

# 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱 检测蜂蜜中的4-甲基咪唑和2-甲基咪唑

刘芸<sup>1\*</sup>, 丁涛<sup>1</sup>, 费晓庆<sup>1</sup>, 沈崇钰<sup>1</sup>, 吴斌<sup>1</sup>, 张睿<sup>1</sup>, 陈磊<sup>1</sup>, 张晓燕<sup>1</sup>, 谭梦茹<sup>2</sup>

(1. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001; 2. 中国药科大学药学院, 南京 210001)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱法直接测定蜂蜜中4-甲基咪唑和2-甲基咪唑的方法。**方法** 用水溶解蜂蜜样品, 经0.22 μm粒径的微孔膜过滤后, 采用Agilent HILIC Plus(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)色谱柱进行分离, 以体积比为8:2的乙腈与5 mmol/L乙酸铵水溶液为流动相进行等度洗脱。质谱采用正离子模式, 在质荷比(*m/z*)50~400范围内通过高分辨质谱全扫描模式提取目标化合物的精确质量数。**结果** 在本文建立的色谱条件下, 4-甲基咪唑(4-MI)和2-甲基咪唑(2-MI)能够得到较好的分离, 高分辨率质谱提取的质量准确度小于 $5 \times 10^{-6}$ (5 ppm)。该方法对4-MI的检测限可达50 μg/kg, 对2-MI的检测限可达25 μg/kg。两种待测物质采用外标法定量, 线性良好, 相关系数均大于0.99。通过加标验证, 在50、100和150 μg/kg三个加标水平下, 蜂蜜中4-MI和2-MI的平均回收率为73.2%~107.9%, 相对标准偏差(RSD)小于9.7%。**结论** 该方法样品处理过程简单, 不使用有机溶剂, 灵敏度高, 适用于任何蜜种的测定, 可以作为蜂蜜中是否掺入焦糖色素的检测方法。利用该方法对国内外各地区12个蜜种的30个蜂蜜样品进行检测, 均未检出4-MI和2-MI。**关键词:** 高分辨率质谱; 蜂蜜; 焦糖色素; 4-甲基咪唑; 2-甲基咪唑

## Direct determination of 4-methylimidazole and 2-methylimidazole in honey by high performance liquid chromatography - quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry

LIU Yun<sup>1\*</sup>, DING Tao<sup>1</sup>, FEI Xiao-Qing<sup>1</sup>, SHEN Chong-Yu<sup>1</sup>, WU Bin<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>,  
CHEN Lei<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Yan<sup>1</sup>, TAN Meng-Ru<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China;  
2. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210001, China)

**ABSTRACT: Objective** A method of high performance liquid chromatography- quadrupole/ electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (HPLC-Q/orbitrap MS) was developed to determine 4-methylimidazole and 2-methylimidazole in honey. **Methods** The honey samples were diluted with deionized water, and then filtered by a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane with pore size of 0.22 μm. The analytes were separated on an Agilent HILIC Plus (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) column through isocratic elution with acetonitrile and 5 mmol/L of ammonium acetate aqueous solution (v:v, 8:2). Full scan experiments

基金项目: 江苏省“333工程”科研项目(BRA2013276)、江苏省大型科学仪器服务平台项目(BZ201302)

**Fund:** Supported by the Research Program of 333 Engineering in Jiangsu Province (BRA2013276) and the Program of Large Scientific Instrument Service Platform in Jiangsu Province (BZ201302)

\*通讯作者: 刘芸, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品掺假。E-mail: liuy4@jsciq.gov.cn

\*Corresponding author: LIU Yun, Ph.D., Engineer, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.99, Zhonghua Road, Nanjing 210001, China. E-mail: liuy4@jsciq.gov.cn

were performed over the range of  $m/z$  50~400 in positive mode to extract the accurate mass of analytes.

**Results** Under the optimal condition, 4-methylimidazole (4-MI) and 2-methylimidazole (2-MI) were well separated, and the accuracy of extracted mass routinely detected was below  $5 \times 10^{-6}$ . The detection limits for 4-MI and 2-MI were 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. Good linearities were provided in their respective linear ranges with correlation coefficients higher than 0.99. The average recoveries at three spiked levels (50, 100 and 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were in the range of 73.2 %~107.9 % and the relative standard deviations (RSDs) lower than 9.7 %. **Conclusion** The proposed method was simple, on use of organic solvents, sensitive, and can therefore meet the requirements of the determination of caramel color in all kinds of honey. The method was applied to 30 honey samples of 12 species from domestic and other countries. The results showed that neither 4-MI nor 2-MI was detected.

**KEY WORDS:** high resolution mass spectrometry (HRMS); honey; caramel colours; 4-methylimidazole; 2-methylimidazole

## 1 引言

焦糖色素又称焦糖色或酱色, 是一种浓黑褐色粘稠物质, 有特殊的甜香气和焦苦味<sup>[1,2]</sup>, 能够将被添加物质变成棕褐色, 因而作为添加剂广泛应用于食品工业中, 如酒类、酱油、醋、酱料、可乐饮料、糕点、咖啡等<sup>[3]</sup>。食品工业中使用的焦糖色素大多是葡萄糖母液为原料, 利用高压釜反应器, 采用氨法工艺生产的, 该工艺反应中会发生不同程度的副反应, 生成有毒物质 2-甲基咪唑(2-MI)和 4-甲基咪唑(4-MI), 而这两种物质是影响焦糖色素安全性的重要因素<sup>[4,5]</sup>。4-MI 是一种含氮杂环化合物, 分子式为  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ , 动物试验显示 4-MI 能导致动物产生肿瘤, 因而可能给人体带来致癌风险<sup>[6]</sup>。同时 4-MI 也是一种神经毒素, 动物毒理学实验表明, 4-MI 能导致动物兴奋、痉挛甚至诱发癫痫症<sup>[7]</sup>。2-MI 是 4-MI 的同分异构体, 也属于含氮杂环类化合物 (结构式见图 1)。2-MI 不仅具有强烈的惊厥和致癌作用, 还能诱导动物得甲状腺肿大和甲状腺瘤<sup>[8,9]</sup>。世界卫生组织把 4-MI 作为食品中是否添加了焦糖色素的标志物, 也同时对其含量有明确的限定, 以色率 20000 EBC 单位计, 即含量不大于 200 ppm<sup>[10]</sup>。我国国家标准 GB8817- 2001 也对氨法生产的焦糖色素中 4-MI 的含量做出规定, 即不得超过 0.02%, 但对于 2-MI 的含量却没有限制。由于 2-MI 和 4-MI 分子的极性很大, 含量很低, 因此如何快速、准确地测定其含量, 成为目前研究的重点。GB2760-2011 中, 不管是加氨法、普通法还是亚硫酸铵法生产的焦糖色素均禁止用于蜂蜜基质中。而有些不法蜂蜜生产商用糖浆勾兑蜂蜜, 由于糖浆是

无色的, 为了达到色度需要, 会加入一定量的焦糖色素; 在蜂蜜加工中, 脱抗生索的过程也会把蜂蜜颜色脱除, 不法生产商也会加入焦糖色素调颜色。因此, 建立蜂蜜样品中 4-MI 和 2-MI 含量的测定方法对提高蜂蜜掺假鉴别和焦糖色素的食用安全性具有一定的指导意义。

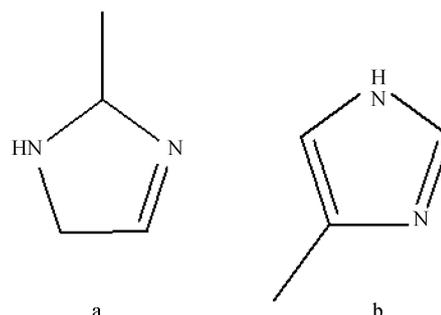


图 1 2-MI 和 4-MI 的结构式

Fig. 1 The structure of 2-MI and 4-MI

目前为止, 焦糖色素及焦糖色素食品中咪唑衍生物的测定方法有: 高效液相色谱(HPLC)-紫外法<sup>[11]</sup>、HPLC-质谱(MS)法<sup>[12]</sup>、二维液相色谱-紫外法<sup>[13]</sup>、毛细管气相色谱法<sup>[14]</sup>等。本研究应用的四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱仪是首台将四极杆的母离子选择性和高分辨率精确质量 orbitrap 质量分析相结合的新型仪器, 旨在提供高度可靠的定量和定性分析, 目前已经广泛应用于蛋白质组学、中药安全控制、代谢组学、和食品安全领域中小分子和大分子的研究<sup>[15-18]</sup>, 但将 orbitrap 高分辨质谱用于蜂蜜中焦糖色素的测定还未见报道。本研究充分利用高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱的高灵敏度和强抗

干扰能力的特点, 能够检测到复杂混合物中更多痕量级的污染物, 为焦糖色素中 2-MI 和 4-MI 的检验提供一种切实可行的分析方法, 从而可以有效控制焦糖色素的食用安全性。本方法具有前处理过程简便、分析时间短、测定结果准确等特点, 可以用于实际蜂蜜样品的测定。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器、试剂与材料

四极杆静电场轨道阱高分辨率质谱仪 Q-Exactive(赛默飞世尔科技 ThermoFisher Scientific 公司), 配备有 HESI-II 源, 液相色谱系统为 Dionex 3000 高压液相色谱, 自动进样器; ELGA-Q15 高纯水发生器(英国 ELGA 公司); 涡旋混合器(XW-80A 型, 上海医科大学仪器厂)。

2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 2-MI)和 4-甲基咪唑(4-methylimidazole, 4-MI)(纯度大于等于 99%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸铵(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 实验用水均为超纯水(Elga 公司)。

天然蜂蜜样品包括: 油菜蜜、洋槐蜜、荆条蜜、椴树蜜、紫云英蜜、葵花蜜、芦苕蜜、枣花蜜、麦卢卡蜂蜜、香橙蜜、棉花蜜、荞麦蜜(来自国内外不同地区的蜂农或者蜂蜜供应商), 共计 12 个蜜种 30 个样本, 蜂蜜的收集过程中没有季节时间的限制。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

分别称取 2-MI 和 4-MI 标准品各 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用纯乙腈溶解, 配制成 1 mg/mL 的标准储备液, 密封保存于 4 °C 冰箱中。准确吸取 1 mg/mL 的两种单标准储备液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容得 100 μg/mL 的混合标准溶液。

标准工作溶液的配制: 根据需要, 吸取一定量的标准溶液, 用初始流动相将混合标准溶液稀释成系列标准溶液。

#### 2.2.2 样品前处理

准确称取蜂蜜样品 1 g 于 10 mL 容量瓶中, 加入适量的水, 涡旋 30 s 混合均匀, 最后加水混合均匀后定容, 取适量溶液经 0.22 μm 的水相滤膜过滤至进样瓶中, 供高效液相四极杆静电场轨道阱高分辨率质谱仪测定。

### 2.2.3 色谱-质谱条件

#### (1) 色谱条件

色谱柱为 Agilent HILIC Plus(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm); 流动相为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液 A 和乙腈 B(A:B, 20:80, v:v); 流速: 0.50 mL/min; 进样量 10 μL; 样品室温度: 19 °C。

#### (2) 质谱条件

可加热的电喷雾离子源(HESI-II); 毛细管温度为 350 °C; 鞘气(N<sub>2</sub>)流速 50 L/min; 辅助气(N<sub>2</sub>)流速 6 L/min; 吹扫气(N<sub>2</sub>)流速 3 L/min; 喷雾电压为 3 kV; 透镜电压为 50 V; 采用正离子扫描模式; 全扫描的分辨率 R=35000, 扫描范围: 50-400 m/z。

## 3 结果和讨论

### 3.1 前处理方法的优化

蜂蜜的基质复杂, 总糖含量达 75%以上, 水分 16%~25%, 还含有少量蛋白质、矿物质、维生素、有机酸等, 总含量为 5%左右。由此可见, 蜂蜜中的大部分物质为水溶性的。为了避免大分子物质阻塞色谱柱, 首先要对蜂蜜进行样品前处理。实验证明, 乙腈是挥发性的有机溶剂, 具有较好的沉淀蛋白的作用, 与液质方法的处理步骤相匹配。同时焦糖色素中的 4-MI 和 2-MI 极易溶解于水, 适量的水有助于 4-MI 和 2-MI 的提取, 所以提取溶剂选择以水为主的乙腈-水的混合体系, 对蜂蜜样品的前处理进行优化。

以两个蜜种即江苏油菜蜜和河南荆条蜜为例, 比较了不同比例乙腈-水的提取效率, 结果如表 1 所示。随着乙腈的加入, 4-MI 和 2-MI 在蜂蜜中的回收率显示不同的变化趋势, 但都高于 70%。在不同的蜜种中, 回收率的变化也不相同, 可能与不同蜂蜜的基质效应有关。实际操作过程中发现, 乙腈的加入并没有出现明显的蛋白沉淀, 可能是蜂蜜中蛋白质含量太少的缘故, 且在液质进样之前, 样品已经通过 0.22 μm 的滤膜过滤, 大分子的蛋白质已经被除掉。因此, 从经济和环保的角度考虑, 最终选择直接用纯水稀释作为样品前处理的方法。

### 3.2 色谱柱的选择

色谱柱的选择对于样品分离非常重要, 不同的色谱柱对同一样品有不同的保留时间和分离效果。在实验过程中, 分别使用 Agilent TC-C<sub>18</sub>(100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm)、Agilent ZORBAX SB-Aq(100 mm × 4.6

mm, 2.6  $\mu\text{m}$ )和 Agilent HILIC Plus(2.1 mm  $\times$  100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )对目标化合物进行分离。由于 4-MI 和 2-MI 为同分异构体且分子极性很大, 在 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱上很难有保留。虽然 ZORBAX SB-Aq 柱具有亲水性的表面, 能够增加极性化合物 4-MI 和 2-MI 的保留, 比传统的 C<sub>18</sub> HPLC 色谱柱的分离能力强, 但是仍然不能使他们达到基线分离。有文献报道<sup>[19,20]</sup>, 使用离子对试剂可以增强 4-MI 和 2-MI 在 C<sub>18</sub> 色谱柱上的保留, 但由于离子对试剂不仅需要较长的色谱平衡时间, 且会减少仪器和色谱柱的使用寿命, 尤为重要是与质谱条件不兼容。HILIC Plus 色谱柱为高性能亲水性的硅胶填料, 当使用 5 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈(20:80, v:v)作为流动相时, 能够显著增强极性化合物 4-MI 和 2-MI 的色谱保留行为, 使标准物质的峰形尖锐对称, 取得较好的分离效果, 能够满足检测的要求, 分离结果如图 2 所示。

表 1 蜂蜜样品不同前处理方式的比较

Table 1 The comparison of different pretreatment of honey samples

蜜种	前处理	回收率/%	
	乙腈:水 (v:v)	4-甲基咪唑	2-甲基咪唑
江苏油菜蜜	4:6	100.4	112.5
	2:8	74.2	93.3
	纯水	91.4	87.2
河南荆条蜜	4:6	79.6	99.14
	2:8	76.3	87.3
	纯水	86.4	79.2

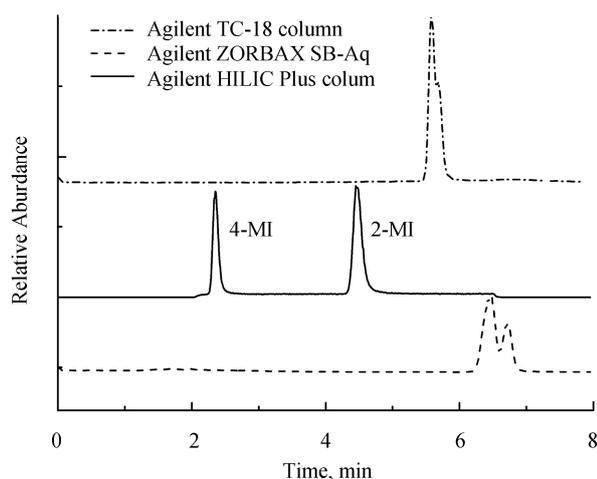


图 2 三种不同色谱柱对咪唑化合物分离色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the methylimidazole compounds based on three different chromatographic columns

### 3.3 质谱条件的优化

由于 4-MI 和 2-MI 分子结构较为简单, 且分子中只含氮杂原子, 因此本实验在 ESI<sup>+</sup> 模式下, 采用流动注射方式, 对 4-MI 和 2-MI 进行高分辨率全扫描, 选择质谱响应较强的特征母离子。采用 CAS 号在权威的 Chemspider 数据库中查询该化合物的详细信息, 得到该化合物的分子式为 C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 母离子的精确理论质量数应为 83.061101, 而我们在实验中选择的母离子分子量为 83.06085, 以准分子离子 [M+H]<sup>+</sup> 理论精确质量数提取色谱图, 在分辨率(R)为 35 000 时, 分析物相对质量偏差小于 5 $\times$ 10<sup>-6</sup>。在全扫描采集模式下得到一级全扫描的质谱图, 如图 3 所示。按照欧盟 2002/657/EC 指令, 农药和兽药残留分析中必须满足总分 4 分的要求, 才能满足确证的需要。高分辨质谱一个母离子得 2 分, 一个子离子得 2.5 分, 因此我们又进行了 CID 二级质谱, 在碰撞能为 50 eV 时得到的质谱图如图 4 所示。由于 4-MI 和 2-MI 结构的差异, 导致他们在相同碰撞能条件下, 碎片离子 56.04944 相对丰度不同, 而且 2-MI 的结构较稳定, 碎片离子强度较低, 因此, 后续实验中选用了母离子定量。

### 3.4 方法学评价

#### 3.4.1 线性范围及检出限

按 2.2.1 确定的实验步骤制备 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4-MI 和 2-MI 标准混合储备液, 用乙腈-水(80:20, v:v)稀释标准工作溶液, 依次得到含量为 0.5、2、5、10、50、100 ng/mL 的标准溶液。采用 Orbitrap 高分辨质谱对 4-MI 和 2-MI 进行外标法定量分析。以目标物特征离子的色谱峰面积为纵坐标 y、以目标物的浓度为横坐标 x, 绘制标准曲线。从表 2 中可以看出, 4-MI 和 2-MI 的相关系数(r)大于 0.99, 4-MI 在 5~100 ng/mL、2-MI 在 2~100 ng/mL 范围内线性关系良好。由于高分辨质谱基线噪音极低, 以仪器方法计算的检出限和定量限与方法的真实性可能存在误差, 因此, 在空白样品中添加低浓度的目标化合物, 获得 S/N=3 时对应的浓度为此方法的检出限, 获得 S/N=10 时对应的浓度为此方法的定量限。所得结果如表 2 所示。

#### 3.4.2 回收率

分别在江苏油菜蜜(1)、河南荆条蜜(2)、新疆葵花蜜(3)、宁夏棉花蜜(4)、吉林椴树蜜(5)、陕西枣花蜜

蜜(6)、山东洋槐蜜(7)、内蒙荞麦蜜(8)等 8 种蜂蜜样品中进行了 3 个不同添加水平的加标回收率实验, 每个水平重复测定 5 次, 测得 4-MI 和 2-MI 的回

收率范围和相对标准偏差范围(见表 3)。可见, 该方法对不同基质的蜂蜜具有通用性, 能够用于日常分析的检测。

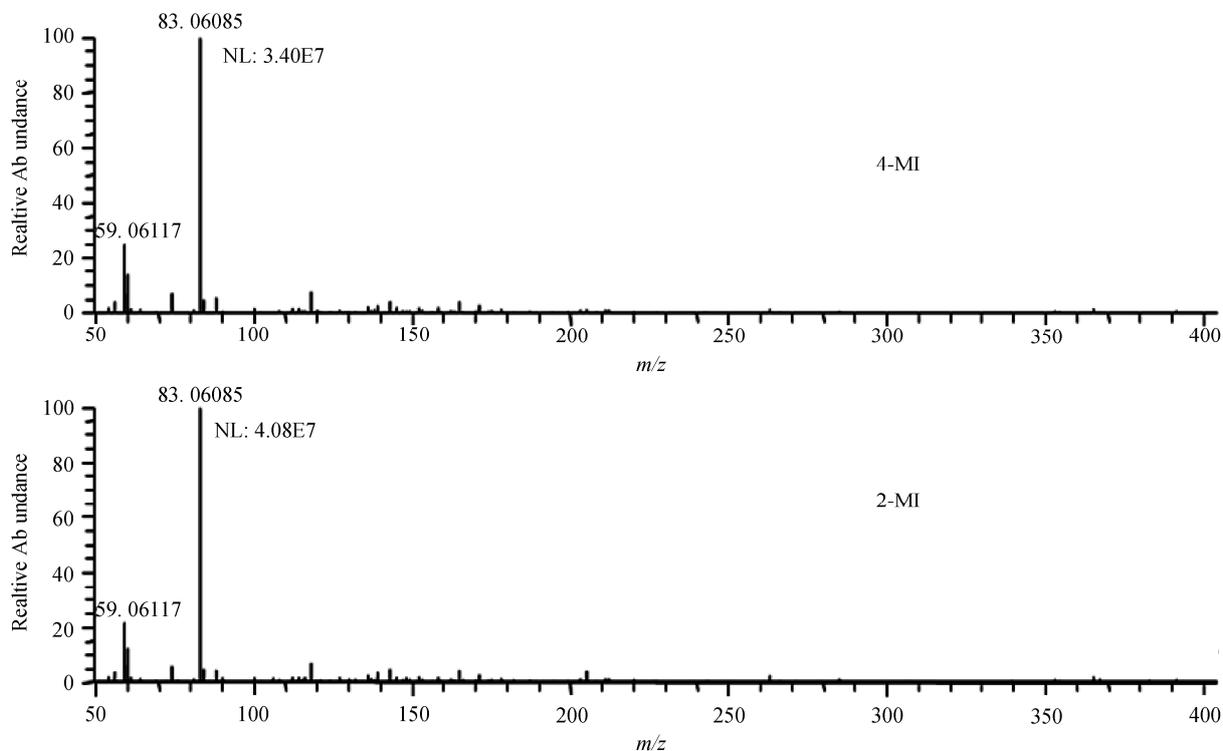


图 3 2-MI 和 4-MI 标准溶液的一级全扫描图  
Fig. 3 Full-scan accurate mass spectrum of 4-MI and 2-MI

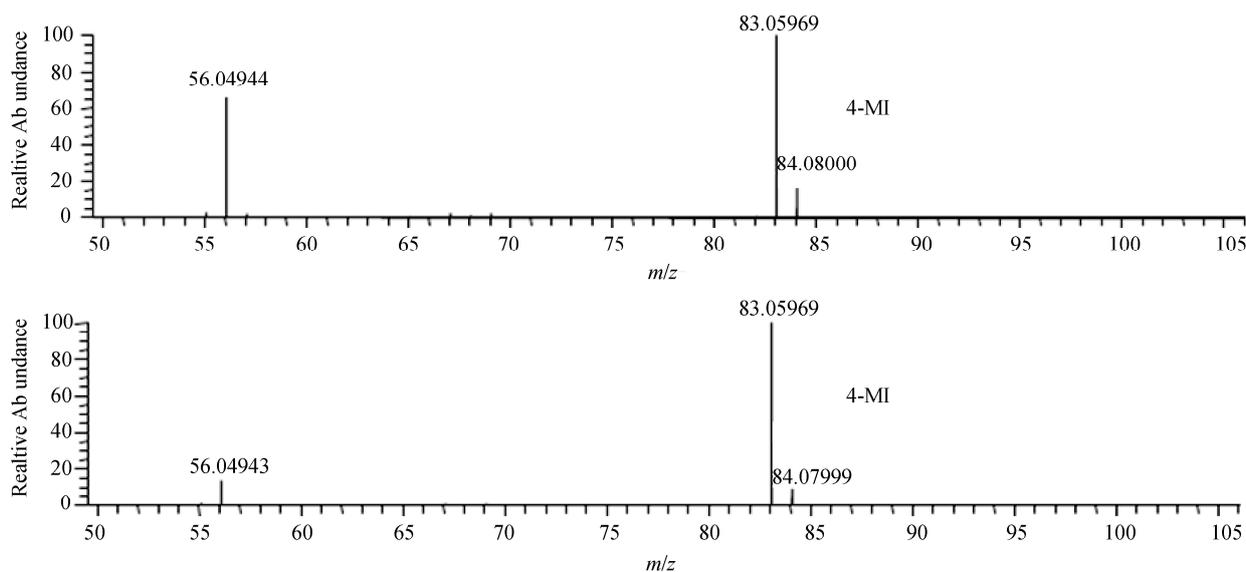


图 4 2-MI 和 4-MI 标准溶液的二级 CID 质谱图  
Fig. 4 CID mass spectrum of 4-MI and 2-MI

表 2 4-MI 和 2-MI 的线性方程、相关系数、保留时间、检出限和定量限  
 Table 2 Regression equations, correlation coefficients ( $r$ ), retention, limits of detection (LODs,  $n=7$ ) and limits of quantification (LOQs,  $n=7$ ) of the 4-MI and 2-MI compounds

分析物	线性方程	相关系数	保留时间/min	检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
4-MI	$y=-870106+6.13757e+0.06x$	0.9995	2.35	15	50
2-MI	$y=-782022+1.136e+0.07x$	0.9998	4.47	7.5	25

表 3 8 种不同种类蜂蜜样品中 4-MI 和 2-MI 的加标回收率( $n=5$ )  
 Table 3 Recoveries of 4-MI and 2-MI spiked in 8 different kinds of honey samples ( $n=5$ )

蜜种	添加水平/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	4-甲基咪唑		2-甲基咪唑	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
江苏油菜	50	92.1	5.5	90.9	6.1
	100	91.4	3.4	87.2	7.2
	150	86.4	6.3	92.1	1.6
河南荆条蜜	50	98.6	4.7	90.3	3.2
	100	86.4	8.4	79.2	8.6
	150	94.2	5.9	93.4	6.2
新疆葵花蜜	50	104.6	2.9	99.8	3.1
	100	73.2	9.5	80.1	6.9
	150	87.2	7.3	75.3	2.9
宁夏棉花蜜	50	93.6	4.2	94.8	7.7
	100	87.3	8.4	106.9	9.0
	150	79.8	2.1	98.3	7.0
吉林椴树蜜	50	89.5	5.5	89.7	5.0
	100	90.4	8.3	96.4	7.6
	150	77.5	2.0	90.2	9.2
陕西枣花蜜	50	91.7	3.9	92.0	4.1
	100	88.2	9.2	83.9	6.9
	150	83.6	4.3	88.5	3.4
山东洋槐蜜	50	107.9	4.7	105.2	5.3
	100	100.3	7.6	103.8	2.2
	150	89.5	9.2	100.4	1.4
内蒙荞麦蜜	50	83.7	5.3	88.2	4.7
	100	80.5	2.5	100.4	9.7
	150	82.4	3.0	98.9	6.9

### 3.5 实际蜂蜜样品中 4-MI 和 2-MI 的检测

本研究以国内外各地区 12 个蜜种 30 个蜂蜜样品为对象,按照“2.2.2”的样品前处理方法,采用优化后的 LC-MS/MS 条件定性和定量分析蜂蜜中是否加入

了焦糖色素,结果表明 4-MI 和 2-MI 均未检出。空白样品以及其中添加浓度为 10 ng/mL 的 4-MI 和 2-MI 时的选择离子流图如图 5 所示。可以看出空白基质对 4-MI 和 2-MI 的测定没有任何干扰。蜂蜜中

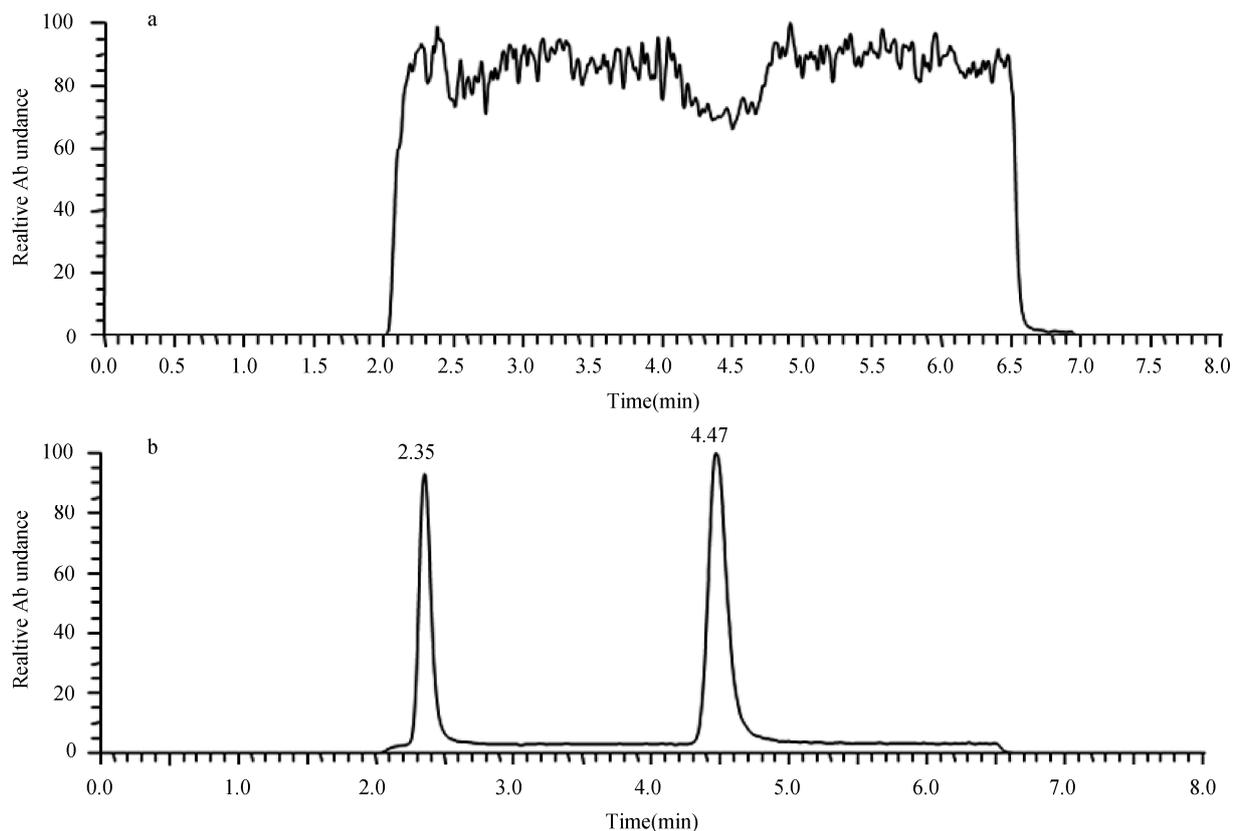


图 5 蜂蜜样品的提取离子流图(a)和样品中加 2-MI 和 4-MI 标准溶液的提取离子流图(b)

Fig. 5 Extracted ion chromatogram from a blank sample (a), and the direct 10 ng/ml 2-MI and 4-MI in a blank sample (b)

进行焦糖色素中 2-MI 和 4-MI 的研究还未见诸报道,然而,有文献<sup>[21]</sup>报道在可乐中的焦糖色素中检测到 2-MI 和 4-MI,该方法采用的是 LC/MS/MS 方法,检出限为 2  $\mu\text{g/L}$ 。而本研究采用的是 HRMS 检测方法,具有处理简单,一级质谱就可以定量的优点,检测限达 50  $\mu\text{g/kg}$ 。

#### 4 结 论

本文建立了高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨率质谱直接测定蜂蜜中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑含量的方法。样品经水稀释溶解后直接进样测定,避免了复杂的前处理过程,样品基质对目标化合物的测定基本无干扰。应用本方法可在 8 min 内完成整个检测分析过程,大大提高了检测效率。该方法具有一定的通用性,适用于大多数蜜种和蜜源的蜂蜜样品检测,且该方法具有操作简单、选择性高、灵敏度高、抗干扰性强、定量结果准确可靠等优点,能够满足蜂蜜中焦糖色素的分析要求,为蜂蜜掺假的监

控提供了技术支撑。为了进一步验证该方法对蜂蜜中掺入焦糖色素的鉴定能力,下一步工作中我们将考查不同比例的焦糖色素人为掺入蜂蜜中对蜂蜜色泽的影响及所建立方法的检测能力。

#### 参考文献

- [1] 王树清, 高崇, 朱石生. 高色率焦糖色素的合成新工艺[J]. 中国调味品, 2005, (3): 50-53.  
Wang SQ, Gao C, Zhu SS. The new technology of high rates for synthesis caramel color [J]. Chin Cond, 2005, (3): 50-53.
- [2] 李祥. 焦糖色素的生产工艺、性质及用途[J]. 中国调味品, 1997, 12: 2-4.  
Li X. The production technology, nature and purpose for caramel color [J]. Chin Cond, 1997, 12: 2-4.
- [3] 李国基, 耿予欢. 利用糖蜜生产焦糖色素的研究[J]. 甘蔗糖业, 2000, (5): 38-41.  
Li GJ, Geng YH. The investigation of processing cameral color based on molasses [J]. Sug Cane, 2000, (5): 38-41.
- [4] Bergstrom J. Factors affecting the formation of 4-methylimidazole in ammonia-treated fodder [J]. J Agric Food

- Chem, 1991, 39(8): 1422–1425
- [5] 赵俊平, 高丽华, 金伟伟, 等. 酱油中 4-甲基咪唑含量测定方法的研究[J]. 中国酿造, 2010, 7: 89–91.  
Zhao JP, Gao LH, Jin WW, *et al.* The determination method of 4-methylimidazole in soy sauce [J]. China Brew, 2010, 7: 89–91.
- [6] Buckee GK, Baile TP. Examination of some brewing materials and caramels for the possible occurrence of 4-methylimidazole [J]. J Inst Brew, 1978, 84(3): 158–159.
- [7] Fernandes JO, Ferreira MA. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5) methylimidazole in ammonia caramel color using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate [J]. J Chromatogr A, 1997, 786: 299–308.
- [8] Nishie K, Waiss AC, Keyl AC. Toxicity of methylimidazoles [J]. Toxicol Appl Pharm, 1969, 14(2): 301–307.
- [9] Sivertsen T, Nygaard AK, Mathisen G, *et al.* Effects of 4-methylimidazole on cerebral glutamate decarboxylase activity and specific GABA receptor binding in mice [J]. Toxicol Mech Method, 2009, 19(3): 214–218.
- [10] WHO Food Additives Series, World Health Organization, Geneva, 1976, 7: 35.
- [11] Lawrence JF, Charbonneau CF. Direct method for the determination of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole in caramel colours and beers by high-performance liquid chromatography with absorbance detection [J]. J Chromatogr, 1987, 407: 405–407.
- [12] Klejdus B, Moravkova J, Kuban V. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric method for separation of 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole at pg levels [J]. Anal Chim Acta, 2003, 477 (1): 49–58.
- [13] Moretton C, Crétier G, Nigay H, *et al.* Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography methods for quantification of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole in class III caramel colours [J]. J Chromatogr A, 2008, 1198–1199: 73–79.
- [14] 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 XQ, Feng W, Shi HY, *et al.* The determination simultaneously of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole of caramel color using gas chromatography [J]. Chin Cond, 2012, 37(8): 83–85.
- [15] Galiacy SD, Froment C, Mouton-Barbosa E, *et al.* Deeper in the human cornea proteome using nanoLC–Orbitrap MS/MS: An improvement for future studies on cornea homeostasis and pathophysiology [J]. J Proteomics, 2011, 75(1): 81–92.
- [16] Yang Y, Wang HJ, Yang J, *et al.* Chemical profiling and quantification of Chinese medicinal formula Huang-Lian-Jie-Du decoction, a systematic quality control strategy using ultra high performance liquid chromatography combined with hybrid quadrupole-orbitrap and triple quadrupole mass spectrometers [J]. J Chromatogr A, 2013, 1321: 88–99.
- [17] Self RL, Wu WH. Determination of eight biogenic amines in selected seafood products by MSPD extraction followed by UHPLC–Orbitrap MS [J]. J Food Compos Anal, 2012, 27 (2): 169–173.
- [18] Glauser G, Veyrat N, Rochat B. Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers [J]. J Chromatogr A, 2013, 1292: 151–159.
- [19] Casal S, Fernandes JO, Oliveira MBPP, *et al.* Gas chromatographic–mass spectrometric quantification of 4-(5)-methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction [J]. J Chromatogr A, 2002, 976 (1–2): 285–291.
- [20] Thomsen M, Willumsen D. Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reversed-phase ion-pair liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 1981, 211 (2): 213–221.
- [21] Claudia S, Mariya M, Julia S, *et al.* Determination of 2-methylimidazole, 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole in caramel colours and cola using LC/MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2013, 927 (1): 223–226.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



刘芸, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品掺假。  
E-mail: liuy4@jsciq.gov.cn