肉品中食用胶检测方法的研发

端礼钦[1*]，王静[1]，耿士伟[2]，吴琼[3]，王丰存[1]，杨洪生[4]，孟勇[4]，陶利明[5]，庄丽萍[6]

(1.徐州市农产品质量安全中心，徐州 221000；2.江苏省畜产品质量检验测试中心，南京 210036；3.江苏省农业农村厅，南京 210036；4.江苏省水产质量检测中心，南京 210017；5.苏州市吴江区农业农村局，苏州 215200；6.苏州高新区（虎丘区）农业水务综合执法大队，苏州 215011)

摘要：肉品中食用胶的定性定量检测一直以来是肉品中非法添加物分析领域的盲区，没有对应的检测方法。本研究遴选了胶种标志物 κ-卡拉胶以及分析标志物 κ-卡拉胶二糖，开发了肉品中 κ-卡拉胶液相色谱串联质谱检测方法、柱前衍生液相色谱串联质谱检测方法和柱前衍生液相色谱检测方法。本研究首次解决了肉品中食用胶的定性定量检测问题，获得国家知识产权授权发明专利两项，为其他食品或农产品中食用胶的检测提供了思路和方法。

关键词：肉品；卡拉胶；κ-卡拉胶二糖；液相色谱；液相色谱串联质谱；柱前衍生

Research of detection methodfor ediblecolloid in meat

Dun Li-Qin[1*], Wang Jing[1], Geng Shi-Wei[2], Wu Qiong[3], Wang Feng-Cun[1], Yang Hong-Sheng[4], Meng Yong[4], Tao Li-Ming[5], Zhuang Li-Ping[6]

(1.Agro-food Quality and SafetyCenter of Xuzhou, Xuzhou 221000; 2.Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing 210036; 3.Jiangsu Department of Agriculture and Rural Affairs,Nanjing 210036; 4.Aquatic Products Analysis and Testing Center of Jiangsu Province, Nanjing 210017; 5.Suzhou Wujiang Municipal Bureau of Agricultureand Rural Affairs, Suzhou 215200; 6.Suzhou High Tech Zone(Huqiu) Agricultural and Water-affair Comprehensive Law Enforcement Brigade, Suzhou 215011)

Abstract: There was noqualitative or quantitative detectionmethodforedible colloid in meatbefore these methods wereestablished. This research selected κ-carrageenan and κ-carrageenan disaccharide as detection markers, which were used to detect edible colloid in meat. On this basis,detection methods for edible colloid in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,pre-column derivatization liquid chromatography-tandem mass spectrometryand pre-column derivatizationliquid chromatography method were established and developed.Therefore,the problem of qualitative and quantitative detection of edible colloid in meat

中国仪器仪表学会

was solved for the first time, and two national invention patents which were based on the detection methods were obtained. It also offersa way for the detection methods of edible colloid in other foods and agricultural products.

Key words：Meat; Carrageenan;κ-carrageenan disaccharide; Liquid chromatography; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Pre-column derivatization

1 前言

肉品掺假一直以来都是肉品质量安全中广为诟病的问题，其中最典型的就是注水、注胶问题。注水肉是指在屠宰前向动物灌水，或是屠宰后向肌肉注水而制成的肉品，其目的在于给肉品增重来获取不法收益[1]。注水肉的危害在于不仅降低了肉品的品质，造成病原微生物等污染，还会加速肉品腐败变质速度。注胶肉是不法分子用食用胶或者工业胶替代注水肉中的水，同样通过给肉品增重来达到获取不法收益的目的，多发于零散定点屠宰点和非法屠宰窝点；而且注胶肉隐蔽性更强，除了有注水肉同样的危害之外，工业胶中重金属等残留高，危害更大[2]。

在此之前，注胶肉的检测方法有近红外光谱法、荧光光谱法、低场核磁共振技术等，这些检测方法一般都需要建立数学模型，采用分析统计方法来进行定性检测，无法实现直接定性定量检测[3-5]。

本课题组从2014年开始肉品中食用胶检测方法的研发，2016年申报了国家发明专利《一种畜肉中κ-卡拉胶的液相色谱串联质谱检测方法》，2017年4月发明专利公开，2019年获得发明专利授权，首次解决了肉品中食用胶质谱法定性定量检测问题[6]。为了取得更加有益的检测效果，2022年课题组又开发了畜肉中κ-卡拉胶的柱前衍生-液相色谱串联质谱检测方法和柱前衍生-液相色谱检测方法，同年申报了国家发明专利《一种畜肉中κ-卡拉胶的柱前衍生液相色谱串联质谱检测方法》和《一种畜肉中κ-卡拉胶的液相色谱检测方法》，其中《一种畜肉中κ-卡拉胶的柱前衍生液相色谱串联质谱检测方法》已获得发明专利授权[7]。柱前衍生检测方法适用性更好，选择性更强，便于在检测机构推广应用。

2 注胶肉检测方法技术路线的设计

为了能准确、有效、定性定量地检测出注胶肉中食用胶，课题组建立了三条技术路线以构建完整的注胶肉中食用检测体系。

技术路线一为质谱法直接分析注胶肉中食用胶，具体为：选择胶种标志物→建立前处理

中国仪器仪表学会

方法（分析标志物提取方法、净化方法）→建立仪器检测方法→选择分析标志物→确定定性定量检测母离子子离子→验证方法有效性和专属性。

技术路线二为柱前衍生质谱法分析注胶肉中食用胶，具体为选择胶种标志物→建立前处理方法（分析标志物提取方法、净化方法）→选择分析标志物→建立衍生化方法→建立仪器检测方法→确定定性定量检测母离子子离子→验证方法有效性和专属性。

技术路线三为液相色谱法分析注胶肉中食用胶，具体为选择胶种标志物→建立前处理方法（分析标志物提取方法、净化方法）→选择分析标志物→建立衍生化方法→建立仪器检测方法→验证方法有效性和专属性。

3 检测标志物的选择

3.1 胶种标志物

课题组调研发现在肉品掺假过程中一般使用的胶种有卡拉胶、黄原胶、琼脂等，其中卡拉胶由于成本低，获取方便大多为注胶肉的首选胶种。为了获得最佳的代表性，课题组在选择检测胶种的时候，首选了卡拉胶作为注胶肉检测的胶种标志物。卡拉胶（Carrageenan）是一种亲水性胶体，又称为麒麟菜胶、石花菜胶、鹿角菜胶、角叉菜胶，是一种硫酸半乳聚糖，均是以 1,3-连接-4-硫酸基-β-D 半乳糖（G4S）和 1,4-连接-3,6-内醚-α-D 半乳糖（An）交替连接形成骨架结构，根据硫酸酯结合形态的不同，主要可分为 κ 型、ι 型、λ 型等 7 种类型[8]。工业生产和使用最为广泛的是 κ 型、ι 型和 λ 型卡拉胶，其中 κ-卡拉胶容易形成较脆的凝胶，有泌水性，且使用非常广泛，课题组认为其最有可能被用作非法添加[9]。

3.2 分析标志物

κ-卡拉胶是一种线性高分子聚合物，其分子量大约在 5000-1000000 之间，且 κ-卡拉胶为非常复杂的混合物，通常无法直接使用质谱进行定量定性分析。为了得到了稳定、均一的分析标志物，课题组使用了不同的方法对 κ-卡拉胶进行水解，并对水解产物进行了分析。通过研究发现不同聚合度的寡糖在液相色谱串联质谱上都有检出，随着水解时间的延长，聚合度较高的多糖逐渐减少，最终水解产物大多为低聚合度的寡糖，以 κ-卡拉胶单糖和 κ-卡拉胶二糖为最多，其中 κ-卡拉胶二糖为 κ-卡拉胶最基本的聚合单位。考虑到分析标志物的专属性，κ-卡拉胶单糖可来自于其他类型的卡拉胶水解，但 κ-卡拉胶二糖作为 κ-卡拉胶的基本聚合单元，是 κ-卡拉胶特有结构，因此选择 κ-卡拉胶二糖作为质谱分析方法的分析标志物。综上，κ-卡拉胶二糖来源单一，结构较稳定，在质谱离子源端易电离，可被质谱有效检出，便于定量分析，是合适的 κ-卡拉胶分析标志物。

中国仪器仪表学会

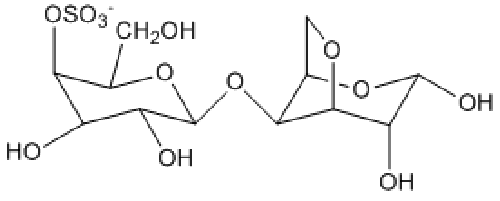

图 1　κ−卡拉胶二糖结构式

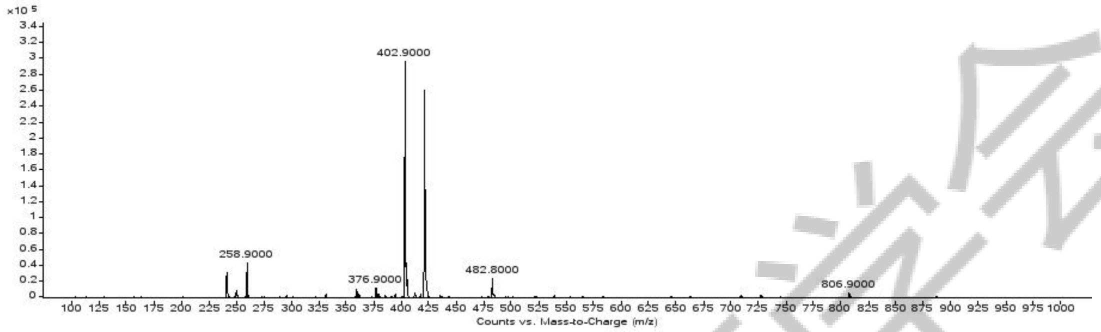

图 2　水解产物扫描的总离子流图

4 前处理方法的建立

肉品中常规成分有水分、蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质等，其中水分含量大约在70%~72%，蛋白质含量大约在 19%~23%，脂肪含量大约在 5%~7%，碳水化合物在 1%左右[10-11]。其中，对检测有影响的干扰物主要是蛋白质、脂肪和碳水化合物。样品水解后，大部分蛋白质和脂肪都可以通过离心、萃取等方式来去除。其中对检测结果有直接影响的是碳水化合物，但其结构与分析标志物不同，因此在色谱柱上保留也有所不同。考虑到检测的简便性，建立了二氯甲烷对水解液多次萃取的前处理方式，经萃取后的水相部分直接上机检测。

5 水解方案的选择

多糖水解的方案一般有酸水解、碱水解、酶水解、超声波水解等。碱性条件下，酸性多糖失去质子，形成盐，但如果多糖内部有酰胺、酯基、羟磺酸等基团则容易被碱反应导致水解。酶水解一般用作彻底水解，本研究中如果使用酶水解得到 κ-卡拉胶单糖则无法保证其单一性来源。而超声波水解，不仅需要使用专用设备，单独使用效率也较低。相比之下，酸水解方法简单，效率较高，水解物成分较单一。

实验发现，水解时间的长短会影响水解效率，当水解时间足够长的时候，κ-卡拉胶可以完全水解为 κ-卡拉胶单糖和 κ-卡拉胶二糖。在一定浓度范围内，酸的浓度越高，其水解的

中国仪器仪表学会

速度越快。同时，我们发现，温度对水解效率也有较大的影响，在一定的温度范围内，温度越高，水解的速度越快。为了达到最高的水解效率，本研究选择采取超声波辅助酸水解，结合了酸水解和超声波水解相结合的方式，使用低浓度盐酸水溶液，在超声波辅助下，一定温度条件下水解，水解时间可控制在 10 min 左右。

6 分析方法的建立

6.1 液相色谱串联质谱法

1）色谱条件

κ-卡拉胶二糖由于极性较强，其结构特点并不适合使用应用最广泛的 C18 柱来进行分离，而糖基分析柱对于分离糖类物质有着非常好的效果，其中以亚乙基桥杂化（BEH）为代表的色谱柱使用比较广泛，在本研究中适合保留分离 κ-卡拉胶二糖。

由于水解后的样品成分相对简单，在去除掉脂肪和蛋白质之后，经色谱柱分离后检出的主要是目标物和基质本身含有的水溶性糖类物质，因此，流动相采用乙酸铵水溶液与乙腈的混合溶液。如果想要取得更好的分离效果，也可以使用梯度洗脱。

2）质谱条件

在 ESI-MS 模式下，课题组尝试了正负离子模式，由于卡拉胶寡糖带有硫酸基团，在负离子模式具有更高的灵敏度，κ-卡拉胶二糖响应值更好。

根据产物离子扫描结果分析推测，m/z 为 403 的离子主要碎裂成 m/z 为 97 和 m/z 为 241 的两个碎片离子，我们推测其碎裂位置可能是 3，6-内醚半乳糖分子内的醚键，另一离子碎片应为脱落的硫酸基[12]。

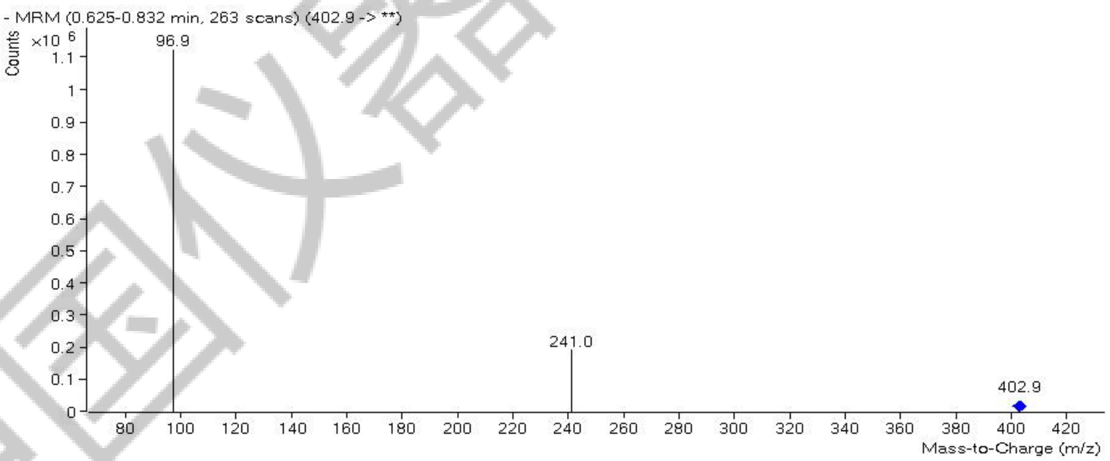

图 3　κ−卡拉胶二糖二级质谱图

因此，选择了 m/z=403 作为母离子，m/z=97，m/z=241 作为碎片离子。其他质谱条件使用安捷伦液相色谱串联质谱的 Optimizer 软件优化。

中国仪器仪表学会

6.2 柱前衍生液相色谱串联质谱法

为了进一步提高方法的适用性，准确性和灵敏度，课题组尝试离子对反相色谱和柱前衍生方法来分离检测 κ-卡拉胶二糖。离子对反相色谱在分离酸性物质的时候，一般选用四丁基氢氧化铵、四丁基氯化铵等物质，考虑到铵盐水溶液的配制繁琐、对仪器设备的影响以及离子对试剂对色谱柱的改性作用，最后选择了柱前衍生方法。

柱前衍生法的特点是不需要专用的糖基分析柱，使用常规流动相即可，其特异性更强，去干扰效果更好，灵敏度度更高。

1）衍生化条件

糖类衍生有很多种方法，常用的衍生化试剂有 3-氨基-9-乙基咔唑（AEC）、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）等[13-14]。经过试验，课题组使用了 PMP 作为 κ-卡拉胶二糖的衍生化试剂，具有操作简单，稳定性好等特点。κ-卡拉胶二糖经 PMP 衍生后疏水性提高，衍生化产物带电荷，可以用多种分离模式对其进行分析。

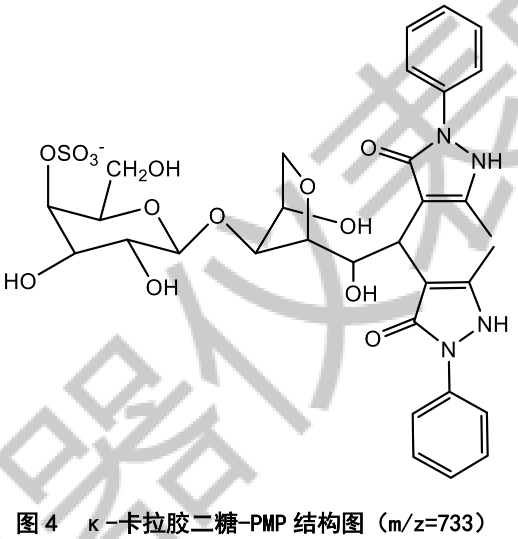

图 4　κ-卡拉胶二糖-PMP 结构图（m/z=733）

2）色谱条件

使用 C18 色谱柱，流动相采用乙酸铵水溶液与甲醇。

3）质谱条件

在多反应监测（MRM）模式下，我们选择了 κ-卡拉胶二糖-PMP（m/z=733）作为母离子，4 种碎片离子作为子离子，子离子的相对分子质量分别为 559.2、299.2、281.1、173.0。

中国仪器仪表学会

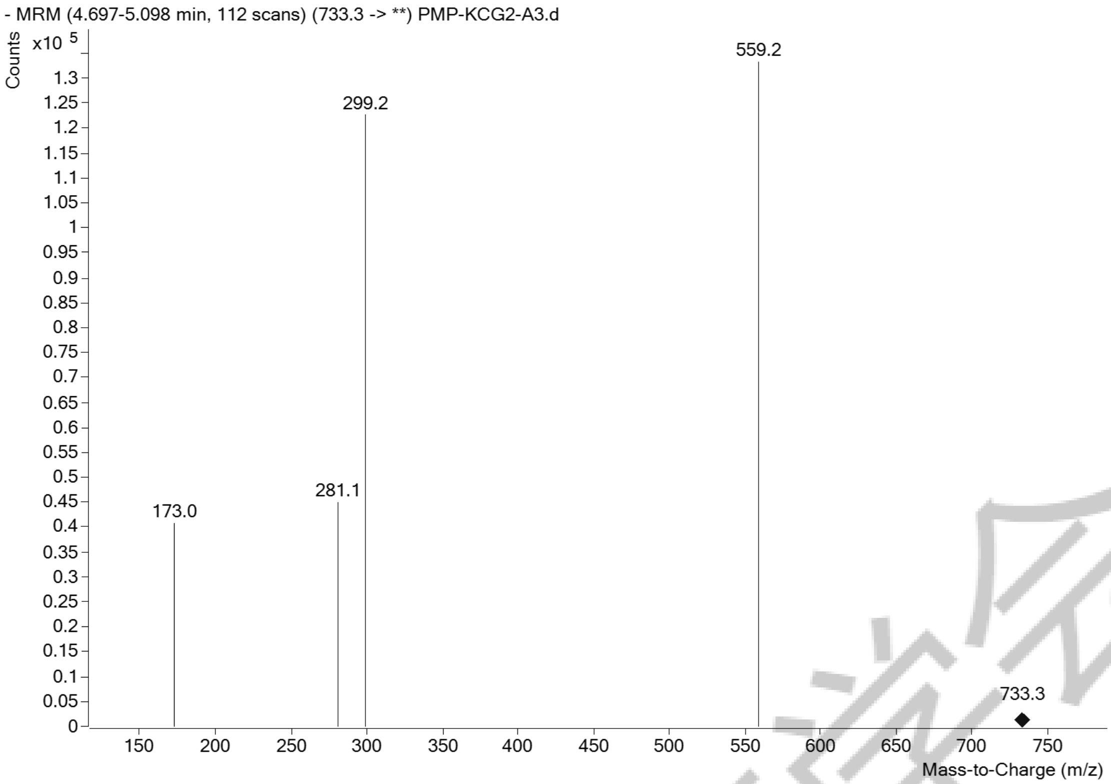

图 5　多反应监测子离子

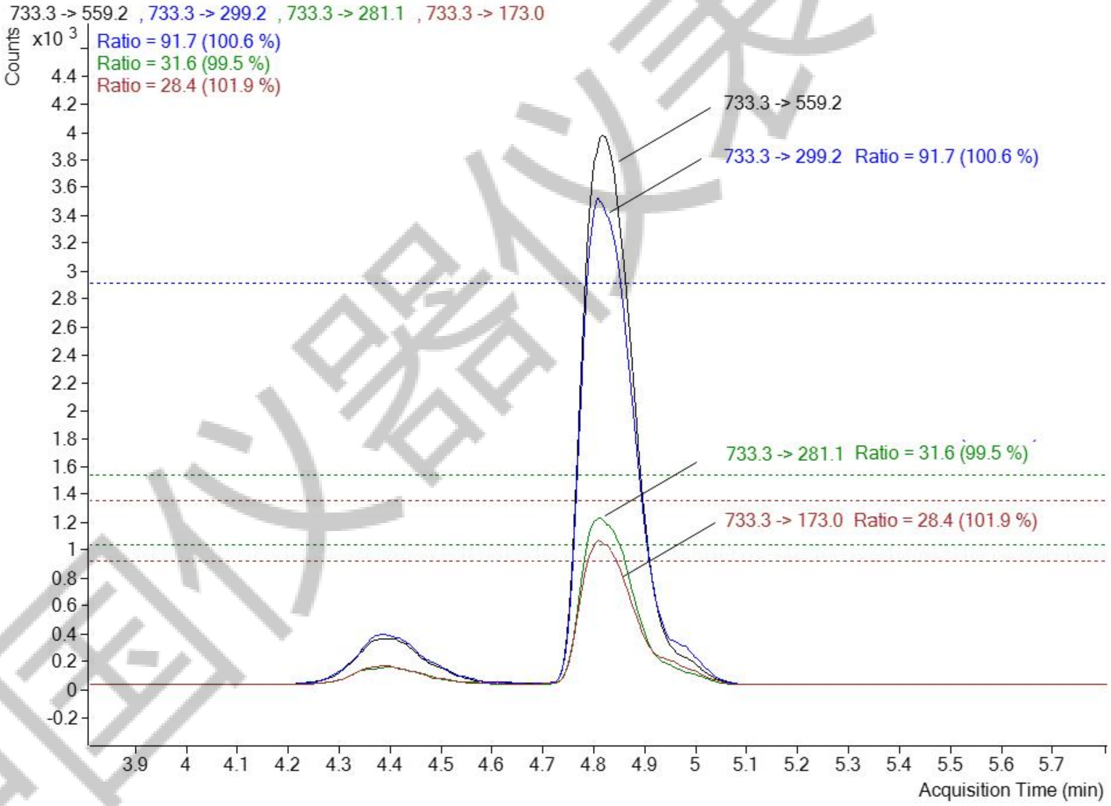

图 6　各子离子丰度

6.3 液相色谱法

1）衍生化条件

中国仪器仪表学会

κ-卡拉胶本身为高分子聚合物，无法直接使用液相色谱进行定量检测；因此需要选择合适的衍生化试剂对水解产物κ-卡拉胶二糖进行衍生化，生成含有紫外吸收基团的衍生化物，才能满足液相色谱紫外检测器检测要求。课题组使用了PMP作为κ-卡拉胶二糖的衍生化试剂，具有操作简单、响应值高、稳定性好等特点。

2）色谱条件

使用C18色谱柱，流动相采用乙酸铵水溶液与甲醇，可采取梯度洗脱。

7 实际应用

给肉品增重而非法添加的卡拉胶的量一般会达到肉品总重量的10%~30%[15]，而课题组开发的质谱检测方法检出限可以达到2~5mg/kg，完全可以满足检测需求。

2017年4月课题组申报的《一种畜肉中κ-卡拉胶的液相色谱串联质谱检测方法》发明专利公开后，2018年国家市场监管总局发布了补充检验方法《畜肉中卡拉胶的测定（BJS201804）》[16]，2021年农业农村部发布了NY/T 3876-2021《猪肉中卡拉胶的检测液相色谱-串联质谱法》[17]，两项标准均是以κ-卡拉胶二糖为分析标志物，使用液相色谱串联质谱来进行检测的，其主要离子对均为403>97，403>241。至此，肉品中的卡拉胶的检测问题基本得到了解决。课题组另一项发明专利《一种畜肉中 κ-卡拉胶的柱前衍生液相色谱串联质谱检测方法》和正在实质性审查的发明专利《一种畜肉中κ-卡拉胶的液相色谱检测方法》将作为肉品中卡拉胶检测标准体系建设的重要补充内容。

另外，除了非法添加之外，卡拉胶作为一种最常用的食品添加剂，使用非常广泛。因此也可以通过本方法来检测食品添加剂卡拉胶在食品中添加的量，可检测譬如加工肉、粉丝、果冻、冰激凌、奶油、奶粉、糖果等食品，所以本研究开发的方法还可以广泛应用在其他食品农产品中食用胶的检测中。

参考文献:

[1]郑炜,王君玮,赵思俊.生猪屠宰前违规使用卡拉胶的检测研究进展[J].中国动物检疫,2015,32(09):69-71.

[2]刘回春.市场存在7种“问题肉”专家调查得6个结论[J].中国质量万里行,2016(11):48-49.

[3]孟一,张玉华,许丽丹等.近红外光谱技术对猪肉注水、注胶的快速检测[J].食品科学,2014,35(08):299-303.

[4]王欣,王志永,陈利华等.注胶肉糜的低场核磁弛豫特性及与近红外光谱技术判别效果的比

中国仪器仪表学会

较[J].食品与发酵工业,2016,42(02):150-156.

[5]黄奇峰,高淑梅,陈国庆等.卡拉胶的荧光光谱特性及其质量浓度预测[J].江南大学学报(自然科学版),2012,11(05):592-596.

[6]端礼钦,陶利明,王静等. 一种畜肉中 κ-卡拉胶的液相色谱串联质谱检测方法[P]. 江苏省：CN106556654B,2019-01-25.

[7]端礼钦,王丰存,王静等. 一种畜肉中 κ-卡拉胶的柱前衍生液相色谱串联质谱检测方法[P]. 江苏省：CN116298005A,2023-06-23.

[8]孟凡玲,罗亮,宁辉等.κ-卡拉胶研究进展[J].高分子通报,2003(05):49-56.

[9]郑瑞峰,王晓娟,吴秋艳等.卡拉胶凝胶保水机理及其应用研究[J].食品安全导刊,2022(08):186-188.

[10]杨月欣.中国食物成分表 2004 第二期[M].北京：北京大学医学出版社，2004，256-263.

[11]余群力,蒋玉梅,王存堂,等.白牦牛肉成分分析及评价[J].中国食品学报，2005,5(004):124-127.

[12]陈欢欢,赵峡,栾晓红等.电喷雾质谱在寡糖序列分析中的应用[J].高等学校化学学报,2015,36(01):1-8.

[13]孙玉姣,王承建,耿腾飞等.κ-卡拉胶寡糖 AEC 柱前衍生物的 LC-ESI-MS/MS^n 分离分析[J].化学学报,2011,69(14):1697-1704.

[14]钟碧萍,吴晓青,周津等.柱前衍生化 HPLC 法分离不同聚合度的壳寡糖[J].生物化工,2019,5(03):16-19.

[15]李欣南,关一夫.掺假肉检验技术发展现状[J].食品研究与开发,2016,37(05):189-193.

[16].市场监管总局关于发布《畜肉中卡拉胶的测定》食品补充检验方法的公告 [2018 年第 10 号][J].中国食品卫生杂志,2018,30(04):367.

[17]中华人民共和国农业农村部公告(第 424 号)[J].中华人民共和国农业农村部公报,2021(8):102-102.

中国仪器仪表学会