



# 中华人民共和国国家标准

GB 5009.282—2020

## 食品安全国家标准

### 食品中 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基咪唑的测定

2020-09-11 发布

2021-03-11 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 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基咪唑的测定

### 1 范围

本标准规定了食品中 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于炼乳、冷冻饮品、果酱、豆制品、可可及巧克力制品、糖果、小麦粉制品、饼干、馅料及表面挂浆、肉制品、调味糖浆、调味品(酱油、醋、酱及酱制品、料酒、复合调味料)、饮料、酒类、果冻及膨化食品中 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑含量的测定。

### 2 原理

试样加同位素内标后,采用水或酸水提取,经固相萃取柱净化、浓缩,用液相色谱-串联质谱仪测定,同位素内标法定量。

### 3 试剂和材料

除另有说明外,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

#### 3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):色谱纯。
- 3.1.2 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):色谱纯。
- 3.1.3 甲酸( $\text{HCOOH}$ ):色谱纯。
- 3.1.4 氨水( $\text{NH}_4\text{OH}$ ):浓度 25%~28%。
- 3.1.5 正己烷( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ):色谱纯。
- 3.1.6 乙酸铵( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ):色谱纯。
- 3.1.7 氯化钠( $\text{NaCl}$ )。

#### 3.2 试剂配制

- 3.2.1 2%甲酸水溶液:量取 20 mL 甲酸,加入到 980 mL 水中,混匀。
- 3.2.2 氨水甲醇溶液:量取 50 mL 氨水,加入到 950 mL 甲醇中,混匀。
- 3.2.3 乙酸铵溶液(5 mmol/L):称取 0.39 g 乙酸铵,溶于 1 000 mL 水中,混匀。
- 3.2.4 乙腈-乙酸铵溶液(9+1):将乙腈和乙酸铵溶液(5 mmol/L)按 9:1 的体积比混合均匀。

#### 3.3 标准品

- 3.3.1 1-甲基咪唑标准品( $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ , CAS 号:616-47-7):纯度≥98%,或为经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.2 2-甲基咪唑标准品( $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ , CAS 号:693-98-1):纯度≥98%,或为经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.3 4-甲基咪唑标准品( $C_4H_6N_2$ , CAS号:822-36-6):纯度 $\geqslant 98\%$ ,或为经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.4 同位素内标 1-甲基咪唑-D<sub>6</sub>( $C_4D_6N_2$ , CAS号:285978-27-0):纯度 $\geqslant 98\%$ 。

3.3.5 同位素内标 2-甲基咪唑-D<sub>6</sub>( $C_4D_6N_2$ , CAS号:1173022-19-9):纯度 $\geqslant 98\%$ 。

3.3.6 同位素内标 4-甲基咪唑-D<sub>6</sub>( $C_4D_6N_2$ , CAS号:1219804-79-1):纯度 $\geqslant 98\%$ 。

### 3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取 1-甲基咪唑标准品 25 mg(精确至 0.01 mg),加水 1 mL 使其溶解,用乙腈转移至 25 mL 棕色容量瓶中并定容至刻度,摇匀。分别准确称取 2-甲基咪唑、4-甲基咪唑标准品 25 mg(精确至 0.01 mg),用乙腈溶解,转移至 25 mL 棕色容量瓶中并定容至刻度,摇匀。 $-20^{\circ}\text{C}$ 下避光密封保存,有效期 6 个月。

3.4.2 混合标准工作溶液(2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):分别吸取上述标准储备溶液各 100  $\mu\text{L}$ 于同一 50 mL 棕色容量瓶中,加乙腈稀释定容至刻度,摇匀,得 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准溶液。此溶液  $4^{\circ}\text{C}$ 以下避光密封保存,有效期 3 个月。

3.4.3 同位素内标储备溶液(1 mg/mL):分别准确称取 1-甲基咪唑-D<sub>6</sub>、2-甲基咪唑-D<sub>6</sub> 和 4-甲基咪唑-D<sub>6</sub> 各 10 mg(精确至 1 mg),用乙腈溶解,转移至 10 mL 棕色容量瓶中定容至刻度,摇匀。 $-20^{\circ}\text{C}$ 下避光密封保存,有效期 6 个月。

3.4.4 同位素内标混合工作溶液(1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):分别吸取上述同位素内标储备溶液各 100  $\mu\text{L}$ 于同一 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈稀释定容至刻度,摇匀,得 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的同位素内标混合工作溶液。此溶液  $4^{\circ}\text{C}$  避光密封保存,有效期 3 个月。

3.4.5 标准系列溶液:分别吸取混合标准工作溶液 25  $\mu\text{L}$ 、75  $\mu\text{L}$ 、150  $\mu\text{L}$ 、300  $\mu\text{L}$ 、600  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  至 5 mL 棕色容量瓶中,分别加入 250  $\mu\text{L}$  的同位素内标混合工作溶液,用乙腈-乙酸铵溶液(9+1)混合液定容至刻度,配制成 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑的混合标准系列溶液,质量浓度为 10 ng/mL、30 ng/mL、60 ng/mL、120 ng/mL、240 ng/mL、400 ng/mL。在实际样品测定中,可根据样品浓度调整同位素内标混合工作溶液加入量及稀释倍数。

### 3.5 材料

3.5.1 混合型阳离子交换固相萃取小柱:*N*-乙烯吡咯烷酮-二乙烯基苯共聚物基质-磺酸基,150 mg,6 mL,或性能相当者。使用前依次用 5 mL 甲醇活化,再用 5 mL 水淋洗平衡。

3.5.2 均质子:适用于 50 mL 离心管。

3.5.3 有机系滤膜:孔径为 0.22  $\mu\text{m}$ 。

注:3.5.1、3.5.2、3.5.3 在使用前均应做本底试验,确定无干扰后方可使用。

## 4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。

4.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 01 g。

4.3 移液器:最大量程 200  $\mu\text{L}$  和 1 000  $\mu\text{L}$ 。

4.4 均质器。

4.5 涡旋混合器。

4.6 恒温水浴装置。

4.7 超声波清洗器:功率 $\geqslant 250 \text{ W}$ 。

4.8 高速离心机:转速 $\geqslant 10\,000 \text{ r}/\text{min}$ 。

4.9 固相萃取装置。

4.10 氮吹浓缩装置。

## 5 分析步骤

### 5.1 样品前处理

#### 5.1.1 试样制备

取适量有代表性的样品,饮料等液态均匀样品直接摇匀;非均匀的样品需匀浆或粉碎均匀,冷冻饮品室温融化后充分搅拌均匀,必要时可30 ℃~40 ℃水浴加热搅拌,酱类等可以采用研磨或者均质混匀,巧克力等采用50 ℃~60 ℃加热熔融,并趁热充分搅拌均匀。

#### 5.1.2 试样提取

##### 5.1.2.1 液体试样(如酱油、醋、饮料、酒类等)

称取2 g混合均匀的试样(精确至0.001 g),置20 mL刻度比色管中,加入1.0 μg/mL同位素内标混合工作溶液100 μL,加2%甲酸水溶液定容至20 mL,摇匀,置离心管中,以10 000 r/min离心5 min,上清液待净化。

##### 5.1.2.2 半流体试样(如果酱、蚝油、调味糖浆、冷冻饮品等)及胶基糖果、粉圆

称取2 g混合均匀的试样(精确至0.001 g),置50 mL离心管中,加入1.0 μg/mL同位素内标混合工作溶液100 μL,混匀,准确加入水20 mL,涡旋1 min,70 ℃水浴加热10 min,冷却至室温后,超声提取20 min,以10 000 r/min在4 ℃下离心5 min,上清液待净化。

#### 5.1.2.3 果冻

称取2 g混合均匀的试样(精确至0.001 g),置50 mL离心管中,加入1.0 μg/mL同位素内标混合工作溶液100 μL,混匀,加入2 g氯化钠,准确加入水20 mL,涡旋1 min,70 ℃水浴加热10 min,冷却至室温后,超声提取20 min,以10 000 r/min在4 ℃下离心5 min,上清液待净化。

#### 5.1.2.4 炼乳、可可及巧克力制品

称取2 g混合均匀的试样(精确至0.001 g),置50 mL离心管中,加入1.0 μg/mL同位素内标混合工作溶液100 μL,混匀,准确加入2%甲酸水溶液20 mL,60 ℃水浴加热5 min,加入2颗均质子,涡旋5 min,以10 000 r/min离心5 min,上清液待净化。

#### 5.1.2.5 豆制品、酱及酱制品等其他试样

称取2 g混合均匀的试样(精确至0.001 g),置50 mL离心管中,加入1.0 μg/mL同位素内标混合工作溶液100 μL,混匀,准确加入水20 mL,均质1 min,以10 000 r/min在4 ℃下离心5 min,上清液待净化。

#### 5.1.3 试样净化

##### 5.1.3.1 酱油、醋、饮料、酒、炼乳、可可及巧克力制品

吸取10 mL上清液,过固相萃取小柱,依次用2%甲酸水溶液5 mL,甲醇5 mL淋洗,再用氨水甲醇溶液10 mL洗脱,收集全部洗脱液,45 ℃以下氮吹至近干,准确加入乙腈-乙酸铵溶液(9+1)1 mL,涡旋30 s,过0.22 μm有机滤膜,滤液供液相色谱-串联质谱仪测定。

##### 5.1.3.2 蚝油

吸取10 mL上清液,加甲酸200 μL混匀酸化,必要时过滤,过固相萃取小柱,依次用2%甲酸水溶

液 5 mL,乙腈 5 mL 淋洗,抽干,1.5 mL 正己烷淋洗两次,抽干,再用氨水甲醇溶液 10 mL 洗脱,收集全部洗脱液,45 ℃以下氮吹至近干,准确加入乙腈-乙酸铵溶液(9+1)1 mL,涡旋 30 s,过 0.22 μm 有机系滤膜,滤液供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 5.1.3.3 除 5.1.3.1、5.1.3.2 外的其他基质

吸取 10 mL 上清液,加甲酸 200 μL 混匀酸化,必要时过滤,过固相萃取小柱,依次用 2% 甲酸水溶液 5 mL,甲醇 5 mL 淋洗,再用氨水甲醇溶液 10 mL 洗脱,收集全部洗脱液,45 ℃以下氮吹至近干,准确加入乙腈-乙酸铵溶液(9+1)1 mL,涡旋 30 s,过 0.22 μm 有机系滤膜,滤液供液相色谱-串联质谱仪测定。

## 5.2 仪器参考条件

### 5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下:

- 液相色谱柱:HILIC 色谱柱(2.1 mm×100 mm,3.5 μm),或性能相当色谱柱。
- 色谱柱柱温:35 ℃。
- 流动相:(A)乙腈;(B)5 mmol/L 乙酸铵溶液;洗脱梯度参考条件见表 1。
- 流速:0.6 mL/min。
- 进样体积:2 μL。

表 1 色谱洗脱梯度参考条件

| 时间/min | 流动相 A/% | 流动相 B/% | 流速/(mL/min) |
|--------|---------|---------|-------------|
| 0.00   | 95      | 5       | 0.6         |
| 6.00   | 95      | 5       | 0.6         |
| 6.50   | 60      | 40      | 0.6         |
| 7.00   | 60      | 40      | 0.6         |
| 7.50   | 95      | 5       | 0.6         |
| 12.00  | 95      | 5       | 0.6         |

### 5.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子化模式:电喷雾电离正离子模式。
- 质谱扫描方式:多反应离子监测(MRM)。
- 其他参考质谱条件:见附录 A。

## 5.3 定性测定

### 5.3.1 保留时间

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在±2.5%之内。

### 5.3.2 定量离子、定性离子及相对离子丰度比

每种化合物的质谱定性离子必须出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检验批次,

对同一化合物,样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比,其允许偏差不超过表 2 规定的范围。

表 2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

| 相对离子丰度/% | >50 | 20~50 | 10~20 | ≤10 |
|----------|-----|-------|-------|-----|
| 允许相对偏差/% | ±20 | ±25   | ±30   | ±50 |

## 5.4 定量测定

#### 5.4.1 标准曲线的制作

将标准系列溶液由低到高进样检测，以被测组分浓度与对应内标浓度比值为横坐标，被测组分色谱峰面积与对应内标色谱峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程。

标准品色谱图参见附录 B 图 B.1。

#### 5.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液同标准系列溶液进样测定,计算样品中待测物的含量。

## 5.5 空白试验

不称取试样,按照 5.1 做空白试验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

## 6 分析结果的表述

试样中目标化合物的含量按式(1)计算:

式中：

$X$  ——试样中待测组分的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

*c* ——试样溶液中待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品经固相萃取柱净化洗脱后的最终定容体积,单位为毫升(mL);

$f$  ——样液的稀释因子；

*m* ——试样的称样量,单位为克(g);

1 000——換算系数：

计算结果保留 3 位有

For more information about the study, please contact Dr. John D. Cawley at (609) 258-4626 or via email at [jdcawley@princeton.edu](mailto:jdcawley@princeton.edu).

清田漢

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得大于平均值的 20%。

## ○ 其他

当取样量为 2 g 时,1-中基咪唑、2-中基咪唑和 4-中基咪唑在咖啡饮料、植物饮料中的检出限为 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;在其他基质中的检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**附录 A**  
**参考质谱条件**

参考质谱条件如下：

- a) 毛细管电压：0.5 kV；
- b) 锥孔电压：30 V；
- c) 脱溶剂温度：500 ℃；
- d) 脱溶剂气流量：1 000 L/h；
- e) 锥孔气流量：150 L/h；
- f) 碰撞气：氩气；
- g) 其他质谱参数见表 A.1。

**表 A.1 参考质谱参数**

| 化合物名称  | 母离子/(m/z) | 子离子/(m/z)         | 锥孔电压/V | 碰撞电压/eV |
|--|-----------|-------------------|--------|---------|
| 1-甲基咪唑<br>(1-Methylimidazole)  | 83.1      | 56.1              | 30     | 14      |
|  |           | 42.1 <sup>*</sup> | 30     | 15      |
| 2-甲基咪唑<br>(2-Methylimidazole)  | 83.1      | 56.1              | 30     | 14      |
|  |           | 42.1 <sup>*</sup> | 30     | 15      |
| 4-甲基咪唑<br>(4-Methylimidazole)  | 83.1      | 56.1 <sup>*</sup> | 30     | 14      |
|  |           | 42.1              | 30     | 15      |
| 1-甲基咪唑-D <sub>6</sub>  | 89.1      | 45.1 <sup>*</sup> | 30     | 15      |
|  |           | 61.1 <sup>*</sup> | 30     | 15      |
| 2-甲基咪唑-D <sub>6</sub>  | 88.1      | 44.1 <sup>*</sup> | 30     | 15      |
| 4-甲基咪唑-D <sub>6</sub>  | 88.1      | 60.1 <sup>*</sup> | 30     | 14      |
| 注 1：质谱条件仅供参考，当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。<br>注 2： <sup>*</sup> 为定量离子。 |           |                   |        |         |

**附录 B**  
**标准品色谱图**

标准品多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1。

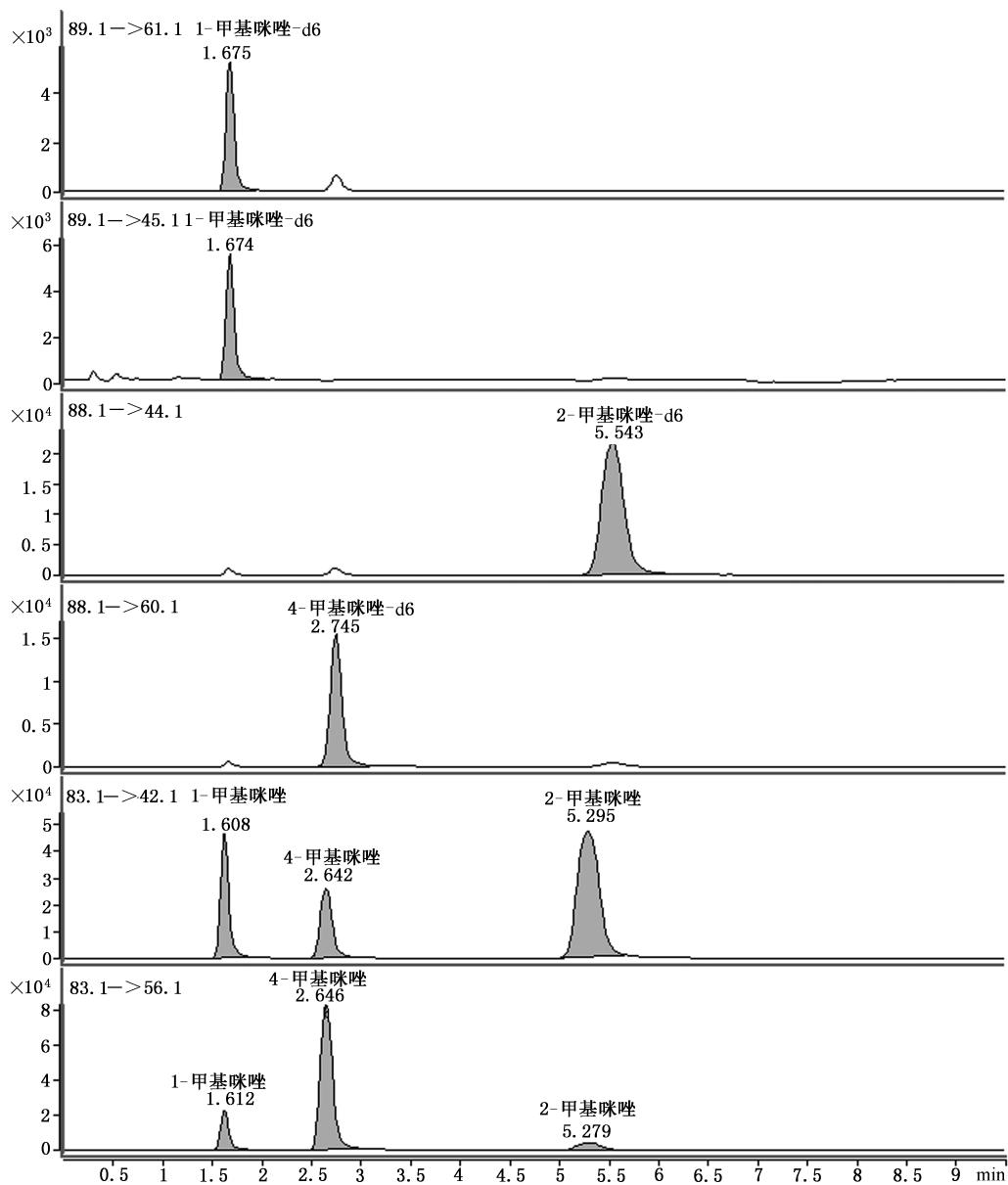


图 B.1 标准品多反应监测(MRM)色谱图