

固相萃取-选择离子气质联用法 测定液态调味料中的 4-甲基咪唑

熊珺¹, 陈美玲², 赖毅东¹

(1. 东莞市质量监督检测中心, 广东东莞 523808) (2. 广东医学院, 广东东莞 523808)

摘要: 建立了 SPE-SIM-GC-MS 测定液态调味料中 4-甲基咪唑的新方法。对影响 4-甲基咪唑萃取效率的诸因素如溶液的 pH、洗脱溶剂和洗脱溶剂的体积等进行了优化。在最佳的萃取条件下, 该方法对 4-甲基咪唑的检出限为 7.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 相关系数和相对标准偏差 (RSD, $n=5$) 分别为 0.99985 和 7.5%。将该方法用于实际样品中 4-甲基咪唑的分析, 其加标回收的回收率为 80.3~86.2%。

关键词: 固相萃取; 液态调味料; 4-甲基咪唑; 选择离子气质联用

文章编号: 1673-9078(2012)5-567-569

Determination of 4-Methylimidazole in Liquid Seasoning by Solid Phase Extraction Combined with Gas Chromatography/Selected Ion Mass Spectrometry

XIONG Jun¹, CHEN Mei-ling², LAI Yidong¹

(1. Dongguan Quality Supervision and Testing Center, Dongguan 523808, China)

(2. Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract: A simple and sensitive method was developed for determination of 4-methylimidazole in liquid seasoning samples by solid phase extraction (SPE) with selected ion mass-gas chromatography mass spectrometry (SIM-GCMS). In this work, effects of solution pH, type and volume of elution solvents were investigated to optimize extraction conditions. Under the optimized SPE conditions, the relative standard deviation (RSD, $n=5$) for the samples was 7.5%. The coefficient of determination for calibration curve was 0.99985. The method detection limit was 7.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was applied to real samples and the recovery of 80.3~86.2 % was obtained.

Key words: solid phase extraction; liquid seasoning; 4-methylimidazole; selected ion mass-gas chromatography mass spectrometry

焦糖色素俗称“酱色”, 占整个食品着色剂销量的 90%以上, 而其中 75%的焦糖色素用于酿造工业, 广泛用于酱油、醋、可乐、冷饮等食品中^[1]。4-甲基咪唑 (4-methylimidazole) 是焦糖色素生产中的副产物, 为含氮杂环化合物, 分子式为 $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$, 作为一种神经毒, 具有强烈的致惊厥作用, 能使动物产生超兴奋状态, 令其发生痉挛甚至诱发癫痫症, 对雄性小鼠的痉挛致死量为 370 mg/kg 体重; 同时, 可以诱发老鼠患肺癌, 与雌性小鼠患白血病有一定的关联。由于 4-甲基咪唑对人体潜在的危害性使人们对食品中添加的焦糖色的安全性有所怀疑^[1]。国家标准 GB 8817-2001 也对焦糖色的质量标准做出了规定, 对于非氨法焦糖色,

4-甲基咪唑不得检出; 对于氨(铵)法焦糖色, 4-甲基咪唑的含量应低于 0.02%^[2]。不合格焦糖色的使用以及过量使用会给调味品带来潜在风险。所以, 快速、准确测定酱油等调味品中的 4-甲基咪唑含量, 对质检和毒物检验部门具有重要意义。

目前对 4-甲基咪唑的检测方法主要有薄层层析法^[3], 气相色谱法^[4]和液相色谱法^[5,6], 但由于酱油等调味料基体干扰大, 上述检测方法在定性定量存在一定的缺陷。GB 8817 规定的薄层层析法采用目测比色, 用于分离的硅胶板需要手工制作, 并且显色剂显色时间长, 准确定量较难。而液液萃取前处理方法操作繁琐, 易乳化, 且不宜实现自动化。故本实验拟以气相色谱质谱作为后续分离检测的手段, 固相萃取柱先吸附调味料等样品中 4-甲基咪唑, 再用适量的二氯甲烷洗脱, 洗脱液浓缩后定容, 直接进样分析; 从而避免了基体干扰和 TLC 等测试方法无法准确定量

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 广东省质量技术监督局科技项目 (2009ZZ09)

作者简介: 熊珺, 博士, 从事痕量化合物检测技术的研究

通讯作者: 赖毅东

缺点,提高了方法的灵敏度和准确性。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

仪器: Agilent 6890N-5975B 气相色谱-质谱联用仪, HP-88 毛细管色谱柱 (100 m×250 μm×0.20 μm), 固相萃取装置 (美国 Waters 公司), 氮气浓缩仪 (奥特赛恩斯公司, 天津), Chromabond-XTR (3000 mg, 15 mL) 固相萃取柱

试剂和样品: 氢氧化钠, 二氯甲烷, 甲醇均为分析纯。4-甲基咪唑标准品 (≥98%) 购于Fluka公司; 酿造酱油, 配制酱油和水解蛋白液等样品购于当地超市和企业。

1.2 样品前处理

先取 3.5 mL 样品, 以 10 mol/L NaOH 溶液调节其 pH 值至 11, 然后过 XTR 萃取柱, 吸附 30 min 后, 再以 36 mL 二氯甲烷洗脱萃取柱上的 4-甲基咪唑 (流速约为 1.0 mL/min), 收集洗脱液浓缩至近干, 最后定容至 0.80 mL, 并将其转移至自动进样瓶中, 取 1.0 μL 直接注入 GC-MS 进行分离检测。

1.3 色谱和质谱条件

升温程序为初温 120 °C, 以 30 °C/min 升至 260 °C, 保持 8.5 min; 恒流模式下柱流量为 1.3 mL/min; 进样口温度为 250 °C; 传输线温度 280 °C; 载气为高纯氮; 进样方式为不分流进样, 进样量为 1.0 μL。电离模式: 电子轰击源, 能量为 70 eV; 离子源温度 200 °C; 溶剂延迟 3.0 min。

扫描方式: 采用选择离子扫描模式, 4-甲基咪唑特征离子为 m/z 28、41、54 和 82。以 m/z 82 作为 4-甲基咪唑定量离子, 以 m/z 28、41、54 和 82 作为 4-甲基咪唑的定性鉴别离子, 考察各碎片离子与 m/z 82 离子的强度比, 其强度比不得超过标准溶液的相同离子强度比的 ±20%。

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的优化

洗脱溶剂、洗脱溶剂的体积和溶液的 pH 等均影响固相萃取的萃取效率, 因此, 本工作将对影响萃取效率的各因素进行考察, 以寻求最佳的萃取条件。

2.1.1 洗脱溶剂的选择

选择合适的洗脱溶剂是提高方法的回收率及灵敏度的关键。故实验中分别考察了甲醇、三氯甲烷和二氯甲烷对酿造酱油、配制酱油和水解蛋白液中 4-甲基咪唑的洗脱能力, 实验结果如图 1 所示。可以看出, 与甲醇和三氯甲烷相比, 二氯甲烷对 4-甲基咪唑的洗

脱效率为 80~95%, 洗脱效果最好, 因此选用二氯甲烷作洗脱溶剂。

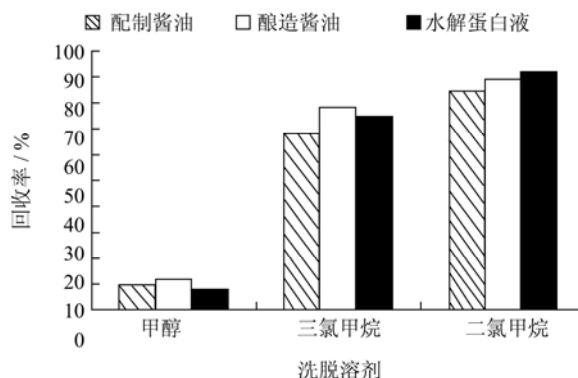


图 1 不同洗脱溶剂对 4-甲基咪唑洗脱效率的影响

Fig.1 Effect of different elution solvents on the extraction efficiency

2.1.2 洗脱剂用量的确定

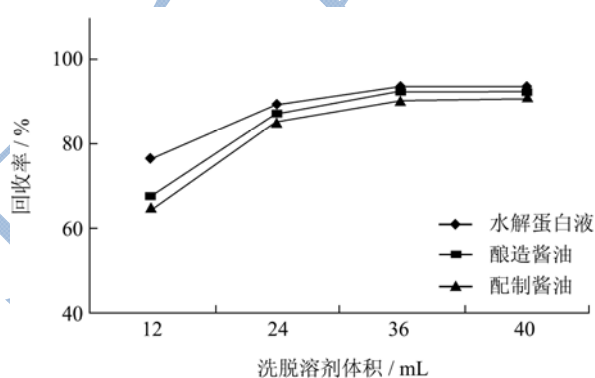


图 2 洗脱溶剂的用量对 4-甲基咪唑回收率的影响

Fig.2 Effect of the volume of elution solvent on the extraction efficiency

实验中考察了洗脱体积 (12、24、36、48 mL) 对分析物在配制酱油、酿造酱油和水解蛋白液的萃取效率影响。从图 2 可以看出, 当洗脱溶剂的体积从 12 mL 增加至 36 mL 时, 4-甲基咪唑的回收率一直增大; 且当洗脱体积为 36 mL, 4-甲基咪唑的回收率可达 90%; 当继续增加洗脱溶剂二氯甲烷的体积, 4-甲基咪唑的回收率并无明显变化, 并且将会使后续浓缩时间延长, 降低整个方法的分析速度。故本实验选择最佳的洗脱体积为 36 mL。

2.1.3 溶液 PH 的影响

调节溶液 pH 值可以改变目标分析物的存在形式, 从而影响其萃取效率。由于 4-甲基咪唑存在一对孤对电子, 在酸性中易得到质子而变成离子, 从而易溶于水, 而在碱性中以分子形式存在而溶于有机溶剂。实验中考察了样品溶液的 pH 值在 6.5~13.0 范围内变化时对 4-甲基咪唑萃取效率的影响, 所得结果如图 3 所示。可以看出, 当样品的 pH 值为 11.0 时, 4-甲基咪唑的回收率最好, 因此, 选择溶液的 pH 值为 11.0。

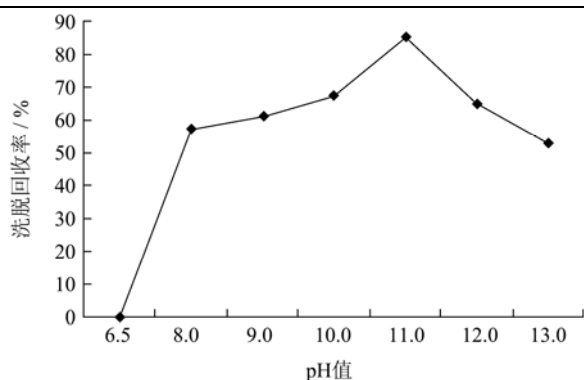


图3 溶液的 pH 值对 4-甲基咪唑萃取效率的影响

Fig.3 Effect of pH on the extraction efficiency

2.2 方法的分析性能

表 1 4-甲基咪唑测定的方法分析性能

Table 1 Analytical performance of SPE-GC-SIM-MS for the determination 4-methylimidazole

分析物	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^a /(%) (n=5)
4-甲基咪唑	$y=22934x-26308$	25~10000	0.99985	7.27	7.5

注: ^a 4-甲基咪唑添加量为 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

以三倍信噪比所对应的分析物浓度为检出限, 得到该方法对 4-甲基咪唑的检出限见表 1。由表 1 可知本方法的灵敏度和精密度足以满足实际样品中 4-甲基咪唑分析检测的要求。

2.3 实际样品的测定

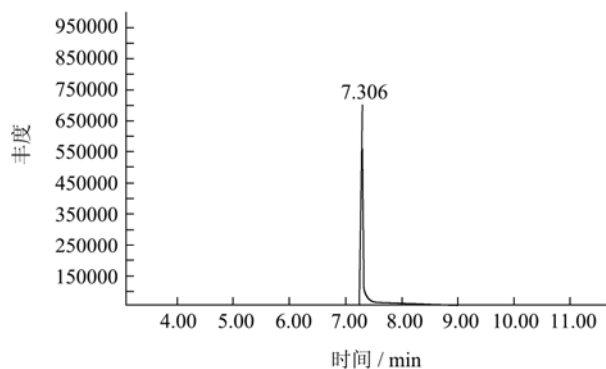


图 4 4-甲基咪唑的标准品选择离子质谱图

Fig.4 The selected ion mass spectrum of 4-methylimidazole standard solution

将所建立的 SPE-GC-SIM-MS 方法应用于超市所购买的酱油和水解蛋白液中的 4-甲基咪唑的分析并进行了加标回收, 实验结果列于表 2。从表 2 可以看出, 在市面上所购买的酱油和水解蛋白液中 4-甲基咪唑含量分别为 0~2.38 mg/kg 和 0~1.04 mg/kg , 其加标回收率分别为 80.3~86.2%和 81.8~84.6%, 相对标准偏差 (RSDs, n=3) 为 5.4~9.6%和 5.3~9.7%。图 4 和图 5 给为标准品和酱油中的 4-甲基咪唑选择离子质谱图。

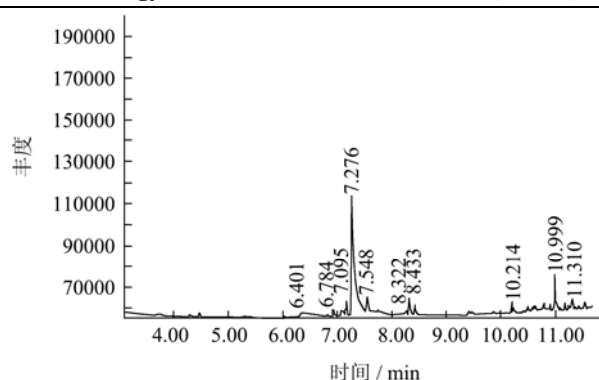


图 5 酱油中 4-甲基咪唑的选择离子质谱图

Fig.5 The selected ion mass spectrum of 4-methylimidazole in soy sauce

表 2 样品中 4-甲基咪唑的测定及其加标回收

Table 2 Analytical results and recoveries of 4-methylimidazole in samples by SPE-SIM-GCMS

Sample	Added/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery	RSD/(%) (n=3)
酱油 1	0.00	1.14	-	7.3
	3.00	3.64	83.3	6.9
酱油 2	0.00	n.d. ^a	-	-
	3.00	2.57	85.8	7.1
酱油 3	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.41	80.3	9.2
酱油 4	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.59	86.2	7.0
酱油 5	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.47	82.3	6.3
酱油 6	0.00	2.38	-	8.5
	3.00	4.91	84.4	5.4
酱油 7	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.46	81.9	9.6
酱油 8	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.42	80.8	8.7
水解蛋白液 1	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.51	83.7	7.6
水解蛋白液 2	0.00	1.04	-	5.3
	3.00	2.54	84.6	7.8
水解蛋白液 3	0.00	n.d.	-	-
	3.00	2.45	81.8	9.7

注: ^a n.d.: Not detected.

3 结论

本文建立了 SPE-SIM-GCMS 测定调味液中 4-甲基咪唑的新方法, 该方法具有操作方便、简单、灵敏度及重现性好等优点。将其应用于酱油及水解蛋白液

中 4-甲基咪唑的分析并进行了加标回收实验, 结果满意。

参考文献

- [1] 张金云, 曾祥燕. 果葡糖浆对焦糖色素质量影响的研[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 67-69
- [2] 赵俊平, 高丽华, 金伟伟, 等. 酱油中 4-甲基咪唑含量测定方法的研究[J]. 中国酿造, 2010, 7: 89-91
- [3] GB 8817-2001 食品添加剂焦糖色(亚硫酸铵法、氨法、普通法)[S]
- [4] 郭小莉, 陈敏, 等. 毛细管气相色谱法测定焦糖色素中的 4-甲基咪唑[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 169-171
- [5] 陈洪兴, 戴军, 等. 高效液相色谱法测定焦糖色素中的 4-甲基咪唑[J]. 中国调味品, 2006, 6: 53-56
- [6] 王妙飞, 高美珍, 程庚金生, 等. 柱前衍生法测定 4-甲基咪唑条件的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 984-986