

# HPLC-APCI-MS/MS 法测定与口接触玩具及儿童用品中 14 种可迁移 N-亚硝胺及可 N-亚硝化物质

黄理纳<sup>1</sup>, 李函珂<sup>2</sup>, 蚁乐洲<sup>1</sup>, 彭峰<sup>2</sup>, 李琼<sup>2</sup>

(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东 广州 510640)

**摘要:**建立了高效液相色谱-大气压化学电离-串联质谱(HPLC-APCI-MS/MS)法测定与口接触玩具及儿童用品中 14 种可迁移 N-亚硝胺及可 N-亚硝化物质。样品在人工唾液中模拟口腔接触后,一部分迁移液用于可迁移 N-亚硝胺的分析,另一部分经亚硝化后用于可迁移 N-亚硝化物质的分析。实验还对电离源类型、多重反应监测参数、离子源参数、色谱柱类型、梯度洗脱程序、甲酸浓度等条件进行了优化。结果表明:14 种目标物在 0.2~100  $\mu\text{g/L}$ 范围内的线性关系良好,相关系数  $R^2 \geq 0.999 5$ ,方法检出限为 0.32~1.0  $\mu\text{g/kg}$ ;在 5, 50, 500  $\mu\text{g/kg}$  加标浓度水平的回收率为 82.3%~122%,相对标准偏差为 1.1%~13.9% ( $n=5$ )。实验抽查了 104 个批次市场样品,包括橡胶和硅胶奶嘴、气球以及其他橡胶制品,阳性率为 7.4%。在抽查分析的 8 批次气球样品中,有 4 批次 N-亚硝胺迁移量和 6 批次可 N-亚硝化物质迁移量超出了欧盟玩具安全指令 2009/48/EC 规定的迁移限量,阳性率高达 75%,说明气球样品的风险最高。

**关键词:**玩具;儿童用品;与口接触;可迁移;N-亚硝胺;可 N-亚硝化物质;高效液相色谱-大气压化学电离-串联质谱(HPLC-APCI-MS/MS)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2016)05-0453-12

doi:10.7538/zpzb.youxian.2016.0019

## Determination of 14 Migrations of N-Nitrosamines and N-Nitrosatable Substances in Toys and Children's Products by HPLC-APCI-MS/MS

HUANG Li-na<sup>1</sup>, LI Han-ke<sup>2</sup>, YI Le-zhou<sup>1</sup>, PENG Feng<sup>2</sup>, LI Qiong<sup>2</sup>

(1. Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** N-nitrosamines, known as strong carcinogens, are extensively concerned in safety of consumer products, especially in safety of toys. In the mean time, N-nitrosatable substances, such as secondary amines, which can convert to N-nitrosamines under certain circumstances, is concerned as well. Consequently, there are many regulations and standards successively published to restrict N-nitrosamines and N-nitrosatable substances in many countries. Generally speaking, toys and children's products that con-

收稿日期:2015-10-31;修回日期:2015-12-17

基金项目:广东省科技厅计划项目(2014A040401066)资助

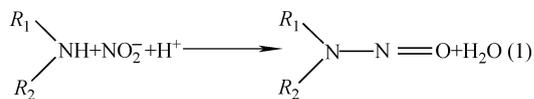
作者简介:黄理纳(1971—),男(汉族),湖南株洲人,研究员,从事玩具及儿童用品化学检测研究。E-mail: huangln@iqtc.cn

网络出版时间:2016-03-28;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160328.1443.010.html>

tact with mouth, such as balloons and rubber teats, are more likely to contain *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances. In order to meet the analytical requirements of exit-entry inspection of international regulations concerning toys and children's products, a method of high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS) was developed to determine the migrations of 14 *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances in toys and children's products that contact with mouth. Samples were cut into pieces and then migrated in artificial saliva to simulate mouth contact. The migration solution was used for the determination of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances after nitrosation afterwards in the presence of nitrite contained in artificial saliva. The conditions and parameters of liquid chromatography and mass spectrometry were optimized, such as multiple reaction monitoring, source-dependent parameters, chromatographic columns selection, gradient elution program and formic acid concentration. The results show that the linear relationships are good for all 14 *N*-nitrosamines in the range of 0.2-100  $\mu\text{g/L}$  with the correlation coefficient greater than 0.9995. Method detection limits are 0.32-1.0  $\mu\text{g/kg}$ , and the recoveries of 14 *N*-nitrosamines are 88.0%-122%, 89.0%-106%, 91.0%-109% at the spiked levels of 5, 50, 500  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The relative standard deviations ( $n=5$ ) are 3.0%-13.9%, 1.9%-6.2%, 1.1%-6.6%, respectively. 104 batches of exit-entry spot-check samples were inspected, and it was found that balloons were high risk samples. There are totally 8 batches of balloon samples among all the inspected samples, migrations of *N*-nitrosamines in 4 batches of balloon samples and migrations of *N*-nitrosatable substances in 6 batches of balloon samples exceed the limit migrations specified in EU Toy Safety Directive 2009/48/EC. The balloon samples have the highest risk, so we need to give extra concern in terms of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances.

**Key words:** toys; children's products; contact with mouth; migration; *N*-nitrosamines; *N*-nitrosatable substances; high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS)

*N*-亚硝胺是含有—N—N=O官能团的化合物总称,主要存在于气球、奶嘴等橡胶制品,以及烟草和肉类制品中。研究表明:橡胶的硫化过程中,橡胶中的仲胺会在亚硝酸盐的作用下转化为对应的 *N*-亚硝胺<sup>[1]</sup>;在水溶液中,仲胺也能与亚硝酸根离子作用生成对应的 *N*-亚硝胺,示于式(1)。*N*-亚硝化物质是指在一定条件下能够转化为 *N*-亚硝胺的物质,如式(1)中的仲胺。



人群的流行病学调查表明,*N*-亚硝胺可通过皮肤、呼吸道和消化道进入人体,某些 *N*-亚硝

胺可与生物大分子(如 DNA)以共价键结合的形式形成加合物,改变 DNA 的性质,从而引发癌症<sup>[2]</sup>。人类的某些癌症,如胃癌、食道癌、肝癌、结肠癌等可能与其有关<sup>[3]</sup>。2009~2015年,欧盟非食品类消费品快速预警系统共通报了13起因 *N*-亚硝胺或可 *N*-亚硝化物质的迁移量超标而被召回的玩具,其中12起涉及气球产品,说明气球具有较高风险。玩具及儿童用品作为我国出口欧盟的大宗商品之一,对 *N*-亚硝胺及可 *N*-亚硝化物质超标具有较高的敏感性,而气球又是其中最为敏感的产品之一,应引起高度重视。1993年欧盟93/11/EC指令<sup>[4]</sup>、2007年德国法规<sup>[5]</sup>以及2009年欧盟2009/48/EC指令<sup>[6]</sup>,都对橡胶制品的 *N*-亚硝胺及可 *N*-亚硝化物质的迁移量进

行了限制。其中,欧盟 2009/48/EC 指令规定,玩具及儿童用品中 *N*-亚硝胺迁移量不得超过 0.05 mg/kg,可 *N*-亚硝化物质迁移量不得超过 1 mg/kg。2012 年,我国在 GB 28482—2012 中规定<sup>[7]</sup>,奶嘴中可迁移 *N*-亚硝胺不得超过 0.01 mg/kg,可 *N*-亚硝化物质的迁移量不得超过 0.1 mg/kg。

目前,*N*-亚硝胺的分析方法主要有气相色谱(GC)法和液相色谱(LC)法。GC 可提供较好的分离度,但分析前需使用二氯甲烷等有机溶剂对 *N*-亚硝胺进行萃取,前处理步骤复杂,且只适于分离易挥发的 *N*-亚硝胺,其应用受到一定程度的限制。LC 不仅能够分离难挥发的 *N*-亚硝胺,而且能够直接分析水相,无需有机溶剂萃取,简化了样品的前处理步骤;但其分离度较低,不能分离某些 *N*-亚硝胺同分异构体。热能分析仪(TEA)作为一种 *N*-亚硝胺的特异型检测器,其灵敏度高、选择性强、受基质干扰小,是一些国际和国内标准的检测方法<sup>[8]</sup>。但该检测器只适用于含亚硝基化合物的检测,且设备昂贵,其使用受到了一定的限制。单级质谱(MS)和串联质谱(MS/MS)也可用于 *N*-亚硝胺的检测。单级质谱常与气相色谱联用,采用电子轰击源(EI)或化学电离源(CI)对 *N*-亚硝胺进行电离。使用 EI 源时,某些低质量 *N*-亚硝胺的响应较低,且易受基体干扰,谱图特异性不强,定性和定量存在一定困难<sup>[9]</sup>。串联质谱则使用特定的离子对进行定性和定量分析,具有选择性强,可解决单级质谱背景复杂和干扰严重的问题,更适于同时分析多个目标物。将串联质谱与液相色谱联用,线性范围可达 3~5 个数量级。Kim 等<sup>[10]</sup>建立的 HPLC-ESI-MS/MS 法以甲酸-甲醇作为流动相,对烟草中的 *N*-亚硝胺进行分析,检出限可达 0.1 μg/L; Herrmann 等<sup>[11]</sup>考察了不同电离源对 *N*-亚硝胺灵敏度的影响,发现在分析标准溶液时,使用电喷雾电离源(ESI)得到的响应略高,但大气压化学电离源(APCI)受基体的影响较小,抗干扰能力较强,更适用于实际样品的分析;Krauss 等<sup>[12]</sup>采用高分辨质谱(LIT Orbitrap MS)法对 9 种 *N*-亚硝胺对应的母离子和子离子的分子质量进行准确测定,得到了子离子的分子式,定性能力进一步提高。

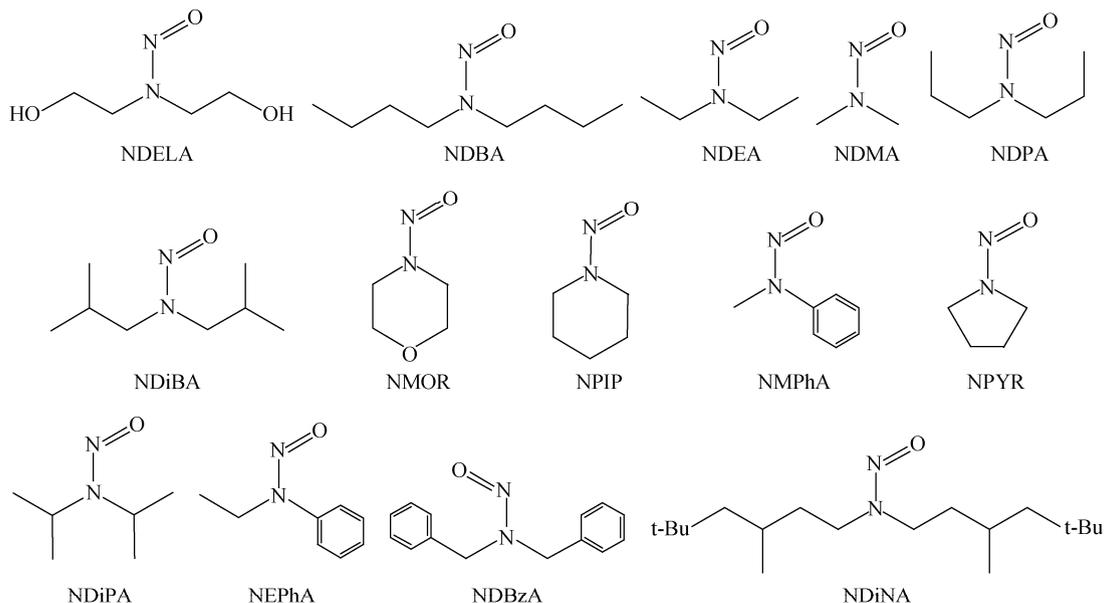
本研究将采用 HPLC-APCI-MS/MS 法同时测定与口接触玩具及儿童用品中 14 种 *N*-亚硝胺,如 *N*-亚硝基二甲胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)、*N*-亚硝基二乙醇胺(*N*-nitrosodiethanolamine, NDELA)、*N*-亚硝基吗啉(*N*-nitrosomorpholine, NMOR)、*N*-亚硝基哌啶(*N*-nitrosopiperidine, NPIP)、*N*-亚硝基二乙胺(*N*-nitrosodiethylamine, NDEA)、*N*-亚硝基吡咯烷(*N*-nitrosopyrrolidine, NPYR)、*N*-亚硝基二丙胺(*N*-nitrosodipropylamine, NDPA)、*N*-亚硝基二异丙胺(*N*-nitrosodiisopropylamine, NDiPA)、*N*-亚硝基-*N*-甲基-*N*-苯胺(*N*-nitroso-*N*-methyl-*N*-phenylamine, NMPhA)、*N*-亚硝基-*N*-乙基-*N*-苯胺(*N*-nitroso-*N*-ethyl-*N*-phenylamine, NEPhA)、*N*-亚硝基二丁胺(*N*-nitrosodibutylamine, NDBA)、*N*-亚硝基二异丁胺(*N*-nitrosodiisobutylamine, NDiBA)、*N*-亚硝基二苄基胺(*N*-nitrosodibenzylamine, NDBzA)、*N*-亚硝基二异壬基胺(*N*-nitrosodinonylamine, NDiNA),其结构式示于图 1。通过优化色谱和质谱条件,使该方法能够满足德国法规的限量要求(*N*-亚硝胺及可 *N*-亚硝化物质的迁移限量分别不得超过 0.01 mg/kg 和 0.1 mg/kg),并通过空白加标和实际样品分析对本方法进行验证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

1200 型高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有 60 MPa 二元泵;API3200 型三重四极杆质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品,配有电喷雾和大气压化学电离源;SW23 型恒温水浴振荡床:德国 Julabo 公司产品;Milli-Q Direct 超纯水机:德国 Merck Millipore 公司产品。

13 种 *N*-亚硝胺标准物质,NDMA(≥99.5%)、NDELA(≥97.7%)、NMOR(≥99.5%)、NPIP(≥99.5%)、NDEA(≥99.9%)、NPYR(≥98.0%)、NDPA(≥99.1%)、NDiPA(≥99.5%)、NMPhA(≥98.7%)、NEPhA(≥98.0%)、NDBA(≥99.1%)、NDiBA(≥99.5%)、NDBzA(≥98.0%);均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;NDiNA(≥98.0%)标准物质:购自加拿大 TRC 公司;亚硝酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、碳酸钾、盐酸、氢氧化钠:均

图 1 14 种 *N*-亚硝胺的化学结构式Fig. 1 Chemical structures of 14 *N*-nitrosamines

为分析纯,购自广州化学试剂厂;甲醇(色谱纯):购自美国 Fisher 公司;甲酸(色谱纯):购自德国 CNW 公司;实验用水:由 Milli-Q Direct 超纯水机制备,电阻率为  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ,并经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤。

与口接触玩具及儿童用品均为出入境检验检疫抽查样品,共 104 个批次。

## 1.2 样品前处理

### 1.2.1 人工唾液的配制

参考欧盟标准 EN12868:1999<sup>[7]</sup> 配制,将 4.2 g 碳酸氢钠、0.5 g 氯化钠、0.2 g 碳酸钾和 0.03 g 亚硝酸钠溶于超纯水中,加水稀释至 900 mL,用盐酸或氢氧化钠溶液调节至 pH 9.0,然后将溶液转移至 1 L 容量瓶中,加水定容至刻度,即得人工唾液。人工唾液现配现用,使用前需预热至  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 1.2.2 样品的迁移

参考 EN 71-12:2013<sup>[13]</sup> 中样品的处理方法,对于气球样品,沿轴向进行多次对称裁剪,剪至约  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  碎片;称量 3.5~4.5 g 气球碎片于 50 mL 锥形瓶中,加入 10 倍于其质量的已经预热至  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  的人工唾液,确保样品完全浸没后,塞紧瓶塞,将锥形瓶置于  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  恒温水浴中,避光静置 1 h;静置结束后,立即用 2 mL 注射器抽取迁移溶液,经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后,置于棕色瓶中,待测。对于除气球外的其他橡胶样品,从其

橡胶部分剪下表面积不低于  $10 \text{ cm}^2$  的样品用于测试,若橡胶部分表面积小于  $10 \text{ cm}^2$ ,则将其全部剪下,剪下部分的质量不低于 0.2 g;准确称取剪下的试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 倍于其质量的已预热至  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  的人工唾液,确保样品被完全浸没;塞紧瓶塞,将锥形瓶置于  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  恒温水浴中,避光静置  $(240 \pm 3) \text{ min}$  后,立即将迁移溶液转移至适当大小的玻璃瓶中,然后经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后转移至棕色进样瓶中,待测。

### 1.2.3 迁移液的亚硝化

取 1.2.2 节制得的 5 mL 迁移液于 25 mL 棕色锥形瓶中,加入 0.5 mL 1 mol/L 稀盐酸,塞紧瓶塞,在  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  恒温水浴中避光静置 30 min,随后向迁移液中加入 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液;用 2 mL 注射器抽取上述溶液,经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后置于棕色瓶中,待测。

### 1.2.4 *N*-亚硝胺标准溶液的配制

称取适量的 *N*-亚硝胺标准物质,以甲醇为溶剂,配制浓度为  $1000 \mu\text{g/L}$  的 14 种 *N*-亚硝胺储备溶液,并于  $-18^\circ\text{C}$  下避光保存;用人工唾液逐级稀释储备液,得到浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0  $\mu\text{g/L}$  的 *N*-亚硝胺标准工作溶液,于  $4^\circ\text{C}$  下避光保存于棕色瓶中。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱: Poroshell 120 EC-C18 反相柱(100 mm×2.1 mm×2.7 μm); 流动相: 甲醇(含 0.01% 甲酸)-水(含 0.01% 甲酸)溶液; 梯度洗脱程序: 甲醇的起始比例为 10%, 在 10 min 内线性变化至 98%, 保持 3 min, 在 0.1 min 内线性变化至 10%, 保持 4.9 min, 总分析时长为 18 min; 每次分析结束后, 以甲醇-水溶液(1:9, V/V)平衡系统 4 min; 流速 0.3 mL/min; 进样体积 40 μL; 柱温 40 °C。

**1.3.2 质谱条件** 大气压化学电离源(APCI), 正离子模式; 离子源温度 250 °C; 电晕放电针电流 3 μA; 离子源辅助雾化气和碰撞气均为超纯氮气, 压力分别为 0.138 MPa 和 0.028 MPa; 多反应监测(MRM)模式扫描, Q1 和 Q3 四极杆质量分辨率不小于 0.7 Da; 每个 MRM 过程的驻留时间为 100 ms, 每个化合物选取 2 个 MRM 过程进行同时监测, 其中响应较强的离子对用于定量, 较弱的离子对用于定性; 使用 Analyst 1.5.2 软件进行批处理和数据采集; 依据对应色谱峰的保留时间和 2 个 MRM 过程色谱峰的丰度比对样品中的 *N*-亚硝胺进行定性, 外标法峰面积定量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

**2.1.1 电离源的选择** 电喷雾电离源和大气压化学电离源是液质联用中常用的两种电离源。Kim 和 Herrmann 等<sup>[9-10]</sup>报道了 ESI 正离子模式下可对一些 *N*-亚硝胺化合物进行分析, 且在分析标准溶液时, 使用 ESI 源得到的响应要略高于 APCI 源。文献<sup>[14-16]</sup>也报道了使用 ESI 源对 *N*-亚硝胺进行测定, 得到的结果令人满意。并且, Ripolles 等<sup>[14]</sup>进一步指出, APCI 模式下 *N*-亚硝胺色谱峰的信噪比更高, 同时峰型也得到了改善。本研究考察了 ESI 正离子模式下 14 种 *N*-亚硝胺的仪器响应(峰面积), 并对各参数进行优化。使用相同的流动相、流速、进样体积和梯度洗脱程序分析 100 μg/L *N*-亚硝胺混合标准溶液, 将每个目标物在 APCI 模式下的仪器响应定义为 100%, ESI 模式下得到的各目标物的相对仪器响应列于表 1。可见, 在 ESI 模式下, 只有 NDiNA 的仪

器响应高于 APCI 模式下的仪器响应, 而其余 13 种 *N*-亚硝胺的仪器响应均低于 APCI 模式。此外, 考虑到本研究中的 14 种 *N*-亚硝胺大多属于中等极性 or 弱极性化合物, 更适于在 APCI 模式下电离, 加之 APCI 的抗干扰能力更强, 受样品基体的影响更小<sup>[11]</sup>, 因此最终选择 APCI 作为电离源。

表 1 ESI 模式下, 14 种 *N*-亚硝胺的仪器响应相对值  
Table 1 Relative instrumental responses of 14 *N*-nitrosamines at ESI mode

分析物	相对值/%	分析物	相对值/%
NDELA	0.14	NDiPA	5.31
NDMA	5.41	NMPhA	11.61
NMOR	12.44	NEPhA	16.95
NPYR	10.01	NDBA	74.34
NDEA	12.12	NDiBA	92.98
NPIP	17.13	NDBzA	91.24
NDPA	9.44	NDiNA	1086.62

**2.1.2 MRM 参数的优化** 用玻璃注射器吸取适当浓度的 *N*-亚硝胺单标溶液, 以 50 μL/min 的流速直接进样, 分别对 14 种 *N*-亚硝胺的 MRM 参数进行优化, 其结果列于表 2。

**2.1.3 离子源参数的优化** 使用 APCI 源时, 目标物的分析灵敏度很大程度上取决于在离子源中形成的  $[M+H]^+$  气相离子的数量, 而其又取决于离子源加热器温度(TEM)、辅助气(GS1)压力及电晕放电针电流(NC), 因此需对这 3 个参数进行优化。同时, 为尽量减少非目标分析物对检测造成的干扰, 并维持较高的响应值, 需要对气帘气(CUR)压力进行优化。此外, 为确保 14 种 *N*-亚硝胺在碰撞池内能够产生表 2 中所列的子离子, 并获得较高的响应值, 需要对碰撞气(CAD)压力进行优化。本研究采用流动注射分析(flow injection analysis, FIA)法对每个 *N*-亚硝胺涉及的离子源参数进行优化, 设置流速为 0.3 mL/min, 对浓度为 100 μg/L 含有 14 种 *N*-亚硝胺的标准溶液按表 3 所列的参数进行优化, 每个参数重复测定 2 次, 每次进样 5 μL, 分析时间 30 s, 优化结果列于表 4。最终设置实际分析参数为 TEM 250 °C, GS1 0.138 MPa, NC 4 μA, CUR 0.103 MPa, CAD 0.027 6 MPa。

表 2 14 种 N-亚硝胺的 MRM 参数优化结果  
Table 2 Optimized MRM conditions of 14 N-nitrosamines

分析物	名义质量/Da	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	去簇电压/V	碰撞能量/V	出口电压/V
NDELA	134.13	135.0	74.0(q)	14	19	1
			104.0(Q)		9	1
NDMA	74.08	75.0	43.0(Q)	30	22	2
			58.0(q)		18	3
NMOR	116.12	117.0	86.1(q)	20	20	1.4
			87.1(Q)		17	1.4
NPYR	100.12	101.0	55.2(Q)	40	25	1.4
			41.2(q)		37	1.4
NDEA	102.14	103.0	47.1(q)	23	25	4.5
			75.1(Q)		16	2.4
NPIP	114.15	115.0	41.2(q)	20	23	1.4
			69.0(Q)		35	1.4
NDPA	130.19	131.1	43.1(q)	24	16	1.4
			89.1(Q)		24	1.9
NDiPA	130.19	131.1	43.1(q)	24	16	1.4
			89.1(Q)		24	1.9
NMPHA	136.15	137.0	66.1(Q)	26	30	1.4
			77.0(q)		39	1.4
NEPHA	150.18	151.0	65.9(q)	30	34	1.4
			77.0(Q)		28	1.5
NDBA	158.24	159.0	57.3(Q)	25	21	4
			103.1(q)		16	3
NDiBA	158.24	159.0	57.3(Q)	25	21	4
			103.1(q)		16	3
NDBzA	226.30	227.0	65.2(q)	16	21	1.3
			91.2(Q)		67	2.5
NDiNA	298.51	299.4	57.3(Q)	45	32	1.5
			71.3(q)		42	1.5

注:名义质量(nominal mass)是指化合物的平均相对分子质量(考虑同位素丰度);Q表示响应较强的离子,用于定量;q表示响应较弱的离子,用于定性

表 3 离子源参数优化设定  
Table 3 Optimizing values of source-dependent parameters

离子源参数	可调范围	优化值
离子源温度/°C	0~750	150,200,250,300,350,50,500
辅助气压力/MPa	0~0.62	10,15,20,25,30,35,40
放电针电流/ $\mu$ A	1~5	1,2,3,4,5
气帘气压力/MPa	0.069~0.344	10,15,20,25,30
碰撞气压力/MPa	0.138~0.096	2,4,6,8,10

表4 14种N-亚硝胺的离子源参数优化结果

Table 4 Optimized values of source-dependent parameters of 14 N-nitrosamines

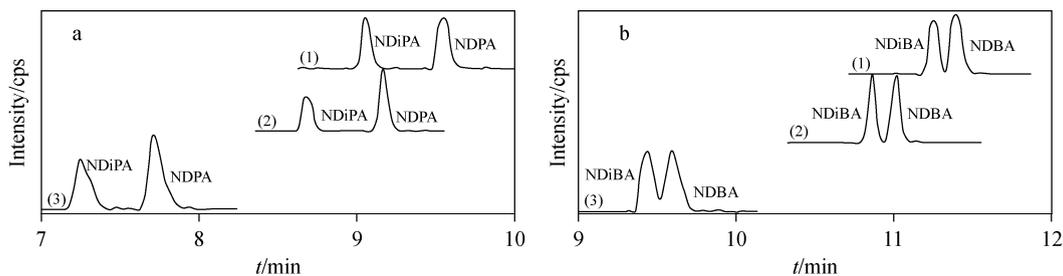
分析物	气帘气压力/MPa	温度/°C	辅助气压力/MPa	碰撞气压力/MPa	放电针电流/ $\mu$ A
NDELA	0.069	350	0.138	0.021	4
NDMA	0.103~0.138	250	0.138	0.021	5
NMOR	0.069	250	0.138	0.0276~0.0414	5
NPYR	0.103~0.138	250	0.103	0.0414	3
NDEA	0.069~0.103	200~250	0.103	0.0276~0.0414	3
NPIP	0.069	200	0.103	0.0414	3
NDPA	0.103~0.138	200	0.138	0.0414	2.5
NDiPA	0.069	250~300	0.138	0.0414	2.5
NMPhA	0.069	250	0.241~0.276	0.0276~0.0414	4
NEPhA	0.103	200~250	0.276	0.0414	4
NDBA	0.103~0.138	200~250	0.138	0.0276~0.0414	3
NDiBA	0.138	200~250	0.138	0.0276~0.0414	3
NDBzA	0.103	250	0.138	0.0276	2.5~3
NDiNA	0.103~0.138	250	0.138~0.172	0.0276	3

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择 在本实验分析的14种N-亚硝胺中,NDPA与NDiPA,NDBA与NDiBA互为同分异构体,它们具有几乎相同的MRM过程(在0.7 Da的质量分辨率下不能区分)。为了准确地定性和定量,二者的色谱峰必须基线分离。为此,选取Eclipse XDB-C18(150 mm×2.1 mm×3.5  $\mu$ m)、Eclipse Plus C18(100 mm×2.1 mm×1.8  $\mu$ m)、Poroshell 120 EC-C18(100 mm×2.1 mm×2.7  $\mu$ m)反相柱,在相同的梯度洗脱程序下进行实验。由于XDB-C18为150 mm柱,为降低分析时间,将其流速提高至0.5 mL/min。使用上述色谱柱分析浓度为1  $\mu$ g/L含有14种N-亚硝胺的标准溶液,得到的NDPA与NDiPA、NDBA与

NDiBA提取离子色谱图示于图2。

由图2可见,3种色谱柱都能得到较好的峰型,NDPA和NDiPA均可实现基线分离,但使用填料尺寸较大的Eclipse XDB-C18色谱柱时,NDBA和NDiBA不能基线分离;而填料尺寸较小的Poroshell 120 EC-C18和Eclipse Plus C18色谱柱对NDBA和NDiBA的分离效果较好。这是由于目标物在该类色谱柱中的扩散相对较小、色谱峰变窄、峰高变大、分离度和灵敏度更高。在实际分析中,Eclipse Plus C18柱在梯度洗脱过程中的压力接近系统压力上限(60 MPa),随着无机盐在色谱柱中逐渐累积,会造成系统压力超出上限;而使用Poroshell 120 EC-C18柱时,系统压力显著降低,因此本研究选择该色谱柱进行样品分析。



注:(1) Eclipse Plus C18;(2) Poroshell 120 EC-C18;(3) Eclipse XDB-C18

图2 使用不同色谱柱得到的NDPA与NDiPA(a)和NDBA与NDiBA(b)提取离子色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of NDPA, NDiPA (a) and NDBA, NDiBA (b) using different chromatographic columns

**2.2.2 梯度洗脱程序的优化** 由于配制标准溶液的溶剂为甲醇-水溶液,为使流动相、标准溶液及样品基体兼容,选择甲醇-水溶液作为流动相。实验发现:甲醇比例低于90%时,极性最弱的 NDiNA 无法在20 min内洗脱;提高甲醇比例至100%时,NDiNA可在14 min左右洗脱,但由于此时流动相的洗脱能力最强,在相同流速下,同分异构体 NDBA 和 NDiBA 的分离度变差,不能实现基线分离;当降低甲醇比例至98%时,既可保证 NDiNA 在14 min左右洗脱,也可使 NDBA 和 NDiBA 基线分离,因此将甲醇的最终比例定为98%。同时,为了使极性较强的 NDELA、NDMA、NMOR 和 NPYR 得到窄而尖的色谱峰,流动相的起始比例应与标液溶剂的组分接近。实验表明,当甲醇的起始比例为40%时,色谱峰出现了严重的前伸,峰宽变大、灵敏度显著降低。为避免这4种分析物在死时间内被洗脱,强洗脱溶剂的起始比例不应过高,因此选择10%作为甲醇的起始比例。当进一步降低甲醇比例至5%时,也可得到窄而尖的色谱峰,但梯度陡度增大,分离度下降,不利于同分异构体 NDBA 和 NDiBA 的分离。因此,将甲醇的起始比例定为10%。根据色谱理论,梯度洗脱时间  $t_G$  可按式(2)计算<sup>[17]</sup>:

$$t_G = \frac{1.15V_m \Delta\varphi S \bar{k}'}{F} \quad (2)$$

式中: $V_m$  为色谱柱的死体积,本实验中色谱柱的死体积约等于色谱柱内部容积的60%; $\Delta\varphi$  为梯度洗脱过程中强洗脱溶剂比例的变化量,此处  $\Delta\varphi = 98\% - 10\% = 0.88$ ;  $\bar{k}'$  为平均容量因子, $S$  为参数,对于洗脱分子质量小于500的化合物, $\bar{k}' = 5$ ,  $S = 4$ ;  $F$  为流动相流速。据此,计算出使用 Poroshell 120 EC-C18 柱时的理论梯度洗脱时间  $t_G = 14.01$  min。由于 NDiNA 需要90%以上的甲醇才能洗脱,在保证其他目标分析物有足够的灵敏度和分离度的前提下,将梯度洗脱时间缩短至10 min,并在10~13 min进行甲醇比例为98%的等度洗脱,以缩短 NDiNA 的洗脱时间。NDiNA 在14.41 min出峰,而此时流动相已切换至起始比例,这是由于死体积、水和甲醇在泵后混合引起的体积变化,以及仪器控制电路的延迟等因素导致的梯度洗脱时间滞后现象,延迟时间  $t_D$  可按式(3)估算:

$$t_D = \frac{V_D}{F} \quad (3)$$

式中, $V_D$  为液相色谱仪的柱前延迟体积, $F$  为流速。本实验所使用仪器的柱前延迟体积约为800  $\mu\text{L}$ ,因此,延迟时间约为2.67 min,说明 NDiNA 出峰时仍在进行梯度洗脱。梯度洗脱程序优化后,得到的提取离子色谱图和总离子流色谱图分别示于图3和图4。

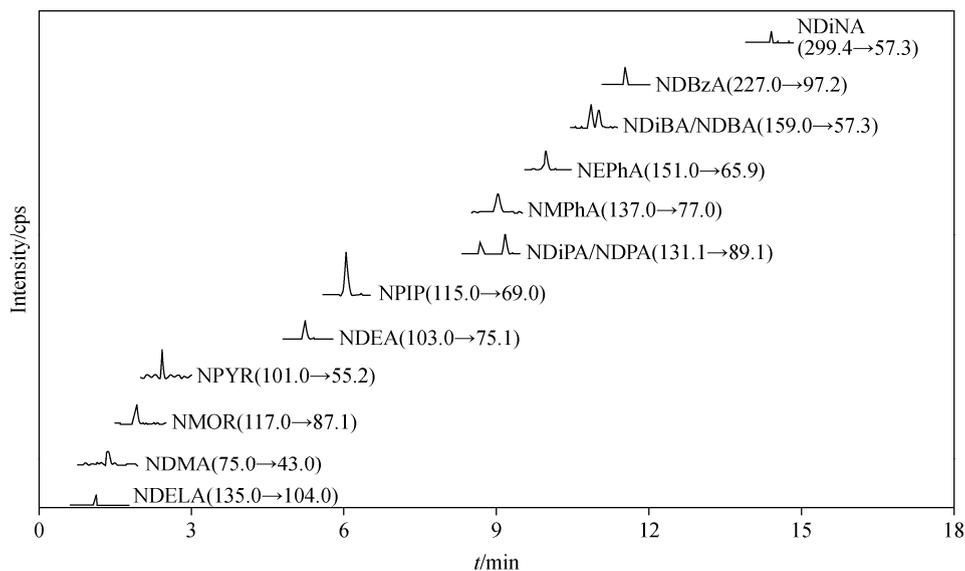
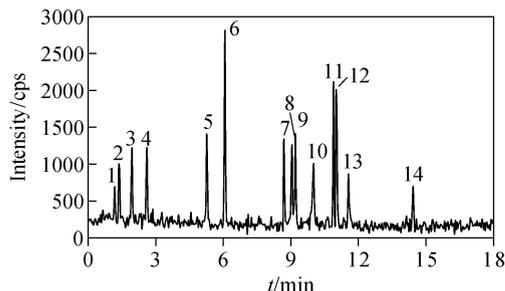


图3 色谱条件优化后,14种N-亚硝胺的提取离子色谱图(Q过程)

Fig. 3 Extracted ion chromatogram (Q transitions) of 14 N-nitrosamines after optimized chromatographic conditions



注: 1. NDELA; 2. NDMA; 3. NMOR; 4. NPYR; 5. NDEA; 6. NPIP; 7. NDiPA; 8. NMPPhA; 9. NDPA; 10. NEPhA; 11. NDiBAh; 12. NDBA; 13. NDBzA; 14. NDiNA

图 4 色谱条件优化后,

14 种 *N*-亚硝胺的总离子流色谱图

Fig. 4 Total ion chromatogram of 14 *N*-nitrosamines with optimizd chromatographic conditions

**2.2.3 甲酸浓度的优化** Herrmann 等<sup>[11]</sup>指出, 由于 *N*-亚硝胺被电离时主要形成  $[M+H]^+$  准分子离子, 因此降低了流动相的 pH 值, 有利于提高流动相的质子化程度, 促进质子交换过程, 在离子源中形成更多的  $[M+H]^+$ , 从而提高目标分析物的响应。另据文献<sup>[10,18-22]</sup>报道, 在水和(或)甲醇中加入甲酸、乙酸、甲酸铵或乙酸铵都可以达到降低流动相 pH 的目的, 但使用甲酸时的干扰更低, 故本研究选择甲酸作为流动相改性剂。为找到最佳的甲酸浓度, 分别配制了 0%、0.005%、0.01%、0.015%、0.020% 甲酸-水溶液和甲酸-甲醇溶液, 将它们分别作为流动相分析 1  $\mu\text{g/L}$  *N*-亚硝胺标准溶液, 每次分析连续进样 10 次, 计算峰面积的平均值, 并用 14 种 *N*-亚硝胺的峰面积对甲酸浓度作图, 结果示于图 5。

从图 5 可见, 14 种 *N*-亚硝胺响应最高时对应的甲酸浓度集中在 0.005%~0.01%, 当甲酸浓度大于 0.01% 时, 响应有所下降。对于极性较弱的化合物 NPIP、NDPA、NDiPA、NMPPhA 和 NDBzA, 当甲酸浓度为 0.02% 时, 响应显著降低, 甚至低于甲酸浓度为 0 时的响应, 其他目标物的响应也有所下降, 表明此时目标物的电离受甲酸电离的抑制,  $[M+H]^+$  气相离子数量显著减少。此外, 实验还发现, 甲酸浓度为 0.02% 时, 仪器精密度也有所下降, 连续进样时峰面积的 RSD 值增大。因此, 最终选择 0.01% 甲酸作为流动相。

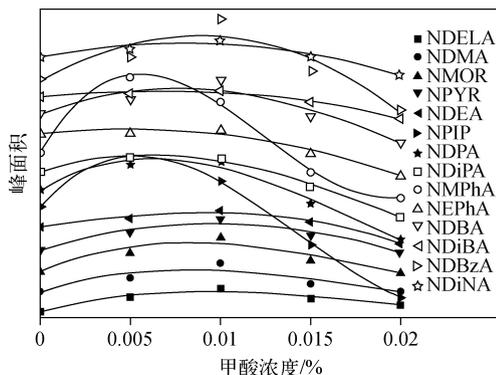


图 5 14 种 *N*-亚硝胺峰面积与甲酸浓度的关系

Fig. 5 Relationship of peak area and formic acid concentration of 14 *N*-nitrosamines

### 2.3 线性方程和检出限

实验考察了 14 种目标物在 0.2~100  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内的线性关系, 结果表明, 它们的线性关系良好, 相关系数  $R^2 \geq 0.9995$ 。如果将浓度范围扩展至 0.2~200  $\mu\text{g/L}$ , 多数 *N*-亚硝胺的线性关系变差,  $R^2 \leq 0.99$ 。对 0.1  $\mu\text{g/L}$  *N*-亚硝胺标准溶液进行分析, 通过计算信噪比得到 14 种目标分析物的方法检出限 ( $S/N=3$ ) 和定量限 ( $S/N=10$ ), 结果列于表 5。

### 2.4 方法的回收率与精密度

对阴性气球样品进行加标回收测试, 使其添加水平分别为 5、50、500  $\mu\text{g/kg}$ , 对应的迁移液中目标物浓度分别为 0.5、5、50  $\mu\text{g/L}$ 。按 2.2 和 2.3 节优化的各项参数进行实验, 得到的回收率和精密度结果列于表 6。可见, 3 个不同加标水平的回收率分别为 88.0%~122%、89.0%~106%、91.0%~109%, 相对标准偏差分别为 3.0%~13.9%、1.9%~9.2%、1.1%~6.6%。

### 2.5 实际样品的分析

对 104 个批次的橡胶和硅胶奶嘴、气球及其他橡胶制品进行抽查, 阳性率为 7.4%, 其中硅胶奶嘴因避免了 *N*-亚硝胺及可 *N*-亚硝化物质的引入, 阳性率为 0%, 风险较低。但抽查的 8 个气球样品中有 6 个阳性样品, 阳性率高达 75%, 测试结果列于表 7。表中的迁移量 ( $\text{mg/kg}$ ) 是由迁移液测试值换算而来的, 换算公式示于式 (4):

$$c = \frac{c_0 V}{m} \quad (4)$$

表 5 14 种 *N*-亚硝胺的线性方程、相关系数、方法检出限及定量限Table 5 Linear equations, correlation coefficients, method detection limits and limits of quantification of 14 *N*-nitrosamines

分析物	线性方程	相关系数 $R^2$	检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
NDELA	$y=1286.4x-123.4$	0.9998	1.00	3.33
NDMA	$y=5498.6x-253.9$	0.9997	0.86	2.87
NMOR	$y=5856.6x-356.7$	0.9998	0.46	2.86
NPYR	$y=5428.1x-328.0$	0.9998	0.55	1.83
NDEA	$y=9551.1x-5045.3$	0.9995	0.75	2.50
NPIP	$y=19330x-4877.5$	0.9997	1.00	3.33
NDPA	$y=8754.7x-1135.6$	0.9999	0.67	2.23
NDiPA	$y=5728.0x-229.3$	0.9999	0.86	2.87
NMPPhA	$y=6587.0x+63.7$	0.9999	1.00	3.33
NEPhA	$y=8026.7x+1392.9$	0.9998	0.32	1.07
NDBA	$y=9687.0x-2299.7$	0.9996	0.32	1.07
NDiBA	$y=8341.9x-2233.0$	0.9996	0.60	2.00
NDBzA	$y=10132.0x+1452.1$	0.9997	0.86	2.87
NDiNA	$y=1971.8x-1640.5$	0.9996	0.67	2.23

表 6 14 种 *N*-亚硝胺的加标回收率和相对标准偏差 ( $n=5$ )Table 6 Recoveries and relative standard deviations of 14 *N*-nitrosamines at different spiked levels ( $n=5$ )

分析物	添加水平(测试液中目标物浓度)					
	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ )		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5 $\mu\text{g}/\text{L}$ )		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (50 $\mu\text{g}/\text{L}$ )	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
NDELA	112	7.8	98.4	4.6	101	2.2
NDMA	100	10.9	90.2	3.1	100	3.4
NMOR	96.0	9.8	98.8	2.0	107	1.9
NYPR	95.0	6.5	104	3.1	103	2.3
NDEA	112	6.9	90.0	3.1	103	1.6
NPIP	102	4.3	89.4	2.9	99.0	1.1
NDiPA	84.0	4.4	82.3	1.9	97.5	1.4
NDPA	112	4.7	86.6	9.2	98.8	2.1
NMPPhA	88.0	10.5	105	1.7	102	2.6
NEPhA	92.0	13.9	106	3.2	103	2.8
NDiBA	112	7.1	92.8	4.4	94.8	6.6
NDBA	122	5.4	98.6	6.5	109	4.5
NDBzA	92.0	9.6	97.2	2.3	98.8	3.5
NDiNA	88.0	3.0	89.0	2.5	91.0	2.3

表 7 气球样品中 *N*-亚硝胺和可 *N*-亚硝化物质的迁移量Table 7 Migrations of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances in balloon samples

分析物		迁移量/(mg/kg)					
		白色气球 A	白色气球 B	黄色气球 A	黄色气球 B	绿色气球 A	绿色气球 B
<i>N</i> -亚硝胺	NDMA	0.770	0.785	0.757	0.803	—	—
	NMPhA	—	—	—	—	0.0317	0.0366
可 <i>N</i> -亚硝化物质	NMPhA	11.9	13.3	8.58	7.96	4.60	4.41

注:—表示低于方法检出限

式中: $m$  为样品的质量, kg;  $V$  为迁移液体积, mL;  $c_0$  为迁移液测试值, mg/L。由于我国缺少对气球中 *N*-亚硝胺迁移量的明确规定, 因此本研究参考欧盟玩具安全指令 2009/48/EC 的规定, 即橡胶气球或橡胶玩具中的 *N*-亚硝胺迁移量不得超过 0.05 mg/kg, 可 *N*-亚硝化物质的迁移量不得超过 1 mg/kg。从表 7 可见, 白色气球 A、B 和黄色气球 A、B 的 *N*-亚硝胺迁移量, 以及全部 6 个阳性样品的可 *N*-亚硝化物质迁移量均远远超出了迁移限量。另外, 在日常测试中发现, NDMA 是检出最多的 *N*-亚硝胺, 风险最高, 而多数不合格气球样品在亚硝化后会检出 NMPhA。

### 3 结论

通过对样品进行迁移和亚硝化, 以及质谱、色谱条件和参数的优化, 建立了同时测定与口接触玩具及儿童用品中 14 种 *N*-亚硝胺及可 *N*-亚硝化物质的 HPLC-APCI-MS/MS 方法。该方法前处理简单, 可直接分析迁移溶液, 无需浓缩或萃取, 检出限能够满足德国法规的要求, 具有较好的回收率和精密度。同时, 通过对大量实际样品的分析, 筛选出了高风险产品为气球, 其中的高风险物质为 NDMA 和 NMPhA。该方法可为我国制定相关玩具及儿童用品的法规和标准, 以及加强进出口玩具及儿童用品的出入境检验风险监管提供有力的技术支持。

### 参考文献:

- [1] ALTKOFER W, BRAUNE S, ELLENDT K, et al. Migration of nitrosamines from rubber products—are balloons and condoms harmful to the human health? [J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49(3): 235-238.
- [2] 朱家琦, 肖颖, 刘泽嵌, 等. 茶叶对 *N*-甲基苄基亚硝胺致 DNA 烷基化的影响 [J]. 卫生研究, 1990, 19(5): 22-25.  
ZHU Jiaqi, XIAO Ying, LIU Zeqin, et al. The effects of Chinese tea on the methylation of DNA induced by the esophageal carcinogen *N*-nitrosomethylbenzylamine [J]. Journal of Hygiene Research, 1990, 19(5): 22-25 (in Chinese).
- [3] 封棣. 乳胶制品中亚硝胺的分析及生物安全性评价 [D]. 北京: 北京协和医学院国家人口计生委科学技术研究所, 2009.
- [4] Directive 93/11/EEC of 15 March 1993 concerning the release of the *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from elastomer pr rubber teats or smothers [S]. Official Journal of the European Union, L 093, 1993: 37.
- [5] Opinion on the presence of nitrosamines and nitrosatable compounds from rubber balloons. Scientific Committee on Consumer Products [S]. Brussels, European Commission, 2007: 11.
- [6] Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the Safety of Toys [S]. Official Journal of the European Union, L 170, 2009: 24.
- [7] GB/T 28482—2012 婴幼儿安抚奶嘴安全要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [8] EN 12868: 1999, Child use and care articles—Methods for determining the release of *N*-Nitrosamines and *N*-Nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers, European Standard [S]. Brussels, European Committee for Standardization, 1999.
- [9] 幸苑娜, 倪宏刚, 王欣, 等. 气相色谱-正化学源质谱法测定橡胶中 *N*-亚硝胺及其前体物的迁移量 [J]. 分析化学, 2011, 39(7): 1 065-1 070.  
XING Yuanna, NI Honggang, WANG Xin, et al. Determination of migration levels of

- N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from balloons by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(7): 1 065-1 070(in Chinese).
- [10] KIM H J, SHIN H S. Determination of tobacco-specific nitrosamines in replacement liquids of electronic cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2013, 1 291(4): 48-55.
- [11] HERRMANN S S, DUEDAHL-OLSEN L, GRANBY K. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation [J]. J Chromatogr A, 2014, 1 330(4): 20-29.
- [12] KRAUSS M, HOLLENDER J. Analysis of nitrosamines in wastewater: Exploring the trace level quantification capabilities of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer [J]. Anal Chem, 2008, 80(3): 834-842.
- [13] EN 71-12: 2013, Safety of Toys, part 12-*N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances. European Standard[S]. Brussels, European Committee for Standardization, 2013.
- [14] RIPOLLES C, PITARCH E, SANCHO J V, et al. Determination of eight nitrosamines in water at the ng · L<sup>-1</sup> levels by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2011, 702(1): 62-71.
- [15] 陈婷, 温裕云, 欧延, 等. 固相萃取净化及超高效液相色谱-串联质谱法测定橡胶制品中的 13 种 *N*-亚硝胺[J]. 色谱, 2014, 32(1): 89-94.
- CHEN Ting, WEN Yuyun, OU Yan, et al. Determination of 13 *N*-nitrosamines in rubber products by solid phase extraction purification and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32(1): 89-94 (in Chinese).
- [16] 罗茜, 王东红, 王炳一, 等. 超高效液相色谱串联质谱快速测定饮用水中 9 种 *N*-亚硝胺的新方法 [J]. 中国科学: 化学, 2011, 41(1): 82-90.
- LUO Qian, WANG Donghong, WANG Bingyi, et al. Rapid and sensitive method for simultaneous determination of nine *N*-nitrosamines in drinking water by UPLC-MS/MS [J]. Scientia Sinica Chimica, 2011, 41(1): 82-90(in Chinese).
- [17] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2012.
- [18] WU W, ASHLEY D L, WATSON C H. Simultaneous determination of five tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2003, 75(18): 4 827-4 832.
- [19] WAGNER K A, FINKEL N H, FOSSETT J E, et al. Development of a quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2005, 77(4): 1 001-1 006.
- [20] WU J, JOZA P, SARIFI M, et al. Quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in cigarette tobacco and mainstream cigarette smoke by use of isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2008, 80(4): 1 341-1 345.
- [21] 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]. Anal Chim Acta, 2010, 674(1): 71-78.
- [22] JANSSON C, PACCOU A, OESTERDAHL B G. Analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines in snuff by ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2003, 1 008(2): 135-143.