

邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基) 羟胺盐酸盐衍生-HPLC法 测定果蔬中甲醛含量

李俊,王辉,刘辉,陈中爱,刘嘉,陈朝军,唐健波,吕都,刘永翔*
(贵州省生物技术研究,贵州贵阳 550006)

摘要:通过邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐与甲醛衍生,建立了测定果蔬中甲醛含量的高效液相色谱法。样品在温度为70℃超声波条件下直接提取衍生30 min,经离心纯化后液相色谱检测,外标法定量。优化的色谱条件为: Eelipse XDB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈和水(70:30,v/v),流速1.0 mL/min,柱温40℃,检测波长210 nm。结果表明,该方法的检出限可达到0.114 mg/kg,在0.57~57 mg/kg范围内呈良好的线性关系,平均回收率为82.3%~94.1%,相对标准偏差为4.0%~7.1% (n=6)。该方法样品前处理简便,稳定性好,检测限低,适合果蔬中甲醛的快速定量检测。

关键词:甲醛,高效液相色谱,邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐,衍生

Determination of formaldehyde in fruits and vegetables by HPLC derived with o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride

LI Jun, WANG Hui, LIU Hui, CHEN Zhong-ai, LIU Jia, CHEN Zhao-jun,
TANG Jian-bo, LV Du, LIU Yong-xiang*

(Biological Technology Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography method was used to determine formaldehyde in fruits and vegetables by o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride derived with formaldehyde. Samples was directly extracted and derived at a temperature of 70℃ under the conditions of ultrasonic 30 min, then monitored by liquid chromatography after centrifugation and purified and quantified using the external standard method. The detection was performed on a XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) in an isocratic elution mode using a mobile phase consisting of acetonitrile and water (70:30, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min, the column temperature was 40℃ and detection wavelength was 210 nm. The results showed that the quantification limit of the method was 0.114 mg/kg, with a good linear relationship between 0.57~57 mg/kg. The average recovery rate were 82.3%~94.1%, with RSD of 4.0%~8.1% (n=6). The method was simple, stability, low detection limits and suitable for the determination formaldehyde in fruits and vegetables.

Key words: formaldehyde; HPLC; o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride; derivatives

中图分类号: TS255.7

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2016)11-0305-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.054

甲醛(formaldehyde),俗称蚁醛,在常温下是一种无色具有强烈刺激性气味的气体,易溶于水、醇和醚,35%~40%的甲醛水溶液被称为福尔马林^[1]。甲醛属于中等毒性物质,过量摄入会导致头痛、乏力、呕吐、失眠以及神经紊乱^[2-3]。研究表明,甲醛还有遗传毒性和致癌性^[4]。甲醛是我国禁止在食品中添加和使用的物质,其具有一定的防腐功效,近年来有关甲醛污染果蔬的报道越来越多,已严重危害到人

们的健康^[5]。目前测定食品中甲醛含量的方法主要有分光光度法^[6]、高效液相色谱法^[7]、气相色谱法^[8]等,甲醛检测标准方法有SC/T 3025-2006、DB44/T 519-2008、SN/T 1547-2011、NY/T1283-2007^[9-12]等,主要用于测定水产品、香菇、米面制品、啤酒、乳饮料等产品中甲醛含量,而针对果蔬中甲醛的检测方法鲜有报道。因此,急需建立一种高效、稳定的果蔬中甲醛含量的检测方法。这对于完善市

收稿日期:2015-11-23

作者简介:李俊(1990-),男,硕士,研究实习员,研究方向:食品化学与营养学,E-mail:lijunsjs2015@163.com。

* 通讯作者:刘永翔(1978-),女,博士,研究员,研究方向:食品化学,E-mail:kittyliu0211@163.com。

场监管和食品中甲醛检测标准方法体系具有重要意义。

现有甲醛检测方法的原理都是通过一种衍生剂与甲醛结合生成一种稳定的衍生物,通过检测衍生物来确定甲醛含量,常用的衍生物为乙酰丙酮和2,4-二硝基苯肼。乙酰丙酮分光光度法的原理是乙酰丙酮与甲醛的显色反应,果蔬样品的颜色对检测结果干扰较大;2,4-二硝基苯肼与甲醛的衍生物在水中溶解度不高^[13],且前处理过程中操作繁琐,易造成检测结果的不稳定。本研究通过邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐(PFBHA)^[14]与甲醛衍生,优化衍生反应条件,改进前处理工艺,通过高效液相色谱检测,为果蔬中甲醛检测提供一种稳定高效的定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苹果、桔子、白菜、白萝卜、辣椒、西兰花、姜 购于重庆市北碚区永辉超市;邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐(PFBHA)标准品 Sigma 公司购买;乙腈 色谱纯;37.0%~40.0% 甲醛溶液 购买于成都市科龙化工试剂厂,用碘量法^[15]标定其精确浓度为1.14 mg/mL,配制甲醛标准使用液浓度为114 μg/mL;其他试剂 均为分析纯。

1290 超高效液相色谱仪、二极管阵列检测器 美国 Agilent 公司;DK-8D 型三孔电热恒温水槽 上海齐欣科学仪器有限公司;KQ3200DB 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;722-P 型紫外可见分光光度计 上海现代仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 液相色谱条件的选择 准确移取200 μL 114 μg/mL 甲醛标准使用液于10 mL 容量瓶中,加入1.0 mL 1.0 mg/mL PFBHA 衍生剂,用蒸馏水定容至10 mL,在60 °C 水浴条件下加热30 min,冷却后过0.22 μm 混合相滤膜,然后置于高效液相色谱仪上用DAD 检测器进行全波长扫描,确定最佳吸收波长。选取乙腈和水作为流动相,流速1.0 mL/min,柱温40 °C,使流动相比比例分别为乙腈:水=60:40、70:30、75:25、80:20、90:10 来确定最佳流动相比比例。同时根据最佳流动相比比例调节柱温分别为30、35、40 °C 来确定最佳柱温。

1.2.2 同时提取衍生条件的确定

1.2.2.1 衍生反应条件的正交优化实验 根据单因素实验结果,选择对衍生反应有影响的3个因素:衍生剂加入量、反应温度、反应时间,进行正交优化实验,分别测定每组的峰面积。

1.2.2.2 超声波提取法中乙酸锌和亚铁氰化钾用量的确定 准确称取打碎后的白菜样品10.00 g,置于100 mL 具塞离心管中,在每份样品中分别加入21.9%的乙酸锌、106 g/L 的亚铁氰化钾和二者(1:1)混合溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL,补足蒸馏水至50 mL,设定超声波功率100 W,温度60 °C,超声提取30 min,然后在离心机上8000 r/min 离心5 min,将上清液移入50 mL 容量

瓶中,用蒸馏水定容至50 mL,移取2.0 mL 提取液,用分光光度计在413 nm 波长下检测其吸光值^[7](若溶液中有少许杂质需过0.22 μm 水相滤膜),并做空白实验。

表1 衍生反应条件的正交优化实验因素水平表

Table 1 The orthogonal test factor levels list of derivative reaction conditions

水平	因素		
	A 反应温度 (°C)	B 衍生剂 加入量(mL)	C 反应时间 (min)
1	50	0.8	20
2	60	1.0	30
3	70	1.2	40

1.2.2.3 超声波提取条件的正交优化实验 根据单因素实验结果,选择对超声波提取有较大影响的3个因素:提取时间、超声波功率、提取温度,进行正交优化实验。选择西兰花作为样品。

表2 超声波提取条件的正交优化实验因素水平表

Table 2 The orthogonal test factor levels list of ultrasound extraction conditions

水平	因素		
	A 提取时间 (min)	B 超声波功率 (W)	C 提取温度 (°C)
1	20	70	50
2	30	80	60
3	40	90	70

1.2.3 乙酸锌和亚铁氰化钾对甲醛-PFBHA 衍生物的影响 准确移取50、100、200 μL 114 μg/mL 的甲醛标准使用液各两份于10 mL 容量瓶中,其中一份依次加入0.5 mL 21.9%的乙酸锌溶液,0.5 mL 106 g/L 的亚铁氰化钾溶液,1.0 mL 1.0 mg/mL 的PFBHA 衍生剂;另一份依次加入1.0 mL 蒸馏水,1.0 mL 1.0 mg/mL 的PFBHA 衍生剂,两份溶液均用蒸馏水定容至10 mL,然后在60 °C 水浴中加热20 min,取出后在流水中快速冷却,在离心机上8000 r/min 离心5 min,取少许溶液过0.22 μm 混合相滤膜,液相色谱检测。重复3次。

1.2.4 颜色干扰实验和衍生物显色稳定性实验 通过将少量苋菜红、胍黄、靛蓝三种颜色分别加入2.28 μg/mL 的甲醛标准品中和白萝卜样品中,测定其峰面积变化,确定果蔬样品颜色对甲醛检测过程是否产生干扰。

准确移取50、200、500 μL 114 μg/mL 的甲醛标准使用液于10 mL 容量瓶中,加入1.0 mL 1.0 mg/mL 的PFBHA 衍生剂,用蒸馏水定容至10 mL,置于60 °C 水浴中衍生20 min,取出后在流水中快速冷却,取少许溶液过0.22 μm 混合相滤膜,然后分别放置0、2、4、6、8、10、12、18、24 h,液相色谱法测定每个时间点时溶液的峰面积,确定甲醛-PFBHA 衍生物的显色稳定时间。

1.2.5 标准曲线的绘制 准确移取0、20、50、100、

200、500 μL 甲醛标准使用液于 10 mL 容量瓶中,加入 1.0 mL 1.0 mg/mL 的 PFBHA 衍生剂,用蒸馏水定容至 10 mL,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 30 min,取出后流水中快速冷却,然后加入 0.5 mL 乙酸锌溶液,0.5 mL 亚铁氰化钾溶液,搅拌均匀,8000 r/min 离心 5 min,过 0.22 μm 滤头,液相色谱测定。重复测定 3 次。

样品中甲醛含量 $M = (C \times 50 \times 1000) / (m \times 1000)$

式中: M 为样品中甲醛的残留量(mg/kg); C 为从标准工作曲线得到的样液中甲醛的浓度(mg/L); m 为称取试样质量(g);50 为提取液最终定容体积(mL)。

1.2.6 方法的回收率和精密度实验 将实验原料中 7 种样品打碎,每种样品分别精确称取 4 份,每份 10.00 g,置于 100 mL 具塞离心管中,每种样品中甲醛的添加水平分别为 0、1.14、8.55、17.10 mg/kg,然后按照实验所得检测方法测定甲醛含量。重复 6 次。

1.3 数据处理

采用 Origin (Version 8.6) 进行作图,采用 SPSS (Version 17.0) 进行统计学分析, $p < 0.05$ 认为有统计学显著性差异, $p < 0.01$ 认为有统计学极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

由图 1 可知 PFBHA 衍生液相色谱法检测的最佳波长为 210 nm。通过实验发现流动相比比例乙腈:水 = 70:30,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,所得标准品和样品的分离效果最佳,如图 2 所示,衍生物色谱峰和其他峰能完全分离,完成一个样品的分析耗时 7 min,甲醛衍生物保留时间在 5.3 min。因此高效液相色谱法色谱条件为:流速:1.0 mL/min;流动相:乙腈:水 = 70:30;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL ;检测器:二极管阵列检测器,检测波长:210 nm;色谱柱为 C_{18} 柱。

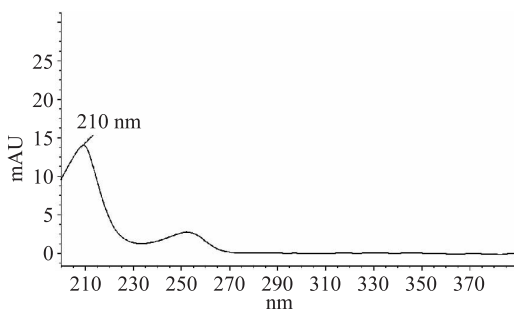


图 1 PFBHA-甲醛衍生物全波长扫描图

Fig.1 Full wavelength scans of PFBHA-formaldehyde derivatives

2.2 衍生反应条件的正交优化实验结果

由表 3 分析可得,影响衍生反应条件的因素主次顺序为:衍生剂加入量 > 水浴温度 > 水浴时间。综合各因素,最优的衍生反应条件为: $A_3B_2C_2$,即水浴温度为 70 $^{\circ}\text{C}$,衍生剂加入量为 1.0 mL,水浴时间为 30 min,在该最佳衍生反应条件下进行验证实验,重复 3 次,测得平均峰面积为 486.1 ± 3.1 。

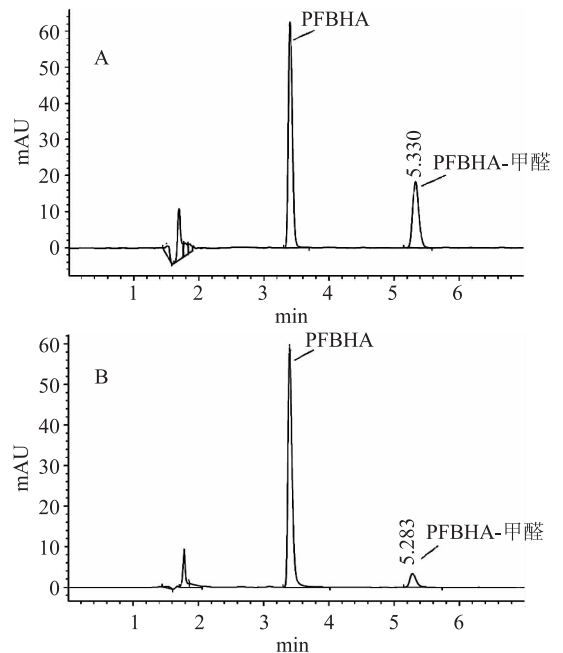


图 2 甲醛标准品(A)和白菜样品(B)的 HPLC 图
Fig.2 HPLC profile of formaldehyde standards (A) and cabbage sample (B)

表 3 衍生反应条件的正交优化实验结果 $L_9(3^4)$

Table 3 The results of orthogonal test of derivative reaction conditions $L_9(3^4)$

实验号	A 水浴温度	B 衍生剂加入量	C 水浴时间	空列	峰面积
1	1	1	1	1	397.6
2	1	2	2	2	437.8
3	1	3	3	3	426.5
4	2	1	2	3	421.6
5	2	2	3	1	483.1
6	2	3	1	2	435.2
7	3	1	3	2	427.3
8	3	2	1	3	441.8
9	3	3	2	1	485.9
K_1	420.6	415.5	424.9		
K_2	446.6	454.9	448.4		
K_3	451.7	453.2	445.6		
R	31.1	39.4	23.5		

2.3 乙酸锌和亚铁氰化钾用量的选择

所得结果如图 3 所示,随着乙酸锌和亚铁氰化钾加入量的增多,溶液的吸光值不断降低,说明溶液的澄清度不断升高。当两者混合加入量达到 5 mL 后,溶液的吸光值随加入量增加趋于稳定,且加入 5 mL 乙酸锌和亚铁氰化钾(1:1)混合溶液时吸光值比单一加入乙酸锌或者单一加入亚铁氰化钾更低,说明溶液更加澄清透明,此时对测定结果影响更小,所以选择加入乙酸锌和亚铁氰化钾(1:1)溶液 5 mL 为较适宜加入量。

2.4 超声波提取条件的确定

由表 4 分析可得,影响超声波提取条件的因素主次顺序为:超声波功率 > 提取时间 > 提取温度。

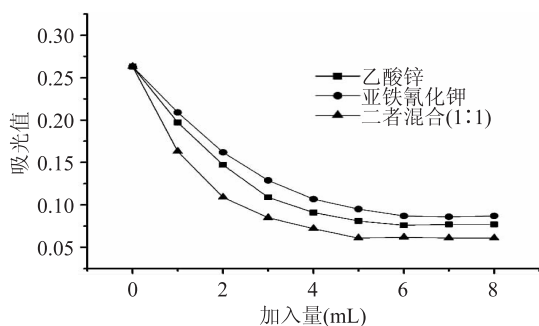


图3 乙酸锌和亚铁氰化钾加入量对澄清度的影响

Fig.3 Effect of the amount of Zinc acetate and Potassium hexacyanoferrate on the clarity of the solution

综合各因素,最优的超声波提取条件为: $A_2B_2C_2$, 即提取温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 超声波功率 80 W , 提取时间 30 min , 在该最佳超声波提取条件下补充验证实验, 重复 3 次, 提取出的甲醛平均含量为 $2.40 \pm 0.53\text{ mg/kg}$ 。

表4 超声波提取条件的正交优化实验结果 $L_9(3^4)$ Table 4 Results of orthogonal test of ultrasound extraction conditions $L_9(3^4)$

实验号	A 提取时间	B 超声波功率	C 提取温度	空列	提取出甲醛含量 (mg/kg)
1	1	1	1	1	1.49
2	1	2	2	2	1.82
3	1	3	3	3	1.52
4	2	1	2	3	1.58
5	2	2	3	1	2.30
6	2	3	1	2	2.07
7	3	1	3	2	1.62
8	3	2	1	3	1.95
9	3	3	2	1	2.31
K_1	1.61	1.56	1.84		
K_2	1.98	2.02	1.90		
K_3	1.96	1.97	1.81		
R	0.37	0.46	0.09		

2.5 乙酸锌和亚铁氰化钾对甲醛-PFBHA 衍生物的影响

由表 5 可知, 加与不加乙酸锌和亚铁氰化钾在三种浓度下测得的甲醛-PFBHA 衍生物峰面积无显著差异 ($p > 0.05$), 说明加入乙酸锌和亚铁氰化钾对甲醛-PFBHA 衍生物没有影响, 乙酸锌和亚铁氰化钾可以作为 PFBHA 衍生液相色谱法前处理过程中的有效澄清剂。

因此改进后的样品处理方法为: 准确称取经打碎的样品 10.00 g , 置于 100 mL 具塞离心管中, 依次

加入 5.0 mL PFBHA 衍生剂, 35 mL 蒸馏水。在超声波功率 80 W , 温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下超声提取 30 min , 然后依次加入 2.5 mL 乙酸锌溶液, 2.5 mL 亚铁氰化钾溶液, 在离心机上 8000 r/min 离心 5 min , 将上清液移入 50 mL 容量瓶中, 再用少量蒸馏水 (约 5 mL) 清洗残渣 1 次, 在离心机上 8000 r/min 离心 5 min , 合并上清液并用蒸馏水定容至 50 mL , 即为样品待测液。

表5 乙酸锌和亚铁氰化钾对甲醛-PFBHA 衍生物的影响

Table 5 Effect of the amount of zinc acetate and potassium hexacyanoferrate on the derivative of PFBHA-formaldehyde

甲醛标准溶液 ($\mu\text{g/mL}$)	衍生物色谱峰平均面积	
	不加乙酸锌和亚铁氰化钾	加乙酸锌和亚铁氰化钾
0.57	125.9 ± 5.4^a	126.4 ± 4.3^a
1.14	245.1 ± 4.1^b	246.3 ± 7.2^b
2.28	485.2 ± 7.8^c	484.6 ± 7.1^c

注: 每一行中相同字母表示衍生物色谱峰平均面积无显著差异 ($p > 0.05$), 表 6 同。

2.6 颜色干扰实验

由表 6 可知, 经过添加苋菜红、胍黄和靛蓝三种颜色, 甲醛标准溶液和白萝卜样品溶液中测得的衍生物峰面积与未加色素测得的衍生物峰面积均无显著差异 ($p > 0.05$), 说明颜色对衍生物的生成量没有影响, 即果蔬样品的颜色对检测结果无影响, 所以邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基) 羟胺盐酸盐衍生液相色谱法前处理过程中不需要进行脱色处理。

2.7 衍生物稳定性实验

所得结果如图 4 所示, 邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基) 羟胺盐酸盐-甲醛衍生物在放置 6 h 后, 峰面积有减少的趋势, 随着放置时间延长, 峰面积逐渐减少, 可能是因为衍生物在放置 6 h 后开始慢慢分解, 所以处理完的样品应尽量在 6 h 以内检测, 以确保检测结果的准确性。

2.8 标准曲线、方法的线性范围及检出限

按上述步骤处理, 绘制的标准曲线如图 5 所示, 标准曲线回归方程为 $y = 210.37x + 6.2804$, 相关系数为 0.9997 , 在 $0.57 \sim 57\text{ mg/kg}$ 范围内线性关系良好。根据 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 确定检出限, 该方法的检出限为 0.114 mg/kg 。

2.9 方法的回收率和精密度

由表 7 可知, 当样品中甲醛的添加水平为 1.14 mg/kg 时, 回收率为 $82.3\% \sim 88.1\%$, 相对标准偏差为 $4.0\% \sim 7.0\%$; 添加水平为 8.55 mg/kg 时, 回收率为

表6 不同颜色对甲醛-PFBHA 衍生液相色谱法检测结果的影响

Table 6 Effect of different colors on the test results of the liquid chromatography derivatized by PFBHA-formaldehyde

样品	衍生物色谱峰平均面积			
	未加	苋菜红	胍黄	靛蓝
甲醛标准溶液 ($2.28\mu\text{g/mL}$)	485.9 ± 3.5^a	479.6 ± 2.8^a	483.1 ± 4.4^a	488.2 ± 3.2^a
白萝卜	13.7 ± 0.2^b	13.5 ± 0.4^b	13.8 ± 0.2^b	13.5 ± 0.3^b

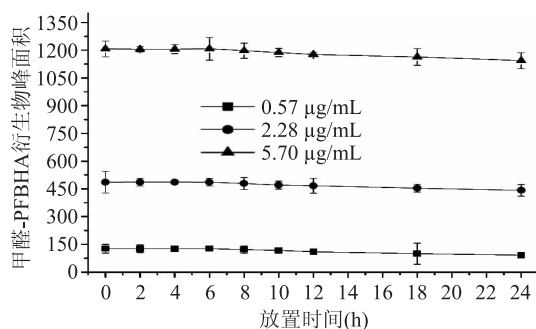


图4 衍生物稳定性随时间变化曲线

Fig.4 The curve of derivatives stability changed with time

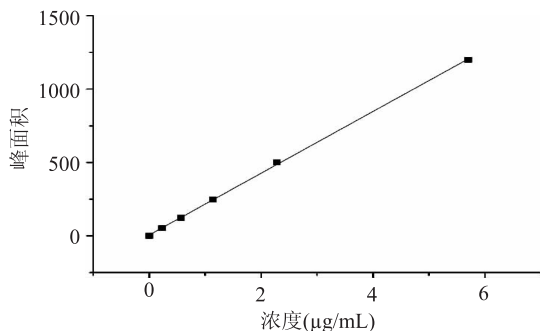


图5 甲醛标准曲线

Fig.5 Standard curve of formaldehyde

90.5%~94.1%, 相对标准偏差为 4.6%~6.1%; 添加水平为 17.10 mg/kg 时, 回收率为 89.2%~93.3%, 相对标准偏差为 4.5%~7.1%。在三个不同浓度的添加水平下, 平均回收率为 82.3%~94.1%, 相对标准偏差为 4.0%~7.1%, 说明该方法的准确度和重现性均为良好。

表7 不同样品中甲醛的回收率和精密度($n=6$)Table 7 Recovery rate and precision tests of formaldehyde in different samples($n=6$)

样品	样品检出量 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	PFBHA	
			平均回收率 (%)	RSD (%)
苹果	0	1.14	82.9	5.5
		8.55	91.1	4.6
		17.10	92.6	7.1
桔子	0.53	1.14	83.4	4.9
		8.55	92.3	6.0
		17.10	89.2	5.8
白菜	0.19	1.14	88.1	6.0
		8.55	90.5	6.2
		17.10	93.3	4.5
白萝卜	0.17	1.14	83.1	7.0
		8.55	92.8	6.0
		17.10	91.7	5.1
辣椒	0	1.14	82.3	6.5
		8.55	91.1	5.4
		17.10	92.1	6.7
西兰花	0.24	1.14	82.7	4.0
		8.55	90.7	4.9
		17.10	90.1	5.3
姜	0	1.14	82.5	5.5
		8.55	94.1	6.1
		17.10	93.3	5.9

3 结论

研究发现邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐与甲醛的衍生物在水中溶解性较好,且检测过程中不受样品颜色干扰,所以可以优化前处理步骤,直接用水提取且同时衍生,经乙酸锌和亚铁氰化钾纯化处理后液相色谱检测,操作简便,准确度高。邻-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺盐酸盐与甲醛衍生反应的最佳条件为水浴温度 70 ℃,衍生剂加入量 1.0 mL,反应 30 min,生成的衍生物最佳吸收波长为 210 nm。该方法标准曲线回归方程为 $y = 210.37x + 6.2804$, 相关系数为 0.9997, 在 0.57~57 mg/kg 范围内线性关系良好,检出限 0.114 mg/kg,能有效检测出甲醛含量较低的样品中甲醛含量。当甲醛添加水平分别为 1.14、8.55、17.1 mg/kg 时,平均回收率为 82.3%~94.1%,相对标准偏差为 4.0%~7.1% ($n=6$),方法的回收率和准确度都较高。本方法完成一个果蔬样品的检测只需 47 min,可以用于果蔬中甲醛含量的快速定量检测。

参考文献

- [1] Tang X J, Bai Y, Duong A, et al. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects [J]. Environment international, 2009, 35(8): 1210-1224.
- [2] 丛玉隆, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 815, 881-888.
- [3] IPCS. Concise International Chemical Assessment Document No.40, Formaldehyde [R]. Geneva: WHO, 2002.
- [4] Charpin D, Dutau H, Falzon S. Hypersensitivity to formaldehyde [J]. Allergy, 2000, 55(10): 986-987.
- [5] 马永均, 安利华, 郑万源, 等. 中国常见水果甲醛本底值调查及含量分析 [J]. 食品科技, 2007, 3(5): 221-224.
- [6] Isela L, Noelia C, Francisco P, et al. Ultrasound-assisted emulsification microextraction with simultaneous derivatization coupled to fibre optics-based cuvetteless UV-vis micro-spectrophotometry for formaldehyde determination in cosmetic samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 16(5): 125-129.
- [7] Liu J F, Peng J F, Chi Y G, et al. Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography [J]. TALANTA, 2005, 65(3): 705-709.
- [8] 徐天源, 林太清, 韩必红. 水产及水发食品中甲醛的气相色谱法测定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 64-71.
- [9] 国家水产品质量监督检验中心. SC/T 3025-2006, 水产品中甲醛的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] 广东省疾病预防控制中心, 广州天河绿洲生物化学研究中心. DB44/T 519-2008 食品中甲醛的快速检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [11] 农业部食用菌产品质量监督检验测试中心(上海), 长春吉大小天鹅仪器有限公司, 上海市农业科学院食用菌研究所. 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.
- [12] 中华人民共和国浙江出入境检验检疫局. SN/T 1547-2011 进出口食品中甲醛的测定 液相色谱法 [S]. 北京: 中国标

(下转第 313 页)

得直线回归方程为 $Y = 1355X + 481.66$, 相关系数 $R^2 = 0.9994$ 。结果表明西地那非在 $0.2 \sim 20 \mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好。

通过空白基质溶液稀释标准液进行检测, 当色谱峰信噪比(S/N)等于3时对应的浓度作为方法的检测限, 实验测得西地那非检测限为 $0.025 \mu\text{g/L}$ 。配制浓度为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 的西地那非溶液5份, 按照上述操作进行检测。按照上述标准曲线进行计算, 求得该浓度下西地那非浓度的精密度(RSD)为 $1.32\% < 3\%$, 将 $0.5 \mu\text{g/L}$ 作为该方法的定量限。

2.4.3 精密度 取浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ 的西地那非溶液, 重复进样6次, 记录峰面积并计算相对标准偏差(RSD)。测得西地那非峰面积RSD为 $1.39\% < 2\%$, 表明方法精密度良好。

2.4.4 回收率 应用本文建立方法, 在空白玛咖样品中添加标准溶液, 分别做 0.05 、 0.1 和 1 mg/kg 的3个水平的添加实验。每个添加水平做5个平行实验, 按照1.3节所述的样品处理方法得到样品液进行测定, 回收率结果如表2, 西地那非平均回收率在 $92.45\% \sim 106.91\%$ 之间, 相对标准偏差在 $4.98\% \sim 7.48\%$ 之间, 该方法适合应用于玛咖中西地那非的定量分析。

表2 西地那非添加回收率和相对标准偏差($n=5$)
Table 2 The RSD of Recovery ($n=5$)

样品	加标量 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
玛咖粉末	0.05	92.45	7.48
	0.1	92.82	7.43
	1	106.91	4.98

2.4.5 稳定性 用基质溶液配制浓度为 $100 \mu\text{g/L}$ 的标准液, 分别在 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 10 h 检测, 计算峰面积RSD以验证分析方法的稳定性, 实验测定在不同时间进样西地那非峰面积RSD为 1.78% , 小于 2% , 方法具有良好的稳定性。

2.5 实际样品分析

应用所建立的UPLC-MS/MS方法对市场上的玛咖果、玛咖酒、玛咖饮料、玛咖精片和玛咖果糖等共14个玛咖产品进行检测。测定这些玛咖产品中是否添加西地那非, 并进行定量分析。检测结果表明所购买的样品均未检测出添加西地那非。

3 结论

本文建立了UPLC-MS/MS法对玛咖产品中非法添加西地那非进行检测。该方法具有高选择性、高灵敏度、准确定性定量分析等特点。样品前处理过程简单, 节约时间和成本, 可提高工作效率。可应用于玛咖产品中非法添加西地那非的定量分析, 具

有一定的实用价值。为检测玛咖产品质量的好坏、消费者身体健康提供方便。为规范市场上玛咖产品提供参考, 具有很好的实用价值。

参考文献

- [1] Gonzales G F, Cordova A, Vega K, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men [J]. *Andrologia*, 2002, 34(6): 367-372.
- [2] Gonzales G F, Cordova A, Vega K, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men [J]. *Journal of Endocrinology*, 2003, 176(1): 163-168.
- [3] 金文闻. 药食两用植物玛咖 (*Lepidium meyenii*) 的功效物质研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [4] Liu H, Jin W, Fu C, et al. Discovering anti-osteoporosis constituents of maca (*Lepidium meyenii*) by combined virtual screening and activity verification [J]. *Food Research International*, 2015, 77: 215-220.
- [5] 文金隆, 何芳雁, 韩春妮, 等. 云南引种玛咖对小鼠非特异性免疫、抗疲劳、耐缺氧功能的影响 [J]. *云南中医学院学报*, 2012, 35(5): 4-7.
- [6] 冯颖, 何钊, 徐珑峰, 等. 云南栽培玛咖的营养成分分析与评价 [J]. *林业科学研究*, 2009, 22(5): 696-700.
- [7] 新“植物伟哥”玛咖的中国式狂欢 [J]. *农家之友*, 2015(3): 9-10.
- [8] 真相揭秘: 植物伟哥玛咖是惊天骗局 [J]. *现代营销: 经营版*, 2015(7): 44-45.
- [9] 刘元瑞, 葛海生, 赵康虎, 等. 薄层原位表面增强拉曼光谱法检测中成药和保健品中添加的西地那非 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1241-1246.
- [10] 鲁琳, 高燕红, 李少霞, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定保健食品中枸橼酸西地那非的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005(9): 1052-1054.
- [11] 钟华, 梁淑明, 曾伟杰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法快速检测保健品中的枸橼酸西地那非 [J]. *现代食品科技*, 2010(2): 206-208.
- [12] 苏永恒, 刘红丽, 张榕杰. 超高效液相色谱-串联电喷雾四级杆质谱法检测西地那非的方法研究 [J]. *中国卫生工程学*, 2010(1): 44-46.
- [13] 任淑玲, 朱旭江. LC-MS 检测金锁固精丸中非法添加的枸橼酸西地那非 [J]. *中国现代应用药学*, 2010(4): 358-360.
- [14] 李锦清, 慕艳, 郇明浩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中三种违禁成分 [J]. *现代食品科技*, 2014, 11: 246-250.
- [15] SN/T 1951-2007 进出口保健食品中伐地那非、西地那非、他达拉非的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法.

(上接第309页)

准出版社, 2011.

[13] Li J R, Zhu J L, Ye L F. Determination of formaldehyde in squid by highperformance liquid chromatography [J]. *Asia Pac J Clin Nutre*, 2007, 16(1): 127-130.

[14] Rebecca A, Fernando L. Analysis of formaldehyde formation

in wastewater using on-fiber derivatization-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 25(29): 26-29.

[15] 尤铁学. 碘量法标定二氧化硫和甲醛标准贮备溶液的改进 [J]. *化学试剂*, 2008, 30(6): 447-448.