1.50 min 设置PSS压力为27 psig. (冷却后升高压力) -1.00 min 时PSS分流流量为0 mL/min. (不分流模式) 3.00 min时 PSS 分流流量调至25 mL/min. (释放体系内压力) 9.27 min.切换阀开 (分析NDMA) 9.48 min.切换阀关 12.60 min.切换阀开 (分析NDEA) 12.80 min.切换阀关 12.81 min将 PSS压力设为2 psig (进行反吹)
进样	使用自动进样器进样, 样品溶剂为二氯甲烷, 进样量为3.0 µL

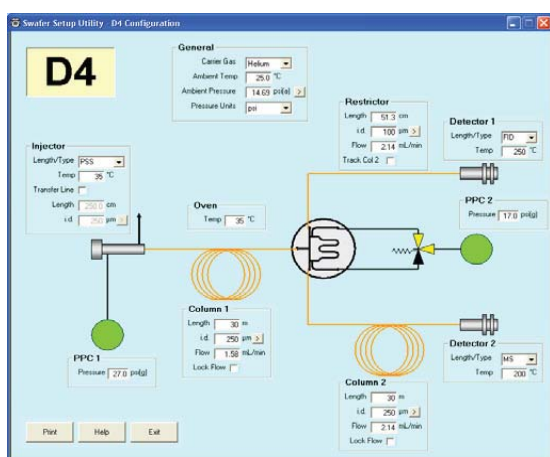


图1. 用于检测啤酒中亚硝胺的Swafer实用软件

## 样品制备

准确移取25mL啤酒样品至50mL的烧杯中，在较低温度的超声波中脱气2分钟。

将  $10.0 \pm 0.5$  g 的脱气啤酒称重，精确到0.1g，置入15mL聚丙烯离心管中。

在样品中加入1mL去离子水配制的1.0 M的氢氧化钠溶液和  $3.0 \pm 0.1$  g 的氯化钠，震荡，将盐溶解。

用A级球滴管在处理后的啤酒样品中加入1mL二氯甲烷，并小心轻摇10分钟。避免剧烈震荡，减少乳化层的形成。

将样品试管高速离心10分钟。对于已经乳化的样品，将试管中的物质前后震荡几次然后再次离心（这通常对于破坏乳化层有效）。图2是成功提取的样品。



图2 成功提取的啤酒样品

用滴管在下层有机相中吸取足够量的溶液，转移至用于气相色谱分析的自动进样小瓶中。不必将所有的提取液都转移出来。注意不要将水相溶液也随着提取物一起转移。进样瓶用合适的盖子密封好，在进行分析前一直冷冻保存。

## 方法开发

图3是包括NDMA和NDEA在内的一系列混合亚硝胺标准品的总离子流色谱图。在这个色谱图中，D-swafer设置将预柱中的流出物直接进入分析柱，分析柱与质谱相连。实际上我们需要检测样品中的亚硝胺浓度低于1ppb（提取液中浓度相当于10ppb）。它们的浓度比图3所示的标样浓度要小的1000倍。

另外一点我们需要注意的是PPS进样器在分析中的角色。样品提取液的溶剂是二氯甲烷。这是一种强挥发性溶剂，沸点在40°C（标准大气压下）。由于很难在色谱柱头集中，它并不是一种很适合不分流进样的溶剂。在这个方法中，设定较低的PPS进样口温度（35°C）然后加热气化其余的进样样品。进样口提供了对蒸汽压的更好的控制，另外3 µL的进样体积使得色谱峰集中且较好的分离，见图3。有一点需要注意，PPS进样口在象这样的较低温度下进样，就需要在下次运行之前将进样口的温度在这段时间里降下来。Clarus® 680色谱仪的 PSS进样口使用优化的散热片和高速的专用冷却风扇可以保证在四分钟之内完成降温。

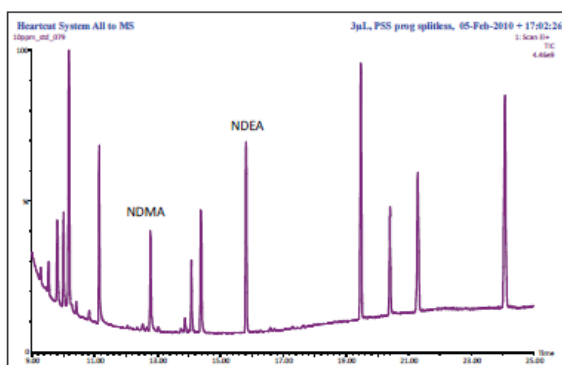


图3. 3 µL 10 ppm的亚硝胺混合溶液，经预柱直接进入第二根色谱柱分离，质谱检测后的总离子流色谱图 (m/z 35 至 150)。

图4中列出了有关检出限的信息，是与图3相同色谱条件下得到的啤酒提取液的总离子流色谱图。这张色谱图的时间比例扩大了，但使用相似的响应范围，两种亚硝胺的预期保留时间被标注出来。我们需要从样本基质中检测的峰到要比图3中的峰小1000倍，并且没有共馏出峰的明显干扰。用这种方法获得所需的更好的灵敏度和选择性显然是一个挑战。

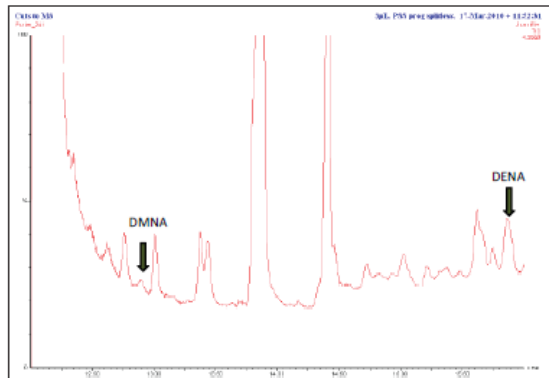


图4. American porter ale提取物的总离子流色谱图，样品经预柱直接进入第二根色谱柱分离，质谱检测后的总离子流色谱图

四级杆质谱的选择离子扫描 (SIR) 模式可以很容易地得到更好的灵敏度和选择性。

图5和图6给出了所监测的两种亚硝胺的结构和质谱图。这些图从Clarus 680质谱系统配置的v. 2.0版的NIST®质谱谱库中获得。NDMA和NDEA分别有较强的m/z 74和m/z 102分子离子。这些离子在SIR质谱方法中可以用来采集和处理数据。

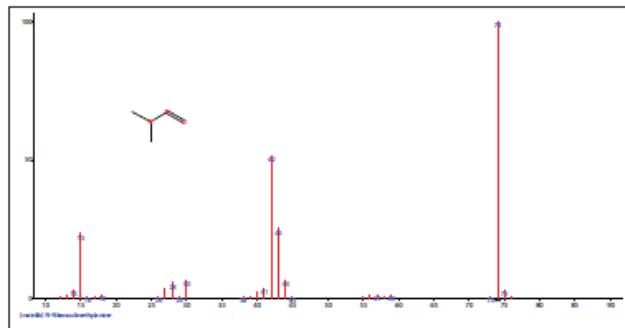


图5. 亚硝基二甲胺的结构式和质谱图。

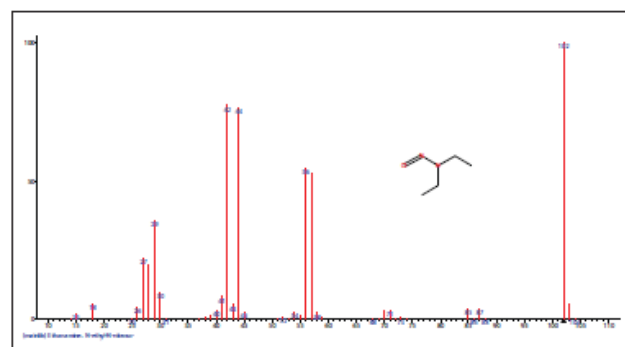


图6. 亚硝基二乙胺的结构式和质谱图

图7是与图3和图4中相同处理方法下，稀释更多倍的混合亚硝胺样品的色谱图。这些峰所代表的亚硝胺样品的浓度为1 ppb，并且显然能够检测比1 ppb更低浓度的样品。

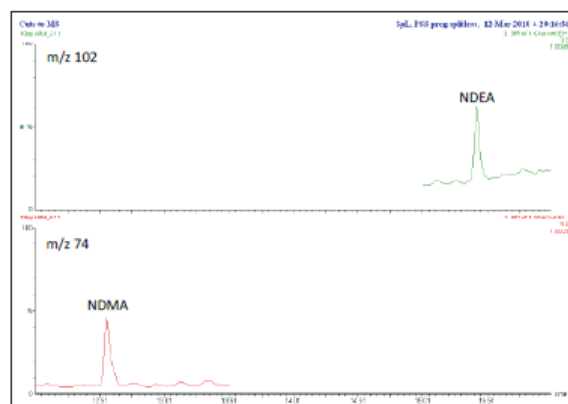


图7. 10 ppb的亚硝胺混合溶液进样（样本浓度相当于1 ppb），在预期保留时间处对NDMA和NDEA分别扫描m/z 74 和m/z 102的离子，所获得的选择离子色谱图。

但是，当啤酒提取液在采用与图7相同方法采集的色谱图列于图8中时，谱图中有明显的干扰峰，从而在要求的浓度水平上对亚硝胺的峰有干扰。这张图与图7的缩放比例一致。故方法选择性方面需要进行进一步的提高。

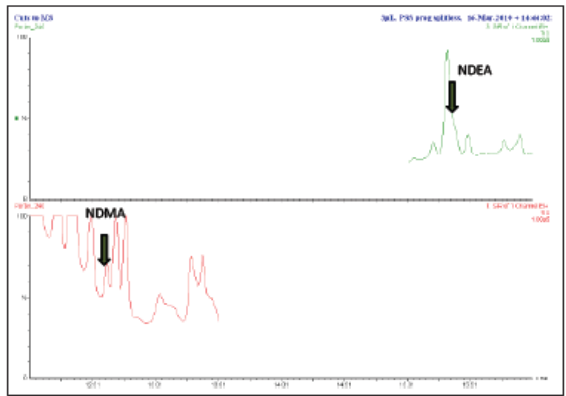


图8. 预期保留时间处分别扫描NDMA和NDEA中m/z 74和102离子。

使用在D4 中心切割配置中的D-Swafer程序，通过将在亚硝胺保留时间范围的狭窄切割段从预柱传递到分析柱，可以提供进一步的高选择性。这样，溶剂和大量的样品基质被从监测色谱中完全去除。由于分析柱固定相的极性很强，使会在非极性预柱中与亚硝胺共流出并切割到分析柱上的峰，在不同的固定相上得以分离。图9中是亚硝胺标准品混合物的色谱图，流出亚硝胺的区域，是在分析柱上进行切割的位置。

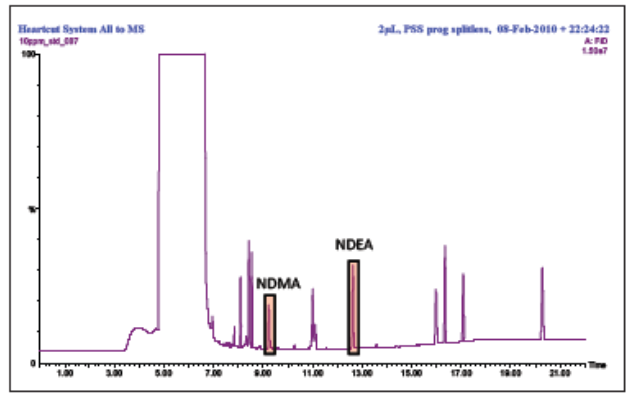


图9. 10ppm亚硝胺标准品混合物的预柱色谱图。这张色谱图是预柱流出液切换至D-Swafer阻尼通道，用FID检测得到的。被标注部分是进行切割的区域。

图10中色谱图来自与图4和图8中相同的啤酒提取液，并在与图9样品相同的条件下运行，但加入了溶剂切割程序。

切割区域通过FID信号的下降来表示。在NDEA的峰被切割后，气相色谱进样口的压力降到较低值，来启动预柱的反吹。这由前一次未切割的色谱图的缺失来指示。反吹可以帮助较重组分离开Swafer和检测器，避免了通过提高升温程序的方法来洗脱样品，减少了分析时间。

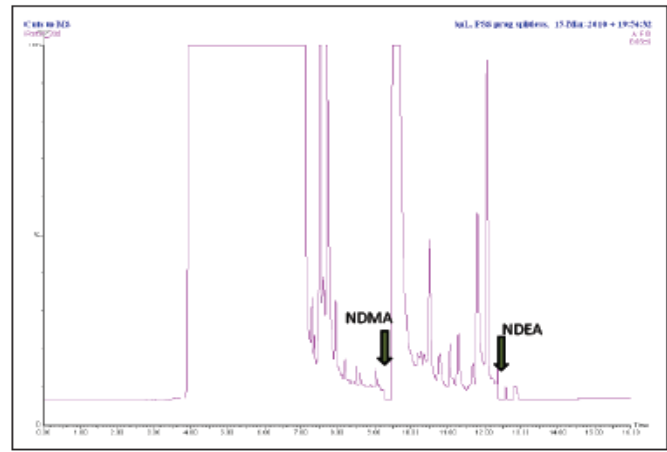


图10. 被切割至分析柱上部分American porter ale提取液的FID预柱色谱图。

图11是图10中切割溶液直接上分析柱所得的相关选择离子色谱图。谱图很干净，0.39ppb NDMA和0.11ppb NDEA的亚硝胺峰能够很有把握地检测到及定量分析。与图8的色谱图进行比较，能够看到采用了D-Swafer 中心切割技术后选择性的改善。

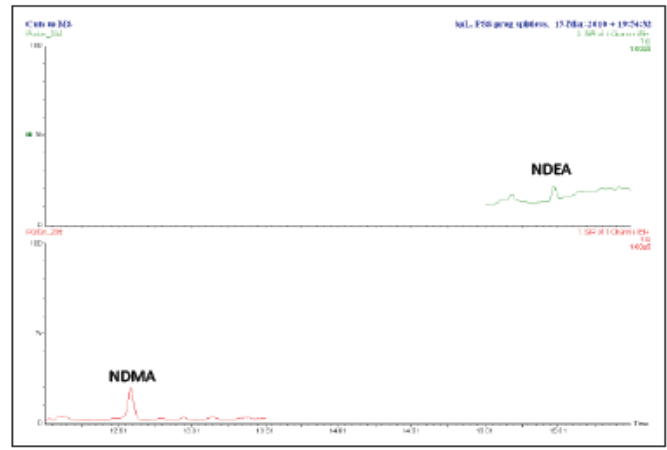


图11. 分析柱上的American porter ale提取液的选择离子色谱图。



性能

在这些条件下，用已知浓度的标准品混合液来测试体系性能。图12和13是NDMA和NDEA的校正曲线，有效样品浓度范围为0.05ppb（或更低浓度）至2.0ppb。两种分析物的线性都很好。

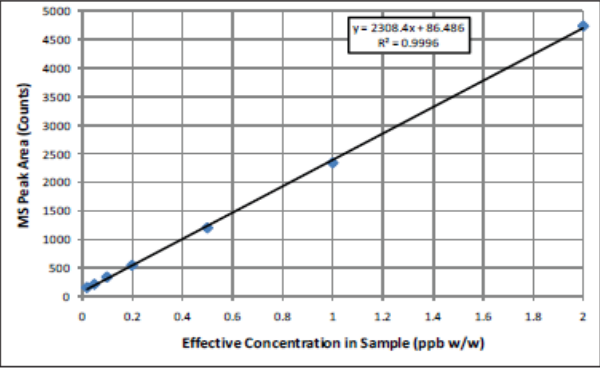


图12. NDMA的校正曲线

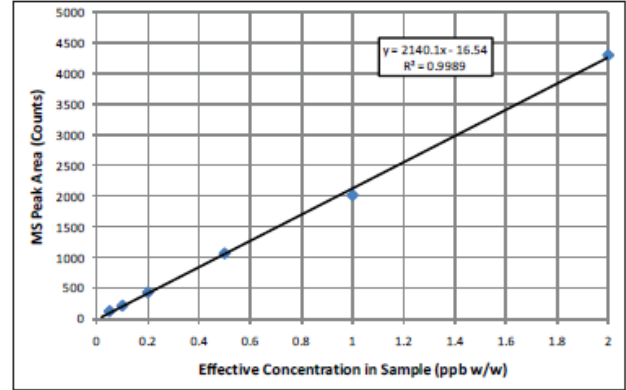


图13. NDEA的校正曲线

啤酒样品的检测结果

将各种在本地商店采购的市售啤酒和自酿啤酒（所有粮食配方）提取后，用该方法进行色谱分析。结果在表2中列出。按照美国FDA标准(CPG 510.600) 5.0ppb判定，所有检测结果都合格。

表2.不同啤酒样品的检测结果		
样品	NDMA (ppb)	NDEA (ppb)
Oktoberfest (德国)	<0.02	<0.05
IPA (美国)	0.09	<0.05
English Bitter (自酿)	0.08	<0.05
Pilsner Lager (自酿)	<0.02	<0.05
Imperial Stout (美国)	0.25	<0.05
Coffee Porter (美国)	0.39	0.11
IPA-B (美国)	0.08	<0.05
Pale Ale (自酿)	0.16	<0.05
Paler Ale (美国)	0.14	<0.05

使方法更稳定

使用内标物可以提高方法的稳定性，可以降低向样品中加入溶剂或样品处理过程中溶剂挥发所产生的偏差。

在二氯甲烷提取液中加入50ppb（在样品中相当于5ppb）的氘代NDMA。这种NDMA-D6化合物在质谱图中有一个主要离子（也是分子离子）m/z 80，所以调整SIR方法在质谱检测过程中同时扫描该离子。

这种氘代化合物是一种很好的内标物，它与被检测NDMA的化学性质类似，受到干扰相同。

图14是加入内标的标准混合物的色谱图。

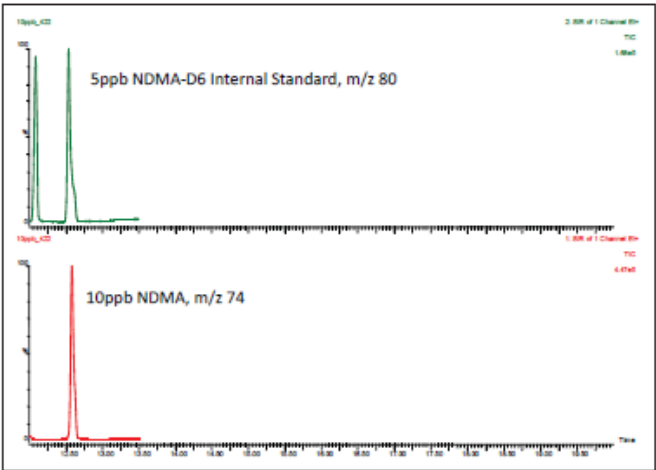


图14. 混合标准品中NDMA和NDMA-D6的谱图，及其在样品中的浓度。

图15中为NDMA和NDMA-D6的响应比与浓度比之间所做的校正曲线。0.1ppb以下的线性也很好。

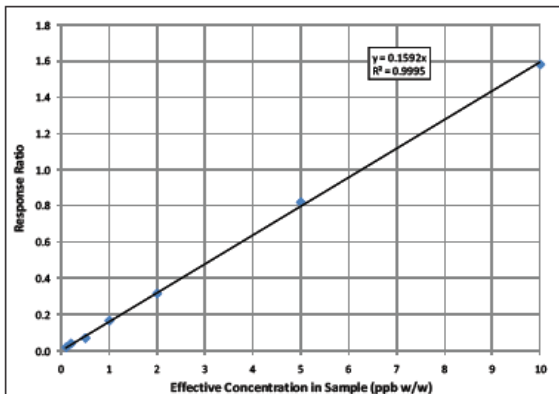


图15. 内标校准后的NDMA的校正曲线数据。

表3中为通过对同一NDMA和NDMA-D6混合溶液多次进样获得的仪器精度参数。相对标准偏差为2.5%对于此类分析的定量精密度来说很不错——复杂样本基质的低浓度分析。

表3. 添加NDMA和NDEA-D6内标的精度参数	
n	10
评价结果	2.27
RSD%	2.46

另一系列啤酒样品被选择来进行分析。这些都是酒精ABV在7~10%的高浓度啤酒（USA Cream Ale除外），生产中使用了大量的麦芽。更高的样品基质干扰对该方法来说是个严峻的考验。

图16是其中一种高浓度啤酒提取物的色谱图，表4是样品检测结果的汇总。

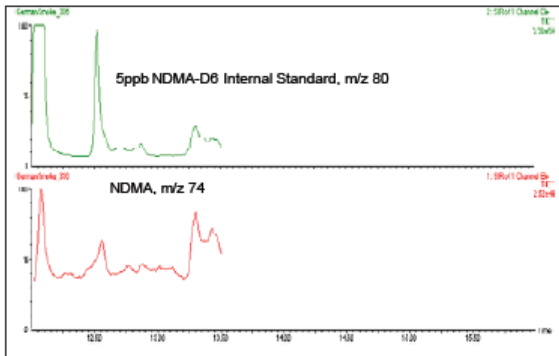


图16. NDMA-D6内标标记的Czech dark lager样品提取物的色谱图。

表4. 各类啤酒样品的结果	
啤酒样品	NDMA (ppb)
Polish Porter	0.43
German Rauchbier	0.32
Russian Porter	0.80
Italian Birra Blonde	0.22
USA Cream Ale	<0.2
Czech Dark Lager	0.76

### 检测其他亚硝胺的扩展方法

尽管最初工作围绕两种亚硝胺进行的，这个方法也易于用在监测其他的亚硝胺上。图17到图19展示了对于亚硝基吡咯烷（NPYR）是如何通过简单的增加一个切割程序和延长运行时间来扩展方法的。

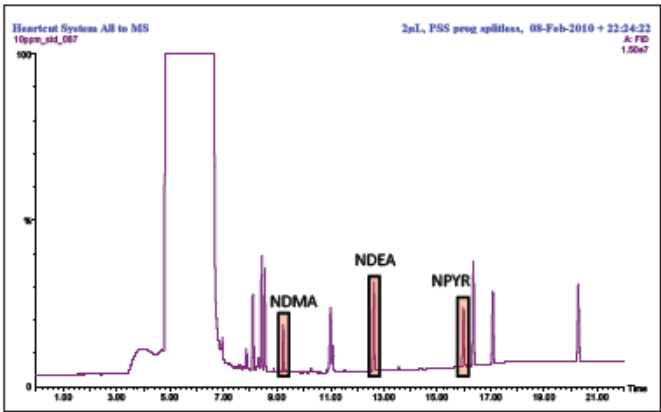


图17. 显示对NPYR反冲和增加了切割次数的10ppm标准溶液的预柱FID色谱图。

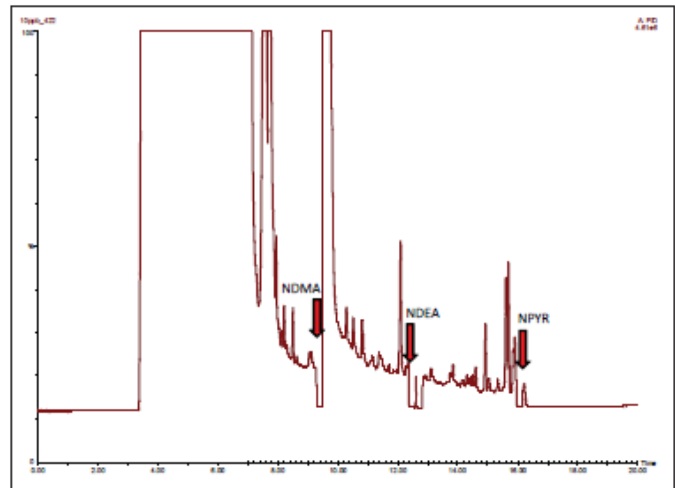


图18. 切割转换至分析柱的啤酒提取液的预柱FID色谱图。温度程序升至225° C，色谱运行时间延长至20min。

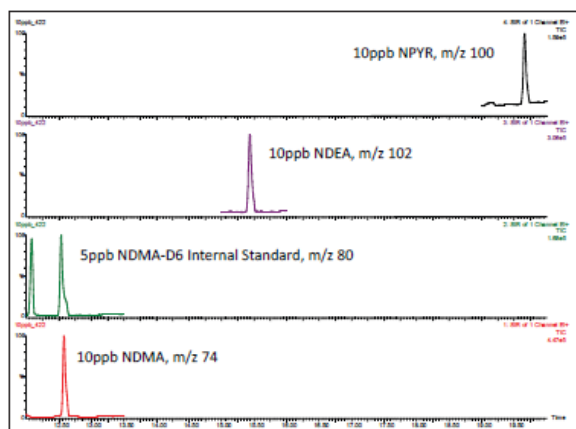


图19. 啤酒加标样品（三种分析物及内标）的分析柱选择离子色谱图。

## 结论

建立检测啤酒中亚硝胺的方法的需求多年来一直存在。随时间推移，许多不同的方法被

开发出来，但需要大量的样品净化、浓缩程序和特殊的检测体系。这个应用报告中介绍的方法使用了非常简单和直接的，且用最少溶剂（1mL）进行的提取过程。此方法的样本提取液比其他方法的要“脏”，但是通过运用与SIR数据采集模式结合的分析物切割技术，可以在不牺牲检出限的情况下保证必要的选择性。

分析物切割技术、快速降温和Clarus 680的PPS进样相结合，能够另色谱分析周期减少到不到20分钟。

例子已经证明，啤酒中0.1ppb或者更低浓度的亚硝胺能够被检测到。

尽管此方法是针对啤酒进行分析，但它也可用于其他种类样品中的亚硝胺的分析。

## PerkinElmer, Inc.

大中华区总部  
地址：上海张江高科园区李冰路67弄4号  
邮编：201203  
电话：(800) 762 4000 或 (021) 3876 9510  
传真：(021) 5895 3643  
[www.perkinelmer.com.cn](http://www.perkinelmer.com.cn)



要获取全球办事处的完整列表，请访问 <http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有©2010, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。

009485A\_01\_CN