

附件 2

肉制品中刚果红的测定

BJS 201807

1 范围

本方法规定了肉制品中刚果红的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于肉制品中刚果红的测定。

2 原理

试样经氨水乙醇溶液提取,用正己烷去除提取液中的脂肪后用液相色谱串联质谱法进行测定,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯或以上规格,水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(C₂H₃N): 色谱纯。

3.1.2 甲醇(CH₃OH): 色谱纯。

3.1.3 乙醇(C₂H₅OH): 色谱纯。

3.1.4 正己烷(C₆H₁₄): 优级纯。

3.1.5 甲酸铵(CH₃NO₂): 色谱纯。

3.1.6 氨水(NH₃·H₂O): 含量 25%~28%。

3.2 试剂的配制

3.2.1 氨水乙醇溶液(20+80): 移取氨水(3.1.6) 20 mL, 加入 80ml 乙醇(3.1.3), 混匀备用。

3.2.2 5mmol/L甲酸铵溶液: 称取甲酸铵(3.1.5) 0.315 g, 加适量的水溶解, 定容至1000 mL, 混匀。

3.3 标准品

刚果红标准样品的分子式、相对分子量、CAS 登录号见表 1, 纯度≥98 %

表 1 刚果红标准样品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量
刚果红	Congo Red	573-58-0	C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂	696.66

3.4 标准溶液的配制

称取10 mg (精确到0.1 mg) 刚果红标准品于100 mL量瓶中, 加入少量甲醇溶解后, 用甲醇定容, 得到100 μg/mL的标准储备溶液, 4℃避光保存6个月。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱四极杆串联质谱仪，带电喷雾（ESI）离子源

4.2 涡旋振荡器

4.3 组织捣碎机

4.4 高速离心机，10000 r/min

4.5 电子天平，感量 0.0001g 和 0.01g

4.6 旋转蒸发器

5 分析步骤

5.1 试样制备

取适量有代表性的试样切成小块，组织捣碎机捣碎，均质分成两份，作为试样和留样，分别装入洁净容器中，密封并标记，于 -18℃ 避光保存。

5.2 样品前处理

准确称取 2 g（精确至 0.01g）试样于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 氨水乙醇溶液（3.2.1），在涡旋振荡器上提取 2 min 后置于离心机中以 5000 r/min 离心 5 min，把上层提取液溶液全部转移至另一离心管中，用 10 mL 氨水乙醇溶液重复提取一次，合并提取液。在提取液中加入 30 mL 正己烷于涡旋振荡器上混合 2 min 后，5000 r/min 离心 2 min，弃去正己烷，将下层溶液全部转移至旋蒸瓶中，60 °C 下旋蒸至干，用 5 mL 甲醇溶解残渣。取部分溶解液至离心管中，10000 r/min 离心 10 min 后，取上清液上机测试。

5.3 仪器条件

5.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（3.0 mm × 100 mm，3.5 μm），或性能相当者；

b) 流动相：流动相 A 为 5 mmol/L 甲酸铵水溶液，流动相 B 为乙腈，流动相梯度洗脱程序见表 2；

6 表 2 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	80	20
5.0	20	80
6.0	80	20
8.0	80	20

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：35℃；

e) 进样量：1 μL。

6.1.1 质谱条件

a) 电离方式：电喷雾负离子模式；

b) 检测方式：多反应监测（MRM）；

c) 雾化气压力：40 psi；

- d) 干燥气温度: 320 °C;
- e) 干燥气流速: 9.0 L/min;
- f) 毛细管电压: 4.0kV;
- g) 监测离子对、碎裂电压和碰撞能量见表3。

7 表 3 刚果红的监测离子对、碎裂电压和碰撞能量

中文名称	监测离子对(m/z)	碎裂电压(V)	碰撞能量(eV)
刚果红	325.0/152.0	130	39
	325.0/416.0 *	130	13

注: *为定量离子对

7.1 定性确证

进行样品测定时,如果检出的质量色谱峰保留时间与标准溶液一致,并且在扣除背景后的样品谱图中,各定性离子的相对丰度(k)与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,最大允许相对偏差不超过表4中规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测组分。

8 表 4 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	k>50%	50%≥k>20%	20%≥k>10%	k≤10%
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.1 定量测定

8.1.1 标准曲线的制备

将刚果红标准溶液(3.4)用甲醇逐级稀释成0.25µg/mL、1µg/mL、5µg/mL、10µg/mL、20µg/mL的标准系列溶液,准确称取与试样基质相应的阴性试样2g(精确至0.01g,按5.2操作未检出325.0/152.0和325.0/416.0离子对),分别加入标准系列溶液1mL,与试样同时进行提取,制成最终浓度为0.05、0.2、1.0、2.0、4.0 µg/mL标准系列工作溶液,将标准系列工作液上机测试,建立响应值与浓度的线性拟合方程。标准谱图见附录A。

8.1.2 试样溶液的测定

将试样溶液(5.2)按仪器参考条件(5.3)进行测定,得到相应的试样溶液的质量色谱峰面积。根据标准曲线得到试样溶液中刚果红的浓度。

8.2 空白试验

除不加试样外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

按下式(1)计算试样中刚果红的含量:

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X —试样中刚果红的含量，mg/kg；

C —试样测定液中待测物含量， $\mu\text{g/mL}$ ；

V —试样定容体积，mL；

m —称取样品量，g；

f —试样制备过程中的稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留2位有效数字。

10 灵敏度

当称样量为2.00 g时，本方法检出限为0.13 mg/kg，定量限为0.45 mg/kg。

11 精密度和准确度

在0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及5.0 mg/kg的添加水平下，回收率不低于70%，相对标准偏差不高于10%。

附录A

刚果红标准溶液质量色谱图

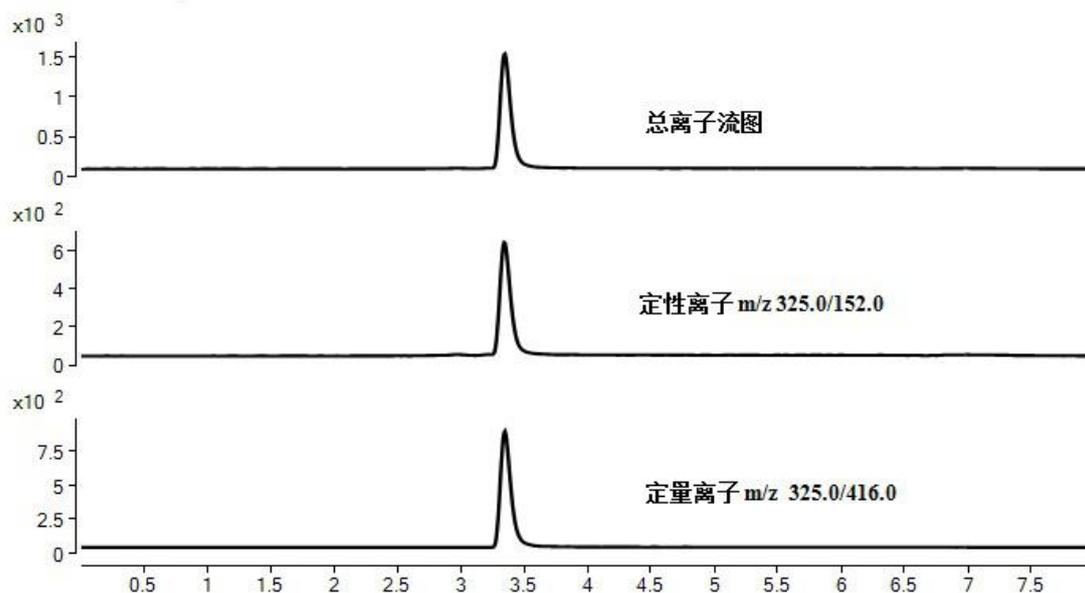


图 1 100ng/mL 刚果红多反应监测（MRM）色谱图

本方法负责起草单位：南京市食品药品监督检验院。

验证单位：江苏省食品药品监督检验研究院、国家肉类食品质量监督检验中心、河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心、北京市食品安全监控和风险评估中心、辽宁省食品检验研究院。

主要起草人：凌睿、胡文彦、孙小杰、林慧、李志刚、马育松。