

## 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\*

林 慧<sup>1,2</sup>, 徐春祥<sup>1\*</sup>, 颜春荣<sup>1</sup>, 张 征<sup>1</sup>, 王岁楼<sup>2\*</sup>

(1. 江苏省产品质量监督检验研究院, 江苏 南京 210007; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

**摘要:**建立了牛肉中刚果红的检测方法。定性方法采用液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱对未知物进行质谱谱图库匹配,定量分析采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱。牛肉样品中的刚果红经液液萃取净化后,采用Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> Rapid Resolution HD 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)进行分离,流动相为95%(体积分数)甲醇,流速为0.2 mL/min。AB 4000<sup>+</sup>三重四极杆质谱仪在电喷雾负离子化(ESI)及MRM模式下定量。结果显示,刚果红在0.03~1 mg/L浓度范围内,线性关系良好(相关系数为0.999 8),精密度高(RSD小于5%),回收率为88%~91%,检出限约为0.01 mg/L。本方法快速简便,重现性好,可以为牛肉及其他肉制品中刚果红的定量提供良好的解决方案。

**关键词:**高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱;超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱;刚果红;牛肉  
**中图分类号:** O658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-8713(2013)09-0914-06

## 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

LIN Hui<sup>1,2</sup>, XU Chunxiang<sup>1\*</sup>, YAN Chunrong<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup>, WANG Suilou<sup>2\*</sup>

(1. Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China;  
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** A method was developed for the determination of congo red in beef. The analyte was identified by high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF MS) and quantitatively determined by ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry. After purified by liquid-liquid extraction, the congo red in the beef sample was separated on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> Rapid Resolution HD UPLC column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) HPLC, using 95% (volume percentage) methanol as the mobile phase at 0.2 mL/min. The detection was performed on an AB 4000<sup>+</sup> triple quadrupole mass spectrometer utilizing electrospray ionization (ESI) interface operated in negative ion mode and multiple-reaction monitoring (MRM) mode. The results showed that the linear range of congo red mass concentration was 0.03–1 mg/L with the correlation coefficient of 0.999 8. The method had a good precision with the RSDs lower than 5% and the recoveries ranging from 88% to 91%. The limit of detection (LOD) of congo red was 0.01 mg/L. With good reproducibility, the method is simple, fast and effective for the determination of the illegally added congo red in beef and other meat products.

**Key words:** high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF MS); ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS); congo red; beef

\* 通讯联系人. Tel: (025)84470301, E-mail: cxc70@163.com(徐春祥); Tel: (025)84470304, E-mail: cpuwsl@126.com(王岁楼).

基金项目: 江苏省质量技术监督局科技项目(KJ112501).

收稿日期: 2013-03-22

★此文系“2012年第五届华东地区色谱质谱学术报告会暨仪器展示会”优秀论文。

刚果红,化学名为 3,3'-[(1,1'-联苯)-4,4'-双偶氮]双(4-氨基萘-1-磺酸)二钠,分子式为  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ , C. I. 22120, 结构式见图 1。又名直接红 28、直接大红、棉红、直接朱红,属于联苯胺为母体的红色偶氮染料。刚果红是水溶性染料,易溶于乙醇<sup>[1]</sup>,与纤维素纤维间有极强的吸附力。目前一般用于临床诊断淀粉样病变、作为生物染色剂及酸碱指示剂等<sup>[2]</sup>。水溶液中的刚果红可被光催化降解<sup>[3-5]</sup>。刚果红可与机体蛋白结合,为可疑致癌物与诱变剂。被人体吸收后,在人体的正常代谢生化反应条件下,可能发生还原反应使偶氮基断裂,重新生成致癌芳香胺,并经过活化作用改变人体 DNA 的结构与功能,引起病变和诱发癌症<sup>[6-8]</sup>。基于刚果红的毒性作用,纺织业禁用刚果红已久,同时它也被很多国家列为食品中禁用着色剂。但是,在经济利益的驱使下,有不法商家在加工熟牛肉制品的过程中使用刚果红着色,以改善熟牛肉制品的感官色泽,提高销售量。因此,有必要对熟牛肉制品中的刚果红进行检测。

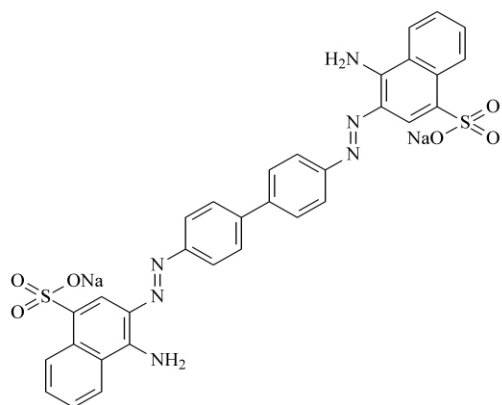


图 1 刚果红结构式  
Fig. 1 Structure of congo red

目前报道的刚果红测定方法主要有分光光度法<sup>[9]</sup>、高效液相色谱-串联单四极杆质谱法<sup>[10,11]</sup>、高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法<sup>[12]</sup>,大部分是针对环境中刚果红的测定。关于食品,目前仅检索到凌睿等<sup>[12]</sup>报道的运用高效液相色谱-串联三重四极杆质谱测定肉制品中的刚果红。但是,其检出限较高,不适用于微量刚果红的分析,且三重四极杆质谱的质量分辨率远低于飞行时间质谱,易发生假阳性事件。四极杆飞行时间质谱具有优异的精确度、灵敏度和扫描速度,并有配套的数据分析软件,可以对复杂样品进行鉴别分析、定量分析、谱图检索等。通过建立待测化合物标准品的高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱的谱图数据库与样品的高效液

相色谱-串联四极杆飞行时间质谱分析得到的质谱信息比对检索,可以有效降低食品样品中其他组分对测定结果的干扰,从而实现食品样品中有害物质的筛查<sup>[13,14]</sup>。

近几年食品安全事件频发,商家为了追求利益最大化,违法添加违禁添加剂,对人民的生命财产造成了严重危害。本文探讨了食品中非法添加刚果红的鉴别和定量方法,采用高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(LC-QTOF MS)首先鉴别未知物,确定其具体成分后,对其采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)进行定量。以期为牛肉及其他肉制品中非法添加刚果红的鉴别、定量提供良好的解决方案。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

1200 RRLC 型高效液相色谱-串联 6530 型四极杆飞行时间质谱仪,MassHunter 色谱工作站及 PCDL 软件自建有着色剂质谱谱图数据库(美国 Agilent 公司); 1290 型超高压液相色谱-串联 API 4000+ 三重四极杆质谱仪,Analyst 软件(美国 AB SCIEX 公司); XW-80A 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); Avanti J-E 型离心机(美国贝克曼库尔特公司); 5418R 型离心机(艾本德中国有限公司); XS-205DU 型电子分析天平(美国梅特勒-托利多公司); FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

刚果红标准品(CAS 573-58-0)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。甲醇、正己烷均为色谱纯,购自德国 Merck 公司。实验室用水为超纯水,由美国 Millipore 公司纯水仪制得。

牛肉样品为市售熟牛肉样品。

### 1.2 实验步骤

#### 1.2.1 标准储备溶液和工作溶液的配制

精确称取刚果红标准品适量置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇配制成质量浓度为 1.0 g/L 的标准储备液。

分别吸取不同体积的刚果红标准储备溶液,用甲醇逐级稀释成质量浓度为 0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.5、1 mg/L 的系列标准溶液。

#### 1.2.2 样品制备

称取 5 g 均匀捣碎的熟牛肉样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中;准确加入 10 mL 甲醇和 10 mL 正己烷,涡旋 5 min;放入离心机中,以 5 000 r/min 的转速离心 5 min;取上清液 2

mL 移入 2.5 mL 离心管中,放入高速离心机中,以 12 000 r/min 的转速离心 2 min。移取上清液于进样小瓶中,必要时适当用甲醇稀释。

### 1.3 实验条件

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> Rapid Resolution HD (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm),定性分析时用两通管代替色谱柱;流动相:甲醇-水(95:5, v/v);流速:0.2 mL/min;柱温:30 °C;进样量:LC-QTOF MS 为 5 μL, UPLC-MS/MS 为 2 μL。

#### 1.3.2 质谱条件

定性条件:Agilent 6530 型四极杆飞行时间质谱仪采用电喷雾离子化(ESI)源,负离子模式;喷嘴电压为 1 000 V,毛细管电压为 3 500 V,碰撞电压为 130 V,锥孔电压为 65 V;干燥气温度为 350 °C;干燥气流速为 5 L/min;雾化器压力为 310 kPa;鞘气温度为 350 °C;鞘气流速为 11 L/min。一级质谱为单级质谱采集模式,采集范围为  $m/z$  100~700;采集速度为 2 spectra/s。二级碎片离子的质谱采集模式为目标离子采集模式,采集范围为  $m/z$  100~700;采集速度为 2 spectra/s;碰撞能为 40、50、60 V。

定量条件:API 4000<sup>+</sup> 型三重四极杆质谱仪采用 ESI 源,负离子模式;碰撞气(CAD)压力 55 kPa,气帘气(CUR)压力 280 kPa,雾化气(GS1)压力 345 kPa,辅助加热气(GS2)压力 345 kPa;离子喷雾电压-4 500 V;毛细管温度(TEM)500 °C;优化的各离子对质谱参数值见表 1。

表 1 质谱优化离子对参数

Table 1 Parameters optimized with the developed method by UPLC-MS/MS

Precursor ion ( $m/z$ )	DP/V	EP/V	Product ion ( $m/z$ )	CE/V	CXP/V
325.0	-95	-10	152.0 <sup>a)</sup>	-30	-22
325.0	-95	-10	416.0 <sup>b)</sup>	-20	-20

DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential.

a) quantitative ion; b) confirmation ion.

### 1.4 着色剂质谱图数据库

采用 Agilent 公司的个人化合物数据库工作站(Personal Compound Database and Library, PC-DL)建立包括刚果红在内的 102 种禁用和限用着色剂的精确分子质量及 QTOF 质谱图数据库。

## 2 结果与讨论

### 2.1 定性方法的建立与优化

未知物的定性鉴别是通过与预先建好的质谱图

库进行检索匹配实现的。按照 1.2.2 节方法进行样品前处理,按照 1.3 节定性条件上机分析。在单级质谱采集模式下采集一级质谱图数据(见图 2)后进行分子特征提取,将提取出的精确质量数导入到 PCDL 软件中,与质谱图库中的化合物进行检索匹配,发现与质谱图库中的刚果红匹配度较高。然后,在目标离子采集模式获取二级质谱图数据(见图 3),导入到 PCDL 软件中进行二级质谱图数据检索匹配,发现与质谱图库中的刚果红二级质谱图数据匹配度较高,分值达到 97% 以上。因此确认该未知物为刚果红。

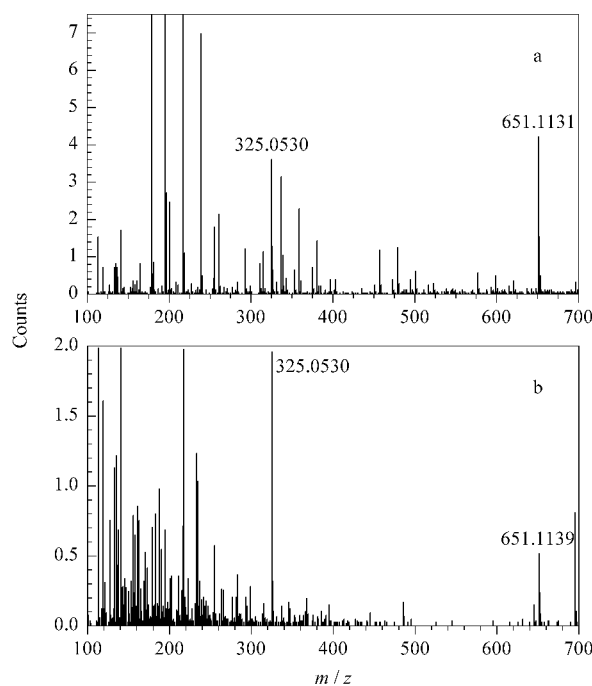


图 2 (a)刚果红和(b)未知物的一级质谱图  
Fig. 2 MS spectra of (a) congo red and (b) the unknown substance

试验中发现,当分别用水、甲醇、乙腈配制刚果红标准溶液时,刚果红在水和甲醇中的溶解度较好,在乙腈中的溶解度较差。为了得到较好的离子化效果,选择采用甲醇配制刚果红标准溶液。同时,由于刚果红结构特殊,其吸附能力较强且在超声波中易降解,所以在样品前处理时采用涡旋提取-高速离心方式净化,而避免采用超声提取-膜过滤方式净化。

进行定性试验分析时,在空白溶剂中发现了与刚果红母离子精确质量数( $m/z$  325.0537)相近的一个质量数( $m/z$  325.1877)。这两个精确质量数在四极杆飞行时间质谱中可以分辨,但是在相对低灵敏度的三重四极杆质谱中难以分辨,因此试验中对此未知干扰物进行了二级质谱确证,图 3 为刚果红和未知干扰物的二级质谱碎片信息。刚果红母离

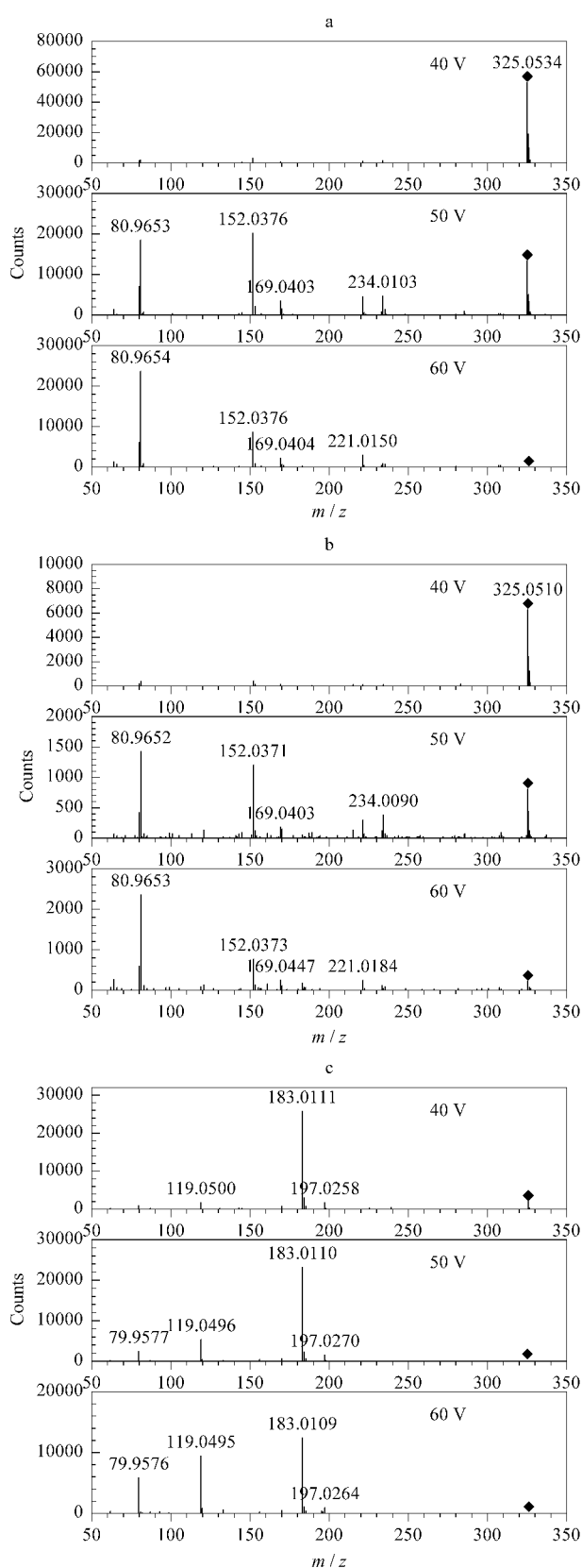


图 3 (a)刚果红、(b)未知物和(c)未知干扰物在不同碰撞能下的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of (a) congo red, (b) the unknown substance and (c) the unknown interfering substance with different collision energies

子 ( $m/z$  325.0537) 的子离子为  $m/z$  234.0103、169.0404、152.0378、80.9553; 未知干扰物母离子 ( $m/z$  325.1830) 的子离子为  $m/z$  281.2457、197.0267、183.0110、119.0496、79.9577。同时, 二者在色谱保留时间上没有区别, 因此在采用三重四极杆质谱仪定量分析时要避免采用未知物的子离子作为定量离子对。

## 2.2 定量方法的建立与优化

色谱条件优化时, 考察了不同流动相体系下刚果红的响应。当流动相中水相比例增大时, 刚果红响应变差, 这可能与刚果红的较强吸附能力有关。采用超高压液相色谱分离, 刚果红的保留时间增加不明显, 这是因为超高压液相色谱采用填充了细粒径微球填料的色谱柱进行分离。色谱柱填料是影响液相色谱系统分离能力的关键因素之一, 在相同线速度下, 填料粒径越小, 理论塔板高度越小, 柱效越高。通常情况下, 超高压液相色谱的出峰时间为普通高效液相色谱出峰时间的 1/10。因此, 一方面因为超高压液相色谱缩短了出峰时间, 另一方面因为刚果红极性较强极易洗脱所以调整流动相比例并没有能够明显增加其保留时间。最终选择了使刚果红响应强度较高的 95% (体积分数) 甲醇作为流动相以保证良好的离子化响应。在此条件下, 刚果红的保留时间为 1.38 min。

质谱条件优化时, 根据刚果红结构中含有磺酸结构, 选择了负离子模式下进行监测。在采用流动注射方式优化刚果红的母离子时, 发现刚果红母离子  $[M - 2Na + H]^-$  ( $m/z$  651.1) 和  $[M - 2Na]^{2-}$  ( $m/z$  325.0) 均有响应。其中  $m/z$  325.0 的响应较强, 因此选择其为母离子。优化的去簇电压 (DP) 为 -95 V、入口电压 (EP) 为 -10 V。然后给予其一定碰撞能优化子离子, 发现在不同碰撞能下  $m/z$  325.0 的母离子有 5 个子离子 ( $m/z$  416.0、182.7、152.0、118.9、81.0) 有较强响应。而从上述 2.1 节四极杆飞行时间质谱定性分析结果可知,  $m/z$  182.7 和 118.9 为未知干扰物子离子。因此选择  $m/z$  152.0 和 416.0 作为母离子  $m/z$  325.0 的监测子离子, 并对 2 个子离子进行了碰撞电压 (CE) 和出口电压 (CXP) 的优化。确定最终的 MRM 检测离子为  $m/z$  325.0  $\rightarrow$   $m/z$  152.0,  $m/z$  325.0  $\rightarrow$   $m/z$  416.0。在最终优化的定量条件下得到刚果红标准品和实际样品的提取离子流图 (见图 4 和图 5)。

## 2.3 定量方法的验证

### 2.3.1 检出限和定量限

以  $S/N = 3$  (噪声以进样量 2  $\mu$ L 时的基线计

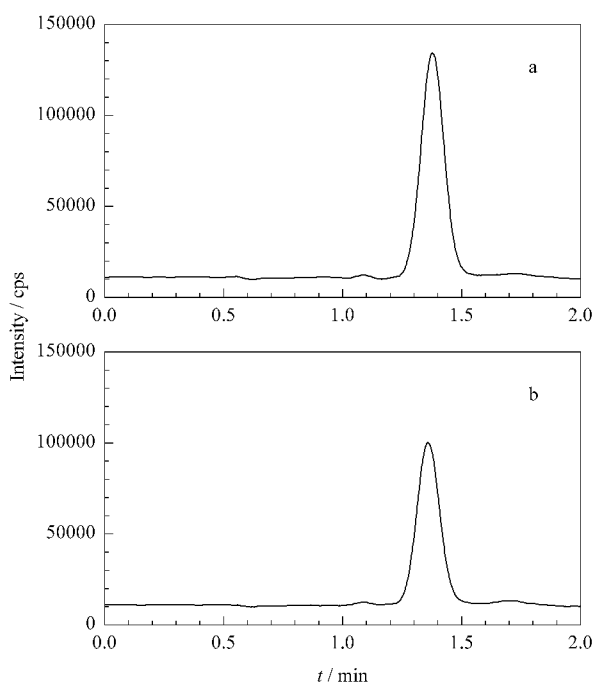


图 4 刚果红标准品的(a)定量离子和(b)定性离子的提取离子流图

Fig. 4 Extracted ion chromatograms of (a) the quantitative ion and (b) the confirmation ion of congo standard

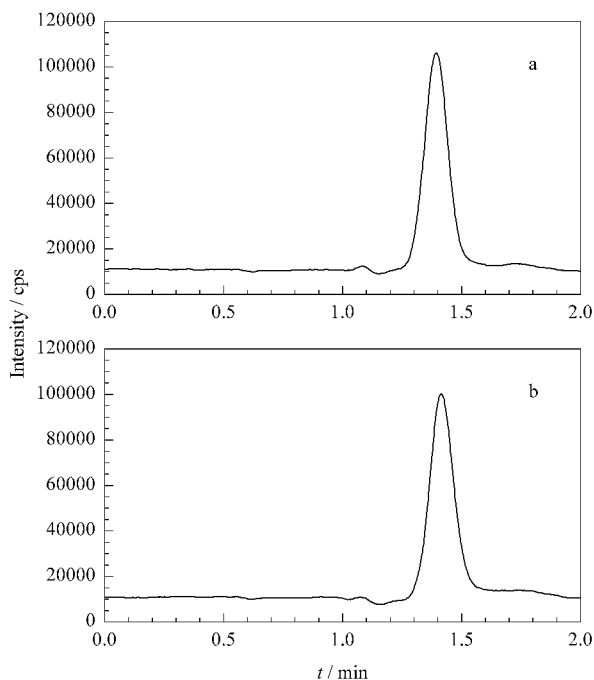


图 5 实际样品的(a)定量离子和(b)定性离子的提取离子流图

Fig. 5 Extracted ion chromatograms of (a) the quantitative ion and (b) the confirmation ion of the real sample

算),刚果红标准溶液的检出限约为 0.01 mg/L。以  $S/N=10$ (噪声以进样量  $2 \mu\text{L}$  时的基线计算),刚果红标准溶液的定量限约为 0.03 mg/L。熟牛肉制品中刚果红的检出限为 0.02 mg/kg,定量限为

0.06 mg/kg。

### 2.3.2 工作曲线和线性范围

分别吸取 1.2.1 节中配制的系列标准工作液,按照 1.3 节定量实验条件上机测定,以峰面积  $Y$  对刚果红质量浓度  $X$  (mg/L) 计算线性回归方程。在 0.03~1 mg/L 线性范围内,线性回归方程为  $Y = 2640.6X - 7372.2$ ,线性相关系数为 0.9998。

### 2.3.3 精密度

分别取 0.05、0.1 和 0.5 mg/L 的标准工作液,重复进样 6 次,以峰面积计算精密度,峰面积的 RSD 介于 2.77%~4.65% 之间,表明仪器精密度良好。

### 2.3.4 回收率

取空白牛肉 9 份,在 0.06、0.2、1 mg/kg 3 个加标水平上进行回收率试验,结果见表 2。可以看出 3 个加标水平的回收率达到 88%~91%,RSD 为 2.20%~3.77%,表明该方法回收率较高且稳定。

表 2 空白牛肉样品中刚果红的加标回收率 ( $n=3$ )

Table 2 Recoveries of congo red spiked in a blank beef sample ( $n=3$ )

Spiked level/ (mg/kg)	Average found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
0.06	0.053	88	3.77
0.2	0.177	88	3.27
1	0.910	91	2.20

## 2.4 牛肉样品中刚果红含量的测定

利用本方法对某市售牛肉作坊中的一个熟牛肉样品进行了检测,结果发现该熟牛肉中刚果红的含量达到 6.32 mg/kg, RSD 为 3.78%。

## 3 结论

采用液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱分析结合谱图库检索,确定未知添加物为刚果红后,建立了超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱快速检测牛肉中刚果红的方法。实验结果表明,该方法具有简便、灵敏度高、准确度高、精密度好的优点。其思路可以为食品中非法添加物的鉴别和定量、食品质量控制和安全评价提供参考。

## 参考文献:

[1] ChemBlink. Congo Red. [2012-10-20]. <http://www.chemblink.com/products/573-58-0C.htm>

[2] Wikimedia Foundation. Congo Red. [2012-10-20]. [http://en.wikipedia.org/wiki/Congo\\_red](http://en.wikipedia.org/wiki/Congo_red)

[3] Lachheb H, Puzenat E, Houas A, et al. Appl Catal B: Environ, 2002, 39(1): 75

[4] Bali U, Satalkaya E, Sengül F. J Haz Mat, 2004, 114: 159

- [5] Cao Y Q, Hu Y Y, Sun J, et al. *Bioelectrochem*, 2010, 79(1): 71
- [6] Steensma D P. *Arch Pathol Lab Med*, 2001, 125 (2): 250
- [7] Sponza D T, Isik M. *Process Biochem*, 2005, 40(8): 2735
- [8] Frid P, Anisimov S V, Popovic N. *Brain Res Rev*, 2007, 53 (1): 135
- [9] Ma W X, Qian B H, Yang X J, et al. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis* (马卫兴, 钱保华, 杨绪杰, 等. *理化检验:化学分册*), 2005, 47(7): 492
- [10] Shi F. *Fujian Analysis and Testing* (侍芳. *福建分析测试*), 2010, 19(2): 60
- [11] He F P, Shi F, Pan L T. *Environmental Pollution and Protection* (贺锋萍, 侍芳, 潘碌亭. *环境污染及防治*), 2011, 33 (4): 71
- [12] Ling R, Hu W Y, Qiao L. *Journal of Instrumental Analysis* (凌睿, 胡文彦, 乔玲. *分析测试学报*), 2012, 31(6): 730
- [13] Zhao Y S, Yang M L, Zhang F et al. *Chinese Journal of Chromatography* (赵延胜, 杨敏莉, 张峰, 等. *色谱*), 2011, 29(7): 631
- [14] Zhao Y S, Chu X G, Wang H, et al. *Journal of Food Safety and Quality* (赵延胜, 储晓刚, 王茜, 等. *食品安全质量检测学报*), 2011, 2(2): 59