# 甘油体系研究奶糖内源性甲醛的生成机理

陈 梅[1]，吕春华[2]，朱晓雨[2]，陈笑梅[2,*]，莫卫民[1]
(1.浙江工业大学化学工程与材料学院，浙江 杭州 310014；2.浙江出入境检验检疫局，浙江 杭州 310016)

**摘 要：**在甘油体系中研究奶糖内源性甲醛的生成机理，并用衍生液提取、高效液相色谱法对其进行检测。结果表明：甘油能有效收集奶糖及其主要成分经高温处理后生成的甲醛；乳粉是奶糖中甲醛生成的主要物质，而乳粉中的酪蛋白和乳糖的美拉德反应是奶糖中甲醛生成的主要原因。本研究中发现酪蛋白和乳糖在60～120℃分别加热1h，甲醛的生成量及其变化趋势与乳粉在相同条件下处理所产生的甲醛量及变化趋势相似，而且甲醛的生成量随热处理强度的增强而增加。同时发现不同糖类与酪蛋白美拉德反应对甲醛生成的影响不同，其中葡萄糖的影响最大，其次为果糖、乳糖，蔗糖对酪蛋白甲醛的生成基本无影响。

**关键词：**甲醛；奶糖；乳粉；酪蛋白；糖类；美拉德反应

## Formation Mechanism of Endogenous Formaldehyde in Toffee with Glycerol System

CHEN Mei[1]，LÜ Chun-hua[2]，ZHU Xiao-yu[2]，CHEN Xiao-mei[2,*]，MO Wei-min[1]
(1. College of Chemical and Material Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China；
2. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China)

**Abstract:** The formation mechanism of endogenous formaldehyde in toffee was studied by glycerol system. High performance liquid chromatography (HPLC)-derived liquid extraction method was used to determine formaldehyde. The results showed that glycerol could collect formaldehyde efficiently during the production of toffee. As major compositions of toffee, milk powder plays an important role in the generation of formaldehyde. The major reason for the generation of endogenous formaldehyde in toffee was Maillard reaction between casein and lactose. The content of formaldehyde and its variation tendency in casein-lactose-glycerol system treated at 60—120 ℃ for 1 h was similar with milk powder-lactose-glycerol system under the same condition. Positive correlation between formaldehyde content and high temperature treatment was observed. Different kinds of carbohydrates play different roles in the generation of formaldehyde. The most obvious impact was glucose, which was followed by fructose, lactose and sucrose.

**Key words:** formaldehyde; toffee; milk powder; casein; carbohydrate; Maillard reaction
中图分类号：TS246.5 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)05-0081-05

甲醛具有较高的毒性，已被世界卫生组织(WHO)确定为致癌和致畸的物质。近年来，“大白兔奶糖含甲醛”、食品中违禁使用吊白块和水发产品用甲醛浸泡等事件频繁发生，已成为全球关注的焦点。大量研究[1]表明甲醛可在动植物体内自然产生，是一种自身的代谢产物，是某些氨基酸生物合成所必需的前提物质。Yamagata等[2]发现甲醛可在一些蔬菜、水果、发酵制品中自然产生，Bianchi等[3]在水产中检测到有较高本底含量的内源性甲醛。张文德[4]发现食用菌类、水产品、果蔬类、粮食类、乳制品等食品中均含有天然甲醛。马永均等[5]调查表明，在66个水果样品中，甲醛含量超过1.0mg/kg的有11个，1.0～0.5mg/kg的有22个，小于0.5mg/kg的有33个。水果(植物)呼吸作用使复杂的有机物质在酶的作用下缓慢分解为简单有机物——醇类、酮类、醛类以及$CO_2$和水等，在细胞代谢的生化过程中会产生微量的甲醛。乳品中的甲醛来源于乳脂肪的酶类反应和氨基化合物等物质的美拉德反应，是复杂反应过程中代谢或产生的中间产物[4]。各种乳制品中能测出包括甲醛在内的多种羰基化合物，鲜牛乳中曾分离出甲醛、乙醛、丙醛、己醛、苯甲醛等物质[4]，乳酸菌都有生产甲醛及乙醛的能力，例如，在蛋白质分解酶的作用下，乳蛋白生成肽、氨基酸类化合物在微生物的作用下脱去氨基后，可

收稿日期：2011-12-05
基金项目：国家质量监督检验总局科技计划项目(2009IK180)
作者简介：陈梅(1985—)，女，硕士，研究方向为食品分析。E-mail：nali05@126.com
*通信作者：陈笑梅(1965—)，女，研究员，硕士，研究方向为食品分析。E-mail：cxm@ziq.gov.cn

以转变为醛、酮、醇类，产生奶酪特有的风味[6]。文献[7-9]报道，食品中内源性甲醛的生成也可能和其加工的工艺有关。

乳制品含有丰富的蛋白质和还原糖，其主要蛋白——酪蛋白和乳清蛋白的赖氨酸残基活性较强，易与乳糖发生美拉德反应[10]。文献[11]报道美拉德反应原理为Amadori产物裂解产生羰基和α-二羰基化合物会继续与氨基化合物反应，使氨基化合物失去1分子$CO_2$生成少1个碳原子的醛类。冯大炎等[12]认为面包烘烤时美拉德反应和Strecker降解反应同时进行产生了一些醛酮类物质，如甲醛、丙醛、异戊醛等。陈华[13]认为相等量的甘氨酸和葡萄糖混合加热100～150℃时产生的Strecker醛类为甲醛。

本实验针对奶糖中的甲醛问题，调查奶糖原料乳粉和糖类中甲醛的本底含量及其高温处理后甲醛含量的变化；找出乳粉是奶糖内源性甲醛形成的关键物质，进一步分析乳粉高温体系甲醛生成的特性；模拟奶糖熬糖工艺，考察不同糖类的添加对乳粉高温处理甲醛生成的影响；通过对乳粉主要成分分析进一步找出乳粉中甲醛形成的关键物质并验证其高温反应特性，以期阐明奶糖中内源性甲醛生成的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大白兔牌奶糖为市售；伊利、光明、雅士利等品牌乳粉(蛋白质含量18.5%～40.0%、乳糖含量31.5%～54.8%)为市售。

甲醛标准溶液(100μg/mL) 环境保护部标准样品研究所；2,4-二硝基苯肼(DNPH，优级纯) 国药集团化学试剂有限公司；酪蛋白、乳清蛋白 上海源聚生物科技有限公司；乳糖 上海伯奥生物科技有限公司；葡萄糖、蔗糖、果糖 美国Acros Organics公司；甘油 江苏强盛化工有限公司；乙腈、甲醇(色谱纯) 美国Tedia公司；所有试剂均为分析纯，所用水为去离子水。

配制的DNPH溶液：称取DNPH 0.50g，用乙腈溶解并定容至250mL，质量浓度为2g/L。pH5磷酸盐缓冲液：称取13.6g $KH_2PO_4$，加入500mL水中，混匀后用NaOH溶液调至pH5.0。配制的衍生液：将DNPH溶液与pH5.0磷酸盐缓冲液，按体积比1:1混合。

### 1.2 仪器与设备

Agilent 1200高效液相色谱仪(配G1315B二极管阵列检测器) 美国Agilent公司；电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司；恒温振荡器 太仓市科教器材厂；高速离心机 美国Thermo公司；电子天平(感量0.0001g) 瑞士Mettler Toledo公司；旋涡混合器 太仓华利达实验室设备公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 甲醛生成模拟与定量

称取2.25g甘油于8mL螺纹口样品瓶中，加入0.25g样品(乳粉、酪蛋白、乳清蛋白)，再按一定比例加入一定量的糖(糖添加实验、乳粉内源性甲醛生成因子探究实验)，旋紧螺帽。于80℃水浴中静置10min，涡旋混匀。置于烘箱中120℃加热60min。

#### 1.3.2 甲醛生成特性

参考1.3.1节准备样品。在相同加热时间条件下，将完全混匀的样品分别置于60、80、100、120℃加热60min；相同加热温度条件下，将全混匀的样品置于120℃烘箱中分别加热20、40、60、80、100min。

#### 1.3.3 甲醛的测定

##### 1.3.3.1 甲醛的衍生反应

常温条件下，称取2.00g样品于50mL塑料离心管中，加入20mL衍生液。高温处理后的样品，用20mL衍生液将反应产物转移至50mL塑料离心管中。旋紧管塞，涡旋混匀。置于60℃恒温振荡器中，150r/min振摇提取60min，取出冷却至室温。

##### 1.3.3.2 净化

将1.3.3.1节的提取液，以不低于4000r/min离心5min。若离心后溶液澄清，过0.45μm微孔滤膜，滤液供HPLC法测定。若离心后溶液浑浊或分层，在提取液中加入8g硫酸铵，混匀，以不低于4000r/min离心5min。移取上清液于20mL刻度试管中，下层溶液用10mL乙腈重复萃取1次，合并上清液，用乙腈定容至20.0mL，混匀后过0.45μm微孔滤膜，滤液供HPLC法测定。

#### 1.3.4 甲醛衍生物标准溶液的制备

参考文献[14]，分别移取适量的甲醛标准溶液，于10mL具塞刻度试管中，用衍生液定容至10mL。盖上塞后混匀，于60℃水浴中加热60min，取出冷却至室温。溶液过0.45μm微孔滤膜，滤液供HPLC法测定。高温体系甲醛的测定实验，甲醛标准的衍生体系中需分别加甘油0.90g，参见上述操作制备。

#### 1.3.5 色谱条件

色谱柱：Agilent色谱柱$C_{18}$色谱柱(250mm×4.6mm，5μm)；流动相：乙腈-水(60:40，*V*/*V*)；流速：1.0mL/min；柱温30℃； 检测波长：350nm；进样量：10μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 高温处理中甲醛的收集及检测方法的研究

#### 2.1.1 高温处理中甲醛收集方法的研究

奶糖熬糖工艺在120℃，为研究在此温度条件下奶糖及其各成分甲醛的含量变化，首先需研究这些物质在高温处理时甲醛的收集方法。因甲醛是挥发性物质，奶糖

及其各成分经高温处理产生的甲醛，若没有收集直接冷却测定，甲醛将部分挥发。本实验比较了甘油体系和水体系对奶糖经高温处理产生的甲醛的收集效果，结果表明，甘油体系的实验结果重现性较好。甘油沸点较高，120℃时仍为液态，反应体系的均匀性和热传导性较好；水沸点为100℃，120℃时转化为气态，挥发带走部分甲醛，反应体系均匀性不佳，对实验装置的密封性要求高，而且存在因压力过大爆炸的风险。

2.1.2 甘油体系中甲醛检测方法的研究

参考文献[15]，衍生液提取法能够有效提取样品中游离态和可逆结合态的甲醛，同时避免样品中内源性甲醛的形成，是一种较合理的前处理方法。文献中甲醛的衍生反应在水-乙腈(1:1，*V*/*V*)的体系中进行，本实验甲醛的衍生体系中含有甘油，需考察甘油对衍生反应的影响。在甲醛衍生物标准溶液中加入一定量的甘油，通过比较衍生产物的峰面积考察甘油对甲醛衍生反应的影响，结果表明：甘油含量≤2mL时，甲醛衍生物的峰面积与不加甘油时相比，误差在5%以内。此时，甲醛标准溶液 0.2～10.0m/kg的线性方程为$y$=345.8$x$+20.33，相关系数$R^2$≥0.99990。甘油含量＞2mL，试剂空白偏高，线性关系不佳。

2.2 高温处理对奶糖主要成分糖类甲醛生成的影响

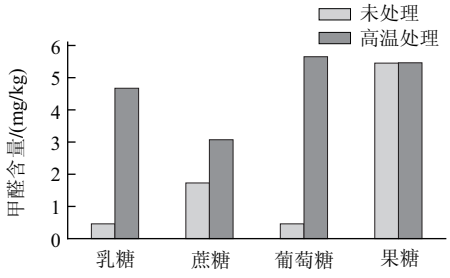


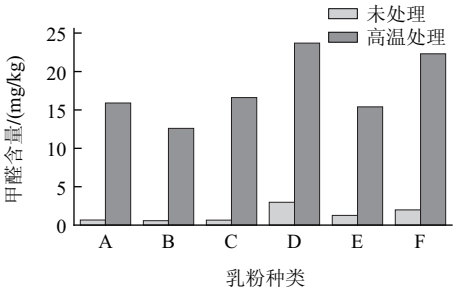

**图 1 奶糖经高温处理后甲醛含量的变化**

**Fig.1 Change of formaldehyde content in different carbohydrates treated at 120 ℃ for 60 min**

考察奶糖的主要原料糖类经高温处理后甲醛含量的变化，以探究奶糖中内源性甲醛生成的主要原因。见图1。糖类的甲醛本底值均较低，高温处理后4种糖的甲醛含量略有增加，其中葡萄糖中的甲醛含量变化最大，由0.46mg/kg增加到5.65mg/kg。糖类中甲醛略有增加，可能是因为糖类物质高温时分解产生小分子质量代谢产物甲醛[16]。

2.3 高温处理对奶糖原料乳粉甲醛生成的影响

如图2所示，6种乳粉的甲醛本底值为0.58～2.97mg/kg，高温处理后甲醛含量增加至12.6～23.7mg/kg。6种乳粉中A、B、C、D、E为成人乳粉，F为婴儿乳粉，表明乳粉高温处理后甲醛含量显著增加具有普遍性。A、B为同一品牌的脱脂乳粉和全脂乳粉，高温处理后甲醛含量分别为15.9、12.6mg/kg，无显著性差异($P$＞0.05)，表明乳粉中脂肪不是影响高温甲醛生成的主要因素。




A～F分别为品牌1脱脂乳粉、品牌1全脂乳粉、品牌2脱脂乳粉、品牌3女士乳粉、品牌4高钙高铁乳粉、品牌5婴幼儿乳粉。

**图 2 乳粉经高温处理后甲醛含量的变化**

**Fig.2 Change of formaldehyde content in different milk powder treated at 120 ℃ for 60 min**

2.4 乳粉高温体系甲醛生成的影响因素

2.4.1 加热温度和时间对乳粉甲醛生成的影响

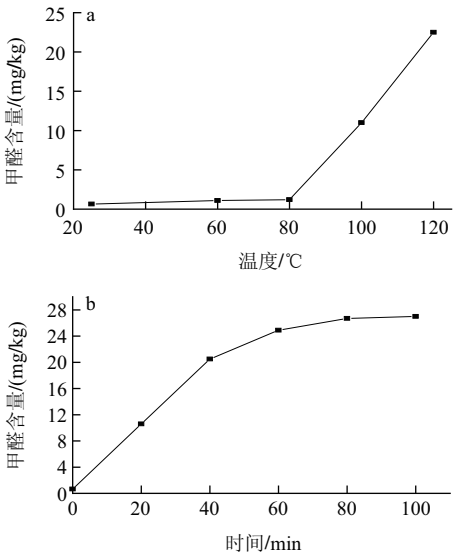



**图 3 乳粉-甘油体系甲醛生成的温度曲线(a)和时间曲线(b)**

**Fig.3 Temperature curve (a) and time curve (b) for the generation of formaldehyde in milk powder-glycerin system**

由图3a可知，随着加热温度升高甲醛含量增加。温度高于80℃时，甲醛生成显著($P$＜0.05)；加热温度为100℃和120℃时，甲醛含量分别是本底值的16.9倍和34.6倍。由图3b可知，加热时间为20～60min时，甲醛生成量随加热时间延长而显著增加($P$＜0.05)，至60min时，甲醛的生成量达到最大；在60～100min之间甲醛生成速率变缓。马志玲等[10]研究表明热处理的强度越大，乳糖与赖氨酸残基的结合越强烈，美拉德反应越容易进行。实验结果也表明，温度大于80℃，加热时间越长，产生的甲醛含量越多，超过60min后，甲醛含量基本不变。因此选择乳粉-甘油体系120℃高温处理60min作为乳粉高温体系处理条件。

2.4.2 糖类添加对乳粉高温处理甲醛生成的影响

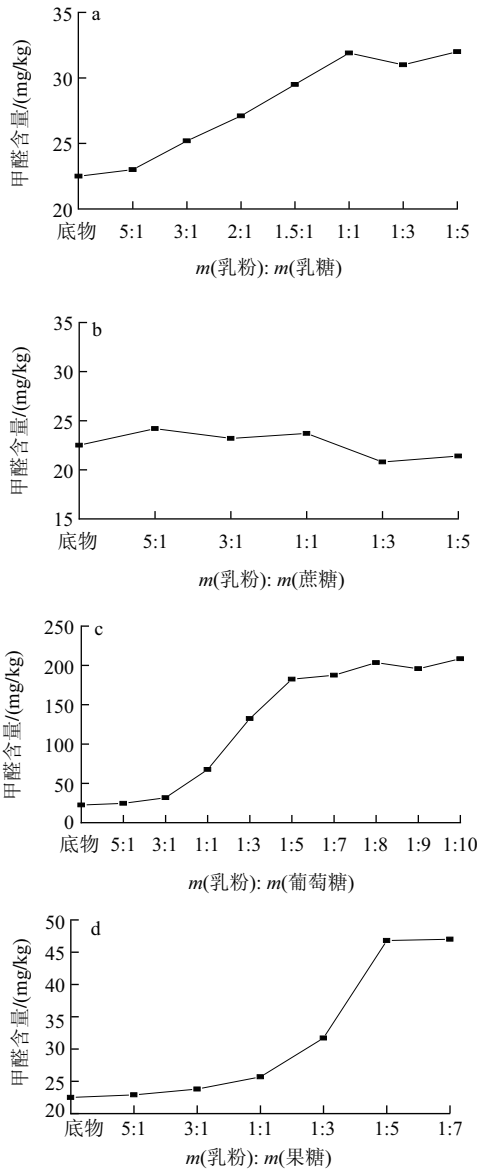
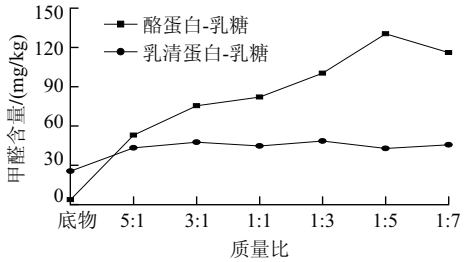



**图 4 糖类添加对高温处理乳粉甲醛生成的影响**

**Fig.4 Effect of different addition amounts of (a) lactose, (b) sucrose, (c) glucose, (d) fructose on the generation of formaldehyde in milk powder-glycerin system treated at 120 ℃ for 60 min**

由图4可知，随着乳糖、葡萄糖、果糖量增加，甲醛生成量随之增大；其中葡萄糖的添加影响最显著($P<0.05$)，甲醛的最高生成量为182.5mg/kg，果糖和乳糖次之，甲醛的最高生成量分别为45.9、31.9mg/kg，蔗糖添加对甲醛生成影响不明显。4种糖添加对乳粉高温处理甲醛生成影响的顺序为葡萄糖＞果糖＞乳糖＞蔗糖，这与Mauron[17]的研究结果一致，即美拉德反应的难易顺序为五碳醛糖＞己醛糖＞己酮糖＞双糖。蔗糖、乳糖为双糖，还原性较弱，反应活性小于单糖。吴惠玲等[18]的研究表明，蔗糖是非还原糖，不含游离的羰基，没有显示出与氨基酸的反应活性。因此添加蔗糖不会导致乳粉热处理甲醛含量的升高。葡萄糖为醛糖，果糖为酮糖，醛糖的末端基团位阻效应小，更易于氨基化合物反应，因此葡萄糖的反应活性大于果糖的反应活性[16]。

2.5 乳粉内源性甲醛生成主要因子的探究




图中横坐标$m$(酪蛋白): $m$(乳糖)或$m$(乳清蛋白): $m$(乳糖)。

**图 5 酪蛋白(乳清蛋白)-乳糖-甘油体系高温甲醛的生成**

**Fig.5 The generation of formaldehyde in casein (whey protein)-lactose-glycerin system treated at 120 ℃ for 60 min**

美拉德反应主要是羰基化合物和氨基化合物间的反应。牛乳中90%以上的蛋白质为酪蛋白和乳清蛋白，且这两种蛋白的赖氨酸残基都有很高的反应活性，较易与还原糖乳糖反应[10,19]。如图5所示，酪蛋白高温甲醛的生成量随着乳糖的添加增加较明显，至质量比为1:5时甲醛的生成量最大。乳清蛋白高温甲醛的生成不明显。这是因为酪蛋白对热不敏感，而乳清蛋白热处理时容易变性[20]。因此，乳清蛋白热处理时赖氨酸残基失活，影响美拉德反应导致甲醛生成不明显。

酪蛋白-乳糖-甘油体系在高温条件下甲醛生成量的变化趋势与乳粉-乳糖-甘油体系的趋势一致，而且生成的甲醛量也相近，见图4a，当乳粉与乳糖1:1混合时，乳粉生成的甲醛量最高。因实验所用乳粉中酪蛋白含量为26.4%，乳糖含量为47.3%，乳粉与乳糖含量为1:1相当于酪蛋白与乳糖的质量比为1:5.6。这与图5中酪蛋白与乳糖比为1:5时，生成的甲醛量最多相吻合。当乳粉与乳糖质量比为1:1混合时，乳粉甲醛的生成量为31.9mg/kg，酪蛋白在乳粉中的含量为26.4%，相当于每千克酪蛋白产生的甲醛量为120.8mg。这与图5中酪蛋白与乳糖质量比为1:5时，酪蛋白产生甲醛的生成量为130.4mg/kg相近。因此，乳粉内源性甲醛的生成主要是由酪蛋白和乳糖发生美拉德反应产生的。

2.6 酪蛋白-乳糖-甘油模拟体系高温甲醛生成的特点

考察加热温度和时间对酪蛋白-乳糖-甘油体系(酪蛋白、乳糖添加质量比为1:3)甲醛生成的影响，见图6。该体系低于80℃处理时甲醛的生成不明显，高于80℃处理时甲醛的生成开始显著增加，120℃时甲醛含量最高。这与图3a乳粉-甘油体系高温甲醛生成的趋势相似。体系在加热20～60min时，甲醛的生成随着加热时间的延长逐渐

增加，到60min时甲醛的生成最明显，60min后甲醛的生成量基本不变。与图3b乳粉-甘油体系高温甲醛生成的趋势相似。因此，酪蛋白-乳糖-甘油体系高温甲醛的消长趋势与乳粉-甘油体系高温甲醛的消长趋势相似。

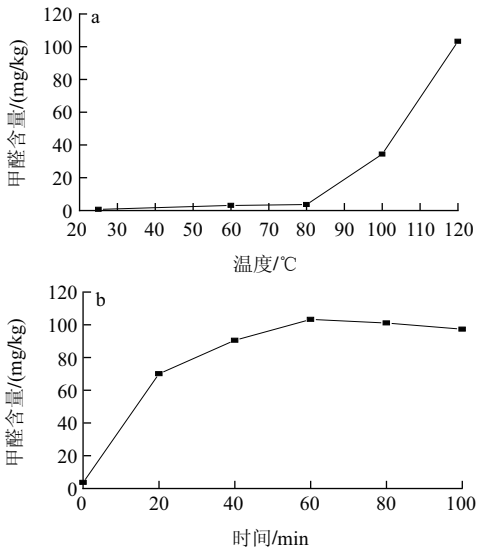



**图 6 酪蛋白-乳糖-甘油体系甲醛生成的温度曲线(a)和时间曲线(b)**

**Fig.6 Temperature curve (a) and time curve (b) of the generation of formaldehyde in casein-lactose-glycerin system**

## 3 结 论

本实验研究了甘油体系收集样品经高温处理生成甲醛的方法及收集后甲醛的检测方法。通过对奶糖主要成分乳粉和糖类进行研究，发现乳粉是奶糖中甲醛生成的主要物质，在分析乳粉主要成分蛋白和糖类时发现酪蛋白和乳糖的美拉德反应是奶糖甲醛生成的根本原因。乳清蛋白对甲醛的生成基本无影响，不同糖类的影响也不同，依次为葡萄糖＞果糖＞乳糖＞蔗糖。

**参考文献：**

[1] OWEN B A, DUDNEY C S, TAN E L, et al. Formaldehyde in drinking water: comparative hazard evaluation and an approach to regulation[J]. Regulation Toxicology and Pharmacology, 1990, 11(3): 220-236.

[2] YAMAGATA M, LOW L K. Rapid determination of formaldehyde in banana shrimp penaeus[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(4): 718-720.

[3] BIANCHI F, CARERI M, MUSCI M, et al. Fish and food safety: determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis[J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1049-1053.

[4] 张文德. 食品中甲醛的来源及检测意义[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(5): 455-459.

[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, 2003(3): 221-224.

[6] PARKIN K L, HULTIN H O. A membrane fraction from red hake muscle catalyzing the conversion of TMAO to dimethylamine and formaldehyde[C]. International Institute of Refrigeration Joint Meeting of Commission C-2, D1-D2, D3, Boston, USA, 1981: 568-597.

[7] 丁晓雯, 刁恩杰. 半胱氨酸对香菇甲醛含量控制及控制机理[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 133-135.

[8] 刁恩杰, 丁晓雯, 章道明. 干燥方式对香菇中甲醛含量的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 70-73.

[9] 朱军莉, 励建荣. 鱿鱼及其制品加工贮存过程中甲醛的消长规律研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 14-17.

[10] 马志玲, 王延平, 吴京洪, 等. 乳及乳制品中加工中的美拉德反应[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(3): 8-10.

[11] 张永忠, 赵新淮, 李铁晶, 等. 乳品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 277-278.

[12] 冯大炎, 周运友. Maillard反应与Strecker降解及其对食品风味与食品营养的影响[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 1993, 16(2): 79-84.

[13] 陈华. 影响食品中美拉德反应的因素[J]. 四川食品与发酵, 1998(3): 21-23.

[14] 陈笑梅, 施旭霞, 朱卫建, 等. 高效液相色谱直接测定甲醛衍生物反应条件的研究[J]. 分析化学, 2004, 32(11): 1421-1425.

[15] 吕春华, 陈梅, 陈笑梅, 等. 衍生液提取-高效液相色谱法测定食品中甲醛[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(9): 1005-1008.

[16] BAKER P R. The generation of formaldehyde in cigarettes-overview and recent experiments[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(11): 1799-1822.

[17] MAURON J. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint[J]. Progress in Food Nutrition Science, 1981, 5(1/6): 5-35.

[18] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444.

[19] JING H, KITTS D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 1007-1015.

[20] 周洁瑾, 张列兵, 梁建芬, 等. 热处理对牛乳蛋白质品质的影响[J]. 食品科技, 2010, 35(6): 74-77.