

高效液相色谱法测定豆制品中的甲醛

李红英*, 黄程, 李丽霞, 吕稳, 李世兴, 刘芸

(湖北省药品监督检验研究院, 武汉 430075)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定豆制品中甲醛含量的分析方法。**方法** 样品粉碎后, 采用乙腈-2,4-二硝基苯肼和磷酸二氢钠溶液的混合体系为衍生溶液提取样品中的甲醛, 生成的产物经色谱柱 Welch XB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)洗脱, 流动相为乙腈-水(70:30, V:V), 柱温为 35 °C, 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 355 nm, 高效液相色谱法检测。**结果** 甲醛质量浓度在 0~3.0 μg/mL 范围内呈良好线性, 相关系数 r^2 为 0.9999, 在 2、10 和 40 μg 3 个加标水平的回收率为 87.22%~93.92%, 相对标准偏差为 0.75%~3.87%, 检出限为 0.05 mg/kg。**结论** 本方法灵敏度高, 操作简便, 准确可靠, 适合于测定豆制品中甲醛的含量。

关键词: 豆制品; 甲醛; 衍生液提取; 高效液相色谱法

Determination of formaldehyde in soybean product by high performance liquid chromatography

LI Hong-Ying*, HUANG Cheng, LI Li-Xia, LV Wen, LI Shi-Xing, LIU Yun

(Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of formaldehyde in soybean product by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The formaldehyde in the smashed sample was extracted from the derivatized solution which was a mixed system of acetonitrile-2,4-dinitrophenylhydrazine and sodium dihydrogen phosphate solution, and then the product was eluted by a column of Welch XB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-water (70:30, V:V) at 35 °C, and the flow rate was 0.8 mL/min. The detection wavelength was 355 nm, and it was detected by high performance liquid chromatography. **Results** Under optimal experimental conditions, good linearity was observed in the range of 0-3.0 μg/mL with a correlation coefficient (r^2) of 0.9999. The recoveries of formaldehyde at 3 levels (2, 10 and 40 μg) were 87.22%-93.92% and the relative standard deviations (RSD) were between 0.75% and 3.87%. The limit of detection was 0.05 mg/kg. **Conclusion** The established method is simple, rapid, reliable and accurate, which is suitable for the detection of formaldehyde in soybean product.

KEY WORDS: soybean product; formaldehyde; extracted with derivative solution; high performance liquid chromatography

1 引言

甲醛是一种具有刺激性气味的气体, 被世界卫生组织

确定为致癌和致畸物质^[1,2]。食品中的甲醛主要来源于某些食品中正常的代谢成分和外界引入, 外界引入主要为环境污染、加工过程产生和非法人为添加^[3]。由于甲醛具有

*通讯作者: 李红英, 博士, 主管技师, 主要研究方向为食品化妆品质量安全与检测。E-mail: lihongy02190117@163.com

*Corresponding author: LI Hong-Ying, Ph.D, Technologist-in-Charge, Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China. E-mail: lihongy02190117@163.com

漂白、防腐的作用,一些不法商家在食品中非法使用甲醛,导致食品质量安全受到极大挑战,因此,加强食品中甲醛的监测对保证食品安全具有重要意义。

目前,甲醛的检测方法有分光光度法^[4-6]、荧光法^[7]和色谱法^[8-13]等。其中高效液相色谱法以其无干扰、易操作、检测灵敏度高优点广泛用于各行业甲醛的测定。关于食品中甲醛检测的标准主要有 DB41/T 424-2005^[14], NY/T 1283-2007^[15], GB/T 21126-2007^[16], SC/T 3025-2006^[17],其中 DB41/T 424-2005 包含非发酵豆制品的测定,检测方法为变色酸法和乙酰丙酮分光光度法,但易受干扰,专属性不高。关于豆制品的检测方法灵敏度较低且易受干扰,因此建立一个高效稳定的检测方法对豆制品日常监管和补充完善甲醛标准检测体系具有重要意义。

本研究采用直接衍生化高效液相色谱法测定豆制品中的甲醛含量,测定结果可靠,提高了检测的灵敏度和选择性,为开发测定豆制品中甲醛含量的有效检测方法提供依据。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

样品为非发酵豆制品;甲醛标准溶液(100 $\mu\text{g/mL}$,北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);实验用水为 millipore 用水;2,4-二硝基苯肼(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);其他试剂(分析纯,国药集团)。

2.1.2 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(配 2998 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司);Milli-Q A10 超纯水机(美国 Millipore 公司);METTLER TOLEDO 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液:称取 150 mg 2,4-二硝基苯肼,用乙腈溶解定容至 1000 mL,配制成 0.15 g/L 的 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液;

磷酸盐缓冲溶液:称取 31.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,用水溶解定容至 1000 mL,配制成 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠溶液;

衍生液:将 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液与磷酸盐缓冲溶液 1:1(V:V)混合。

2.2.2 样品溶液的制备

称取粉碎均匀的豆制品 2.0 g,置于 50 mL 具塞离心管中,加 20 mL 衍生溶液,涡旋混匀,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 60 min,取出冷却至室温,离心,取上清液过 0.45 μm 有机相滤膜,在色谱条件下进行测定。

2.2.3 色谱条件

色谱柱为 Welch XB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈:水(70:30, V:V),流量为 0.8 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为 355 nm,进样量 10 μL ,洗脱方式为等度洗脱。

2.2.4 标准溶液的制备

分别吸取不同体积的甲醛标准溶液,置于 50 mL 刻度离心管中,加衍生液至 20 mL,配制成浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,涡旋混匀,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 60 min,取出冷却至室温,取上清液过 0.45 μm 有机相滤膜,在色谱条件下进行测定,以甲醛质量浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),绘制工作曲线,外标法计算样品中甲醛的含量。

3 结果与分析

3.1 衍生液及用量的选择

本实验选用 2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)作为衍生试剂, DNPH 与衍生产物 2,4-二硝基苯腙均易溶于乙腈,据文献报道,在 pH 5 缓冲溶液-乙腈条件下,甲醛与 DNPH 的衍生反应灵敏度较高^[18,19],0.2 mol/L 的磷酸二氢钠溶液 pH 约为 5,故本实验选择 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液与 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠溶液的混合体系作为衍生反应溶液。甲醛与 DNPH 反应的摩尔等量关系为 1:1,为了保证甲醛能彻底反应,本研究选择加入稍过量的 DNPH。根据有关文献报道, DNPH 浓度为 2.0% 和 DNPH 浓度为甲醛 1.2 倍满足衍生反应要求^[8,18]。本实验选择 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液与缓冲溶液 1:1(V:V)混合作为直接提取衍生液,按照 2.2.4 对含有甲醛 240 μg 的标准溶液加入衍生液至 20 mL 进行实验(其中甲醛浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$)。结果发现 10 mL 0.15 mg/mL 的 2,4-二硝基苯肼溶液完全可以满足衍生的需要,见图 1。所以本实验最终选取 20 mL 0.15 mg/mL 的 2,4-二硝基苯肼溶液与 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液 1:1(V:V)混合液作为衍生液的用量。

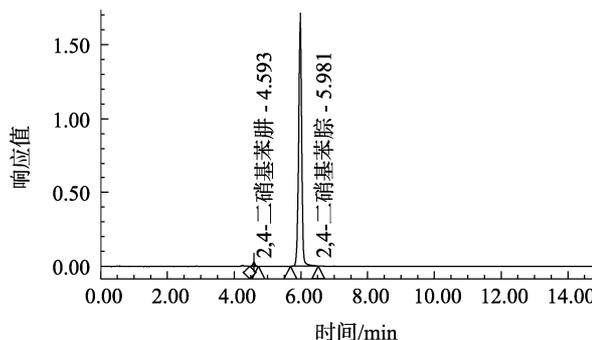


图1 12 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醛标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of formaldehyde standard solution(12 $\mu\text{g/mL}$)

3.2 衍生温度和时间的选择

本实验选取 30、40、50、60、70、80 °C 为衍生温度, 2、10 和 40 μg 3 个水平添加量($n=6$), 衍生时间为 60 min, 进行衍生温度实验, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 3 个添加水平下, 随着温度的升高, 衍生产物峰面积呈现升高的趋势, 60 °C 以后变化较小, 其中 10 μg 和 40 μg 2 个添加量水平在 70 °C 以后生成产物的峰面积有下降的趋势。由相关文献得知甲醛反应一般在 60 °C 反应较快, 绝大多数蛋白质在 70 °C 时都会变性沉淀, 能被 0.45 μm 滤膜滤除, 不会进入色谱系统^[7,19]。

本研究在 60 °C 条件下选取衍生时间 20、40、60、90 和 120 min, 2、20 和 50 μg 3 个添加量水平, 进行衍生时间实验, 并同时选取衍生时间 60 min 做标准曲线, 计算回收率。3 个添加水平在 60 °C 不同衍生时间的回收率具体见表 1。

由表 1 可以看出, 反应时间大于等于 60 min, 回收率计算结果均在 90% 以上, 随着反应时间的增长, 回收率升高, 但变化幅度不大, 从节省成本和提高效率等方面综合考虑选择反应温度为 60 °C 和衍生时间为 60 min。

3.3 线性范围与检测限

将甲醛标准溶液逐级稀释配制成 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液, 按照 2.2.4 所述进行衍生

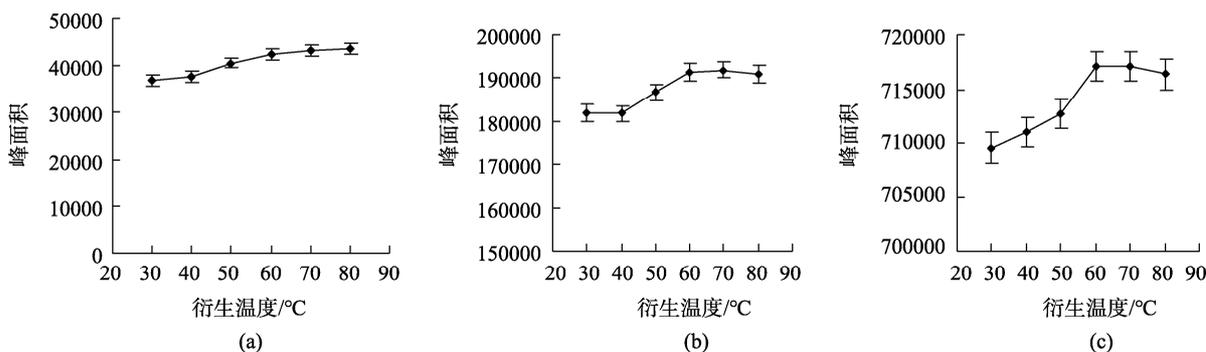
化处理, 在上述色谱条件下进行检测, 同时进行空白实验。以甲醛质量浓度为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 见图 3。由图 3 可以看出, 甲醛质量浓度在 0~3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好。将标准溶液加入豆制品中按标准曲线溶液方法处理后, 进行色谱测定, 扣除空白后信噪比为 3 的灵敏度计算检出限, 当取样量为 2 g 时, 本方法的最低检出浓度为 0.05 mg/kg, GB/T 21126-2007 的检出浓度为 0.08 mg/kg, 本实验建立的方法检出浓度低于 GB/T 21126-2007。

3.4 回收率实验

取粉碎均匀的豆制品样品(其中样品经甲醛标准曲线法计算, 含量为 0.19 $\mu\text{g}/\text{g}$), 分别添加 2、10、40 μg 3 个水平的甲醛标准溶液, 按本研究建立的方法进行加标回收率实验, 每个水平平行 6 份, 计算回收率和相对标准偏差, 结果见表 2。从表 2 中可以看出, 3 个水平平均回收率范围为 87.22%~93.92%, 相对标准偏差为 0.75%~3.87%, 回收率和相对标准偏差符合 GB27404-2008 实验要求。

3.5 精密度

取粉碎均匀的同一种豆制品 6 份, 向其中分别加入 120 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲醛标准溶液, 然后在实验建立的优化条件下进行精密度实验, 测定结果的峰面积见表 3。结果显示相对标准偏差为 0.73%, 说明该方法具有良好的精密度。



注: 添加量水平 a: 2 μg ; b: 10 μg ; c: 40 μg 。

图 2 不同衍生温度衍生物峰面积变化曲线($n=6$)

Fig.2 Curves of peak area of derivatives changed with temperature ($n=6$)

表 1 60 °C 时不同衍生时间的测定结果
Table 1 Results of different derivative times at 60 °C

衍生时间/min	加标量/ μg	回收率/%	加标量/ μg	回收率/%	加标量/ μg	回收率/%
20	2	84.18	20	84.91	50	89.58
40	2	85.68	20	87.68	50	90.04
60	2	93.25	20	91.99	50	91.85
90	2	95.17	20	93.89	50	94.65
120	2	95.89	20	94.17	50	94.72

表2 加标回收实验结果 (n=6)
Table 2 Results of recovery tests (n=6)

加标量/ μg	回收率测定结果/%						平均回收率/%	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
2	88.81	81.55	91.03	88.47	85.04	88.41	87.22	3.87
10	96.17	94.34	92.08	94.17	92.73	94.05	93.92	1.52
40	92.79	94.05	93.23	93.32	93.22	91.92	93.09	0.75

表3 精密度实验结果
Table 3 Results of precision of the method

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
峰面积	240547	245292	240770	241475	243017	241663	242127	0.73

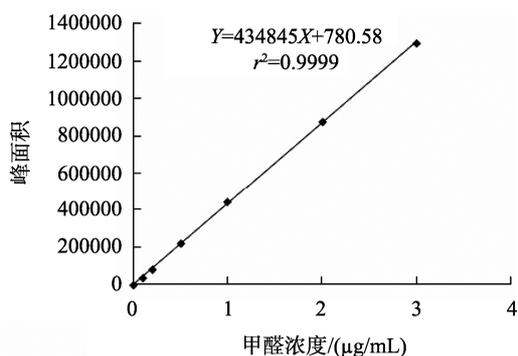


图3 甲醛标准曲线

Fig.3 Standard curve of formaldehyde

3.6 样品的测定

用建立的方法对2018年国家食品监督抽检中的部分豆制品进行测定,测定结果见表4。由表4可以看出,测定结果与抽检方案使用的标准检测方法GB/T 21126-2007^[16]测定结果一致。

表4 实际样品检测结果
Table 4 Results of formaldehyde in different samples

样品	序号	建立方法测定结果/ $\mu\text{g/g}$	GB/T 21126-2007测定结果/ $\mu\text{g/g}$
腐竹	样1	0.41	0.42
	样2	0.43	0.45
	样3	0.48	0.50
	样4	1.30	1.40
豆腐	样1	0.24	0.30
	样2	0.19	0.19
	样3	0.23	0.19
	样4	0.26	0.29
香干	样1	0.22	0.25
	样2	0.75	0.68
	样3	0.34	0.33
	样4	0.29	0.33
	样5	0.17	0.25
蛋白类豆制品	样1	0.20	0.23
	样2	0.26	0.22

4 结论

本研究建立了衍生液直接提取,高效液相色谱法测定豆制品中甲醛含量的分析方法。衍生化试剂直接加到样品中,将提取与衍生化同时进行,大大缩短了前处理的时间,使前处理过程更简单易操作。本研究建立的方法,灵敏度高,精密度好,准确可靠,适用于豆制品中甲醛含量的检测。

参考文献

- 黄种乾, 李亚楠, 高丽霞, 等. 食品中甲醛分析方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 4712-4717.
Huang ZQ, Li YN, Gao LX, et al. Research advances of analysis techniques of formaldehyde in foods [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(12): 4712-4717.
- 李忠军, 邹训重, 黎彧, 等. 甲醛测定方法的进展概述[J]. 广东微量元素科学, 2014, 21(6): 28-32.
Li ZJ, Zou XZ, Li Y, et al. The research summary of formaldehyde determination methods [J]. Guangdong Trac Elem Sci, 2014, 21(6): 28-32.
- 靳红果, 刘华琳, 张瑞, 等. 食品中甲醛及其检测方法[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 373-376.
Jin HG, Liu HL, Zhang R, et al. Review of analytical methods for the determination of formaldehyde in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(19): 373-376.
- 李俊, 刘辉, 刘嘉, 等. 乙酰丙酮分光光度法检测果蔬中甲醛含量的改进研究[J]. 食品科技, 2016, 41(9): 289-294.
Li J, Liu H, Liu J, et al. Improvement on acetylacetone spectrophotometry for formaldehyde detection in fruits and vegetables [J]. Food Sci Technol, 2016, 41(9): 289-294.
- 王冬芬, 李道敏. 乙酰丙酮法测定香菇中的甲醛[J]. 河南预防医学杂志, 2014, 25(1): 40-42.
Wang DF, Li DM. Determination of formaldehyde in mushrooms acetyl acetone method [J]. Henan J Prev Med, 2014, 25(1): 40-42.
- 李俊, 吕都, 陈中爱, 等. 果蔬中甲醛提取方法的优选研究[J]. 食品工业, 2017, 38(1): 32-36.
Li J, Lv D, Chen ZA, et al. Optimization research on extract methods of formaldehyde in fruits and vegetables [J]. Food Ind, 2017, 38(1): 32-36.

- [7] 邵仕萍, 相大鹏, 李华斌, 等. 乙酰丙酮衍生化高效液相色谱-荧光检测法测定食品中的甲醛[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 241-245.
Shao SP, Xiang DP, Li HB, *et al.* Determination of formaldehyde in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection through derivatization with acetylacetone [J]. Food Sci, 2015, 36(16): 241-245.
- [8] 张艳艳, 潘小红, 张礼红. 高效液相色谱法测定食品中甲醛次硫酸氢钠含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1470-1474.
Zhang YY, Pan XH, Zhang LH. Determination of sodium formaldehyde sulfoxylate in food by highperformance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(4): 1470-1474.
- [9] 甘凝岚, 颜春荣, 徐春祥. 高效液相色谱法测定鸭血制品中甲醛含量[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 204-207.
Gan NL, Yan CR, Xu CX. Determination of formaldehyde in duck blood products by HPLC [J]. Food Sci, 2014, 35(12): 204-207.
- [10] 张莉, 江丰, 范志勇, 等. 气相色谱-串联质谱联用仪测定大豆及大豆制品中甲醛含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(11): 153-156.
Zhang L, Jiang F, Fan ZY, *et al.* Determination of formaldehyde in soybean and soybean product using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2016, 37(11): 153-156.
- [11] 唐穗平. 柱前衍生高效液相色谱法检测水产品中甲醛的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2931-2936.
Tang SP. Determination of formaldehyde in aquatic products by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2931-2936.
- [12] 孟繁磊, 牛红红, 宋志峰, 等. 高效液相色谱法测定黑木耳中甲醛含量[J]. 食品工业, 2017, 38(6): 311-313.
Meng FL, Niu HH, Song ZF, *et al.* Determination of formaldehyde content in black fungus by HPLC [J]. Food Ind, 2017, 38(6): 311-313.
- [13] 刘瑞芳, 廖和菁, 胡礼渊, 等. 高效液相色谱法测定进口鱼柳中的吊白块方法研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(1): 164-166.
Liu RF, Liao HJ, Hu LY, *et al.* Study on the determination method of the sodium formaldehyde fulfoxylate in imported fish fillet by HPLC [J]. Food Res Dev, 2016, 37(1): 164-166.
- [14] DB41/T 424-2005 食品中甲醛合次硫酸氢钠(吊白块)的测定[S].
DB41/T 424-2005 Determination of sodium formaldehyde sulfoxylate (hanging white block) in food [S].
- [15] NY/T 1283-2007 香菇中甲醛含量的测定[S].
NY/T 1283-2007 Determination of Formaldehyde Content in *Lentinula edodes* [S].
- [16] 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].
GB/T 21126-2007 Determination of sodium formaldehyde sulfoxylate in grain products [S].
- [17] SC/T 3025-2006 水产品中甲醛的测定[S].
SC/T 3025-2006 Determination of formaldehyde in aquatic products [S].
- [18] 魏昭, 吴蕊, 梁勃, 等. 2,4-二硝基苯肼衍生化-高效液相色谱法测定面粉中的甲醛[J]. 食品安全导刊, 2016, (11): 67-68.
Wei Z, Wu R, Liang B, *et al.* Determination of formaldehyde in flour by high performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (11): 67-68.
- [19] 吕春华, 陈梅, 陈笑梅, 等. 衍生液提取-高效液相色谱法测定食品中甲醛[J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47(9): 1005-1008.
Lv CH, Chen M, Chen XM, *et al.* HPLC determination of formaldehyde in foodstuffs by extraction with derivation solution [J]. Ptca (Part B: Chem Anal), 2011, 47(9): 1005-1008.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



李红英, 主管技师, 主要研究方向为食品化妆品质量安全与检测。
E-mail: lihongy02190117@163.com