

健康杂志,2004,21(6):408-409.

[8] 陈莹,莫连峰,唐宁. HPLC法测定复方水杨酸冰片软膏中水杨酸和苯甲酸的含量[J]. 中国药品标准,2009,10(6):465-467.

[9] 赵敏,宁啸骏,周耀斌. 高效液相色谱法测定化妆品中邻苯基

苯酚的含量[J]. 香精香料化妆品,2010,12(6):25-27.

[10] 白娟娟,艾尔肯·依不拉音,麦麦提·艾合麦提. 固相萃取逐步分离果实保鲜防腐剂噻本咪唑、邻苯基苯酚残留检测的研究[J]. 新疆医科大学学报,2012,35(5):594-598.

实验技术与方法

面粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱测定方法的优化

宋书锋,王丹,刘卿,杨杰,方从容,鲁杰,赵云峰

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 建立面粉中偶氮甲酰胺测定的高效液相色谱法(HPLC)。方法 以丙酮为提取液,样品提取液经离心浓缩后,用水复溶残渣,采用 BDS HYPERSIL Cyano 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4.6 μm)分离,二极管阵列检测器检测。结果 在 2~40 μg/ml 范围内,线性关系良好($r=0.9998$),3个添加水平的回收率为 74%~118%,相对标准偏差 $RSD < 5\%$ 。方法的定量限为 3 mg/kg。结论 本方法特异性强,前处理简单,适用于面粉中添加的偶氮甲酰胺快速筛查和定量。

关键词:面粉;偶氮甲酰胺;高效液相色谱法;测定;面粉处理剂;食品添加剂;食品安全

中图分类号:R155;O657.7;TS202.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0448-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.010

Optimization for determination of azodicarbonamide in flour by high performance liquid chromatography

SONG Shu-feng, WANG Dan, LIU Qing, YANG Jie, FANG Cong-rong, LU Jie, ZHAO Yun-feng

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination (ADA) of azodicarbonamide in flour. **Methods** Samples were extracted with acetone, then centrifuged and concentrated, the residue was dissolved with water. The injection was separated by cyano column and detected by photo-diode array. **Results** The method showed a good linearity in the range of 2-40 μg/ml ($r=0.9998$). The recoveries of ADA from flour spiked at three levels were in the range of 74%-118% with the relative standard deviations less than 5%. The limit of quantification (LOQ) was 3 mg/kg. **Conclusion** This method could be used for screening and quantification of ADA in flour for its strong specificity and simple preparation.

Key words: Flour; azodicarbonamide; high performance liquid chromatography; determination; flour treatment agents; food additives; food safety

偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADA)为常用的化工试剂,在水和大多数有机溶剂中几乎不溶,在二甲基亚砜(DMSO)中微溶,加热 180 °C 以上分解^[1]。有报道显示^[2],ADA 自身与面粉不发生作

用,但在加水后可与面粉蛋白质中氨基酸的巯基键(-SH)作用,使其转化为二硫键(-S-S-),从而达到增筋和漂白的作用。国际食品法典委员会(CAC)、美国、加拿大、韩国和我国台湾地区均允许 ADA 作为面粉处理剂,使用量为 45 mg/kg。我国 GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》规定 ADA 作为面粉处理剂的允许使用量为 45 mg/kg^[3]。有研究显示^[4-5],面粉中的 ADA 与水接触后,立即快速分解为联二脲,进一步加热处理产生氨基脲(SEM)。SEM 是一种与硝基咪唑类药物-咪唑西林代谢产物一致的化合物,具有致突变和致癌作用,因此 ADA

收稿日期:2014-07-14

基金项目:973“食品加工过程安全性评价及危害物风险评估”(2012CB720804)

作者简介:宋书锋 男 副研究员 研究方向为食品添加剂检测技术 E-mail:songsf@cfsa.net.cn

通讯作者:赵云峰 男 研究员 研究方向为食品化学检验 E-mail:zhaoyf@cfsa.net.cn

使用的安全性引起了关注,在国内提出了研制面粉中 ADA 检测方法和加强监管的需求。

文献报道^[6-7],可采用高效液相色谱法(HPLC)进行 ADA 的测定,但存在样品提取的有效性、配制标准溶液的试剂对检测结果判定的影响等问题。为此,本文在探讨提取方法的基础上,对文献报道的检测 ADA 的液相色谱法进行进一步优化和验证,提出了适合于实际监督检查的方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪(附二极管阵列检测器,美国 Waters)、BDS HYPERSIL Cyano 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,4.6 μm,美国 Thermo Scientific)、超声波清洗机、高速冷冻离心机、涡旋混合器、氮吹仪(美国 Organomation)。

试剂偶氮甲酰胺对照样品(含量 99.6%,市售食品级添加剂),丙酮、甲醇均色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

准确称取样品 1 g(精确至 0.001 g),置 15 ml 离心管,加入 10 ml 丙酮,涡旋混匀后,超声提取 15 min,每 5 min 取出振摇一次。超声后冷却至室温,9 000 r/min 离心 15 min,上清液经微孔滤膜过滤,取 5 ml 滤液于 40 °C 下氮气浓缩至干。加入 1 ml 水复溶,100 °C 水浴超声 5 min,冷却后,微孔滤膜过滤,样品液注入高效液相色谱仪测定。

1.2.2 色谱条件

色谱柱采用 BDS HYPERSIL Cyano(4.6 mm × 250 mm,4.6 μm),柱温为 30 °C。流动相为甲醇-水(15:85,V/V),流速 0.8 ml/min,检测波长 245 nm,进样量 20 μl。

2 结果与分析

2.1 方法优化

2.1.1 色谱柱及流动相的选择

偶氮甲酰胺极性很强,在普通 C₁₈ 柱上基本没有保留,即使采用纯水作为流动相,也是在固定时间出峰。选择适合于反相色谱不能保留的强极性酸、碱和中性化合物分析的 BEH Amide 色谱柱时,保留虽略有改善,但峰型较差。在氰基柱 BDS HYPERSIL Cyano 上,ADA 保留时间为 4.5 min 左右,且峰型尖锐对称,见图 1。考察了甲醇-水(15:85,V/V)以及甲醇-20 mmol 乙酸铵(15:85,V/V)作为流动相效果,结果表明,由于 ADA 几乎呈中性,用缓冲盐调节流动相 pH 值时,ADA 峰型和响应均没有明显改善,

故选择甲醇-水(15:85,V/V)作为流动相,也可延长色谱柱使用寿命。

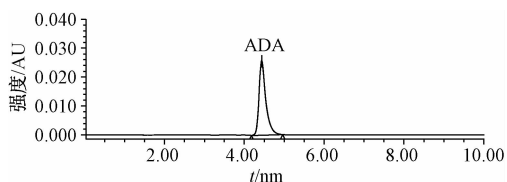


图 1 偶氮甲酰胺标准溶液(20 μg/ml)色谱图
Figure 1 Chromatograph of ADA standard solution

2.1.2 标准溶液的配制

目前市售标准溶液用 DMSO 配制,浓度为 1 mg/ml。文献^[6-8]也多以 DMSO 作为溶剂配制标准储备液,再用水、乙酸铵溶液或 5% DMSO 逐级稀释。但在 ADA 的最大吸收波长 245 nm 处,二甲基亚砜也有较大吸收,且 DMSO 在色谱柱上的保留时间和 ADA 几乎相同,但光谱显示 DMSO 最大吸收为 222 nm。即使采用氰基柱,同时调节流动相中甲醇和水的比例,也不能实现 DMSO 和 ADA 的有效分离。在扫描波长 190 ~ 400 nm 下,偶氮甲酰胺 5% DMSO 溶液、5% DMSO 及偶氮甲酰胺水溶液光谱图见图 2 ~ 4。

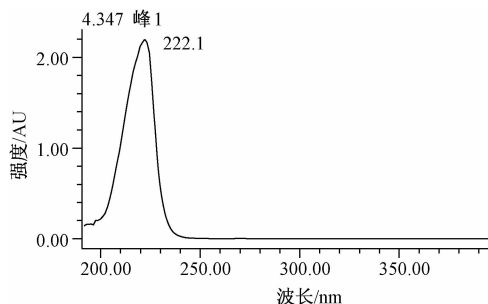


图 2 偶氮甲酰胺 5% DMSO 溶液光谱图
Figure 2 Spectrum of ADA in 5% DMSO

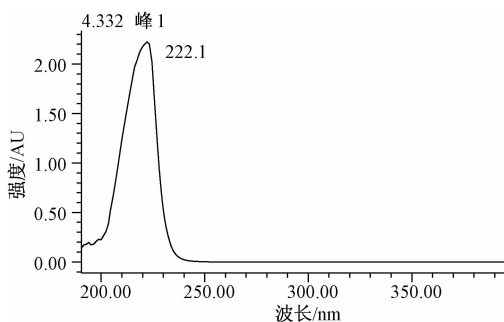


图 3 5% DMSO 的光谱图
Figure 3 Spectrum of 5% DMSO

为避免采用 DMSO 对测定结果判定的影响,本文标准溶液采用超纯水配制。为考察水对标准溶液配制的适用性,称取 4 mg ADA,加水 100 ml 超声溶解,浓度为 40 μg/ml;另制备 ADA 的饱和水溶液,按上述

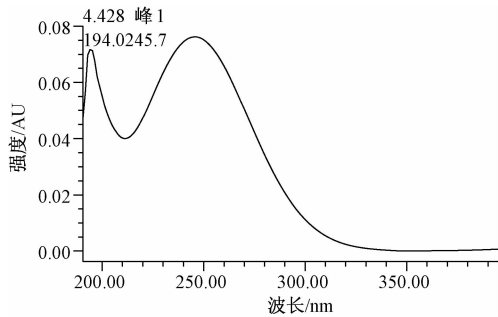


图4 偶氮甲酰胺水溶液光谱图

Figure 4 Spectrum of ADA in water

色谱条件进行 HPLC 检测。结果显示,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液中 ADA 峰面积小于饱和溶液中 ADA 峰面积,表明 100 ml 水中溶解 4 mg ADA 是可能的,且由 2 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 系列溶液的测定结果可见,浓度和峰面积呈良好线性,且在 190 ~ 400 nm 波长下扫描,ADA 的最大吸收约为 245 nm,与文献[1]相同。

2.1.3 提取溶剂的选择

尽管 ADA 在 DMSO、N,N-二甲基甲酰胺中溶解度相对较高,但是当使用这些溶剂提取样品时,难以在随后浓缩、溶剂置换或其它净化手段中去除,而选择的分离色谱柱不能使 ADA 与 DMSO、N,N-二甲基甲酰胺良好分离,造成结果判定的假阳性。而使用水提取时,样品中的水溶性成分也干扰 ADA 测定。参考文献[7,9],选择丙酮作提取溶剂,由本文的添加回收试验结果显示,回收率良好,色谱图未见干扰。本研究还发现,当采用氮气浓缩时,应使丙酮尽可能吹干,否则,采用水复溶残渣后,在 ADA 的色谱图后,会出现一个较高的色谱峰,影响结果的定量分析。且如果采用室温下水复溶时,添加的回收率低,只有 10% 左右。本文则采用沸水浴中超声 5 min 复溶,冷却后微孔滤膜过滤,添加回收可满足要求。

2.2 方法参数的验证

2.2.1 线性试验

用水配制浓度分别为含 ADA 的 2、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 系列标准溶液。在所选的色谱条件下进样,每个浓度至少重复 3 次,用测得的峰面积平均值对进样浓度与峰面积绘制校正曲线。峰面积与质量浓度成正比,线性方程为 $y = 1.27 \times 10^4 x - 7.50 \times 10^3$, $r = 0.9998$ 。

2.2.2 灵敏度、添加回收率和精密度试验

按 1.2 处理方法及色谱条件下,根据 10 倍信噪比确定方法的定量限为 3 mg/kg。

在阴性面粉中添加浓度分别为 4、40、200 mg/kg 的 ADA,按照上述的试样处理和色谱条件进行测定,每个浓度重复 6 次,测定结果和相对标准偏差详

见表 1,添加回收率在 74% ~ 118% 之间,相对标准偏差 $< 5\%$,表明方法的性能良好。

表 1 面粉样品不同浓度添加水平的回收率和精密度 ($n = 6$)

Table 1 Recoveries and precision of ADA spiked

in flour at three levels		
加标水平/(mg/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
4	115	2.23
40	90.3	1.61
200	75.6	1.37

2.3 样品测定

采用本方法对市售面粉 13 份(包括面包粉、饺子粉、油饼粉、麦芯粉、小麦粉等)进行测定,在 1 份面包粉中检出偶氮甲酰胺,含量为 41 mg/kg,见图 5。

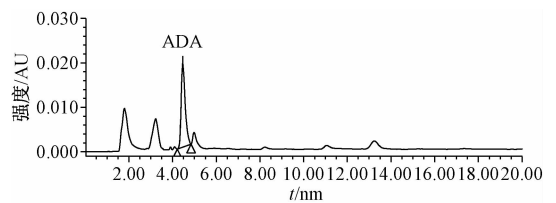


图5 阳性样品(面包粉)色谱图

Figure 5 Chromatograph of positive sample (bread flour)

3 小结

本研究用水替代 DMSO 溶解偶氮甲酰胺,避免了因 DMSO 与偶氮甲酰胺出峰时间相同而造成误判的可能,同时在参考文献的基础上,对样品的提取、复溶、色谱柱和流动相的选择等方面进行了优化,建立了适合于面粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱测定方法,回收率、精密度及检出限能够满足方法学要求,可用于当前面粉中添加偶氮甲酰胺的监督检测。

参考文献

- [1] 美国药典委员会. 美国食品化学法典. [M]. 7 版. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [2] 吴正双, 梁焯琼, 钟海娟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定面粉中的偶氮甲酰胺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1239-1242.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [4] 李金强, 郭海霞, 曹鹏, 等. 偶氮甲酰胺分解产生呋喃西林代谢物的相关性研究[J]. 化学分析计量, 2009, 18(6): 34-36.
- [5] Gregory O N, Timothy H B, Gregory W D, et al. Semicarbazide formation in flour and bread[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(6): 2064-2067.
- [6] 弓耀忠, 巩强, 张焯, 等. 高效液相色谱法检测小麦粉中的偶氮甲酰胺方法的研究[J]. 现代仪器, 2010, 16(2): 65-67.
- [7] 陈波, 靳保辉, 林燕奎, 等. 面粉中偶氮甲酰胺含量的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 1002-1004.
- [8] 周漪波, 黄芳, 朱志鑫, 等. 小麦粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱法快速测定[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 102-105.

[9] JING Y, XIANG H W, YA X S, et al. Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product

semicarbazide; investigation of variation in flour and flour products [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(17): 9313-9318.

实验技术与方法

超高效液相色谱法同时测定调味品中非法添加 20 种工业染料

王艳春, 李博, 刘晓峰

(北京市通州区疾病预防控制中心, 北京 101100)

摘要:目的 建立超高效液相色谱方法同时测定调味品中 20 种工业染料含量。方法 采用 Endeavorsil C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸的 20 mmol/L 乙酸胺水溶液-甲醇为流动相体系进行梯度洗脱, 分别在波长为 450、520 和 600 nm 处检测。结果 方法的线性范围: 2~40 μg/ml, $r \geq 0.999$, 20 种工业染料的定量检出限为 0.07~0.75 mg/kg; 20 种组分的平均回收率 72.3%~93.0%, 相对标准偏差 1.0%~6.2% ($n=6$)。结论 本方法快速、准确、灵敏, 可用于同时测定调味品中 20 种非法添加的工业染料。

关键词:超高效液相色谱; 调味品; 工业染料; 食品安全; 违法添加

中图分类号: R155.5; TS254 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0451-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.05.011

Simultaneous determination of 20 kinds of illegally added industrial dye in condiments by UPLC

WANG Yan-chun, LI Bo, LIU Xiao-feng

(Tongzhou Center for Disease Prevention and Control, Beijing 101100, China)

Abstract: Objective To determine 20 kinds of industrial dyes simultaneously in condiments with ultra high performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** Samples were separated on a Endeavorsil C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) chromatographic column and gradient eluted of 20 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (containing 0.1% formic acid) methyl alcohol. The wavelength of the detector was at 450, 520 and 600 nm. **Results** The calibration curve showed good linearity in the range of 2-40 μg/ml, and the correlation coefficients were better than 0.999. The limits of detection were in the range of 0.07-0.75 mg/kg. The recoveries of standard addition at three levels was 72.3% -93.0% and the RSD ($n=6$) was 1.0% -6.2%. **Conclusion** The method was sensitive and accurate, it could be used for the detection of the 20 kinds of industrial dyes in condiments simultaneously.

Key words: Ultra performanace liquid chromatography; condiment; industrial dye; food safety; illegal to add

工业染料一般是指在工业生产中用于着色(如将纺织品、皮毛制品、木制品以及陶瓷制品上色等)的各种染料。目前广为熟悉的工业染料包括:罗丹明 B、苏丹橙 G、苏丹黄、对位红、苏丹红 G、苏丹 I、苏丹 II、苏丹 III、苏丹 IV^[1-2]、红 2G、碱性橙 2、碱性橙 21、碱性橙 22、酸性橙 II、酸性金黄^[3-7]、孔雀石绿、结晶紫、苏丹 7B、苏丹黑、溶剂蓝 35 等。工业染料对人体具有危害性,有些甚至有“三致”(致畸、致癌、致突变)作用。因此 2008

年 12 月卫生部发布的《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》中明确将工业染料列入非食用物质。严令禁止添加到食品中的,要求加大监测力度,因此建立调味品中工业染料的检测方法十分必要,对保障老百姓食品安全具有预警作用。目前文献报道^[1-4]的方法主要有液相色谱法;液相色谱质谱联用法^[8];气相色谱质谱联用法等。由于工业染料的种类比较多,不法经营者使用的染料也不尽相同,而目前国标方法和文献报道的检测方法,大多只能用于测定其中的一至四种化合物,为此,本研究建立了一种采用超高效液相色谱法梯度洗脱,能够同时测定 20 种工业染料的方法,方法的灵敏度高,重现性好,方便快捷。

收稿日期:2014-06-03

基金项目:北京市通州区科技项目(kj2013qx009)

作者简介:王艳春 女 副主任技师 研究方向为理化检验

E-mail: wangyanchun1221@163.com