

生乳中亚硝酸盐回收率检测分析研究

杨颖*, 朱磊, 富莉静, 魏金娥, 张国霞, 陈亚双, 李慧, 孙明, 于晓明,
沈永华, 王艳芹, 张雪梅, 张慧萍, 刘伯扬, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘要: **目的** 改进国标中因生乳本底对回收率结果的影响。**方法** 依据 GB 5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中第二分光光度法, 在加标回收实验中将生乳本底进行不同倍数稀释, 确定回收率最佳时的稀释倍数。**结果** 对生乳本底进行稀释后, 确定 10 倍稀释后加标回收率全部符合要求, 最大相对标准偏差为 9.118%。检测实际样品时, 本方法与国标检测结果经无显著性差异($P=0.10$)。**结论** 改进后的方法操作简单, 回收率高、准确性高, 可用于牛乳中亚硝酸盐的检测。

关键词: 生乳; 亚硝酸盐; 检出限; 加标回收率

Detection and analysis of nitrite recovery in raw milk

YANG Ying*, ZHU Lei, FU Li-Jing, WEI Jin-E, ZHANG Guo-Xia, CHEN Ya-Shuang, LI Hui,
SUN Ming, YU Xiao-Ming, SHEN Yong-Hua, WANG Yan-Qin, ZHANG Xue-Mei,
ZHANG Hui-Ping, LIU Bo-Yang, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Group (Group) Limited by Share Ltd, Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To improve the influence of raw milk background on the recovery rate in the national standard. **Methods** According to GB 5009.33-2016 *Determination of nitrite and nitrate in food* in the second method spectrophotometry, the raw milk background was diluted by different multiples in the standard recovery experiment to determine the dilution ratio when the recovery rate was the best. **Results** After 10 times dilution, the standard recovery rates could meet the requirements, and the maximum relative standard deviation was 9.118%. When the actual samples were tested, there was no significant difference between this method and the national standard test results ($P=0.10$). **Conclusion** The improved method has the advantages of simple operation, high recovery and accuracy, and can be used for the determination of nitrite in milk.

KEY WORDS: raw milk; nitrite; limit of detection; recovery rate

1 引言

生乳中含有蛋白质、脂肪、乳糖、多种维生素和矿物质等人体所需物质。目前牛奶已成为日常不可缺少的必需品之一。因此, 牛奶的质量直接影响到人们的身体健康。

生鲜牛乳中亚硝酸盐主要来自于饲料及饮水, 亚硝酸盐在细菌的作用下, 可转变成硝酸胺类, 人体摄入较多的亚硝酸盐会出现呕吐、腹泻、腹痛等症状^[1,2]。硝酸盐本身无毒, 但能被唾液和肠道中的细菌变为亚硝酸盐, 胃中的硝酸盐与食物中的蛋白质反应也可以生成亚硝胺基化合物, 亚硝

*通讯作者: 杨颖, 工程师, 主要研究实验室检测体系管理。E-mail: yangying@mengniu.cn

*Corresponding author: YANG Ying, Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd, R&D Building #6, Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd, Shengle Economic Zone, Heling'er, Huhhot 011517, China. E-mail: yangying@mengniu.cn

酸盐与食品中固有的胺类化合物是产生致癌物质-亚硝胺的前体物质,是潜在的致癌物质^[3],因此亚硝酸盐含量过高会引起高铁蛋白症,在国内外医学界受到专家学者的高度重视^[4]。国家标准中对乳制品中的亚硝酸盐有明确的限量规定^[5]。因此对生乳中亚硝酸盐的检测具有重要意义。

目前在生乳亚硝酸盐检测中,我国均采用 GB-5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》^[6]中第二法分光光度法检测。在新国标实施后针对于实验室方法证实过程中,该方法检出限、2 倍检出限、国家限量限处加标回收率普遍偏低,经日常多次试验均未能有效满足 GB/T-27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中附录 F 中相关要求^[7]。

本研究采用 GB-5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中第二法分光光度法检测曲线,针对不同的本底稀释倍数,降低生乳本底对回收率检测的干扰,提升回收率,从而符合试剂检测要求,为相关检测提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AL-204 电子天平(最大称量值 210 g,分度值 0.0001 g,英国梅特勒-托利多公司); 7200 分光光度计(波长范围 325~1000 nm, 波长精度 ± 2.0 nm,上海尤尼柯公司); Elix10 纯水机(法国 Millipore 公司)。

亚铁氰化钾、乙酸锌、盐酸、冰乙酸、硼酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺(分析纯,天津市福晨化学试剂厂); 水为符合 GB/T 6682-2008 规定三级水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

亚铁氰化钾溶液(106 g/L): 称取 106.0 g 亚铁氰化钾,用水溶解,并稀释至 1000 mL。

乙酸锌溶液(220 g/L): 称取 220.0 g 乙酸锌,先加 30 mL 冰乙酸溶解,用水稀释至 1000 mL。

饱和硼砂溶液(50 g/L): 称取 5.0 g 硼酸钠,溶于 100 mL 热水中,冷却后备用。

对氨基苯磺酸溶液(4 g/L): 称取 0.4 g 对氨基苯磺酸,溶于 100 mL 20%盐酸中,混匀,置棕色瓶中,避光保存。

盐酸萘乙二胺溶液(2 g/L): 称取 0.2 g 盐酸萘乙二胺,溶于 100 mL 水中,混匀,置于棕色瓶中,避光保存。

2.2.2 样品前处理

试样制备提取: 称取稀释后 90 g 样品,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加 12.5 mL 饱和硼砂溶液,加入 70 °C 左右的水约 60 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 的乙酸锌溶液,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,滤液备用。吸取 40 mL 上述滤液于 50 mL 带塞比色管中,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 的盐酸萘乙二胺溶液,加水至刻度,混匀,静置 15 min,用 1 cm 比色皿,于波长 538 nm 处测吸光度,同时做试剂空白。

2.2.3 标准曲线的制作

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。于标准管与试样管中分别加入 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,于波长 538 nm 处测吸光度,绘制标准曲线比较,同时做试剂空白^[8]。

2.2.4 加标样品的制作

(1) 生乳本底的稀释步骤

生乳 5 倍稀释: 吸取 100 mL 的生乳于 500 mL 的容量瓶中,用超纯水稀释定溶。

生乳 10 倍稀释: 吸取 50 mL 的生乳于 500 mL 的容量瓶中,用超纯水稀释定溶。

(2) 加标样配制过程

0.06 mg/kg 加标(1 倍检出限): 吸取 1.2 mL 亚硝酸溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用本底样品定容至 200 mL;

0.12 mg/kg 加标(2 倍检出限): 吸取 2.4 mL 亚硝酸溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用本底样品定容至 200 mL;

0.40 mg/kg 加标(限量限): 吸取 8 mL 亚硝酸溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用本底样品定容至 200 mL。

2.2.5 检出限和限量限

检出限: 0.06 mg/kg 要求来源于 GB 5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》^[6]。

限量限: 0.40 mg/kg 要求来源于 GB 2762-2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[9]。

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

以标准溶液浓度(X)为横坐标,以吸光度值(Y)为纵坐标,绘制标准(见图 1),相关系数 $r^2=0.9992$,线性关系良好。

3.2 回收率实验

采用生乳本底稀释倍数(未稀释、5 倍稀释、10 倍稀释)参与加标验证,共计验证 3 个加标点,分别为检出限 0.06 mg/kg、2 倍检出限 0.12 mg/kg、限量值 0.40 mg/kg,每个验证点分别检测 4 组数据,共计验证数据 36 组。未稀释验证 12 组数据,1 组符合要求,符合率为 0.83%,5 倍稀释

验证 12 组数据, 7 组符合要求, 符合率为 58.33%, 10 倍稀释验证 12 组数据, 12 组符合要求, 符合率为 100%。结果见表 1。

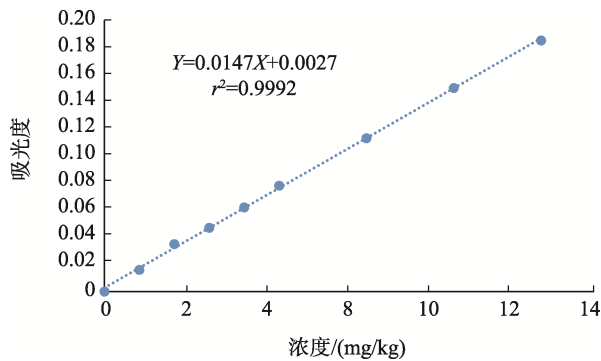


图 1 检测曲线图

Fig. 1 Standard curve

3.3 重复性实验

利用本底生乳进行样品加标, 同时使用 10 倍稀释生乳作本底进行加标实验, 对每个样品使用新方法各进行 4 次重复性检测, 以考察供加标样品检测结果的重复性。结果表明, 试样在本底 10 倍稀释后进行加标验证, 最大相对标准偏差为 9.118%, 结果表明重复性良好, 结果见表 2。

3.4 与国标法测定结果比较

选取不同浓度梯度的实际样品使用国标方法和新方法进行结果对比, 共进行了 6 组样品的检测, 其中 1 组为本底样品检测, 2 种方法结果均为未检出, 其余 5 组数据结果, 根据精密度分析结果进行相关性检测(此次使用 T 检验)。利用 Minitab 统计分析工具进行配对 T 检验分析, 结果见表 3。本检验方法的检测结果与国标检测结果一致, 经 T 检验得出 P 值为 0.10, 结果无显著性差异。

4 结论与讨论

在使用 GB 5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》第二法分光光度计法检测生乳过程中, 在检出限、2 倍检出限和 0.4mg/kg(限量限)附近加标回收率。由于生乳本底自身影响, 导致回收率不稳定不易达到要求, 采用对生乳本底稀释后进行检测^[8-16]。直接以生乳作为回收率本底添加时, 日常检测数据中符合率低于 10%, 通过对生乳进行 5 倍稀释后, 符合率可以达到 58.33%以上, 10 倍稀释符合率可以达到 100%以上。

通过实验室数据可以看出在对生乳 10 倍稀释时, 加标回收率符合率较高, 可满足 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中附录 F 中被测组分含量 < 0.1 mg/kg(回收率范围 60%~120%), 被测组分含量 0.1~1.0 mg/kg(回收率范围 80%~110%)的要求中。本方法生乳

表 1 本底回收率实验数据

Table 1 Background dilution recovery test data

稀释倍数	加标点/(mg/kg)	回收率/%	要求范围 ^[7]	是否符合
未稀释	0.06	58.60	60%~120%	否
		58.60		否
		52.30		否
		58.20		否
		57.60		否
		67.10		否
	0.12	60.20	80%~110%	否
		54.50		否
		80.60		是
		78.70		否
		79.60		否
		75.90		否
5 倍稀释	0.06	61.20	60%~120%	是
		64.90		是
		58.30		否
		61.50		是
		73.40		否
		76.50		否
	0.12	77.10	80%~110%	否
		79.70		否
		86.30		是
		84.40		是
		84.40		是
		81.50		是
10 倍稀释	0.06	74.90	60%~120%	是
		71.20		是
		74.90		是
		73.80		是
		82.80		是
		82.80		是
	0.12	83.00	80%~110%	是
		82.40		是
		92.90		是
		89.20		是
		88.20		是
		91.10		是

表 2 重复性实验结果
Table 2 Reproducible results

样本编号	检测结果/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	标准偏差/(mg/kg)	相对标准偏差/%
10 倍稀释(本底)	未检出/未检出/未检出/未检出	/	/	/
样品 1(0.06 mg/kg 加标)	0.039/0.043/0.047/0.039	0.042	0.004	9.118
样品 2(0.12 mg/kg 加标)	0.11/0.096/0.099/0.096	0.100	0.007	6.635
样品 3(0.04 mg/kg 加标)	0.37/0.35/0.36/0.36	0.360	0.008	2.268

表 3 T 检验分析表
Table 3 Analysis table of T test result

参数	新方法	国标方法
检测量/个	5	5
标准偏差 S	0.305	0.318
T 值		0.10
P 值		0.928

本底 10 倍稀释后加标回收率符合率达 100%。同时对 10 倍稀释后的样品重复性进行验证, 最大相对标准偏差为 9.118%, 符合要求。

本研究对生乳检测亚硝酸本底稀释后加标回收率展开优化, 方法操作简单, 回收符合率及重现性较好, 能够为生乳检测亚硝酸盐验证回收率提供参考依据。

参考文献

- 王瑞珍. 原料牛乳中亚硝酸盐的几种检测方法[J]. 现代畜牧科技, 2011, (11): 147-148.
Wang RZ. Several methods for determination of nitrite in raw milk [J]. Mod Anim Husband Technol, 2011, (11): 147-148.
- 谢薇, 陈秋娟, 何星存. 腌菜中亚硝酸盐含量的测定[J]. 中国调味品, 2017, 8: 42-48.
Xie W, Chen QJ, He XC. Determination of nitrite content in pickles [J]. China Cond, 2017, 8: 42-48.
- 杜晓旭, 徐艳伟, 康俊伟, 等. 牛乳及乳制品中亚硝酸盐快速定性检测方法[J]. 轻工科技, 2013, (2): 5-6.
Du XX, Xu YW, Kang JW, et al. Rapid qualitative determination of nitrite in milk and dairy [J]. Guangxi J Light Ind, 2013, (2): 5-6.
- 刘琴, 谢丽韬, 成玉梅, 等. 全自动流动注射分析法检测生乳中亚硝酸盐的检出限测定[J]. 中国奶牛, 2012, (3): 35-36.
Liu Q, Xie LT, Cheng YM, et al. Determination of nitrite in fresh milk by automated flow injection analysis [J]. Chin Dairy Catt, 2012, (3): 35-36.
- 张淑伟. 乳制品中亚硝酸盐测定的实验室质量控制[J]. 济宁学院学报, 2007, 28(3): 20-21.
Zhang SW. Laboratory quality control of nitrite determination in dairy products [J]. J Jining Univ, 2007, 28(3): 20-21.
- GB 5009.33-2016 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S].
GB 5009.33-2016 Determination of nitrite and nitrate in foods [S].
- GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
GB/T 27404-2008 Laboratory quality control standard food and chemical testing [S].
- 陈蔓. 食品中亚硝酸盐的提取优化及含量检测[D]. 荆州: 长江大学, 2013.
Chen M. Extraction optimization and content determination of nitrite in foods [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2013.
- GB 2762-2017 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
GB 2762-2017 National food safety standard-Limit of pollutants in food [S].
- 韩深, 郭铮蕾, 王珮玥. 化学检测领域实验室方法的证实与应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 203-209.
Han S, Guo ZL, Wang PY. Confirmation and application of laboratory methods in the field of chemical detection [J]. Food Ferm Ind, 2016, 42(5): 203-209.
- 孙帅, 彭毅, 李攻科, 等. 衍生化/表面增强拉曼光谱快速检测乳制品中亚硝酸盐[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, (9): 3602-3607.
Sun S, Peng Y, Li GK, et al. Rapid determination of nitrite in dairy products by derivatization/surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. J Food Saf Qual, 2016, (9): 3602-3607.
- 王倩, 刘允军, 安晶晶. 亚硝酸盐对机体的作用[J]. 职业与健康, 2016, 32(23): 3297-3300.
Wang Q, Liu YJ, An JJ. The role of nitrite in the body [J]. Occup Health, 2016, 32(23): 3297-3300.
- 王京辉, 许玮仪. 中药中有害残留物痕量检测分析方法验证原则探讨[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1704-1709.

Wang JH, Xu WY. Discussion on the principles of verification for the method of trace detection and analysis of harmful residues in traditional chinese medicine [J]. J Pharm Anal, 2012, 32(9): 1704-1709.

- [14] 周科燧. 化学检测实验室的方法验证与确认[J]. 中国新技术新产品, 2014, 3: 155-156.

Zhou KW. Methodological validation and confirmation of chemical testing laboratories [J]. New Technol Prod China, 2014, 3: 155-156.

- [15] 叶行. 饮用水中硼酸盐、硝酸盐及亚硝酸盐快速检测技术及试剂盒的研制[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.

Ye X. The rapid detection technology of borate, nitrate and nitrite in drinking water and the development of reagent kit [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.

- [16] 汪菊, 付大友, 徐晨曦. 食品中亚硝酸盐快速检测方法的研究[J]. 食

品工业科技, 2015, (9): 278-281.

Wang J, Fu DY, Xu CX. Study on the rapid determination method of nitrite in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, (9): 278-281.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



杨颖, 工程师, 主要研究方向实验室检测管理。

E-mail: yangying1@mengniu.cn

“色谱技术在食品分析中的应用”专题征稿函

食品不仅是维持人体生命活动所必需的各种营养物质和能量的最主要来源, 而且以其色、香、味、质地及口感给人们以愉悦的感官享受。随着食品工业和食品科学技术的不断发展, 民众对食品品质和卫生要求也越来越高。因此, 对食品质量的控制与安全保障尤为重要, 而这在很大程度上依赖于先进的分析检测技术。色谱技术是一种分离和分析方法, 在分析化学、有机化学、生物化学等领域有着非常广泛的应用。

鉴于此, 本刊特别策划了“色谱技术在食品分析中的应用”专题, 主要围绕柱色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法、色谱与其他方法联用法等在食品检测与质量安全控制领域的应用, 阐述色谱技术的原理、特点、适用范围、优势与局限性、色谱新方法的研究, 展示色谱技术在食品安全检测中的应用实例, 本专题计划在 2019 年 4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编吴永宁研究员及编辑部全体编辑特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2019 年 2 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明专题文章)

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部