

GC-MS/MS 法测定可乐中 4- 甲基咪唑含量

GCMSMS-040

摘要：本文采用岛津三重四极杆气相色谱质谱联用仪 GCMS-TQ8030 对可乐中 4- 甲基咪唑进行测定。标准溶液浓度在 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内，标准曲线线性良好， $r=0.9998$ ，组分的检出限为 1.11 $\mu\text{g/L}$ ，平均加标回收率为 81.75%，浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 标样连续进样 5 针峰面积 RSD 为 4.15%，该方法操作简便快捷，测定准确。

关键词：GC-MS/MS 可乐 4- 甲基咪唑

4- 甲基咪唑 (4-Methylimidazole)，白色或类白色的结晶粉末，是一种重要的有机中间体。研究表明，4- 甲基咪唑能够提高小鼠肿瘤和白血病的发病率，由此推测，其可能会对人体产生一定的致癌性。

可乐饮料中的 4- 甲基咪唑主要来源于焦糖色素。焦糖色素是一种食用色素，广泛应用于可乐、酱油、食醋、黄酒、啤酒等饮料和食品中。直接用糖煮制的焦糖色素不含有 4- 甲基咪唑，而当前国内外大部分厂家生产的焦糖色素都是使用“氮类化合物”作为催化剂，或是由

糖、氨水及亚硝酸盐在高温高压下反应而成，这种工艺中会生成 4- 甲基咪唑。世界卫生组织对焦糖色素中 4- 甲基咪唑的限量为 200 mg/kg，我国国家标准 GB8817-2001 对氨法生产的焦糖色素中 4- 甲基咪唑的含量规定不超过 0.02%。

本文使用三重四极杆气相色谱质谱联用仪建立了可乐中 4- 甲基咪唑的检测方法，该方法操作简单，准确可靠，检出限低，适用于可乐饮料中 4- 甲基咪唑含量的测定。

实验部分

1.1 仪器

三重四极杆气质联用仪：GCMS-TQ8030

1.2 分析条件

色谱柱：InertCap WAX, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm

柱温程序：80 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)_20 $^{\circ}\text{C}$ /min_150 $^{\circ}\text{C}$ _
5 $^{\circ}\text{C}$ /min_250 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)

CID 气：氩气

进样口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

进样量：1 μL

进样方式：不分流，1 min

载气控制方式：恒线速度方式

载气线速度：36.8 cm/sec

接口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

离子源温度：230 $^{\circ}\text{C}$

采集方式：MRM

1.3 样品制备

将样品在室温放置 30 min，去碳酸气，量取 5 mL 样品移入 250 mL 分液漏斗中，以 10 mol/L 的氢氧化钠溶液将样品 pH 值调节为 11，加二氯甲烷萃取液 40 mL，充分震荡 5 min，静止分层后，收集下层有机相，用相同方法重复萃取 3 次，合并有机相，浓缩近干，用丙酮定容为 2 mL，待测。

样品前处理

2.1 色谱图

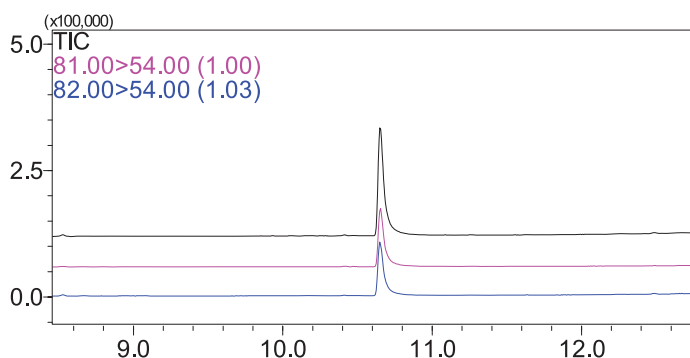


图1 4-甲基咪唑标准溶液MRM图(0.5 $\mu\text{g/mL}$)

表1 4-甲基咪唑的保留时间及MRM参数

No.	化合物名称	CAS#	保留时间(min)	定量离子对	CE	定性离子对	CE
1	4-甲基咪唑 (4-Methylimidazole)	131-11-3	10.625	82>54	10	81>54	10

2.2 标准曲线

配制 6 个级别的 4- 甲基咪唑标准溶液，浓度分别为：5、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g/L}$ ，以浓度为横坐标，定量离子的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，4- 甲基咪唑标准曲线如下所示。

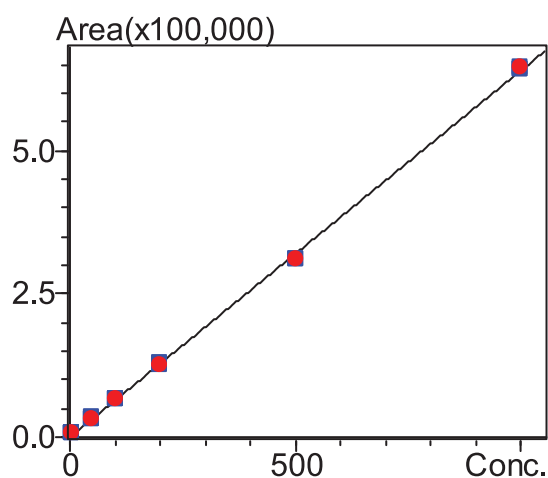


图2 4-甲基咪唑标准曲线

2.3 检出限及重复性

根据 5 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液数据，计算方法检出限（3 倍信噪比计算），4- 甲基咪唑检出限见表 2。浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液连续进样 5 针，计算峰面积 RSD% 考察仪器重复性，结果如表 2 所示。

表2 4-甲基咪唑标准曲线相关系数、检出限及峰面积重复性(n=5)

No.	组分名称	相关系数	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	RSD%
1	4-甲基咪唑	0.9998	1.11	4.15

2.4 回收率

选取市售某种可乐分别进行测定和回收率实验，样品加标浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ ，按照样品前处理方法平行处理 3 份，进样分析，可乐样品测定结果和加标回收率见表 3。

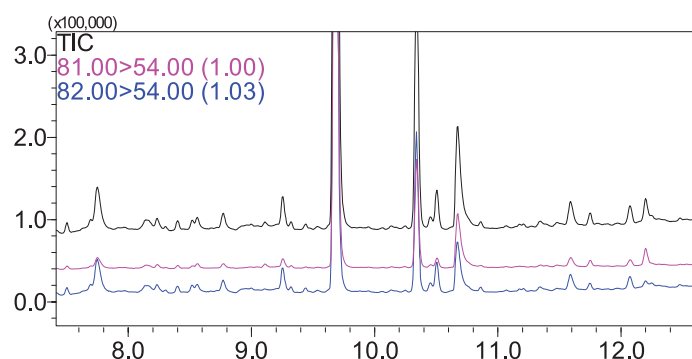


图3 样品MRM谱图

表3 样品检测结果及加标回收率

No.	组分名称	可乐样品	加标样品		
		检测结果($\mu\text{g/L}$)	回收率%	平均回收率%	RSD%(n=3)
1	4-甲基咪唑	112.40	75.02	81.75	7.20
			85.90		
			84.34		

结论

采用岛津 GCMS-TQ8030 对可乐饮料中 4- 甲基咪唑进行分析测定，该方法操作简单，在标准样品浓度在 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内，标准曲线线性相关系数为 0.9998，组分的检出限为 1.11 $\mu\text{g/L}$ ，平均加标回收率为 81.75%，此方法适用于可乐中 4- 甲基咪唑的检测要求。

LC-30A 测定焦糖色素及饮料中的 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑

LC-145

摘要：本文建立了一种使用超高效液相色谱仪 LC-30A，结合 HILIC 色谱柱，无需使用离子对试剂快速测定焦糖色素和饮料中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的方法。实验结果表明：在 0.2 ~ 50 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999；4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑仪器检出限分别为 0.021 mg/L、0.023mg/L，定量限分别为 0.076 mg/L、0.069 mg/L。三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02~0.08%和 0.18~1.46%之间，仪器精密度良好；焦糖色素样品和可乐饮料样品加标回收率在 83.0%~91.6%之间。

关键词：4-甲基咪唑 2-甲基咪唑 超高效液相色谱 焦糖色素 饮料

焦糖色素是一种允许使用的半天然食品着色剂，广泛应用于饮料、酱油、食醋、甜品等生产中。在亚硫酸铵法或氨法生产焦糖色素的过程中，会产生有毒副产物 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑，具有可能的致癌作用。故我国的国家标准规定以亚硫酸铵法或氨法生产的焦糖色素中 4-甲基咪唑的含量应不大于 0.02%，但未限定 2-甲基咪唑的含量。

目前，我国国家标准中已有焦糖色素中 4-甲基咪唑的检测方法，采用薄层色谱法和离子对色谱法进行测定。尚没有食品中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的分析方法。薄层色谱法准确度较差，离子对色谱法平衡时间长，分析周期长，且对色谱柱有一定的损耗。

本文采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 结合 HILIC 色谱柱，测定了焦糖色素和可乐饮料中的 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑，供相关检测人员参考。

1. 实验条件

1.1 仪器和材料

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 二元高压梯度系统。具体配置为：LC-30AD 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，RF-20AXS 荧光检测器，CBM-20Alite 系统控制器，LabSolutions 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Xbridge HILIC, 2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.5 μm

流动相：A: 5 mM 甲酸铵水溶液；B: 乙腈

流速：0.45 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：35℃

检测波长：215 nm

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度 B%=90%:

表 1 梯度时间程序

Time	Module	Action	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	90
8.50	Controller	Stop	

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

以乙腈/甲醇(9/1, v/v)配制浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 mg/L 等 8 个标准溶液浓度系列。

1.3.2 样品前处理方法

称取 3 g 焦糖色素，用水稀释，并定容至 15 mL。或称取 3 g 饮料，超声 5 min 后待净化。取 MCX 固相萃取小柱（60 mg/3 mL），依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化，取饮料超声后样品或 3 mL 焦糖色素稀释样品以 1 mL/min 流速过柱，依次用 3 mL 2%甲酸水溶液和 3 mL 甲醇淋洗，抽干，用 3 mL 5%氯化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，40℃氮气挥干，乙腈/甲醇(9/1, v/v)定容至 1 mL，0.22 μm 滤膜过滤后待测。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

标准样品色谱图如图1所示。

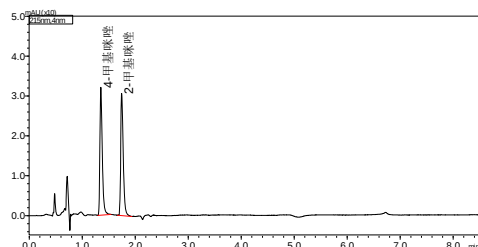


图 1 标准样品色谱图 (5 mg/L)

2.2 线性关系

将 8 个不同浓度的黄曲霉毒素标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，结果如图 2、图 3 所示。

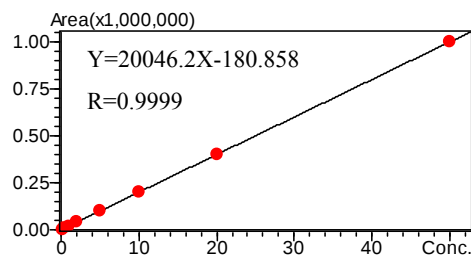


图 2 4-甲基咪唑的标准工作曲线

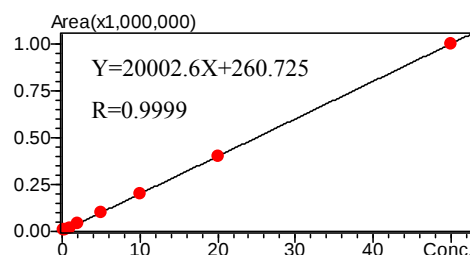


图 3 2-甲基咪唑的标准工作曲线

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.2 mg/L 计算仪器的灵敏度，通过 LabSolutions 软件，按照 ASTM 方式，选取基线为 3.2-3.7 min 计算信噪比，4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑仪器检测限（3 倍噪声计算）分别为 0.021 mg/L、0.023mg/L；定量限（10 倍噪声计算）分别为 0.076 mg/L、0.069 mg/L。0.2 mg/L 标样色谱图如图 4 所示。

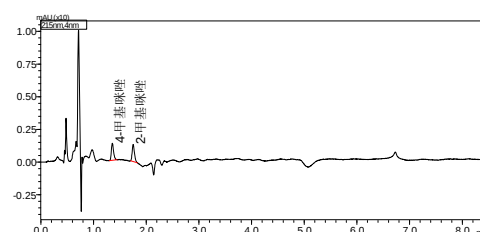


图 4 0.2mg/L 标准溶液的色谱图

2.4 精密度实验

取低、中、高三个不同浓度标准溶液，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~0.08% 和 0.18~1.46%之间，仪器精密度良好。

表 2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

组分	浓度	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
4-甲基咪唑	0.5	0.038	1.403
	2.0	0.036	0.274
	10	0.080	0.176
2-甲基咪唑	0.5	0.037	1.459
	2.0	0.025	0.766
	10	0.053	0.282

2.5 加标回收实验

按照 1.3.2 所述方法处理焦糖色素样品、市售可乐饮料样品和加标样品，上机测试。色谱图如图 5、图 6、图 7、图 8 所示。加标回收结果见表 3。

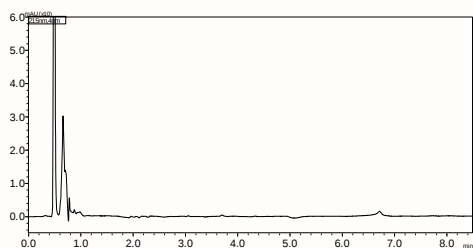


图 5 焦糖色素样品色谱图

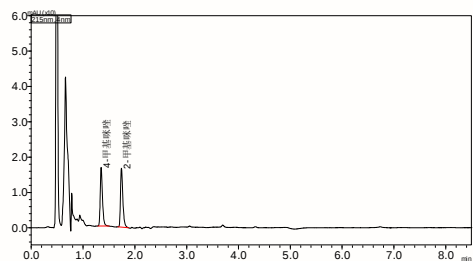


图 6 焦糖色素加标样品色谱图 (加标量: 5.0 mg/kg)

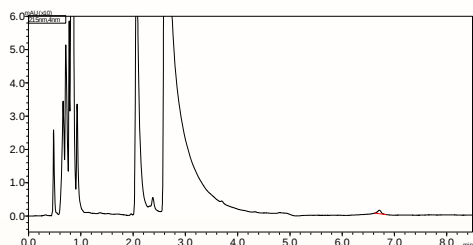


图 7 可乐饮料样品色谱图

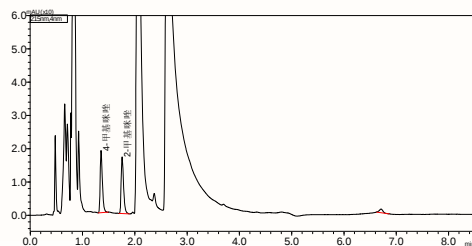


图 8 可乐样品加标色谱图 (加标量: 5.0 mg/kg)

表 3 加标回收结果

基质	化合物名称	样品 mg/kg	加标量 mg/kg	实测值 mg/kg	回收率
焦糖色素	4-甲基咪唑	N.D.	5.0	4.15	83.0%
	2-甲基咪唑			4.34	86.8%
可乐饮料	4-甲基咪唑	N.D.	5.0	4.58	91.6%
	2-甲基咪唑			4.55	91.0%

注: N.D.表示未检出

3 结论

本文建立了一种使用超高效液相色谱仪 LC-30A，结合 HILIC 色谱柱，无需使用离子对试剂快速测定焦糖色素和饮料中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的方法。实验结果表明：两种化合物在 0.2 mg/L~ 50 mg/L 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999；4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑仪器检出限分别为 0.021 mg/L、0.023mg/L，定量限分别为 0.076 mg/L、0.069 mg/L。三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02~0.08%和 0.18~1.46%之间，仪器精密密度良好；焦糖色素样品和可乐饮料样品加标回收率在 83.0%~91.6%之间。本方法适合作为焦糖色素及饮料中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑的快速分析方法。

附录:

表 4 化合物信息表

中文名称	英文名称	CAS 号
4-甲基咪唑	4-Methylimidazole	822-36-6
2-甲基咪唑	2-Methylimidazole	693-98-1