

- 生标准[S].北京:中国标准出版社,1989.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.78—2003 食品包装用原纸卫生标准分析方法[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [4] CAO Y, Griffith J F, Weisberg S B, et al. Evaluation of optical brightener photodecay characteristics for detection of human fecal contamination[J]. *Water Res*, 2009, 43(8):2273-2279.
- [5] Lee J Y, Youn H J, Lee H L. Fundamental study for quantitative analysis of the fluorescent whitening agent (FWA) content of paper and process water [J]. *Bio Resources*, 2011, 7(1):315-326.
- [6] 罗冠中,刘祥,汪晓冬,等. 荧光分光光度法测定生活用纸制品中的荧光增白剂[J]. *中国测试*, 2009, 35(4):68-71.
- [7] 潘可亮,杨利,刘勇,等. 荧光增白剂 VBL 的荧光光谱及测定方法研究[J]. *化学研究与应用*, 2010, 22(9):1210-1213.
- [8] De Los S M, Nerin C, Domeno C, et al. The analysis of fluorescent whitening agents using reversed-phase HPLC and mass spectrometry[J]. *LC-GC North America*, 2004, 22(6):550-561.
- [9] CHEN H C, WANG S P, DING W H. Determination of fluorescent whitening agents in environmental waters by solid-phase extraction and ion pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1102(1):135-142.
- [10] SHU W C, DING W H. Determination of fluorescent whitening agents in laundry detergents and surface waters by solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1088(1):218-223.
- [11] CHEN H C, DING W H. Hot-water and solid-phase extraction of fluorescent whitening agents in paper materials and infant clothes followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(2):202-207.
- [12] JIANG D, CHEN L, FU W, et al. Simultaneous determination of 11 fluorescent whitening agents in food-contact paper and board by ion-pairing high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(4):605-611.
- [13] 蒋定国,陈立松,温小龙,等. 荧光分光光度法测定纸质食品包装材料中的荧光增白剂[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1):50-54.

实验技术与方法

爆米花中双乙酰含量检测方法的建立及应用

刘冲,孙凤祥,李桂芝,张雅梦,王毓梁,陈永
(潍坊医学院,山东 潍坊 261053)

摘要:目的 建立及优化爆米花中双乙酰含量的测定方法,并对潍坊地区市售爆米花中双乙酰含量进行检测。方法 从爆米花预处理方法、料液比、蒸馏提取时间、显色时间及最佳检测波长等方面,建立并优化爆米花中双乙酰含量的检测方法,运用所建立的方法对6种市售爆米花中双乙酰含量进行测定。结果 通过优化得到最佳提取工艺为:爆米花样品粉碎目数40目,料液比1:5,蒸馏提取时间30 min,显色时间20 min,最佳检测波长335 nm,利用该方法测定6种市售爆米花中双乙酰的含量分别为7.15、10.85、5.05、7.50、7.40、6.25 mg/kg。结论 试验建立的双乙酰含量的测定方法简单易行,有良好的回归性和可再现性,方法检出限为0.0687 μg/L。试验测得的潍坊地区6种市售爆米花中双乙酰含量均在美国香料和香精制造者协会(FEMA)规定范围内。

关键词:爆米花;双乙酰;邻苯二胺比色法;食品添加剂;检测;食品安全

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)03-0355-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.017

Establishment and application of detection method of diacetyl content in popcorn

LIU Chong, SUN Feng-xiang, LI Gui-zhi, ZHANG Ya-meng, WANG Yu-liang, CHEN Yong
(Weifang Medical University, Shandong Weifang 261053, China)

Abstract: Objective To establish and optimize a method for determining diacetyl content in popcorn, and determine the diacetyl content in popcorn sold in Weifang. **Methods** Popcorn pretreatment, diacetyl distillation extraction time, and absorption spectral scan condition were optimized to establish the method for the determination of diacetyl content in

收稿日期:2015-07-08

基金项目:国家自然科学基金(81303198);山东省自然科学基金(ZR2011HQ044);潍坊医学院大学生科技创新基金(KX2014030)

作者简介:刘冲 男 本科生 研究方向为临床医学 E-mail:liuch2012@163.com

通信作者:陈永 男 副教授 研究方向为中药活性成分 E-mail:cheny@wfmc.edu.cn

popcorn. Diacetyl content of 6 kinds of popcorns was determined with the method. **Results** The optimum extraction conditions of diacetyl content in popcorn were 40 meshes material granularity, 1:5 materiel-liquid ratio, 30 min extraction time, 20 min reaction time, and 335 nm wavelength detection. The diacetyl content of 6 kinds of popcorns was 7.15, 10.85, 5.05, 7.50, 7.40 and 6.25 mg/kg respectively. **Conclusion** The method is simple and easy to operate, and it has good regression and reproducibility. The diacetyl content of 6 kinds of popcorns was within the prescribed scope of Flavour Extract Manufacturers' Association (FEMA).

Key words: Popcorn; diacetyl; o-phenylenediamine colorimetric method; food additive; detection; food safety

双乙酰(2,3-butanedione, $C_4H_6O_2$)又称二乙酰、2,3-丁二酮,是一种黄色至浅绿色且具有强烈奶油香味的食用香料,过去常被认为是一种安全的食品添加剂,主要用作人造奶油、糖果的增香剂、明胶的硬化剂等^[1-5]。目前市售爆米花为改善口感,均会添加含双乙酰的人造奶油,已有资料显示,经常食用爆米花会损伤肺、脑器官^[6]。近年来,食品中双乙酰的安全性问题已引起了国内外的广泛关注^[7-8],但目前国内对于双乙酰作为食品添加剂的安全性研究相对较少,关于双乙酰对人体的致病机制尚未清楚。随着消费水平的提高和生活方式的改变,奶油类爆米花的消费量呈每年递增趋势,因此对于爆米花中双乙酰的含量监控十分重要。目前已有的双乙酰检测方法有紫外分光光度法、荧光分光光度法、高效液相色谱法、气相色谱法、极谱法、肌酸比色法及化学发光法等。其中紫外分光光度法简单易行,成本低廉,适合于双乙酰含量的实时监测,但此法多针对啤酒等液体样品。我国国标 GB/T 4928—2008《啤酒分析方法》^[9]对啤酒中双乙酰含量的测定采用了改进的邻苯二胺比色法,该方法是否适用于爆米花中双乙酰的检测,有待考究。本研究以啤酒样品中改进的邻苯二胺比色法作参照,拟建立适合于爆米花中双乙酰含量的测定方法并对潍坊地区爆米花中双乙酰含量进行测定,以期对监测爆米花中双乙酰含量提供技术支持,为消费者进行爆米花的选购提供借鉴与指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

市售爆米花分别购自潍坊市某影院①、某影院②、某商场、某超市、某地下商场、市郊某集市。

1.1.2 主要仪器与试剂

双乙酰蒸馏器(郑州市兴华玻璃仪器厂)、紫外分光光度计、Epoch 超微量微孔板分光光度计、粉碎机;邻苯二胺(北京索莱宝试剂有限公司)、双乙酰(美国 Sigma)、有机硅消泡剂(江苏腾达助剂有限公司)、盐酸(AR)。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

双乙酰标准溶液:取 10 μ l 双乙酰标准品(0.981 g/ml),加蒸馏水梯度稀释至 0.981 mg/L。邻苯二胺溶液:准确称取 0.5 g 邻苯二胺晶体,放入烧杯中,加入少量 4 mol/L 的盐酸完全溶解,将溶液倒入 50 ml 容量瓶中,洗涤玻璃棒与烧杯三次,并将洗涤液倒入容量瓶中,加 4 mol/L 盐酸至刻度线。

1.2.2 吸收光谱扫描

将双乙酰标准品及样品馏出液分别与邻苯二胺反应后产物(2,3-二甲基喹啉)在 300 ~ 500 nm 波长下进行扫描,确定最佳检测波长。

1.2.3 标准曲线的制作

用已配制的 9.81 mg/L 双乙酰标准溶液,按表 1 所示配制成 0.687、1.374、2.061、2.748、3.435 mg/L 的双乙酰溶液,在 335 nm 处测定其 OD 值。以双乙酰浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,制作双乙酰标准曲线。

表 1 双乙酰标准溶液配置表

试剂	1	2	3	4	5	6
双乙酰标准液/ μ l	0	350	700	1 050	1 400	1 750
蒸馏水/ml	5.0	4.65	4.30	3.95	3.60	3.25
10 g/L 邻苯二胺/ml	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
暗处放置 20 min						
4 mol/L 盐酸/ml	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

1.2.4 爆米花双乙酰含量检测流程

爆米花粉碎→过筛→浸泡→蒸馏→取馏出液 5.0 ml 加入邻苯二胺 0.5 ml→加入盐酸 1.0 ml→紫外分光光度法测定双乙酰含量。

1.2.5 单因素试验

以样品粉碎至 14 目,浸泡 30 min,料液比 1:3,蒸馏时间 20 min,显色时间 10 min 为初始条件,对影响爆米花中双乙酰提取因素粉碎目数、浸泡时间、料液比、蒸馏时间、显色时间进行单因素检测。

1.2.6 加标回收试验

根据其中一份样品所测得的双乙酰含量,量取其含量的 20% 标准溶液,加入到爆米花中,以最佳方式进行蒸馏,测定加标后的馏出液中双乙酰含

量,计算加标回收率。

1.2.7 精确度^[10]和检出限^[11]

分别取同种样品6次蒸馏所得的馏出液,利用邻苯二胺比色法测定OD值,并代入标准曲线计算双乙酰含量,计算6组数据的标准差得到精确度。

根据特殊仪器检出限的规定,分光光度法中是以扣除空白值后的与0.01吸光度相对应的浓度值作为方法检出限。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

将馏出液与邻苯二胺的反应产物进行波长扫描,结果如图1所示,发现反应产物最佳检测波长为335 nm,可排除馏出液中其他物质的干扰,因此可以选择335 nm作为测定双乙酰与邻苯二胺反应产物OD值的波长。

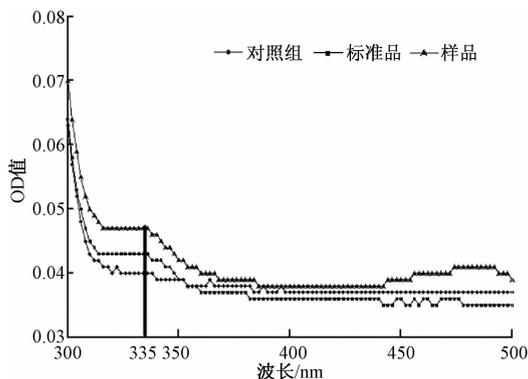


图1 双乙酰反应物吸收峰检测

Figure 1 Detection of diacetyl reactant absorption peak

2.2 标准曲线

以双乙酰浓度为横坐标,混合物吸光度为纵坐标,在335 nm检测波长下得到双乙酰标准曲线如图2所示,在0.687~3.435 mg/L呈线性相关关系,线性方程为: $y = 0.0755x + 0.0057$ ($r^2 = 0.9949$)。

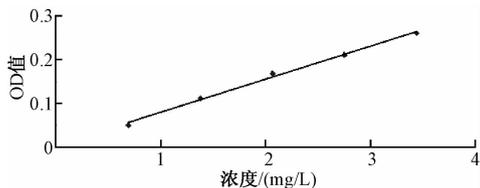


图2 双乙酰标准曲线(335 nm)

Figure 2 Standard curve of diacetyl

2.3 考察单因素的影响

粉碎目数:利用粉碎机将爆米花粉碎为14、40目及不粉碎,分别进行蒸馏,测定馏出液与邻苯二胺反应产物的OD值,得出双乙酰的含量。结果显示从不粉碎到14目之间含量有所增加但并不明显,在粉碎至40目之后,含量可能继续增加,但考虑样

品过于粘滞会影响双乙酰的释放,故将粉碎目数定为40目。

浸泡时间:将样品分别浸泡0、1、2、3、4、5 h,蒸馏提取20 min,测得每组馏出液与邻苯二胺反应产物的吸光度。由于蒸馏时间较长,爆米花在此过程中已充分浸泡,故浸泡时间对双乙酰含量无明显影响。

料液比:将40目的样品分成5等份,依次加入不同体积蒸馏水,使料液比分别为1:3、1:4、1:5、1:6、1:7,分别测得馏出液与邻苯二胺反应产物的OD值,结果如图3所示。由此可看出随着蒸馏水添加量的增加双乙酰含量逐渐增加,在达到1:5之后,双乙酰含量不再明显增加。为节约成本及缩短操作时间,故将料液比定为1:5。

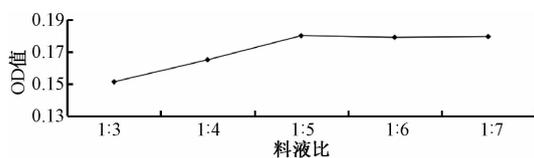


图3 料液比与双乙酰含量关系(335 nm)

Figure 3 Relationship between material-water ratio and diacetyl content

蒸馏时间:在第一滴馏出液流出时开始计时,并分部收集馏出液,外加冰水冷浴,每管收集10 min,测定各管中双乙酰含量,结果如图4所示。由图可见,随着蒸馏时间的延长,双乙酰的馏出量逐渐减少,当蒸馏时间达到30 min后,几乎无双乙酰被蒸出。综合考虑试验操作时间及对未加工玉米的检测结果,故将蒸馏时间定为30 min。

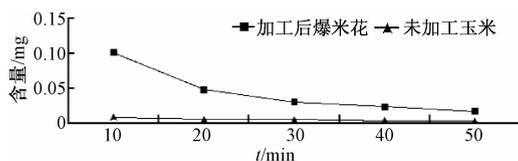


图4 蒸馏时间与双乙酰含量关系

Figure 4 Relationship between distillation time and diacetyl content

显色时间:通过测定馏出液与邻苯二胺反应产物在不同显色时间条件下的OD值,结果显示,在室温、暗处条件下反应10 min后测定值偏低,20~40 min范围内无明显变化,建议将显色时间定为20 min,以缩短试验操作时间。

综上所述,爆米花中双乙酰含量检测的最佳方法为:爆米花样品种粉碎目数40目,现泡现用,料液比1:5,蒸馏提取30 min,显色20 min,最佳检测波长为335 nm。

2.4 加标回收试验

加标前爆米花中双乙酰含量为7.15 mg/kg,加

标后双乙酰含量测定值为 8.55 mg/kg,通过加标回收率计算公式得回收率为 97.9%,馏出液双乙酰回收率较高,能满足试验精确度要求。

2.5 精确度检测

精确度是指对同一试验过程实施多次后所得到的数据之间的一致性程度,是一个试验的重要指标。通过对同种爆米花样品种进行的多次测定($n = 6$),按照公式计算测定结果的平均偏差、标准偏差、相对标准偏差,考察方法的精确度。从表 2 可以看出,样品的相对标准偏差在 3% 以内,表明该方法有较高的重现性,精确度较高。

表 2 精密度试验测定结果

Table 2 Result of precision experiment

样品编号	OD 值	测定结果 / (mg/kg)	平均偏差	标准偏差	相对标准偏差 / %
A1	0.112	6.69			
A2	0.111	6.63			
A3	0.116	6.94	0.12	0.136	1.13
A4	0.110	6.56			
A5	0.115	6.88			
A6	0.112	6.69			

2.6 方法检出限的确定

配制浓度为 0.068 mg/L 的标准溶液,多次测定其与邻苯二胺反应后产物的吸光度,测定值为 0.013、0.011、0.009、0.011、0.011、0.009、0.010。吸光度接近 0.01,可以此浓度作为本试验的方法检出限。

2.7 市售爆米花双乙酰含量检测

按照本试验所建立的爆米花中双乙酰含量检测的最佳方法,课题组对前期收集到的 6 种市售爆米花样品种中的双乙酰含量进行了检测,结果见表 3。结果显示 6 种样品的双乙酰含量在 5.05 ~ 10.85 mg/kg 之间,均在美国香料和香精制造者协会 (FEMA) 规定范围内,且处于相对较低水平。

表 3 市售爆米花中双乙酰含量检测 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Detection of diacetyl content in popcorn

样品编号	含量 / (mg/kg)
某地下商场	7.15 ± 0.25
某商场	10.85 ± 0.35
某超市	5.05 ± 0.20
某影院①	7.50 ± 0.15
某影院②	7.40 ± 0.60
市郊某集市	6.25 ± 0.025

3 讨论

双乙酰作为一种重要的合成风味物质,广泛应用于奶油味微波爆米花、巧克力、糖果、焙烤食品等的生产。虽然双乙酰被美国食品药品监督管理局 (FDA) 列为一般认为安全级 (GRAS 级),但其安全性已引起了各

方面的广泛关注。根据国内外资料显示,长期接触双乙酰会导致或加重呼吸系统疾病的发生和发展,如导致闭塞性细支气管炎、加重囊性纤维化、诱导氧化应激等毒性作用^[12]。双乙酰引起的闭塞性细支气管炎又被称为“爆米花肺”^[13],患者会出现呼吸困难,咳嗽,肺组织纤维化,基本功能丧失甚至死亡等临床表现^[14]。此外双乙酰可以激活囊性纤维化患者肺部常见菌群(铜绿假单胞菌)对肺部的损伤作用,导致肺纤维化和肺功能丧失^[15-16],甚至还可以使人体产生过量活性氧,加快机体衰老。鉴于过量摄入双乙酰会对人体造成的上述严重危害及爆米花销售量的增加,其含量监控十分重要,为此本课题组开展此课题来进行相关研究。

目前邻苯二胺比色法多应用于啤酒、葡萄酒等液体样品中双乙酰含量的测定,此法对固体物质中双乙酰含量的检测尚未见相关报道。本试验在建立优化爆米花中双乙酰含量的测定方法中发现双乙酰含量的测定主要取决于蒸馏时间的长短、料液比及显色反应时间。目前,啤酒体系中双乙酰含量测定的蒸馏时间为 3 ~ 5 min,而此时间并不适用于爆米花。通过对多组样品进行蒸馏操作发现在达到 30 min 时才能将绝大部分双乙酰蒸馏出来,同时试验也发现 30 min 后仍有少量双乙酰的馏出,结合对未添加奶油的玉米进行相同处理的检测结果(见图 4)及参考相关文献后,证实此时的双乙酰主要来自玉米中脂质氧化及糖类的分解^[12,17-19],故将蒸馏时间定为 30 min 即可满足试验要求。蒸馏时料液比应达到 1:5,料液比过低会导致双乙酰蒸馏效率下降,以致双乙酰馏出量过少;而过高的料液比也无益于双乙酰的蒸馏提取。显色反应时间至少达到 20 min,否则会使结果偏低。由于双乙酰主要附着于爆米花表面,因此爆米花的粉碎目数及浸泡时间对其含量的测定影响不大。

综上所述,本研究所建立的爆米花双乙酰检测方法简单易行,成本低廉,此外本试验应用邻苯二胺比色法测定双乙酰与邻苯二胺反应产物的吸光度,然后采用标准曲线取代啤酒中经验值法求出双乙酰的含量浓度,此法使结果精确度较高^[20-23]。

(志谢 感谢王艳丽、宁文慧、王方泽、杨月、李丹丹、黄传洲、陈博超、何鹏程同学在样品检测及数据分析中提供的帮助)

参考文献

- [1] 凌关庭,王亦云,周述潮. 食品添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,1989:150.
- [2] Krogerus K, Gibson B R. 125th Anniversary review: diacetyl and its control during brewery fermentation[J]. Journal of the Institute

- of Brewing, 2013, 119(3):86-97.
- [3] 练敏,纪晓俊,黄和,等. 香料 2,3-丁二酮的合成现状及展望[J]. 现代化工, 2008, 28(8):29-34.
- [4] 胡文效,姜兴涛,魏彦锋,等. 发酵法生产 2,3-丁二酮[C]//2004 年中国香料香精学术研讨会论文集. 北京:中国香料香精化妆品工业协会, 2004:92-97.
- [5] Shibamoto T. Diacetyl: occurrence, analysis, and toxicity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(18):4048-4053.
- [6] 张万英. 常吃爆米花伤肺伤脑[J]. 石河子科技, 2013(1):57.
- [7] Kanwal R, Kullman G, Fedan K B, et al. Occupational lung disease risk and exposure to butter-flavoring chemicals after implementation of controls at microwave popcorn plant [J]. Public Health Reports, 2011, 126(4):480-494.
- [8] White K L, Heikkila K, Williams R, et al. Diacetyl exposures at four microwave popcorn plants [J]. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2010, 7(4):185-193.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4928—2008 啤酒分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [10] 魏阳吉,郝亚楠,杜慧娟,等. 应用邻苯二胺比色法测定葡萄酒中的双乙酰[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2008(4):4-11.
- [11] 姜大伟. 化学分析-方法检出限的综合探讨[J]. 吉林地质, 2012, 31(3):92-94.
- [12] 相启森,马云芳,董吉林,等. 食品中 2,3-丁二酮形成机制和检测方法的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11):208-214.
- [13] Boylstein R. Identification of diacetyl substitutes at a microwave popcorn production plant [J]. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 2012, 9(2):D33-D34.
- [14] 李松,张素倩,邹琳,等. 闭塞性细支气管炎小鼠模型的建立与评价[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(22):2283-2286.
- [15] 周汉良,陈季强. 呼吸药理学与治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999:112.
- [16] Whiteson K L, Meinardi S. Breath gas metabolites and bacterial metagenomes from cystic fibrosis airways indicate active pH neutral 2, 3-butanedione fermentation [J]. The ISME Journal, 2014, 8(6):1247-1258.
- [17] JIANG Y, Hengel M, PAN C, et al. Determination of toxic α -dicarbonyl compounds, glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl, released to the headspace of lipid commodities upon heat treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(5):1067-1071.
- [18] Shibamoto T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(1):12-25.
- [19] Scanlan R A, Lindsay R C, Libbey L M, et al. Heat induced volatile compounds in milk [J]. Journal of Dairy Science, 1968, 51(7):1001-1007.
- [20] 刘长祥. 浅谈啤酒生产中双乙酰的产生与调控[J]. 山西食品工业, 2002, 7(1):34-35.
- [21] 鲍会梅. 啤酒双乙酰含量的控制[J]. 酿酒, 2008, 55(10):25-26.
- [22] 孔鲁裔. 紫外分光光度法测定啤酒中的双乙酰[J]. 酿酒, 2007, 34(4):105-106.
- [23] 王德强,王雪青,姜宏伟. 浅谈淡色啤酒双乙酰含量的控制[J]. 酿酒, 2002, 2(4):62.

· 请示批复 ·

总局办公厅关于经营者经营芽苗类蔬菜中含 6-苄基腺嘌呤等物质处置有关问题的复函

食药监办食监二函〔2016〕144 号

福建省食品药品监督管理局:

你局《关于如何处置经营者经营芽苗类蔬菜中含 6-苄基腺嘌呤等物质的请示》(闽食药监食流〔2016〕4 号)收悉。经商农业部门,现函复如下:

一、《关于豆芽生产过程中禁止使用 6-苄基腺嘌呤等物质的公告》(食品药品监管总局、农业部、国家卫生计生委公告 2015 年第 11 号)(以下简称《公告》)现行有效,应当继续严格执行。

二、《绿色食品芽苗类蔬菜》(NY/T 1325—2015)为农业部发布的标准。农业部认为,《公告》规定豆芽生产者不得在豆芽生产过程中使用 6-苄基腺嘌呤,豆芽经营者不得经营含有 6-苄基腺嘌呤的豆芽。在修订《绿色食品芽苗类蔬菜》时,为落实《公告》规定,增加了绿色食品芽苗类蔬菜中 6-苄基腺嘌呤的限量指标,参照《食品中 6-苄基腺嘌呤的测定高效液相色谱法》(GB/T 23381—2009)定量检出限 0.02 mg/kg,规定了绿色食品芽苗类产品中的 6-苄基腺嘌呤限量值为 0.02 mg/kg,与《公告》要求一致,目的是防止非法添加。

食品药品监管总局办公厅
二〇一六年三月四日

(相关链接:<http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1605/146480.html>)