

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000146

高效液相色谱法测定面粉中偶氮甲酰胺的含量

向 露¹, 易廷辉², 王 雅¹, 王俊苏³, 彭 涛⁴, 王国民³, 母昭德¹

(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市农业委员会农业环境监测站, 重庆 401121; 3. 重庆出入境检验检疫局、进出口食品安全工程技术研究中心, 重庆 400020; 4. 中国检验检疫科学研究院农产品安全中心, 北京 100123)

【摘要】目的:建立面粉中偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADC)的高效液相色谱检测方法。**方法:**样品经丙酮提取, 正己烷脱脂, 进入高效液相色谱后采用 Eclipse XDB-CN 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)进行分离, 以乙腈-20 mmol/L 乙酸铵为流动相进行梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测波长为 245 nm。**结果:**ADC 在 1.0~90.0 mg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数(r)大于 0.99, 定量限为 5 mg/kg($S/N \geq 10$), 在 5.0、10.0、45.0 mg/kg 3 个添加水平下回收率在 68.6%~116.9%之间, 相对标准偏差均小于 7.0 %。**结论:**建立的面粉中 ADC 液相色谱方法简单快捷, 准确可靠, 适用于面粉中 ADC 的测定。

【关键词】偶氮甲酰胺; 面粉; 高效液相色谱法; 测定**【中图分类号】**O657.7+2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-11

Determination of azodicarbonamide in flour by high performance liquid chromatography

Xiang Lu¹, Yi Tinghui², Wang Ya¹, Wang Junsu³, Peng Tao⁴, Wang Guomin³, Mu Zhaode¹

(1. Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Chongqing City Agricultural Environmental Monitoring Station, Chongqing Agriculture Committee; 3. Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing Engineering Technology Research Center for Import and Export Food Safety; 4. Agro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine)

【Abstract】Objective: To develop an analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of azodicarbonamide (ADC) in flour. **Methods:** Samples were extracted with acetone, degreased with *n*-hexane, then separated with a agilent Eclipse XDB-CN column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-ammonium acetate (20 mmol/L) as mobile phase with a gradient elution program and were detected with diode array detector with the wavelength of 245 nm.

作者介绍: 向 露, Email: xianglu51@163.com, 研究方向: 药物分析。

通信作者: 母昭德, Email: mzd2008@tom.com。

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划资助项目(编号: 2012BAD33B02、2012BAK08B01); 国家质检公益行业科研专项基金资助项目(编号: 201210016、201210086)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000146.html>

- [7] Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(s5): S344-S349.
- [8] Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, et al. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(10): 5510-5515.
- [9] Corrigan RM, Mijalovic H, Foster TJ. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells [J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 22.
- [10] Cheng AG, Kim HK, Burts ML, et al. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues [J]. FASEB J, 2009, 23(10): 3393-3404.
- [11] Sharp JA, Echague CG, Hair PS, et al. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38407.
- [12] O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, et al. Multiple mechanisms for

- the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A [J]. Mol Microbiol, 2002, 44(4): 1033-1044.
- [13] 张阳丽, 汪德强. 人 α1 微球蛋白的克隆、表达、纯化及生物学活性鉴定 [J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(5): 445-448.
- [14] Broker BM, van Belkum A. Immune proteomics of *Staphylococcus aureus* [J]. Proteomics, 2011, 11(15): 3221-3231.
- [15] Zhang LQ, Xiang H, Gao JL, et al. Purification, characterization, and crystallization of the adhesive domain of SdrD from *Staphylococcus aureus* [J]. Protein Expr Purif, 2010, 69(2): 204-208.
- [16] Xiang H, Gao FF, Wang DC, et al. Characterization, crystallization and preliminary X-ray analysis of the adhesive domain of SdrE from *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010, 66(Pt 7): 858-861.

(责任编辑: 冉明会)

nm. **Results**: ADC had a good linear relationship within the range of 1.0–90.0 mg/kg; the correlation coefficient was higher than 0.99 and the limit of quantification ($S/N \geq 10$) was 5.0 mg/kg. Average recoveries of ADC at spiking levels of 5.0, 10.0, 45.0 mg/kg were ranged from 68.6% to 116.9% and relative standard deviations were less than 7.0%. **Conclusions**: The method developed is simple, rapid, accurate and reliable; it can be used for the determination of ADC in flour.

【Key words】azodicarbonamide; flour; high performance liquid chromatography; determination

偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADC), 分子式为 $C_2H_4O_2N_4$, 又名偶氮二甲酰胺, 早期是一种用于生产聚乙烯材料的发泡剂, 具有漂白、氧化和明显强化面筋作用以及高效、价廉等优点, 在美国、加拿大、中国等国家, 替代溴酸钾作面团性能改进剂和增白剂^[1-3]。

研究表明, ADC 作为面粉添加剂存在较大的食品安全隐患。早在 2003 年, 欧洲食品安全局发布的风险评估报告中称: 生产金属盖用塑料垫片的发泡剂 ADC, 会在金属盖高温处理的过程中产生氨基脒这种致癌物质残留于食品中^[4-5]。ADC 在面粉类食品加工过程中经过湿热处理, 同样会降解生成氨基脒残留于面粉制品中, 会对人体产生危害^[6-7]。因此, 欧盟、澳大利亚、新加坡等地区和国家禁止将 ADC 作为食品添加剂用于面粉的加工。虽然我国 GB 2760–2011《食品添加剂使用卫生标准》规定小麦粉中 ADC 最大使用量为 45 mg/kg^[8], 但至今还没有制定相应的检测标准。

目前, 面粉中 ADC 的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9-11]。ADC 为极性较强的物质且溶解性较差, 前处理过程中甲醇、乙腈等有机溶剂均难以提取, 很难选取一种合适的有机溶剂既能增加其提取效率, 又不干扰 HPLC 法的测定。本文采用固体标准品添加, 丙酮提取, 基质回收曲线定量的方法, 解决了 ADC 因提取效果差而导致回收率低的问题。该方法简便快速, 测定结果准确可靠, 并具有良好的精密度和较宽的线性范围, 适用于日常面粉中 ADC 的含量监控。

1 材料与方法

1.1 研究材料

空白面粉购自重庆市小麦粉加工作坊, 测定样品购自重庆市各个超市和粮油市场。

1.2 主要试剂和仪器

ADC 标准品购自美国 Sigma 公司, 丙酮、乙腈(色谱纯)均购自美国 TEDIA 公司, 乙酸铵(分析纯)购自成都市科龙化工试剂厂, 实验用水为超纯水。

UFLC XR 液相色谱系统包括 LC-20AD 输液泵, SIL-20AC 自动进样器, SPD-M20A 紫外检测器, CTO-20AC 恒温箱(日本岛津公司), 4011 Digital 旋转蒸发器(德国 Heidolph 公司), XH-B 型振荡器(江苏康健医疗用品有限公司), 3-30K 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), N-EVAP 116 氮气吹干仪(美国 Organomation Associates 公司), Sartorius BS224S (天平赛多利斯科学仪器有限公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 标准溶液的配制 准确称取 ADC 标准品 10 mg(精确至 0.01 mg), 用乙腈-水($v/v=7:3$)制备成质量浓度为 100 mg/L 的 ADC 标准储备液, 常温保存。根据需要用乙腈-水($v/v=7:3$)稀释成适当浓度的标准工作液。

1.3.2 加标面粉的制备 准确称取 ADC 标准品 9 mg(精确至 0.01 mg)和空白面粉 100 g(精确至 0.01 g)于烧杯中, 用玻璃棒将面粉与标准品充分搅动 2.0 h 直至混匀, 制成浓度为 90.0 mg/kg 的加标面粉。采用空白面粉逐级稀释的方法, 得到浓度为 45.0、20.0、10.0、5.0、1.0 mg/kg 的加标面粉。

1.3.3 样品前处理 称取 2.00 g 样品于 50 ml 具塞离心管中, 10 ml 丙酮超声振荡提取 2 次, 每次 20 min, 7 500 r/min, 10 ℃冷冻离心 5 min, 合并提取液, 于 40 ℃氮吹至干。残渣用 1 ml 乙腈水($v/v=7:3$)定容, 涡旋振荡 1 min 后, 超声 5 min 溶解, 1 ml 乙腈饱和的正己烷脱脂。3 000 r/min 离心 2 min, 1 ml 下层溶液过有机系微孔滤膜(0.22 μm)后, 供 HPLC 分析。

1.3.4 色谱条件 色谱柱: Eclipse XDB-CN 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 流速: 0.5 ml/min; 检测波长 245 nm; 进样量: 10 μl 。流动相: 20 mmol/L 乙酸铵(A); 乙腈(B), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution program

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
10	85	15
10.01	98	2
12	98	2

2 结果

2.1 专属性考察

在选定液相条件下,ADC 能够达到基线分离,峰型较好,分离度 R 均大于 1.5,分离时间为 12 min。空白基质中无干扰杂质。色谱图见图 1。

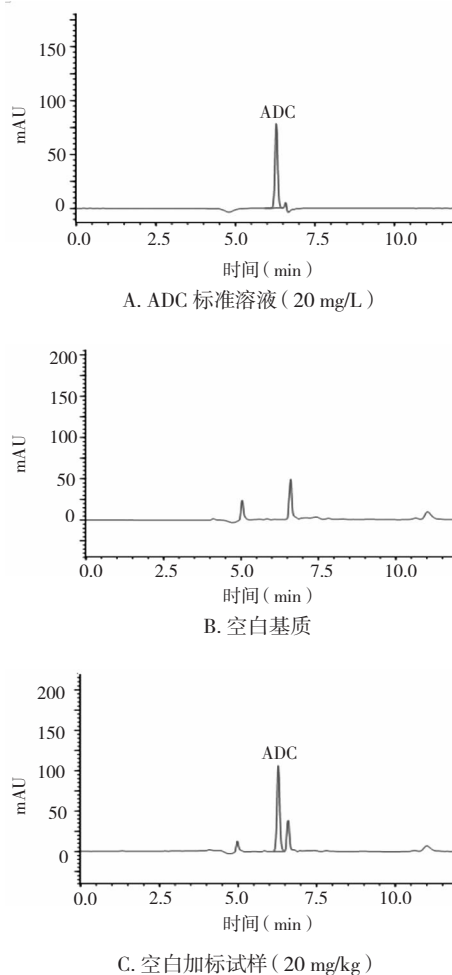


图 1 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms

2.2 基质回收标准曲线

准确称取 1、5、10、20、45、90 mg/kg 加标面粉 2.00 g,按照 1.3 的方法进行提取净化、进样分析,以质量浓度(x ,mg/kg)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标绘制基质回收标准曲线。ADC 在 1.0~90.0 mg/kg 范围内线性关系良好,所得回归方程为 $y=22\ 219x+109\ 009$ ($r^2=0.997\ 8$)。

2.3 定量限考察

分别称取 2.00 g 加标面粉试样共 6 份,ADC 添加浓度为 5.0 mg/kg。按照 1.2 项下方法进行提取净化、进样分析,计算信噪比。结果表明,ADC 的信噪比均为 10,因此将 ADC 的定量限定为 5.0 mg/kg。

2.4 回收率和精密度

采用空白面粉进行添加回收和精密度实验,添加水平为

5.0、10.0、45.0 mg/kg,每个添加水平分析 6 次,回收率和精密度(相对标准偏差)结果见表 2。ADC 的回收率为 68.6%~116.9% 之间,相对标准偏差均小于 7.0%,方法有较好的准确度和精密度。

表 2 ADC 的回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

Tab.2 Recoveries and RSDs of ADC ($n=6$)

添加浓度 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
5.0	3.58	71.6	4.5
	3.89	77.8	
	3.43	68.6	
	3.76	75.2	
	3.75	75.0	
	3.58	71.6	
10.0	7.65	76.5	7.0
	8.85	88.5	
	7.68	76.8	
	7.29	72.9	
	7.89	78.9	
	7.48	74.8	
45.0	44.90	99.8	5.5
	52.61	116.9	
	51.25	113.9	
	49.69	110.4	
	51.94	115.4	
	50.45	112.1	

2.5 样品测定

随机抽取各超市和粮油市场的 20 批面粉样品进行检测,其中在 5 批样品中检出 ADC,其含量在 5.8~37.0 mg/kg 之间,都没有超过最大限量 45 mg/kg;其余 15 批样品中的 ADC 均未检出。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 液相色谱柱的选择 根据 ADC 的极性性质及参考文献[9-11],对 SB-C18 柱、AQ-C18 亲水柱、氰基柱等进行了考察。结果表明,ADC 在 SB-C18 柱和 AQ-C18 亲水柱上几乎没有保留,尝试加入庚烷磺酸钠、十二烷基磺酸钠等离子对试剂,保留时间始终在 2~3 min 之间,都没有能够改善其保留性质从而推迟出峰时间。氨基柱和氰基柱属于中等极性的色谱分离柱,适用于 ADC 的分离。对比 2 种柱子,氰基柱分离效果更好,其保留时间为 6 min 左右,满足分析需要。

3.1.2 流动相的选择 本实验对乙腈-水、乙腈-乙酸铵流动相体系进行了考察。结果表明,以乙腈-水

为流动相时,虽然标准溶液能够出峰,但进行添加回收试验时,调节流动相比列或者进行梯度洗脱,与空白对照相比,目标峰都无法与杂质峰分开,严重干扰测定。而以乙腈-乙酸铵为流动相时,不仅能够使标准溶液能够在合适的时间出峰,且对梯度洗脱程序进行了选择和优化。结果表明,梯度洗脱程序为 0~10 min,2%~15%B;10.01~12 min,2%B 时,ADC 的色谱峰峰型对称且与基质中的杂质能够较好的分离。因此,本实验采用乙腈-乙酸铵(20 mmol/L)进行梯度洗脱。

3.2 前处理条件的优化

3.2.1 提取溶剂的选择 ADC 的极性较强,不溶于水、醇,微溶于丙酮、乙腈,易溶于二甲基亚砜和 N,N-二甲基甲酰胺。本实验考察了二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺,丙酮和乙腈作为提取溶剂的提取效果。结果表明,虽然二甲基亚砜和 N,N-二甲基甲酰胺对 ADA 溶解效果较好,但是,一方面这 2 种溶剂沸点较高,难以进行浓缩,另一方面,由于溶剂紫外吸收较强且出峰时间与 ADC 的保留时间相近,会严重干扰目标物质的测定;采用乙腈提取时,ADC 的回收率较低(<60%),不能满足测定需要;丙酮对 ADC 的提取效率较高,平均回收率为 89.2%。因此,本实验选择丙酮为提取溶剂。

3.2.2 提取方式的选择 本实验考察了涡旋提取、振荡提取和超声提取 3 种提取方式的提取效果。结果表明,涡旋提取方式下 ADC 的提取效率较低,而振荡和超声均能提高提取效率,因此本实验采用先超声,再振荡的提取方式进行提取,以提高提取效率。

3.3 基质回收标准曲线的制备

ADC 溶解性较差,标准溶液配制都较为困难。本实验采用丙酮为提取溶剂,仍然提取效果不佳。在回收率试验中,采用标准溶液添加时,ADC 的提取效果很差,平均回收率仅为 20.6%;若采用 ADC 固体标准品添加,且采用基质回收标准曲线定量时,平均回收率为 87.6%。基质回收标准曲线是将一系列浓度标准品添加于基质中,进行前处理步骤后,进样分析所得的标准曲线。参照文献[12],本实验利用基

质回收标准曲线定量,能够排除基质的干扰,从而有效的提高回收率,解决了 ADC 因溶解性限制而导致提取回收率较低的问题。

本文建立了面粉中 ADC 的 HPLC 测定方法。该方法采用基质回收标准曲线定量,解决了 ADC 回收率较低的问题;采用梯度洗脱,有效分离了杂质与目标物质。结果表明,该方法线性关系良好,回收率较高,精密度高,前处理方法简单,可用于面粉中 ADC 的测定。

参 考 文 献

- [1] 王远成,任凌云,张鹏涛.偶氮甲酰胺对面粉质及包装质量的影响[J].中国粮油学报,2001,16(1):32-35.
- [2] 李 晔,李晓光.偶氮甲酰胺在高筋面粉中的应用研究[J].粮食与油脂,2003(5):6-8.
- [3] 侯元英.偶氮甲酰胺-溴酸钾的替代物[J].青海科技,2007(2):54-55.
- [4] Gassin AL.European food safety authority document[C/OL]//Advice of the ad hoc expert group set up to advise the EFSA on the possible occurrence of semicarbazide in packaged foods-28 July 2003,Brussels, 2003[2013-3-26]http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc_documents/catindex_en.html.
- [5] Stadler RH,Mottier P,Guy P,et al.Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars[J].Analyst,2004,129(3):276-281.
- [6] Becalski A,Lau BP,Lewis D,et al.Semicarbazide formation in azodicarbonamide-treated flour:model study[J].J Agric Food Chem,2004,52(18):5730-5734.
- [7] Noonan GO,Begley TH,Diachenko GW.Semicarbazide formation in flour and bread[J].J Agric Food Chem,2008,56(6):2064-2067.
- [8] 中华人民共和国卫生部.中国国家标准化管理委员会.GB/T 2760-2011.食品添加剂使用卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [9] 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):102-104.
- [10] 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.
- [11] 陈 颖,祁广建,王 熠,等.HPLC 法测定面粉及其制品中偶氮甲酰胺的含量[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):274-275.
- [12] 王俊苏,郝存显,陈冬东,等.HPLC 法检测降糖保健食品中的双胍类药物[J].中国药房,2013,24(1):68-71.

(责任编辑:冉明会)