

气相色谱-燃烧-同位素比质谱法测定鱿鱼中甲醛稳定碳同位素比值

韩 莉, 余婷婷, 刘 迪, 王会霞, 江 丰

(湖北省食品质量与安全监督检验研究院 武汉 430074)

摘要 建立了一种气相色谱-燃烧-同位素比质谱法(GC/C/IRMS)测定鱿鱼中甲醛(FA)稳定碳同位素比值的方法。鱿鱼样品经水充分提取后,高速离心除油脂,上清液与 2,4-二硝基苯肼在酸性、60℃条件下发生液相衍生化反应 1 h,衍生液经正己烷萃取,氮吹干后复溶即可进行稳定碳同位素测试。二氯甲烷、甲醇、正己烷、乙腈均可作为衍生产物甲醛 2,4-二硝基苯肼的同位素测试的溶剂。甲醛的衍生化反应未发生碳同位素分馏,由质量平衡方程计算得到的衍生产物甲醛 2,4-二硝基苯肼的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与实测值差值的标准偏差为 0.215‰。分析 9 个市售不同产地鱿鱼中甲醛的含量为 0.341~39.132 mg/kg,内脏部分含量较高。甲醛含量较高的 2、3、4、5 号样品 $\delta^{13}\text{C}$ 值差异高达 23.653‰。水产品中甲醛稳定碳同位素指纹特征可作为其来源解析的特征性指标。

关键词 气相色谱-燃烧-同位素比质谱法; 鱿鱼; 甲醛; 碳同位素; 源解析

文章编号 1009-7848(2022)02-0337-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.036

我国是水产品的生产大国和消费大国,水产品的安全和质量也受到人们的关注。甲醛是水产品中经常被检出的一种化学污染物^[1-2],是一种无色,具有强烈刺激气味的原生质毒物,人长期食用含有甲醛的食物,会对身体造成极大伤害,我国也早将甲醛列入农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》(农业部 193 号公告)禁用药物名单^[3]。水产品中甲醛来源比较复杂:一是人为添加,不法商贩在水产保存和运输过程中添加甲醛水溶液,用于保鲜、漂白、防腐等作用;二是内源产生,水产品自身代谢过程会产生一定量的甲醛^[4]。水产品中鱿鱼的甲醛含量普遍偏高,含量高达 146 mg/kg,食品安全风险比较突出^[5]。

目前,甲醛的测试方法有分光光度法^[6-7]、荧光法^[8]、气相色谱法^[9-10]、高效液相色谱法^[11-15]等。甲醛的含量测定只能说明食品中含有甲醛,其来源却无法判定,这也是目前食品安全质量监管的难点。稳定同位素指纹分析技术可从原子角度探析化合物中元素的分布,在食品真实性鉴别、产地溯源等方面很有潜力,该技术已在小麦^[16]、葡萄酒^[17]、蜂

蜜^[18]、牛肉^[19]、茶叶^[20-21]等多种食品中成功应用。目前,同位素分析技术用于食品中甲醛来源鉴别的报道尚少,在大气中甲醛来源分析方面有相关研究。余应新等^[22-23]利用单体化合物稳定碳同位素方法研究了大气中甲醛来源的问题。郭宋军等^[24]和 Guo 等^[25]采用气相色谱/燃烧/同位素比值质谱(GC/C/IRMS)技术测定了广州市大气甲醛碳同位素组成。鱿鱼中普遍存在一定量的甲醛,内源性甲醛是由氧化三甲胺在代谢过程中转化而来^[26],其代谢效率受茶多酚、氯化钙、乳糖等影响^[27-29]。关于水产品中甲醛真实来源问题,目前还没有有效地判别方法。利用单体化合物同位素指纹特征来表征鱿鱼中甲醛来源是一个新思路。本文选用甲醛安全风险较高的鱿鱼为对象,建立衍生化-气相色谱/燃烧/同位素比值质谱(GC/C/IRMS)法测定鱿鱼中甲醛稳定碳同位素的方法,为甲醛来源解析提供科学依据,为食品质量安全监管提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醛水溶液、2,4-二硝基苯肼(2,4-Dinitrophenylhydrazine, DNPH)、甲醛 2,4-二硝基苯肼标准品(Formaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazine, FA-DNPH, 99.8%),CATO 公司;甲醛水溶液标准品(10 mg/L),First Standard 公司;正己烷、

收稿日期: 2021-02-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602302);湖北省食品药品监督管理局科研项目(201801017)

作者简介: 韩莉(1990—),女,硕士,工程师

E-mail: 447605531@qq.com

二氯甲烷、乙酸乙酯,国药集团化学试剂有限公司;盐酸溶液、氯化钠(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;国际原子能机构同位素标准物质:咖啡因($\delta^{13}\text{C}=-19.357\text{‰}$,IAEA-600)、乙醇溶液($\delta^{13}\text{C}=-26.72\text{‰}$,BCR-660)。

1.2 仪器与设备

ME204/02 分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;WNE29 恒温水浴摇床,德国 memmert 公司;S180H 超声仪,德国 Elma 公司;Allegra 64R 冷冻离心机,美国贝克曼公司;N-EVAP112 氮吹仪,美国 Organomation Associates Inc 公司;e2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;DeltaV 气体稳定同位素比值质谱仪(配备有 Thermo 气相色谱仪、Flash 2000HT 元素分析仪),美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理 鲑鱼样品购买自 6 个省 9 个城市区域,内脏部分为样品 A,剔除内脏剩余部分为样品 B,整条鲑鱼为样品 C,样品 A、B、C 均切碎后研磨成泥,-20℃保存。衍生试剂 2,4-二硝基苯肼用色谱纯的乙腈重结晶两次后用高效液相色谱检验其纯度。将过量的纯化过的 DNPH 溶于 24 mL 盐酸,再加水定容至 100 mL,配制得到衍生溶液。

1.3.2 FA 的含量测试 准确称取 2 g 鲑鱼样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 水,盖上盖子后超声提取 30 min,9 000 r/min、4℃高速离心 10 min,取上清液于另一个干净的离心管,加入 1 mL DNPH 衍生溶液(根据鲑鱼样品中甲醛含量调整衍生溶液的添加量),迅速密封,将离心管置于 60℃恒温水浴摇床衍生反应 1 h,待冷却至室温,用 0.22 μm 滤膜过滤,衍生物的含量在高效液相色谱仪中完成,工作曲线标准溶液和样品相同的衍生操作,拟定衍生物线性曲线间接计算鲑鱼样品中 FA 的含量。

高效液相色谱仪工作条件如下:化学键合 C18 柱(4.6 mm \times 250 mm);柱温 30℃;流动相 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=7:3$;流速 0.8 mL/min;进样量 10 μL ;紫外检测器,检测器波长 355 nm。

1.3.3 FA 标准样的稳定碳同位素测试 取 1 mL 37% FA 溶液于 5 mL 样品顶空瓶中,加入适量的

氯化钠,样品瓶置于 65℃反应箱平衡 90 min,用 5 mL 气体进样针抽取 2 mL 顶空气体,通过 GC/C/IRMS 测定顶空气体中 FA 的稳定碳同位素比值,参考气 CO_2 的 $\delta^{13}\text{CPDB}$ 值采用乙醇($\delta^{13}\text{C}=-26.72\text{‰}$,BCR-660)校正。

气相色谱仪工作条件如下:测定 FA 标准品时,采用 HP-INNOWAX 强极性色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 20 μm);柱温 65℃,进样口温度 250℃,氦气流速 1.5 mL/min。

1.3.4 甲醛 2,4-二硝基苯肼的稳定碳同位素测试 向 1.3.2 节衍生好的溶液中加入 10 mL 的正己烷,翻转摇匀充分萃取,4 000 r/min、4℃离心 3 min,取上层正己烷置于 50 mL 离心管中,向残留水溶液中再加入 10 mL 正己烷,再重复萃取 2~3 次,合并正己烷层,将萃取液置于氮吹仪吹干,用甲醇定容至 1 mL,通过 GC/C/IRMS 测定甲醛 2,4-二硝基苯肼的稳定碳同位素值,参考气 CO_2 的 $\delta^{13}\text{CPDB}$ 值采用乙醇($\delta^{13}\text{C}=-26.72\text{‰}$,BCR-660)校正。

气相色谱仪工作条件如下:测定甲醛 2,4-二硝基苯肼时,色谱柱为 HP-5MS 弱极性柱(30 m \times 0.25 mm \times 20 μm);程序升温条件从 50~200(20℃/min)~250(3℃/min)~290℃(20℃/min),保留 5 min;进样口温度 250℃,氦气流速 1.0 mL/min。

1.3.5 2,4-二硝基苯肼的稳定碳同位素测试 通过百万分之一天平称取处理好的 2,4-二硝基苯肼粉末 0.1~2 mg 于锡杯,通过自动进样盘进样,采用元素分析-同位素比值质谱法(EA-IRMS)测定 2,4-二硝基苯肼的稳定碳同位素值。参考气 CO_2 的 $\delta^{13}\text{CPDB}$ 值采用咖啡因($\delta^{13}\text{C}=-19.357\text{‰}$,IAEA-600)校正。

元素分析仪工作条件如下:燃烧炉温度 960℃,氦气流速 90 mL/min,二氧化碳参考气流速 180 mL/min,氧气流速 230 mL/min,色谱柱温 50℃。

1.3.6 液相衍生化过程的同位素效应试验 向离心管加入 10 μL 37% FA 溶液,混匀后向其中加入 1 mL 的 DNPH 衍生溶液(过量),衍生、萃取及测试同 1.3.2 节和 1.3.4 节方法。

1.4 计算方法

Wen 等^[30]通过测定 DNPH 和甲醛 2,4-二硝基苯肼的稳定碳同位素比值,以质量平衡方程【式

(1) 间接计算而得到 FA 的稳定碳同位素比值, 余应新等^[22]也用该方法对大气中 FA 的稳定碳同位素比值进行了分析。

$$f_{\text{FA}}\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}+f_{\text{DNPH}}\delta^{13}\text{C}_{\text{DNPH}}=\delta^{13}\text{C}_{\text{FA-DNPH}} \quad (1)$$

式中, f_{FA} ——参加反应的甲醛的碳原子在衍生物中的占比; f_{DNPH} ——参加反应的 2,4-二硝基苯肼的碳原子在衍生物中的占比; 其中 $f_{\text{FA}+\text{DNPH}}=1$ 。

2 结果与分析

2.1 仪器稳定性分析

IRMS 系统的性能优劣是确定碳稳定同位素比值能否被认可的重要指标。验证 IRMS 系统的测定稳定性, 连续 10 次通入固定体积的 CO_2 气体, 测定 CO_2 中 $\delta^{13}\text{C}$, 结果见表 1。其标准偏差为 0.016‰, 稳定性较好。

2.2 FA 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测试结果

FA 溶液中的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由顶空-GC/C/IRMS 法测定, 直接测定 FA 的灵敏度较低, 需对平衡过程及条件进行优化以达到 GC/C/IRMS 方法测定 FA 的灵敏度。由图 1a 可知, 高温可以促进 FA 从液相向

表 1 IRMS 系统稳定性

Table 1 Stability of IRMS system		
进样次数	离子强度/mV	$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$
1	99.037	0.006
2	98.853	0.000
3	98.889	-0.002
4	98.944	-0.018
5	98.975	-0.036
6	99.008	-0.031
7	99.009	-0.013
8	98.956	-0.021
9	99.646	-0.026
10	99.119	-0.044
SD	-	0.016

气相扩散, 提高平衡温度可以提高顶空 FA 含量, 然而当温度太高时, FA 的含量却有所降低, 可能太高的温度会导致顶空瓶瓶盖变形, 部分气体逸散, 因此最优平衡温度为 65 °C。FA 产生量与平衡时间的关系如图 1b 所示, 反应在 90 min 时基本可以达到平衡状态。向 FA 溶液中加入一定量的

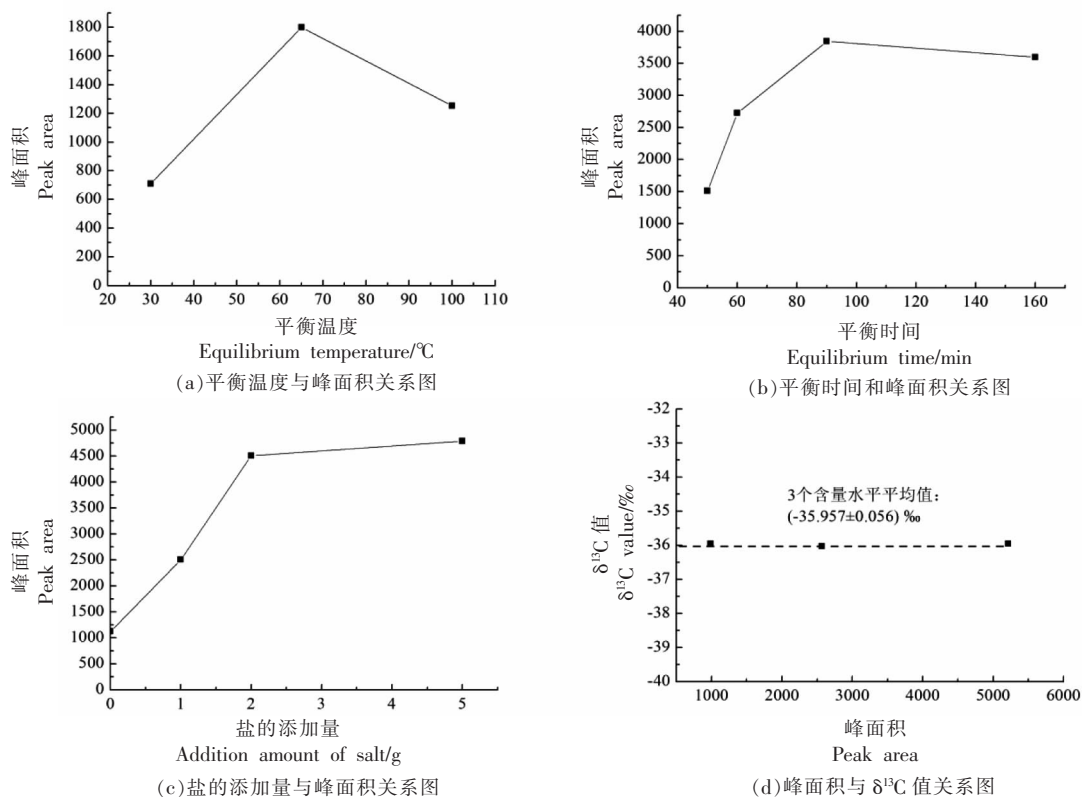


图 1 FA 测试方法优化结果示意图

Fig.1 Schematic diagram of optimization results of FA test method

氯化钠可以降低 FA 在水中的溶解度,提高 FA 测定的灵敏度,如图 1c 所示,氯化钠的最佳添加量为 2 g。从图 1d 可知,FA 含量对 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定影响不大,3 个含量水平的 FA 溶液 $\delta^{13}\text{C}$ 值标准偏差 SD 仅为 0.056‰。对同一含量水平的 FA 测定 3 次平行,其平均值为 -35.937‰,SD 为 0.121‰,以该值为后文中液相衍生化过程同位素效应验证试验

中 FA 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

2.3 DNP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测试结果

DNP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由 EA/IRMS 法测定,进样 5 次,得到的结果如表 2 所示。测定得到的 $\delta^{13}\text{C}$ 值平均值为 -28.154‰,SD 为 0.104‰。本研究所用到的衍生剂均由该纯化过的 DNP 固体配制而来。

表 2 DNP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值结果

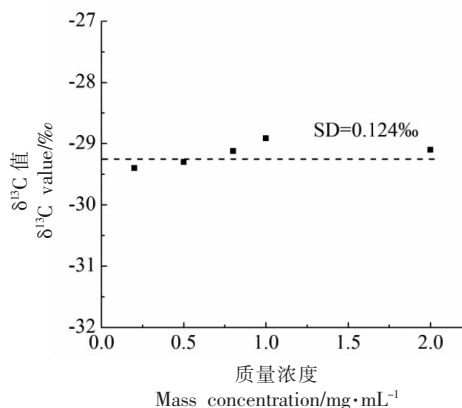
Table 2 Results of $\delta^{13}\text{C}$ value of DNP

样品序号	1	2	3	4	5
$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	-28.199	-28.150	-28.239	-27.976	-28.205
平均值/‰	-28.154				

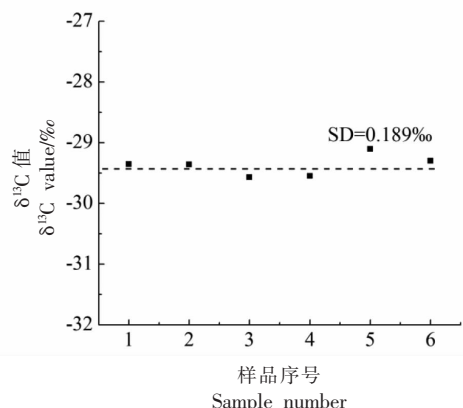
2.4 甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测试结果

甲醛 2,4-二硝基苯腙标准品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由 GC/IRMS 测定,其色谱峰峰形对称、尖锐。不同质量浓度梯度 (0.2~2 mg/mL) 的标准溶液中甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 值如图 2 所示,SD 值为

0.124‰,说明其 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定受质量浓度影响很小,测定 6 组质量浓度为 0.8 mg/mL 标准溶液,甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 SD 为 0.189‰,说明碳同位素测试稳定性较好。



(a) 甲醛 2,4-二硝基苯腙浓度与 $\delta^{13}\text{C}$ 值关系图



(b) 不同样品 $\delta^{13}\text{C}$ 值结果图

图 2 甲醛 2,4-二硝基苯腙 $\delta^{13}\text{C}$ 值结果示意图

Fig.2 Schematic diagram of $\delta^{13}\text{C}$ value on formaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone

对同一质量浓度下,分别对采用二氯甲烷、甲醇、正己烷、乙腈稀释的标准溶液进行稳定碳同位素分析, $\delta^{13}\text{C}$ 值如下表 3,不同溶剂的选择对甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 值无明显的影响。衍生产物可采用下表中的溶剂复溶上 GC/IRMS 进行测试。

2.5 液相衍生化过程同位素效应试验结果

5 组液相衍生化过程的测试结果如表 5 所示,由甲醛和 DNP 在酸性条件下衍生而产生的

表 3 不同溶剂稀释下甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 值

Table 3 $\delta^{13}\text{C}$ value of formaldehyde

溶剂	$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	SD/‰
二氯甲烷	-29.049	0.066
甲醇	-29.052	
正己烷	-29.027	
乙腈	-28.912	

甲醛 2,4-二硝基苯腙的 $\delta^{13}\text{C}$ 理论值是经质量平衡方程(1)计算而来,测定值是经 GC/C/IRMS 测定得到。从表 4 可知,甲醛和 DNPH 的衍生化过程是符合质量平衡方程的,衍生物 $\delta^{13}\text{C}$ 理论值和测

定值差值低于 0.344‰,差值 SD 为 0.215‰。可以认为在 DNPH 过量的情况下,甲醛在衍生化过程中是不存在稳定碳同位素的分馏的。

表 4 液相衍生化过程结果表(‰)

Table 4 The results of liquid phase derivatization process (‰)

序号	$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{DNPH}}$	$\delta^{13}\text{C}$ 甲醛 2,4-二硝基苯腙 理论值	$\delta^{13}\text{C}$ 甲醛 2,4-二硝基苯腙 测定值	Δ
1	-35.937	-28.154	-29.266	-29.594	0.328
2				-29.101	-0.165
3				-29.444	0.178
4				-29.610	0.344
5				-29.590	0.324

根据 Rieley^[31]提出的同位素效应理论,化学反应中的同位素分馏与决定反应速率的那一级反应有关,碳原子相连的化学键的断裂和生成才会导致碳同位素发生分馏。FA 和 DNPH 的反应如图 3 所示,FA 中的碳原子参与了化学键的断裂和生成,DNPH 中仅有氮原子参与了化学键的断裂和生成,2,4-二硝基苯基中无碳原子参与反应。而且,该反应中 DNPH 是过量的,FA 是定量完全反应了,因此整个反应过程中碳同位素丰度比没有发生改变,可以认为甲醛液相衍生化反应无碳同位素分馏。

2.6 鱿鱼样品中 FA 含量及 $\delta^{13}\text{C}$ 值测试结果分析

对市售 9 个沿海城市鲜活鱿鱼中 FA 含量进行测试,除去内脏的鱿鱼身体、鱿鱼全部、内脏 3 部分的含量分布如图 4 所示。试验结果表明,鱿鱼中普遍存在一定量的 FA,其含量 0.341~39.132 mg/kg。总体来看,鱿鱼内脏中 FA 的含量最高,如样品 3 中内脏的 FA 含量高达 39.132 mg/kg,除去内脏后的身体中 FA 含量为 4.382 mg/kg,说明内源性的甲醛可能主要是在鱿鱼内脏产生。样品 1 例外,其内脏中 FA 含量低于全部样品中 FA 的含量,可能该样品中添加了一定的外源性 FA,使得其分布异常。

对 FA 含量较高的 2、3、4、5 4 个鱿鱼样品进一步测定衍生产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值,经过质量平衡方程(1)计算得到的鱿鱼中甲醛的 $\delta^{13}\text{C}$ 值如表 5 所示,

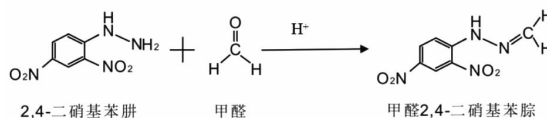


图 3 衍生反应的结构式示意图

Fig.3 Structural formula schematic of the derived reaction

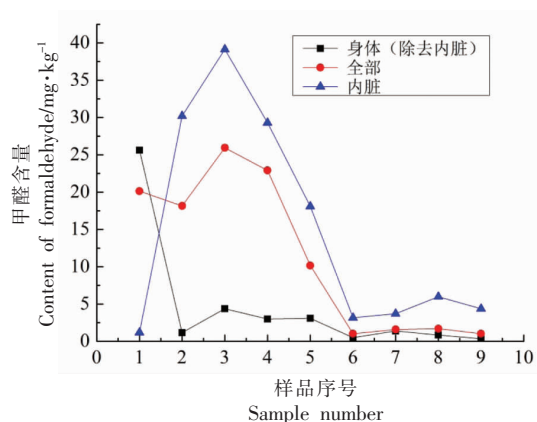


图 4 鱿鱼中甲醛含量示意图

Fig.4 Diagram of formaldehyde content in squid

不同产地鱿鱼中甲醛的 $\delta^{13}\text{C}$ 值差异最大可达 23.653‰,同位素指纹特征的差异可能是由于地域差异导致鱿鱼有机体中碳元素分布差异造成,也可能是不同样品中内外源甲醛贡献率的差异所致。

3 结论

本研究利用 DNPH 与 FA 在酸性条件下发生

表5 鱿鱼中FA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值结果表(‰)Table 5 $\delta^{13}\text{C}$ value of FA in squid (‰)

序号	2	3	4	5
甲醛 2,4-二硝基苯胺 $\delta^{13}\text{C}$ 值	-31.031	-27.634	-30.927	-29.026
甲醛 $\delta^{13}\text{C}$ 值	-48.167	-24.514	-47.565	-34.258

液相衍生化反应,将易挥发的小分子FA转化成难挥发的甲醛2,4-二硝基苯胺,在气相色谱柱上具有更好的保留与灵敏度。通过测定衍生剂DNPH和衍生产物甲醛2,4-二硝基苯胺的 $\delta^{13}\text{C}$ 值,液相衍生化反应不产生碳同位素分馏,因此由质量平衡方程可以间接计算得到FA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。该方法可用于鱿鱼中FA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值测定,鱿鱼的产地以及人为添加使用FA均会对鱿鱼中FA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值产生影响。本研究为鱿鱼中甲醛的来源判别提供了新思路,为保障水产品的质量安全提供了技术支撑。

参 考 文 献

- [1] 陈金玉,刘华,朱晓琳,等.广州市市售水产品氯霉素、孔雀石绿、呋喃唑酮和甲醛残留量分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(17):5609-5614.
CHEN J Y, LIU H, ZHU X L, et al. Analysis of chloramphenicol, malachite green, furazolidone and formaldehyde residues in aquatic products sold in Guangzhou in 2018-2019[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(17): 5609-5614.
- [2] 郑智溢,黄娇,李珏,等.乐清市主要鲜活水产品甲醛残留量调查及膳食暴露风险评估[J].渔业研究,2018,40(3):217-222.
ZHENG Z Y, HUANG J, LI J, et al. Investigation on formaldehyde residues of major fresh aquatic products consumed in Yueqing City and health assessment on dietary exposure[J]. Fishery Study, 2018, 40(3): 217-222.
- [3] 钟崇泳.广东省水产品流通领域中违禁药物的检测和研究[D].广州:华南理工大学,2015.
ZHONG C Y. Detection and study of prohibited drugs in aquatic products circulation in Guangdong Province[D]. GuangZhou: South China University of Technology, 2015.
- [4] 李颖畅,朱军莉,励建荣.水产品中内源性甲醛的产生和控制研究进展[J].食品工业科技,2012,8(33):406-408.
- [5] LI Y C, ZHU J L, LI J R. Research progress on producing and control of endogenous formaldehyde in aquatic products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 8(33): 406-408.
- [6] 张璇,杨光昕,韩峰,等.鱿鱼和龙头鱼中甲醛本底含量及变化规律研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(2):864-867.
ZHANG X, YANG G X, HAN F, et al. Studies on intrinsic content and change trend of formaldehyde in squid and bummalo[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(2): 864-867.
- [7] TESHIMA N, FERNÁNDEZ S K M, UEDA M, et al. Flow injection spectrophotometric determination of formaldehyde based on its condensation with hydroxylamine and subsequent redox reaction with iron (I II)-ferrozine complex[J]. Talanta, 2011, 84(5): 1205-1208.
- [8] AFKHAMI A, BAGHERI H. Preconcentration of trace amounts of formaldehyde from water, biological and food samples using an efficient nanosized solid phase, and its determination by a novel kinetic method [J]. Microchimica Acta, 2012, 176 (1/2): 217-227.
- [9] SÁENZ M, ALVARADO J, PENAPEREIRA F, et al. Liquid -phase microextraction with in -drop derivatization combined with microvolume fluorospectrometry for free and hydrolyzed formaldehyde determination in textile samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 687(1): 50-55.
- [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):51-58.
TANG S Z, HUANG L, CHEN Z X, et al. Quantification of free - formaldehyde in aquatic products by gas chromatography coupled with pro -column derivatization[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2016, 6(2): 51-58.
- [11] 周霞,李双,焦丽娟.顶空气相色谱法测定水发食品中甲醛[J].营养与食品卫生,2018,45(10):

- 1773-1776.
- ZHOU X, LI S, JIAO L J. Determination of formaldehyde in soaked food by headspace-gas chromatography[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2018, 45(10): 1773-1776.
- [11] 徐继松, 翟少伟, 许璐, 等. 衍生化反相高效液相色谱法检测水产品中的甲醛残留量[J]. *食品工业*, 2019, 40(10): 299-303.
- XU J S, ZHAI S W, XU L, et al. Determination of formaldehyde residues in aquatic products with derivatization reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. *Food Service*, 2019, 40(10): 299-303.
- [12] 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 S P. Determination of formaldehyde in aquatic products by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2016, 7(7): 2931-2936.
- [13] YU H X, LIU Y, XU M P, et al. Feasibility of micro-extraction and subsequent HPLC analysis for evaluating the extractable formaldehyde content of medium-density fiberboard[J]. *European Journal of Wood and Wood Products*, 2015, 73(6): 801-806.
- [14] XU X, SU R, ZHAO X, et al. Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography[J]. *Talanta*, 2011, 85(5): 2632-2638.
- [15] WANG T, GAO X L, TONG J, 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.
- [16] WADOOD S A, BOLI G, YIMIN W. Geographical traceability of wheat and its products using multielement light stable isotopes coupled with chemometrics[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2019, 54(2): 178-188.
- [17] VICTOR V, ROSS S, KARINE P, et al. Strontium isotope characterization of wines from the Quebec (Canada) terroir[J]. *Procedia Earth and Planetary Science*, 2015, 13: 252-255.
- [18] BERRIEL V, PERDOMO C H. Differentiating pasture honey from eucalyptus honey based on carbon isotopic data in Uruguay[J]. *Heliyon*, 2019, 5(3): e01228.
- [19] ZHAO S, ZHAO Y, ROGERS K M, et al. Two new defatted beef reference materials, CAAS-1801 and CAAS-1802, for carbon and nitrogen stable isotope ratio measurements[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2019, 33(8): 803-810.
- [20] LIU Z, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Influence of leaf age, species and soil depth on the authenticity and geographical origin assignment of green tea[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2019, 33(7): 625-634.
- [21] LIU H L, ZENG Y T, YAN J N, et al. C N H O and mineral element stable isotope ratio analysis for authentication in tea[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 91: 103513.
- [22] 余应新, 文晟, 冯艳丽, 等. 大气甲醛稳定碳同位素分析方法研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(8): 1495-1500.
- YU Y X, WEN S, FENG Y L, et al. Stable carbon isotope analysis method for the atmospheric formaldehyde[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(8): 1495-1500.
- [23] 余应新, 文晟, 冯艳丽, 等. 亚硫酸氢钠和半胱胺衍生法测定大气甲醛中碳同位素的研究[J]. *分析化学*, 2006, 34(6): 773-777.
- YU Y X, WEN S, FENG Y L, et al. The feasibility study of carbon isotope analytical method for the atmospheric formaldehyde by sodium bisulfite[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(6): 773-777.
- [24] 郭送军, 文晟, 谭吉华, 等. 广州市大气典型羰基化合物碳同位素组成初探[J]. *环境化学*, 2009, 28(2): 272-275.
- GUO S J, WEN S, TAN J H, et al. The preliminary study of carbon isotopic compositions of atmospheric typical carbonyl compounds in Guangzhou[J]. *Environmental Chemistry*, 2009, 28(2): 272-275.
- [25] GUO S J, CHEN M. ^{13}C isotope evidence for photochemical production of atmospheric formaldehyde, acetaldehyde, and acetone pollutants in Guangzhou[J]. *Original Paper*, 2013, 11(1): 77-82.
- [26] 朱军莉, 励建荣. 秘鲁鱿鱼 TMAOase 性质及其与甲醛生成相关性研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 2(10): 97-103.

- ZHU J L, LI J R. Properties of trimethylamine-*N*-oxide demethylase and relation between the enzyme and formation of formaldehyde in the squid from Peru[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 2(10): 97-103.
- [27] DONG L L, ZHU J L, LI X P, et al. Effect of tea polyphenols on the physical and chemical characteristics of dried-seasoned squid (*Dosidicus gigas*) during storage[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 286-592.
- [28] 朱军利, 苗林林, 李学鹏, 等. TG-DSC 分析氯化钙抑制鱿鱼氧化三甲胺的热分解作用[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(12): 148-154.
- ZHU J L, MIAO L L, LI X P, et al. Inhibition action of calcium chloride to thermal degradation of TMAO in squid by TG-DSC technique[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(12): 148-154.
- [29] 陈帅, 朱军莉, 潘伟春. 乳糖对鱿鱼中氧化三甲胺热分解反应动力学的影响[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(3): 116-122.
- CHEN S, ZHU J L, PAN W C. Effects of galactose on the reaction kinetics of thermal degradation of MAO in squid [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(3): 116-122.
- [30] WEN S, YU Y X, GUO S J, et al. Improvement of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization method for carbon isotope analysis of atmospheric acetone[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(8): 1322-1326.
- [31] RIELEY G. Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: Identification of isotope fractionation processes[J]. *The Analyst*, 1994, 119(5): 915-919.

Determination of Formaldehyde Stable Carbon Isotope Ratio in Squid by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry

Han Li, Yu Tingting, Liu Di, Wang Huixia, Jiang Feng

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430074)

Abstract A method of gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) to test stable carbon isotope ratio of formaldehyde (FA) in squid was established. After the squid samples were fully extracted with water, the oil was removed by centrifugation at high speed. The supernatant was derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine at 60 °C for 1 h. The derived liquid was extracted with *n*-hexane liquid. Dichloromethane, methanol, *n*-hexane and acetonitrile can be used as solvents for isotopic testing of formaldehyde 2,4 dinitrophenylhydrazone. No carbon isotope fractionation occurred in the derivative reaction of formaldehyde. The standard deviation of $\delta^{13}\text{C}$ value of formaldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone from measured value and calculated value by the mass balance equation was 0.215%. The formaldehyde content of squids from 9 cities was 0.341-39.132 mg/kg, and the content in visceral was higher. The difference value of $\delta^{13}\text{C}$ value in sample 2, 3, 4 and 5 with high formaldehyde content was as high as 23.653%. The fingerprint of formaldehyde stable carbon isotope in aquatic products can be used as the characteristic index of source analysis.

Keywords gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry; squid; formaldehyde; carbon isotope; source analysis