

# 选择离子气质联用法同时测定食醋中 2-甲基咪唑和4-甲基咪唑

孟颖<sup>1</sup>, 闫璐<sup>1</sup>, 胡洁<sup>1</sup>, 王皓铭<sup>1</sup>, 王思佳<sup>1</sup>, 李争春<sup>1</sup>, 胡永钢<sup>2</sup>, 张生万<sup>1,\*</sup>

(1.山西大学生命科学学院, 山西太原 030006;

2.山西大学化学化工学院, 山西太原 030006)

**摘要:**建立了选择离子气/质联用法同时测定食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的新方法。对色谱条件进行了筛选优化。样品经碱处理, 硅藻土吸附, 二氯甲烷洗脱, 合并洗脱液并浓缩, 以N-甲基甲酰胺为内标物, 用二氯甲烷定容至10mL容量瓶后进行气/质联用测定。结果表明, 2-甲基咪唑和4-甲基咪唑均在0~15.2mg/L范围内呈良好线性关系, 其相关系数分别为0.9997和0.9996; 相对标准偏差分别为3.0%和3.1%; 2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的平均回收率分别为101.3%和99.3%。使用该法对市售食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的含量进行了同时测定, 结果较优。

**关键词:**气相色谱-质谱法(GC/MS), 选择离子模式(SIM), 食醋, 2-甲基咪唑, 4-甲基咪唑

## Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in vinegar by gas chromatography/selected ion mass spectrometry

MENG Ying<sup>1</sup>, YAN Lu<sup>1</sup>, HU Jie<sup>1</sup>, WANG Hao-ming<sup>1</sup>, WANG Si-jia<sup>1</sup>, LI Zheng-chun<sup>1</sup>,  
HU Yong-gang<sup>2</sup>, ZHANG Sheng-wan<sup>1,\*</sup>

(1.School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** The method of the determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in vinegar by selected ion GC-MS was established. The chromatographic conditions were selected and optimized. The sample were first alkalized, purified by kieselguhr, eluted with dichloromethane. The eluate was combined and concentrated, then with N-methyl-formanilide as internal standard, volumed to the 10mL volumetric flask with dichloromethane, then determined by GC. The results showed that the concentration of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole both in the range of 0~15.2mg/L had good linear relationship. The correlation coefficients respectively were 0.9997 and 0.9996; the relative standard deviation were respectively 3.0% and 3.1%. The average recoveries of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole were 101.3% and 99.3%. This method was used to determine 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in commercial vinegar, and the satisfactory results was achieved.

**Key words:** GC/MS; selected ion mass; vinegar; 2-methylimidazole; 4-methylimidazole

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)06-0059-04

焦糖色素是一种世界广泛使用的食品色素, 占整个食品着色剂使用量的90%以上<sup>[1]</sup>, 由于它的色泽, 口感和良好的稳定性, 被广泛的用于食醋、酱油、饮料和啤酒等食品中<sup>[2]</sup>。现在市场上广泛使用的焦糖色素多为氨(铵)法生产, 在生产过程中产生一定量的2-甲基咪唑和4-甲基咪唑<sup>[3]</sup>。有研究表明, 4-甲基咪唑有类似吡啶、吡咯的毒性, 抑制细胞色素P450同工酶, 它在人的肝脏中发生催化反应, 产生许多低分子质量的致癌物<sup>[4]</sup>。2-甲基咪唑和4-甲基咪唑属同分

异构体<sup>[5]</sup>, 能诱发动物惊厥<sup>[6]</sup>还会导致甲状腺肿瘤<sup>[6]</sup>。世界卫生组织和我国国标GB 8871-2001均规定氨(铵)法生产的焦糖色素中4-甲基咪唑的含量不得超过0.02%, 而未对2-甲基咪唑的含量做出规定<sup>[7-8]</sup>。为了提供一个控制食品质量与安全的有力依据, 建立快速有效的检测食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑含量的方法极其重要。

目前, 文献报道的薄层色谱法<sup>[9]</sup>、分光光度法<sup>[9]</sup>、气相色谱法<sup>[10]</sup>是对焦糖色中的4-甲基咪唑进行检测; 高效液相色谱法<sup>[11]</sup>对饮料中的4-甲基咪唑进行检测; 气质联用法<sup>[1-2, 4, 7]</sup>分别对液态调味料、软饮料、焦糖色和炭烧咖啡中的4-甲基咪唑进行检测。用选择离子(SIM)气质联用色谱法同时测定食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的方法在国内外尚未见文献报

收稿日期: 2013-07-04 \* 通讯联系人

作者简介: 孟颖(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学。

基金项目: 山西省普通高校特色重点学科建设项目; 山西大学本科生第十期科研训练。

道。本文对各类色谱条件进行筛选优化,并对市售食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑进行了测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

2-甲基咪唑、4-甲基咪唑 分析纯, 西亚试剂; N-甲基甲酰胺 分析纯, TCI公司; 二氯甲烷(分析纯)、氢氧化钠(分析纯) 天津市进丰化工有限公司; 硅藻土 天津光复精细化工研究所; 食醋 市售。

Agilent 7890-5975C型GC/MS联用仪 配有电子轰击离子源(ED), 美国Agilent公司; RE-52AA型旋转蒸发仪 杭州瑞佳精密科学仪器有限公司; BS 124S型分析天平 Satorius公司; 玻璃层析柱(30mm×300mm)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液的配制

1.2.1.1 内标溶液的配制 称取N-甲基甲酰胺0.0506g, 置于50mL容量瓶中, 用二氯甲烷溶解后定容, 摇匀, 得浓度为1.01mg/mL的储备液; 取1.25mL浓度为1.01mg/mL的溶液至50mL容量瓶, 定容后摇匀, 得浓度为25.3 $\mu$ g/mL的溶液, 备用。

1.2.1.2 混合标准品储备液的配制 分别称取2-甲基咪唑和4-甲基咪唑0.0504g, 置于50mL容量瓶中, 用二氯甲烷溶解后定容, 摇匀, 得浓度为1.01mg/mL的储备液; 取2.50mL浓度为1.01mg/mL的储备液至25mL容量瓶, 用二氯甲烷定容后摇匀, 得浓度为101 $\mu$ g/mL的标准液, 备用。

1.2.2 样品前处理 先取25.0mL样品于50mL烧杯中, 用10mol/L的NaOH溶液调pH至11, 加入硅藻土30g与样品混合至半干, 将混合物装入有活塞的层析柱。加入50mL二氯甲烷静置30min。用150mL二氯甲烷洗脱, 收集洗脱液, 用旋转蒸发仪浓缩至2~3mL。转移至10mL容量瓶中, 加入1mL浓度为25.3 $\mu$ g/mL的内标储备液, 定容。

#### 1.2.3 色谱与质谱条件

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱: RTX-WAX(30m×250 $\mu$ m×0.5 $\mu$ m); 载气: He; 恒流, 柱流量: 1.5mL/min; 分流进样, 分流比: 2:1; 进样量: 2 $\mu$ L; 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C; 柱初温: 120 $^{\circ}$ C, 保持3min, 以15 $^{\circ}$ C/min的速度升至230 $^{\circ}$ C, 保持30min。

1.2.3.2 质谱条件 电子轰击(ED)离子源; 电子能量70eV; 离子源温度250 $^{\circ}$ C; 四级杆温度150 $^{\circ}$ C; 传输线温度280 $^{\circ}$ C; 溶剂延迟时间4min; 扫描方式选择离子扫描模式(SIM); 4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的特征离子都为m/z82和54.1, 以m/z82为定量离子; N-甲基甲酰胺的特征离子为m/z135和106, 以m/z135为定量离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱柱的选择

分别选择RTX-WAX、HP-5不同极性的色谱柱进行实验。图1为RTX-WAX色谱柱进行实验所得色谱图。结果表明: 选用RTX-WAX极性柱响应值较高且峰形好, 2-甲基咪唑、4-甲基咪唑完全分离。

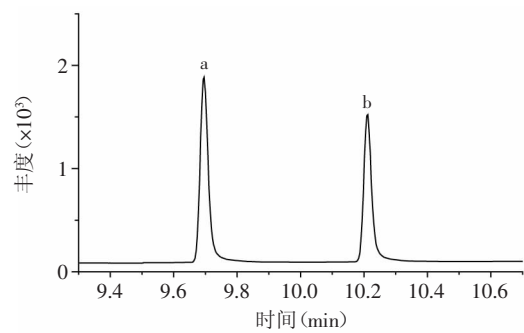


图1 RTX-WAX色谱柱实验所得总离子流色谱图  
Fig.1 The Total ion chromatogram of experiments by RTX-WAX column

注: a: 2-甲基咪唑; b: 4-甲基咪唑; 图3同。

### 2.2 内标物的选择

分别选择咪唑<sup>[4,7]</sup>、2-乙基咪唑<sup>[2,4,7]</sup>和N-甲基甲酰胺不同的内标物在相同的色谱条件下进行实验, 结果见图2。结果表明: 咪唑与4-甲基咪唑出峰时间相同, 无法实现完全分离; 2-乙基咪唑与2-甲基咪唑虽然达到分离, 但分离效果不理想; N-甲基甲酰胺不仅出峰快, 峰形好, 而且与被测组分达到完全分离, 因此选用N-甲基甲酰胺为内标物。

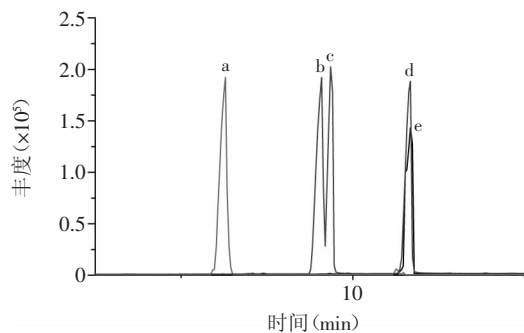


图2 不同内标物与被测物的总离子流色谱图

Fig.2 The total ion chromatogram of different internal standards and analytes

注: a: N-甲基甲酰胺; b: 2-甲基咪唑; c: 2-乙基咪唑; d: 4-甲基咪唑; e: 咪唑。

### 2.3 GC-MS离子对的选择

2-甲基咪唑和4-甲基咪唑属于同分异构体, 对其进行全扫描, 质谱图见图3, 通过全扫描确定化合物的特征离子有m/z82.0、54.1。以m/z82.0作为2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的定量离子, 以m/z54.1作为2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的定性鉴别离子。对N-甲基甲酰胺进行全扫描, 质谱图见图4, 确定其特征离子有m/z135.0和106.0。以m/z135.0作为N-甲基甲酰胺的定量离子, 以m/z106.0作为其定性离子。

### 2.4 标准曲线和检出限

分别精确移取2-甲基咪唑和4-甲基咪唑标准液0.03、0.05、0.10、0.50、1.00、1.50mL置于10mL容量瓶中, 各加入1.00mL浓度为25.3 $\mu$ g/mL的内标液, 定容摇匀, 得系列标准液, 其中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑浓度分别为0.303、0.505、1.01、5.04、10.1、15.2 $\mu$ g/mL,

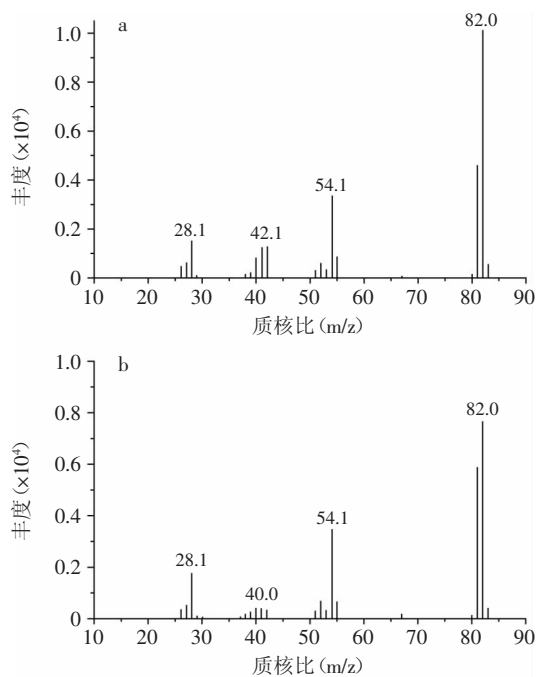


图3 2-甲基咪唑(a)和4-甲基咪唑(b)的质谱图  
Fig.3 The mass spectrum of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole

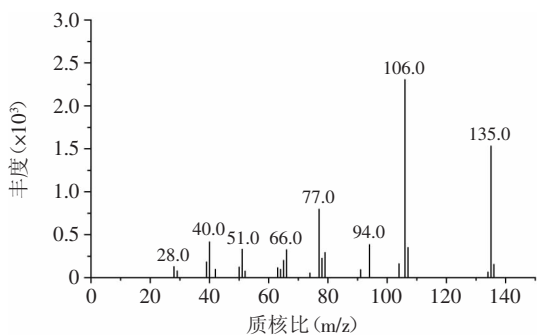


图4 N-甲基甲酰胺的质谱图  
Fig.4 The mass spectrum of N-methyl-formanilide

在选择离子模式下(SIM)平行测定三次,以被测物峰面积与内标物峰面积的比值对其浓度进行线性回归,2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的线性回归方程分别

为:  $y=0.2263x-0.0382, R=0.9997$  和  $y=0.194x-0.047, R=0.9996$ , 其标准曲线见图5。

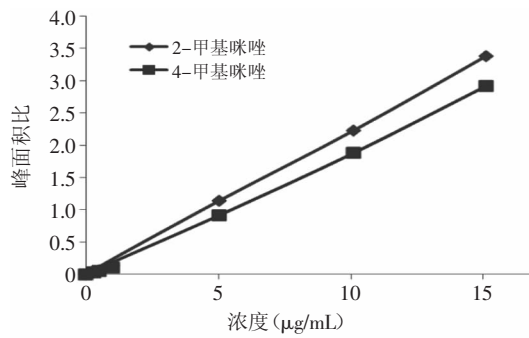


图5 2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的标准曲线  
Fig.5 Standard curve of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole

结果表明,2-甲基咪唑和4-甲基咪唑在0~15.2μg/mL的范围内线性关系良好;按3倍信噪比计算2-甲基咪唑、4-甲基咪唑检出限分别为0.0106、0.0160μg/mL,表明该方法具有较高的灵敏度。

### 2.5 精密度

在1.2.3项的条件下,对2-甲基咪唑和4-甲基咪唑浓度均为5.05μg/mL的溶液连续进样6次,结果见表1。从表1可知,以峰面积计算2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的相对标准偏差分别为3.0%和3.1%,表明该方法精密度良好。

### 2.6 回收率

精密移取已知2-甲基咪唑和4-甲基咪唑含量的样品3份,置于5mL容量瓶中,分别向其中准确加入10.1μg/mL的溶液0.50、0.70、0.90mL,每份2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的加入量均分别为5.05、7.06、9.07μg,再各加入0.5mL 25.3μg/mL的内标储备液,定容摇匀,进行测定,结果见表2。2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的平均回收率分别为101.3%和99.3%,表明该方法具有较高的准确性。

### 2.7 样品测定

分别对5种市售样品按1.2.2项的方法处理,在1.2.3项的条件下进行定性定量分析,结果见图6、

表1 精密度实验结果

Table 1 The results of RSD by SIM- GC/MS

被测物	被测物峰面积						峰面积平均值	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
2-甲基咪唑	2762	2834	2972	2957	2788	2844	2859.50	3.0
4-甲基咪唑	2507	2474	2666	2642	2648	2611	2591.33	3.1

表2 2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的回收率结果

Table 2 Recoveries of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole by SIM- GC/MS

2-甲基咪唑含量(μg)	4-甲基咪唑含量(μg)	加入量(μg)	2-甲基咪唑与内标物峰面积比值平均值	2-甲基咪唑回收量(μg)	2-甲基咪唑回收率(%)	4-甲基咪唑与内标物峰面积比值平均值	4-甲基咪唑回收量(μg)	4-甲基咪唑回收率(%)
		5.05	0.2988	7.44	107	0.2941	8.79	98.4
2.06	3.83	7.06	0.3739	9.10	99.7	0.3861	11.2	104
		9.07	0.4549	10.89	97.3	0.4384	12.5	95.6

表3。

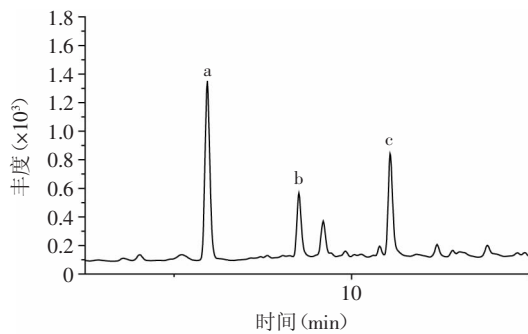


图6 样品的选择离子色谱图

Fig.6 The selected ion mass spectrum of the sample

注: a: N-甲基甲酰苯胺; b: 2-甲基咪唑; c: 4-甲基咪唑。

表3 样品中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的测定结果

Table 3 The measurement results of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in the sample

样品编号	2-甲基咪唑(mg/L)	4-甲基咪唑(mg/L)
醋1	0.844	1.413
醋2	0.402	1.018
醋3	0.210	0.776
醋4	0.228	0.778
醋5	0.850	1.672

由图6可知,市售的食醋中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑均有检出,计算各样品中的2-甲基咪唑和4-甲基咪唑含量,2-甲基咪唑的含量在0.210~0.850mg/L,4-甲基咪唑的含量在0.776~1.672mg/L范围内。

### 3 结论

本文建立了选择离子气质联用法同时测定食醋中的2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的新方法。结果表明:2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的线性范围均在0~15.2mg/L范围内呈良好线性关系,其相关系数分别为0.9997和0.9996;相对标准偏差分别为3.0%和3.1%;2-甲基咪唑和4-甲基咪唑的平均回收率分别为101.3%和99.3%。该法具有高灵敏度,定量准确度更

高等优点。本法用于市售食醋的分析,取得了满意结果。

### 参考文献

- [1] 熊培,陈美玲,赖毅东. 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[J]. 现代食品科技, 2012, 28(5): 567-578.
- [2] S C Cunha, A I Barrado, M A Faria, *et al.* Assessment of 4-(5-)methylimidazole in soft drinks and dark beer[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24: 609-614.
- [3] 彭向前,冯伟,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.
- [4] J O Fernandes, M A Ferreira. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5)methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 786: 299-308.
- [5] 林晓珊,杭义萍,吴惠勤,等. 气相色谱-串联质谱法测定焦糖色素中2-甲基咪唑和4-甲基咪唑[J]. 分析实验室, 2011, 30(11): 85-88.
- [6] Po Chan, J Mahler, G Travlos, *et al.* Induction of thyroid lesions in 14-week toxicity studies of 2 and 4-methylimidazole in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice[J]. Organ Toxicity and Mechanisms, 2006, 80(3): 169-180.
- [7] S Casal, J O Fernandes, M B P P Oliveira, *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric quantification of 4-(5-)methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 976: 285-291.
- [8] GB 8817-2001, 食品添加剂焦糖色(亚硫酸铵法、氨法、普通法)[S].
- [9] 黄志勤, 屈海云. 分光光度法测定焦糖色中的4-甲基咪唑[J]. 中国调味品, 2005(6): 52-54.
- [10] 郭小莉,陈敏,张世湘,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.
- [11] 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.

(上接第51页)

- [15] GB 8954-1988食醋厂卫生规范[S].
- [16] GB 12694-1990肉类加工厂卫生规范[S].
- [17] GB 19303-2003熟肉制品企业生产卫生规范[S].
- [18] GB 12693-2010乳制品良好生产规范[S].
- [19] GB 23790-2010粉状婴幼儿配方食品良好生产规范[S].
- [20] GB 12695-2003饮料企业良好生产规范[S].
- [21] GB 19304-2003定型包装饮用水企业生产卫生规范[S].
- [22] GB 16330-1996饮用天然矿泉水厂卫生规范[S].
- [23] GB 8950-1988罐头厂卫生规范[S].
- [24] GB 17404-1998膨化食品良好生产规范[S].

- [25] GB 17403-1998巧克力厂卫生规范[S].
- [26] GB 8591-1988白酒厂卫生规范[S].
- [27] GB 12696-1990葡萄酒厂卫生规范[S].
- [28] GB 12697-1990果酒厂卫生规范[S].
- [29] GB 8952-1988啤酒厂卫生规范[S].
- [30] GB 12698-1990黄酒厂卫生规范[S].
- [31] GB 8956-2003蜜饯企业良好生产规范[S].
- [32] GB 8957-1988糕点厂卫生规范[S].
- [33] GB 1355-1986小麦粉[S].
- [34] GB/T 24353-2009风险管理原则与实施指南[S].