

嬰兒奶嘴中亞硝胺含量之檢驗方法(二)

Method of Test for Nitrosamines on Baby Nipples (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於嬰兒奶嘴中 *N*-nitrosodibutylamine (NDBA)、*N*-nitrosodiethylamine (NDEA)、*N*-nitrosodimethylamine (NDMA)、*N*-nitrosodipropylamine (NDPA)、*N*-nitrosomorpholine (NMOR)、*N*-nitrosopiperidine (NPIP) 及 *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) 等 7 項亞硝胺類化合物之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經人工唾液溶出後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS) 分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：大氣壓力化學游離(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：ACQUITY HSS T3, 1.8 μm , 內徑 2.1 mm \times 15 cm, 或同級品。
 - 2.1.2. 水浴(Water bath)：溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。
 - 2.1.3. 烘箱(Oven)：附有自動溫度調節，溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。
 - 2.2. 試藥：甲醇及甲酸均採用液相層析級；鹽酸(32-35%)採用超純級；碳酸氫鈉、碳酸鉀、氯化鈉、亞硝酸鈉及氫氧化鈉均採用試藥特級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 $18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；NDBA、NDEA 及 NDMA 對照用標準品(1 mg/mL in methanol)；NDPA 對照用標準品(0.5 mg/mL in methanol)；NMOR 及 NPYR 對照用標準品；NPIP 對照用標準品(5 mg/mL in methanol)；*N*-nitrosodibutylamine- d_{18} (NDBA- d_{18})、*N*-nitrosodiethylamine- d_4 (NDEA- d_4)、*N*-nitrosodipropylamine- d_{14} (NDPA- d_{14})、*N*-nitrosomorpholine- d_8 (NMOR- d_8)、*N*-nitrosopiperidine- d_{10} (NPIP- d_{10}) 及 *N*-nitrosopyrrolidine- d_4 (NPYR- d_4) 同位素內部標準品；*N*-nitrosodimethylamine- d_6 (NDMA- d_6) 同位素內部標準品(1 mg/mL in methanol)。

2.3. 器具及材料：

- 2.3.1. 容量瓶：10 mL，褐色。
- 2.3.2. 鑷子。
- 2.3.3. 血清瓶：100 mL，褐色。
- 2.3.4. 樣品瓶：2 mL，褐色，玻璃材質。
- 2.3.5. 濾膜：孔徑0.22 μm，Nylon材質。

2.4 試劑之調製：

2.4.1. 0.1 M鹽酸溶液

取鹽酸4.6 mL，緩慢加入去離子水450 mL中，冷卻後，加去離子水使成500 mL。

2.4.2. 0.1 M氫氧化鈉溶液

取氫氧化鈉1 g，加去離子水溶解使成250 mL。

2.5. 人工唾液之調製：

稱取碳酸氫鈉4.2 g、氯化鈉0.5 g、碳酸鉀0.2 g及亞硝酸鈉30 mg，加去離子水900 mL溶解，以0.1 M鹽酸溶液或0.1 M氫氧化鈉溶液調整pH值至9.0，再加去離子水使成1000 mL。

2.6. 移動相溶液之調製：

2.6.1. 移動相溶液A：

取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾，供作移動相溶液A。

2.6.2. 移動相溶液B：甲醇。

2.7. 內部標準溶液之配製：

取NDBA-d₁₈、NDEA-d₄、NDPA-d₁₄、NMOR-d₈、NPIP-d₁₀及NPYR-d₄同位素內部標準品各約1 mg，精確稱定，分別以甲醇溶液溶解並定容至10 mL；取適量NDMA-d₆同位素內部標準品，以甲醇溶液稀釋至50 μg/mL，作為內部標準原液，冷凍避光貯存。臨用時取適量各內部標準原液混合，以甲醇稀釋至5 μg/mL，再以人工唾液稀釋至15 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.8. 標準溶液之配製：

取適量NDBA、NDEA、NDMA、NDPA及NPIP對照用標準品，分別以甲醇溶液稀釋至50 μg/mL；取NMOR及NPYR對照用標準品各約1 mg，精確稱定，分別以甲醇溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍避光貯存。臨用時，取適量各標準原液混合，以甲醇稀釋至5 μg/mL，再以人工唾液稀釋至1 μg/mL，作

為混合標準原液。取適量混合標準原液及內部標準溶液混合，以人工唾液稀釋至0.2~50 ng/mL (含內部標準品濃度5 ng/mL)，供作標準溶液。

2.9. 檢液之調製：

將檢體沿長軸對切，取約5.5 g ± 0.5 g (若檢體超過6 g，則切除一小切片)，精確稱定，置於沸水300 mL中，加熱10分鐘，以鑷子取出並甩去多餘水分，再移入血清瓶中，加入適量預先加熱至40°C之人工唾液^(註1)，蓋上瓶蓋，輕晃使樣品完全浸入，置於40°C烘箱中，24小時後取出溶出液。精確量取溶出液1 mL，加入內部標準溶液0.5 mL，混合均勻，供作檢液。

註1：人工唾液之添加量(mL)為檢體取樣之重量(g)乘上4，如檢體取樣量為5.5 g，則人工唾液之添加量為22 mL (5.5 × 4)。

2.10. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各20 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就各亞硝酸類化合物標準品與其內部標準品之波峰面積比，與對應之各亞硝酸類化合物濃度，分別製作標準曲線。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註2)：

層析管：ACQUITY UPLC HSS T3，1.8 µm，內徑2.1 mm × 15 cm。

層析管溫度：40°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件，進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 10.0	70 → 0	30 → 100
10.0 → 15.0	0 → 0	100 → 100
15.0 → 15.1	0 → 70	100 → 30
15.1 → 18.0	70 → 70	30 → 30

移動相流速：0.2 mL/min。

注入量：20 µL。

離子化模式：APCI正離子。

放電電流(Nebulizer current)：5 µA。

氣簾氣體(Curtain gas)：20 psi。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：30 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：55 psi。

碰撞氣體(Collision gas)：medium。

加熱管溫度(Turbo heater temperature)：220°C。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)及碰撞能量(collision energy)如附表。

註2：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.11. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各20 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.10節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註3)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各亞硝胺類化合物之含量(ppb)：

$$\text{檢體中各亞硝胺類化合物之含量(ppb)} = \frac{C \times V_0 \times V_2}{M \times V_1}$$

C：由標準曲線求得檢液中各亞硝胺類化合物之濃度(ng/mL)

V₀：人工唾液之添加量(mL)

V₁：檢液中溶出液之體積(1 mL)

V₂：檢液最後之體積(1.5 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

註3：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積相除而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限，NDBA等7項亞硝胺類化合物均為1.2 ppb。

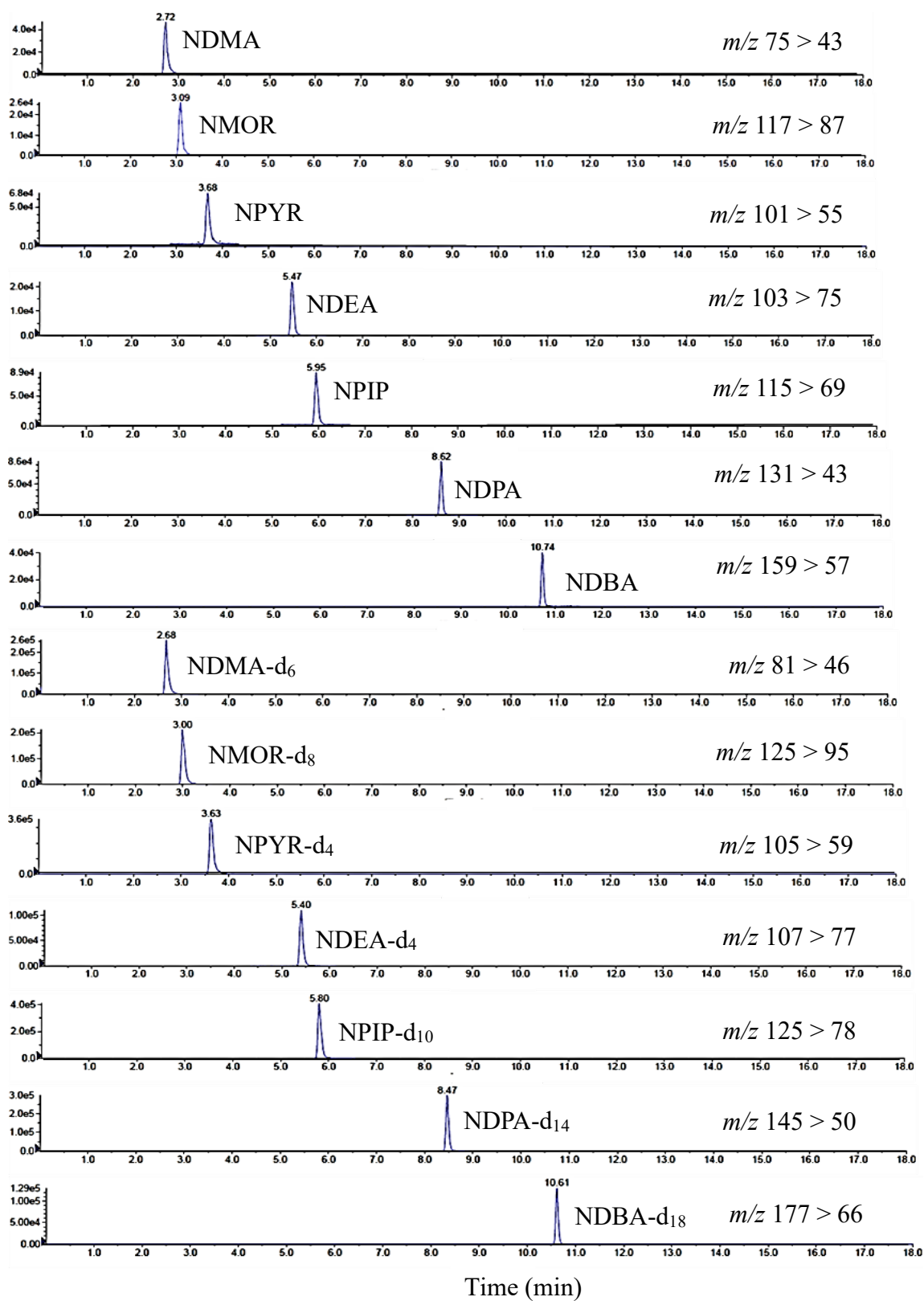
2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Hwang, J. B., Lee, J. E., Kim, E., Eom, K. Y., Kim, H. A. and Lee, S. 2023. Analysis of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from baby bottle rubber teats by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Addit. Contam. Part A 40: 518-527.

2. European Committee for Standardization. 2017. Child use and care articles- method for determining the release of *N*-nitrosamines and *N*-nitrosatable substances from elastomer or rubber teats and soothers. DIN EN 12868:2017-04.

參考層析圖譜



圖、以LC-MS/MS分析NDMA等7項亞硝酸類化合物及其同位素內部標準品之MRM圖譜

附表、NDMA 等 7 項亞硝胺類化合物及其同位素內部標準品之多重反應偵測模式參數

項次	分析物	離子對		去集簇 電壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	同位素內部 標準品
		前驅離子(m/z) >	產物離子(m/z)			
1	NDBA	159 > 57*		30	12	NDBA-d ₁₈
			159 > 103	100	10	
2	NDEA	103 > 75*		25	13	NDEA-d ₄
			103 > 47	25	29	
3	NDMA	75 > 43*		120	21	NDMA-d ₆
			75 > 58	80	20	
4	NDPA	131 > 43*		59	14	NDPA-d ₁₄
			131 > 89	59	21	
5	NMOR	117 > 87*		100	17	NMOR-d ₈
			117 > 86	38	20	
6	NPIP	115 > 69*		42	21	NPIP-d ₁₀
			115 > 41	42	33	
7	NPYR	101 > 55*		100	22	NPYR-d ₄
			101 > 41	58	37	
I.S.	NDBA-d ₁₈	177 > 66		30	12	—
I.S.	NDEA-d ₄	107 > 77		25	13	—
I.S.	NDMA-d ₆	81 > 46		60	21	—
I.S.	NDPA-d ₁₄	145 > 50		59	14	—
I.S.	NMOR-d ₈	125 > 95		38	17	—
I.S.	NPIP-d ₁₀	125 > 78		42	21	—
I.S.	NPYR-d ₄	105 > 59		58	22	—

*定量離子對