

小麦粉中偶氮甲酰胺的液相色谱测定方法探究

肖晓莉, 吴琪, 罗珩

绵阳市食品药品检验所, 四川绵阳 621000

【摘要】偶氮甲酰胺属于食品添加剂, 其分解产物存在食品安全风险, 本文对某标准物质厂家推荐的直接测定法进行验证, 并对小麦粉中偶氮甲酰胺衍生物的高效液相色谱测定方法的相关检测条件(提取试剂、衍生试剂、衍生时间、色谱柱和仪器响应等)进行进一步探究和完善。

【关键词】偶氮甲酰胺; 液相色谱; 小麦粉; 检测条件

【中图分类号】TS211.7 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2022.14.016

引言

偶氮甲酰胺, 在工业中作为发泡剂, 用于橡胶、泡沫塑料的制作^[1], 在食品行业中用作食品添加剂, 对面粉具有增白、强化面筋和促进成熟的作用。ADA的分解产物氨基脒(SEM属于致癌化学物质, 人吸入ADA可能会导致过敏和哮喘^[2])。GB 2760-2014中规定偶氮甲酰胺可作为小麦粉中的面粉处理剂, 最大使用量为0.045g/kg。偶氮甲酰胺的高效液相色谱检测方法可分为直接测定和间接测定^[3]。直接测定是使用丙酮、乙腈等易挥发有机溶剂作提取剂, 将有机溶剂浓缩净化后用高效液相色谱直接测定^[4], 由于丙酮、乙腈等有机溶剂对偶氮甲酰胺溶解性差, 在紫外吸收下响应值偏小, 所以需进行浓缩净化; 间接测定是利用偶氮甲酰胺与衍生溶液发生的化学变换, 使紫外吸收较弱的偶氮甲酰胺生成带有发色基团的大分子衍生产物, 提高色谱分析的检测灵敏度。GB 5009.283-2021规定了食品中偶氮甲酰胺的液相色谱测定方法, 该方法对偶氮甲酰胺的衍生物使用外标法进行定量。本文对某标准物质厂家推荐的直接测定法进行了验证, 并对GB 5009.283-2021方法中相关检测条件进行进一步探究和完善。

1 实验部分

1.1 选择N,N-二甲基甲酰胺提取溶剂

丙酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷常作为偶氮甲酰胺的提取溶剂。丙酮、乙腈对偶氮甲酰胺的溶解性较小, 提取后需进行浓缩; N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷对偶氮甲酰胺溶解度较高, 且N,N-二甲基甲酰胺较二甲基亚砷黏度小很多, 能通过离心和过滤等

方法将溶液澄清, 避免了浓缩过程中样品的衰减, 从而提高提取效率。因此使用N,N-二甲基甲酰胺溶液作为提取溶剂^[5-6]。

1.2 偶氮甲酰胺标准品

标准物质厂商: BePure; 批号: F0032298; 浓度: 1000ug/mL。

标准中间溶液配制: 偶氮甲酰胺标准储备液(100ug/mL): 精密吸取偶氮甲酰胺标准溶液(1000ug/mL) 1.0mL置10mL棕色容量瓶中, 加N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度, 摇匀, 即得100ug/mL的标准中间液。

1.3 直接测定法验证(某标准物质厂商推荐方法)

偶氮甲酰胺标准工作液: 分别精密吸取偶氮甲酰胺标准储备液0.05mL、0.1mL、0.2mL、0.5mL、1.0mL置10mL棕色容量瓶中, 加N,N-二甲基甲酰胺稀释的标准曲线溶液, 临用现配。

戴安U3000高效液相色谱仪(DAD检测器), 编号SP-14; ME204T/02电子天平, 编号LX-19; 色谱柱: Kromasil 60-5-CN 氰基柱(4.6x250mm); 检测波长230nm; 流动相甲醇: 水=15:85; 流速1mL/min; 实验发现, 该方法的紫外吸收响应值小, 检测灵敏度不高, 标准品中未出现目标峰, 因此不推荐使用。

1.4 衍生测定法

试剂: 甲醇(CH₄O): 色谱纯、N,N-二甲基甲酰胺(C₃H₇N₂O)、无水硫酸镁(MgSO₄)、三苯基膦(C₁₈H₁₅P): 麦克林, >99.0%

空白基质提取溶液: 称取2.50g试样, 置于50mL具塞离心管中, 加入1g无水硫酸镁, 混合均匀, 准确加

入 25.0mL N,N-二甲基甲酰胺,充分混匀,振荡提取 20min,静置,8000r/min 离心 10min,取上清液,即得。本方法检出限应高于空白小麦粉中偶氮甲酰胺的含量。

偶氮甲酰胺标准工作液:分别精密吸取偶氮甲酰胺标准储备液 0.05mL、0.1mL、0.2mL、0.5mL、1.0mL 置 10mL 棕色容量瓶中,加空白基质提取溶液稀释得标准曲线溶液,临用现配。

样品溶液的制备:

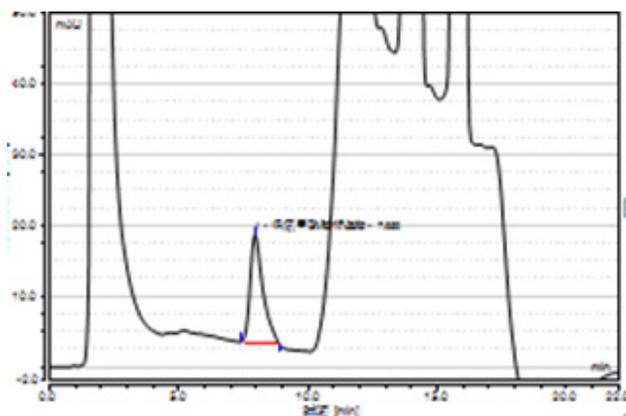
试样处理:称取混匀试样 2.50g,置于 50mL 具塞离心管中,加入 1g 无水硫酸镁,混合均匀,准确加入 25.0mL N,N-二甲基甲酰胺,充分混匀,振荡提取 20min,静置,8000r/min 离心 10min,取上清液待衍生。

试样溶液的衍生:取上述滤液 1.00mL,置于 10mL 具塞离心管中,加入 0.1mL 三苯基膦衍生溶液(N,N-二甲基甲酰胺作溶剂,浓度为 10.0mg/mL,避光,临配现用),于涡旋混合器上混合均匀,于电热鼓风干燥箱中 20℃~30℃ 温度下,避光静置衍生 12h 以上,衍生液过 0.22 μm 有机微孔滤膜后,供液相色谱仪测定(待测液在 20℃~30℃ 环境温度下 60h 之内上机检测)。

标准溶液的衍生:分别精密吸取标准曲线工作溶液 1.00mL,按上述试样溶液的衍生化方法操作,与试样溶液进行同步衍生。绘制标准曲线。

偶氮甲酰胺衍生物的浓度即为偶氮甲酰胺的浓度,将衍生物的浓度数据带入计算。若样品检测浓度超出线性范围,应用 N,N-二甲基甲酰胺稀释样品溶液与空白基质提取液,重新配置标准曲线,再同步衍生和测定。

仪器参考条件:色谱柱 SHIMADZU C18 色谱柱(4.6mm×150mm,5 μm);流速:1.0mL/min;柱温:30℃;检测



戴安 U3000, 10ug/mL, 峰面积 8.6mAU*min

波长:230nm;进样量:10uL;流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	水%	甲醇%
0	45	55
8	45	55
9	10	90
15	10	90
16	45	55
22	45	55

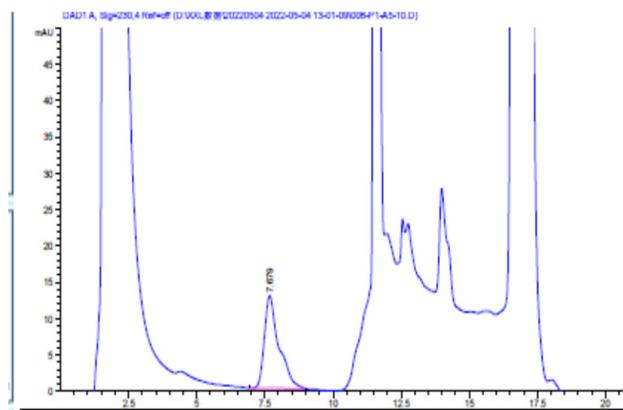
2 结果与讨论

衍生试剂的使用:选择三苯基膦(C18H15P)作为衍生剂,试用了科隆、麦克林、阿拉丁不同品牌试剂进行衍生,实验发现科隆品牌的衍生效果不理想,麦克林、阿拉丁能达到实验要求;当使用浓度为 10mg/mL 三苯基膦衍生时,衍生物的峰面积最大。

色谱柱的选择:本次实验采用了 SHIMADZU-C18 色谱柱(4.6mm×150mm,5 μm)、Thermo-C18 色谱柱(4.6mm×250mm,5 μm)、SWELL Chromplus-C18 色谱柱(4.6mm×250mm,5 μm)和 SHIMADZU-C18 色谱柱(4.6mm×250mm,5 μm)进行分离试验,结果发现 SHIMADZU-C18 色谱柱(4.6mm×150mm,5 μm)、SWELL Chromplus-C18 色谱柱(4.6mm×250mm,5 μm)的色谱峰的分离效果和峰形较好。

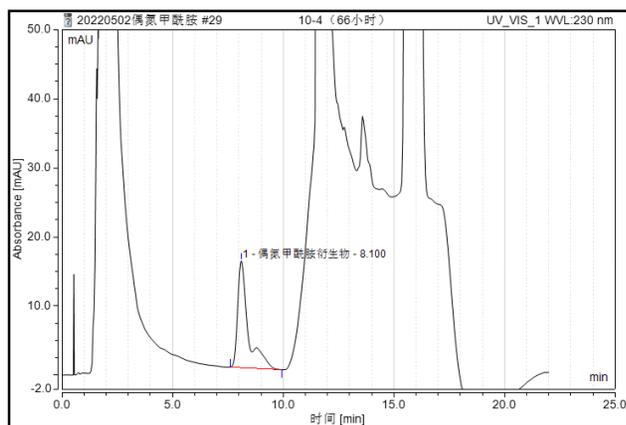
样品前处理注意事项:本方法采用 DAD 溶剂溶解度高,黏稠度较小的 N,N-二甲基甲酰胺作为提取溶剂,当样品提取液中加入三苯基膦衍生溶液后,应于涡旋混合器上充分混匀,实验证明涡旋时间 3min 以上效果较理想。充分混匀后于 20℃~30℃ 环境温度下避光静置衍生。

液相色谱仪:样品溶液流经色谱柱,通过检测器,待测组分浓度被转换成电信号传送到记录仪,记录仪记

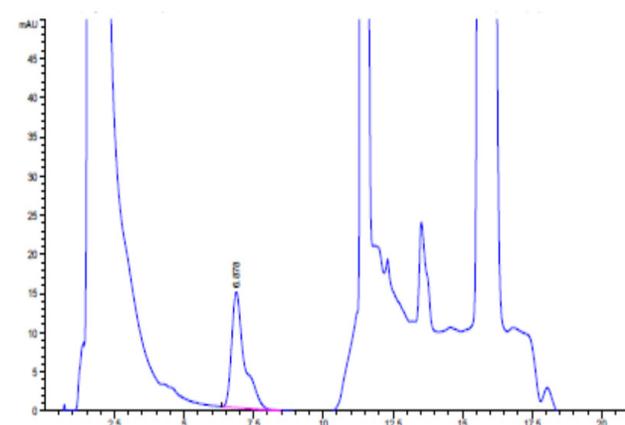


安捷伦 1260II, 10ug/mL, 峰面积 470mAU*s

图 1



戴安 U3000, 10ug/mL, 114h



安捷伦 1260II, 10ug/mL, 114h

图 2

录色谱信号, 不同品牌液相色谱仪记录的色谱信号值存在差异, 所以在相同的条件下同一浓度的待测组分通过不同品牌的液相色谱仪的测定, 其响应值和峰面积不同。本实验分别使用了戴安 U3000 高效液相色谱仪、安捷伦 1260II 高效液相色谱仪、岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪进行测定, 发现安捷伦 1260II 高效液相色谱仪中低浓度的目标峰的峰面积大小适中, 更易确认, 可作为首选仪器。(如图 1)

衍生时间的选择: 本次实验将待测液在 $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 环境温度下进行衍生, 结果显示, 衍生产物峰面积与衍生时间成正比, 当衍生时间达到 12h 时, 峰面积增加缓慢并趋于稳定; 在 60h 内, 各仪器的目标峰峰形和峰面积大小均稳定, 超过 60h 以后, 戴安 U3000 高效液相色谱仪的峰型出现拖尾现象, 安捷伦 1260II 高效液相色谱仪相对较稳定。见图 2。

线性范围与检出限: 向高效液相色谱仪中注入衍生后的标准溶液, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 以标准溶液浓度为横坐标, 得标准曲线回归方程: $Y=1.8492X-0.3978$, $r=0.9999$, 在 $0.5\text{ug/mL} \sim 10\text{ug/mL}$ 范围内, 线性良好。空白样品进行加标测得方法检出限和定量限, 检出限: 信噪比大于 3 的添加量; 定量限: 信噪比大于 10 的添加量。本方法检出限为 1.1mg/kg , 定量限为 5.0mg/kg 。

回收率和精密度: 称取 9 份混匀的试样各称取 2.50g 试样, 置于 50mL 具塞离心管中, 按样品提取步骤进行操作, 避光静置衍生 12h 以上, 衍生液过 $0.22\ \mu\text{m}$ 有机微孔滤膜后, 供液相色谱仪测定 (待测液在 $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 环境温度下 60h 之内测定)。该方法回收率为 $88\% \sim 91\%$ 。将浓度为 2ug/mL 偶氮甲酰胺标准溶液连续测定 6 次, 求

出 6 次测定峰面积的相对标准偏差, 依次来确定仪器的稳定性, 计算出 RSD 值为 4.2%。

3 结束语

在制作面制品时, 小麦粉里所含的 ADA 遇水会快速转化, 在提取、检测 ADA 过程中, ADA 也会发生转化反应, 因此 ADA 直接检测法不能准确反映其初始添加量, 本研究对 GB5009.283-2021 相关检测条件进行进一步探究和完善, 使操作快速简单、灵敏度高、定量准确, 能够满足国家标准对食品中偶氮甲酰胺限量的检测要求。

参考文献:

- [1] 林长虹, 李芸, 陈杰锋, 等. 小麦粉及其制品中偶氮甲酰胺的检测方法研究 [J]. 中国食品添加剂, 2015(7):167-171.
- [2] 田林双, 顾鹏程, 吴存兵, 等. 小麦粉及其制品中偶氮甲酰胺检测方法研究进展 [J]. 食品科学, 2021, 42(9):347-354.
- [3] 周陶忆, 陆琦, 孙凯峰. 小麦粉中偶氮甲酰胺检测技术研究 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(12):1412-1414.
- [4] 张青龄, 黄建立, 林有裕, 等. 小麦粉中偶氮甲酰胺检测方法研究 [J]. 食品科技, 2015, 284(6):355-359.
- [5] 张桂芳, 张晓瑜, 宫月华, 等. 高效液相色谱-紫外检测法快速测定小麦面粉中偶氮甲酰胺 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5):473-475.
- [6] 赵丽, 邵明媛, 周雅, 等. 高效液相色谱法测定小麦粉中偶氮甲酰胺 [J]. 中国食品添加剂, 2018(1):200-204.