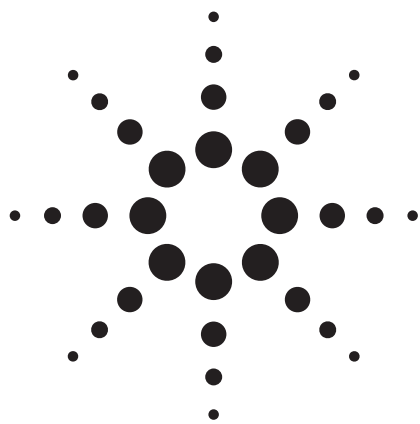




Agilent 1260 uHPLC 串联 Agilent 6460QQQ 质谱系统检测玩具中的亚硝胺及亚硝基胺类物质

应用

玩具致癌物

作者

王少珍 黄岱咏 张曼玉 詹舜安
应用工程师
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本实验采用 Agilent 1260 uHPLC 串联 Agilent 6460QQQ 质谱系统，采用大气压化学电离 (APCI) 源、ZorbaxSB-Aq 色谱柱快速分析了十三种亚硝胺及亚硝基胺类物质，其中两组亚硝基胺异构体得到了完全分离，可用于玩具中亚硝胺及亚硝基胺类物质的快速定性定量分析。十三种亚硝胺类化合物在 1~20 µg/L 线性范围内，相关系数 $R^2 > 0.998$ 。此检测方法具有简便、灵敏度高、重复性好等特点，满足欧盟玩具指令 EN-71-12 的要求。

前言

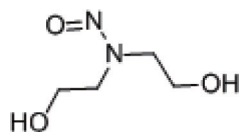
以天然或人造橡胶为原材料的产品在制造过程中，二硫代氨基甲酸酯类和秋兰姆类常被当硫化促进剂使用。这两类硫化促进剂在硫化工序中被转化成 N-亚硝胺和其他种类的亚硝基胺物质。大量的动物实验已确认，亚硝胺是最重要的化学致癌物之一，还有致畸和致突变作用，而亚硝基胺通过酸化可转化为亚硝胺类物质。众所周知，在健康成长过程中，儿童是一个易受伤害的群体。在使用的橡胶奶嘴、安抚奶嘴和玩具时，可能暴露于 N-亚硝胺中，因此对玩具和儿童产品中 N-亚硝胺进行安全评估是有必要的。欧洲标准化委员会 (CEN) 就 N-亚硝胺 (n-nitrosamines) 和 N-亚硝基胺 (n-nitrosatables) 发布了最严苛的欧盟玩具法规 EN 71-12: 2013，并于 2013 年 7 月起实施。



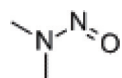
Agilent Technologies

采用 LC-APCI/MS/MS 法, 使用 ZorbaxSB-Aq 填料色谱柱, 可以在短时间内对十三种亚硝胺及亚硝基胺进行分离, 其中分子量同为 131 的 NAPA/NPiPA, 以及分子量同为 159 的 NABA/NDiBA 都能够达到完全分离, 从而满足定量需求。目前, 液相色谱-电喷雾质谱联用 (LC-ESI-MS) 技术广泛应用于高通量的分析, 能提供令人满意的分析速度、灵敏度、选择性和可靠性, 而某些在电喷雾源中响应较低的化合物可以在大气压化学电离 (APCI) 中被电离。本方法采用 APCI 源进行检测, 使得分子量较低的 NDMA 化合物有好的响应, 满足欧盟法规 EN71-12 定量限的要求。

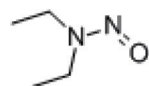
亚硝胺及亚硝基胺结构图



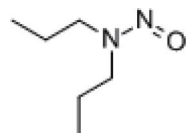
NDELA, CAS 号: 1116-54-7, 分子量: 134.0691



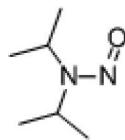
NDMA, CAS 号: 62-75-9, 分子量: 75.048



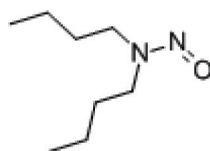
NDEA, CAS 号: 55-18-5, 分子量: 102.0793



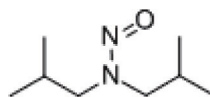
NDPA, CAS 号: 621-64-7, 分子量: 130.1106



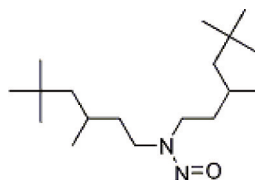
NDiPA, CAS 号: 601-77-4, 分子量: 130.1106



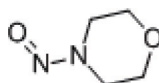
NDBA, CAS 号: 924-16-3, 分子量: 158.1419



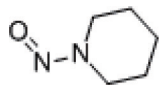
NDiBA, CAS 号: 997-95-5, 分子量: 158.1419



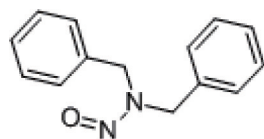
NDiNA, CAS 号: 1207995-62-7, 分子量: 298.2984



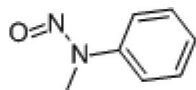
NMOR, CAS 号: 59-89-2, 分子量: 116.0586



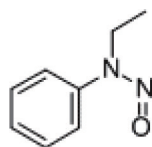
NPIP, CAS 号: 100-75-4, 分子量: 114.0793



NDBzA, CAS 号: 5336-53-8, 分子量: 226.1106



NMPPhA, CAS 号: 614-00-6, 分子量: 136.0637



NEPhA, CAS 号: 612-64-6, 分子量: 150.0793

实验部分

仪器

Agilent 1260 uHPLC 系统, 其中包括二元泵, 自动进样器、真空在线脱气机和柱温箱。

Agilent 6460QQQ 质谱系统, MassHunter B 5.0 采集软件和数据处理软件。

试剂

试剂	来源	备注
甲醇	DikmaPure	HPLC 级
水		超纯水
试样标准品		
亚硝胺及亚硝基胺类、D8-NDELA、D6-NDMA		

标样制备

取十三种亚硝胺及亚硝基胺标准品适量, 用甲醇配制成标准品溶液。

实验条件

色谱柱:	ZORBAX SB-AqC18, 3.0 × 100 mm, 3.5 μm	
流动相:	A: 0.1% Fa 水	
	B: 0.1% Fa 甲醇	
流速:	0.5 ml/min	
柱温:	40 °C	
进样量:	20 μl	
梯度:	Time (min)	B (%)
	0	2
	1	2
	3	50
	6.5	80
	7	95
	10	95
质谱条件:		
极性:	正极	
干燥气温度:	350 °C	
干燥气流量:	6 L/min	
雾化器压力:	40 psi	
毛细管电压:	4000 V	
APCI 蒸发室温度:	350 °C	
扫描模式:	MRM	
Delta EMV:	600 V	

MRM 条件:

Compound Name	Pre. Ion	Pro. Ion	FragmentorV	Collision Energy V	Polarity
NDELA	135.1	104.1	70	4	Positive
		74.1		10	
D8-NDELA	143.1	80.2	70	10	Positive
NDMA	75.1	58.2	30	10	Positive
		43.3		15	
D6-NDMA	81.1	46.1	30	15	Positive
NMOR	117.1	87.1	90	10	Positive
		86.3		12	
NPIP	115.1	69.3	80	14	Positive
		41.3		10	
NDEA	103.1	75.2	70	8	Positive
		47.2		14	
NEPhA	151.1	77.2	70	18	Positive
		51.2		44	
NMPHA	137.2	107.1	80	8	Positive
		66.2		20	
NDPA	131.1	89.2	70	8	Positive
		43.3		12	
NPiPA	131.1	89.2	70	8	Positive
		43.3		12	
NDBzA	227.1	91.2	70	14	Positive
		65.2		58	
NDBA	159.1	103.1	80	8	Positive
		57.3		12	
NDiBA	159.1	103.1	80	8	Positive
		57.3		12	
NDiNA	299.3	71.4	90	18	Positive
		57.4		20	

结果与讨论

LC-MS/MS 方法可在 10 分钟内完全十三种亚硝胺及亚硝基胺类物质分离，下图为此十三种化合物的 TIC 图谱。

MS/MS 分离定量时，对于分子量不同的化合物来说，即使不能完全分离也可通过提取不同的离子通道而达到定量要求，但对于分子量完全相同的异构体则必须在质谱入口端达到完全分离方可进行准确定量。因此对于分子量同为 131 的 NAPA/NPiPA，以及分子量同为 159 的 NABA/NDiBA，必须在液相部分达到完全分离。采用 ZorbaxSB-Aq 色谱柱可以达到上述异构体的完全分离。

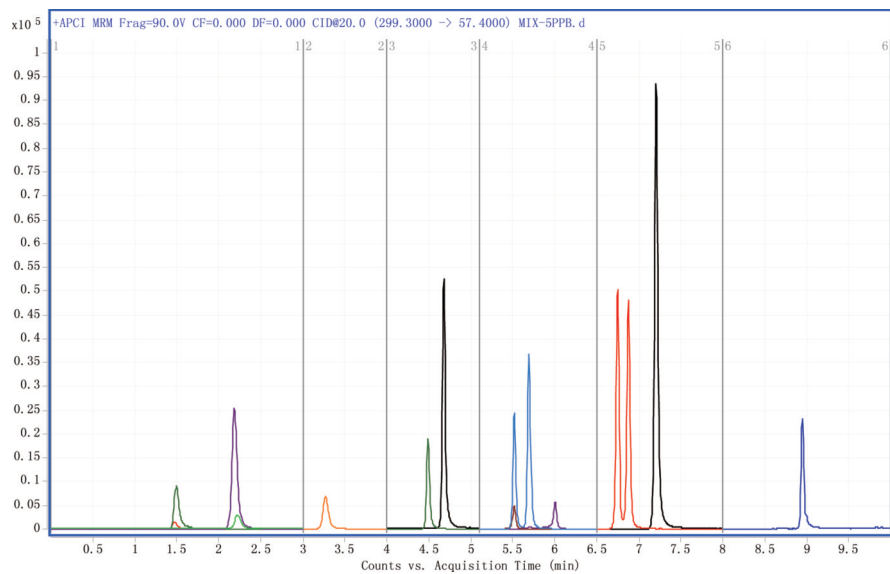


图 1. 十三种亚硝胺及亚硝基胺的 LC-MS/MS TIC 图谱

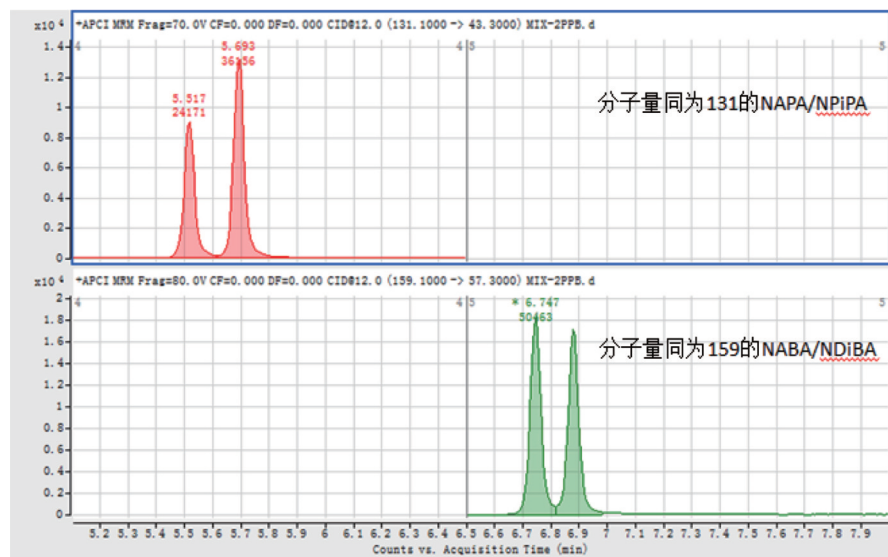
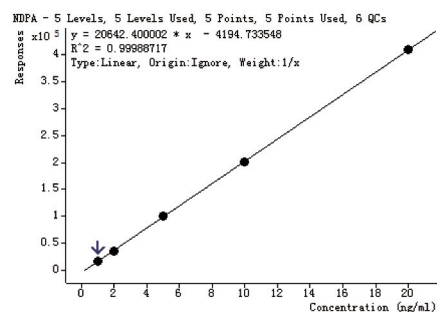
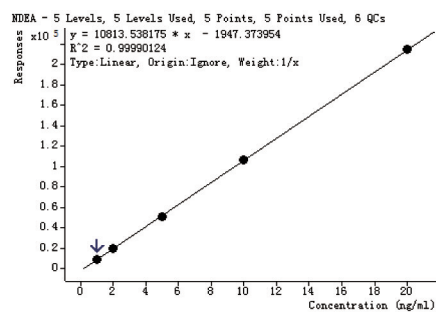
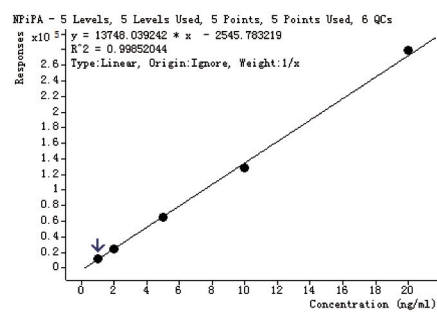
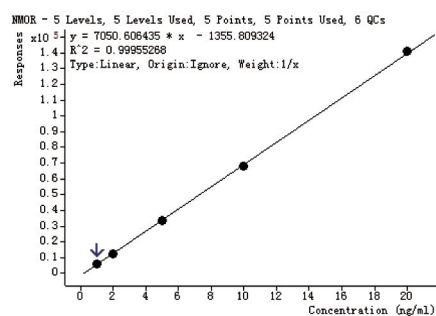
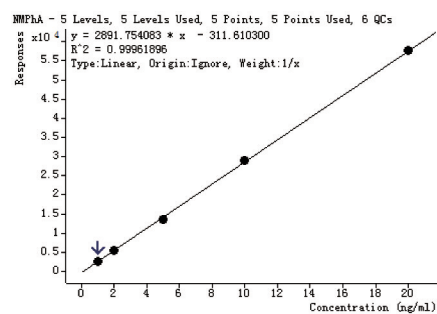
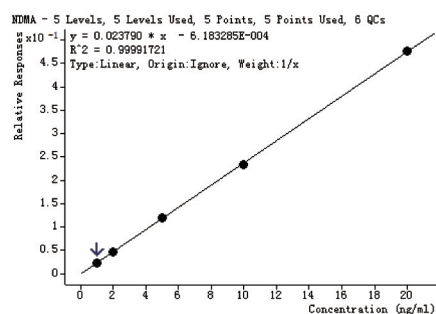
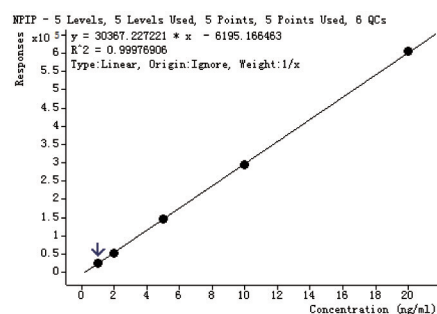
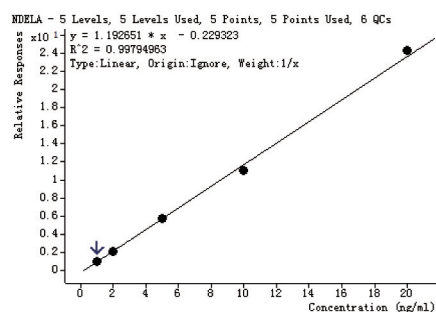


图 2. 分子离子为 131 和 159 的异构体图谱

十三种亚硝胺及亚硝基胺类物质配制浓度为 1、2、5、10、20 ng/ml 标准系列, 依次进样, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标分别作标准曲线, 其相关系数及回归方程如下:



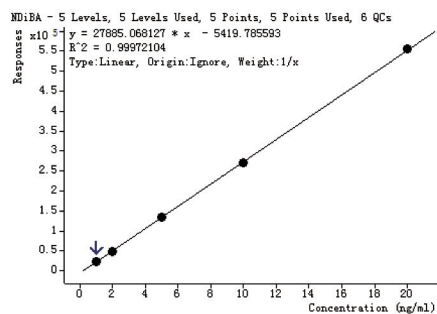
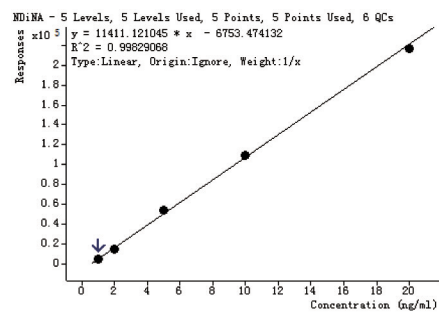
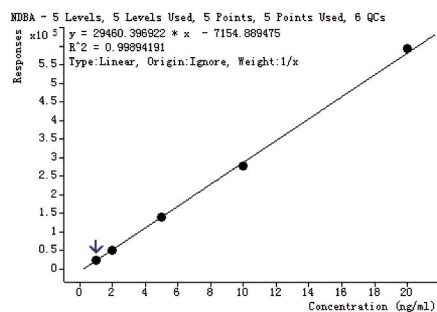
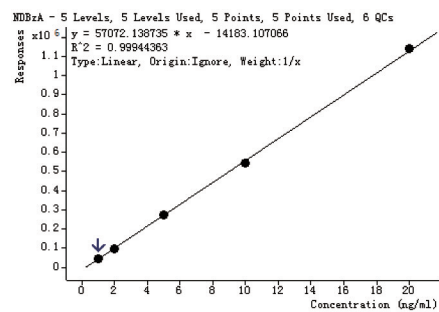
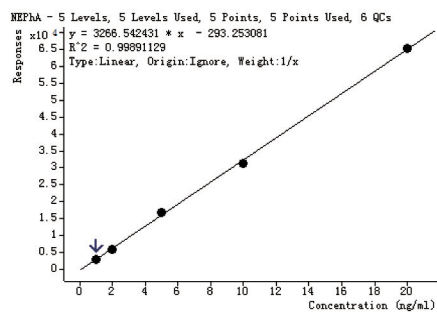


图 3. 十三种亚硝胺和亚硝基胺类物质标准曲线线性

结论

采用 Agilent 1260 uHPLC 连接 Agilent 6460QQQ 质谱, 使用 APCI 源和 ZorbaxSB-Aq 3.0 × 100 mm, 3.5 μm 色谱柱对十三种亚硝胺及亚硝基胺类物质进行检测, 10 分钟内可完成分离检测, 且其中几种分子量相同的异构体均能完全分离。十三种亚硝胺类化合物在 1~20 μg/L 线性范围内, 相关系数 $R^2 > 0.998$ 。此检测方法具有简便、灵敏度高、重复性好等特点, 满足欧盟玩具指令 EN-71-12 的要求。

更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务, 请访问我们的网站: www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2014
2014 年 2 月 21 日, 中国印刷
5991-4092CHCN



Agilent Technologies