

香菇中不同形态甲醛的测定与分析

李冰茹, 马智宏, 何昭颖, 李杨, 平华

(农业部农产品质量安全风险评估实验室, 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 香菇中同时存在游离态甲醛和结合态甲醛, 建立一种可以一次性快速测定这两种形态甲醛含量的方法。根据香菇中两种形态的甲醛析出条件, 实验设计了2个步骤: 第一步, 先通过蒸馏提取香菇中游离态甲醛; 第二步, 加酸后再次蒸馏, 提取香菇中结合态甲醛。实验设定条件为: 蒸馏时间为4 min, 加10%磷酸40 mL, 水浴温度为60℃, 水浴时间为60 min。结论为, 当甲醛浓度为0.0~10.0 mg/L时, 标准曲线线性关系良好, 相关系数 r 为0.9995, 游离态甲醛检测的加标回收率为87.8%~105.9%, 相对标准偏差(RSD)在3.5%~7.0%; 结合态甲醛检测的加标回收率为89.5%~105.8%, 相对标准偏差(RSD)在2.5%~6.7%。香菇中结合态甲醛含量占总甲醛的62.6%~71.8%, 游离态甲醛和结合态甲醛在伞部的含量均高于柄部的含量。全自动定氮仪可以一次性处理香菇中不同形态的甲醛, 与高效液相色谱联用, 能够自动、快速、高效地完成香菇中甲醛形态的检测与分析。

关键词: 香菇; 甲醛形态; 全自动定氮仪; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2019)01-239-244

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.034

Determination and Analysis of Different Morphology of Formaldehyde in *Letinous edodes*

LI Bing-ru, MA Zhi-hong, HE Zhao-ying, LI Yang, PING Hua

(Risk Assessment Lab for Agro-products, Ministry of Agriculture, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to one-time and rapidly determine the dissociative formaldehyde and conjugate formaldehyde in *Letinous edodes*, the method of combining full automatic nitrogen analyzer and high performance liquid chromatography (HPLC) was established. According to the precipitation conditions with different morphology of formaldehyde in *Letinous edodes*, the 2 steps were set to distill with the automatic nitrogen analyzer. The first step was distilled dissociative formaldehyde and the second step was adding-acid to distill the conjugate formaldehyde. The conditions of experiment were that distilling-time 4 min, 10% phosphoric acid 40 mL, water-bathing temperature 60℃, and water-bathing time 60 min. When formaldehyde concentration is 0.0~10.0 mg/L, the standard curve has good linear relationship, the correlation coefficient r is 0.9995. The recoveries of dissociative formaldehyde were 87.8%~105.9%, the relative standard deviation (RSD) was 3.5%~7.0%; the recovery of conjugate formaldehyde was 89.5%~105.8%, and RSD was 2.5%~6.7%. The automatic nitrogen analyzer could improve the extraction efficiency of different morphology of formaldehyde in *Letinous edodes*. The content of conjugate formaldehyde in *Letinous edodes* accounted for 62.6%~71.8%. The contents of dissociative formaldehyde and conjugate formaldehyde in the umbrella part were higher than that in the stalk part. The method combined with high performance liquid chromatography and the automatic nitrogen analyzer was suitable for the batch detection of formaldehyde in *Letinous edodes*.

Key words: automatic nitrogen analyzer; *Letinous edodes*; formaldehyde morphology; high performance liquid chromatography

香菇在生长发育过程中会产生甲醛, 属于香菇特有的生理代谢现象^[1], 以游离态和结合态^[2,3]的形式存

收稿日期: 2018-10-09

基金项目: 北京市农林科学院创新建设项目 (KJGX20170419); 国家食品安全风险评估重大专项 (GJFP201800601)

作者简介: 李冰茹 (1979-), 女, 高级工程师, 研究方向: 农产品质量检测及污染评价

通讯作者: 马智宏 (1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 农田环境有害物质预警、农产品质量以及植物生理生化

在。虽然大部分甲醛是以结合态的形态存在^[2], 由于游离态甲醛具有一定致癌作用^[4], 因此对于甲醛形态的存在形式和含量进行检测分析就很有必要。鉴于香菇析出甲醛的独特现象, 对香菇中游离态和结合态甲醛的存在形式和含量进行检测分析, 客观评估香菇中的甲醛对健康的影响, 具有一定的科学意义。

检测香菇中游离态和结合态甲醛的含量, 首先要确保香菇中甲醛的形态在不发生转换的情况下将其从香菇组织中分别提取出来^[5,6]。香菇中甲醛含量检测的

前处理方法主要是水蒸气蒸馏法、直接蒸馏法^[7]、超声提取法和水浸泡法等,其测定的结果基本是游离态甲醛的含量^[8]。结合态甲醛含量的检测,必须先使用酸碱等化学物质将其改变为游离态的形式才能进行^[9]。而且,如果加酸检测结合态的甲醛,需要选择新的试样进行重复提取,效率低下,不适合批量样品的处理^[10,11]。因此,针对香菇中不同形态甲醛含量的测定与分析是一个有意义的研究题目。

为此,黄文水等选用凯氏定氮蒸馏装置代替蒸汽蒸馏装置,检测啤酒、鹅肠以及香菇中的游离态甲醛,发现其具有灵敏度高、选择性好、精密度和准确度好等优点^[12]。李冰茹等利用凯氏定氮仪代替传统蒸馏方法测定了香菇中的游离甲醛的含量^[13],在此基础上利用凯氏定氮仪与高效液相色谱法^[14]联用,实现自动蒸馏和加酸,建立了一种新的能够一次性提取及测定香菇中游离态和结合态甲醛的方法,与现行的 NY_T_1283-2007《香菇中甲醛含量的测定》标准相比,结果更全面,既有游离态的含量,又有结合态含量,数据更精确。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

香菇,采集于北京市生产基地。

冰乙酸(分析纯),北京化学试剂厂;磷酸(分析纯),北京化学试剂厂;2,4-二硝基苯肼(分析纯,纯度 $\geq 90\%$),北京化学试剂厂;乙腈(色谱纯),北京化学试剂厂;甲醛标准品,北京市环保局标物中心。

缓冲液:称取 2.64 g 乙酸钠,以适量水溶解,加 1 mL 冰乙酸,用纯水定容 500 mL。

2,4-二硝基苯肼溶液:称取 2,4-二硝基苯肼 300 mg,用乙腈定容至 500 mL。

衍生液:取 100 mL 2,4-二硝基苯肼溶液,与 100 mL 的缓冲液混匀。

无特殊说明所有试剂均为分析纯、所用水为纯水。

1.2 仪器与设备

2690 液相色谱仪,美国沃特斯科技有限公司;色谱柱 (ACQU-ITY UPLC HSS T3),美国沃特斯科技有限公司;DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;3k30 离心机,美国 SIGMA 公司;匀浆机 (BUCHI)、SPD60 全自动定氮仪,北京

三品科创仪器有限公司;天平,梅特勒仪器(上海)有限公司;水浴摇床,上海旻泉有限公司。

1.3 实验条件

定氮仪蒸馏条件:选择多步蒸馏,第一步蒸馏结束,暂停蒸馏取走吸收液,第二步仪器开始自动加酸,继续蒸馏。

色谱分离条件:ACQU-ITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m);流动相:甲醇与水(70:30, V:V)溶液,等度洗脱,流速为:1 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样体积:20 μ L。

1.4 样品前处理

干样品粉碎或鲜样匀浆,准确称取干样品 20.0 g 或鲜样匀浆 50.0 g,与消煮管中加少许纯水置于定氮仪上,选择多步蒸馏,每步蒸馏的时间设置为 4 min,加酸量为 4 mL。开始蒸馏,用 250 mL 的三角瓶收集蒸馏液,并置于冰水浴中。在第一步蒸馏结束换取新的收集瓶,收集液用纯水定容 100 mL,摇匀待测 I。待仪器自动加酸进行第二步蒸馏,蒸馏结束,收集液同样用纯水定容 100 mL,摇匀待测 II。分别准确吸取待测液 I 和 II 各 1 mL,同时加缓冲液 4 mL 和衍生液 5 mL 于 15 mL 玻璃管中,盖紧塞子并用封口膜密封好,置于 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴摇床,每隔 20 min 取出混匀 1 次,1 h 后取出并冷却室温。过 0.45 或 0.22 μ m 的有机针式滤膜,待测定。

1.5 数据统计分析

本实验利用 WPS 表格 (10.1.0.7566) 进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 蒸馏时间的优化

蒸馏时间对结果有很大的影响^[15],蒸馏的时间太较短,甲醛还没完全挥发出来,会造成检测结果偏低;时间过长,因吸收瓶中的甲醛具有较强的挥发性,也会造成检测结果偏低。按 1.4 节操作,分别对第一步和第二部的蒸馏时间进行了优化。两步骤均分别蒸馏 2、3、4、5、6 min,对比检测结果分析。检测结果如图 1 所示,均呈现随着时间检测结果先升高后降低的趋势,以 4 min 最优。因此,两个步骤的蒸馏时间均确定为 4 min。

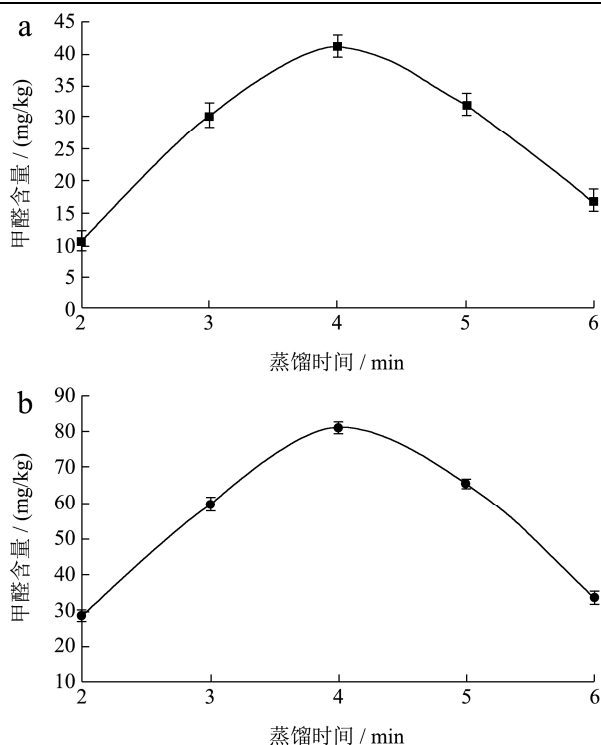


图1 定氮仪蒸馏时间变化趋势图

Fig.1 Optimization of distillation time of automatic Kjeldahl apparatus (n=6)

注: a 游离态甲醛蒸馏时间变化趋势图; b 结合态甲醛蒸馏变化趋势图。

2.2 酸及加酸量的选择

磷酸是非氧化性酸, 只改变溶液的酸碱性, 不会把其它物质氧化成羰基。因此, 酸的选择以磷酸为佳, 分别添加 1、2、3、4、5、6、7 mL 的量, 按照 1.4 节步骤进行操作, 检测结果如图 2 所示。随着酸量的增加检测出的甲醛含量逐步增高并在到 4 mL 时趋于平稳, 因而加酸量选择 4 mL 为宜。

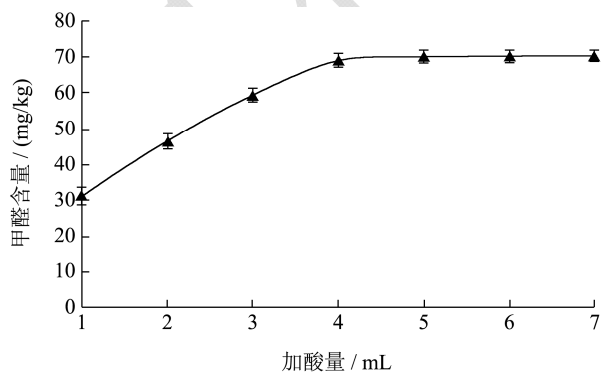


图2 最适宜的加酸量

Fig.2 Optimization of the acid contents (n=6)

2.3 衍生水浴温度的选择

甲醛衍生温度对甲醛的析出结果有一定的影响

[16]。按照 1.4 节的操作, 设定水浴温度分别为 30、40、50、60、70、80 °C, 对比检测结果如图 3 所示。随着温度的升高甲醛含量逐步增加, 说明温度升高有利于甲醛的释放。但是, 当温度高于 60 °C 时, 甲醛的含量反而下降。其原因可能是因为温度过高造成甲醛挥发, 反应液中甲醛的量偏低。因此, 实验中选择 60 °C 作为最佳水浴温度。

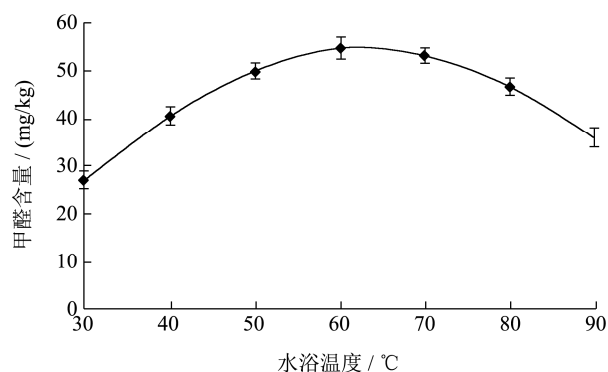


图3 选择合适的衍生水浴温度

Fig.3 The optimization of the derivative temperature for water bath (n=6)

2.4 衍生时间

按照 1.4 节的操作优化衍生时间, 选择 30、40、50、60、70、80 min 进行衍生实验。检测结果如图 4 所示, 在 60 min 前, 随着时间的延长, 甲醛的含量一直在增加; 60 min 后, 甲醛含量不增加, 说明已经反应完全。选定 60 min 为最佳的衍生时间。

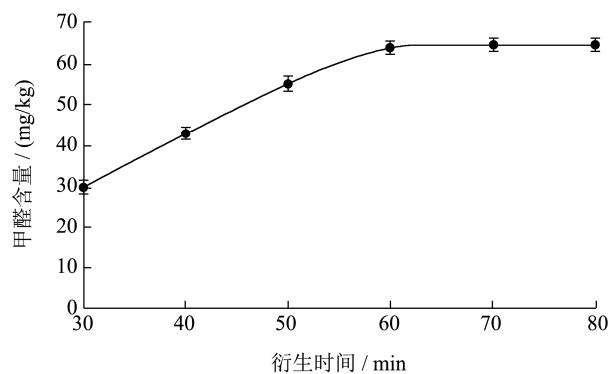


图4 衍生时间的选择

Fig.4 The optimization of the derivative time (n=6)

2.5 标准曲线的绘制及方法的检出限

移取 20、30、50、70、100 μL 浓度为 100 mg/L 甲醛标准溶液, 于 15 mL 玻璃刻度管, 补加缓冲溶液至 5 mL, 再加 5 mL 2,4-二硝基苯肼溶液, 密封严实混匀。置于 60 °C 恒温水浴摇床中, 每隔 20 min 取出混匀 1 次, 1 h 后取出, 冷却至室温。过 0.45 μm 有机针式滤膜待测。得到标准曲线方程为 $Y=655666X-$

93453, 相关系数 R^2 为 0.9995, 在 0.0~10.0 mg/kg 范围线性良好。以噪声的 3 倍计算出最低检出限为 1.0 mg/kg。

2.6 回收率和精密度

选择 1 个本底较低的样品, 分别添加低、中、高

3 个水平浓度, 进行 6 次平行加标回收率实验。检测结果如表 1 所示, 样品均符合国家标准^[17,18], 游离态甲醛检测的加标回收率为 87.8%~105.9%, 相对标准偏差 (RSD) 在 3.5%~7.0%之间, 结合态甲醛检测的加标回收率为 89.5%~105.8%, 相对标准偏差 (RSD) 在 2.5%~6.7%之间, 方法可靠、可行。

表 1 实验的加标回收率和测定结果

Table 1 Results of the recovery of standard addition (n=6)

甲醛形态	含量/(mg/kg)	加标量/(mg/kg)	检测值/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	标准差	回收率/%	RSD/%
游离态甲醛	18	5	22.4	22.7	0.3096	87.8	7.0
			22.5			90.4	
			23.1			101.2	
			22.5			89.4	
			22.8			96.5	
			23.2			103.6	
	18	10	27.8	27.9	0.4082	98.1	4.4
			27.4			94.4	
			28.2			101.6	
			27.9			98.5	
			27.5			94.8	
			28.6			105.9	
	18	20	37.3	37.7	0.6103	96.3	3.5
			37.1			95.3	
			37.4			97.2	
			38.5			102.7	
			37.1			95.6	
			38.5			102.4	
结合态甲醛	35	10	44.5		0.3400	95.1	3.7
			44.6			96.3	
			45.2			102.2	
			44.7			97.4	
			44.6			95.7	
			45.4			103.8	
	35	20	54.5		0.4705	97.6	2.5
			54.3			96.7	
			54.7			98.7	
			55.3			101.5	
			54.5			97.6	
			55.6			102.8	
	35	50	81.7		2.9715	93.3	6.7
			79.8			89.5	
			81.4			92.7	
			87.9			105.8	
			83.8			97.6	
			87.0			103.9	

表2 香菇不同部位不同形态甲醛含量

Table 2 the contents of *Lentinus edodes* different parts of speciation formaldehyde (n=50)

检测部位	甲醛形态	最低含量/(mg/kg)	最高含量/(mg/kg)	平均含量/(mg/kg)	标准差
香菇伞部	游离态甲醛	13.8	43.6	28.6	8.5
	结合态甲醛	23.1	89.7	49.8	16.7
香菇柄部	游离态甲醛	1.80	7.56	4.10	1.5
	结合态甲醛	3.11	19.3	7.83	4.4

2.7 实际样品分析

利用上述方法,对北京市房山区香菇生产基地的50个新鲜香菇的伞和柄分别进行了游离甲醛和结合态甲醛的检测,结果如表2。

通过表2可知,香菇伞部和柄部中游离态的甲醛比结合态甲醛含量明显偏低,香菇伞部甲醛主要以结合态的形式存在,伞部的游离态甲醛含量范围为13.8~43.6 mg/kg,结合态甲醛含量在23.1~89.7 mg/kg之间;柄部的游离态甲醛含量范围为未检出~7.56 mg/kg,结合态甲醛含量在3.11~19.3 mg/kg之间,结合态的甲醛是游离态甲醛的2~3倍。总的来说,香菇中结合态甲醛含量占总甲醛的62.6%~71.8%之间。无论是游离态甲醛还是结合态甲醛,其在伞部的含量均高于柄部的含量。这可能与香菇生理活动及促进甲醛生成的酶主要集中在香菇的伞部密切相关。

3 结论

全自动定氮仪提取高效液相色谱检测香菇中不同形态的甲醛,提取优化条件为定氮仪设置多步蒸馏,第一步蒸馏提取游离态甲醛时间为4 min;第二步加酸蒸馏提取结合态甲醛,加酸量为10%的磷酸40 mL,蒸馏时间为4 min;优化的衍生条件为水浴温度60℃,时间为60 min。对比传统的蒸馏比色法,不难发现传统蒸馏很难控制易爆扑、时间长,密封性差、需要人看守。而全自动定氮仪提取甲醛,自动化程度高、密封性好、快速、适合大批量样品。本方法可同时检测香菇中游离态和结合态的甲醛,具有灵敏度高、选择性好、精密度和准确度好等优点。

参考文献

- [1] Yasumoto K, Iwami K, Mitsuda H. Enzyme-catalyzed evolution of lenthionine from lentinic acid [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1971,35(13): 2070-2080
- [2] 张烨.香菇中甲醛的影响因素及其存在状态研究[D].重庆:西南大学,2007
ZHANG Ye. Studies on influence factor and existing form of formaldehyde in *Lentinula edodes* [D]. Chongqing:

Southwest University, 2007

- [3] 夏苗.香菇内源性甲醛含量的消长规律及采后调控研究[D].杭州:浙江工商大学,2011
XIA Miao. The growth and decline of endogenous formaldehyde in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) as well as its control research [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2011
- [4] 刘华.食品中甲醛的细胞毒性及基因表达影响[J].食品与生物技术学报,2017,36(6):625-634
LIU Hua. Research of cytotoxicity and gene expression by formaldehyde in the food [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(6): 625-634
- [5] 邱霞琴,张红琳,岳都盛,等.蒸馏-乙酰丙酮分光光度法分析香菇内源性甲醛含量变化[J].江苏农业科学,2017,45(9): 141-143
QIU Xia-qin, ZHANG Hong-lin, YUE Dou-sheng, et al. Determination of formaldehyde content in mushroom by distillation - acetyl acetone spectrophotometry [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(9): 141-143
- [6] 吴清盛,茅小燕.香菇中甲醛的提取及其乙酰丙酮分光光度法测定[J].食品与发酵科技,2015,51(1): 84-86
WU Qing-sheng, MAO Xiao-yan. Extraction of formaldehyde in mushrooms and determination with acetylacetone spectrophotometric method [J]. Food Ferment Technol, 2015, 51(1): 84-86
- [7] 农业部.NY/T 1283-2007 香菇中甲醛含量的测定[S].北京:中国农业出版社,2007
Ministry of Agriculture. NY/T 1283-2007 determination of formaldehyde content in *Lentinula edodes* [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2007
- [8] 王丹,王宇,杨树坤.测定食品中甲醛的样品前处理方法比较[J].疾病监测与控制,2009,6:341-342
WANG Dan, WANG Yu, YANG Shu-kun, et al. Comparison on the pretreatment method of formaldehyde in food [J]. Journal of Disease Monitor and Control, 2009, 6: 341-342
- [9] 李俊,刘永翔,王辉,等.高效液相色谱法定量测定果蔬中甲醛含量[J].食品科学,2016,37(22):218-224
LI Jun, LIU Yong-xiang, WANG Hui, et al. Determination of

- formaldehyde in fruits and vegetables by HPLC [J]. Food Science, 2016, 37(22): 218-224
- [10] ZHU Yi, PENG Zeng-qi, WANG Min, et al. Optimization of extraction procedure for formaldehyde assay in smoked meat products [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 28(1): 1-7
- [11] 杨娟,秦樱瑞,曾艺涛,等.内源性甲醛,甲醛毒性及甲醛抑制物的研究进展[J].食品科学,2014,35(1):294-297
- YANG Juan, QIN Ying-rui, ZENG Yi-tao, et al. Progress in endogenous formaldehyde, formaldehyde toxicity and formaldehyde inhibitors [J]. Food Science, 2014, 35(1): 294-297
- [12] 黄文水,余晓麒,吴丽苹,等.凯氏定氮仪-分光光度法测定鹅肠中甲醛[J].光谱实验室,2012,29(4):2607-2609
- HUANG Wen-shui, SHE Xiao-qi, WU Li-ping, et al. Determination of formaldehyde in goose sausage by Kjeldahl nitrogen with spectrophotometry [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2012, 29(4): 2607-2609
- [13] 李冰茹,王纪华,马智宏.凯氏定氮仪联合液相色谱法测定香菇中甲醛含量[J].食品安全质量检测学报,2017,8(5): 1763-1766
- LI Bing-ru, WANG Ji-hua, MA Zhi-hong. Determination of the formaldehyde in *Lentinula edodes* by automatic Kjeldahl apparatus combined with liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2017, 8(5): 1763-1766
- [14] WANG Ting, GAO Xiao-ling, TONG Jia, et al. Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2,4-dinitrophenylhydrazine As derivative reagent [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1577-1582
- [15] 张博,石矛,马杰,等.全自动凯氏定氮仪-超高效液相色谱法测定啤酒中甲醛的残留量[J].中国卫生检验杂志,2015, 25(3):326-329
- ZHANG Bo, SHI Mao, MA Jie, et al. Determination of formaldehyde residues in beer by Kjeltac auto analyzer-UPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(3): 326-329
- [16] 陈建华,缪恩铭,李晶,等.HPLC 法测定食品用包装纸中甲醛与乙醛的含量[J].云南大学学报,2015,37(4):569-576
- CHEN Jian-hua, MIAO En-ming, LI Jing, et al. Determination of formaldehyde and acetaldehyde in food wrapping paper by HPLC [J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2015, 37(4): 569-576
- [17] 徐宝根.出口蔬菜农药残留控制实用手册[M].杭州:浙江科学技术出版社,2007
- XU Bao-gen. Practical book for control of residues of pesticides on the vegetable for exportation [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2007
- [18] 中华人民共和国商务部.香菇出口标准化手册[R].2009
- Ministry of Commerce of P. R. C. Standardization Directory for Mushroom Exportation [R]. 2009

(上接第 102 页)

- [11] 任先伟,魏晓璐,黄鑫,等.核桃青皮提取物抑菌活性及抑菌机理研究[J].食品工业科技,2015,36(18):93-98
- REN Xian-wei, WEI Xiao-lu, HUANG Xin, et al. Antibacterial activity and mechanism of walnut green husk' extract [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 93-98
- [12] 韩亚珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业出版社,1996
- HAN Ya-shan. Experimental Guide for Food Chemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996
- [13] 张传军,刘超,姜晓坤.薤白乙醇提取物的抑菌特性[J].食品科学,2011,32(5):119-122
- ZHANG Chuan-jun, LIU Chao, JIANG Xiao-kun. Antibacterial effect of ethanol extract from the bulbs of *Allium macrostemon* Bunge [J]. Food Science, 2011, 32(5): 119-122
- [14] 徐亚超,盛杰,刘安军.白酒发酵副产物黄水抑菌特性及稳定性研究[J].食品科学,2017,38(15):122-126
- XU Ya-Chao, CHENG Jie, LIU An-jun. Antimicrobial properties and stability of yellow water, a byproduct of Chinese liquor fermentation [J]. Food Science, 2017, 38(15): 122-126
- [15] 许女,史改玲,张浩,等.植物乳杆菌 KF1 对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J].中国食品学报,2016,16(10):19-27
- XU Nyu, SHI Gai-ling, ZHANG Hao, et al. Antibacterial mechanism of lactobacillus plantarum KF1 on *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis milk [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(10): 19-27
- [16] 何梦影.基于脂质体模型对黄酮类化合物抑菌机理的研究[D].华中农业大学,2014
- HE Meng-yin. Antimicrobial mechanism of flavonoids by model membrane study [D]. Huazhong Agricultural University, 2014