

乳粉检测中亚硝酸盐提取方法的优化

李永娟, 黄珂, 张晶, 孙文毅*

(河北省食品安全重点实验室, 国家市场监管重点实验室(特殊食品监管技术),
特殊食品安全与健康河北省工程研究中心, 河北省食品检验研究院, 河北 石家庄 050227)

摘要: 优化一种乳粉中亚硝酸盐的提取方法。采用加热提取法、超声提取法及超声脱色法3种提取方法对不同放置时间实验用水的空白实验吸光度进行测定, 分析3种提取方法滤液颜色及加标回收率, 采用超声脱色法测定质控样品中的亚硝酸盐含量和方法检出限。结果表明: 不同放置时间的实验用水不会对空白实验吸光度产生影响; 超声脱色法回收率均可达90%以上, 相对标准偏差小于10%; 质控样品检测结果在特性值区间内, 检出限为0.4 mg/kg, 符合实验室质控要求。超声脱色法检测结果精确度和准确度良好, 建议国标方法中增加对有色物质的脱色处理。

关键词: 乳粉; 亚硝酸盐; 活性炭; 脱色

Optimization of Extraction Method for the Analysis of Nitrite in Milk Powder

LI Yongjuan, HUANG Ke, ZHANG Jing, SUN Wenyi*

(Hebei Food Safety Key Laboratory, Key Laboratory of Special Food Supervision Technology for State Market Regulation, Hebei Engineering Research Center for Special Food Safety and Health, Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050227, China)

Abstract: This study aimed to select and optimize a sample extraction method for the determination of nitrite from milk powder. The absorbance of the experimental water stored for different periods of time was detected by three extraction methods, heat extraction, ultrasonic extraction and ultrasonic decolorization. The color and spiked recoveries of the filtrates from the three methods were evaluated. The nitrite content of quality control samples was determined by ultrasonic decolorization and the limit of detection (LOD) of this method was investigated. The results indicated that storage time did not affect the absorbance of the experimental water. The recoveries of the ultrasonic decolorization method were over 90%, with relative standard deviations (RSD) less than 10%. and the measured results of the quality control samples were within the characteristic value range with LOD of 0.4 mg/kg, which meets the laboratory quality control requirements. The ultrasonic decolorization method has good accuracy and accuracy, and it is recommended that it be used for the decolorization of colored substances in the national standard method.

Keywords: milk powder; nitrite; activated carbon; decolorization

DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20230423-021

中图分类号: TS252.7

文献标志码: A

文章编号: 1671-5187(2023)03-0023-04

引文格式:

李永娟, 黄珂, 张晶, 等. 乳粉检测中亚硝酸盐提取方法的优化[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(3): 23-26. DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20230423-021. <http://www.dairyst.net.cn>

LI Yongjuan, HUANG Ke, ZHANG Jing, et al. Optimization of extraction method for the analysis of nitrite in milk powder[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2023, 46(3): 23-26. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/rykxyjs1671-5187-20230423-021. <http://www.dairyst.net.cn>

婴幼儿食品一直是社会关注的热点, 乳粉作为婴幼儿的主要食物来源, 其安全性备受关注, 亚硝酸盐是该类食品的重要污染物指标之一^[1]。较低水

平的亚硝酸盐就会对新生婴儿产生影响, 高水平的亚硝酸盐则会导致高铁血红蛋白症, 严重时甚至导致死亡^[2-3]。

收稿日期: 2023-04-23

基金项目: 河北省市场监督管理局能力提升项目(2021JG46)

第一作者简介: 李永娟(1989—)(ORCID: 0009-0007-9548-9716), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。

E-mail: 715877473@qq.com

通信作者简介: 孙文毅(1975—)(ORCID: 0000-0002-2214-9735), 男, 高级工程师, 学士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: sunwenyi@nepp.com.cn

目前,亚硝酸盐的检测方法主要有光谱法、色谱法、电化学分析法等^[4-7],亚硝酸盐的提取效果直接影响检测结果。本实验室常采用GB 5009.33—2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》^[8](以下简称国标)中的分光光度法测定乳粉的亚硝酸盐含量。前期实验过程中发现按照国标中的提取方法进行乳粉样品亚硝酸盐测定时存在空白实验吸光度较大、回收率低、精密度差的问题。国标方法中沸水浴加热过程乳粉会形成黏糊状,导致亚硝酸盐提取不充分,从而影响检测结果平行性。核黄素和胡萝卜素等会使乳粉呈现淡黄色,导致乳粉经提取过滤后滤液略带黄色,检测过程中亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后,再与加入的盐酸萘乙二胺偶合产生紫红色的染料,推测乳粉样品滤液的颜色影响了显色效果,导致回收率较低。为了解决上述问题,本研究主要通过比较不同放置时间的实验用水对空白实验的影响以及优化提取方法改善国标方法中因加热产生的提取不充分导致的平行性差的问题,选择合适的脱色剂吸附乳粉中的色素得到无色透明溶液,探索适用于乳粉中亚硝酸盐的测定方法,以期为乳粉中亚硝酸盐的准确测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品:超市随机购买乳粉样品4份,分别命名为A、B、C、D;过期乳粉样品2份,分别命名为E、F。

亚硝酸钠(基准试剂)、盐酸萘乙二胺(分析纯)、活性炭(分析纯) 天津科密欧化学试剂有限公司;对氨基苯磺酸(分析纯) 天津市光复精细化工研究所。

1.2 仪器与设备

UV-2450紫外-可见光双光分光光度计 日本岛津仪器有限公司;AB204电子分析天平 瑞士梅特勒-托利多公司;KX-1990QT超声波清洗器 北京科玺时代科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

亚硝酸钠标准溶液(200 μg/mL,以亚硝酸钠计):准确称取0.100 0 g于115 °C干燥至恒质量的亚硝酸钠基准试剂,加水溶解,移入500 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀。

亚硝酸钠标准使用液(5.0 μg/mL):临用前,吸取2.50 mL亚硝酸钠标准溶液,置于100 mL容量瓶中,加水稀释至刻度。

1.3.2 加热提取法

称取试样10 g(精确至0.001 g),置于150 mL具塞

锥形瓶中,加12.5 mL 50 g/L饱和硼砂溶液,加入70 °C左右的水约150 mL,混匀,于沸水浴中加热15 min,取出置冷水浴中冷却,并放置至室温。定量转移上述提取液至200 mL容量瓶中,加入5 mL 106 g/L亚铁氰化钾溶液,摇匀,再加入5 mL 220 g/L乙酸锌溶液,以沉淀蛋白质。加水至刻度,摇匀,放置30 min,除去上层脂肪,上清液用滤纸过滤,弃去初滤液30 mL,滤液备用。

1.3.3 超声提取法

称取试样10 g(精确至0.001 g),置于150 mL具塞锥形瓶中,加12.5 mL 50 g/L饱和硼砂溶液,加入70 °C左右的水约150 mL,混匀。将溶解后的试样在室温条件下超声提取30 min,转移上述提取液至200 mL容量瓶中。以下操作同加热提取法。

1.3.4 超声脱色法

称取试样10 g(精确至0.001 g)、活性炭1 g置于150 mL具塞锥形瓶中,加入12.5 mL 50 g/L饱和硼砂溶液,加入70 °C左右的水约150 mL,混匀。将上述溶液在室温条件下超声脱色提取30 min,定量转移上述提取液至200 mL容量瓶中。以下操作同加热提取法。

1.3.5 亚硝酸盐的测定

分别吸取40.0 mL上述滤液于50 mL带塞比色管中,另吸取0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.50、2.00、2.50 mL亚硝酸钠标准使用液(相当于0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.5、10.0、12.5 μg亚硝酸钠),分别置于50 mL带塞比色管中。于标准管及试样管中分别加入2 mL 4 g/L对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置3~5 min后各加入1 mL 2 g/L盐酸萘乙二胺溶液,加水至刻度,混匀,静置15 min,用1 cm比色杯,以零管调节零点,于538 nm波长处测定吸光度,绘制标准曲线。根据标准曲线查得相应的质量,样品中亚硝酸盐的含量按式(1)计算。

$$X = \frac{m_0 \times V_0}{m \times V} \quad (1)$$

式中: X 为试样中亚硝酸钠的含量/(mg/kg); m_0 为测定用样液中亚硝酸钠的质量/μg; V_0 为试样处理液总体积/mL; m 为试样质量/g; V 为测定用样液体积/mL。

1.3.6 空白实验吸光度的测定

取实验用水放置0、3、5、7、14 d,分别采用加热提取法、超声提取法及超声脱色法3种提取方法做空白实验,测定空白实验的吸光度大小。

1.3.7 超声脱色法方法检出限的测定

采用超声脱色法进行20次空白实验,方法检出限按式(2)计算。

$$C_L = \frac{3S_b}{b} \quad (2)$$

式中: C_L 为方法的检出限/(mg/kg); S_b 为空白值标准偏差/(mg/kg); b 为标准曲线的斜率。

1.4 数据处理

采用Excel软件进行数据分析并作图。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐标准工作曲线

参照国标方法进行标准曲线的绘制, 所得标准曲线方程为 $y=0.0146x+0.0010$ ($R^2=0.9999$), 符合实验要求。

2.2 不同放置时间实验用水对空白实验吸光度的影响

由图1可知, 放置不同时间的实验用水及采用不同的提取方法对空白实验吸光度大小的影响不显著。吸光度为0.015~0.018时, 相当于亚硝酸钠的含量为0.958~1.164 μg , 在测定乳粉样品时亚硝酸钠基本未检出, 空白对其影响就比较大^[9]。在赵秋伶等^[10]的研究中也出现空白实验吸光度高于样品的现象, 用超纯水未能解决。对“千滚水”和“隔夜水”中亚硝酸盐含量进行测定时发现, 反复煮沸或长时间放置水中的亚硝酸盐含量会轻微上升^[11]。如果放置保存不当, 水中的细菌会将硝酸盐转化为亚硝酸盐^[12], 当长时间加热时水分蒸发, 会导致亚硝酸盐的含量升高。为防止放置过程中引起的水质变化, 建议使用新鲜实验用水。

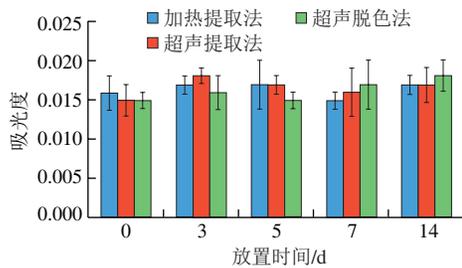


图1 不同放置时间实验用水空白实验吸光度

Fig. 1 Absorbance of experimental water at different storage times

2.3 不同提取方法滤液颜色的比较

分别采用3种方法对乳粉中亚硝酸盐进行提取, 观察其所得滤液颜色。经加热提取或超声提取后滤液有明显的黄色, 经活性炭脱色提取后滤液呈无色状态。活性炭属于非极性吸附剂, 表面具有很多微孔, 可以吸附样品中的色素^[13], 在测定深色食品中亚硝酸盐含量时加入活性炭可以有效消除色素的干扰^[14]。前2种方法滤液明显偏黄, 添加活性炭后滤液为无色透明状, 说明活性炭可以有效起到脱除乳粉滤液颜色的效果。

2.4 不同提取方法回收率的比较

对6种乳粉分别采用3种方法测定其含量, 同时进行加标回收率实验, 加标量为5.00 mg/kg, 比较不同提取方法对结果的影响。

由表1可知, 按照国标方法(加热提取法)检测的加标回收率结果低于其他2种方法。任雪梅等^[15]在对婴幼儿谷类辅助食品亚硝酸盐的研究中发现, 按照国标法处理会产生淀粉糊化, 导致黏度增大, 包裹住亚硝酸盐而降低提取效果, 本研究结果与之一致。同瑞婷等^[16]采用室温超声法代替国标中加热煮沸提取, 提高了米粉中亚硝酸盐的检测效率和准确度。超声提取法可以提高乳粉中亚硝酸盐的回收率, 尚未达到GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[17]中的要求。采用物理超声方式提取可有效提高回收效果^[18-19], 但并未达到完全理想的状态, 推测可能由于乳粉基质较复杂, 过滤后滤液偏黄影响了显色结果, 可以通过降低称样量^[20]、增加沉淀剂用量^[21]或者选取合适的脱色剂^[22]除去滤液的颜色。

表1 不同提取方法回收率比较

Table 1 Comparison of recoveries of different extraction methods

样品编号	加热提取法		超声提取法		超声脱色法	
	含量/(mg/kg)	加标回收率/%	含量/(mg/kg)	加标回收率/%	含量/(mg/kg)	加标回收率/%
A	未检出	32.50	未检出	72.45	未检出	94.05
B	未检出	35.30	未检出	76.15	未检出	91.50
C	未检出	39.15	未检出	77.25	未检出	93.80
D	未检出	41.05	未检出	80.05	未检出	95.70
E	3.02	40.05	4.07	75.10	4.91	90.05
F	3.32	32.00	4.25	79.15	5.02	92.10

注: 检出限0.5 mg/kg。

利用分光光度法测定吸光度时, 对于有颜色或者浑浊的样液必须先进行脱色和澄清处理, 否则将会影响实验结果^[23]。丁小礼等^[24]对深色肉制品中亚硝酸盐含量进行测定时, 提出预处理后有颜色的样品必须进行脱色处理。国标第三法测定蔬菜中硝酸盐时, 用活性炭作为脱色剂去除色素的干扰。测定调味酱中亚硝酸盐时, 陈银珊^[25]在国家标准方法的基础上, 加入活性炭消除色素影响后检测结果更加精确。研究表明, 活性炭的用量、脱色温度、脱色时间^[26-28]等都会影响活性炭的吸附效果。本研究中采用室温超声提取乳粉中的亚硝酸盐并经1 g活性炭脱色30 min后, 回收率较前2种方法明显提高, 与亢美娟等^[29]研究结果一致。同样, 在对酱腌菜中亚硝酸盐的测定中, 活性炭消除了黄色色素的干扰, 检出率提高2倍左右^[30]。

2.5 超声脱色法准确度的分析

选取乳粉样品E, 采用超声提取并添加1 g活性炭脱色法测定加标回收率6次, 研究其回收效果及精密性。由表2可知, 对乳粉样品E采用优化后的方法处理, 不同加标量水平的回收率均在90%以上, 符合实验室质量控制要求^[16]。

表2 超声脱色法准确度测定结果

Table 2 Accuracy of ultrasonic decolorization method

样品 编号	加标量/ (mg/kg)	加标回收率/%						平均值/%	相对标准 偏差/%
		1	2	3	4	5	6		
E	2.50	94.15	92.35	92.40	92.35	94.45	96.05	93.63	1.52
	5.00	97.75	91.46	96.50	90.97	92.34	97.64	94.44	3.19
	10.00	98.85	99.10	97.34	98.41	96.65	95.16	97.59	1.51

2.6 乳粉中亚硝酸盐定量分析质控样品的测定

选取中国检验检疫科学研究院测试评价中心乳粉中亚硝酸盐定量分析质控样品, 采用超声脱色提取法测定6次。质控样品的特性值为29.82 mg/kg, 特性值区间为21.30~38.34 mg/kg。由表3可知, 按照优化后的实验方法对乳粉质控样品进行测定, 结果均在特性值附近, 6组数据的相对标准偏差为0.45%, 表明该方法适用于乳粉中亚硝酸盐含量的测定, 具有较高的准确性和精确性。

表3 乳粉中亚硝酸盐定量分析质控样品的测定结果

Table 3 Measured results of quality control samples for analysis of nitrite in milk powder

样品	测定值/(mg/kg)						相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5	6	
QC-MK-702	29.05	29.82	30.36	29.30	29.54	30.05	0.45

2.7 超声脱色法的方法检出限

按照GB/T 27404—2008^[17]的要求, 测定超声脱色法的方法检出限。测定结果如下: 20次空白值的平均值为0.942 mg/kg, 20次空白值的标准偏差 $S_b=0.00193$ mg/kg, 标准曲线斜率 $b=0.0146$, 方法检出限 $C_L=0.4$ mg/kg, 小于GB 5009.33—2016分光光度法中的检出限(0.5 mg/kg)。

3 结论

针对乳粉中亚硝酸盐测定时空白实验吸光度、滤液颜色及回收率等问题, 优化了一种提高其提取效果的方法。本实验室贮存条件下, 不同存放时间的实验用水对空白实验吸光度影响不大。向称量后的乳粉样品中加入1 g活性炭, 经室温超声提取30 min即可吸附乳粉中的色素, 消除滤液颜色的干扰, 使测定结果准确、可靠。本方法采用室温超声提取法代替国标方法中沸水浴加热方法, 过程简单、操作性强。活性炭用于乳粉样品的脱色处理是可行的, 为乳粉中亚硝酸盐的测定提供了一种更加准确、可靠的提取方法。国标测定食品中亚硝酸盐的含量未提及色素的消除, 建议国标方法中增加对有色物质的脱色处理。

参考文献:

[1] 陈梦婷, 罗秉俊, 杨芳芳. 食品行业控制硝酸盐及亚硝酸盐含量的重要性及相关研究[J]. 广东化工, 2022, 49(8): 72-73; 105.
 [2] GAPPER L W, FONG B Y, OTTER D E, et al. Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(10): 881-887.

[3] 武伦伟, 胡雪, 段国霞, 等. 离子色谱法测定乳制品中亚硝酸盐和硝酸盐含量的方法改进[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(6): 20-25. DOI:10.15922/j.cnki.jdst.2020.06.004.
 [4] 周毅文, 黄世杰, 吴俊星, 等. 食品中亚硝酸盐的测定方法研究进展[J]. 广州化工, 2019, 47(20): 29-31.
 [5] 陈俊秀, 梁孟军, 张瑞雨, 等. 两种国标方法对奶粉中亚硝酸盐的测定与分析[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(23): 182-185. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2019.23.045.
 [6] 姜宏, 于维森. 气相色谱质谱联用仪(GC-MS)测定乳粉中的亚硝酸盐[J]. 中国公共卫生, 2001(3): 94.
 [7] WANG Qihua, YU Liju, LIU Yang, et al. Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: a review[J]. Talanta, 2016, 165: 709-720.
 [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定: GB 5009.33—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
 [9] 李梅, 康峻巍, 李德, 等. 乳样亚硝酸盐空白值偏高原因分析及解决措施[J]. 轻工科技, 2013, 29(4): 118-119.
 [10] 赵秋伶, 程良义, 张振宇. 乳粉硝酸盐和亚硝酸盐测定的影响因素探讨[J]. 应用化工, 2011, 40(8): 1398-1400. DOI:10.16581/j.cnki.issn1671-3206.2011.08.012.
 [11] 胡文敏, 蔡展帆, 梁淑霞. “干滚水”和“隔夜水”中亚硝酸盐含量[J]. 现代食品, 2021(12): 140-144; 149. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2021.12.039.
 [12] 赵喜华, 崔瑞霞, 栗焕, 等. 不同食品在不同放置时间周期后亚硝酸盐含量的变化[J]. 现代食品, 2022, 28(5): 164-167. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2022.05.044.
 [13] OZSOY H D, VAN LEEUWEN J. Removal of color from fruit candy waste by activated carbon adsorption[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 101(1): 106-112.
 [14] 宋鸽, 何娇, 李慧娟, 等. 亚硝酸盐含量测定过程中的脱色条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(24): 6541-6545.
 [15] 任雪梅, 田洪芸, 徐立清, 等. 婴幼儿谷类辅助食品中亚硝酸盐测定方法的改进[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5324-5328.
 [16] 同瑞婷, 宋悦, 兰萌. 婴幼儿米粉类辅食中亚硝酸盐测定方法的优化[J]. 农产品加工, 2021(13): 70-71. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2021.07.015.
 [17] 中华人民共和国浙江出入境检验检疫局, 中国合格评定国家认可中心. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
 [18] 许彩霞, 许美珠, 吴芸芸, 等. 婴幼儿谷物辅助食品中亚硝酸盐前处理方法的改进研究[J]. 福建分析测试, 2022, 31(4): 24-26.
 [19] 刘丰奎, 汪雨, 钱春燕, 等. 超声辅助提取-气相分子吸收光谱法测定火腿中亚硝酸盐[J]. 分析科学学报, 2022, 38(1): 89-93. DOI:10.13526/j.issn.1006-6144.2022.01.016.
 [20] 屠生辉, 姜顾倩妮, 刘镇, 等. 提高分光光度法测定乳粉亚硝酸盐回收率的研究[J]. 食品安全导刊, 2023(4): 87-89, 93. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2023.04.046.
 [21] 李怡, 王兴婷, 高芸芸, 等. 增加沉淀剂用量对食品亚硝酸盐检测的影响[J]. 中国食品工业, 2021(2): 67-70.
 [22] 唐成霞, 徐连伟. 活性炭脱色法测定蔬菜中亚硝酸盐含量的研究[J]. 园艺与种苗, 2012, 7(1): 39-41.
 [23] 张宓灵. 分光光度法检测乳制品中亚硝酸盐的影响因素[J]. 中国标准化, 2021(12): 217-220.
 [24] 丁小礼, 明朋, 曾观红. 分光光度法测定深色肉制品中亚硝酸盐含量[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2016(2): 10-12.
 [25] 陈银珊. 活性炭脱色测定调味酱中亚硝酸盐方法探讨[J]. 食品安全导刊, 2021(12): 91-92; 98. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2021.12.053.
 [26] 莎娜, 王国泽. 活性炭对甘薯果脯废糖液的脱色效果研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(36): 8145-8146. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2009.36.041.
 [27] 黄占权, 冯一兵, 穆莹. 蔬菜罐头中亚硝酸盐测定影响因素研究[J]. 黑龙江农业科学, 2009(2): 129-132.
 [28] 周文斌. 泡菜中亚硝酸盐测定方法研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 241-243.
 [29] 亢美娟, 黄思棋, 刘芳玉, 等. 婴幼儿配方乳粉中亚硝酸盐检测方法的优化[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(8): 53-57. DOI:10.19827/j.issn1001-2230.2022.08.010.
 [30] 李春松, 黄秀彦, 樊宏, 等. 活性炭脱色: 分光光度法测定酱腌菜中的亚硝酸盐[J]. 现代食品, 2020(6): 160-162. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2020.06.054.