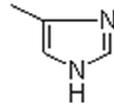


Determination of 4-Methylimidazole in Coke by using ZIC®-HILIC

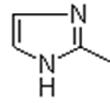
ZIC®-HILIC 色谱柱检测可乐饮料中的甲基咪唑

默克密理博应用实验室 2013-07-15

近日，百事可乐的产品在美国10个州中被爆出4-甲基咪唑(4-Methylimidazole)严重超标。4-甲基咪唑是一种有机中间体，主要用于合成大宗胃药西咪替丁，也可用作环氧树脂固化剂和金属表面防护剂等。可乐中的4-甲基咪唑是在以亚硫酸铵为原料生产焦糖色素时产生的。4-甲基咪唑白色至类白色结晶粉末，易溶于水和乙醇，有腐蚀性，是一种能诱发肿瘤的化学物质。



4-Methylimidazole



2-Methylimidazole

默克密理博致力于分析方法的开发，为客户提供简便、快速的解决方案。4-甲基咪唑及其异构体2-甲基咪唑均有较强极性，适合使用默克密理博的两性离子型亲水作用色谱柱(ZIC®-HILIC)分离。

本实验采用默克密理博两性离子型（ZIC®-HILIC）色谱柱直接分析可乐中甲基咪唑的液相色谱方法。该方法前处理简单，不需要衍生化，也不需要添加离子对试剂。

1 材料试剂

- 1.1 对照品：4-甲基咪唑，2-甲基咪唑。
- 1.2 色谱柱：ZIC®-HILIC 250-4.6mm 5um 200Å（默克密理博，货号：1.50458.0001）
- 1.3 乙腈（默克密理博，货号：1.00030.4008）
- 1.4 甲醇（默克密理博，货号：1.06007.4008）
- 1.5 磷酸二氢钾（默克密理博，货号：1.04873.1000）
- 1.6 可口可乐及百事可乐样品
- 1.7 实验用超纯水（默克密理博Milli-Q Advantage）
- 1.8 PVDF0.22um针头过滤器（默克密理博，货号：SLGV033NB）
- 1.9 标准溶液配制：使用70%乙腈溶液，分别配制1mg/ml的4-甲基咪唑，2-甲基咪唑对照品原液。取两个对照品原液，1:1混合、稀释、定容，成，得100ug/ml的混合对照品母液。混合母液用70%乙腈溶液配制浓度为0.1-10ug/mL的标准工作液。
- 1.10 样品前处理：取3 ml 可乐饮料样品于5mL容量瓶中，用碱液调节pH值，加水稀释至刻度。混匀，取1mL溶液于10mL容量瓶中，加8ml 乙腈溶解，超声10min后，冷却至室温，加乙腈稀释至刻度。混匀，静置，分层，取上层清液，过滤。另取3ml可乐，加入标准品后，调节pH值，再同法处理。

2.测试条件

2.1 液相色谱仪：Agilent 1260 HPLC

2.2 色谱条件

色谱柱:ZIC®-HILIC PEEK 250-4.6 5um(1.50458.0001)

流动相: A-磷酸缓冲盐（20mM K₂HPO₄），B-乙腈

梯度程序: 0-12 min 80% B; 12-15 min 80-50% B, 15-20 min 50% B, Post time: 7 min

检测波长: 214nm

柱温:30°C

流速:1mL/min

进样体积: 20ul

3 测试结果

3.1 对照品测试

对照

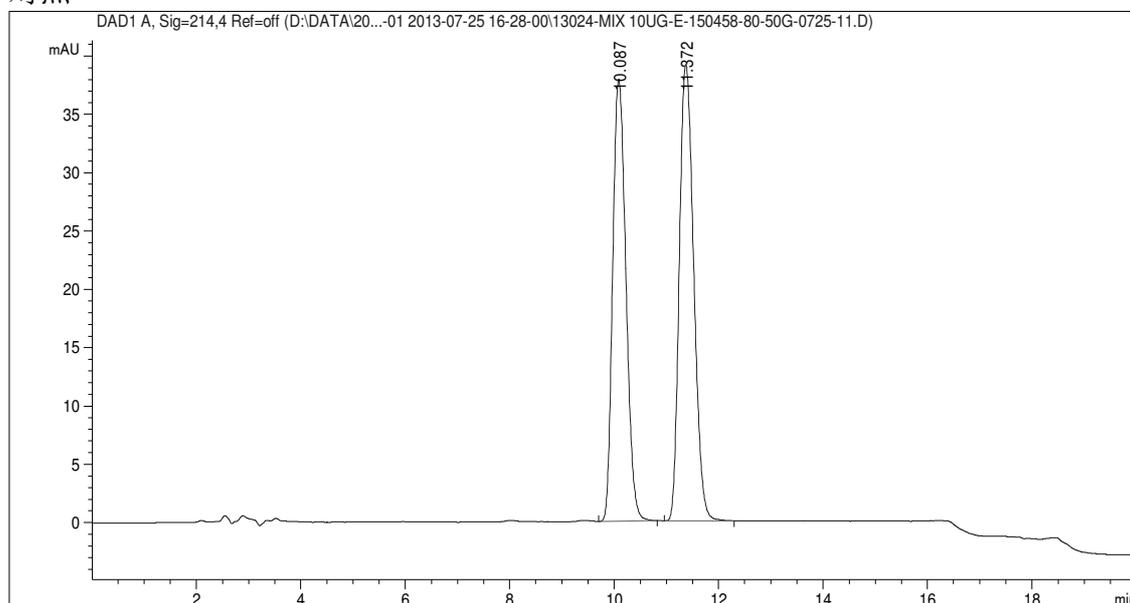


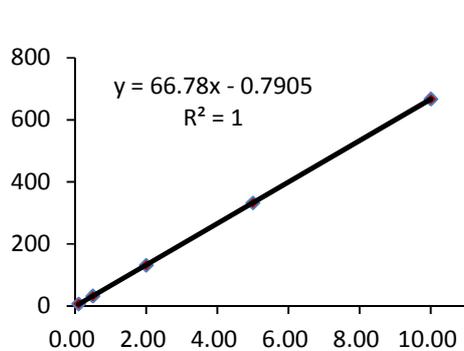
图 1 混合对照品溶液(10ug/ml)

表 1 对照品测试结果

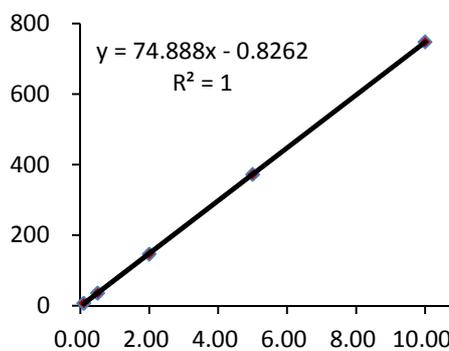
No.	Compound	Retention Time (min)	Theoretical Plates	Asymmetry	Resolution	RSD % (n=3)
1	4-Methylimidazole	10.1	7135	0.80	-	2.37
2	2-Methylimidazole	11.4	7857	0.79	2.46	1.44

3.2 校准曲线

配制 0.1, 0.5, 2, 5, 10ug/ml 的对照品溶液, 分别进样检测。根据浓度与峰面积值绘制校准曲线。



a) 4-Methylimidazole



b) 2-Methylimidazole

图 2 校准曲线

结果表明，在 0.1-10ug/ml 之间，线性关系良好。

3.3 加标回收及精密度试验

百事可乐样品按照样品处理方法处理，结果显示未检出甲基咪唑，且在 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑色谱峰附近没有干扰峰。

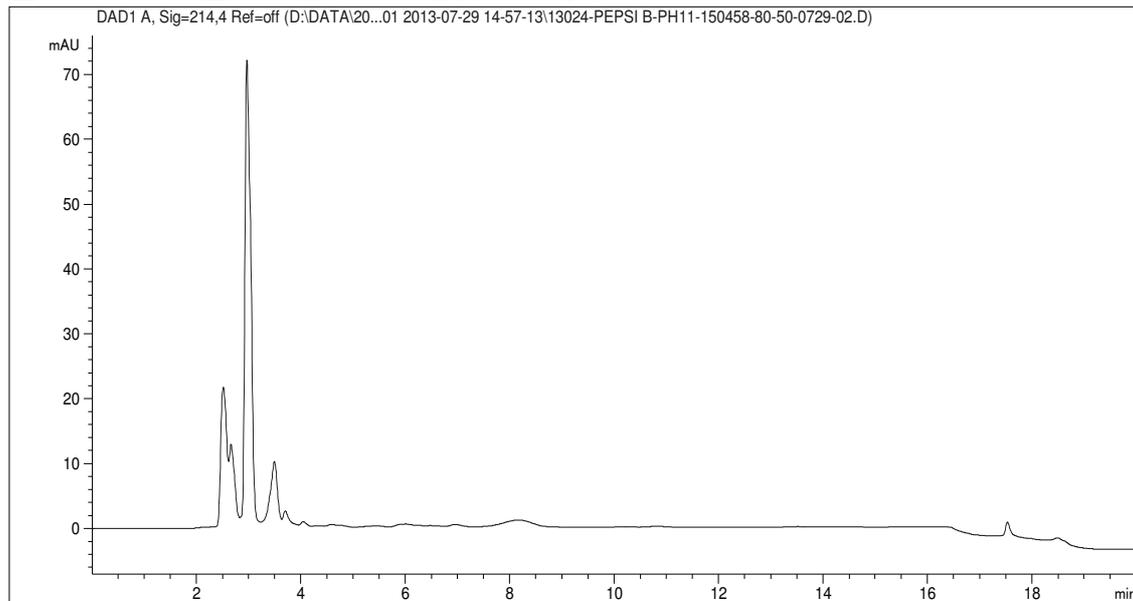


图 3 百事可乐样品

取 3mL 百事可乐样品，分别加入不同量混合对照品，经过处理后测定，计算加标回收率，见表 3。

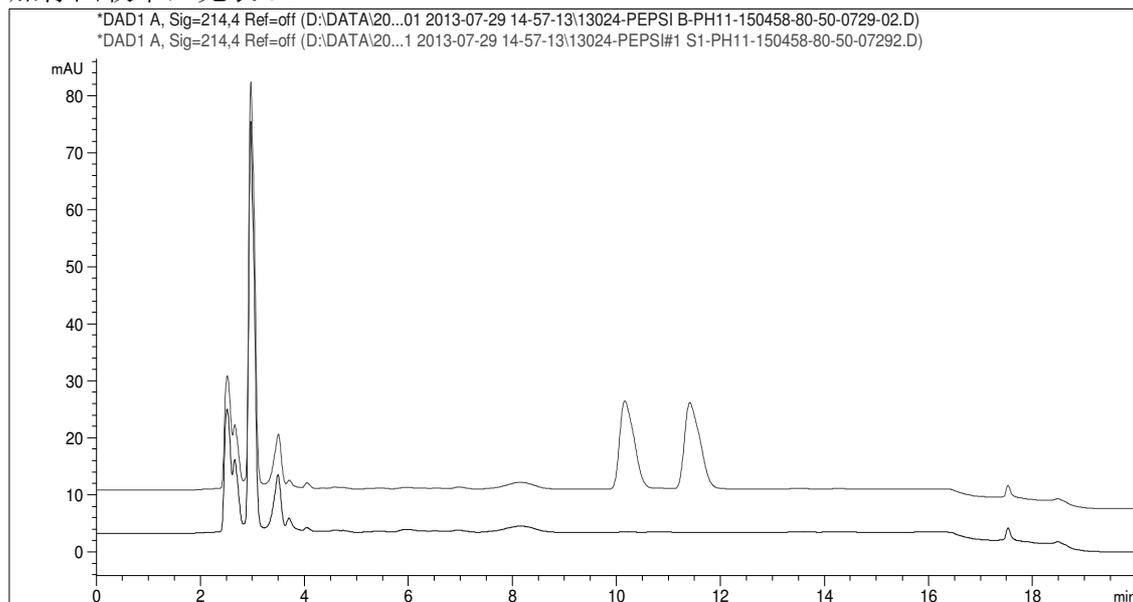


图 4 样品加标（蓝色为可乐空白，红色为可乐加标（17ug/ml））

表 2 加标回收及精密度实验

加标浓度 (ug/ml)	回收率	RSD
1.7	111.9%	4.3%
17	94.9%	1.2%
83.3	95.4%	1.3%

3.5 可口可乐样品测试

取可口可乐，按照方法处理，检测。结果显示未到甲基咪唑。

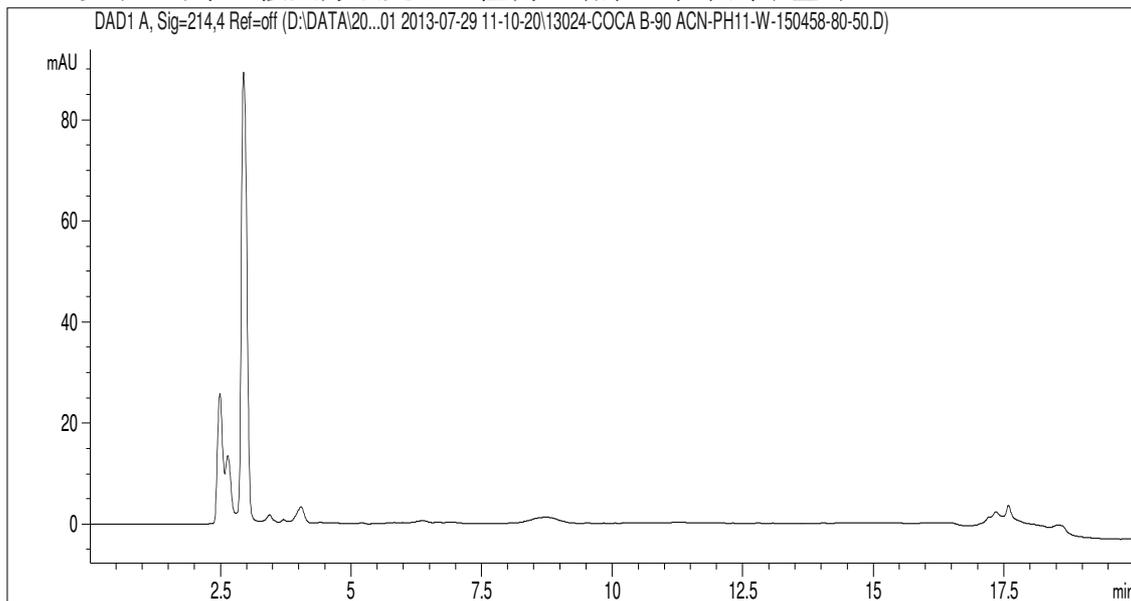
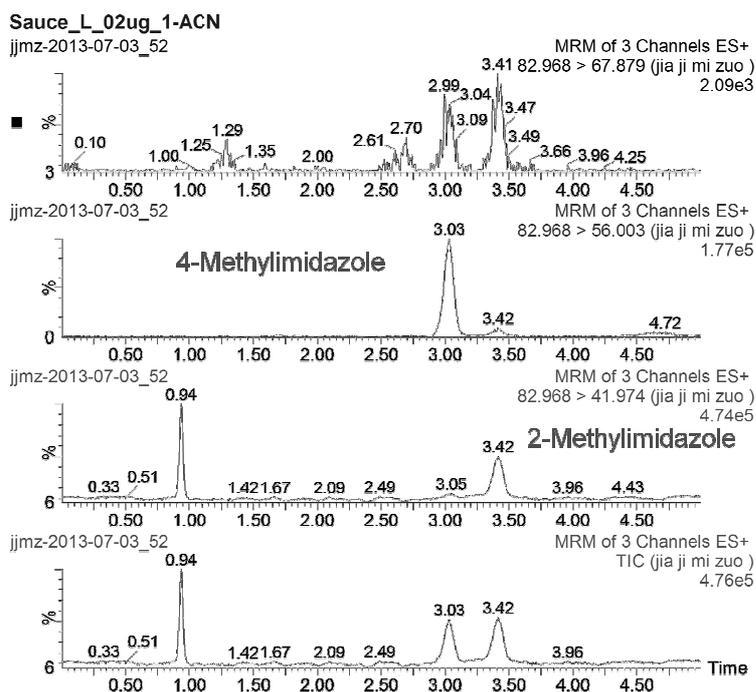


图 5 可口可乐样品的测试图谱

4 结论

采用 ZIC®-HILIC 色谱柱，直接分析可乐样品中的 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑。方法在 0.1-10ug/ml 范围内线性关系良好，操作简单，重现性良好。

附：LC-MS/MS测试食品中的甲基咪唑



附图：ZIC-HILIC-MS/MS测试MRM扫描图谱（20ppb）

色谱柱推荐

应用	描述	订货号
HPLC	ZIC®-HILIC PEEK 250-4.6 5um	1.50458.0001
LC/MS	ZIC®-HILIC PEEK 150-2.1 5um	1.50454.0001

更详细信息请联系默克密理博。