



中华人民共和国国家标准

GB 5009.283—2021

食品安全国家标准

食品中偶氮甲酰胺的测定

2021-09-07 发布

2022-03-07 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国 家 市 场 监 督 管 理 总 局 发 布

食品安全国家标准

食品中偶氮甲酰胺的测定

1 范围

本标准规定了食品中偶氮甲酰胺的液相色谱测定方法。

本标准适用于小麦粉中偶氮甲酰胺的测定。

2 原理

试样用 *N,N*-二甲基甲酰胺溶液提取,离心,用三苯基膦衍生,衍生液经液相色谱测定,外标法定量。

3 试剂和材料

警示——三苯基膦和 *N,N*-二甲基甲酰胺操作时应避免接触皮肤和眼睛,在通风环境中操作。

除非另有说明,本方法所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH_4O) : 色谱纯。

3.1.2 *N,N*-二甲基甲酰胺($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$)。

3.1.3 无水硫酸镁(MgSO_4)。

3.1.4 三苯基膦($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{P}$)。

3.2 试剂配制

三苯基膦衍生溶液:准确称取三苯基膦 100 mg,用 *N,N*-二甲基甲酰胺溶解并定容至 10 mL,配制成浓度为 10.0 mg/mL 的衍生溶液,存放于避光处备用。临用前配制。

3.3 标准品

偶氮甲酰胺标准品($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$, CAS:123-77-3),纯度>97%。或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备溶液:准确称取偶氮甲酰胺标准品 50 mg(精确至 0.1 mg),用 *N,N*-二甲基甲酰胺溶解并定容至 500 mL,混匀,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备溶液,将溶液转移至棕色玻璃容器中,−20 ℃下避光保存备用,有效期 20 d。

3.4.2 空白基质提取溶液:使用空白小麦粉按照 5.2 方法进行试样处理,得到空白基质提取溶液。空白小麦粉中偶氮甲酰胺的含量应低于本方法检出限。

3.4.3 标准系列工作溶液: 分别吸取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液 50.0 μL 、100 μL 、200 μL 、500 μL 、1 000 μL 于一组 10 mL 容量瓶中, 用空白基质提取溶液定容至刻度, 混匀, 配制成浓度分别为 0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列工作液。临用前配制。

3.5 材料

有机微孔滤膜: 0.22 μm 。

4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱仪: 配有二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 4.2 分析天平: 感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。
- 4.3 涡旋混合器。
- 4.4 高速离心机: 转速 $\geq 10\,000\text{ r/min}$ 。
- 4.5 可控温设备: 可设定温度 20 $^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5 分析步骤

5.1 试样制备

称取具代表性小麦粉样品 200 g, 混合均匀, 贮存于棕色广口瓶中, 备用。

5.2 试样处理

称取 2.50 g 试样, 置于 50 mL 具塞离心管中, 加入 1 g 无水硫酸镁, 混合均匀, 准确加入 25.0 mL N,N-二甲基甲酰胺, 在涡旋振荡器上充分混合, 振荡提取 20 min, 静置, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待衍生。

5.3 衍生

5.3.1 试样溶液的衍生化

吸取 1.00 mL 滤液, 置于 10 mL 具塞离心管中, 加入 100 μL 三苯基膦衍生溶液, 于涡旋混合器上充分混合, 20 $^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境温度下, 避光静置衍生 12 h 以上(若环境温度达不到要求, 可在 20 $^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可控温设备中进行衍生反应)。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 $^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境温度下 60 h 之内测定)。

5.3.2 标准溶液的衍生化

吸取 1.00 mL 不同浓度的标准系列工作溶液, 按 5.3.1 操作步骤, 与试样溶液同步进行衍生, 制备标准溶液工作曲线。

5.4 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 或性能相当者;
- b) 流动相: A 为水, B 为甲醇, 梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$;

- e) 检测波长: 230 nm;
f) 进样量: 10 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	45	55
8.0	45	55
9.0	10	90
15.0	10	90
16.0	45	55
22.0	45	55

5.5 标准曲线的制作

将衍生后的标准系列工作溶液分别注入高效液相色谱仪中,测定相应衍生物的峰面积,以标准系列工作溶液中偶氮甲酰胺的浓度为横坐标,以衍生物的峰面积的响应值为纵坐标,绘制标准曲线。偶氮甲酰胺标准溶液衍生物色谱图参见附录 A 中图 A.1。

5.6 试样溶液的测定

将试样衍生液注入高效液相色谱仪中,得到偶氮甲酰胺衍生物的色谱峰面积,根据标准曲线得到试样溶液中偶氮甲酰胺的浓度。偶氮甲酰胺浓度应在标准曲线线性范围之内,超出线性范围则应使用N,N-二甲基甲酰胺溶液稀释试样提取溶液,将空白基质提取溶液同步稀释后配制标准曲线,同步衍生,再进行分析。

6 分析结果的表述

试样中偶氮甲酰胺的含量按式(1)计算。

式中：

X ——试样中偶氮甲酰胺的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——由标准曲线得出的样液中偶氮甲酰胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——试样提取溶液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000 —— 单位换算系数。

计算结果保留两位有效数字。

在主要城市中，以前的两次普查测得的毛人口数占全国总人口数的百分比。

8 其他

当取样量为 2.50 g 时, 提取溶液体积为 25.0 mL 时, 本方法检出限为 2.0 mg/kg, 定量限为 5.0 mg/kg。

附录 A
偶氮甲酰胺标准溶液衍生物高效液相色谱图

偶氮甲酰胺标准溶液衍生物色谱图见图 A.1。

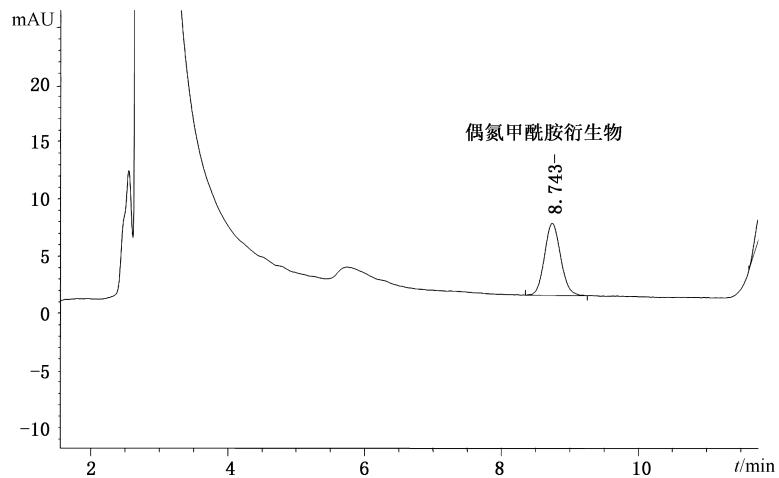


图 A.1 偶氮甲酰胺标准溶液衍生物(0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图