

试验与研究

# 衍生液提取-高效液相色谱法 测定食品中甲醛

吕春华<sup>1</sup>, 陈梅<sup>2</sup>, 陈笑梅<sup>1</sup>, 刘海山<sup>1</sup>, 史颖珠<sup>1</sup>

(1. 浙江出入境检验检疫局, 杭州 310012; 2. 浙江工业大学 化学工程与材料学院, 杭州 310014)

**摘要:** 提出了高效液相色谱法测定了几种食品中甲醛含量。以衍生液 2,4-二硝基苯胍乙腈溶液-pH 5 的磷酸盐缓冲溶液(1+1)的混合溶液为提取剂对样品进行提取,以 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为固定相,以甲醇水(70+30)溶液为流动相分离。甲醛的测定下限(10S/N)为 5.0 mg · kg<sup>-1</sup>。以鲜香菇、鲜鱿鱼、奶粉和面粉样品为基体,分别添加 5.0, 10.0, 20.0 mg · kg<sup>-1</sup> 甲醛标准溶液,回收率在 73.3%~97.7% 之间,相对标准偏差(n=6)在 1.4%~5.0% 之间。

**关键词:** 高效液相色谱法; 衍生液提取; 甲醛; 食品

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)09-1005-04

## HPLC Determination of Formaldehyde in Foodstuffs by Extraction with Derivative Solution

LÜ Chua-hua<sup>1</sup>, CHEN Mei<sup>2</sup>, CHEN Xiao-mei<sup>1</sup>, LIU Hai-shan<sup>1</sup>, SHI Ying-zhu<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310012, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Industry, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** HPLC was applied to the determination of formaldehyde in some foodstuffs. The formaldehyde in sample was extract with a mixture of 2,4-dinitro-phenylhydrazine (dissolved in acetonitrile) and phosphate buffer solution of pH 5 (1+1) as derivatizing solution, and separated on Agilent C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). A mixture of methanol and water mixed in the ratio of 70 to 30 (by volume) was used as mobile phase. Values of limit of determination (10S/N) found was 5.0 mg · kg<sup>-1</sup>. Using samples of fresh mushroom, fresh squid, milk powder and flour as matrixes, tests for recovery were made by standard addition method at 3 concentration levels of 5.0, 10.0 and 20.0 mg · kg<sup>-1</sup>, and the results obtained were in the range of 73.3%–97.7%, with values of RSDs (n=6) in the range of 1.4%–5.0%.

**Keywords:** HPLC; Extraction with derivatizing solution; Formaldehyde; Foodstuffs

甲醛具有较高毒性,我国规定严禁将甲醛及其化合物用作食品添加剂<sup>[1]</sup>。食品中甲醛检测时,样品前处理过程可能导致食品中内源性甲醛的产

生<sup>[2]</sup>。如香菇中存在香菇菌酸的酶解反应、甲氧基化合物酸解和含硫化合物热分解等甲醛产生途径;水产品中甲醛来源于氧化三甲胺的分解、蛋白质和脂肪的分解和氧化等;乳制品中甲醛来源于糖和氨基化合物的麦拉德反应、不饱和脂肪酸的氧化分解等。食品中甲醛除了游离态外,还存在多种形式的结合态甲醛。如蛋白质容易与甲醛结合形成复合

收稿日期: 2011-03-09

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局研究课题(2009IK180)

作者简介: 吕春华(1981-),女,浙江东阳人,博士,主要从事理化检验工作。

物, 添加吊白块食品中以甲醛次硫酸氢钠形式存在。食品中甲醛检测时, 样品前处理方法的不同, 影响甲醛的检测值。食品中甲醛前处理方法主要有水蒸气蒸馏法<sup>[3-5]</sup>和水浸法<sup>[6]</sup>。水蒸气蒸馏法能提取游离甲醛和可逆结合态甲醛, 但不能避免食品中的成分形成内源性甲醛; 水浸法能提取游离甲醛, 但不能提取结合态甲醛。目前为止, 能有效避免食品中前体物质释放内源性甲醛, 同时提取游离甲醛和可逆结合态甲醛的前处理方法尚未见报道。

本工作以香菇、鲑鱼、奶粉和面粉为代表性食品, 试验比较了水蒸气蒸馏法、水浸法、乙酸锌-乙酸溶液提取法<sup>[7]</sup>、冷水均质法<sup>[8]</sup>、三氯乙酸溶液提取法<sup>[9]</sup>、氯化钠盐酸溶液提取法<sup>[10]</sup>、衍生液提取法7种前处理方法, 对食品中甲醛检测值的影响, 选择衍生液提取样品中甲醛, 用高效液相色谱法(HPLC)测定。

## 1 试验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配 G 1315B 二极管阵列检测器。

甲醛标准储备溶液:  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2,4-二硝基苯肼(DNPH)乙腈溶液: 称取适量 DNPH, 用乙腈配制成  $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DNPH 溶液。

磷酸盐缓冲溶液:  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠溶液, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调 pH 值至 5。

衍生液: 将 DNPH 乙腈溶液与 pH 5 的磷酸盐缓冲溶液, 按 1 比 1 的体积比混合。

乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯; 试验用水为去离子水。

### 1.2 色谱条件

Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(70+30)溶液, 流量  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温 40 °C, 检测波长 365 nm, 进样量 20 μL。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 衍生液提取

奶粉经 120 °C 烘 1 h 处理制成阳性样品, 面粉中添加适量吊白块溶液制成阳性样品。称取捣碎的香菇、鲑鱼、奶粉、面粉等试样 1.000~2.000 g 置于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入衍生液 20.0 mL, 涡旋混匀。于 60 °C 水浴中振摇提取 1 h, 取出冷却至室温。

#### 1.3.2 净化

将上述提取液, 以不低于  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速离心 5 min。如离心后溶液澄清, 取上清液过 0.45 μm 有机相微孔滤膜, 滤液在色谱条件下进行测定。如离心后溶液浑浊或分层, 加入硫酸铵 8 g, 涡旋混匀, 以不低于  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速离心 5 min。移取上清液于 20 mL 具塞刻度试管或比色管中, 下层溶液用 10 mL 乙腈重复萃取一次, 合并上清液, 用乙腈定容至 20.0 mL。混匀后过 0.45 μm 有机相微孔滤膜, 滤液在色谱条件下进行测定。如样品中脂肪含量较高, 在提取液中加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷, 涡旋混匀, 离心, 弃去上层正己烷, 再进一步净化处理。

#### 1.3.3 甲醛衍生标准溶液的制备

参考文献[11]的方法, 移取适量的甲醛标准工作溶液, 置于 10 mL 具塞刻度试管或比色管中, 加入 pH 5 的磷酸盐缓冲溶液至 5 mL, 再用 DNPH 乙腈溶液定容至 10 mL, 盖上塞后混匀, 于 60 °C 水浴中静置反应 1 h, 取出冷却至室温。溶液过 0.45 μm 有机相微孔滤膜, 滤液在色谱条件下进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沉淀剂的选择

香菇、鲑鱼、奶粉和面粉样品中富含的蛋白质、脂肪和淀粉等会干扰甲醛的测定, 需要进行净化处理。试验分别选择乙酸铅、三氯乙酸、硫酸铵和乙腈作为沉淀剂。结果表明: 乙酸铅和三氯乙酸的本底值较高, 干扰测定; 硫酸铵能较好地沉淀蛋白质和水溶性杂质, 乙腈和水比例为 2~3 时, 能较好地沉淀蛋白质。试验选择乙腈饱和的正己烷去除脂肪、硫酸铵和乙腈沉淀蛋白质等, 通过液液萃取净化衍生液。

### 2.2 衍生液的选择

据文献报道, 在 pH 5 缓冲溶液-乙腈(1+1)条件下, 甲醛和 DNPH 的衍生反应灵敏度较高, 并能够抑制香菇菌酸酶反应释放甲醛<sup>[11-12]</sup>。试验比较了 pH 7 的 DNPH 乙腈溶液-水(1+1)、DNPH 乙腈溶液-pH 5 磷酸盐缓冲溶液(1+1)、DNPH 乙腈溶液-pH 2 磷酸盐缓冲溶液(1+1), 分别用于提取鲑鱼、奶粉、面粉样品中甲醛的效果。结果表明: pH 7 体系的甲醛测定值较低, 此条件下不利于食品中可逆结合态甲醛的提取; pH 2 体系的甲醛测定值较高, 可能食品中有的成分衍生形成其他醛类物质, 所得

甲醛衍生物的光谱图不能完全重叠,表明色谱峰含有杂质;pH 5 体系的甲醛测定值与 pH 2 体系值相近,蛋白质-甲醛复合物、淀粉-甲醛复合物和吊白块在弱酸性条件下受热易分解,衍生剂与分解产物甲醛反应形成稳定的甲醛衍生物,有利于提取食品中可逆结合态甲醛。试验选择 DNPH 乙腈溶液-pH 5 磷酸盐缓冲溶液(1+1)作为衍生液进行甲醛的提取。

### 2.3 提取温度的选择

香菇菌酸的酶活性在 37 °C 时最高,在 60 °C 时酶活性降低,在 80 °C 时酶活性进一步降低。鱿鱼丝在高温蒸煮和焙烤工序中经氧化三甲胺酶催化生成甲醛的量不大,主要是通过高温化学分解途径形成

甲醛,在 90 °C~115 °C 之间,随着温度的升高,甲醛的含量增大。奶粉中麦拉德反应随着温度的升高反应速度加快,温度低于 60 °C 时反应速度较慢。试验选择 60 °C 为提取温度,能有效降低香菇菌酸的酶活性,同时抑制鱿鱼丝和奶粉中前体物质热分解形成甲醛。

### 2.4 不同前处理方法比较

以干香菇、鱿鱼丝、奶粉和面粉为样品,分别采用水蒸气蒸馏法(方法 1)、水浸法(方法 2)、乙酸-乙酸锌溶液提取法(方法 3)、冷水均质法(方法 4)、三氯乙酸溶液提取法(方法 5)、氯化钠-盐酸溶液提取法(方法 6)和衍生液提取法(方法 7) 7 种方法提取样品中甲醛,按色谱条件测定,结果见表 1。

表 1 不同提取方法对干香菇、鱿鱼丝、奶粉、面粉中甲醛测定值的影响 (n=6)

Tab. 1 Effect of different methods of extraction on determination of formaldehyde in dried mushroom, shredded squid, milk powder and flour

提取方法	干香菇		鱿鱼丝		奶粉		面粉	
	测定值 <i>w</i> / (mg · kg <sup>-1</sup> )	RSD / %	测定值 <i>w</i> / (mg · kg <sup>-1</sup> )	RSD / %	测定值 <i>w</i> / (mg · kg <sup>-1</sup> )	RSD / %	测定值 <i>w</i> / (mg · kg <sup>-1</sup> )	RSD / %
方法 1	98.8	6.2	71.6	4.2	12.2	5.3	11.5	6.8
方法 2	1 007	3.1	18.7	5.0	8.7	1.9	4.5	4.5
方法 3	45.2	4.3	-	-	-	-	-	-
方法 4	55.9	5.2	-	-	-	-	-	-
方法 5	-	-	22.4	4.6	-	-	-	-
方法 6	-	-	-	-	-	-	11.4	3.6
方法 7	18.6	4.0	84.2	2.3	11.4	4.1	10.5	5.0

结果表明:方法 1 采用加酸条件高温蒸馏,能提取游离甲醛和蛋白质-甲醛复合物、吊白块等可逆结合态甲醛,但不能避免干香菇、鱿鱼丝、奶粉中前体物质热分解生成内源性甲醛,且蒸馏操作耗时、结果重现性不佳。方法 2 采用 pH 7 的水、40 °C 水浴振摇提取,能提取鱿鱼丝、奶粉、面粉中游离甲醛,不能提取结合态甲醛,且干香菇中存在酶解反应释放内源性甲醛。方法 3 和方法 4 均能在一定程度上抑制香菇菌酸酶反应释放甲醛。方法 5 采用三氯乙酸溶液、60 °C 水浴振摇提取,能提取鱿鱼丝中游离甲醛,与方法 2 的测定值相近。方法 6 采用氯化钠-盐酸溶液、60 °C 水浴振摇提取,使吊白块分解生成甲醛,与方法 1 的测定值相近。方法 7 采用衍生液、60 °C 水浴振摇提取,能有效抑制香菇菌酸酶反应释放甲醛,干香菇中甲醛测定值最低;避免了样品中前体物质热分解生成甲醛,鱿鱼丝、奶粉和面粉中甲醛测定值与方法 1 相近,表明能够提取游离甲醛和可逆结合态甲醛。试验选择方法 7 衍生液提取法进行样品

中甲醛的提取。

### 2.5 标准曲线和测定下限

在色谱条件下对甲醛衍生物标准溶液系列进行测定,甲醛的质量浓度在 0.20~5.00 mg · L<sup>-1</sup> 范围内与响应值呈线性关系,线性回归方程为  $y = 344.6x + 7.222$ ,相关系数为 0.999 9。

按试验方法对鲜香菇、鲜鱿鱼、奶粉、面粉空白样品进行测定,以 10 倍信噪比对应的浓度计算方法的测定下限为 5.0 mg · kg<sup>-1</sup>。

### 2.6 回收试验

在鲜香菇、鲜鱿鱼、奶粉、面粉空白样品中分别添加 5.0, 10.0, 20.0 mg · kg<sup>-1</sup> 甲醛标准溶液进行回收试验,平行测定 6 次,回收率及精密度测定结果见表 2。

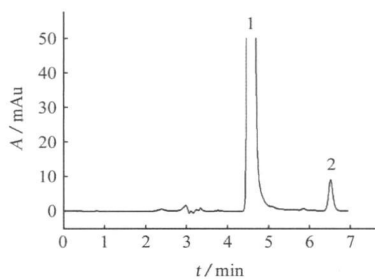
回收率范围为 70%~110%,相对标准偏差均小于 5.0%,符合分析要求。甲醛标准溶液、奶粉样品及奶粉加标样品的色谱图见图 1。

本工作以香菇、鱿鱼、奶粉和面粉为代表性食品,

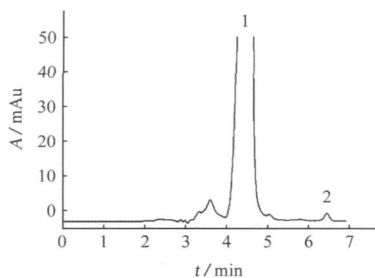
表 2 回收率及精密度试验结果( $n=6$ )

Tab. 2 Results of tests for recovery and precision

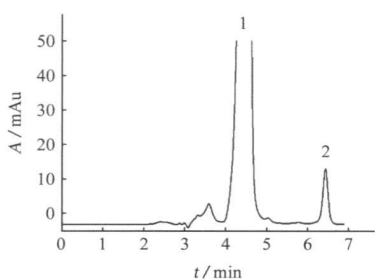
添加水平 $w/(mg \cdot kg^{-1})$	鲜香菇		鲜鱿鱼		奶粉		面粉	
	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
5.0	89.2	4.6	73.9	3.0	78.6	4.9	96.0	4.9
10.0	91.7	3.4	73.3	1.4	82.4	5.0	96.5	3.7
20.0	90.4	2.1	75.9	2.7	84.1	4.5	97.7	2.2



(a)  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  甲醛标准溶液



(b) 奶粉样品溶液



(c) 奶粉加标( $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 样品溶液  
1—衍生剂 DNPH; 2—甲醛衍生物

图 1 甲醛标准溶液(a)、奶粉样品溶液(b)及其加标样品(c)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of formaldehyde standard solution (a), milk powder sample solutions (b), and milk powder sample solutions with addition of standard formaldehyde (c)

衍生液提取法能提取样品中游离甲醛和可逆结合态甲醛,同时能避免样品中内源性甲醛的形成,与现有检测方法比较,衍生液提取法快速、简便、重现性好,是测定食品中甲醛较合理的前处理方法。本方法已代替水浸法成为检验检疫行业标准 SN/T 1547-2011<sup>[13]</sup>。

参考文献:

- [1] GB 2760- 2007 食品添加剂卫生标准[S].
- [2] 张文德. 食品中甲醛的来源及检测意义[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(5): 455-459.
- [3] AOAC Official Method 931. 08 Formaldehyde in Food [S].
- [4] NY/T 1283- 2007 香菇中甲醛含量的测定[S].
- [5] SC/T 3025- 2006 水产品中甲醛的测定[S].
- [6] SN/T 1547- 2005 进出口食品中甲醛含量测定 液相色谱法[S].
- [7] DB33/T 555- 2005 植物源食品中甲醛残留量的测定 高效液相色谱法[S].
- [8] YAMAZAKI H, OGASAWARA Y, SAKAI C, et al. Studies on formaldehyde in lentinus edodes [J]. Journal of the Food Hygiene Society of Japan, 1980, 21 (3): 165-170.
- [9] 郑斌, 陈伟斌, 徐晓林, 等. 液相色谱法测定水产品中游离甲醛含量的研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2006, 25(4): 355-358, 384.
- [10] GB/T 21126- 2007 小麦粉与大米粉及其制品中甲醛次硫酸氢钠含量的测定[S].
- [11] 陈笑梅, 施旭霞, 朱卫建, 等. 高效液相色谱直接测定甲醛衍生物反应条件的研究[J]. 分析化学, 2004, 32 (11): 1489-1491.
- [12] 吕春华, 陈笑梅, 史颖珠, 等. 衍生液提取-高效液相色谱法快速测定香菇中的游离甲醛[J]. 色谱, 2010, 28 (10): 940-944.
- [13] SN/T 1547- 2011 进出口食品中甲醛的测定 液相色谱法[S].

选择衍生液提取样品中甲醛, 高效液相色谱法测定。