

# 高效液相色谱法测定熟肉制品中的刚果红

窦彩云\*, 马育松, 康占省, 葛世辉

(河北出入境检验检疫局技术中心, 石家庄 050051)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱测定熟肉制品中刚果红的检测方法。**方法** 样品经石油醚去除脂肪, 以氨水-乙醇(20:80, 体积比)溶液提取, 乙酸调节 pH 至中性, 以水定容、离心。经 ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 甲醇-20 mmol/L 乙酸铵为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 500 nm, 外标法定量。**结果** 刚果红在 0.1 ~ 10 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 添加回收率在 82.5% ~ 90.7% 之间, 相对标准偏差为在 2.26% ~ 7.29% 之间, 方法检出限为 0.02 mg/kg。**结论** 该方法简便、快捷, 回收率和重现性好, 适用于熟肉制品中刚果红的测定。

**关键词:** 刚果红; 熟肉制品; 高效液相色谱法

## Determination of Congo red in cooked meat products by high performance liquid chromatography

DOU Cai-yun\*, MA Yu-song, KANG Zhan-Sheng, GE Shi-Hui

(Technical Center of Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method of determination of Congo red in cooked meat products by high performance liquid chromatography. **Methods** The fat of the samples was removed with petroleum, and then the samples were extracted by ammonia-ethanol (20:80, v:v), pH was adjusted to 7.0~7.5 with acetic acid, and diluted with water to constant volume and then by centrifugation. Congo red was separated on a ZORBAX SB-Aq (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol -20 mmol /L ammonium acetate as mobile phase by gradient elution, and detected at 500 nm, the external standard method was used for quantitative analysis. **Results** Congo red has a good linear relationship in range of 0.1~10 μg/mL ( $r>0.999$ ). The recoveries were between 82.5% ~ 90.7%, with relative standard deviations(RSD) of 2.26% ~ 7.29%. The limit of detection was 0.02 mg /kg. **Conclusion** This method is simple, feasible, with good recovery and reproducibility, it is suitable for detection of Congo red in cooked meat products.

**KEY WORDS:** Congo red; cooked meat; high performance liquid chromatography

## 1 引言

刚果红是一种典型的联苯胺类偶氮染料, 一般用作医学检验、生物染色剂及化学指示剂, 非食用色素, 不允许加入到食品中, 《GB 2760-2011 食品添加

剂使用标准》<sup>[1]</sup>中不包含该物质。2013年12月16日欧洲化学总署(ECHA)正式发布 REACH 法规第十批高度关注物质清单, 新增的7种物质中就包括刚果红, 对其分类定义为致癌<sup>[2]</sup>。但刚果红由于其着色力强、价格低廉, 有不法商贩将其添加到熟肉中为其染

\*通讯作者: 窦彩云, 硕士, 工程师, 主要研究方向为理化检验。E-mail: cydou2013@163.com

\*Corresponding author: DOU Cai-yun, Engineer, Technical Center of Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.318, Heping Road, Xinhua District, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: cydou2013@163.com

色,是新出现的制假造假方法。为保障人民群众食品安全,维护人民群众身体健康,建立刚果红相应的检测技术具有重要意义。

目前肉制品中刚果红的检测没有国家标准和行业标准方法。国内外报道的刚果红检测方法有液相色谱法、液相色谱-质谱法<sup>[3-6]</sup>,主要针对辣椒面、水样、肉质等。质谱法可以实现准确的定性,但在定量上会受基质效应影响,并不十分准确,在检测浓度较大的物质时需要稀释多倍后上机,结果计算会引入较大的误差,采用液相色谱法检测肉制品中的刚果红未见相关报道。参考国标 GB/T 5009.35-2003 食品中合成色素的检测方法和国标 GB/T 9695.6-2008 肉制品中的胭脂红的检测及相关参考文献<sup>[7-15]</sup>,本文采用氨水乙醇提取,乙酸中和后采用高效液相色谱仪检测,简便快捷。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(安捷伦 1200,美国);超声波提取器(江苏国华);离心机(HITACHI CF16RXII,日本);电子天平(METTLER TOLEDO,瑞士);25 mL 比色管;0.2  $\mu\text{m}$  聚丙烯针头滤膜(PP membrane, Pall corporation, 美国)。

甲醇、乙酸铵(色谱纯, Dikma);乙醇、氨水、乙酸(分析纯,天津永大);水为二级去离子水。刚果红标准品纯度 98%,购自百灵威科技。标准储备液 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :准确称取 10 mg 刚果红标准品于 50 mL 容量瓶中,用甲醇-水(1:1)溶解定容,配制成 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备液。样品为郊区菜市场散装熟猪肉及牛肉样品。

### 2.2 样品前处理

准确称取 2.5 g(精确到 0.01 g)已绞碎均匀的试样于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL 石油醚,涡旋振荡 1 min,5000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。残渣中加入 10 mL 氨水-乙醇(20:80),涡旋振荡 2 min,再超声提取 20 min,以 5000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至 25 mL 比色管中,残渣再加 10 mL 氨水-乙醇提取液提取 1 次,合并提取液。于通风橱中用乙酸调节 pH 至 7.0~7.5,加水定容,混匀。取约 1 mL 上清液过 0.2  $\mu\text{m}$  聚丙烯针头滤膜至进样瓶,上机测定。

### 2.3 液相色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-Aq, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; 流动相 A: 20 mmol 乙酸铵水溶液, B: 甲醇,梯度洗脱程序见表 1,流速 1.0 mL/min,柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长: 500 nm。进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

表 1 梯度洗脱程序  
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.0	85	15
3.0	65	35
10.0	20	80
12.0	20	80
12.1	85	15
17.0	85	15

## 3 结果与讨论

### 3.1 液相色谱条件的建立

#### 3.1.1 检测波长的确定

刚果红标准溶液呈红色,设定检测波长为 254 nm 在液相色谱仪上进样,并在 230 nm~600 nm 全扫描,发现刚果红在 500 nm 附近有最大吸收峰,所以选择 500 nm 作为测定波长,同时可以减少杂质干扰,吸收光谱见图 1。

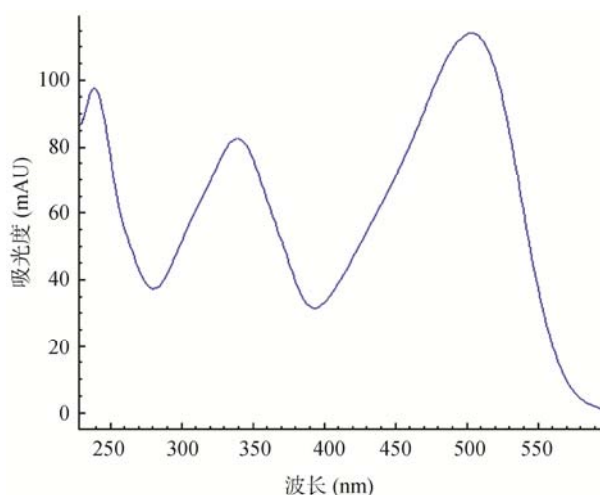


图 1 刚果红吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of Congo red

### 3.1.2 液相色谱条件的优化

选择乙腈-水、甲醇-水等溶液为流动相时, 刚果红峰形展宽, 峰形差, 将水相换成 20 mmol/L 乙酸铵溶液做流动相, 通过调整不同的比例, 以 85:15 的乙酸铵和甲醇为初始比例, 采用梯度洗脱可以获得很好峰形, 且能与柠檬黄、日落黄、苋菜红、胭脂红、诱惑红、赤藓红、亮蓝七种常见色素达到良好分离, 刚果红单标和八种混和标准溶液色谱图见图 2 和图 3。

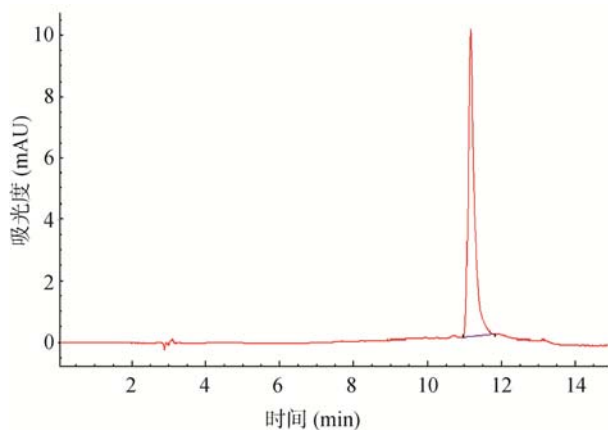
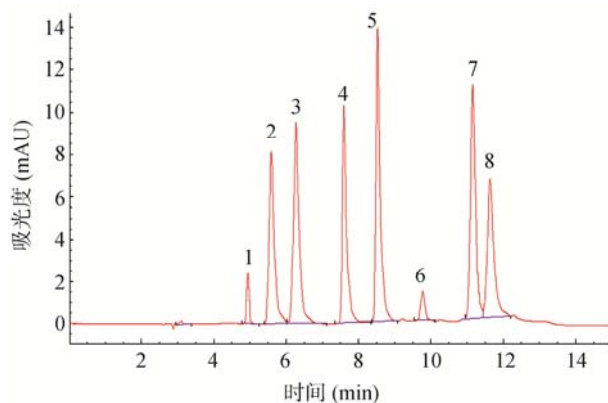


图 2 刚果红标准色谱图

Fig. 2 Chromatogram of Congo red



1-柠檬黄; 2-苋菜红; 3-胭脂红; 4-日落黄; 5-诱惑红; 6-亮蓝;  
7-刚果红; 8-赤藓红

图 3 8 种混合标准溶液色谱图

Fig. 3 Chromatogram of 8 mixed standard solutions

### 3.2 提取条件的选择

用不含刚果红的酱卤猪肉和牛肉样品为基质进行加标实验时, 发现肉质对其有很强的吸附, 提取溶剂分别用水、乙醇、甲醇、乙腈、乙腈-水等溶剂对肉制品中的刚果红进行提取, 提取方式采取涡旋、超

声均质等方式, 均不能有效的将刚果红从肉制品中提取出来。刚果红是一种磺酸盐的结构, 因此改用氨化乙醇为提取液, 回收率有所提高, 通过比较不同比例的氨水乙醇溶液提取效率, 结果表明氨水-乙醇(20:80, 体积比)时, 回收率最高, 提取效率见表 2, 因此选用该溶液作为提取溶剂。刚果红在普通的尼龙有机滤膜上有较强的吸附, 不能用这种膜进行过滤。本实验选用了进口 PP 材质的滤膜, 不会对刚果红造成吸附。

表 2 不同比例的氨水乙醇溶液提取效率

Table 2 Effect of different ratio ammonia/ethanol on the recovery of Congo red

氨水-乙醇(体积比)	2:98	5:95	10:90	20:80	30:70	40:60
回收率(%)	30.2	45.0	68.5	99.5	99.3	99.0

### 3.3 方法的线性范围和检出限

将标准储备液用流动相逐级稀释配成 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作溶液, 按上述优化的色谱条件进行测定, 以刚果红的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。在 0.1 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性良好, 回归方程为  $Y = 83.5462X + 5.0680$ , 线性相关系数大于 0.999, 标准曲线见图 4。本方法的检出限为 0.02 mg/kg( $S/N=3$ )。

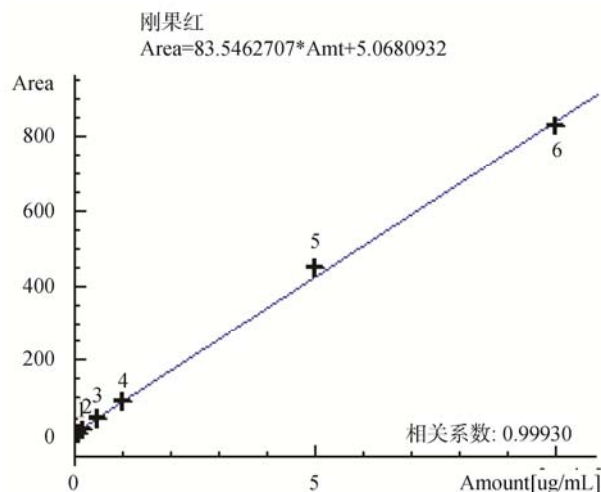


图 4 刚果红标准曲线

Fig. 4 Standard curves of Congo red

### 3.4 回收率和精密度

以不含刚果红的酱卤猪肉和牛肉样品, 在 1.0、

2.0、10.0 mg/kg 三个添加水平进行回收率试验, 每个水平重复测定 6 次, 测得回收率在 82.5% ~ 90.7% 之间, 相对标准偏差为 2.26% ~ 7.29%, 结果见表 3。

表 3 猪肉和牛肉样品中刚果红的回收率和相对标准偏差 ( $n=6$ )

Table 3 Average recoveries and RSD of Congo red from cooked pork and beef samples ( $n=6$ )

	添加水平 (mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD(%)
熟牛肉	1.0	88.2	7.29
	2.0	84.6	2.98
	10.0	85.5	4.98
熟猪肉	1.0	90.7	6.61
	2.0	82.5	5.34
	10.0	82.5	2.26

### 3.5 实际样品分析

利用本方法对市场委托检测的卤煮熟牛、猪肉及内脏等制品共 25 批样品中刚果红含量进行了检测, 其中熟牛肉 8 批, 熟猪肉 12 批, 猪肺 3 批, 猪耳丝 2 批, 一批熟猪肉检出刚果红的含量为 39 mg/kg, 熟牛肉中检出 5 mg/kg。

## 4 结论

本文建立了熟肉制品中刚果红含量的高效液相色谱法测定方法。样品前处理仅用氨水-乙醇溶液提取即可, 不需经过其他如液液分配、固相萃取等操作, 全部前处理时间约 1 h。整个前处理过程简便、快捷。经过色谱条件的优化, 刚果红可以与熟肉中其他常用色素达到良好的分离。该方法简便、稳定、回收率和重现性好, 适用于熟肉制品中刚果红的测定。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB 2760-2011 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 2760-2011. National Food safety Standards-Standards for uses of food additives [S].
- [2] Jukka Malm. Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV [Z]. ECHA ED/121/2013:1-4.
- [3] 钟慈平, 魏炜, 王正虹, 等. 固相萃取-超高效液相色谱法快速检测辣椒面中刚果红[J]. 食品科学, 2014, 35 (10): 195-198.
- [4] Zhong CP, Wei W, Wang ZH, *et al.* Determination of Congo Red in chili powder by solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2014, 35 (10): 195-198.
- [5] 侍芳. 液相色谱-质谱联用检测环境水样中刚果红染料[J]. 福建分析测试, 2010, 19(2): 60-62.  
Shi F. Determination of Congo red in environment water by liquid chromatography and electrospray mass spectrometry [J]. Fujian Anal Test, 2010, 19(2): 60-62.
- [5] 林慧, 徐春祥, 颜春荣, 等. 液相色谱 - 串联四极杆飞行时间质谱和超高效液相色谱 - 串联三重四极杆质谱用于检测牛肉中的刚果红[J]. 色谱, 2013, 31(9): 914-919.  
Lin H, Xu CX, Yan CR, *et al.* Determination of Congo red in beef by high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry and ultra -high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(9): 914-919.
- [6] 凌睿, 胡文彦, 乔玲. 高分辨快速液相色谱-串联质谱法测定肉制品中的刚果红[J]. 分析测试学报, 2012, 31(6): 730-733.  
Ling R, Hu WY, Qiao L. Determination of Congo red in meat products by rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(6): 730.
- [7] 中华人民共和国卫生部, GB /T5009.35-2003 食品中合成着色剂的测定方法[S].  
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009.35-2003. Determination of synthetic colour in foods [S].
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 9695.6-2008. 肉制品胭脂红着色剂 测定[S].  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 9695.6-2008 Meat products-Determination of artificial colour ponceau 4R [S].
- [9] 李娜, 李淑娟, 安娟, 等. 快速液相色谱法测定食品中 11 种合成着色剂[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 313-314.  
Li Na, Li SJ, An J, *et al.* Determination of eleven kinds of synthetical pigments in food by rapid resolution liquid chromatography[J]. Sci Technol Food Ind, 2009, 30(1): 313-314.
- [10] 郑月明, 国伟, 聂雪梅, 等. 食品中违禁添加的非食用色素检测技术综述[J]. 中国农学通报, 2012, 28 (9): 222-228.  
Zheng YM, Guo W, Nie XM, *et al.* Research on detection methods of inedible pigment illegally added to food [J]. Chin Agri Sci Bull, 2012, 28 (9): 222-228.
- [11] 刘敏. 高效液相色谱法测定食品中的添加剂和非法添加物[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.  
Liu M. Determination of food additives and illegal additives by hplc in food [D]. Taian: Shandong Agriculture University., 2012.

- [12] 牛晋阳, 郭文萍, 赵榕. 高效液相色谱法测定肉制品中的着色剂[J]. 肉类工业, 2007, 312(4): 23-26.  
Niu JY, Guo WP, Zhao R. Determination of colorant in meat product by HPLC [J]. Meat Ind, 2007, 312(4): 23-26.
- [13] 曾泳艇, 黎永乐, 张协光. 固相萃取-超高效液相串联质谱法同时测定食品中红色 2G、酸性大红、酸性橙 II 和酸性金黄 G[J]. 广东化工, 2012, 39(3): 151-160.  
Zeng YT, Li YL, Zhang XG. Determination of red 2g,ponceau 2r,orange II and metanil yellow in food by spe-uplc-ms/ms method [J]. Guangdong Chem Ind, 2012, 39(3): 151-160.
- [14] 刘丽, 吴青, 林凤英, 等. QuEChERS-HPLC 快速测定食品中七种食用合成色素[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 81-85.  
Liu Li, Wu Q, Lin FY, *et al.* QuEChERS-high performance liquid chromatography for the determination of synthetic colorants in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(12): 81-85.
- [15] 林春晓, 曾红惠, 付斌, 等. 高效液相色谱检测熟食肉制品中人工合成色素的研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(3): 556-557.  
Lin CX, Zeng HH, Fu B, *et al.* Determination of artificial pigment from meat products by using high performance liquid chromatography [J]. Chin Tropic Med, 2005, 5(3): 556-557.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



窦彩云, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品理化检验。

E-mail: cydou2013@163.com