

固相萃取—超高效液相色谱—质谱法测定 食用香精中 3 种甲基咪唑类物质

Determination of three methylimidazole compounds in food flavors by
solid phase extraction coupled with ultra-performance
liquid chromatography-mass spectrometry

周艳华¹ 李 涛² 向 俊² 徐文泱²

ZHOU Yan-hua¹ LI Tao² XIANG Jun² XU Wen-yang²

(1. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南 长沙 410004;

2. 湖南省产商品质量检验研究院食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410111)

(1. Changsha Environmental Protection College, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Hunan Institute of Commodity Quality Inspection, Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha, Hunan 410011, China)

摘要:目的:同时、快速检测食用香精中 3 种甲基咪唑化合物。方法:利用 5% 三氯乙酸溶液提取食用香精,再利用 PCX 混合阳离子固相萃取柱净化提取液,最后利用超高效液相色谱—质谱法和内标法进行定性和定量分析。结果:3 种甲基咪唑化合物在 5.0~400.0 ng/mL 内呈良好线性关系,相关系数 $R^2 \geq 0.997$ 。3 种甲基咪唑检出限为 0.030~0.450 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限(LOQ)为 0.10~1.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。3 种甲基咪唑的加标回收率在 82.8%~111.7%,相对标准偏差 RSD 在 1.3%~9.3%。结论:该方法简单高效、准确度高,可作为食用香精中甲基咪唑的定量检验方法。**关键词:**固相萃取;超高效液相色谱—质谱法;甲基咪唑化合物;食用香精

Abstract: Objective: This study aimed to establish a method for quick determination of 3 kinds of methylimidazole compounds in food flavor. **Methods:** The food flavor was extracted with 5% trichloroacetic acid solution and purified with PCX mixed cationic solid phase extraction column. Finally, the qualitative and quantitative analysis was carried out by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and internal standard method. **Results:** The linear relationship between the

three methyl imidazole compounds was good in the range of 5.0~400.0 ng/mL, with correlation coefficient $R^2 \geq 0.997$. The limits of detection were 0.030~0.450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limits of quantification (LOQ) were 0.10~1.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries of three methylimidazole ranged from 82.8% to 111.7%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 1.3% to 9.3%. **Conclusion:** The method is simple, efficient and accurate, and can be used for the quantitative determination of 1-methylimidazole, 2-methylimidazole, 4-methylimidazole in food flavor.

Keywords: solid phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; methylimidazole compounds; food flavor

食品中常见的美拉德反应可产生赋予食品色、香、味的成分,同时也可能伴随产生甲基咪唑类化合物^[1-2]。甲基咪唑是一类五元杂环化合物,对动物有强烈惊厥作用,可诱发癫痫。目前,甲基咪唑化合物检测主要有紫外分光光度法^[3]、气相色谱法^[4]、液相色谱法^[5]、质谱法^[6-9]等。紫外分光光度法成本低,操作简单,但灵敏度低,适用范围小,且易出现假阳性结果。气相色谱法定量准确,适用于易挥发、成分简单样品,但对于复杂样品,易出现假阳性,重复性差。液相色谱法定量准确,但灵敏度不高,前处理需衍生化,操作步骤复杂。气相质谱法易受杂质干扰,出现假阳性结果,不能满足痕量测定需求。液质法选择性强,灵敏度高,被广泛应用于食品中痕量有毒有害物的检测,是检测甲基咪唑的最优方法。甲基咪唑分子量较小,质谱裂解可能会出现假阳性和基质效应,内

基金项目:湖南创新型省份建设专项项目(编号:2020SK2128);
湖南省科技创新平台与人才计划项目(编号:
2019TP1058)

作者简介:周艳华,女,长沙环境保护职业技术学院副教授,硕士。
通信作者:李涛(1984—),男,湖南省产商品质量检验研究院高级
工程师,硕士。E-mail:boylitao@163.com

收稿日期:2022-02-17 **改回日期:**2022-05-13

标法是保障结果准确性的有效手段。

现有研究主要集中于含焦糖色素和添加焦糖色素的食品(如酱油^[10]、耗油^[11]、豆制品^[12])中甲基咪唑的检测,多采用GB 5009.282—2020方法,此法不适用于食用香精等食品添加剂检测。研究拟使用三氯乙酸高效提取除杂,采用固相萃取法(SPE)和超高效液相色谱与质谱联用法(UPLC-MS/MS)进行富集净化和定性检测,最后利用内标法进行定量分析,旨在建立一种快速检测食用香精中甲基咪唑、2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的方法,为食品安全监管部门有效监控食用香精中3种甲基咪唑化合物的来源提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

麻辣香精、牛粉香精、鸡肉膏等:市售;

乙腈、甲醇:色谱纯,德国默克公司;

三氯乙酸、乙酸铵、氨水:优级纯,上海国药试剂有限公司;

1-甲基咪唑:纯度>99%,上海安谱实验科技股份有限公司;

2-甲基咪唑:纯度>99%,北京坛墨质检科技有限公司;

4-甲基咪唑:纯度>98.5%,北京曼哈格生物科技有限公司;

1-甲基咪唑-D6、2-甲基咪唑-D6 内标物:纯度≥98%,天津阿尔塔科技有限公司;

4-甲基咪唑-D6 内标物:纯度>98%,加拿大 CDN 公司。

1.2 仪器与设备

质谱仪:TSQ Quantis 型,美国赛默飞公司;

分析天平:BSA224s 型,赛多利斯科学仪器(北京)公司;

冷冻离心机:AVANTI J-15R 型,贝克曼库尔特公司;

超声波清洗器:SCQ 型,上海声彦超声波仪器有限公司;

数显型多管旋涡混合器:945066 型,美国 Talboys 公司;

高速振荡器:CM-1000 型,东京理化器械株式会社。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制 分别精密称取 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑、4-甲基咪唑、1-甲基咪唑-D6、2-甲基咪唑-D6、4-甲基咪唑-D6 标准品,用乙腈溶解并配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,使用前稀释为 1.0 μg/mL 的标准使用液。分别精密移取一定量的标准使用液,加入同位素内标溶液,配制成标准线性系列溶液,质量浓度为 5.0~400.0 ng/mL,内标质量浓度为 50.0 ng/mL。

1.3.2 样品前处理 精密称取混匀后的食用香精 2 g 于

离心管中,加入 1.0 μg/mL 的混合内标溶液 0.25 mL 和 25 mL 5%三氯乙酸溶液,振摇 20 min 后,冷冻离心,精密量取 5 mL 上清液,过混合阳离子交换固相萃取小柱净化,依次用 5 mL 水溶液、5 mL 正己烷和 5 mL 甲醇溶液淋洗,用 8 mL 5%氨水—甲醇洗脱,氮气吹至近干,精密移取 1 mL 5 mmol/L 乙酸铵—乙腈(体积比 10:90)溶解,过膜,待测。

1.3.3 液相色谱条件及质谱条件优化 液相色谱条件为:A 为乙酸铵溶液(5 mmol/L),B 为乙腈,流速 0.4 mL/min,柱温 30 ℃,进样体积 5 μL。梯度洗脱程序:0~4.5 min,10% A;4.5~4.6 min,10% A~40% A;4.6~5.9 min,40% A;5.9~6.0 min,40% A~10% A;6.0~8.0 min,10% A。在 HESI 离子源下,毛细管电压 3 500 V,雾化器温度 350 ℃,离子传输管温度 350 ℃,鞘气 4.58 L/min,辅助气 7.97 L/min,反吹气 1.5 L/min。通过标准物质母离子扫描和子离子扫描,确定质谱分析方法。

1.3.4 方法学验证 在空白香精样品中添加低浓度混合标准物质,再在确定的最优前处理条件和仪器条件下测定, $S/N \geq 3$ 的浓度为检出限, $S/N \geq 10$ 的浓度为定量限。在空白基质样品中加入 3 种甲基咪唑及内标,甲基咪唑含量为 5.0,10.0,50.0 μg/kg($n=6$),按确定的前处理工艺和仪器方法测定,计算回收率和相对标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

通过 CAS 号查询 3 种甲基咪唑及内标物的分子量,通过母离子全扫描结果可知 3 种甲基咪唑及内标响应度最高的是正离子模式。通过子离子扫描,获得目标化合物的最优质谱参数,甲基咪唑化合物依据响应强度确定定量离子和定性离子,3 种甲基咪唑化合物的质谱检测方法见表 1。3 种甲基咪唑分子量较小,经质谱电离后产生的碎裂离子数较少,碎片离子质量小。选择稳定性较好、响应度较强和碎片离子质量较高的离子作为定量离子,可以提高检测的稳定性。

2.2 色谱条件优化

3 种甲基咪唑化合物是同分异构体,分子量相同,裂解定量离子也相同,因此需优化色谱条件来分离 3 种甲基咪唑化合物。首先采用 C₁₈ 系列色谱柱,研究发现增加色谱柱长度对 3 种甲基咪唑出峰时间影响较小,出峰时间均在 1 min 左右,且 3 种甲基咪唑保留时间一致,再选用 C₈ 色谱柱,分离效果无改善。目标化合物出峰时间较早,易与样品基质同时出峰,影响分析结果的准确性。甲基咪唑化合物是含氮极性小分子化合物,C₁₈ 或 C₈ 色谱柱对此类化合物保留能力弱,因此出峰时间早,不能有效分离 3 种化合物。因此选择保留能力与 C₁₈ 相反的亲水性色谱柱(HILIC)来分离 3 种甲基咪唑。研究选择了

表 1 甲基咪唑化合物的质谱参数表[†]

Table 1 Mass spectrum parameters of methylimidazole compounds

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	RF-lens
1-甲基咪唑	83.01	55.97 [*] , 67.97	17.05, 26.74	58
2-甲基咪唑	83.022	55.97 [*] , 67.97	18.61, 30.44	60
4-甲基咪唑	83.022	55.97 [*] , 42.042	5.25, 17.55	59
1-甲基咪唑-D6	89.05	61.071 [*] , 71.042	18.40, 27.91	59
2-甲基咪唑-D6	88.1	61.042 [*] , 44.042	21.64, 20.63	61
4-甲基咪唑-D6	88.1	60.071 [*] , 44.97	18.65, 28.80	60

[†] * 定量离子。

Dikma Inspire HILIC (2.1 mm × 100 mm, 3 μm)、Ultimate UHPLC HILIC (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 和 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide HILIC (3.0 mm × 150 mm, 1.7 μm) 在其最优的色谱条件下分离 3 种甲基咪唑, 结果表明 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide HILIC 色谱柱能有效分离 3 种甲基咪唑化合物, 其他两种色谱柱可将 3 种甲基咪唑化合物的保留时间延后, 但

不能将 3 种同分异构体化合物有效分离, 因此选择 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide HILIC 进行检测分析。此色谱柱填料为 1.7 μm 的 BEH HILIC 颗粒, 具有高分离度、高柱效、高分析速度等特点, 因此可以将 3 种同分异构体化合物进行分离, 通过单一标准物质进样分析, 出峰的顺序分别为 1-甲基咪唑、4-甲基咪唑、2-甲基咪唑, 3 种甲基咪唑及其内标化合物定量离子色谱图见图 1。

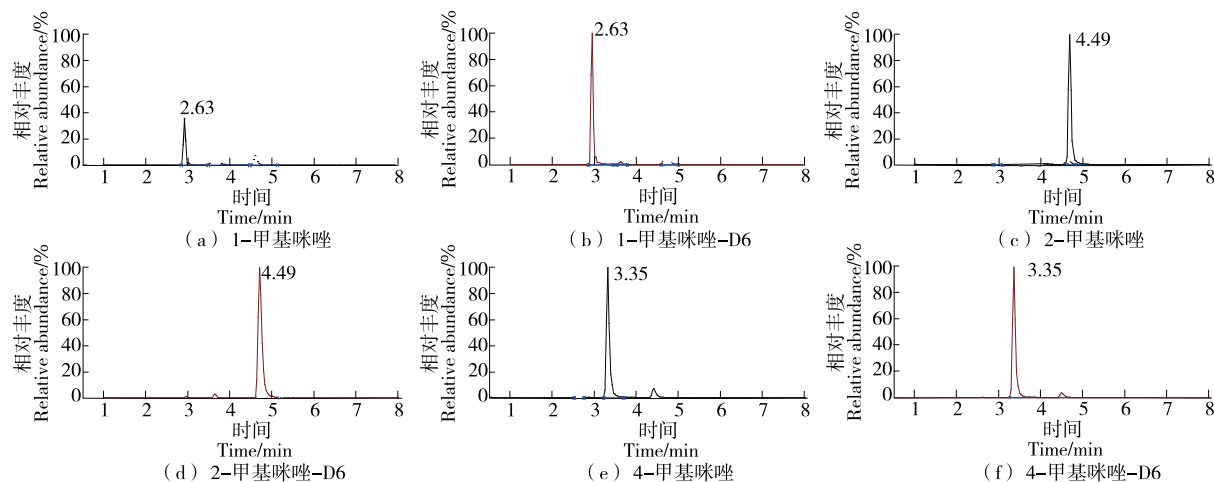


图 1 3 种甲基咪唑化合物及其内标混合标准溶液定量离子色谱图

Figure 1 Quantitative ion chromatogram of three methylimidazole compounds and their internal standard mixed standard solutions

2.3 提取试剂的优化

甲基咪唑化合物易溶于水, 因此选用水系溶剂进行提取。研究选择水、2% 甲酸水溶液、2% 三氯乙酸水溶液进行提取效果对比, 结果见图 2。由图 2 可知, 3 种提取试剂均能提取 3 种甲基咪唑化合物, 当用水提取时, 甲基咪唑化合物回收率最低, 2% 三氯乙酸的提取回收率最高。在净化过程中, 水提取溶液过柱净化速度最慢, 2% 三氯乙酸提取溶液最快。结合提取回收率和净化效率, 选择三氯乙酸溶液作为提取试剂。复合食用香精中含有肽、氨基酸、蛋白质、脂肪等, 在提取甲基咪唑的前处理过程中, 三氯乙酸可以有效沉淀蛋白质, 提高提取效率。研究进一步比较了 1% 三氯乙酸溶液、2% 三氯乙酸溶液、5% 三氯乙酸溶液、10% 三氯乙酸溶液的提取效果, 见图 2。

由图 2 可知, 随三氯乙酸提取液体积分数的升高, 甲基咪唑化合物的回收率逐步升高, 但当三氯乙酸体积分数 ≥ 5% 时, 甲基咪唑化合物的回收率变化较小。这是因为随三氯乙酸提取液体积分数的升高, 提取剂中三氯乙酸沉淀杂质的能力越强, 当三氯乙酸体积分数为 5% 时, 样品已被处理澄清, 达到最佳的净化效果, 过量的三氯乙酸溶液会增加后续淋洗次数。因此, 选择 5% 的三氯乙酸提取液作为香精中甲基咪唑的提取液。

2.4 净化固相萃取柱的优化

在最优提取工艺条件下, 比较了强阳离子固相萃取柱(SCX)、混合阳离子固相萃取柱(PCX)、弱阳离子固相萃取柱(WCX)对 3 种甲基咪唑的净化效果。不同固相萃取柱净化回收率见图 3。结果表明, 经 PCX 柱净化后,

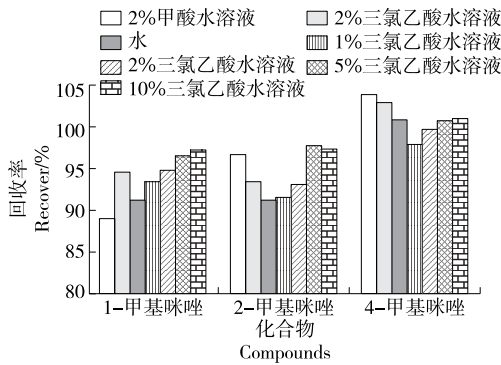


图2 不同提取剂对甲基咪唑回收率的影响

Figure 2 Effects of different extractants on the recovery of methylimidazole

3种甲基咪唑化合物回收率最高,WCX固相萃取柱净化回收率最低。PCX柱利用阳离子交换机理提供了离子交换与反相保留双重保留模式,对碱性化合物具有高的选择性,而WCX柱填充了混合型弱阳离子交换反相吸附剂,对强碱性的化合物具有高选择性,适用的pH值范围比较窄,SCX柱填料键合基团通常为(苯)磺酸基,一般用于有机碱类化合物净化。3种甲基咪唑为含氮五元芳香杂环化合物,呈弱碱性,PCX柱对3种甲基咪唑进行选择性吸附,选择不同极性淋洗液淋洗净化,氨化甲醇洗脱回收目标物,达到富集目标化合物并消除杂质,降低杂质引起的基质效应。

2.5 线性关系、检出限和定量限

由表2可知,当质量浓度为5.0~400.0 ng/mL时,

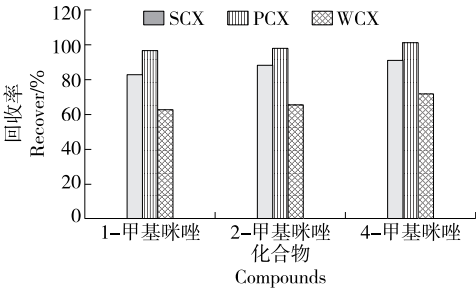


图3 不同固相萃取柱对甲基咪唑回收率的影响

Figure 3 Effects of different solid phase extraction columns on the recovery of methylimidazole

3种甲基咪唑化合物的线性关系良好,相关系数 $R^2 \geq 0.997$,检出限(LOD)为0.030~0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限(LOQ)为0.10~1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,此方法对3种甲基咪唑的检出限和定量限灵敏度高于GB 5009.282—2020。3种甲基咪唑分子量相同,但分子结构不同,在同一质谱条件下响应度有差异,因此检出限和定量限也不同。

2.6 准确度和精密度

由表3可知,当甲基咪唑化合物加标量为5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率在82.8%~111.7%,相对标准偏差RSD为1.2%~6.6%;当甲基咪唑化合物加标量为10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率在85.5%~105.2%,RSD为1.3%~9.3%;当甲基咪唑化合物加标量为50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率在88.0%~107.4%,RSD为1.7%~9.1%。不同内标物加标量条件下加标回收率和精密度良好,符合GB/T

表2 甲基咪唑化合物的线性、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Standard linearity, correlation coefficient, LOD and LOQ of methylimidazole compounds

化合物	标准曲线方程	R^2	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
1-甲基咪唑	$Y=0.139\ 447X$	0.999 8	0.088	0.29
2-甲基咪唑	$Y=0.046\ 812X$	0.997 8	0.450	1.50
4-甲基咪唑	$Y=0.026\ 246\ 9X$	0.998 6	0.030	0.10

表3 甲基咪唑化合物的回收率和精密度

Table 3 Recovery and precision of methylimidazole compounds %

基质种类	化合物	加标量 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标量 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标量 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
液体基质	1-甲基咪唑	111.7	1.4	105.2	1.3	107.4	1.7
	2-甲基咪唑	103.4	1.2	99.4	1.5	105.8	3.9
	4-甲基咪唑	103.5	1.7	101.2	1.7	105.8	2.9
半固体基质	1-甲基咪唑	95.0	5.3	94.2	4.4	98.9	2.6
	2-甲基咪唑	97.1	6.6	96.7	5.8	98.1	3.7
	4-甲基咪唑	97.2	4.9	89.0	3.4	106.7	4.6
固体基质	1-甲基咪唑	82.8	4.1	92.3	5.5	88.0	6.4
	2-甲基咪唑	92.3	5.5	85.5	9.3	98.1	6.7
	4-甲基咪唑	97.2	4.9	89.0	3.4	98.4	9.1

27404—2008 中检测方法确认技术要求。结果表明检验方法准确可靠,满足甲基咪唑检测要求。

2.7 实际样品检测

采用所建立的方法对市售 20 种食用香精进行检测,由表 4 可知,样品中有 10 份检出上述 3 种甲基咪唑,检出率为 50%。样品中 1-甲基咪唑的含量在 5.6~32.2 μg/kg, 2-甲基咪唑的含量在 5.2~160.2 μg/kg, 鸡肉粉、牛肉粉和猪骨粉的中 2-甲基咪唑含量超过 100 μg/kg。4-甲基咪唑的含量在 5.1~178.9 μg/kg,牛肉粉和羊肉粉的 4-甲基

咪唑含量超过了 150 μg/kg,其中羊肉粉中 4-甲基咪唑含量最高,为 178.9 μg/kg,但远低于焦糖中 4-甲基咪唑的限量值 200 mg/kg。食品中甲基咪唑大多来源于焦糖色素,但市售样品中检出甲基咪唑化合物的香精配料均属肉类香精且均不含焦糖色素,说明肉类香精产品中甲基咪唑化合物来源不是焦糖色素而是肉类酶解物、还原糖和氨基酸发生复杂的美拉德反应而产生的。因此通过控制美拉德反应条件可以控制部分香精产品中甲基咪唑化合物的含量,使产品安全性可控。

表 4 市售香精中 3 种甲基咪唑类化合物的含量[†]

Table 4 Contents of 3 methimidazole compounds in food flavors sold in market μg/kg

样品	1-甲基咪唑	2-甲基咪唑	4-甲基咪唑	样品	1-甲基咪唑	2-甲基咪唑	4-甲基咪唑
猪骨膏	16.0	13.6	13.5	猪骨粉	32.2	100.3	135.2
鸡肉粉	22.1	110.4	112.1	羊肉粉	12.5	98.2	178.9
鸡肉膏 1	14.3	8.4	9.0	鸡油鸡精	—	—	—
鸡肉膏 2	14.5	8.4	9.3	猪肉粉	22.5	90.5	135.2
牛肉膏	7.1	5.2	5.1	玉米香精	—	—	—
牛肉粉	15.4	160.2	175.7	牛奶香精	5.6	10.5	35.6
烧肉鸡精	—	—	—	鲜奶精	—	—	—
麻辣香精	—	—	—	橙味香精	—	—	—
椰油香精	—	—	—	咖啡香精	—	—	—
黑鸭味鸡精	—	—	—	卤肉香精	—	—	—

† “—”表示未检出。

3 结论

3 种甲基咪唑为同分异构体,分子量小,此类化合物易产生基质效应,因此采用水性柱分离,固相萃取柱吸附净化。采用液相色谱与质谱联用法进行定性分析,使用内标法定量,降低了基质效应影响,保证了检验方法的可靠性和稳定性。利用建立的方法验证了食用香精中甲基咪唑化合物检测的适用性,结果显示该方法定量限优于国家标准。而且该方法快速、高效、灵敏度高,可应用于食用香精中 3 种甲基咪唑的定量检测。后续将对其他类型食品中甲基咪唑含量测定进行方法适用性研究。

参考文献

[1] MARTIN S I, JONGEN W M, VANBOECKEL M A, et al. A review of maillard reaction in food and implications to kinetic modelling[J]. Trends in Food Science and Technology, 2000, 11(10): 364-373.
[2] 许海侠, 程裕东, 金银哲. 微波加热下食品美拉德反应研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 214-219.
XU H X, CHENG Y D, JIN Y Z. Research progress of Maillard reaction in food under microwave heating[J]. Food & Machinery, 2020, 36(6): 214-219.
[3] 陈岩, 赵宇明. 紫外可见光谱法测定食醋中 4-甲基咪唑含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(24): 128-131.

CHEN Y, ZHAO Y M. Determination of 4-methyl imidazole content in vinegar by UV-vis spectrometry[J]. Food Research and Development, 2016, 37(24): 128-131.
[4] 彭向前, 冯玮, 石海英, 等. 气相色谱法同时检测焦糖色素中的 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 中国调味品, 2012, 37(8): 83-85.
PENG X Q, FENG W, SHI H Y, et al. Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in caramel pigment by capillary gas chromatography[J]. China Condiment, 2012, 37(8): 83-85.
[5] 王冰玉, 赵文英, 曹晓荣, 等. 高效液相色谱法测定咪唑生产工 艺中反应液中咪唑及 2 种杂质 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 理化检验: 化学分册, 2020, 56(6): 692-695.
WANG B Y, ZHAO W Y, CAO X R, et al. HPLC determination of the imidazole and 2 impurities of 2 methylimidazole and 4 methylimidazole in reaction solutions in production process of imidazole[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2020, 56(6): 692-695.
[6] 乔青青, 郝莉花, 巩凡, 等. 气相色谱—正化学源质谱法同时测定焦糖色素中 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 258-262.
QIAO Q Q, HAO L H, GONG F, et al. Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole incaramel pigment using GC-PCI MS/MS [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 258-262.

(下转第 200 页)