

食品中游离甲醛的高效液相色谱测定方法的研究

徐 炜 魏春青

(连云港市疾病预防控制中心, 江苏 连云港 222003)

摘要:为优化食品中游离甲醛的测定方法,采用固相提取、高效液相色谱法测定食品中微量游离甲醛的含量。试样经水浸泡等方法处理后过滤,取过滤液与2,4-二硝基苯肼衍生反应后,经Oasis HLB富集净化,采用Luna 5 μ C₁₈(2)色谱柱,水与乙腈为流动相,选用380 nm波长检测,与标准谱图比较进行定性,外标定量。本法的回收率分布于85.0%~97.4%,检出限为0.025 mg/kg。本方法具有简便、快速、准确的特点。

关键词:食品;甲醛;二硝基苯类;色谱法,高压液相

Determination of Free Formaldehyde in Foods by HPLC

XU Wei, WEI Chun-qing

(Lianyungang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Lianyungang 222003, China)

Abstract: This study was conducted to optimize the method for determination of trace of free formaldehyde in foods by HPLC. The samples were soaked by water, then the liquid was made to react with 2, 4 - Dinitrophenylhydrazine and then, purified and enriched by Oasis HLB Cartridge. The components were separated on a Luna 5 μ C₁₈ (2) column with acetonitrile and water as mobile phase and UV detection at 380 nm. The recovery was 87.0%~99.4%. The limit of detection was 0.025 mg/kg. It is concluded that the method is sensitive and accurate.

Key word: Food; Formaldehyde; Dinitrobenzenes; Chromatography, High Pressure Liquid

原子荧光法作为我国特有的分析方法,在食品中铅、砷、汞、镉、锡等元素的分析检验工作中发挥着重要作用,如何对其不断加以完善,从而得到更广泛应用和国际公认,是国内分析工作者的责任。

另外,我国标准理化检验方法 GB/T 5009—2003 除检出限之外,缺乏必要的技术参数,建议按国际分析方法的要求制定参数,如精密度、准确度、灵敏度、最低检出限、不确定度等,以提高我国检测方法的国际可比性。

目前,我国国标中有多种分析方法可供选择,以适应基层不同要求的食品检验工作,然而要提高我国现有的检验水平,分析方法的仪器化、自动化是必然的发展方向,而能够进行元素价态分析和同时检测多种元素的联用技术是国内外发展的共同趋势。

参考文献

- [1] GB/T 5009—2003. 食品卫生检验方法理化部分[S].
- [2] Codex stan 193 - 2003. General Standard for Contaminants

and Toxins in Foods[S].

- [3] Codex stan 234 - 1999. Recommended Methods of Analysis and Sampling[S].
- [4] Codex stan 228 - 2001. Methods of Analysis for Contaminants [S].
- [5] FAO/WHO. Conversion of the methods for trace elements into criteria [R]. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling CX/MAS 05/26/7 - Add. 1, 2005, 4-12.
- [6] Criteria of Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes prepared by the United Kingdom and Canada [R]. CX/MAS 98/5.
- [7] Report of the 27th Session of the Codex Committee on Method of Analysis and Sampling [R]. Alionorm 04/27/23.
- [8] Codex Alimentarius Commission Procedural Manual [R]. 14th Ed, FAO, ROME, 2004.
- [9] 王竹天,兰真,鲁杰,等. GB/T 5009—2003 食品卫生检验方法理化部分简介[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17 (3): 193-211.

[收稿日期:2006-03-03]

中图分类号:R15;TS207 文献标识码:C 文章编号:1004-8456(2006)03-0225-06

基金项目:连云港市卫生局科研课题(局04054)

作者简介:徐炜 男 副主任技师

一些不法商贩在面类食品的制作和水发食品的泡制等食品加工过程中违规添加甲醛和甲醛次硫酸氢钠,以此来改善劣质面制品的感官,提高食品的白色和韧性,延长食品的保存期。目前甲醛的测定方法主要有分光光度法、气相色谱法、液相色谱法和示波极谱法等。

本文参考文献[1,2],根据淀粉类食品、酒类食品和水发食品等的特性,比较浸泡和水汽蒸馏等处理方法的优劣,选用水浸泡样品,然后直接过滤或除蛋白后过滤,取过滤后的过滤液与2,4-二硝基苯肼溶液(以下简称DNPH)衍生化反应,衍生液经Oasis HLB固相提取柱富集和净化,用乙腈将富集的衍生物洗脱后直接进样检测。方法的特异性强、灵敏度高,操作简单。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与材料 甲醛试剂(37%,上海市炎晨化工实业有限公司,分析纯);2,4-二硝基苯肼(中国医药集团上海化学试剂公司,分析纯);甲醇、乙腈、四氢呋喃(Fisher Chemicals,美国,液相色谱淋洗剂);Oasis HLB固相提取柱(购自于Waters公司)。实验用水均为石英亚沸高纯水。

1.0 g/L的DNPH溶液:称取100 mg的DNPH溶于24 ml浓盐酸中,用水定容至100 ml,用前用二氯甲烷萃取纯化数次。50%三氯乙酸溶液:称取50 g三氯乙酸溶于100 ml水中。乙酸盐缓冲液(pH=5):称取30.14 g无水乙酸钠,以适量水溶解,加入12 ml冰乙酸,再用水稀释至500 ml。

甲醛标准溶液:量取分析纯的甲醛试剂2.8 ml,放入1000 ml容量瓶中,加水稀释至刻度。每次应用前用滴定法^[3]标定其浓度,使用前再稀释为0.1 mg/ml的甲醛标准使用液。

1.2 仪器 Waters公司高效液相色谱仪,包括515泵,2487双波长紫外可见检测器,MILLENNIUM³²操作系统;色谱柱:Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (2) 100 A 250 mm \times 4.6 mm;进样量10 μ l;流动相:乙腈+四氢呋喃(99.9+0.1,体积分数)水+四氢呋喃(99.9+0.1,体积分数)=70:30(体积分数);流速:1 ml/min;工作波长为380 nm。

1.3 方法

1.3.1 试样的前处理 固体试样:取粉碎后的试样2.0~10.0 g于50 ml容量瓶中,加水至刻度,充分振摇,常温浸泡4 h后过滤,取10.0 ml过滤液,加入10 ml醋酸盐缓冲溶液(pH=5)和10 ml的DNPH溶液,在常温下衍生反应1 h后,衍生液过Oasis HLB固相提取柱富集。液体试样:取5.0~10.0 ml试样,加入

10 ml醋酸盐缓冲溶液(pH=5)和10 ml的DNPH溶液在常温下衍生反应1 h后,衍生液过Oasis HLB固相提取柱富集。富含蛋白质的试样取粉碎后的试样2.0~10.0 g于50 ml容量瓶中,加30 ml水,常温浸泡4 h后,加入5 ml三氯乙酸溶液(50%),加水至刻度,混匀后过滤,取10 ml过滤液,加入10 ml醋酸盐缓冲溶液(pH=5)和10 ml的DNPH溶液,在常温下衍生反应1 h后,衍生液过Oasis HLB固相提取柱富集。

试样的洗脱和测定 用乙腈将Oasis HLB固相提取柱中的富集物洗脱至5 ml的容量瓶中,并加乙腈至刻度,摇匀,进行色谱分析,以保留时间定性,校正曲线法定量。

1.3.2 甲醛衍生物校正曲线的制备 于10个25 ml的具塞比色管中各加入10 ml醋酸盐缓冲溶液(pH=5),分别准确加入相当于0.0、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、100.0 μ g甲醛的甲醛标准使用液,再加入1.0 g/L的DNPH溶液10 ml,盖塞,振摇,室温下反应1 h。然后经Oasis HLB固相提取柱富集净化后,按上述方法进行洗脱和色谱分析,分别测定并计算其峰面积。

2 结果与amp;讨论

2.1 色谱条件的选择 参考菲罗门公司Phenomenex Luna 5 μ C₁₈ (2) 100 A 250 mm \times 4.6 mm色谱柱的应用图谱,经过实验优选,确定流动相为乙腈+四氢呋喃(99.9+0.1,体积分数)水+四氢呋喃(99.9+0.1,体积分数)=70:30(体积分数),流速为1 ml/min,测定波长为380 nm。在此条件下甲醛与DNPH衍生反应生成的衍生产物甲醛2,4-二硝基苯腙(以下简称甲醛腙)同其它组分分离良好,图1为甲醛腙与乙醛腙和丙酮腙的色谱分离图谱。甲醛在0.0~20.0 μ g/ml的范围内呈线性关系,保留时间为5.303 min,检出限为0.01 μ g/ml,线性回归方程为 $y = 204178x + 19751$ ($r = 0.9998$)。

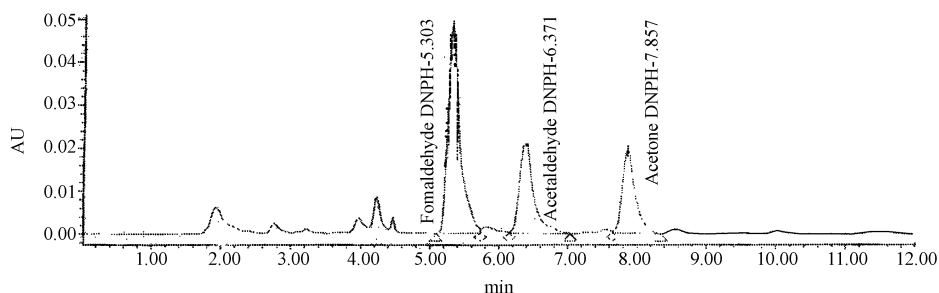
2.2 衍生化条件的选择

2.2.1 反应时pH选择 参考文献[5,6]的反应条件,取30份定量添加甲醛的合成水样10 ml于具塞比色管中,分别加入10 ml不同pH值的缓冲溶液pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.5,然后按1.4法衍生和富集,按2.1的条件进行色谱测定,比较甲醛的测定值,结果显示在缓冲液pH为5的条件下,甲醛的测定值最高。因此,选择pH为5的缓冲液。

2.2.2 衍生化时间的选择 取42份定量添加甲醛的合成水样10 ml于具塞比色管中,各加入10 ml的pH为5的缓冲液和DNPH溶液,以不同的时间进行衍生化反应,然后按1.3的方法衍生和富集以及按

2.1 的条件进行色谱测定,结果见表1。考虑到多数样品中富含糖和蛋白质,如果衍生化反应时间太长,

会产生凝胶物质,影响固相提取柱的富集吸附操作,因而选择衍生化反应时间为1 h 为宜。



1. 甲醛脎 (Formaldehyde DNPH) 2. 乙醛脎 (Acetaldehyde DNPH) 3. 丙酮脎 (Acetone DNPH)

图1 甲醛脎、乙醛脎和丙酮脎的分离图谱

表1 不同衍生时间甲醛脎的生成量

反应时间	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	720 min	24 h
甲醛脎的峰面积	3786159	4029949	4233880	4473115	4455592	4714090	4778127
甲醛脎的生成量 %	79	84	89	94	93	100	100

2.2.3 衍生化温度的选择 取若干份定量添加甲醛的合成水样 10 ml 于具塞比色管中,各加入 10 ml 的 pH 为 5 的缓冲液和 DNPH 溶液,分别在 10、20、30 和 60 下进行衍生化反应 1 h,然后进行色谱测定,结果差异无显著性 ($P > 0.05$)。因此,选择在常温下进行衍生化反应。

2.3 试样前处理的研究

2.3.1 去除蛋白质方法的研究 用三氯乙酸(以下简称 1 法)、乙酸锌和亚铁氰化钾(以下简称 2 法)以及硫酸锌和氢氧化钠(以下简称 3 法)比较 3 种除蛋白质的方法。比较结果发现,3 法操作复杂,2 法测定本底较高,因而本文选用 1 法作为去除蛋白质的方法。

2.3.2 衍生产物提取方法的研究 取 25 ml 啤酒采用 1.3 的方法(以下简称固相萃取法)测定试样的游离甲醛的含量。同时用二氯甲烷萃取衍生产物,经水浴挥干和乙腈溶解定容后进行色谱分析(以下简称二氯甲烷法),甲醛的测定结果分别为 2.69 mg/L 和 1.05 mg/L,图 2 和图 3 分别为 25 ml 啤酒固相萃取法和二氯甲烷法的色谱分离图谱。由于食品样品普遍富含糖、色素等有机物质,用二氯甲烷萃取衍生产物时,常会产生乳化现象以及提取色素等非目标物质,从而降低测定的灵敏度,因而本文选用固相萃取法作为衍生产物提取的方法。

2.3.3 试样前处理方法的比较 由于甲醛易挥发和易溶于水中,试样前处理一般采用加水溶解或加稀酸使结合态甲醛分解溶于水中,然后将试样经水汽蒸馏后,取蒸馏液进行乙酰丙酮等比色分析(以下简称乙酰丙酮法),或取蒸馏液与 DNPH 衍生反应后,用二氯甲烷萃取(以下简称二氯甲烷法)。本

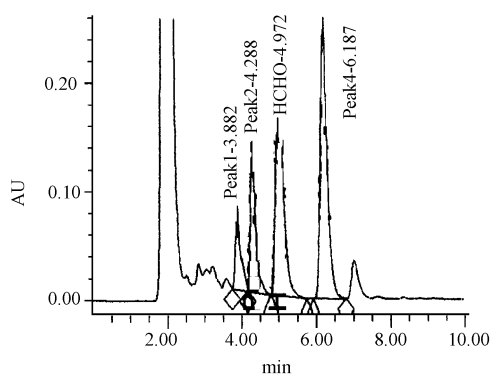


图2 啤酒的固相萃取法色谱分离图谱

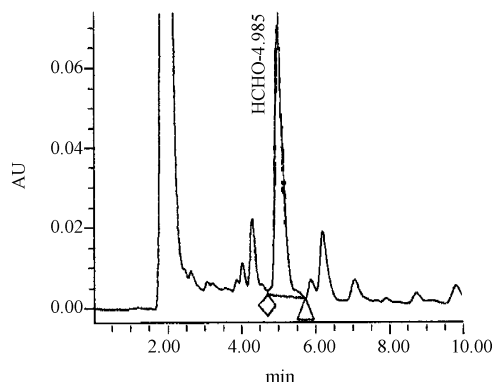


图3 啤酒的二氯甲烷法色谱分离图谱

文选取不同的试样,分别按 1.3 的方法和以上 2 种方法测定试样中的游离甲醛,结果见表 2。

表2 不同处理方法游离甲醛的

	测定结果 (mg/kg 或 mg/L)					
	虾仁	米粉	鲜山芋	啤酒	糖	甲醛
固相萃取法	2.54	0.74	0.20	2.69	1.99	9.52
乙酰丙酮法	nd	5.71	nd	0.93	3.73	7.32
二氯甲烷法	nd	0.52	0.16	0.17	1.67	6.92

注:nd 为未检出,甲醛的浓度为 10 μg/ml。

分析表 2 的数据,乙酰丙酮法测定的是醛酮类物质的总和,无法对甲醛准确定量测定,其测定结果与二氯甲烷 1 法相比偏高。水汽蒸馏同水浸方法相比,测定结果偏低,且回收率和检测灵敏度较前者低,因此,选用 1.3 方法作为试样前处理的方法。

2.5 精密度和回收率 分别取水样、鲜虾仁、水发虾仁各 15 份样品,定量添加 3 种不同浓度的甲醛标准溶液(10、50、100 mg/kg),按照 1.4 的实验方法,进行精密度和回收率的测定,结果见表 3。

表 3 精密度和回收率实验 (n=5)

样品	添加量(μg)	测定量(μg)	回收率(%)	RSD(%)
水样	10	9.3	93.0	1.4
	50	48.7	97.4	1.8
	100	96.4	96.4	1.3
鲜虾仁	10	1.8	18.0	3.6
	50	7.2	14.4	2.9
	100	34.6	34.6	1.7
水发虾仁 ^a	10	8.5	85.0	2.5
	50	47.2	94.4	1.9
	100	95.9	95.9	2.1

注:a 水发虾仁为用 1%的甲醛水溶液浸泡 12 h 的鲜虾仁。

本方法是测定样品中的游离甲醛,如果样品中富含蛋白质,添加的甲醛将与之结合,会使回收率降低,反映为表 3 中鲜虾仁添加的甲醛回收率较低。而水样和水发虾仁的回收率却在 85.0%~97.4%。

2.6 实际样品的测定 按照 1.3 方法,对市场上的多种样品的游离甲醛进行测定,结果见表 4。

表中大米、黄豆等样品的测定结果有较大的差异,是由于水浸泡试样后,直接过滤的测定结果低,

表 4 实际样品测定结果 (mg/kg 或 mg/L)

样品名称	测定结果	样品名称	测定结果
大米	0.59~4.82	猪血	n. d
糯米	0.42~3.26	鸭血	1.93
面粉	2.50	豆腐	2.90
黄豆	0.49~6.01	水发蹄筋	2.43
绿豆	0.21~0.92	水发猪膘	3.02
木耳	11.10	牛百叶	3.33
干香菇	15.87	猪肚	n. d
山楂酒	7.49	鲜虾仁	2.54
白酒	0.44	水发虾仁	248 ^a

注:n. d 为未检出,a:水发虾仁为用 1%甲醛水溶液浸泡 12 h 的鲜虾仁。

而用三氯乙酸除蛋白质后测定结果高,可能是加入的三氯乙酸使得试样中糖类水解产生醛类化合物。

[本研究得到了 Waters 中国有限公司安蓉小姐和广州菲罗门科学仪器有限公司杨武杰先生的帮助,谨在此对他们和其他参与实验的人员表示感谢]。

参考文献

- [1] 张秀丽,李东方,杨红,等. 输配水管材浸泡液中甲醛、乙醛、丙烯醛测定[J]. 中国公共卫生,2004,20(2):231-232.
- [2] 李东方,贾薇,张秀丽,等. 高效液相色谱法测定水中甲醛、乙醛、丙烯醛[J]. 中国公共卫生,2003,19(2):1511-1513.
- [3] 卫生部. 化妆品卫生规范[Z].

[收稿日期:2005-12-14]

中图分类号:R15;TQ224.122 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2006)03-0230-04

[上接第 201 页]

生标准与卫生监督”征文活动(详见本刊的征文启事),以促进我国卫生标准工作质量的提高和应用质量的提高。受活动组织者的邀请,《中国食品卫生杂志》参加这次征文活动,关于食品安全方面的文章我们将择优刊登,欢迎大家踊跃参加该活动。

为加强学术规范与管理,《中国食品卫生杂志》将规范投稿规则,具体的规则文本明年第一期与读者见面,现将重要之处先行在这里告知,从看到这篇导读起就请大家按新规定执行。(1) 投稿请纸版、E-mail(如无条件可免)各一份寄往编辑部。寄纸版稿件(稿件上要加盖公章)时要附单位证明。单位证明内容包括:文章名称;全部作者的名称(按文章上的顺序排列)、全部作者的亲自签字(表明同意在文章上署名和同意署名的顺序);是否为基金资助,资助基金的名称及编号;该文章为该作者所做,内容属实,没有一稿两投。(2) 如文章为基金或课题资助,请随稿件寄基金或课题资助的合同书封面的复印件。(3) 稿件是否存在泄密问题。

参考文献

- [1] 人类基因“少即多”[J]. 生命科学,2006,(4):24.
- [2] 张李伟,邓少伟,郭海峰. 中国保健食品功能宣称流通现状与建议[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(3):220-222.
- [3] 彭军,高小蕾,李琼,等. 卫生部批准的 795 种参类保健食品情况分析[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(3):214-220.