

超高效液相色谱法测定米豆腐中偶氮甲酰胺含量

雷德卿*

(湖南省株洲市食品药品检验所, 株洲 412008)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱法测定米豆腐中偶氮甲酰胺含量。**方法** 使用超高效液相色谱法进行测定, 色谱条件为: 色谱柱: Waters C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 流动相: 水-甲醇(90:10, V:V), 流速: 0.3 mL/min, 检测波长: 275 nm, 柱温: 30 ℃。**结果** 偶氮甲酰胺的色谱峰形对称, 并能与其他物质完全分离; 在 14.98~149.8 ng 范围内线性关系良好, 相关系数 $r=0.9991(n=6)$; 方法检出限为 0.5 μg/g, 方法定量限为 1.6 μg/g, 平均加标回收率为 98.0%, 相对标准偏差 3.5% ($n=3$)。**结论** 该方法前处理简单、快速, 定量准确, 灵敏度高, 可用于检测米豆腐中偶氮甲酰胺含量。

关键词: 米豆腐; 偶氮甲酰胺; 超高效液相色谱

Determination of azodicarbonamide in rice Doufu by ultra performance liquid chromatography

LEI De-Qing*

(Zhuzhou Institute for Food and Drug Control of Hunan Province, Zhuzhou 412008, China)

ABSTRACT: Objective To establish the method for determination of azodicarbonamide in rice Doufu by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** UPLC was used for determination, and the chromatographic conditions were as follows: analytical column was Waters C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of water-methanol (90:10, V:V), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelength was 275nm, and column temperature was 30 ℃. **Results** The chromatography peak of azodicarbonamide was symmetry and completely separated from the other ingredients, and it showed a good linear relationship in the range of 14.98~149.8 ng, with correlation coefficient (r) of 0.9991 ($n=6$). The limit of detection (LOD) was 0.5 μg/g, and the limit of quantitation (LOQ) was 1.6 μg/g. The average recovery was 98.0% with RSD of 3.5% ($n=3$). **Conclusions** The established method is simple, rapid, accurate and sensitive, which can be used for the determination of azodicarbonamide in rice Doufu.

KEY WORDS: rice Doufu; azodicarbonamide; ultra performance liquid chromatography

1 引言

偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADA)是一种白色或淡黄色粉末, 在工业中常用作发泡剂, 可用于瑜伽垫、橡胶鞋底等生产, 以增加产品的弹性, 也用于食品工业, 增加

食品的强度和柔韧性^[1]。偶氮甲酰胺能诱导哮喘及其他呼吸道症状的发生; 降解产物氨基脲对心脏、肝脏和肾脏有一定的损伤作用, 有致癌、致畸作用, 对雄性小鼠有致不育作用^[2-4]。GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》仅允许小麦粉可以添加偶氮甲酰胺^[5], 最大

*通讯作者: 雷德卿, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。E-mail: 53829816@qq.com

*Corresponding author: LEI De-Qing, Associate Chief Pharmacist, Zhuzhou Institute for Food and Drug Control of Hunan Province, No.42 culture lane, Zhuzhou 412008, China. E-mail: 53829816@qq.com

使用量为 0.045 g/kg。米豆腐是川、湘、黔、鄂地区著名的地方小吃, 润滑鲜嫩、清新舒爽, 深受人们喜爱。一些生产商在米豆腐中添加偶氮甲酰胺, 可以增加米豆腐的韧性, 便于保存和提高口感。我国目前没有米豆腐的检验标准, 也没有相关文献资料。为加强米豆腐质量控制, 保障食品安全, 急需建立米豆腐的质量标准。参考关于偶氮甲酰胺检测的研究文献^[6-16], 对米豆腐中偶氮甲酰胺的提取和检验方法进行研究, 为米豆腐的监督检验提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪, 配 DAD 检测器、自动进样器(美国安捷伦公司); MS205DU 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产)。

甲醇(色谱纯, 批号 150615, 国药集团), 超纯水, 二甲基亚砷(分析纯, 201601003, 湖南汇虹试剂有限公司)。偶氮甲酰胺对照品(纯度为 99.0%, 美国 Sigma 公司)。米豆腐样品从市场上购买, 共 31 批, 分别编号为 1 号至 31 号。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 流动相: 水-甲醇(90: 10, *V/V*), 流速: 0.3 mL/min, 检测波长: 275 nm, 柱温: 30 °C, 进样量: 3 μL。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取偶氮甲酰胺对照品 0.02522 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加 30%二甲亚砷溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量取贮备液 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 30%二甲亚砷溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.4 样品溶液的制备

取经筛查含偶氮甲酰胺的样品适量粉碎, 混匀, 取约 10 g, 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 加 30%二甲亚砷溶液 30 mL, 漩涡混旋 1 min, 50 °C 水浴 30 min, 离心, 取上清液。残渣加 30%二甲亚砷溶液 20 mL, 漩涡混旋 1 min, 离心, 取上清液, 重复上述操作一次。合并上清液, 水浴蒸至近干, 用 30%二甲亚砷溶液溶解并定容至 20 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.5 阴性对照溶液的制备

取经筛查不含偶氮甲酰胺的样品, 按样品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.6 线性与范围

精密量取上述贮备液 0.5、1、2、3、4、5 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 加 30%二甲亚砷溶液稀释至刻度, 摇

匀。分别精密吸取 3 μL 注入液相色谱仪, 各进样 2 次, 测定峰面积, 以偶氮甲酰胺浓度为横坐标, 相应峰面积平均值为纵坐标绘制标准曲线。

2.7 精密度试验

取同一份偶氮甲酰胺对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算精密度。

2.8 稳定性试验

分别精密吸取同一样品溶液 3 μL, 于 0、6、12、24、36 h 各进样 2 次, 以峰面积平均值计算 RSD。

2.9 检出限与定量限

取经检测不含偶氮甲酰胺的样品约 10 g, 精密称定, 精密加入 5.044 μg/mL 的偶氮甲酰胺对照品溶液 2 mL, 精密吸取 3 μL, 注入液相色谱仪, 测定信噪比(*S/N*)。按 *S/N*=3 计算方法检出限, 按 *S/N*=10 计算方法定量限。

2.10 回收率试验

精密称取已知含量的供试品适量(含量为 0.036 mg/g)9 份, 分别置 50 mL 离心管中, 精密加入偶氮甲酰胺对照品贮备液 0.2、0.25、0.3 mL 各 3 份。同 2.4 项操作, 按上述色谱条件测定偶氮甲酰胺的含量。

2.11 样品测定

取市场购买的 31 批米豆腐样品, 照上述样品溶液制备方法和色谱条件, 测定样品中氮甲酰胺。

3 结果与分析

3.1 专属性

取对照品、阳性样品及阴性样品溶液, 进样, 结果样品中其他成分对偶氮甲酰胺无干扰, 阴性样品在目标峰附近没有干扰成分(见图 1), 专属性好。

3.2 线性与范围

得回归方程: $Y=2.4015X+1.8170$, $r=0.9991$ ($n=6$)。偶氮甲酰胺在 14.98~149.8 ng 范围内线性关系良好。

3.3 精密度试验

取同一份偶氮甲酰胺对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, RSD% 为 0.4%($n=6$)。

3.4 稳定性试验

以峰面积平均值计算 RSD 为 0.6%, 结果表明样品溶液中待测成分在 36 h 内稳定。

3.5 检出限与定量限

按 *S/N*=3 计算方法检出限, 按 *S/N*=10 计算方法定量限, 结果方法检出限为 0.5 μg/g, 方法定量限为 1.6 μg/g。

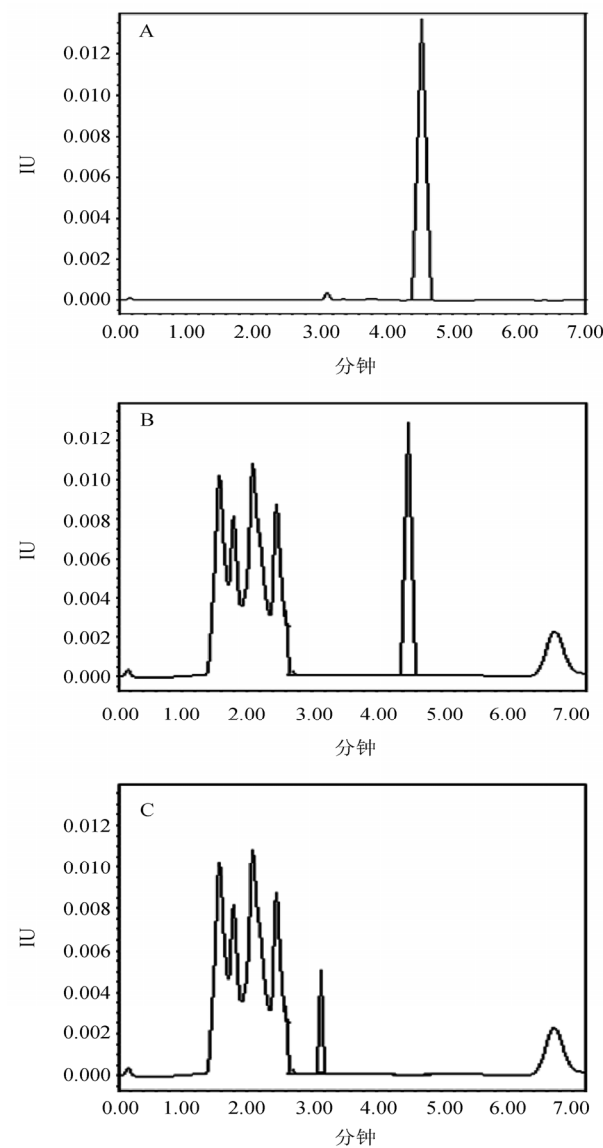


图 1 偶氮甲酰胺对照品(A)、样品溶液(B)和阴性对照(C)色谱图
Fig. 1 Chromatograms of azodicarbonamide reference substance (A), rice Doufu (B) and blank (C)

3.6 回收率试验

计算偶氮甲酰胺的平均回收率为 98.0%, RSD 为 3.5%(见表 1)。

3.7 样品测定

结果 26 批样品未检出, 5 号、14 号、15 号、27 号、30 号等 5 批样品检出偶氮甲酰胺(见表 2)。

4 结论与讨论

4.1 提取方法优化

偶氮甲酰胺能溶于碱、热水、二甲亚砜, 不溶于大多数有机溶剂和冷水。二甲亚砜黏稠性大, 加入样品中成糊状, 难以分离。用水和乙腈提取样品中偶氮甲酰胺, 回收率较高, 但干扰成分较多, 目标峰容易受到干扰。用丙酮超声提取, 再用氮气吹干, 回收率较高, 干扰成分也较少, 但氮吹过程较麻烦, 操作繁琐。选用不同浓度二甲亚砜水溶液提取米豆腐中偶氮甲酰胺, 考察回收率。结果显示 30%二甲亚砜较易与样品分离, 回收率高, 提取效果好, 且操作简单。

4.2 检测方法的进一步研究

UPLC 法简单、方便, 在上述色谱条件下, 偶氮甲酰胺出峰时间约为 4.5 min, 时间快, 峰形良好, 与其他成分分离完全, 可用于该产品质量控制。检出偶氮甲酰胺的 5 批样品, 保留时间和光谱指数图均与对照品一致, 经液相色谱-质谱初步筛查, 其中 4 批其一级质谱及二级质谱图均与对照品一致, 可以确认添加了偶氮甲酰胺; 1 批(15 号样)一级质谱图及二级质谱图与对照品不一致, 说明液相色谱定性存在假阳性结果, 值得进一步研究优化液相色谱-质谱联用法检测米豆腐中偶氮甲酰胺。

该方法前处理简单、快速, 定量准确, 灵敏度高, 可用于检测米豆腐中偶氮甲酰胺含量。

表 1 回收率试验结果 (n=3)
Table 1 Results of recovery tests (n=3)

编号	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	4.0827	0.1470	0.1997	0.3380	95.6		
2	3.9839	0.1434	0.1997	0.3369	96.9		
3	3.8533	0.1387	0.1997	0.3461	103.9		
4	4.9665	0.1788	0.2497	0.4246	98.4		
5	4.8921	0.1761	0.2497	0.4096	93.5	98.0	3.5
6	5.1036	0.1837	0.2497	0.4201	94.7		
7	6.2203	0.2239	0.2996	0.5156	97.4		
8	6.1018	0.2197	0.2996	0.5260	102.2		
9	6.0032	0.2161	0.2996	0.5136	99.3		

表 2 样品偶氮甲酰胺含量
Table 2 The content of azodicarbonamide in samples

编号	5	14	15	27	30
含量(mg/g)	0.036	0.015	0.0075	0.031	0.017

参考文献

[1] 王远成, 任凌云, 周晓邑, 等. 偶氮甲酰胺对面粉粉质及面包质量的影响[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(1): 7-9.
Wang YC, Ren LY, Zhou XY, *et al.* Effects of azodicarbonamide on the quality of flour and bread [J]. J China Cere Oils Ass, 2001, 16(4): 7-9

[2] 谢洁, 彭涛, 刘彩虹, 等. 面包中偶氮甲酰胺及其降解产物的风险分析[J]. 检验检疫学刊, 2014, 24(4): 62-66.
Xie J, Peng T, Liu CH, *et al.* Risk analysis of azoformamide and its degradation products in bread [J]. Inspect Quarant Sci, 2014, 24(4): 62-66.

[3] Vlastos D, Moshou H, Epeoglou K. Evaluation of genotoxic effects of semicarbazide on cultured human lymphocytes and rat bone marrow [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 209-214.

[4] Ye J, Wang XH, Sang YX, *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.

[5] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 Food safety national standard food-Standard for use of additives [S].

[6] 张伟, 张利锋, 苏永恒, 等. 面粉及面粉制品中偶氮甲酰胺检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(13): 2254-2256.
Zhang W, Zhang LF, Su YH, *et al.* Research progress in the determination technology of azodiamide in flour and flour products [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(13): 2254-2256.

[7] 林滢, 黄建立, 张青龄, 等. 小麦粉中偶氮甲酰胺应用及检测技术研究进展[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(2): 15-18.
Lin H, Huan JL, Zhang QL, *et al.* Research on application and determination methods of azodiamide in flour [J]. Grain Oil, 2016, 29(2): 15-18.

[8] 樊继鹏, 杨天宇, 徐振东, 等. 面粉中偶氮甲酰胺高效液相色谱测定方法的优化[J]. 粮食科技与经济, 2014, 39(6): 36-37.
Fan JP, Yang TY, Xu ZD, *et al.* Optimization of high performance liquid chromatographic method for the determination of azodiamide in flour [J]. Grain Sci Technol Econ, 2014, 39(6): 36-37.

[9] 宋书锋, 王丹, 刘卿, 等. 面粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱测定方法的优化[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5): 448-451.
Song SF, Wang D, Liu Q, *et al.* Optimization of the determination of azodiamide in flour by HPLC [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(5):

448-451.

[10] 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.
Zhou YB, Huang F, Zhu ZX, *et al.* High performance liquid chromatography (HPLC) was used for determination of azolamide in wheat flour [J]. Food Res Dev, 2010, 31(4): 102-105.

[11] 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]. 食品安全与检测, 2015, 40(6): 355-359.
Zhang QL, Huang JL, Lin YY, *et al.* A method for determination of azolamide in wheat flour [J]. Food Saf Test, 2015, 40(6): 355-359.

[12] 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, 26(7): 167-171.
Lin CH, Li Y, Chen JF, *et al.* Determination of azodiamide in wheat flour and its products [J]. China Food Addit, 2015, 26(7): 167-171.

[13] 周芳梅. 衍生-超高效液相色谱串联质谱法测定面包糕点中的偶氮二甲酰胺[J]. 中国食品添加剂, 2015, 26(2): 179-185.
Zhou FM. The derivation-super high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC) was used to determine the azodiamide in the bread pastry [J]. China Food Addit, 2015, 26(2): 179-185.

[14] 弓耀忠, 巩强, 张烨, 等. 高效液相色谱法检测小麦粉中偶氮甲酰胺方法的研究[J]. 现代仪器, 2010, 16(2): 65-67.
Gong YZ, Gong Q, Zhang Y, *et al.* High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the azodiamide method in wheat flour [J]. Mod Instrum, 2010, 16(2): 65-67.

[15] 阮莎莎, 刘桂华, 朱舟, 等. 高效液相色谱法检测面粉及面制品中的偶氮甲酰胺[J]. 华南预防医学, 2017, 43(1): 78-82.
Ruan SS, Liu GH, Zhu Z, *et al.* Determination of azodiamide in flour and flour products by HPLC [J]. South China J Prev Med, 2017, 43(1): 78-82.

[16] 周启明, 向露, 王俊苏, 等. 液相色谱串联质谱研究面粉及其制品中偶氮甲酰胺降解规律及氨基脲污染水平[J]. 分析试验室, 2014, 33(7): 782-786.
Zhou QM, Xiang L, Wang JS, *et al.* Study on the degradation law of azodiamide and urea pollution level in wheat flour and its products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(7): 782-786.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



雷德卿, 副主任药师, 主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。
E-mail: 53829816@qq.com