

论著

离子色谱法测定食品中硝酸盐和亚硝酸盐

张磊¹ 刘肖² 赵云峰¹ 牟世芬² 郑洪国² 吴永宁¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050; 2. 戴安中国有限公司,北京 100088)

摘要:目的 建立同时测定食品中硝酸盐和亚硝酸盐的离子色谱方法。方法 采用超声提取、固相萃取柱净化的方法对试样进行前处理,大容量阴离子交换色谱柱分离,抑制型电导检测器检测。结果 亚硝酸盐和硝酸盐的检出限分别为 0.005 mg/L 和 0.008 mg/L,回收率均在 80% 以上, RSD 小于 10%。结论 该方法简便快捷、准确可靠,适用于多种食品基质中亚硝酸盐和硝酸盐的分析。

关键词:硝酸盐类;亚硝酸盐类;食品;色谱法,离子交换

Determination of Nitrate and Nitrite in Foods by Ion Chromatography

ZHANG Lei, LIU Xiao, ZHAO Yun-feng, MOU Shi-fen, ZHENG Hong-guo, WU Yong-ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of nitrite and nitrate in foods. **Method** Food samples were pre-treated by ultrasonic extraction, high-speed centrifugation and solid phase extract clean up, and the resulting supernatants were injected into a high-capacity anion exchange column with suppressed conductivity detection. **Results** The detection limits of nitrite and nitrate were 0.005 mg/L and 0.008 mg/L, respectively. Recovery rates were both above 80% and RSD for either ion was less than 10%. **Conclusion** The method could be simple, rapid, accurate and reliable, and suited for the analysis of nitrite and nitrate in various foods.

Key word: Nitrates; Nitrites; Food; Chromatography, Ion Exchange

食品,特别是植物性食品,常常天然含有大量的硝酸盐,如果保存和处理不当,在硝酸盐还原酶作用下这些食品可能产生大量的亚硝酸盐。硝酸盐和亚硝酸盐也是食品加工中常用的着色剂和防腐剂,因而肉制品中也常有较高的含量。一次摄入过量的亚硝酸盐可以引起高铁血红蛋白血症,3个月以下儿童尤其敏感。同时,亚硝酸盐还能与食品中常见的有机胺类物质形成致癌性的N-亚硝基化合物,从而威胁人体健康。硝酸盐的毒性尽管较低,但是,它在体内能够还原为亚硝酸盐,并且还可内源性形成亚硝胺类物质,因而也受到人们的关注^[1]。鉴于硝酸盐和亚硝酸盐对人体健康的潜在危害,2002年JECFA修订了亚硝酸盐的每日允许摄入量(ADI)为每公斤体重0~0.07mg(以亚硝酸根离子计)^[2]。我国GB 2762—2003修订了食品中亚硝酸盐的限量卫生标准。

我国GB/T 5009.33—2003中规定了亚硝酸盐和硝酸盐含量测定的方法,即试样经沉淀蛋白质,去除

脂肪后,亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化,再与盐酸萘乙二胺偶合反应,光度法测定。硝酸盐则采用镉柱还原为亚硝酸盐后测定^[3]。该方法需分步测定硝酸盐和亚硝酸盐,操作繁琐,专属性差,且试验过程中检验人员需要接触具有致癌性的镉。离子色谱作为新型的色谱分离技术,适合于离子化合物的检测,且简化试样的前处理过程,具有快速、简便、灵敏、选择性强等特点,因而逐渐在蔬菜、肉制品、牛奶及婴儿食品的亚硝酸盐/硝酸盐检测上得到应用^[4-7]。目前欧盟已将离子色谱法规定为肉制品中亚硝酸盐/硝酸盐检测的标准方法^[8]。本文根据文献资料,开展了离子色谱法测定食品中硝酸盐和亚硝酸盐分析方法的探讨,并将测定结果与GB/T 5009.33—2003比较,旨在建立适合于食品中硝酸盐和亚硝酸盐同时快速测定,并能普遍使用的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料 水为超纯水,电阻率为18.2 M \cdot cm。硝酸盐(以NO₃⁻计,下同)标准溶液(1000 mg/L):水基体,相对不确定度(k=2)为0.7%,购自国家标准物质中心。亚硝酸盐(以NO₂⁻计,下同)标准溶液(100 mg/L):水基体,相对不确定度(k=2)为2%,购

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划食品安全关键技术重大项目,化学污染物暴露评估技术研究(2006BAK02A10)

作者简介:张磊 男 助理研究员

通讯作者:赵云峰 男 研究员

自国家标准物质中心。

硝酸盐和亚硝酸盐混合标准使用液 准确移取硝酸盐和亚硝酸盐标准溶液各 1.0 ml 于 100 ml 容量瓶中,用水稀释至刻度,此溶液为 1 ml 含硝酸根离子 10.0 μg 和亚硝酸根离子 1.0 μg 。

固相萃取柱 OnGuard RP 柱(2.5 ml)、OnGuard Ag 柱(1.0 ml)和 OnGuard Na 柱(1.0 ml)美国 Dionex 公司 chp 产品。固相萃取柱使用前需进行活化,其活化过程为:RP 柱使用前依次用 10 ml 甲醇、15 ml 水通过,静置活化 30 min。Ag 柱和 Na 柱用 10 ml 水通过,静置活化 30 min。

离子色谱仪(ICS-2000 型),配备淋洗液在线发生装置、电导检测器、ASRS 型抑制器、25 μl 定量环,美国 dionex 公司产品。

超声波仪 KS-500D,宁波海曙科生超声设备有限公司。

1.2 试样提取和净化 称取水果、蔬菜、鱼类、肉类试样匀浆 5.00 g,以 80 ml 水洗入 100 ml 容量瓶中,超声提取 30 min,每隔 5 min 振摇 1 次,保持固相完全分散。置 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 5 min,用水稀释至刻度。溶液经滤纸过滤后,取部分溶液于 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。

奶粉等准确称取试样 2.50 g,牛奶称取 10.00 g,以 80 ml 水洗入 100 ml 容量瓶中,超声提取 30 min,加入 3% 乙酸 2 ml,放置 20 min,稀释至刻度,采用定量滤纸初步过滤,滤液备用。

取上述提取液 15 ml,依次通过活化后的 OnGuard RP 柱、Ag 柱和 Na 柱,弃去前面 7 ml,收集后面洗脱液待测。

1.3 色谱条件 阴离子分析柱为 IonPac AS11 - HC (250 mm \times 4 mm),保护柱为 IonPac AG11 - HC (50 mm \times 4 mm)。柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,电导检测池温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 。进样体积 25 μl 。淋洗液为氢氧化钾溶液,由淋洗液自动发生器在线产生,流速 1.0 ml/min。洗脱梯度为 6 mmol/L 30 min,在 0.1 min 内升至 70 mmol/L,保持 5 min;再于 0.1 min 内降到 6 mmol/L,保持 5 min。

2 结果与讨论

2.1 试样提取方法的选择 为了选择最佳的提取温度和时间,称取试样匀浆 5.0 g,以 80 ml 水洗入 100 ml 容量瓶中,分别选用 25 $^{\circ}\text{C}$ (室温)、40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴和 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴进行超声提取,提取时间为 20、30、40 和 50 min,以 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 时亚硝酸盐提取效率为 100% 计算,不同时间和温度时的提取效率如图 1 所示。该结果表明,在上述各参数条件下,亚硝酸盐的提取效率差别在 10% 以内,25 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取

30 min 即可获得理想的提取效果,进一步提高温度和时间并不能显著提高提取效率。同样,在此条件下硝酸盐亦能取得较高的提取效率。因此选择室温下超声 30 min 为本方法的提取条件。

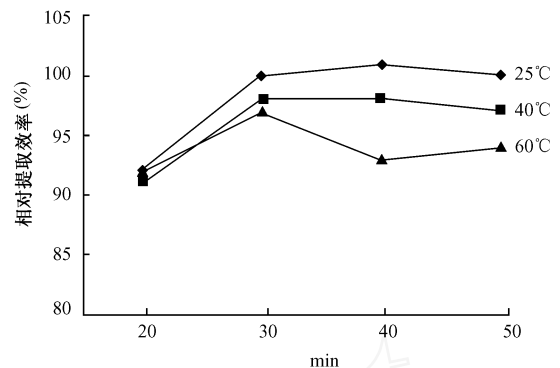


图 1 时间和温度对食品中亚硝酸盐提取效率的影响

2.2 离子干扰去除及色谱分离条件选择 食品样品基质复杂,蔬菜、肉制品等样品中常常含有较多的 Cl^- 。由于 Cl^- 峰邻近 NO_2^- ,为防止在测定过程中高浓度 Cl^- 对低浓度 NO_2^- 的干扰,试样须经过 Ag 柱处理,清除提取液中大部分 Cl^- ,再通过适当的色谱条件,达到与 NO_2^- 的良好分离。由于牛奶或奶粉等样品需使用 3% 乙酸沉淀蛋白,因此处理后的试样中含有较高浓度的乙酸。为了使 NO_2^- 的分离检测不受其干扰,也必须对色谱分离条件进行优化。为此,配制 100 ml 0.06% 的乙酸溶液,其中 NO_2^- 的含量为 20 $\mu\text{g/L}$, NO_3^- 浓度为 8 mg/L。以此溶液在 1 ml/min 的流速下,采用不同浓度的洗脱液进行分离条件的优化。检测结果(表 1)表明,在 6 mmol/L 的氢氧化钾浓度下,低浓度 NO_2^- 可不受 Ac^- 干扰而获得良好的回收。同时可保证试样中 Cl^- 与 NO_2^- 的良好分离(图 2)。

表 1 不同浓度的淋洗液对 0.06% 乙酸溶液中亚硝酸盐和硝酸盐分离效果的影响

KOH 浓度 (mmol/L)	NO_2^-		NO_3^-	
	保留时间 (min)	检出浓度 ($\mu\text{g/L}$)	保留时间 (min)	检出浓度 (mg/L)
5.00	16.47	19.94	32.72	7.97
6.00	13.61	19.96	28.79	8.02
8.00	10.92	18.44	22.30	7.93
10.00	8.04	15.78	17.25	7.80
15.00	6.23	14.62	10.57	7.84

2.3 方法线性试验及检出限 配制 NO_2^- 及 NO_3^- 的混合标准工作溶液,采用上述色谱条件检测,以峰高(y)对浓度(x)作图,得到工作曲线,其线性范围、方程及相关系数见表 2。

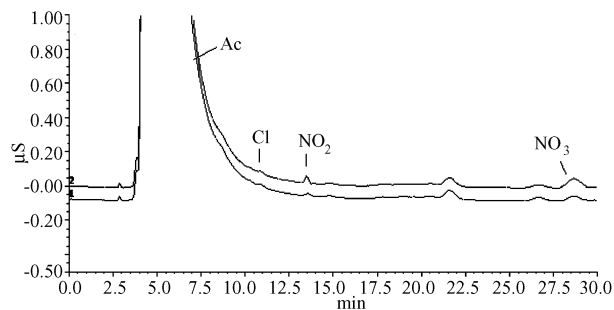


图2 奶粉样品中亚硝酸盐及硝酸盐与干扰离子的分离色谱图

表2 线性试验结果

检测离子	线性范围 (mg/L)	校正曲线	R ²	检出限 (mg/L)
NO ₂ ⁻	0.02 ~ 1.0	y = 0.7786x - 0.0003	0.9994	0.005
NO ₃ ⁻	0.2 ~ 10.0	y = 0.3037x - 0.0077	0.9997	0.008

以 5 μg/L 的标准溶液平行进样 7 次,以 7 次结果标准偏差的 3 倍计算出亚硝酸盐和硝酸盐的检出限(表 2),以此换算成不同基质试样的检出限,亚硝酸盐分别为:牛奶 0.05 mg/kg,奶粉 0.20 mg/kg,蔬菜、水果、肉类 0.10 mg/kg;硝酸盐检出限为:牛奶 0.08 mg/kg,奶粉 0.32 mg/kg,蔬菜、水果、肉类 0.16

表3 亚硝酸盐与硝酸盐加标回收试验结果

(n = 5)

基质	亚硝酸盐			硝酸盐		
	本底值 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	回收率 ($\bar{x} \pm RSD, \%$)	本底值 (mg/kg)	添加水平 (mg/kg)	回收率 ($\bar{x} \pm RSD, \%$)
奶粉	1.85	1.0	92.86 ± 5.87	17.2	4.0	89.36 ± 8.06
		2.0	89.64 ± 4.03		8.0	92.02 ± 5.63
蔬菜	1.39	2.0	89.62 ± 6.80	56.6	20.0	98.66 ± 5.26
		4.0	89.74 ± 7.75		40.0	88.74 ± 6.47
熟肉类	1.90	2.0	90.18 ± 6.47	28.9	10.0	89.52 ± 6.72
		3.0	92.16 ± 7.21		30.0	90.52 ± 6.30

注: n 为检测次数。

表4 电导检测与紫外检测的结果比较

mg/kg

样品编号	亚硝酸盐			硝酸盐		
	电导检测	紫外检测	差值	电导检测	紫外检测	差值
牛奶 1	3.32	3.13	0.19	14.20	14.40	- 0.20
牛奶 2	ND	ND	0.00	4.29	4.18	0.11
奶粉 1	1.76	1.44	0.32	10.90	10.60	0.30
奶粉 2	2.23	1.99	0.24	14.30	15.10	- 0.80
酸奶 1	1.54	1.55	- 0.01	3.13	3.38	- 0.25
酸奶 2	3.59	3.56	0.03	8.03	7.60	0.43
奶酪 1	5.82	6.20	- 0.38	47.80	50.20	- 2.40
奶酪 2	2.71	2.98	- 0.27	40.30	42.20	- 1.90
豆奶 1	1.31	1.52	- 0.21	3.50	3.31	0.19
豆奶 2	4.88	4.37	0.51	9.82	9.24	0.58
蔬菜 1	1.11	0.99	0.12	1550.00	1550.00	0.00
蔬菜 2	1.17	1.02	0.15	820.00	830.00	- 10.00
腌肉 1	16.90	17.40	- 0.50	65.10	61.20	3.90
腌肉 2	14.10	14.40	- 0.30	35.80	38.80	- 3.00
牛肉 1	2.71	2.65	0.06	5.62	6.02	- 0.40
牛肉 2	9.31	9.35	- 0.04	36.70	39.20	- 2.50

注:“ND”为未检出。

mg/kg。

2.4 回收试验 分别以已知本底水平的奶粉、蔬菜和熟肉 3 类食品基质进行加标回收试验,加标水平以 GB 2762—2005《食品中污染物限量》中规定的限量及更低的水平添加。结果表明,3 种基质试样亚硝酸盐和硝酸盐回收率大于 80%,RSD 小于 10% (表 3)。

2.5 电导检测与紫外检测比较 电导检测器为通用性检测器,对待测离子的选择性差。而紫外检测器为选择性检测器,对 NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 有较好的选择性,可以获得比电导检测器更高的灵敏度。同时,紫外检测器对 Cl⁻ 不灵敏,可以降低 Cl⁻ 的干扰^[9]。因此紫外检测器应当是亚硝酸盐和硝酸盐测定的更好选择。但是,紫外检测器价格较贵,需要单独配备,而且其选择性也限制了其应用的范围。而逐渐发展起来的抑制型电导检测器,随着新型抑制器的推出和完善,已能显著降低杂离子的干扰,提高待测离子的响应。将紫外检测器和电导检测器串联进行检测,结果见表 4。可见,抑制型电导检测器与紫外检测器的测定结果无显著差异,说明在该分析条件下,使用抑制型电导检测器即可满足样品中痕量亚硝酸盐和硝酸盐测定的要求。

2.6 离子色谱法与光度法对比 光度法是亚硝酸盐与硝酸盐分析的经典方法,也是我国国标中食品中硝酸盐与亚硝酸盐测定的推荐方法。对同一样品分别采用离子色谱法与光度法检测,结果见表5。

可见,两种方法亚硝酸盐检测结果无明显差异。由于分光光度法采用铜柱还原测定硝酸盐含量,过程复杂,结果略高于离子色谱法。

表5 离子色谱法与分光光度法测定结果的比较

样品	亚硝酸钠			硝酸钠		
	分光光度法	离子色谱法	差值 ^a	分光光度法	离子色谱法	差值 ^a
奶粉	ND	0.50	0.00	45.65	40.69	- 4.96
奶粉	1.26	1.43	0.17	14.96	12.81	- 2.15
炼乳	1.00	1.84	0.84	23.05	14.97	- 8.08
酸奶	ND	0.28	- 0.22	13.42	6.89	- 6.53
牛奶	ND	0.13	- 0.37	9.97	6.60	- 3.37
油菜	3.20	3.58	0.38	4867.55	4128.32	- 739.23
火腿	28.99	24.94	- 4.05	62.25	54.26	- 7.99

注:a为差值=离子色谱法-分光光度法,分光光度法结果中ND以GB/T 5009.33—2003规定的LOD的1/2,即0.5 mg/kg计;“ND”为未检出。

长期以来,NO₃⁻、NO₂⁻等阴离子的分析缺乏快速灵敏的方法,传统的容量法、重量法和光度法大都操作繁琐,费时费力,需用多种化学试剂,而且灵敏度低,同时有干扰。而离子色谱法的产生是对阴离子分析的一项新的突破^[9],在阴离子的测定上具有快速、灵敏、选择性好和,可同时测定多组分的优点,这是传统分光光度法所无法比拟的。本文采用超声提取,高速离心分离,RP柱、Ag柱和Na柱净化,以氢氧化钾溶液为淋洗液,用抑制型电导检测器的离子色谱法进行检测,保留时间定性,外标法定量,实现了食品中亚硝酸盐、硝酸盐同时快速准确检测。

参考文献

- [1] 吴永宁,主编.现代食品安全科学[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [2] WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives. Fifty-ninth meeting, Geneva, 4-13 June 2002. [DB/OL][2008-1-10]. <http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/59corr.pdf>.
- [3] GB/T 5009.133—2003. 食品卫生检验方法[S].
- [4] 胡平,任永红.离子色谱法测定消毒牛奶中的硝酸盐[J].色谱,2006,24(1):106.
- [5] 施家威,颜金良.离子色谱法快速测定食品中的硝酸盐、亚硝酸盐[J].中国卫生检验杂志,2005,15(6):728-729.
- [6] YU B S, CHEN P, NIE L H, et al. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in saliva and foodstuffs by non-suppressed ion chromatography with bulk acoustic wave detector[J]. Anal Sci, 2001, 17(4):495-498.
- [7] MCMULLEN S E, CASANOVA J A, GROSS L K, et al. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in vegetable and fruit baby foods [J]. J AOAC Int., 2005, 88(6):1793-1796.
- [8] European Committee for standardization. Foodstuff's determination of nitrate and/or nitrite content-Part 4: Ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products (EN 12014-4:2005). Brussels, Belgium. [S].
- [9] 牟世芬,刘克纳,丁晓静.离子色谱方法及应用[M].2版.北京:化学工业出版社,2005.

[收稿日期:2008-04-18]

中图分类号:R15;O657.75 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2008)04-0294-04

消息(一)

克朗斯推出 PET 瓶回收再利用新技术

德国克朗斯公司成功地开发出了国际领先的 PET 瓶回收再利用技术,该技术将被压扁的 PET 瓶切割成片,再经初筛、去除金属、分离标签和瓶盖、分离杂质、深度清洗等步骤后,加入一定比例的新 PET 材料与之融合,制成食品级可用的饮料包装材料。此项技术安全实用,节能环保,经济效益明显,PET 饮料瓶的年加工量最高达15 000吨,该技术具有运行成本低、加工温度低、可视操控等优点。

由该回收再利用技术制造的 PET 瓶,经过权威机构的微生物检测,化学成分检验,挑战试验测试,符合 FAO 食品级标准的要求,非常适用于食品和饮料工业,而且其成本比一般的新材料低 20%~30%。目前克朗斯公司的中试工厂已经启动运行,小规模工厂于 2008 年 7 月在孟加拉国正式投产使用。克朗斯公司也可针对来自不同国家的废旧 PET 瓶做相关的生产试验,并做相应的微生物检验和化学测试。