

# 柱前衍生高效液相色谱法测定5种常见食用菌中的甲醛含量

李乌云塔娜, 夏远, 赵灵燕, 苏雄, 巴特尔\*

(内蒙古医科大学公共卫生学院, 呼和浩特 010059)

**摘要: 目的** 建立柱前衍生-高效液相色谱法测定5种常见食用菌中甲醛含量。**方法** 将干制与新鲜食用菌用超纯水浸泡, 浸泡液经2,4-硝基苯肼(DNPH)衍生后, 采用高效液相色谱法检测; 色谱柱: C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(70:30, V:V); 流速为1.0 mL/min; 检测波长352 nm; 柱温40 °C。外标法定量测定食用菌中甲醛含量。**结果** 柱前衍生法对甲醛浓度在10.70~214.00 μg/L范围内与其衍生物峰面积呈良好的线性关系, 线性回归系数( $r^2$ )为0.9964, 方法的检出限为4.20 μg/kg(S/N=3)。加标回收率为78.27%~114.26%, 精密度1.55%~9.22%(n=6)。5种食用菌样品仅香菇样品检出甲醛。新鲜香菇甲醛含量超标, 干制后香菇甲醛含量降低, 低至国家标准含量以下。**结论** 本研究的方法简便、快速、准确、稳定, 可用于测定食用菌中甲醛含量。

**关键词:** 食用菌; 柱前衍生高效液相色谱法; 甲醛

## Determination of formaldehyde in 5 kinds of common edible fungi by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography

LI Wu-Yun-Ta-Na, XIA Yuan, ZHAO Ling-Yan, SU Xiong, BA Te-Er\*

(School of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of formaldehyde content in 5 kinds of common edible fungi by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography. **Methods** The dried and fresh edible fungus were soaked with ultra-pure water, the solution was derived from 2,4-nitrophenylhydrazine (DNPH) and detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic column was C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was 70% acetonitrile and 30% water, and flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 352 nm. The column temperature was 40 °C. The external standard method was used to quantitatively detect the formaldehyde in edible fungi. **Results** The calibration curve of the concentration of formaldehyde showed good linearity within 10.70-214.00 μg/L, with the linear regression coefficient ( $r^2$ ) was 0.9964, and the limit of detection of the method was 4.20 μg/kg (S/N=3). The average recoveries were 78.27%-114.26%, and the relative standard deviations were 1.55%-9.22% (n=6). Formaldehyde was detected only in mushrooms. The formaldehyde content in fresh mushrooms was exceed, but the formaldehyde content in dried mushrooms was reduced and below the national standards. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and stable, which can be used to determine the content of formaldehyde in edible fungi.

**KEY WORDS:** edible fungi; pre-column derivatization-high performance liquid chromatography; formaldehyde

\*通讯作者: 巴特尔, 硕士, 副教授, 主要研究方向为儿童卫生学。E-mail: 384676526@qq.com

\*Corresponding author: BA Te-Er, Master, Associate Professor, School of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China. E-mail: 384676526@qq.com

## 1 引言

甲醛为无色透明气体或液体,有刺激性的气味,其 40%水溶液称为“福尔马林”。在消毒、熏蒸和防腐过程中常用<sup>[1]</sup>。低浓度甲醛浸泡水发产品,使食品含水量明显增加并且长期不腐败变质。甲醛易从消化道吸收,甲醛进入人体后可引起肺水肿,肝、肾充血及血管周围水肿。并有弱的麻醉作用。甲醛急性中毒时可表现为喷嚏、咳嗽、视物模糊、头晕、头痛、乏力、口腔粘膜糜烂、上腹部痛、呕吐等。随着病情加重,出现声音嘶哑、胸痛、呼吸困难等表现,严重者出现喉水肿及窒息、肺水肿、昏迷、休克<sup>[2]</sup>。卫生部《食品添加剂使用标准》删除了甲醛,意味着甲醛将不得作为食品添加剂使用,不得检出<sup>[3]</sup>。但有媒体曝光称,因为新鲜的食用菌中含有的水分多,当气温比较高时,20~30 h 就可能腐烂,有些商贩为了降低损失,使用甲醛溶液对长途运输的食用菌进行喷洒保鲜。因为有些菌类本身释放醛类物质,食用菌中的甲醛含量为不超过 10 mg/kg<sup>[4,5]</sup>,使用“甲醛”保鲜剂几乎成了业内的一个“潜规则”。因此,有必要采用操作简便、可靠、选择性好的方法对食用菌中的甲醛含量进行监测和了解<sup>[6,7]</sup>。甲醛本身的分子结构简单,不能够直接被反相色谱柱吸附,需要对其进行柱前衍生<sup>[8,9]</sup>。

本研究采用柱前衍生-高效液相色谱法<sup>[10-12]</sup>检测食用菌中甲醛含量,以 2,4-二硝基苯肼作为衍生液对甲醛进行柱前衍生,生成的 2,4-二硝基苯腙被反相色谱柱吸附,采用紫外检测器检测,以乙腈:水=70:30 (V:V)为流动相,352 nm 波长检测,以保留时间定性,峰面积定量<sup>[13,14]</sup>。同时,本研究抽样检测呼和浩特市金川区食用菌甲醛含量,了解呼和浩特市金川区食用菌安全状况,以期为人群健康膳食选择提供参考,达到保障人群身体健康的目的,为今后对食用菌的研究提供相关数据。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

日立 TRACE 1300 型高效液相色谱仪(配紫外检测器,日本日立公司); C<sub>18</sub> 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本日立公司); RV10 型旋转蒸发器(德国艾卡仪器有限公司); AL204 型电子天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司); TG16-WS 型台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XJG-40-B 型超纯水机(沈阳欣洁科技有限公司)。

甲醛标准溶液(批号: GSB07-3141-2014, 浓度: 100 μg/L, 北京坛墨质检科技有限公司); 2,4-二硝基苯肼(加约 50%水湿润, CAS 号: 119-26-6, 北京坛墨质检科技有限公司); 甲

醇、乙腈(色谱纯,天津益仁达化工有限公司); 磷酸缓冲液(pH=5)(北京坛墨质检科技有限公司); 超纯水(电阻率 < 18.2 MΩ·cm)。

### 2.2 样品采集

2016 年 4 月至 2016 年 6 月期间,分 3 次前往内蒙古呼和浩特市金川开发区某超市和某菜市场,一共随机抽取了市售针菇、杏鲍菇、海鲜菇、口蘑、香菇 5 种食用菌 3 份,每份样品不少于 500 g。

### 2.3 色谱条件

色谱柱为 C<sub>18</sub> 不锈钢柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 40 °C; 紫外检测器; 检测波长 352 nm; 流动相:乙腈-水(70:30, V:V),进样量 20 μL。

### 2.4 衍生化条件

样品液使用体积: 1 mL; 衍生反应时间: 30 min; 衍生反应温度: 20~25 °C; 衍生反应的酸碱度: pH=5<sup>[15]</sup>。

### 2.5 标准溶液的制备

精密量取甲醛标准溶液(100 mg/L),在室温 pH=5 的条件下,用 2,4-二硝基苯肼衍生 30 min,用超纯水制成浓度为 10.70、21.40、53.50、107.00、214.00 μg/L 2,4-二硝基苯腙标准应用液<sup>[2]</sup>。

### 2.6 样品前处理

#### 2.6.1 样品提取

将从呼和浩特市金川区某市场和超市上购得的食用菌新鲜样品,用清水洗净,平均分为两等份,其中一份干制处理,置于恒温加热箱中,加热温度为 100 °C,加热时间为 3 h,得到食用菌干制样品。使用电子天平(精确至 0.01 g),准确称取市场和超市的食用菌新鲜和干制处理的样品使用研钵碾碎后的试样,准确称量为 3.00 g,放置于 250 mL 的具塞锥形瓶中,向其中加入 100 mL 超纯水,盖上其塞子,再将其放置在超声装置中进行超声,超声温度为室温,超声时间为 30 min,超声完成后将其取出即可,最后将食用菌样品于室温下浸泡 15 h。

#### 2.6.2 样品净化

高效液相色谱测定前移取食用菌样品的浸泡液的上层清液定容 100 mL 容量瓶中,再取 10 mL 的离心管中,使用高速离心机(5000 r/min)对食用菌样品液进行离心,离心温度为室温,离心时间为 10 min。

#### 2.6.3 样品衍生化

取离心完成的食用菌样品液的上层清液 1 mL, 2,4-二硝基苯肼溶液 1 mL 于 5 mL 的刻度管中,并用缓冲溶液定容至刻度 5 mL,对食用菌样品上层清液进行衍生化,衍生温度为室温,衍生时间为 30 min,衍生时缓冲溶液 pH 为 5,上层清液衍生后,经 0.45 μm<sup>[11]</sup>滤膜过滤后,滤液供高效液相色谱分析。

表 1 实验室方法学结果  
Table 1 Results of laboratory methodology

名称	保留时间/min	回归方程	相关系数 $r$	线性范围/( $\mu\text{g/L}$ )	检出限/( $\mu\text{g/kg}$ )
甲醛-2,4-二硝基苯胺	5.12	$Y=553047.23+45763.18X$	0.9964	10.70~214.00	4.20

### 3 结果与分析

#### 3.1 方法学考察结果

##### 3.1.1 线性关系

以标准溶液中甲醛-2,4-二硝基苯胺峰面积为纵坐标(Y), 甲醛质量浓度( $\mu\text{g/L}$ )为横坐标(X)进行线性回归, 回归方程及相关系数如表 1 所示, 在 10.70~214.00 $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性关系良好。

##### 3.1.2 检出限

实验以空白甲醛-2,4-二硝基苯胺为基质, 称取湿制香菇 3.0 g( $n=3$ ) 在 25  $\mu\text{g/kg}$  添加水平下, 按照本研究方法进行前处理和上样测定, 按照所得信号值为信噪比最低值的 3 倍计算检测限。方法质量控制结果见表 1。

##### 3.1.3 精密度实验

取 21.40  $\mu\text{g/L}$  甲醛标准溶液, 衍生完后重复进样 6 次, 记录色谱峰面积, 计算甲醛-2,4-二硝基苯胺的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)即仪器的精密度。取同一批次湿制香菇样品, 平行操作 6 次, 按照 2.6 项方法制备样品溶液, 在 2.3 项色谱条件下测定甲醛含量, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)即方法的精密

度。结果显示样品中甲醛含量 RSD 在 2.32%~4.83%之间, 满足检测要求, 结果见表 2。

表 2 精密度实验结果( $n=6$ )  
Table 2 Experiment results of precision ( $n=6$ )

名称	RSD/%	
	仪器精密度	方法精密度
甲醛-2,4-二硝基苯胺	3.18	2.32
新鲜香菇	4.12	4.83

##### 3.1.4 加标回收率

称取同一批新鲜食用菌和干制食用菌各 3 份, 分别加入浓度为 21.40、53.40、107.00  $\mu\text{g/L}$  的标准溶液, 制备加标样品, 按照“2.6”的方法, 经过 6 次平行实验。食用菌样品中甲醛含量平均加标回收率在 78.27%~114.20%之间, RSD 在 1.55%~9.22%之间, 结果见表 3。

#### 3.2 实际样品测定

按照上述含量测定方法对 5 种食用菌甲醛的含量进行测定。每个样品重复分析 3 次。结果见表 4。

表 3 甲醛的加标回收率( $n=6$ )  
Table 3 Recovery rates of organochlorine pesticides in *Radix Glehniae* ( $n=6$ )

名称	21.40 $\mu\text{g/L}$		53.40 $\mu\text{g/L}$		107.00 $\mu\text{g/L}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
新鲜香菇	85.72	5.23	88.23	4.52	94.85	3.56
干制香菇	94.58	4.04	98.65	5.85	101.63	2.48
新鲜金针菇	98.89	6.28	93.91	3.72	97.76	8.50
干制金针菇	90.73	5.45	109.18	5.57	108.17	1.55
新鲜海鲜菇	101.18	4.77	84.69	9.22	84.22	5.70
干制海鲜菇	83.99	8.54	97.02	8.03	94.13	1.92
新鲜杏鲍菇	99.03	6.53	79.55	2.66	107.60	2.46
干制杏鲍菇	106.78	4.96	78.27	6.00	94.86	3.91
新鲜口蘑	94.82	7.66	88.80	4.83	114.20	5.12
干制口蘑	94.79	4.53	104.7	8.72	93.84	4.92
新鲜金针菇	93.26	3.38	88.40	7.66	95.88	7.92
干制金针菇	92.27	5.39	93.55	6.27	106.70	5.29

表 4 2016 年 5 月金川食用菌样品检测结果  
Table 4 The result of sample determination in May, 2016

样品	检测结果/( $\mu\text{g/L}$ )		超标率/%	
	菜市场	超市	菜市场	超市
新鲜金针菇	ND	ND	0	0
干制金针菇	ND	ND	0	0
新鲜海鲜菇	ND	ND	0	0
干制海鲜菇	ND	ND	0	0
新鲜杏鲍菇	ND	ND	0	0
干制杏鲍菇	ND	ND	0	0
新鲜口蘑	ND	ND	0	0
干制口蘑	ND	ND	0	0
新鲜香菇	14.7	11.5	47	15
干制香菇	8.5	8.45	0	0

注: ND 为未检出。

采用柱前衍生高效液相色谱法对呼和浩特市金川开发区某超市和某菜市场购买的食用菌样品进行测定, 实验结果显示仅有香菇样品检出甲醛, 新鲜香菇样品和干制香菇样品检出甲醛含量已超出食用菌中的甲醛含量  $10 \text{ mg/kg}$ <sup>[4,5]</sup> 值已超标, 新鲜香菇经干制处理后甲醛含量明显降低, 其余食用菌样品甲醛含量均未检出。

#### 4 结论与讨论

新鲜香菇中可能含有大部分游离型甲醛和少部分结合型甲醛, 经干制处理, 去除了大部分游离甲醛<sup>[2]</sup>。因此, 可能导致干制处理的香菇甲醛含量明显下降。金针菇、海鲜菇、口蘑、杏鲍菇 4 种食用菌样品中甲醛含量可能是处于极低水平, 低于仪器的检出限, 导致高效液相色谱仪无法根据峰面积对这 4 种食用菌的甲醛含量进行定量。

采用柱前衍生高效液相色谱法测定食用菌中甲醛含量的方法, 检出限低, 操作简便、快捷, 结果准确、科学。尽管柱前衍生所需要的时间较长, 但仍不失为一种值得推广的检测食用菌中甲醛的方法。

新鲜香菇和干制香菇中甲醛含量超标, 但是干制香菇中甲醛比新鲜香菇降低很多, 可以选择干制香菇代替新鲜香菇食用。金针菇、海鲜菇、口蘑、杏鲍菇 4 种食用菌无论是新鲜或是干制都未检出甲醛。通过实验可以证明呼和浩特市金川开发区食用菌安全状况较佳。本研究使用柱前衍生高效液相色谱法测定食用菌甲醛含量, 能够为更好地保障菌类食用食品安全提供科学依据。此外, 在测定甲醛含量的过程中, 应尽可能多的考虑甲醛跟菌类结合态存在的影响。

#### 参考文献

- [1] 吕玉琼, 林凯, 侯穗波, 等. 香菇中甲醛含量的监测报告[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(6): 701.  
Lv YQ, Lin K, Hou SB, et al. Monitoring report of formaldehyde content in *Lentinus edodes* [J]. Chin J Health Lab Technol, 2002, 12(6): 701.
- [2] 彭锦峰, 刘景富, 邵超, 等. HPLC 法测定食用香菇中甲醛的含量[C]. 中国环境保护优秀论文集, 2005.  
Peng JF, Liu JF, Tai C, et al. Determination of formaldehyde in edible *Lentinus edodes* by HPLC [C]. Excellent Collection of Papers on Environmental Protection in China, 2005.
- [3] 马敬军, 周德庆, 柳淑芳, 等. 二硝基苯胍衍生-高效液相色谱法测定水产品中甲醛含量的研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 28-31.  
Ma JJ, Zhou DQ, Liu SF, et al. Determination of formaldehyde in aquatic products by HPLC with dinitrophenylhydrazine derivatization [J]. Marine Fish Res, 2005, 26(1): 28-31.
- [4] 宋凤英, 王永芳, 韩宏伟, 等. 食品中甲醛测定值的探讨[J]. 实验技术与方法, 2002, 14(3): 20-23.  
Song FY, Wang YF, Han HW, et al. Discussion on determination value of formaldehyde in food [J]. Exp Tech Methods, 2002, 14(3): 20-23.
- [5] 王成云, 龚叶青, 谢堂堂, 等. 柱前衍生/高效液相色谱法测定皮革中甲醛含量[J]. 皮革科学与工程, 2011, 21(6): 47-52.  
Wang CY, Gong YQ, Xie TT, et al. Determination of formaldehyde in leathers by pre-column derivation/ultra performance liquid chromatography method [J]. Leather Sci Eng, 2011, 21(6): 47-52.
- [6] 曹国华, 郑剑萍, 杜玮, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定盐酸四环素原料药中微量甲醛含量[J]. 中国药业, 2015, (6): 42-43: 44.  
Cao GH, Zheng JP, Du W, et al. Determination of trace formaldehyde in tetracycline hydrochloride raw material medicine by precolumn derivatization HPLC [J]. China Pharm, 2015, (6): 42-43: 44.
- [7] 郭飞燕, 于海霞, 马轩, 等. 高效液相色谱法测定人造板中甲醛含量的新方法[J]. 林业工程学报, 2015, 29(6): 109-112.  
Guo FY, Yu HX, Ma X, et al. Determination of formaldehyde in wood-based panels by high performance liquid chromatography [J]. China Forest Sci Technol, 2015, 29(6): 109-112.
- [8] 龙举, 张小军, 郭远明, 等. 高效液相色谱法测定海捕鱼中甲醛的含量[C]. 2013 年浙江省渔业科技论坛论文集, 2013.  
Long J, Zhang XJ, Guo YM, et al. Determination of formaldehyde in sea fish by high performance liquid chromatography [C]. Collection of BBS Papers on Fishery Science and Technology of Zhejiang Province in 2013, 2013.
- [9] 赵婷, 赵梅, 温正如, 等. 高效液相色谱法测定织物涂层整理剂中的甲醛含量[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2009, 27(2): 69-72.  
Zhao T, Zhao M, Wen ZR, et al. Determination of formaldehyde content in textile coating agents by high performance liquid chromatography method [J]. J Shaanxi Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2009, 27(2): 69-72.
- [10] 冯敏铃, 李盛安. 高效液相色谱法测定大白菜中甲醛残留效果研究[J]. 现代农业科技, 2013, (9): 281, 284.  
Feng ML, Li SA. Determination of formaldehyde residue in Chinese cabbage by high performance liquid chromatography [J]. Mod Agric Sci Technol, 2013, (9): 281, 284.
- [11] 王圣庆, 郭瑛, 马言顺, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定啤酒中微量甲醛[J]. 化学研究与应用, 2006, 18(2): 214-216.  
Wang SQ, Guo Y, Ma YS, et al. Determination of trace formaldehyde in

- beer by HPLC with precolumn derivatization and UV detection [J]. *Chem Res Appl*, 2006, 18(2): 214–216.
- [12] 甘凝岚, 颜春荣, 徐春祥, 等. 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, *et al.* Determination of formaldehyde in duck blood products by HPLC [J]. *Food Sci*, 2014, 35(12): 204–207.
- [13] 王帆, 王勇, 黄洁玉, 等. 纺织品中游离甲醛含量的高效液相色谱法测定[J]. *分析科学学报*, 2006, 22(4): 428–430.
- Wang F, Wang Y, Huang JY, *et al.* Determination of free formaldehyde in textiles by high performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 2006, 22(4): 428–430.
- [14] 吴新华, 朱瑞芝, 陆舍铭, 等. 高效液相色谱法测定香精中甲醛的含量[J]. *化学试剂*, 2010, 32(9): 817–818, 858.
- Wu XH, Zhu RZ, Lu SM, *et al.* Determination of formaldehyde in flavors using high performance liquid chromatography [J]. *Chem Reagent*, 2010, 32(9): 817–818, 858.
- [15] 李向荣, 黄亚羲. 高效液相色谱法测定草酸二甲酯中甲醛含量[J]. *分析仪器*, 2013, (5): 15–17.

Li XR, Huang YX. Determination of formaldehyde in dimethyl oxalate by HPLC [J]. *Anal Instrum*, 2013, (5): 15–17.

(责任编辑: 武英华)

## 作者简介



李乌云塔娜, 硕士研究生, 实验师, 主要研究方向卫生检验学。  
E-mail: 373991381@qq.com



巴特尔, 硕士, 副教授, 主要研究方向为儿童卫生学。  
E-mail: 384676526@qq.com