

食品中亚硫酸盐测定方法的改进

张文德 郭 忠 孙仕萍

(唐山市卫生防疫站,河北 唐山 063000)

摘 要:为改进 GB/T 5009.34 食品中亚硫酸盐的测定方法,进行了一系列的改进。SO₂ 标准溶液的配制改为先测定固体试剂 NaHSO₃ 中 SO₂ 的纯度,而后根据已知的 SO₂ 纯度直接称取 NaHSO₃ 配成 SO₂ 标准溶液。显色剂中使用 0.27% 的甲醛溶液和 0.15 mol/L 的盐酸溶液,显色剂用量 1.0 ml,最大吸收波长 580 nm。该试验除 NO₂⁻ 及 S²⁻ 外,其他共存物质及添加剂等均无干扰,在样品溶液中加入 H₂O₂ 作为校正空白消除反应过程中产生的呈色物质及背景颜色的干扰。改进后的方法 SO₂ 标准溶液的配制简捷,灵敏度是国标法的 1.6 倍,最小检出量为 0.1 μg,样品最低检测浓度为 0.2 mg/kg,回收率为 90.0% ~ 110.0%,RSD 范围为 0.5% ~ 3.2%。反应速度、显色体系的稳定性及可操作性等大为提高。该方法适用于食品中 SO₂ 的测定。

关键词:食品;亚硫酸盐类;比色法;研究技术

Improvement of colorimetric determination of sulfites in foods

Zhang Wende, Guo Zhong, Sun Shiping

(Health Anti-epidemic Station of Tangshan municipal, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: Determination of traces of sulfites in various foods was attempted by using the modified para-rosaniline-formaldehyde colorimetry of the national standard GB/T 5009.34.

The effects of preparation of sulfite standard solution, optimum condition of color reaction and coexistence substances on the determination of sulfites were investigated. The effects of interfering substances in samples and background color on the color reaction could be corrected by adding hydrogen peroxide directly into the sample solution before color development as subtraction of the sample blank. Using the modified technique, the sensitivity, specificity, reaction velocity, reproducibility and operability were all increased.

The minimum detectable quantity of this method was 0.1 μg SO₂ in solution. The minimum detectable concentration was 0.2 mg/kg SO₂ in food samples. The method could be applied to almost all kinds of foods.

Key Words: Food; Sulfites; Colorimetry; Investigative Techniques

亚硫酸及其盐类是广泛使用的食品添加剂,具有漂白、脱色、防腐及抗氧化等作用。但近年来发现食品中超量使用及滥用亚硫酸盐的现象非常严重,特别是使用违禁工业化学品吊白块等引发的食品安全问题成为公众关注的热点。因此,研究食品安全快速检测技术具有重要的意义。

食品中亚硫酸的测定,美国 FDA 采用 Monier-Williams 法,^[1]日本标准采用通氮蒸馏-滴定法和盐酸副玫瑰苯胺比色法,^[2]AOAC 法^[3]和我国标准 GB/T 5009.34 为盐酸副玫瑰苯胺比色法。^[4]由于盐

酸副玫瑰苯胺比色法存在操作繁琐、灵敏度低、显色体系不稳、重现性差,时常导致检测结果出现较大误差,特别是食品的颜色、着色剂及未知成分与显色剂反应而呈阳性干扰问题长期被忽视,而这一关键环节正是 GB/T 5009.34 法的技术盲点,必须加以解决。基于此目的,本研究对 GB/T 5009.34 法做出较大修正,改进了 SO₂ 标准溶液的配制方法,探讨了显色反应的最佳条件及干扰物质的影响及消除方法。改进后方法操作简捷,灵敏度高、反应速度快、重现性好、线性范围宽、测量的准确度及可操作性等都显著提高。适用于食品中 SO₂ 的测定。

作者简介:张文德 男 主任技师

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

723 型分光光度计(上海分析仪器厂)。

0.04 %盐酸副玫瑰苯胺溶液 称取 40 mg 盐酸副玫瑰苯胺(Fluka 进口分装)于 100ml 容量瓶内,加 15 ml 浓盐酸溶解,用水稀释至刻度,混匀(冰箱内稳定 1 周)。

0.27 %甲醛溶液 吸取无聚合 36 %甲醛 0.70 ml 于 100 ml 容量瓶内,加水稀释至刻度,混匀(用前配制)。

盐酸副玫瑰苯胺 - 甲醛混合溶液 用前将 0.04 %盐酸副玫瑰苯胺溶液和 0.27 %甲醛溶液以 1 + 1 混合。

0.3 % H₂O₂ 溶液 取 1.0 ml 30 % H₂O₂ 于 100 ml 容量瓶中,加水至刻度,混匀(用前配制)。

SO₂ 纯度的标定 称取约 0.5 g 亚硫酸氢钠(NaHSO₃)于 100 ml 容量瓶中,加水溶解至刻度,混匀。取 10.00 ml 于 250 ml 碘量瓶中,加水 100 ml,准确加 20.00 ml 碘溶液(0.1 mol/L),5 ml 冰乙酸,摇匀,于暗处放置 2 min 后。迅速用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色,加 0.5 ml 1 %淀粉溶液,继续滴定至无色。

另取 100 ml 水,准确加入 20.00 ml 碘溶液(0.1 mol/L),5 ml 冰乙酸,按同一方法做试剂空白试验。

计算:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \times C \times 3.2 \times 10}{W \times 10/100 \times 1000}$$

式中: X—SO₂ 的纯度(mg/mg),即 1 mg NaHSO₃ 所含 SO₂ 的量,mg; C—硫代硫酸钠标准溶液的摩尔浓度(mol/L); V₀—试剂空白溶液所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,ml; V₁—NaHSO₃ 溶液所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,ml; W—称取 NaHSO₃ 的质量,g;3.2—1 ml 碘[c(1/2 I₂) = 0.1 mol/L]标准溶液相当于 SO₂ 质量,mg。

SO₂ 标准溶液 准确称取 162.5 mg NaHSO₃ (SO₂ 的纯度为 0.62 mg/mg)于 100 ml 容量瓶内,用 0.1 mol/L NaOH 溶液溶解,并稀释至刻度,混匀。该溶液 SO₂ 浓度为 1.00 mg/ml,此液作为储备液。用前将储备液用水稀释成 0.1 mg/ml,最后再用四氯汞钠吸收液稀释至 2.0 μg/ml 作为使用液。

其它试剂与 GB/T 5009.34 法相同。水为重蒸馏水。

1.2 方法

试样处理 与 GB/T 5009.34 法相同。

SO₂ 校正曲线的制备 吸取 0、1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0 ml SO₂ 标准溶液(相当于 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg)分别于 A、B 两支 10 ml 容量瓶内,加四氯汞钠吸收液至 5.0 ml。混匀。A 瓶内加 0.2 ml 水,B 瓶内加 0.2 ml 0.3 % H₂O₂ 溶液,混匀。然后各加 1.0 ml 盐酸副玫瑰苯胺 - 甲醛混合溶液,混匀。放置 15 min,用 1 cm 比色杯,以蒸馏水为参比,于波长 580 nm 处分别测定 A、B 瓶内的吸光度。以 A - B 的吸光度差值绘制 SO₂ 校正曲线或计算回归方程。

试样测定 于 A、B 两支 10 ml 容量瓶内,分别加入适量(SO₂ 10 μg)相同的试样处理溶液,各加入四氯汞钠吸收液至 5.0 ml。以下按校正曲线的制备中“A 瓶内加 0.2 ml 水,B 瓶内加 0.2 ml 0.3 % H₂O₂ 溶液……”起进行操作。测定 A、B 瓶内试样的吸光度。以 A - B 的吸光度差值从 SO₂ 校正曲线或回归方程计算样品中 SO₂ 的含量。

2 结果与amp;讨论

2.1 SO₂ 纯度的标定及标准溶液的配制

由于 SO₂ 标准溶液不稳定,使用中需要经常对其浓度进行标定,非常繁琐。本研究对配制方法做了较大改进,先测定固体试剂 NaHSO₃ 中 SO₂ 的纯度,而后根据已知 SO₂ 的纯度,直接称取 NaHSO₃ 配成 SO₂ 标准溶液,使用时无需再进行标定,操作大大简化。对 NaHSO₃ 固体试剂的稳定性进行观察,结果,标定过的 NaHSO₃ 试剂在常温下保存 12 个月后再进行标定时,SO₂ 的含量误差为 ±0.25 % 以内,在滴定误差允许范围内,SO₂ 的纯度较稳定。这样标定之后的固体 NaHSO₃ 试剂可使用 1 年。

SO₂ 标准溶液的配制 先用 0.1 mol/L NaOH 溶液配成储备原液,临用时用四氯汞钠吸收液稀释成 SO₂ 使用液。与国标配制方法比较,测得的 SO₂ 吸光度差异没有显著性。但本法配制简便、快捷,并减少了四氯汞钠吸收液的用量。该 SO₂ 标准原液置冰箱内保存至少稳定 3 周。

2.2 校正曲线 B 瓶的设置

表 1 列出 B 瓶 H₂O₂ 对 SO₂ 标准系列吸光度的影响结果。通过比较,B 瓶加入 H₂O₂ 可完全将 SO₂ 氧化成 H₂SO₄ 予以消除,吸光度(B/水)降低至与试剂空白 0(A/水)几乎相同,同时也说明 H₂O₂ 对显色剂等无影响。此时,制备 SO₂ 校正曲线时也可以将 B 瓶系列省略,以试剂空白为参比进行比色。

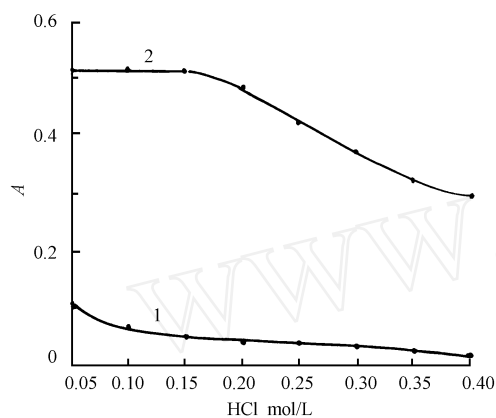
2.3 显色条件的探讨显色剂中盐酸浓度的影响

盐酸浓度是影响显色的关键因素。GB/T

5009.34法因用目视观察盐酸副玫瑰苯胺颜色变化来确定盐酸的用量,每次配制盐酸浓度难以控制一致,既影响了方法的灵敏度,又给定量结果带来较大误差。为此,本文探讨了显色剂中盐酸最佳浓度。改变盐酸浓度从0.05~0.40 mol/L范围,依方法进行的操作,结果见图1。可见,盐酸浓度在0.05~0.16 mol/L范围内, SO_2 的吸光度为最大且恒定(曲线2);当盐酸浓度 >0.16 mol/L,随其浓度的增加而吸光度逐渐下降;试剂空白的吸光度随盐酸浓度的增加而逐渐下降(曲线1)。故选显色剂中盐酸浓度0.15 mol/L。

表1 H_2O_2 对 SO_2 标准系列吸光度的影响

SO_2 μg	0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
A/水	0.052	0.272	0.476	0.680	0.864	1.046
B/水	0.050	0.049	0.050	0.050	0.050	0.049



1. 试剂空白/水;2. SO_2 /试剂空白
图1 显色剂中盐酸浓度的影响

2.4 甲醛浓度的选择

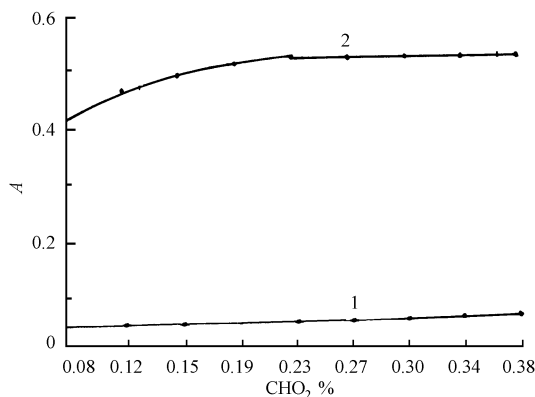
固定显色剂中盐酸浓度0.15 mol/L,改变甲醛浓度从0.08%~0.38%范围,测得结果见图2。可见, SO_2 的吸光度随着甲醛浓度的增加而不断升高,当甲醛浓度达0.23%~0.38%范围时, SO_2 吸光度为最大且恒定(曲线2)。故选0.27%甲醛溶液。

2.5 显色剂溶液用量的影响

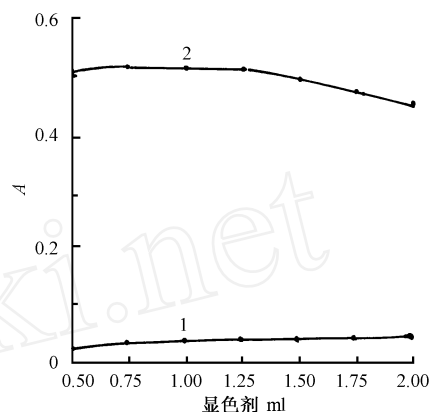
固定盐酸副玫瑰苯胺-甲醛混合溶液比例1+1,改变其加入量从0.5~2.0 ml,结果见图3。可见,当用量在0.75~1.25 ml时, SO_2 的吸光度为最大且恒定(曲线2)。当用量 >1.25 ml, SO_2 的吸光度随之逐渐下降,而试剂空白的吸光度随显色剂用量的增加而略渐升高(曲线1)。故选显色剂1.0 ml。

2.6 温度对显色速度的影响

观察了温度10~30范围内显色反应速度的变化曲线,结果见图4。可见,温度对显色反应速度及稳定时间影响很大。当温度在10时,20 min



1. 试剂空白/水;2. SO_2 /试剂空白
图2 甲醛浓度的影响



1. 试剂空白/水;2. SO_2 /试剂空白
图3 显色剂溶液用量的影响

吸光度达最高且稳定40 min;在15和20时,15 min吸光度均达最高且分别稳定30 min和15 min;25时,10 min吸光度达最高且稳定10 min;30时,10 min吸光度达最高且稳定仅为5 min。因此,测量时要注意温度的影响,尽可能选择较低的温度条件。

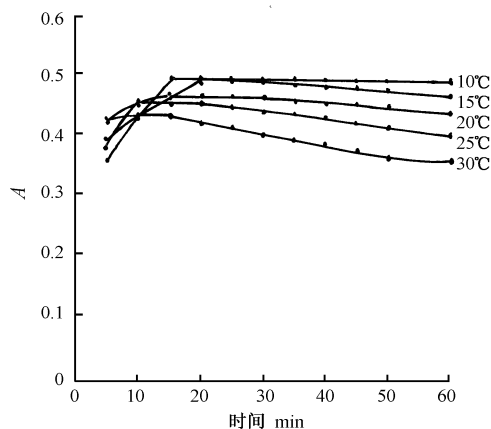
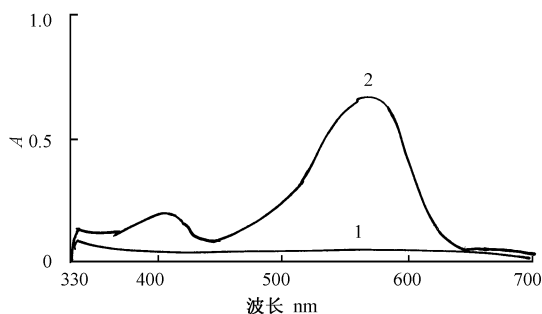


图4 温度对反应速度的影响

2.7 吸收光谱

对 SO_2 的显色产物从波长330~700 nm进行扫描,结果见图5。可见,该最大吸收波长在 580 ± 1

nm处(曲线2),在此波长处,试剂空白吸光度在 0.042 ± 0.009 范围波动(曲线1)。而GB/T 5009.34法测量波长为550 nm,并非是SO₂显色产物的最大吸收,试验证实国标法最大吸收波长应为580 nm。



1. 试剂空白/水;2. SO₂/试剂空白

图5 吸收光谱

2.8 线性关系及灵敏度

SO₂的浓度与吸光度之间在0.05~1.6 mg/L范围内呈良好的直线关系,校正曲线的回归方程为: $A = 0.0994 C + 0.0244$ ($C = \text{mg/L}$), $r = 0.9998$ 。最小检出量为0.1 μg。表观摩尔吸光系数(ϵ_{580}) = $4.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。而GB/T 5009.34法最小检出量为1 μg, $\epsilon_{550} = 2.5 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。本法灵敏度()是GB/T 5009.34法的1.6倍。

2.9 干扰试验及消除方法

共存物质的影响 共存物质的影响试验结果见表2。可见,除NO₂⁻及S²⁻外,其它共存物质及添加剂等均无干扰。乙醇、甲醛等允许量较高。NO₂⁻呈负干扰,可以用氨基磺酸胺作掩蔽剂,加入1 ml 12 g/L氨基磺酸胺至少消除20 μg NO₂⁻的干扰,但加入氨基磺酸胺后可使SO₂吸光度降低0.26倍,此时必须同时制备相应的SO₂校正曲线。若试样不含NO₂⁻,可不加氨基磺酸胺。此外,S²⁻与显色剂反应产生正干扰,因此,对于能分解成S²⁻化物的某些食品(洋葱、大蒜等)成分,本法不适用。

呈色物质的干扰及消除 食品中呈色物质主要指,(1)不参与本显色体系反应的物质,如食品的色泽、着色剂等;(2)参与显色体系反应而出现呈色的未知物质。通常,这两种情况在食品中往往同时存在,前者可产生背景干扰,后者呈现阳性干扰,但并非是SO₂显色的真正颜色。对于这些呈色物质的影响必须要除去。AOAC法和我国GB/T 5009.34法均缺乏消除这些干扰的措施,定量时一直视为SO₂。日本标准方法采用通氮气蒸馏-副玫瑰苯胺比色法,该法在蒸馏试液的B管中加入H₂O₂以除去SO₂以外呈色物质的干扰。但蒸馏装置特殊、操作繁琐,使用剧毒试剂叠氮化钠消除NO₂⁻和昂贵试剂双甲

酮除去醛类干扰。

表2 共存物质的影响试验

加入物质	加入量 mg	吸光度 A	相对误差 %	加入物质	加入量 mg	吸光度 A	相对误差 %
SO ₂	0.005	0.565	—	NH ₃ -N	1.0	0.553	2.1
乙醇	100.0	0.578	2.3	草酸	0.5	0.570	0.9
甲醛	36.0	0.570	0.9	甜味素	0.5	0.551	2.5
甲醇	10.0	0.569	0.7	正戊醇	0.3	0.570	0.9
丙酮	10.0	0.543	3.9	正丁醇	0.27	0.565	0.0
乙酸乙酯	10.0	0.595	5.3	乙醛	0.24	0.553	2.1
三乙醇胺	10.0	0.565	0.0	苯甲酸	0.2	0.579	2.5
NO ₃ ⁻	10.0	0.558	1.2	异戊醇	0.1	0.564	0.2
乳糖	3.3	0.572	1.2	异丁醇	0.1	0.565	0.0
葡萄糖	2.1	0.563	0.3	甜蜜素	0.05	0.579	2.5
苯酚	1.3	0.570	0.9	双酚A	0.04	0.590	4.4
乳酸	1.0	0.558	1.2	山梨酸	0.04	0.535	5.3
柠檬酸	1.0	0.561	0.7	NO ₂ ⁻	0.01	0.083	85.3
琥珀酸	1.0	0.564	0.2	S ²⁻	0.002	0.687	21.6
糖精钠	1.0	0.560	0.9				

为了消除呈色物质的影响,本文对无需蒸馏、直接除去试样中干扰物的方法进行探讨。取样品处理液5.0 ml分别置于A、B、C瓶内,A瓶加0.2 ml水,B瓶加0.2 ml 0.3% H₂O₂,各加1 ml显色剂;C瓶加1.2 ml蒸馏水。放置15 min后测定A、B、C瓶的吸光度,求出A、B、C值,再根据A-B值和A-C值算出样品中SO₂的含量,结果见表3。可见,A-B值与A-C值测定结果间有十分明显的差异。B瓶中由于加入少量H₂O₂,H₂O₂将SO₂氧化成硫酸,不与显色剂显色,与显色体系反应的未知物质所产生的吸光度及溶液的背景颜色通过A-B值一并被扣除,大大提高了测量SO₂的准确性。而A-C值只能扣除样品中颜色或着色剂的背景部分,对SO₂以外参与显色反应呈色的未知物质无法扣除,所以最终导致SO₂的测定值明显偏高。故选A-B值法消除所有呈色物质的影响。

表3 呈色物质干扰的消除方法的比较

样品	A值	B值	C值	A-B值	A-C值
啤酒	1.2	0.6	0.0	0.6	1.2
葡萄酒	9.6	5.6	0.0	4.0	9.6
蜜枣	3.0	2.8	0.8	0.2	2.2
黄花菜	14.4	14.4	3.9	0.0	10.5
滑子菇	6.0	6.0	0.5	0.0	5.5
腐竹	0.5	0.5	0.0	0.0	0.5
糖果	0.4	0.4	0.2	0.0	0.2
枸杞	4.8	4.8	3.9	0.0	0.9

H₂O₂溶液用量试验 向已知SO₂含量的枸杞、红葡萄酒、啤酒样品处理液加入0.3% H₂O₂溶液0.05~0.5 ml,结果H₂O₂用量在0.2~0.4 ml范围,对SO₂的消除率达99.5%~100.0%。本法B瓶加入0.3% H₂O₂溶液0.2 ml,至少可消除100 μg SO₂。

2.10 试样分析和加标回收率

随机采样抽取超市中的各类食品进行分析,同时试样加标做回收率试验,结果见表4。每种试样重复测定4次,相对标准偏差(RSD)为0.5%~3.2%。

表4 试样分析和回收率 mg/kg

样品	加标量	A 值	B 值	A - B 值	回收率 %
啤酒	0	7.8	0.1	7.7	
	5.0,20.0	13.0,29.8	0.1	12.9,29.7	102.0,110.0
绵白糖	0	7.0	0.2	6.8	
	5.0,10.0	12.2,17.3	0.1	12.1,17.2	106.0,104.0
淀粉	0	100.7	0.0	100.7	
	20.0,80.0	121.8,182.0	0.0	121.8,182.0	105.5,101.6
辣椒粉	0	16.0	15.8	0.2	
	8.0,20.0	25.0,38.1	16.1	8.9,22.0	108.8,110.0
粉丝	0	303.0	0.0	303.0	
	200.0,800.0	501.5,1090.0	0.0	501.5,1090.0	99.3,98.3
腐竹	0	0.5	0.5	0	
	4.0,10.0	4.3,10.0	0.6	3.7,9.4	92.5,94.0
黄花菜	0	14.4	14.6	0	
	5.0,20.0	19.6,33.0	15.0	4.6,18.0	92.0,90.0
竹笋罐头	0	1.7	0.0	1.7	
	2.0,8.0	3.8,10.3	0.0	3.8,10.3	105.0,107.5
甜杏脯	0	1027.5	0.0	1027.5	
	100.0,400.0	1123.3,1426.0	0.0	1123.3,1426.0	95.8,99.6
鱿鱼片	0	1.2	0.0	1.2	
	2.0,8.0	3.1,9.0	0.0	3.1,9.0	95.0,97.5

2.11 与国标法比较

本法与国标法(GB/T 5009.34)比较结果见表5。由表5可见,对于颜色较浅的食品(银耳、粉丝、淀粉、白糖等),本法测定值与国标法相一致。枸杞虽然颜色较深,但由于SO₂含量很高,测定时经过若干

倍的稀释,背景的干扰很小,因此,测定值与国标法也较一致。相反,其它样品因颜色较深或SO₂含量较低,干扰相应较大,与本法比较,国标法测定值明显偏高,甚至有些样品(啤酒、酸梅、黄花菜、枸杞、糖果等)本来不含SO₂也测出较高的值。而本法由于采用了A - B值,测定结果较为可靠。

表5 与国标法比较结果 mg/kg

样品	本法	国标法
枸杞	2940.0	2980.0
银耳	690.3	690.1
粉丝	303.0	304.6
淀粉	100.7	100.6
绵白糖	6.8	7.1
红葡萄酒	53.7	56.1
干红葡萄酒	9.0	11.4
啤酒1	0.6	0.8
啤酒2	<0.2	0.3
酸梅	<0.2	3.2
黄花菜	<0.2	3.2
枸杞	<0.2	9.0
糖果(红)	30.0	31.8
糖果(绿)	<0.2	1.7

参考文献:

- [1] Hillery B, Elkins E, Warner C, et al. Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: Collaborative study[J]. J AOAC, 1989, 72(3): 470—475.
- [2] 日本药学会. 卫生试验法·注解[M]. 北京: 华文出版社, 1995, 66—67.
- [3] 中国光学会光谱专业委员会. AOAC分析方法手册(上册)[M]. 1984, 708—709.
- [4] GB/T 5009.34—2003. 食品卫生检验方法 理化部分[S].

[收稿日期: 2004 - 08 - 21]

中图分类号: R15; R155.15; O612.6 文献标识码: B 文章编号: 1004 - 8456(2004)06 - 0504 - 05

实验室菌落计数精密度控制研究 - 方法研究

程苏云 梅玲玲 任锦玉

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310009)

摘要:为使室间及室内检测数据的准确度及精密度控制在一定的范围,保证相关的卫生微生物实验室出具准确的检测数据,选用明胶菌片作为菌落计数室间及室内质控比对品。随机抽取明胶菌片和滤纸菌片各10片进行计数检测;取同一批号的明胶菌片发放给不同实验室进行室间比对;明胶菌片分别经1个月、3个月及6个月保存后进行稳定性计数测定。结果显示同一批次明胶菌片和滤纸菌片的相对标准偏差(RSD)分别为11%和22.3%,表明明胶菌片的精密度高于滤纸菌片;75个实验室室间明胶菌片计数结果95%的可信区间为 $5.51 \times 10^7 \sim 8.03 \times 10^7$ CFU/片,有96.83%的单位在此范围中;明胶菌片4 冰箱保存1、3、6个月的检测结果的均数误差差异无显著