

柱前衍生-高效液相色谱法测定婴幼儿 谷类辅食中的甲醛

丘福保*, 卢丽明, 薛荣旋, 陈华宜
(中山市疾病预防控制中心, 中山 528400)

摘要: **目的** 建立柱前衍生-高效液相色谱法测定婴幼儿谷类辅食中甲醛含量的分析方法。**方法** 样品中的甲醛经柠檬酸钠缓冲溶液和含有 2,4-二硝基苯肼的乙腈混合体系衍生提取, 生成的甲醛-2,4-二硝基苯腙经色谱柱 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 2.7 μm)以乙腈-水(70:30, V:V)等度洗脱分离, 柱温 30 °C, 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 355 nm, 外标法定量分析。**结果** 甲醛在 0.025~2.00 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好且相关系数(r^2)大于 0.995, 方法检出限和定量限分别为 0.03 mg/kg 和 0.10 mg/kg, 在 3 个加标水平(1.00、5.00 和 10.0 mg/kg)的平均加标回收率为 86.8%~89.0%, 相对标准偏差为 0.7%~2.1%。**结论** 该方法操作简便, 灵敏度高, 重现性好, 适用于婴幼儿谷类辅食中甲醛含量的测定。

关键词: 婴幼儿谷类辅食; 甲醛; 柱前衍生; 高效液相色谱法

Determination of formaldehyde in infant cereal-based supplementary food by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

QIU Fu-Bao*, LU Li-Ming, XUE Rong-Xuan, CHEN Hua-Yi

(Zhongshan City Center of Disease Control and Prevention, Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of formaldehyde in infant cereal-based supplementary food by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. **Methods** Formaldehyde in the samples was extracted with sodium citrate buffer solution and acetonitrile mixture containing 2,4-dinitrophenylhydrazine, and the resulting formaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone was eluted with acetonitrile-water (70:30, V:V) on a chromatographic column (4.6 mm×150 mm, 2.7 μm). The column temperature was 30 °C, the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 355 nm, and the quantitative analysis was performed by external standard method. **Results** The detection limit and quantitative limit were 0.03 mg/kg and 0.10 mg/kg, respectively. The average standard recoveries were 86.8%-89.0% at the 3 standard levels (1.00, 5.00, and 10.0 mg/kg), and the relative standard deviations were 0.7%~2.1%. **Conclusion** The established method is simple, sensitive and reproducible, which is suitable for determination of formaldehyde in infant cereal-based supplementary food.

KEY WORDS: infant cereal-based supplementary food; formaldehyde; pre-column derivatization; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 丘福保, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品和水质理化检验。E-mail: hmilycat1314@126.com

*Corresponding author: QIU Fu-Bao, Master, Technician, Zhongshan City Center of Disease Control and Prevention, Zhongshan 528400, China. E-mail: hmilycat1314@126.com

1 引言

甲醛又称蚁醛,是一种无色、有刺激性味道的气体,常温下易溶于水和乙醇,已被世界卫生组织列为一类致癌物质^[1,2]。甲醛本身具有防腐杀菌的作用,且成本低廉,在面食和水发食品中可以起到改变色泽、增加韧性和改善口感的效果,因此常被不法商家所使用^[3]。食品中甲醛的来源途径主要有动植物天然代谢产生、原(辅)料中引入、人为非法添加和环境污染等这几种^[4]。当人体内吸收甲醛浓度过高时,其会与蛋白质分子发生交联、凝固,进而引起人体免疫力下降,严重者还会引起细胞核基因突变^[5]。婴幼儿谷类辅食是以一种或多种谷物为主要原料,且谷物占干物质组成的 25%以上,添加适量的营养强化剂和(或)其他辅料,经加工制成。市面上的婴幼儿谷类辅食分为婴幼儿谷物辅助食品、婴幼儿高蛋白谷物辅助食品、婴幼儿生制类谷物辅助食品和婴幼儿饼干或其他婴幼儿谷物辅助食品^[6]。婴幼儿一般 4~6 个月时需开始添加辅食,以训练其吞咽咀嚼能力,从流食开始慢慢过渡为固体食物。因此,加强婴幼儿谷类辅食中甲醛的检测和市场监管对婴幼儿的健康成长具有极其重要的意义。

目前,食品中甲醛检测方法主要有分光光度法^[7,8]、气相色谱法^[9,10]、气相色谱-质谱联用法^[11]、液相色谱法^[12-16]、液相色谱-质谱联用法^[17,18]和快速检测法^[19]。其中快速检测法在定量方面准确度不够理想,分光光度法灵敏度欠佳且比色时受干扰因素较多,色谱法及色谱-质谱联用法在甲醛定性和定量检测方面均具有优势。本文通过研究以 2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)为甲醛衍生化试剂,优化提取和衍生条件,直接衍生提取婴幼儿谷类辅食中的甲醛,用高效液相色谱法测定。以期为大批量婴幼儿谷类辅食中甲醛的测定提供方法参考,为执法部门对婴幼儿谷类辅食市场监管提供执法依据。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); UX620H 电子天平、SevenMulti 系列 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); Multi reax 振荡器(德国 Heidolph 公司); 3K15 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); SWB-2000 恒温水浴摇床(天津奥特塞恩斯仪器有限公司)。

甲醛标准溶液(9.69 mg/mL, 中国计量科学研究院); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 2,4-二硝基苯肼、无水磷酸氢二钠、二水柠檬酸钠、一水柠檬酸、三水乙酸钠、冰乙酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用

水均为超纯水。

婴幼儿谷类辅食样品购于当地超市。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液: 称取 200 mg 纯化后的 2,4-二硝基苯肼, 用乙腈溶解并定容至 100 mL, 配得 2 g/L 的 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液;

磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液: 分别称取 14.626 g 无水磷酸氢二钠和 10.190 g 一水柠檬酸, 各用水定容至 1000 mL, 2 者在 pH 计监测下取不同体积混合, 配得 pH 为 5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液;

柠檬酸钠缓冲溶液: 分别称取 17.352 g 二水合柠檬酸钠和 5.6 g 一水柠檬酸, 各用水定容至 1000 mL, 2 者在 pH 计监测下取不同体积混合, 配得 pH 为 5.0 的柠檬酸钠缓冲溶液;

乙酸钠缓冲溶液: 称取 19.054 g 三水乙酸钠, 用水定容至 1000 mL, 在 pH 计监测下用冰乙酸调节, 配得 pH 为 5.0 的乙酸钠缓冲溶液。

2.2.2 样品前处理

称取 2.0 g 粉碎均匀的样品(精确至 0.001 g)于 50 mL 具塞聚四氟乙烯离心管中, 依次加入 12 mL 柠檬酸钠缓冲溶液、200 μ L 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液和 7.8 mL 乙腈, 涡旋混匀后置于 60 $^{\circ}$ C 恒温振荡水浴箱中反应 40 min, 取出迅速冷却至室温, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μ m 混合相滤膜后上机测定。

2.2.3 仪器条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4.6 mm \times 150 mm, 2.7 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-水(70:30, V:V), 等度洗脱; 流速为 0.5 mL/min; 进样量为 10 μ L; 检测波长为 355 nm。

2.2.4 标准溶液的制备

取适量甲醛标准原液用水稀释为 100 mg/L 和 10 mg/L 的甲醛标准中间液。分别吸取不同体积的 2 种甲醛标准中间液置于 50 mL 具塞聚四氟乙烯离心管中, 补加柠檬酸钠缓冲溶液至 12 mL, 再加入 200 μ L 2,4-二硝基苯肼-乙腈溶液和 7.8 mL 乙腈, 余下操作按 2.2.2 进行。将最终制得浓度为 0.025、0.05、0.10、0.25、0.500、1.00、2.00 mg/L 的标准溶液系列上机测定。

3 结果与分析

3.1 检测波长的选择

本实验选用 2,4-二硝基苯肼作为甲醛的衍生试剂, 利用二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)进行检测。如图 1 所示, 2,4-二硝基苯肼及其与甲醛的衍生物(2,4-二硝基苯腙, 甲醛-DNPH)的紫外吸收光谱在

355 nm 处均有较大吸收, 而且在乙腈-水(70:30, V:V)等度洗脱条件下二者分离情况良好, 故选用 355 nm 作为检测波长。

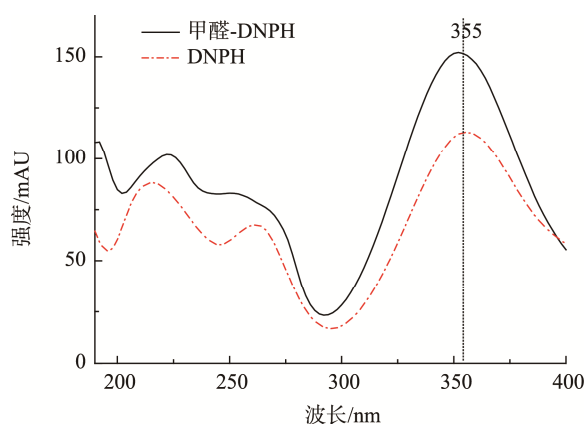
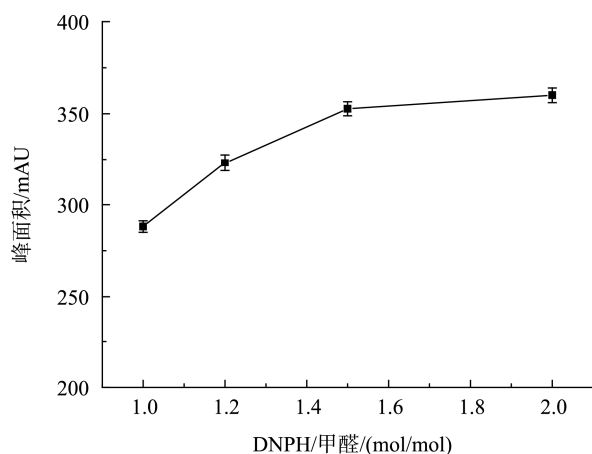


图 1 DNP 和甲醛-DNP 紫外吸收光谱图
Fig.1 The UV absorption spectrogram of DNP and formaldehyde-DNP

3.2 衍生剂用量的选择

甲醛与 2,4-二硝基苯肼生化反应的摩尔等量关系为 1:1, 为保证甲醛尽可能地衍生化, 一般会加入过量的 2,4-二硝基苯肼。在 4 个离心管中加入 400 μL 浓度为 100 mg/L 甲醛标准溶液, 依次加入约 1.0、1.2、1.5、2.0 倍摩尔比的 2 g/L 2,4-二硝基苯肼(分别为 130、160、200、260 μL), 补加超纯水至 20 mL, 混匀, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡水浴反应 1 h 后上机测定。结果如图 2 所示, 随着 2,4-二硝基苯肼加入量的增加, 甲醛衍生物峰面积随之增加, 并在约 1.5 倍摩尔比时达到较高峰值, 随后峰面积增长趋势缓慢。本实验最终选取 2 g/L 2,4-二硝基苯肼的加入量为 200 μL 。



注: 甲醛浓度为 2.00 mg/L。
图 2 DNP/甲醛加入摩尔比($n=3$)
Fig.2 The molar ratio of DNP and formaldehyde ($n=3$)

3.3 提取溶液的选择

洪月玲等^[15]认为甲醛与 2,4-二硝基苯肼的衍生反应在弱酸性缓冲溶液体系下灵敏度较高。本研究配制了 pH 为 5 的乙酸钠-乙酸(A)、柠檬酸钠-柠檬酸(B)和磷酸氢二钠-柠檬酸(C)3 种缓冲溶液, 将缓冲溶液-乙腈各 10 mL(1:1, V:V)混合后作为提取溶液, 其他实验条件均相同的情况下将甲醛标准和实际样品同时进行衍生。结果如图 3a 所示, 在柠檬酸钠-柠檬酸和磷酸氢二钠-柠檬酸 2 种缓冲溶液中, 甲醛衍生物峰面积响应相差不大, 且均比乙酸钠-乙酸缓冲溶液高。

选取柠檬酸钠缓冲溶液作为水相提取溶液, 进一步调节其与乙腈的比例, 结果如图 3b 所示, 当柠檬酸钠缓冲溶液与乙腈的体积比例为 12:8 时, 甲醛衍生物峰面积响应最佳。实验最终选取了柠檬酸钠缓冲溶液-乙腈体系(12:8, V:V)作为提取溶液。

3.4 衍生条件的优化

本实验选取了室温、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 为衍生温度, 衍生时间为 60 min, 进行衍生实验。结果如图 4a 所示, 随着温度的升高, 衍生物峰面积呈升高趋势, 升至 60 $^{\circ}\text{C}$ 之后峰面积呈稳定状态。

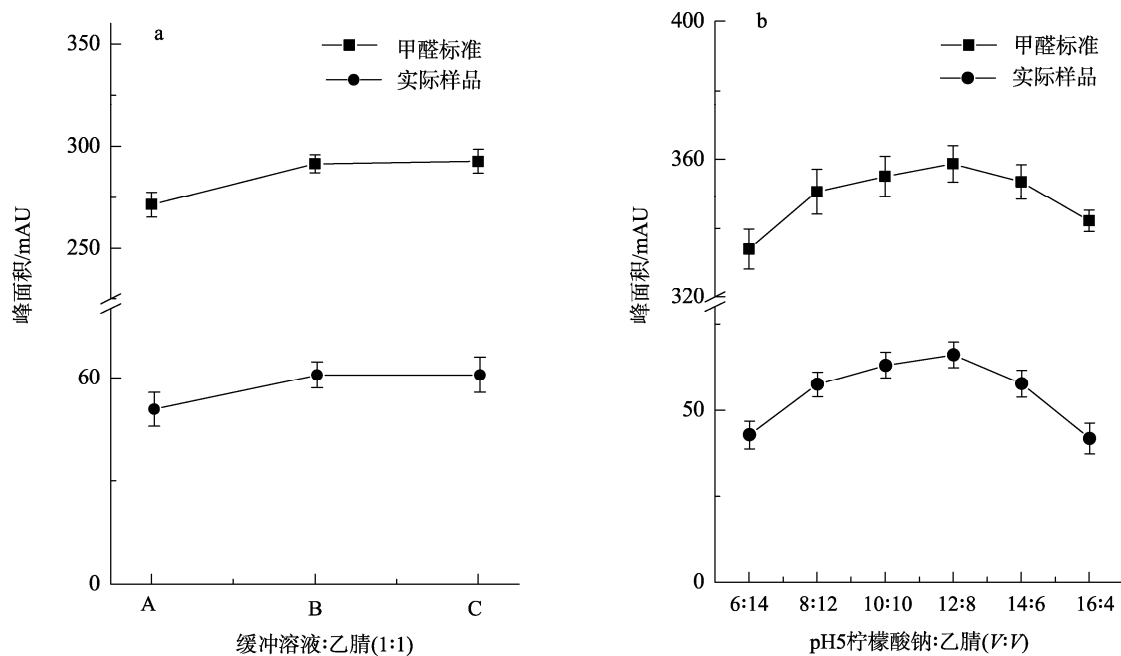
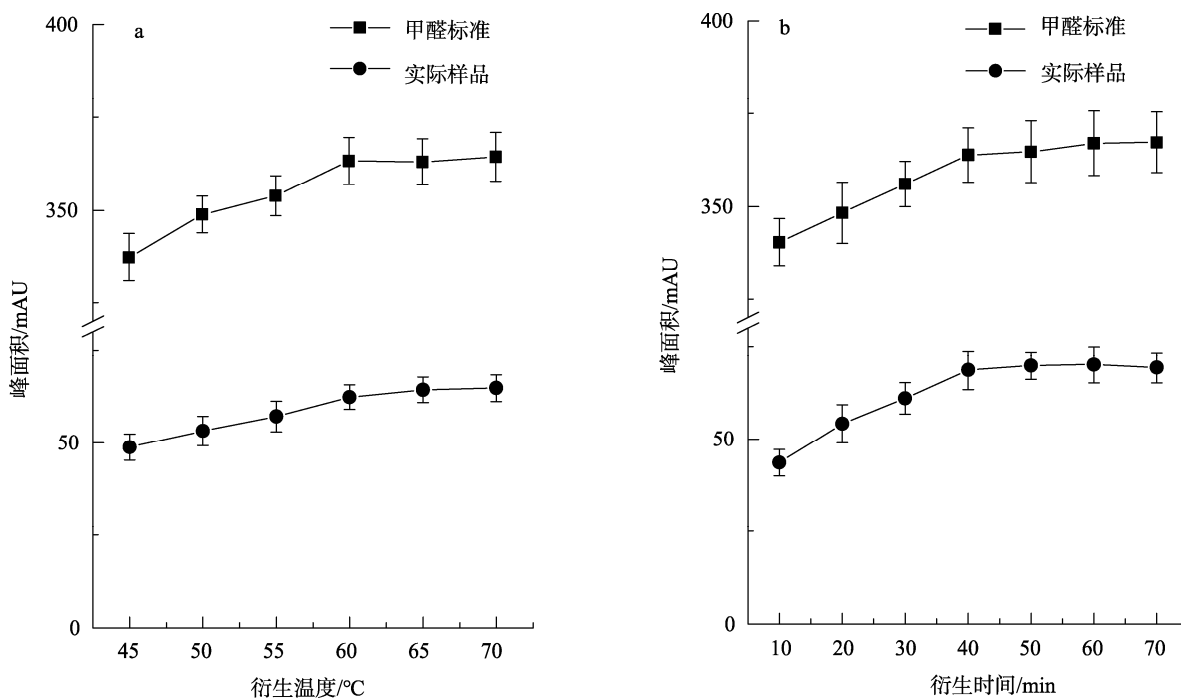
在 60 $^{\circ}\text{C}$ 衍生温度下进一步选取 10、20、30、40、50、60、70 min 为衍生时间。从图 4b 可以看出, 随着反应时间的增长, 甲醛标准的衍生物峰面积在 20 min 后增长缓慢, 实际样品的衍生物峰面积在 40 min 后增长亦趋于稳定。综合考虑实验时间和衍生灵敏度后, 最后选择反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 和衍生时间为 40 min。

3.5 线性关系、方法检出限和定量限

将配制好的甲醛标准溶液系列在上述色谱条件下进行检测, 2.00 mg/L 甲醛标准溶液色谱图如图 5 所示。以甲醛质量浓度为横坐标(X), 以甲醛-DNP 峰面积为纵坐标(Y), 绘制工作曲线用于定量分析。所得甲醛-DNP 在 0.025~2.00 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 线性方程为 $Y=0.1843X+4.0384$, 相关系数为 0.9993。按取样量 2 g, 定容体积 20 mL 计算, 以空白实验的 3 倍和 10 倍基线噪音与峰高回归方程斜率比值对应的浓度分别为方法检出限(limit of detection, LOD)和方法定量限(limit of quantitation, LOQ), 所得检出限和定量限分别为 0.03 mg/kg 和 0.10 mg/kg。

3.6 回收率和精密度

在称好的婴幼儿米粉样品中分别添加 3 个水平(1.00、5.00、10.0 mg/kg)的甲醛标准溶液, 每个水平设置平行样各 6 份, 按照 2.2.2 建立的方法进行前处理并上机测定, 计算加标回收率和相对标准偏差。从表 1 中可以看出, 在扣除样本本底后 3 个添加水平的平均加标回收率为 86.8%~89.0%, 相对标准偏差为 0.7%~2.1%, 说明婴幼儿米粉中干扰甲醛衍生物的基质较少, 该方法具有良好的回收率和精密度。

图 3 缓冲溶液选择及其与乙腈提取条件优化($n=3$)Fig.3 Optimization of extraction conditions of buffer solution and acetonitrile ($n=3$)图 4 衍生温度和衍生时间优化($n=3$)Fig.4 Optimization of derivatization temperature and time ($n=3$)

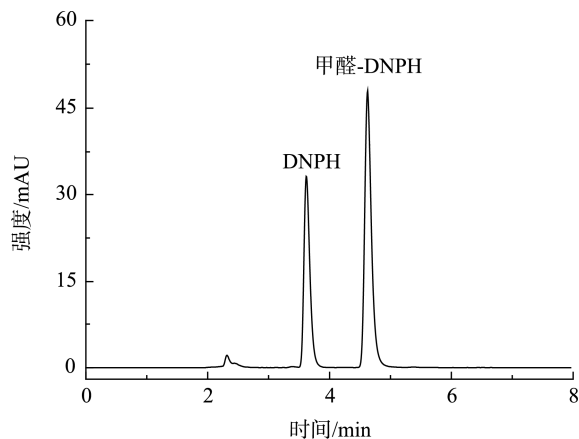


图 5 2.00 mg/L 的甲醛标准溶液色谱图

Fig.5 Chromatogram of formaldehyde standard solution (2.00 mg/L)

3.7 实际样品的测定

用上述建立的方法对留样室中部分婴幼儿谷类辅

食样品进行测定, 测定结果见表 2。由表中可以看出, 本方法测定结果与标准检测方法 GB/T 21126-2007《小麦粉与大米粉及其制品中甲醛次硫酸钠含量的测定》^[20]测定的结果相近, 2 者的相对偏差在 10%以内。

4 结 论

本研究建立了在柠檬酸钠缓冲溶液-乙腈混合体系中以 2,4-二硝基苯肼与婴幼儿谷类辅食的甲醛衍生提取后直接测定的高效液相色谱分析方法。该方法将甲醛提取和衍生化同步进行, 操作简便, 前处理时间少, 方法检出限低于 GB/T 21126-2007《小麦粉与大米粉及其制品中甲醛次硫酸钠含量的测定》^[20]中的检出限 (0.08 μg/g), 且本方法与现行国家标准方法对样品的测定结果相近, 回收率和精密度均能满足实验要求, 适用于婴幼儿谷类辅食中甲醛含量的测定。

表 1 婴幼儿米粉中甲醛平均加标回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 1 Average recoveris and RSDs of formaldehyde in infant supplementary food (n=6)

本底值/(mg/kg)	加标水平/(mg/kg)	测定结果/(mg/kg)						平均回收率/%	相对标准偏差/%
		1	2	3	4	5	6		
0.39	1.00	1.32	1.29	1.25	1.28	1.26	1.25	88.5	2.1
	5.00	4.69	4.72	4.79	4.72	4.71	4.75	86.8	0.7
	10.0	9.30	9.19	9.36	9.33	9.20	9.36	89.0	0.8

表 2 实际样品检测结果
Table 2 Results of formaldehyde in different samples

样品	本方法/(mg/kg)	GB/T 21126-2007/(mg/kg)	相对偏差/%
菠菜营养米粉	0.22	0.24	8.7
婴幼儿营养奶米粉	0.11	0.12	8.7
胡萝卜营养米粉	1.56	1.52	2.6
婴幼儿营养面条	0.28	0.26	7.4
黑米紫薯粒粒面	0.48	0.46	4.3

参考文献

[1] 赖谷仙. 甲醛测定方法的研究进展[J]. 化工技术与开发, 2017, 46(10): 25-28.
Lai GX. Research process for formaldehyde determination methods [J]. Technol Dev Chem Ind, 2017, 46(10): 25-28.

[2] 刘晓庚, 鲍雯钰, 吴命蓉, 等. 甲醛测定方法的研究进展[J]. 理化检验-化学分册, 2019, 55(5): 577-583.
Liu XG, Bao WY, Wu YR, et al. Research progress of determination methods of formaldehyde [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2019, 55(5): 577-583.

[3] 赵丹莹. 食品中甲醛污染物的来源和检测方法[J]. 职业与健康, 2016, 32(17): 2441-2445.
Zhao DY. Source and detection methods of formaldehyde contaminant in food [J]. Occup Health, 2016, 32(17): 2441-2445.

[4] 张昊. 食品中甲醛的来源及检测意义[J]. 检验检疫学刊, 2020, 30(2): 111-112.
Zhang H. Source of and its detection significance formaldehyde in food [J]. Inspect Quarant Sci, 2020, 30(2): 111-112.

[5] 关秀艳. 食品中甲醛的来源与危害[J]. 品牌与标准化, 2011, (10): 11.
Guan XY. Source and harm of formaldehyde in food [J]. Brand Stand, 2011, (10): 11.

[6] GB 10769-2010 食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].
GB 10769-2010 National food safety standard-Cereal based

- complementary foods for infants and young children [S].
- [7] 胡文斌, 张少飞, 朱秀娟, 等. 分光光度法测定集中食品中的甲醛[J]. 农业灾害研究, 2020, 10(1): 111-112.
Hu WB, Zhang SF, Zhu XJ, *et al.* Spectrophotometric determination of formaldehyde in several kinds of food [J]. *J Agric Cata*, 2020, 10(1): 111-112.
- [8] 冯仲善. 农贸市场水产品中甲醛含量的测定[J]. 化工设计通讯, 2019, 45(7): 114-115.
Feng ZS. Determination of formaldehyde in aquatic products in agricultural and trade markets [J]. *Chem Eng Des Commun*, 2019, 45(7): 114-115.
- [9] 袁彩霞, 钱滢文, 柴宗龙, 等. 气相色谱法同时测定啤酒中的甲醛和乙醇[J]. 酿酒科技, 2018, 287(5): 117-121.
Yuan CX, Qian YW, Chai ZL, *et al.* Simultaneous determination of formaldehyde and ethanol in beer by gas chromatography [J]. *Liquor-Mak Sci Technol*, 2018, 287(5): 117-121.
- [10] 汤施展, 黄丽, 陈中祥, 等. 柱前衍生化-气相色谱法测定水产品中的游离甲醛[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(2): 51-56.
Tang SZ, Huang L, Chen ZX, *et al.* Quantification of free-formaldehyde in aquatic products by gas chromatography coupled with pre-column derivatization [J]. *Chin Fishery Qual Stand*, 2016, 6(2): 51-56.
- [11] 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 products using gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(11): 153-156.
- [12] 李红英, 黄程, 李丽霞, 等. 高效液相色谱法测定豆制品中的甲醛[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 259-263.
Li HY, Huang C, Li LX, *et al.* Determination of formaldehyde in soybean product by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(4): 259-263.
- [13] 王志强. 高效液相色谱仪—二级管阵列测器—柱前衍生法测定水产品中甲醛[J]. 预防医学情报杂志, 2018, 34(12): 94-97.
Wang ZQ. Determination of formaldehyde in aquatic products by high performance liquid chromatography with a photo-diode array detector and precolumn derivation [J]. *J Prev Med Inf*, 2018, 34(12): 94-97.
- [14] 李乌云塔娜, 夏远, 赵灵燕, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3569-3573.
Li WYTN, Xia Y, Zhao LY, *et al.* Determination of formaldehyde in 5 kinds of common edible fungi by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3569-3573.
- [15] 洪月玲, 袁野, 胡潇潇. 柱前衍生—高效液相色谱法测定水产品中甲醛含量的研究[J]. 微量元素与健康研究, 2019, 36(5): 59-61.
Hong YL, Yuan Y, Hu XX. Determination of formaldehyde in aquatic products by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Stud Trace Elem Health*, 2019, 36(5): 59-61.
- [16] 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.
- [17] 刘建强. LC-MS/MS 法测定啤酒中的微量甲醛和乙醛[J]. 中国酿造, 2008, (11): 91-94.
Liu JQ. Determination of trace formaldehyde and acetaldehyde in beer by LC-MS/MS [J]. *Chin Brew*, 2008, (11): 91-94.
- [18] 蒋海伟, 唐丽君, 张文中, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿乳粉中甲醛残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 74-80.
Jiang HW, Tang LJ, Zhang WZ, *et al.* Determination of formaldehyde residues in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 74-80.
- [19] 郑钢勇, 林壮森. 海产品及水发食品中甲醛快速检测方法研究进展[J]. 广州化工, 2012, 40(15): 36-37, 40.
Zheng GY, Lin ZS. Research advance of the rapid detection method of formaldehyde in seafood and waterlogged food products [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2012, 40(15): 36-37, 40.
- [20] GB/T 21126-2007 小麦粉与大米粉及其制品中甲醛次硫酸钠含量的测定[S].
GB/T 21126-2007 Determination of sodium formaldehyde sulfoxylate in grain products [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



丘福保, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品和水质理化检验。
E-mail: hmilycat1314@126.com