

ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.26—2003
代替 GB/T 5009.26—1996

食品中 N-亚硝胺类的测定

Determination of N-nitrosamines in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.26—1996《食品中 N-亚硝胺类的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.26—1996 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中 N-亚硝胺类的测定》；

——按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由北京医科大学公共卫生学院、中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

本标准第二法由吉林省卫生防疫站负责起草。

本标准于 1985 年首次发布，1996 年第一次修订，本次为第二次修订。

食品中 N-亚硝胺类的测定

第一法 气相色谱-热能分析法

1 范围

本标准规定了用气相色谱-热能分析仪(GC-TEA)测定啤酒中挥发性 N-亚硝胺的测定方法。

本标准适用于啤酒中 N-亚硝基二甲胺含量的测定。

仪器的最低检出量为 0.1 ng,在试样取样量为 50 g,浓缩体积为 0.5 mL,进样体积为 10 μ L 时,本方法的最低检出浓度为 0.1 μ g/kg;在取样量为 20 g,浓缩体积为 1.0 mL,进样体积为 5 μ L 时,本方法的最低检出浓度为 1.0 μ g/kg。

2 原理

试样中 N-亚硝胺经硅藻土吸附或真空低温蒸馏,用二氯甲烷提取、分离,气相色谱-热能分析仪(GC-TEA)测定。其原理如下:

自气相色谱仪分离后的亚硝胺在热解室中经特异性催化裂解产生 NO 基团,后者与臭氧反应生成激发态 NO*。当激发态 NO* 返回基态时发射出近红外区光线(600 nm~2 800nm)。产生的近红外区光线被光电倍增管检测(600 nm~800 nm)。由于特异性催化裂解与冷阱或 CTR 过滤器除去杂质,使热能分析仪仅仅能检测 NO 基团,而成为亚硝胺特异性检测器。

3 试剂

3.1 二氯甲烷:每批取 100 mL 在水浴上用 K-D 浓缩器浓缩至 1 mL,在热能分析仪上无阳性响应。如有阳性响应,则需经全玻璃装置重蒸后再试,直至阴性。

3.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠(NaOH),用水溶解后定容至 1 L。

3.3 硅藻土:Extrelut(Merck)。

3.4 氮气。

3.5 盐酸(0.1 mol/L)。

3.6 无水硫酸钠。

3.7 N-亚硝胺标准储备液(200 mg/L):吸取 N-亚硝胺标准溶液 10 μ L(约相当于 10 mg),置于已加入 5 mL 无水乙醇并称重的 50 mL 棕色容量瓶中,称量(准确到 0.000 1 g)。用无水乙醇稀释定容,混匀。分别得到 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二丙胺、N-亚硝基吗啉的储备液。此溶液用安瓿密封分装后避光冷藏(-30 $^{\circ}$ C)保存,两年有效。

3.8 N-亚硝胺标准工作液(200 μ g/L):吸取上述 N-亚硝胺标准储备液 100 μ L,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇稀释定容,混匀。此溶液用安瓿密封分装后避光冷藏(4 $^{\circ}$ C)保存,三个月有效。

4 仪器

4.1 气相色谱仪。

4.2 热能分析仪。

4.3 玻璃层析柱:带活塞,8 mm 内径,400 mm 长。

4.4 减压蒸馏装置。

4.5 K-D 浓缩器。

4.6 恒温水浴锅。

5 分析步骤

5.1 提取

5.1.1 甲法：硅藻土吸附

称取 20.00 g 预先脱二氧化碳气的试样于 50 mL 烧杯中,加 1 mL 氢氧化钠溶液(1 mol/L)和 1 mL N-亚硝基二丙胺内标工作液(200 μg/L),混匀后备用。将 12 g Extrelut 干法填于层析柱中,用手敲实。将啤酒试样装于柱顶。平衡 10 min~15 min 后,用 6×5 mL 二氯甲烷直接洗脱提取。

5.1.2 乙法：真空低温蒸馏

5.1.2.1 在双颈蒸馏瓶中加入 50.00 g 预先脱二氧化碳气的试样和玻璃珠,4 mL 氢氧化钠溶液(1 mol/L),混匀后连接好蒸馏装置。在 53.3 kPa 真空度低温蒸馏,待试样剩余 10 mL 左右时,把真空度调节到 93.3 kPa,直至试样蒸至近干为止。

5.1.2.2 把蒸馏液移入 250 mL 分液漏斗,加 4 mL 盐酸(0.1 mol/L),用 20 mL 二氯甲烷提取三次,每次 3 min,合并提取液。用 10 g 无水硫酸钠脱水。

5.2 浓缩

将二氯甲烷提取液转移至 K-D 浓缩器中,于 55℃ 水浴上浓缩至 10 mL,再以缓慢的氮气吹至 0.4 mL~1.0 mL,备用。

5.3 试样测定

5.3.1 气相色谱条件

5.3.1.1 气化室温度:220℃。

5.3.1.2 色谱柱温度:175℃,或从 75℃ 以 5℃/min 速度升至 175℃ 后维持。

5.3.1.3 色谱柱:内径 2 mm~3 mm,长 2 m~3 m 玻璃柱或不锈钢柱,内装涂以固定液质量分数为 10% 的聚乙二醇 20 mol/L 和氢氧化钾(10 g/L)或质量分数为 13% 的 Carbowax 20M/TPA 于载体 Chromosorb WAW-DMCS(80 目~100 目)。

5.3.1.4 载气:氩气,流速 20 mL/min~40 mL/min。

5.3.2 热能分析仪条件

5.3.2.1 接口温度:250℃。

5.3.2.2 热解室温度:500℃。

5.3.2.3 真空度:133 Pa~266 Pa。

5.3.2.4 冷阱:用液氮调至-150℃(可用 CTR 过滤器代替)。

5.3.3 测定

分别注入试样浓缩液和 N-亚硝胺标准工作液 5 μL~10 μL,利用保留时间定性,峰高或峰面积定量。

6 计算

试样中 N-亚硝基二甲胺的含量按式(1)进行计算。

$$X = h_1 \times V_2 \times c \times V / (h_2 \times V_1 \times m) \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X —— 试样中 N-亚硝基二甲胺的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

h₁ —— 试样浓缩液中 N-亚硝基二甲胺的峰高(mm)或峰面积;

h₂ —— 标准工作液中 N-亚硝基二甲胺的峰高(mm)或峰面积;

c —— 标准工作液中 N-亚硝基二甲胺的浓度,单位为微克每升(μg/L);

V₁ —— 试样浓缩液的进样体积,单位为微升(μL);

V_2 ——标准工作液的进样体积,单位为微升(μL);

V ——试样浓缩液的浓缩体积,单位为微升(μL);

m ——试样的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到两位有效数位。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过16%。

第二法 气相色谱-质谱仪法

8 范围

本标准规定了酒类、肉及肉制品、蔬菜、豆制品、茶叶等食品中N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二丙胺及N-亚硝基吡咯烷含量的测定方法。

本标准适用于酒类、肉及肉制品、蔬菜、豆制品、调味品、茶叶等食品中N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二丙胺及N-亚硝基吡咯烷含量的测定。

9 原理

试样中的N-亚硝胺类化合物经水蒸气蒸馏和有机溶剂萃取后,浓缩至一定量,采用气相色谱-质谱联用仪的高分辨峰匹配法进行确认和定量。

10 试剂

10.1 二氯甲烷:应用全玻璃蒸馏装置重蒸。

10.2 无水硫酸钠。

10.3 氯化钠:优级纯。

10.4 硫酸(1+3)。

10.5 氢氧化钠溶液(120 g/L)。

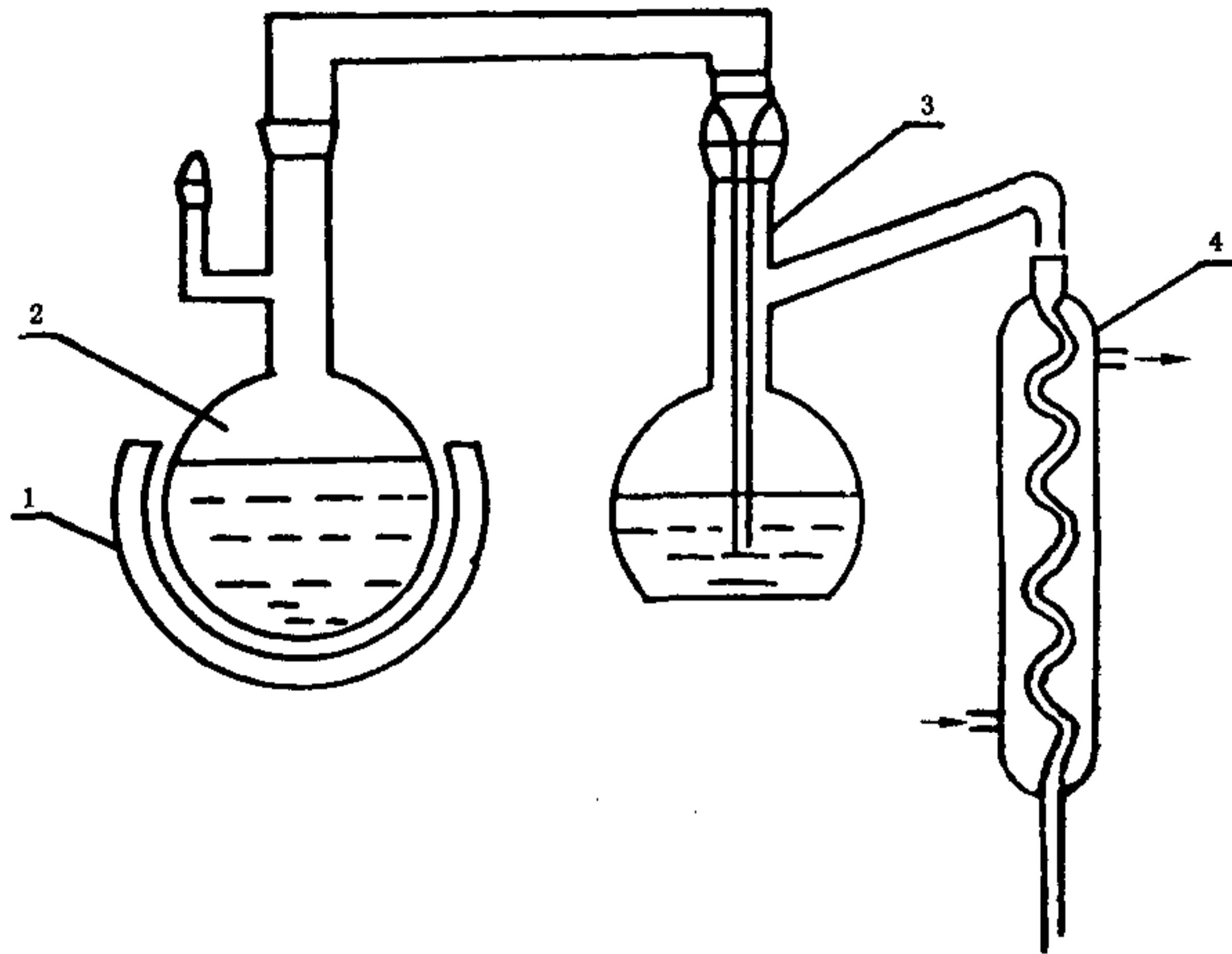
10.6 N-亚硝胺标准溶液:用二氯甲烷作溶剂,分别配制N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二丙胺、N-亚硝基吡咯烷的标准溶液,使每毫升分别相当于0.5 mgN-亚硝胺。

10.7 N-亚硝胺标准使用液:在四个10 mL容量瓶中,加入适量二氯甲烷,用微量注射器各吸取100 μL N-亚硝胺标准溶液,分别置于上述四个容量瓶中,用二氯甲烷稀释至刻度。此溶液每毫升分别相当于5 μg N-亚硝胺。

10.8 耐火砖颗粒:将耐火砖破碎,取直径为1 mm~2 mm的颗粒,分别用乙醇、二氯甲烷清洗后,在马弗炉中(400 $^{\circ}\text{C}$)灼烧1 h,作助沸石使用。

11 仪器

11.1 水蒸气蒸馏装置:如图1所示。



- 1——加热水器；
- 2——2 000 mL 水蒸气发生器；
- 3——1 000 mL 蒸馏瓶；
- 4——冷凝器。

图 1 水蒸气蒸馏装置

11.2 K-D 浓缩器。

11.3 气相色谱-质谱联用仪。

12 分析步骤

12.1 水蒸气蒸馏

称取 200 g 切碎(或绞碎、粉碎)后的试样,置于水蒸气蒸馏装置的蒸馏瓶中(液体试样直接量取 200 mL),加入 100 mL 水(液体试样不加水),摇匀。在蒸馏瓶中加入 120 g 氯化钠,充分摇动,使氯化钠溶解。将蒸馏瓶与水蒸气发生器及冷凝器连接好,并在锥形接收瓶中加入 40mL 二氯甲烷及少量冰块,收集 400 mL 馏出液。

12.2 萃取纯化

在锥形接收瓶中加入 80 g 氯化钠和 3 mL 的硫酸(1+3),搅拌使氯化钠完全溶解。然后转移到 500 mL 分液漏斗中,振荡 5 min,静止分层,将二氯甲烷层分至另一锥形瓶中,再用 120 mL 二氯甲烷分三次提取水层,合并四次提取液,总体积为 160 mL。

对于含有较高浓度乙醇的试样,如蒸馏酒、配制酒等,应用 50 mL 氢氧化钠溶液(120 g/L)洗有机层两次,以除去乙醇的干扰。

12.3 浓缩

将有机层用 10 g 无水硫酸钠脱水后,转移至 K-D 浓缩器中,加入一粒耐火砖颗粒,于 50℃ 水浴上浓缩至 1 mL。备用。

12.4 气相色谱-质谱联用测定条件

12.4.1 色谱条件

12.4.1.1 气化室温度:190℃。

12.4.1.2 色谱柱温度:对 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二丙胺、N-亚硝基吡咯烷分别

为 130℃、145℃、130℃、160℃。

12.4.1.3 色谱柱:内径 1.8 mm~3.0 mm,长 2 m 的玻璃柱,内装涂以质量分数为 15% 的 PEG20M 固定液和氢氧化钾溶液(10 g/L)的 80 目~100 目 Chromosorb WAWDWCS。

12.4.1.4 载气:氦气,流速为 40 mL/min。

12.4.2 质谱仪条件

12.4.2.1 分辨率:≥7 000。

12.4.2.2 离子化电压:70 V。

12.4.2.3 离子化电流:300 μA。

12.4.2.4 离子源温度:180℃。

12.4.2.5 离子源真空度:1.33×10⁻⁴ Pa。

12.4.2.6 界面温度:180℃。

12.4.3 测定采用电子轰击源高分辨峰匹配法,用全氟煤油(PFK)的碎片离子(它们的质荷比为 68.995 27、99.993 6、130.992 0、99.993 6)分别监视 N-亚硝基二甲胺、N-亚硝基二乙胺、N-亚硝基二丙胺及 N-亚硝基吡咯烷的分子、离子(它们的质荷比为 74.048 0、102.079 3、130.110 6、100.063 0),结合它们的保留时间来定性,以示波器上该分子、离子的峰高来定量。

13 计算

试样中某一 N-亚硝胺化合物的含量按式(2)进行计算。

$$X = h_1/h_2 \times c \times V/m \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中某一 N-亚硝胺化合物的含量,单位为微克每千克或微克每升(μg/kg 或 μg/L);

h_1 ——浓缩液中该 N-亚硝胺化合物的峰高,单位为毫米(mm);

h_2 ——标准使用液中该 N-亚硝胺化合物的峰高,单位为毫米(mm);

c ——标准使用液中该 N-亚硝胺化合物的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——试样浓缩液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量或体积,单位为克或毫升(g 或 mL)。

计算结果表示到两位有效数字。