

实验技术与方法

食用菌中甲醛的提取和乙酰丙酮分光光度法分析

邵毅^{1,2},周昌艳^{1,2},白冰^{1,2},邢增涛³,刘海燕^{1,2}

(1.上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,上海 201403; 2.农业部农产品质量安全风险评估实验室(上海),上海 201403; 3.上海市农业委员会,上海 200003)

摘要:目的 建立适用于多种食用菌的甲醛提取技术和甲醛含量的乙酰丙酮分光光度法测定技术。方法 研究灭酶处理、浸泡时间和温度对食用菌样品中甲醛提取的影响,并用凯氏定氮仪蒸馏单元对处理后的食用菌样品进行水蒸汽蒸馏,替代了直接蒸馏法。结果 食用菌鲜样和干样粉碎后直接用水蒸汽蒸馏提取,能快速提取样品中的甲醛,并能反映样品真实的甲醛含量;甲醛在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度内呈线性相关,相对标准偏差 (RSD) $< 10\%$ ($n=5$),回收率为 82.10% ~ 97.98%。结论 本方法快速简便、准确度高、精密性好,适用于多种食用菌中甲醛含量的分析。

关键词:食用菌; 甲醛; 水蒸汽蒸馏; 乙酰丙酮分光光度法; 食品安全

中图分类号:O655;R15;S646 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)03-0258-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.03.008

Extraction of formaldehyde in edible mushrooms and determination by acetylacetone spectrophotometry

SHAO Yi, ZHOU Chang-yan, BAI Bing, XING Zeng-tao, LIU Hai-yan

(Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403, China)

Abstract: Objective To establish a method of extraction and content analysis by acetylacetone spectrophotometry for formaldehyde in several edible mushrooms. **Methods** Mushroom samples were extracted by steam distillation with the distillation unit of Kieldahl azotometer instead of direct distillation. Furthermore, the effects of enzyme inactivation, soaking time and temperature on formaldehyde extraction were studied. **Results** Both in fresh and dried mushroom samples, formaldehyde could be fully extracted in several minutes by direct steam distillation after triturating, and the exact contents of formaldehyde were reflected by the extraction treatment. The linear range for formaldehyde was 0-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the method showed good accuracy with $RSD < 10\%$ ($n=5$) and recovery rate ranged from 82.10% to 97.98%. **Conclusion** The method established in the study is efficient, simple, accurate, precise and suitable for analysis formaldehyde contents in a variety of edible mushrooms.

Key words: Edible mushroom; formaldehyde; steam distillation; acetylacetone spectrophotometry; food safety

2001—2002年,欧洲、日本、新加坡、泰国等多个国家和地区以香菇甲醛含量超标为由,给我国出口的食用菌产品设置贸易壁垒;2012年,青岛的“甲醛平菇”事件在国内引起了较大的反响,将食用菌

甲醛话题推向了消费者舆论的风口浪尖^[1]。因此,需要建立高效、准确、简便并易于在农产品质量安全检测部门推广的食用菌产品甲醛含量测定方法,保障消费者安全健康,确保我国食用菌产品的质量品质、增加国际贸易竞争力。

目前,乙酰丙酮分光光度法是测定甲醛较为理想的分析方法之一^[2-3]。针对食用菌产品, NY/T 1283—2007《香菇中甲醛含量的测定》^[4]也采用了乙酰丙酮分光光度法。但在长期的食用菌甲醛含量分析工作中发现,该法适用性有限,不适用于银耳、木耳等多糖、胶质含量高的食用菌,原因是样品蒸馏提取过程中,沉在蒸馏瓶瓶底的银耳或木耳会因蒸馏瓶底部过热而发生焦糊现象,样品容易粘在瓶底,不但影

收稿日期:2015-02-10

基金项目:农业部2014年国家食用菌质量安全风险评估项目(GJFP2014005);上海市农业系统标准预研项目(2014-016);上海市闵行区2014年度产学研合作计划项目(2014MH175)

作者简介:邵毅 女 副研究员 研究方向为食品科学

E-mail:shao_saas@163.com

通讯作者:刘海燕 女 助理研究员 研究方向为药物分析

E-mail:yanyanhappy2005@163.com

响甲醛提取,而且影响蒸馏瓶的再次使用。此外,这种直接加热法操作较为繁琐,提取时间长达1 h,不适用于大批量样品的检测。因此,本研究建立了基于水蒸汽蒸馏提取食用菌甲醛的提取技术,扩大了该检测方法的适用性,提高了检测效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

食用菌鲜样(香菇、双孢蘑菇、平菇、黑木耳、金针菇)和干样(香菇、黑木耳、银耳)均为市售。

1.1.2 主要仪器与试剂

分光光度计(8453E,美国 Agilent)、凯氏定氮仪(Kjeltec 2200,丹麦 FOSS)的蒸馏单元、水浴锅、高速粉碎机、搅拌机。

乙酰丙酮溶液(100 ml 蒸馏水中加入 25 g 醋酸铵、3 ml 冰醋酸和 0.4 ml 乙酰丙酮,摇匀,储备于棕色瓶中,此液可保存 1 周)、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 甲醛标准溶液(碘量法标定)。

1.2 方法

1.2.1 食用菌样品处理及甲醛提取

食用菌鲜样:称取用搅拌机粉碎的食用菌鲜样 10.0 g,置于蒸馏管中,加入蒸馏水 100 ml,密封,分别用 3 类方式处理:①恒温浸泡:分别在 4、20、40 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中保持 30、90 和 240 min;②沸水浴灭酶+恒温浸泡:在沸水浴中保持 10 min 后,同“恒温浸泡”处理一样在不同温度水浴锅中保持不同时间;③无处理。

食用菌干样:分别用 3 类方式处理:①恒温浸泡:称取用高速粉碎机粉碎的食用菌干样 1.0 g,置于蒸馏管中,加入蒸馏水 100 ml,密封,20 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 30 min;②先浸发后粉碎:称取 10.0 g 食用菌干样,按干样:水=1:10 的比例在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下浸发 1 h,吸干多余水分称重,用搅拌机粉碎,称取浸发样品的 1/10(相当于 1.0 g 干样)至于蒸馏管中并加入蒸馏水 100 ml;③无处理:粉碎后称取 1.0 g,置于蒸馏管中并加蒸馏水 100 ml,无其他处理。

上述处理后立即通水蒸汽蒸馏,冷凝管下口应先插入盛有 10 ml 蒸馏水且置于冰浴的容器中,且控制冷凝水的水温 ≤ 10 $^{\circ}\text{C}$,准确收集蒸馏液至 250 ml,然后测定样品吸光度,绘制标准曲线计算出甲醛浓度。

1.2.2 甲醛测定方法^[5-7]

吸取甲醛标准溶液或样品溶液 10 ml,加入乙酰丙酮溶液 1 ml,混匀,置沸水浴中 10 min,取出冷却。以空白(用蒸馏水替代含有甲醛的溶液)为

参比,于波长 412 nm 处,用 1 cm 比色杯进行比色,记录吸光度。

1.2.3 甲醛标准曲线绘制

分别吸取 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的甲醛标准使用液 0、0.02、0.04、0.10、0.20、0.40、0.60、1.00、2.00 ml,用水定容至 10 ml,按 1.2.2 测定各浓度甲醛标准液的吸光度,以吸光度对浓度绘制标准曲线。

1.2.4 结果计算

每个样品重复测定 3 次,算术平均值为测定结果。样品中的甲醛含量按以下公式计算:

$$X = \frac{C \times V_2}{m \times V_1}$$

式中: X :样品中的甲醛含量,mg/kg; C :从标准曲线上查出的甲醛含量, μg ; m :样品质量,g; V_1 :样品测定取蒸馏液的体积,ml; V_2 :蒸馏液总体积,ml。

1.2.5 回收率和精密度测定

回收率测定:向 5 种食用菌鲜样和 3 种食用菌干样中加入不同量的甲醛标准溶液,使加入的甲醛含量约为样品本底值的 0.5、1 或 2 倍。测定处理后的样品的甲醛含量,计算回收率。

精密度测定:检测食用菌样品的甲醛含量,每个样品重复测定 5 次,计算相对标准偏差(RSD)。

1.3 统计学分析

用 SPSS v19.0 版进行 t 检验,比较用两种方法测定所得结果的差异。

2 结果与分析

2.1 甲醛标准曲线的建立

用分光光度法测定标准品中甲醛的含量,绘制标准曲线,线性方程为 $y = 40.874x + 0.1366$ (吸光度为 x ,甲醛含量为 y), $r^2 = 0.9992$ 。说明该法具有较好的线性关系。

2.2 食用菌鲜样中甲醛提取方法的建立

鲜香菇甲醛提取的结果表明,恒温浸泡组在 4 个提取温度下,样品的甲醛含量随浸泡时间延长而升高。分析原因提出两点猜想:一是香菇甲醛提取是一个缓慢的过程,随时间延长而不断提取出、溶解到水中^[8-9];二是浸泡过程中香菇样品仍能不断生成甲醛^[10]。在“沸水浴灭酶+恒温浸泡”组中,甲醛含量不随浸泡时间延长而提高,为猜想二提供了证据,见图 1。分别用 NY/T 1283—2007 法^[4]和水蒸汽蒸馏提取法测定 8 份香菇鲜样的甲醛含量,两种方法的结果差异没有统计学意义($P = 0.05$)。因此,香菇鲜样粉碎后直接进行水蒸汽蒸馏不仅起到灭酶的作用、反映香菇样品真实的甲醛含量、较完全收集样品蒸馏出的甲醛,而且节约时间、效率高,见表 1。

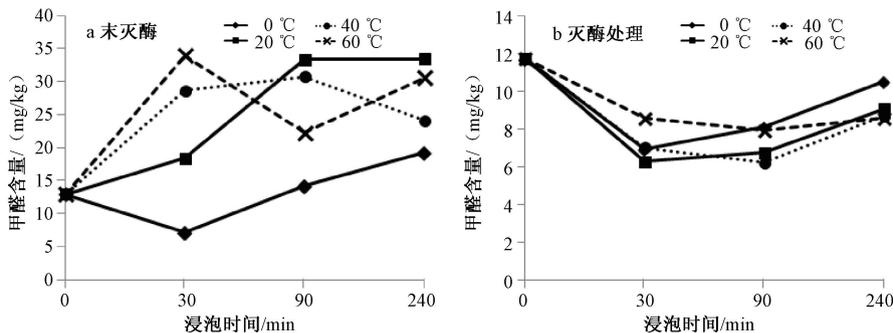


图1 浸泡时间和温度对香菇甲醛提取的影响

Figure 1 Effects of soaking time and temperature on formaldehyde extraction of *Lentinus edodes*

表1 NY/T 1283—2007 法和水蒸汽蒸馏提取法测定香菇鲜样的甲醛含量

Table 1 Formaldehyde levels of 8 fresh *Lentinus edodes* detected by standard method and steam distillation extraction method

提取方法	甲醛含量测定值/(mg/kg)								提取耗时 /(min/1个样品)
	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	样品7	样品8	
NY/T 1283—2007 法 ^[4]	16.58	12.36	23.55	10.09	32.14	5.52	6.71	8.80	60
水蒸汽蒸馏提取法	17.01	15.33	20.75	11.20	30.71	5.01	8.55	9.04	5

同样,在双孢蘑菇、平菇和黑木耳鲜样中,均得到了类似的结果;在金针菇中,任一处理均未检测到甲醛含量。综合考虑提取效率和操作简便性,对

于食用菌鲜样,甲醛提取方法确定为样品粉碎后直接水蒸汽蒸馏提取,见表2。

表2 2种方法提取双孢蘑菇、平菇、黑木耳和金针菇鲜样中甲醛的试验条件与甲醛含量

Table 2 Effects of extraction methods, time and temperatures on formaldehyde levels of fresh *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia auricular* and *Flammulina velutipes*

提取方法	温度/°C	时间/min	甲醛含量测定值/(mg/kg)			
			双孢蘑菇	平菇	黑木耳	金针菇
恒温浸泡法	4	30	8.09(7.70)	18.91(14.58)	5.20(4.83)	0(0)
		90	8.61(7.64)	19.38(14.09)	6.74(5.31)	0(0)
		240	8.77(8.02)	17.55(15.44)	6.16(4.97)	0(0)
	20	30	10.50(7.56)	22.66(15.06)	8.14(6.31)	0(0)
		90	15.34(8.04)	28.61(16.34)	8.53(6.60)	0(0)
		240	16.75(7.89)	27.39(15.99)	7.91(5.96)	0(0)
	40	30	14.37(8.10)	20.46(16.74)	7.83(5.22)	0(0)
		90	13.09(7.94)	24.67(16.28)	8.29(5.04)	0(0)
		240	13.64(7.63)	26.08(15.30)	9.34(5.37)	0(0)
	60	30	16.72(7.69)	24.31(14.67)	8.66(5.71)	0(0)
		90	15.61(7.88)	23.05(15.71)	7.98(5.95)	0(0)
		240	17.84(7.46)	23.80(15.96)	7.50(4.58)	0(0)
直接水蒸汽蒸馏	—	5	8.23	15.82	5.09	0

注:括号内为通过沸水浴灭酶+恒温浸泡处理所测得甲醛含量;括号外为通过恒温浸泡所测得甲醛含量;—表示无具体温度

2.3 食用菌干样中甲醛提取方法的建立

与直接水蒸汽蒸馏(无处理组)比较,3种食用菌干样粉碎后浸泡30 min再蒸馏并未明显提高甲醛的提取效率,且延长了操作时间;而先浸发后粉碎组因在粉碎步骤中损失了部分浸泡液,甲醛含量测定结果偏低。因此对于食用菌干品,甲醛提取方法确定为样品粉碎后直接水蒸汽蒸馏提取,见表3。

2.4 回收率试验

8种食用菌样品的平均回收率范围为82.10%~97.98%,表明建立的方法准确性较高,见表4。

表3 不同前处理方法对香菇、黑木耳和银耳干样甲醛含量的影响(mg/kg)

Table 3 Effects of pretreatment methods on formaldehyde levels of dry *Lentinus edodes*, *Auricularia* and *Tremella*

提取方式	甲醛含量测定值		
	香菇	黑木耳	银耳
直接水蒸汽蒸馏	78.99	29.39	19.34
恒温浸泡30 min	78.12	31.17	18.47
先浸发后粉碎	72.56	25.80	15.67

2.5 方法精密度

双孢蘑菇鲜样、黑木耳鲜样、银耳干样的RSD为3.62%~8.24%,说明本法有较好的精密度,见表5。

表4 6种食用菌样品甲醛加标回收率测定结果

Table 4 Recovery rates of formaldehyde in eight edible mushrooms

样品类型	甲醛添加量 /(mg/kg)	甲醛含量测定值 /(mg/kg)	回收率 /%	样品类型	甲醛添加量 /(mg/kg)	甲醛含量测定值 /(mg/kg)	回收率 /%
香菇(鲜)	0	34.55	—	金针菇(鲜)	0	0	—
	15	48.32	91.80		2	1.91	95.50
	30	62.71	93.87		4	3.39	84.75
	60	89.38	91.38		8	7.46	93.25
双孢蘑菇(鲜)	0	5.82	—	香菇(干)	0	134.28	—
	3	8.34	84.00		70	200.84	90.80
	6	10.64	80.33		140	265.03	93.39
	12	17.20	94.83		280	407.95	97.74
平菇(鲜)	0	18.77	—	黑木耳(干)	0	21.37	—
	10	26.98	82.10		10	29.74	83.70
	20	37.08	91.55		20	40.15	93.90
	40	57.07	95.75		40	55.22	84.63
黑木耳(鲜)	0	4.05	—	银耳(干)	0	43.51	—
	2	5.84	89.50		20	60.11	83.00
	4	7.55	87.50		40	82.70	97.98
	8	11.48	92.88		80	114.34	88.54

注:—表示不统计该项

表5 食用菌甲醛测定精密性结果($n=5$)

Table 5 Intra-day accuracies of the method

样品类型	甲醛含量测定值/(mg/kg)					平均值 /(mg/kg)	RSD /%
	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5		
双孢蘑菇(鲜)	12.20	11.58	11.38	11.94	12.45	12.08	3.62
黑木耳(鲜)	8.09	7.42	7.30	6.92	7.01	7.35	6.29
银耳(干)	22.04	24.83	20.01	23.12	24.04	22.81	8.24

3 小结

本研究建立了水蒸汽蒸馏提取结合乙酰丙酮分光光度法快速测定食用菌鲜样和干样中甲醛含量的方法。结果表明,该方法操作简便、准确度高、精密性好,适用于多种食用菌中甲醛含量的分析,为食用菌产品甲醛含量的监测提供可靠的检测方法。

参考文献

- [1] 邢增涛,赵晓燕,谭琦,等. 2012年食用菌“平菇甲醛”事件浅析[J]. 菌物研究,2012,10(3):210-212.
- [2] Mason D J, Sykes M D, Panton S W, et al. Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked *Shiitake*

mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Addit Contam, 2004, 21 (11): 1071-1082.

- [3] 谭铭雄,林太清,胡国媛,等. 广州市售部分食品甲醛残留的现状调查及检测方法探讨[J]. 中国热带医学,2005,5(3): 575-576,619.
- [4] 中华人民共和国农业部. 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.
- [5] 杜永芳,柳淑芳,马敬军,等. 测定水产品中甲醛含量的分光光度法[J]. 中国食品学报,2005,5(3):91-95.
- [6] 马美范. 乙酰丙酮比色法测定微量甲醛含量显色条件的研究[J]. 酿酒科技,2009,177(3):54-56.
- [7] 杨雪娇,黄伟,温建昌,等. 2005年东莞市食用菌甲醛含量抽查结果分析[J]. 中国食品卫生杂志,2005,19(2):150-152.
- [8] 凌东辉,钟春霞. 分光光度法测定冬菇中的甲醛[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(4):430,444.
- [9] 华红慧,岳振峰,郑卫平,等. 乙酰丙酮分光光度法检测菌菇类及水产品中甲醛含量的研究[J]. 食品科学,2007,28(4):273-276.
- [10] 励建荣,胡子豪,蒋跃明. 鲜香菇中甲醛含量检测的样品前处理方法改进[J]. 农业工程学报,2008,24(10):252-254.