

# 柱前衍生高效液相色谱法检测水产品中 甲醛的含量

唐穗平\*

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300)

**摘要:** **目的** 建立柱前衍生高效液相色谱法检测水产品中甲醛含量。**方法** 样品经绞碎匀浆后, 经 2, 4-二硝基苯肼-乙酸钠缓冲液衍生液(1:1, V:V)于 60 °C 衍生 1 h, 冰浴冷却后的衍生物直接上高效液相色谱检测, 以 ODS-C<sub>18</sub> 柱子为分离柱, 甲醇-水(70:30, V:V)为流动相等度洗脱, 二极管阵列检测器在 365 nm 波长处检测, 外标法定量。**结果** 甲醛在 0~10 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数为 0.9994, 方法检出限为 0.5 mg/kg。空白样品在 1.0、5.0 和 20.0 mg/kg 添加水平下, 回收率在 88.2%~95.3% 之间, RSD 在 0.75%~1.82% 之间。对水产品 9 种样品中的甲醛进行了测定, 其中 6 个样品检出甲醛, 含量范围为 1.51~64.04 mg/kg。**结论** 该方法简便、灵敏、准确, 可适用于水产品中甲醛含量的分析。

**关键词:** 甲醛; 水产品; 柱前衍生; 高效液相色谱法

## Determination of formaldehyde in aquatic products by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization

TANG Sui-Ping\*

(Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of formaldehyde in aquatic products by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization. **Methods** After homogenation and homogeneity, samples were derivatized with 2, 4-dinitrobenzene hydrazine derivative-sodium acetate buffer (1:1, V:V) at 60 °C for 1 h. After ice bath cooling, the derivatives were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using ODS-C<sub>18</sub> column for separation with methanol and water (70:30, V:V) as the mobile phase for isocratic elution, and then detected by diode array detector at 365 nm wavelength with external standard method for quantification. **Results** Formaldehyde had a good linear relationship in the range of 0~10 mg/L with correlation coefficient of 0.9994, and the limit of detection was 0.5 mg/kg. The recoveries spiked at 3 levels of 1.0, 5.0 and 20.0 mg/kg were 88.2%~95.3% with RSD of 0.75% ~ 1.82%. Nine aquatic products were determined, and 6 samples were detected, the content range of formaldehyde were 1.51~64.04 mg/kg. **Conclusion** The method is simple, sensitive and accurate, which can be applied for the analysis of formaldehyde in aquatic products.

**KEY WORDS:** formaldehyde; aquatic product; precolumn derivatization; high performance liquid chromatography

\*通讯作者: 唐穗平, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测与研究。E-mail: Tang2068@126.com

\*Corresponding author: TANG Sui-Ping, Master, Engineer, Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail: Tang2068@126.com

## 1 引言

甲醛是一种具有强烈刺激性气味的气体,其水溶液俗称具有防腐、保鲜的作用“福尔马林”。用甲醛浸泡后的水产品不易腐烂、保存期延长,且吸水后膨胀定型、体积增大、重量增加,外观鲜亮悦目。研究表明,甲醛对呼吸道和人体免疫系统均有较大的影响<sup>[1,2]</sup>,长期接触低剂量甲醛会引起慢性呼吸道疾病、鼻咽癌、结肠癌、脑瘤和月经紊乱,还会有新生儿染色体异常、白血病以及青少年记忆力和智力下降等症状。甲醛具有凝固作用,易与人体内蛋白质的氨基发生反应产生不易分解和排泄的化合物,该化合物在人体内累积到一定程度时,可能会引起白血病<sup>[3]</sup>。

甲醛检测常用的方法有分光光度法和色谱法,分光光度法主要有间苯三酚法、亚硝基亚铁氰化钠法等<sup>[4,5]</sup>。色谱法主要分为气相色谱法(gas chromatograph, GC)<sup>[6-8]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等<sup>[9-11]</sup>。其中分光光度法操作简便,仪器需求简单,容易制成快速检测的成品,但灵敏度、准确度较低,易受干扰造成假阳性结果,样品的基体对检测的结果也有影响。气相色谱中甲醛出峰较快,杂质干扰大<sup>[12-14]</sup>。

目前对水产品中甲醛的测定主要采用标准 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》<sup>[15]</sup>中的高效液相色谱法,该方法样品制备采用水蒸气蒸馏法比较耗时且提取不完全,不利于实验批量检验。本研究提出的使用缓冲溶液提取直接代替蒸馏,简化前处理的同时又能减少蒸馏时所造成的误差,具有操作简单、基质干扰少等特点,适合水产品中甲醛含量的检测。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

岛津 LC20A 高效液相色谱仪(配有二元泵、柱温箱、自动进样器和 PDA 检测器,日本岛津公司); IKA 涡旋器(德国 IKA 公司); Sigma 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); HGC 氮吹仪(恒奥公司); THZ-100B 恒温水浴摇床(上海一恒科技有限公司); Sigma 搅拌机(美国 Sigma 公司)。

甲醛(分析纯,纯度 35%~40%,广州化学试剂厂); 甲醇(色谱纯,纯度 99.9%,上海安谱科学仪器有限公司); 无水乙酸钠(分析纯,纯度 99.0%,天津市天力化学试剂有限公司); 2,4-二硝基苯肼(分析纯,纯度 99.0%,广州化学试剂厂); 乙酸钠缓冲溶液(称取 2.64 g 无水乙酸钠,以适量水溶解,加入 1.0 mL 冰乙酸,水定容至 500 mL,乙酸调节 pH 4.0); 水为去离子水。

带鱼、鲫鱼、龙头鱼等甲醛水产品样品分别购买于佛山市水产品批发市场和大型超市。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 标准溶液的配制

1000 mg/L 标准储备液:称取标定后相当于 0.1 g(精确至 0.001 g)的甲醛于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度;

标准工作溶液:将标准储备液用水分别稀释成 0、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10 mg/L 的标准系列溶液。

### 2.2.2 样品前处理

称取绞碎匀浆样品 2 g(精确至 0.01 g)于聚四氟乙烯离心管中,加入 20 mL 2,4-二硝基苯肼-乙酸钠缓冲液衍生液(1:1, V:V),于涡旋器中涡旋 2 min,置于 60 °C 恒温水浴摇床中振摇,1 h 后取出冰浴冷却至室温,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

### 2.2.3 液相色谱条件

色谱柱型号: ODS-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 365 nm; 进样体积: 20 μL; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇:水(70:30, V:V)等度洗脱。

## 3 结果与分析

### 3.1 衍生液溶剂的选择和 pH 值控制

本研究在配制 2,4-二硝基苯肼溶液时比较了甲醇、乙腈和乙醇作为衍生液溶剂提取效果,结果表明甲醇作溶剂时甲醛衍生物的响应值比乙腈和乙醇的响应值高,而且甲醇的毒性和成本比乙腈低,对环境的污染低,所以选择甲醇为衍生液的溶剂。

经比较 pH 分别为 1.0、2.0、4.0、7.0 和 9.0 的乙酸钠缓冲溶液下的衍生效果(见图 1),结果发现衍生反应在酸性溶液中反应完全,而且在 pH 在 1.0、2.0 和 4.0 时无明显差别,经综合考虑选择提取 pH 为 4.0。

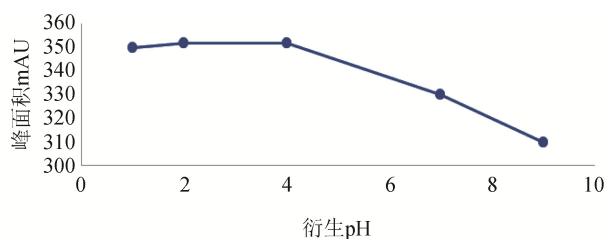


图1 衍生 pH 对甲醛提取的影响

Fig. 1 Effects of derivative pH on the extraction of formaldehyde

### 3.2 衍生温度和时间的比较

试验中发现,在相同条件下衍生温度和时间是有区别的。分别采取 20、40、60 和 80 °C 的衍生温度进行提取(见图 2),结果发现,在 60 °C 条件下提取率最高;同时考察了衍生时间分别为 10、20、30、40、60、90 和 120 min(见图 3),结果发现,在 60 min 条件下提取率最高。所以,试验确定 60 °C 条件下衍生 1 h。

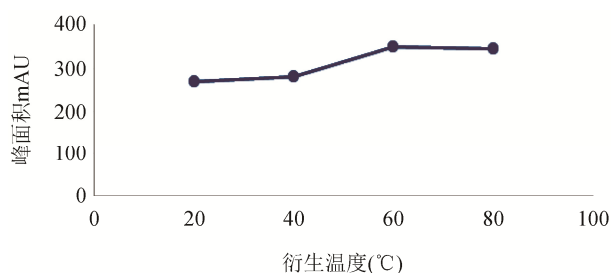


图 2 衍生温度对甲醛提取的影响

Fig. 2 Effects of derivative temperature on the extraction of formaldehyde

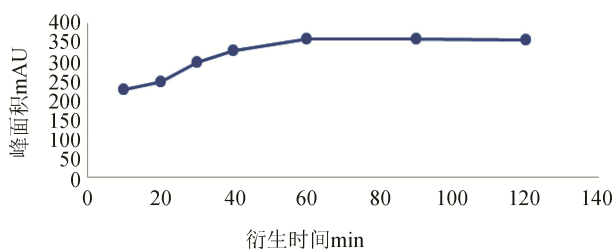


图 3 衍生时间对甲醛提取的影响

Fig. 3 Effects of derivative time on the extraction of formaldehyde

### 3.3 样品谱图

将空白溶液、标准品溶液、样品溶液与样品加标溶液按照 2.2.3 色谱条件上机, 结果见图 4~7。

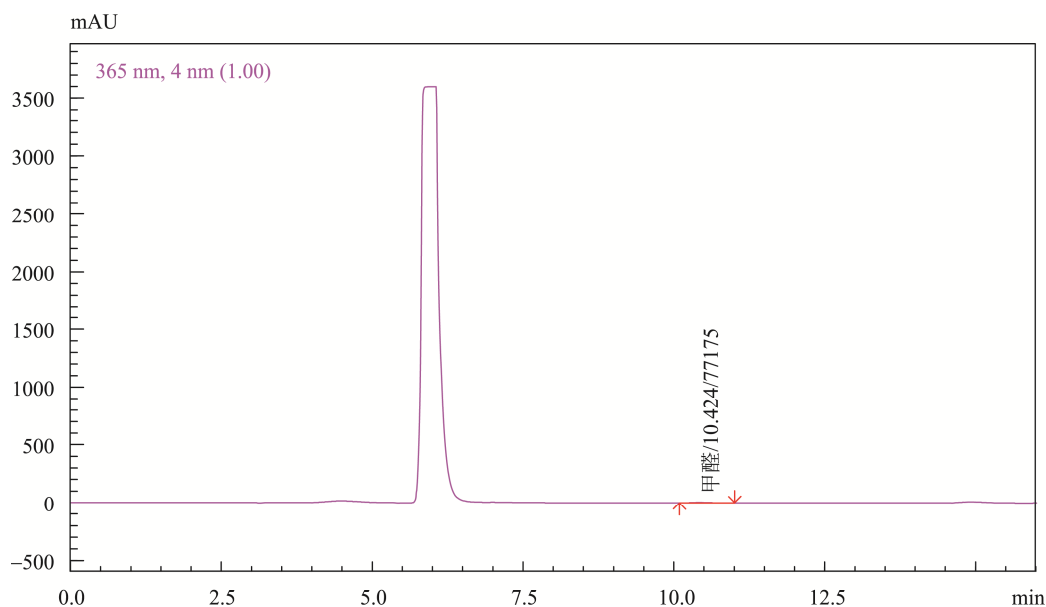


图 4 空白溶液色谱图

Fig. 4 Chromatogram of blank solution

### 3.4 线性范围与检出限

配制 5 个不同浓度的甲醛标准溶液, 分别为 0、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10 mg/L, 与样品同步衍生后, 在 2.2.3 色谱条件进行测定。以质量浓度  $X$  为横坐标、峰面积  $Y$  为纵坐标, 通过最小二乘法作图可得线性回归曲线(见图 8), 其回归方程为:  $Y=605.3X-55.2$ , 相关系数  $r=0.9994$ 。以  $S/N$  为 3 计算方法的检出限为 0.5 mg/kg。

### 3.5 回收率试验

取带鱼、鲫鱼、龙头鱼样品加入甲醛标准品溶液, 使样品的加标量分别为 1.0、5.0 和 20.0 mg/kg。每个加标水平取 6 个平行样, 其回收率与相对标准偏差结果见表 1。从表 1 中看出, 3 个添加水平的平均回收率在 88.2%~95.3% 之间, RSD 在 0.75%~1.82% 之间, 这说明方法的准确度和精密密度均达到分析要求。

### 3.6 水产品及其制品中甲醛含量调查结果

结合本研究柱前衍生法和水蒸气蒸馏法作为样品前处理方法, 利用高效液相色谱法检测了常见海产鱼类、淡水鱼类和水产制品 9 种样品, 海产鱼类鳕鱼和银鱼检出甲醛含量较高, 水产制品中鱿鱼丝和虾干也检出甲醛(见表 2), 结果表明两种前处理方法测得甲醛含量相近, 检出的甲醛含量柱前衍生法比水蒸气蒸馏法要稍高, 表明该方法提取完全, 回收率较高, 是一种适合水产品中甲醛检测方法。

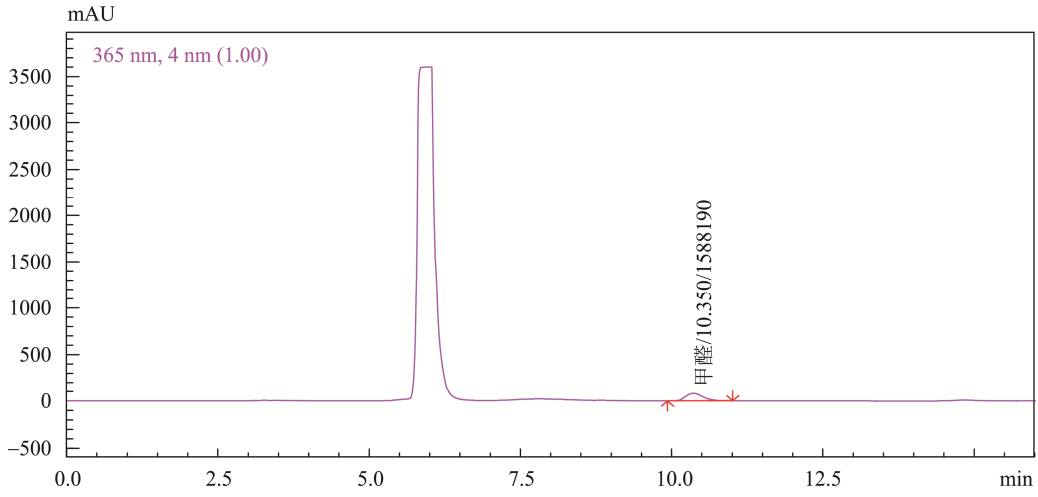


图 5 标准溶液色谱图

Fig. 5 Chromatogram of standard solution

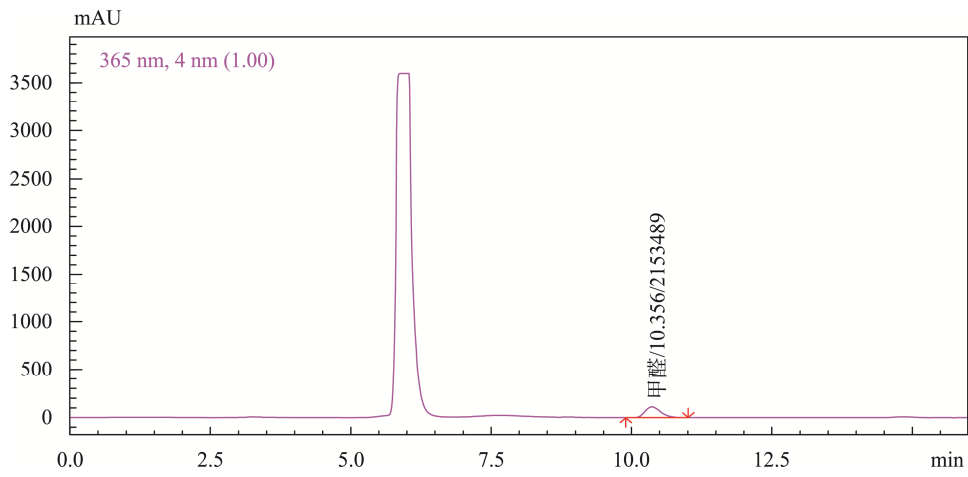


图 6 样品溶液色谱图

Fig. 6 Chromatogram of sample solution

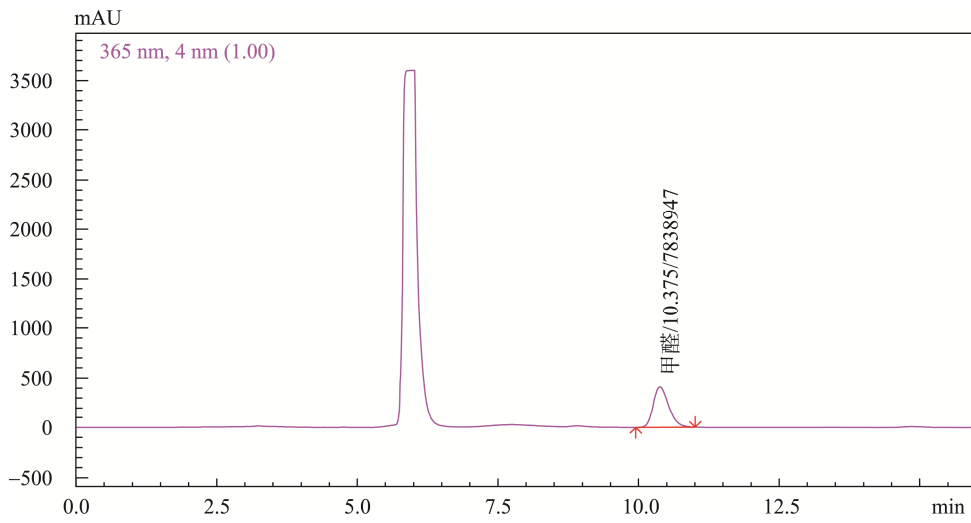


图 7 样品加标溶液色谱图

Fig. 7 Chromatogram of spiked sample solution

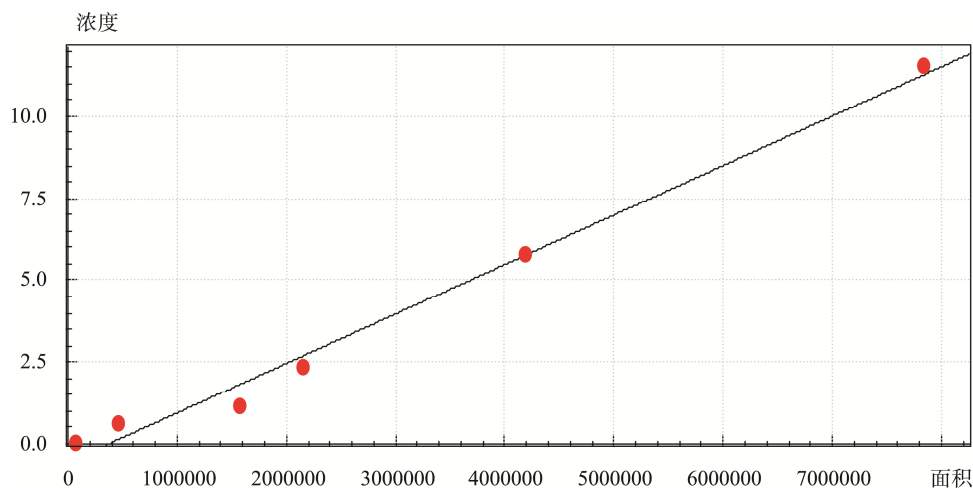


图 8 甲醛标准曲线

Fig. 8 Standard curve of formaldehyde

表 1 不同样品不同添加浓度的回收率(n=6)

Table 1 Recoveries of different samples with different concentrations (n=6)

样品	本底值(mg/kg)	添加浓度(mg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
带鱼	0	1.0	88.2	1.35
	0	5.0	93.2	0.87
	0	20.0	94.7	0.75
鲫鱼	0	1.0	93.5	1.82
	0	5.0	95.2	0.92
	0	20.0	92.9	0.82
龙头鱼	0	1.0	92.7	1.03
	0	5.0	94.1	0.97
	0	20.0	95.3	1.01

表 2 水产品及其制品中甲醛含量测得结果(n=3)

Table 2 Content of formaldehyde in aquatic products (n=3)

样品	存活状态	甲醛含量(mg/kg)	
		柱前衍生法	水蒸气蒸馏法
鳕鱼	海产鱼类, 鲜活水产品	50.12±0.56	48.57±1.12
银鱼	海产鱼类, 鲜活水产品	49.61±0.42	48.31±0.79
鳕鱼	海产鱼类, 冷冻水产品	64.04±1.21	60.14±1.42
带鱼	海产鱼类, 冷冻水产品	1.51±0.87	1.11±0.32
带鱼	海产鱼类, 冷冻水产品	未检出	未检出
鲫鱼	淡水鱼类, 鲜活水产品	未检出	未检出
鱿鱼丝	水产制品, 干制品	36.11±0.71	30.14±0.23
虾干	水产制品, 干制品	27.91±0.18	27.02±0.77
龙头鱼	水产制品, 干制品	未检出	未检出

水产品中甲醛的产生机理研究还较少,研究表明水产品中甲醛的产生一方面来自加工过程中甲醛的污染,这是影响水产品中甲醛含量的重要方面。近年来,一些不法商贩和生产厂家为追求产品的感官性状和延长保鲜时间,改变产品的口感,而向水产品中添加甲醛<sup>[16]</sup>;另一方面是由于水产品中存在的氧化三甲胺相关的酶及微生物的作用。水产品一般采用冰鲜、冷冻、冷藏贮藏,在贮藏过程中酶是主要影响因素,其中氧化三甲胺酶(TMAO-ase)是最主要的酶,这种酶以氧化三甲胺为底物。氧化三甲胺酶广泛分布于海产动物组织中,特别是在鳕类中的含量较高。

## 4 结论

本研究建立了柱前衍生高效液相色谱法测定水产品中的甲醛含量。样品加入 2, 4-二硝基苯胍-乙酸钠缓冲液衍生液, 60 °C 衍生 1 h 后冷却, 直接用于液相色谱检测。试验结果表明, 该方法具有样品前处理简单、回收率良好和数据准确的优点, 可适用于实验室水产品中甲醛含量分析的日常工作, 同时为食品中相关非法添加物的检测提供参考。

## 参考文献

- [1] Takigawa T, Horike T, Ohashi Y, *et al.* Were volatile organic compounds the inducing factors for subjective symptoms of employees working in newly constructed hospitals [J]. *Environ Toxicol*, 2004, 19(4): 280–290.
- [2] Nalivaiko E, DePasquale CG, Blessing WW. Electrocardiographic changes associated with the nasopharyngeal reflex in conscious rabbits: vagosympathetic co-activation [J]. *Auton Neurosci*, 2003, 05(2): 101–104.
- [3] Cole P, Axten C. Form aldehyde and leukemia: fill improbable causal relationship [J]. *Nesul Toxicol Pharm*, 2004, 40(2): 107–112.
- [4] 李颖畅, 励建荣. 水产品内源性甲醛的研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(1): 14–18 .  
Li YC, Li JR. Research progress on endogenous formaldehyde in aquatic products [J]. *Food Ferment Technol*, 2014, 50(1): 14–18.
- [5] 赵新准, 孙晶玮, 姚良. 食品中微量甲醛的化学分析研究[J]. *食品工业科技*, 2004, 25(5): 124–126.  
Zhao XZ, Sun JW, Yao L. Chemical analysis of trace formaldehyde in food research [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2004, 25(5): 124–126 .
- [6] 张慧娟, 欧恩伯. 衍生-固相萃取联用分光光度法测定甲醛及应用[J]. *分析科学学报*, 2013 29(2): 174–178.  
Zhang HJ, Ember. Derivative - SPE coupled spectrophotometric method determination of formaldehyde and its application [J]. *J Anal Sci*, 2013, 29(2): 174–178.
- [7] 曹志奎, 靳翠萍, 葛沛沛, 等. 工业甲醛气相色谱分析方法改进[J]. *广州化工*, 2012, 40 (3): 93–94.  
Cao ZK, Jin CP, Ge PP, *et al.* Industrial formaldehyde gas chromatography analysis method to improve [J]. *J Guangzhou Chem Ind*, 2012, 40(3): 93–94.
- [8] Kee CL, Lai CS, Ge XW, *et al.* Partial conversion of methanol to formaldehyde in the gas chromatography injection port and reactivity with amines [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1257(1257): 158–170.
- [9] 韩冬娇, 李敬, 刘红英. 水产品中内源性甲醛的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, (6): 3954–3956.  
Han DJ, Li Y, Liu HY. Research progress on endogenous formaldehyde in aquatic products [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (6): 3954–3956.
- [10] Xu X, Su R, Zhao X, *et al.* Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2011, 85 (5): 2632–2638.
- [11] Wang T, Gao XL, Tong J, *et al.* Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2, 4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent [J]. *Food Chem*, 2012, 131(4): 1577–1582.
- [12] 顾秀英, 鲍忠定, 许荣年, 等. 衍生气相色谱法测定啤酒中的甲醛[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(6): 116–118.  
Gu XY, Bao ZD, Xu RN, *et al.* Derived gas chromatography for determination of formaldehyde in beer [J]. *J Food Res Dev*, 2008, 29(6): 116–118.
- [13] 蒋圆圆, 李学鹏, 邹朝阳, 等. 苹果多酚与甲醛的反应特性及在鱿鱼丝加工中的应用效果研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(6): 90–93 .  
Jiang YY, Li XP, Zou ZY, *et al.* Study on reaction characteristics of apple polyphenols and formaldehyde and its application in dried-seasoned squid processing [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(6): 90–93.
- [14] Bianchi F, Careri M, Musci M, *et al.* Fish and food safety: determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis [J]. *Food Chem*, 2007, 100: 1049–1053.
- [15] SC/T 3025-2006 水产品中甲醛的测定[S].  
SC/T 3025-2006 The determination of formaldehyde in aquatic products [S].
- [16] 周群慧, 彭珉, 王洋. 食品中甲醛测定新进展及各种方法的比较[J]. *食品科技*, 2004, 10: 75–79.  
Zhou QH, Peng K, Wang Y. New progress in determination of formaldehyde in foods and the comparison of various methods [J]. *J Food Sci Technol*, 2004, 10: 75–79.

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



唐穗平, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测与研究。  
E-mail: Tang2068@126.com