

涡旋辅助分散液液微萃取分光光度法测定 饮用水中的亚硝酸根

张凯歌*, 王云鹤, 李双莹, 郑 智

(河南师范大学环境学院, 黄淮水环境污染与防治教育部重点实验室, 河南省环境污染控制重点实验室, 河南省水处理关键技术国际联合实验室, 新乡 453007)

摘 要: **目的** 建立涡旋辅助分散液液微萃取分光光度法检测饮用水中亚硝酸根的含量。**方法** 在酸性条件下, 亚硝酸根与对硝基苯胺和二苯胺反应生成红色偶氮化合物, 通过测定红色偶氮化合物间接测定亚硝酸根的含量, 以分光光度法检测, 外标法定量。确定萃取剂种类, 利用正交试验对萃取剂的用量、酸浓度和涡旋时间进行优化。**结果** 在浓度 10~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好($r^2=0.9912$), 检出限为 2.0 $\mu\text{g/L}$, 富集倍数为 14。加标回收率为 87.3%~106.3%, 相对标准偏差 0.8%~4.4%。**结论** 该方法具有简单、快速、灵敏度高、准确性好, 适用于饮用水中亚硝酸根的日常监测。

关键词: 涡旋辅助分散液液微萃取; 分光光度法; 饮用水; 亚硝酸根

Determination of nitrite in drinking water by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with spectrophotometry

ZHANG Kai-Ge*, WANG Yun-He, LI Shuang-Ying, ZHENG Zhi

(School of Environment, Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, Key Laboratory for Yellow River and Huai River Water Environment and Pollution Control, Ministry of Education, International Joint Laboratory on Key Techniques in Water Treatment, Henan Province, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of nitrite in drinking water by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (VA-DLLME). **Methods** Under acidic conditions, nitrite reacts with p-nitroaniline and diphenylaminated to form red azo compound. Indirect determination of nitrite content by red azo compound was detected by spectrophotometry and quantified by external standard method. The type of extractant was determined, and the amount of extractant, acid concentration and vortex time were optimized by orthogonal test. **Results** The linear relationship was good in the range of 10–200 $\mu\text{g/L}$ ($r^2=0.9912$), the detection limit was 2.0 $\mu\text{g/L}$, and the enrichment factor was 14. The recoveries of spiked standards were 87.3%–106.3%, and the relative standard deviations were 0.8%–4.4%. **Conclusion** This method is simple, rapid, sensitive and accurate, which is suitable for the daily monitoring of nitrite in drinking water.

KEY WORDS: vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; spectrophotometry; drinking water; nitrite

基金项目: 国家自然科学基金项目(21605040)、国家博士后基金项目(2016M592295)、河南教育厅项目(16A610003)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (21605040), the China Postdoctoral Science Foundation (2016M592295), and the Key Scientific Research Project of Higher Education of Henan Province (16A610003)

***通讯作者:** 张凯歌, 博士, 主要研究方向为样品前处理技术。E-mail: zhangkaige@htu.edu.cn

***Corresponding author:** ZHANG Kai-Ge, Ph.D, School of Environment, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China. E-mail: zhangkaige@htu.edu.cn

1 引 言

亚硝酸根离子是生物氮循环中的重要中间体, 在氧气和微生物的作用下, 通过生物脱氮, 肥料降解, 有机物污染自净和工业废物降解等途径^[1], 广泛存在于土壤、地表水、食物中。据研究亚硝酸盐本身是一种剧毒物质, 同时还是一种致癌物质, 已证实食道癌与患者摄入的亚硝酸盐量呈正相关性。亚硝胺能够透过胎盘进入胎儿体内, 对胎儿有致畸作用^[2]。亚硝酸盐是肉品加工常用的添加剂, 具有抑制肉毒梭状芽孢杆菌、使肉品发色及增强风味的作用^[3], 目前尚没有理想的替代物。US EPA^[4]规定饮用水中 NO₂⁻的最大允许含量为 1.0 mg/L。因此建立简单、快速检测亚硝酸盐的方法具有重要意义。

亚硝酸根的测定方法主要有紫外分光光度法^[5]、电化学法^[6]、荧光光度法^[7]、液相色谱法^[8]、离子色谱法^[9]等。其中紫外分光光度法具有仪器简单价格较低、操作方便、测定速度快、准确度高优点, 适用于生产单位常规测定^[10], 特别适用于欠发达地区。由于样品基质复杂和样品中待测组分含量较低, 检测前需要对样品中的待测组分进行分离和富集。

分散液液微萃取^[11]是一种简单快速、低成本、富集倍数高的样品前处理方法, 一直深受研究者们的关注。在分散液液微萃取过程, 分散剂的作用是加速萃取剂和样品溶液形成乳浊液, 增大萃取剂和分析物的接触面积, 减少萃取时间。由于分散剂是亲水的, 分散剂的使用会降低目标物在萃取剂中的分配系数, 同时也会降低萃取效率。鉴于此, 可以用超声替代分散剂, 促进萃取过程的快速进行, 发展了超声辅助分散液液微萃取^[12,13]。张宪臣等^[12]用超声取代分散剂, 建立了超声辅助分散液液微萃取法结合高效液相色谱法测定护肤水中的 9 种荧光增白剂。与超声相比, 涡旋成本更低、分散作用更均匀并且能量相对温和, 不会导致目标物分解^[14]。因此, 我们采用涡旋辅助分散液液微萃取法对目标分析物进行分离和富集。

本研究基于在酸性介质中, 亚硝酸根与对硝基苯胺和二苯胺反应生成红色偶氮化合物, 采用涡旋辅助分散液液微萃取对红色偶氮化合物进行分离和富集, 结合分光光度法检测红色偶氮化合物的含量, 从而间接测定亚硝酸根离子, 通过正交试验的方法对影响萃取效率的因素进行优化, 建立涡旋辅助分散液液微萃取分光光度法测定饮用水中亚硝酸根新方法, 为相关研究提供参考。

2 材料和方法

2.1 材料、仪器与试剂

实际水样为自来水、地下水和湖水, 取自新乡市。分析测试之前, 所有水样均通过 0.45 μm 滤膜过滤备用。

T6 新世纪型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); BSA-124S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); MX-S 可调式混匀仪(美国赛洛捷克); 80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂); 50 μL 微量进样器(上海源泉生物科技有限公司); 石英比色皿(宜兴市谱析光学元件有限公司)。

亚硝酸钠、四氯化碳、无水乙醇(分析纯, 天津市德恩化学试剂有限公司); 对硝基苯胺、氯苯、二苯胺(分析纯, 阿拉丁试剂有限公司); 硫酸(分析纯, 洛阳市化学试剂厂); 氯化钠(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 三氯甲烷(分析纯, 洛阳昊华化学试剂有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为去离子水。

2.2 样品前处理和实验方法

2.2.1 溶液配制

NO₂⁻标准溶液: 用 NaNO₂ 配制成 10 mg/L 的 NO₂⁻储备溶液(以 NO₂⁻浓度计), 在实验前将储备液稀释至 50 μg/L 使用。

0.5%(m:V)对硝基苯胺乙醇溶液: 称取 0.05 g 对硝基苯胺, 用无水乙醇溶解定容至 10 mL。

0.4%(m:V)二苯胺乙醇溶液: 称取 0.04 g 二苯胺, 用无水乙醇溶解定容至 10 mL。

2.2.2 萃取过程

用移液管量取 5.0 mL 水样或 50 μg/L 的亚硝酸根溶液于 10 mL 玻璃离心管中, 加入 0.3 mL 硫酸(2 mol/L)后摇匀, 再依次加入 50 μL 对硝基苯胺乙醇溶液(0.5%, m:V)和 110 μL 二苯胺乙醇溶液(0.4%, m:V), 混匀后静置 10 min。然后加入 100 μL 氯苯, 用混匀仪涡旋 60 s, 管内形成均匀的乳浊液。随后将玻璃离心管置于离心机中以 4000 r/min 的转速离心 4 min, 管内溶液分层, 下层为有机相。用 50 μL 微量进样器抽取有机相, 并加氯苯稀释至 350 μL, 置于微量比色皿中, 测量吸光度。

2.2.3 正交试验

按照 L₉(3⁴)正交试验因素与水平(表 1), 根据显著性和影响程度, 确定合适的萃取条件。

表 1 正交试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental design

因素	A 萃取剂用量/μL	B 酸浓度/(mol/L)	C 涡旋时间/s
1	80	1	90
2	100	2	120
3	120	4	150

2.3 萃取回收率

本实验用萃取回收率(extraction recovery, ER)来评估萃取效率。萃取回收率为萃取后萃取剂与萃取前初始样品

溶液中 NO₂⁻ 的质量之比。萃取回收率的计算公式如下:

$$ER\% = C_1 \times \frac{V_1}{C_0 \times V_0} \times 100\%$$

其中 C₁ 和 C₀ 分别表示萃取稀释后有机相和萃取前水相中的亚硝酸根浓度, μg/L; V₁ 和 V₀ 分别表示萃取稀释后有机相和萃取前水相的体积, mL。

3 结果和讨论

3.1 萃取剂的选择

萃取剂的选择是萃取实验的关键因素, 本方法的萃取剂需满足以下条件: 密度比水大, 对分析物有良好的亲和性, 萃取剂和水互不相容等^[15]。因此, 我们考察了二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、氯苯 4 种萃取剂的萃取效果, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 使用氯苯作萃取剂萃取时, 萃取效果明显优于其他 3 种萃取剂, 且萃取效率接近 100%, 故选择氯苯作为萃取剂。

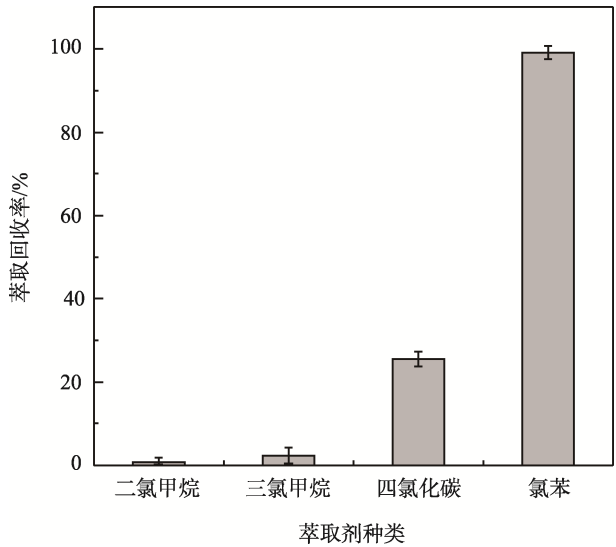


图 1 萃取剂种类优化(n=3)

Fig.1 Optimization of the type of extraction solvent (n=3)

3.2 正交试验

由表 2 和表 3 可知, 当以萃取回收率为考察指标时, 各因素对萃取回收率的影响大小顺序为 B>C>A, 即酸浓度>涡旋时间>萃取剂用量, 最佳组合为 A₂B₂C₂。根据表 4 方差分析结果可知, 涡旋时间和萃取剂用量对指标萃取效率均不显著。综合考虑, 最终选择组合为 A₂B₂C₂, 即萃取剂用量为 100 μL, 酸浓度为 2 mol/L, 涡旋时间为 120 s 时可获得较好的萃取回收率。

3.3 方法评价

在优化的萃取条件下, 配制一系列不同浓度的亚硝酸根水溶液, 按照 2.2.2 所述涡旋辅助-液液微萃取分光光

度法对其进行分离, 富集和测定。结果亚硝酸根在 10~200 μg/L 浓度范围内呈现良好的线性关系, 相关系数为 0.9912, 检出限(limit of detection, LOD, S/N=3)为 2.0 μg/L, 定量限(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)为 10 μg/L。日内精密度和日间精密度的对加标浓度为 100 μg/L 水样在一天内平行测定 5 次以及连续 5 d 每天测定 1 次所得结果的相对标准偏差, 所得日间和日内相对标准偏差分别为 3.5%和 5.5%。富集倍数为 14, 高于或相当于文献报道的 5 倍^[16]和 25 倍^[17]。

表 2 正交试验设计与结果
Table 2 Design and result of orthogonal experiment

列号	A 萃取剂用量/μL	B 酸浓度/(mol/L)	C 涡旋时间/s	萃取回收率/%
1	80	1	90	48
2	80	2	120	90
3	80	4	150	54
4	100	1	120	53
5	100	2	150	100
6	100	4	90	54
7	120	1	150	53
8	120	2	90	88
9	120	4	120	60

表 3 正交试验设计极差分析
Table 3 Range analysis of orthogonal experiment

水平	A /μL	B /(mol/L)	C /s
K ₁	64.000	51.333	63.333
K ₂	69.000	92.667	65.667
K ₃	67.000	56.000	65.000
R	5.000	41.334	5.667

表 4 正交试验方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F _{0.05}
A/μL	38.000	2	1.163	19.000
B/(mol/L)	3074.667	2	94.121	19.000
C /s	52.667	2	1.612	19.000
误差	32.67	2		

3.4 实际样品分析

我们将该方法应用于地下水、自来水和湖水等饮用水中亚硝酸根的分析检测, 同时通过加标回收实验考察方法的准确性, 结果见表 5。本方法的加标回收率为

87.3%~106.3%, 相对标准偏差为 0.8%~4.4%, 结果表明实际样品的复杂基质对该方法无明显的影响。本方法适用于饮用水样中亚硝酸根的测定。

表 5 饮用水中亚硝酸根的测定(n=3)
Table 5 Determination of nitrite in drinking water (n=3)

水样	加标量/(μg/L)	检出量/(μg/L)	RSD/%	加标回收率/%
自来水	0	28.4		
	50	72.0	4.4	87.3
	100	126.0	1.0	97.6
地下水	0	N.D. ^a		
	50	53.2	4.2	106.3
	100	89.6	1.3	89.6
湖水	0	122.2		
	50	167.8	1.1	91.1
	100	227.3	0.8	105.1

注: ND 为未检出。

4 结 论

本研究建立了一种涡旋辅助-分散液液微萃取分光光度法测定饮用水中亚硝酸根的检测方法。实验通过正交试验设计对影响萃取效率的因素进行优化, 在优化的条件下, 方法线性范围为 10~200 μg/L, 相关系数 r^2 为 0.9912, 检出限为 2.0 μg/L, 定量限为 10 μg/L, 日内相对标准偏差为 3.5%, 日间相对标准偏差为 5.5%, 本方法用于饮用水样中亚硝酸根的检测分析, 加标回收率为 87.3%~106.3%。该方法简单、快速、灵敏度高、准确性好, 可用于饮用水中亚硝酸根的日常监测。

参考文献

[1] 郭玉显. 食品中亚硝酸盐的测定及环糊精的增敏作用研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2008.
Guo YX. The determination of nitrite in food and sensitivity enhancement with cyclodextrins [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2008.

[2] 郭有辉, 刘英, 胡露, 等. 婴幼儿米粉中硝酸盐及亚硝酸盐测定方法的改进[J]. 食品科技, 2018, 43(7): 332-336.
Guo YH, Liu Y, Hu L, et al. Improvement of determination of nitrate and nitrite in infant rice flour [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(7): 332-336.

[3] 郭莎莎. 抗氧化剂、加工和贮藏条件对火腿品质及亚硝酸盐转化途径的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
Guo SS. Effect of antioxidants, cooking and storage conditions on qualities and nitrite conversion pathways in ham Abstract [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017.

[4] EPA 822-R-04-005 Drinking water standards and health advisories [S].

[5] 牛桂芬, 付苗苗. 分光光度法测定香肠中亚硝酸盐含量分析[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(7): 100-101.
Niu GF, Fu MM. Determination of nitrite in sausage by spectrophotometry [J]. Food Res Dev, 2015, 36(7): 100-101.

[6] 何潇. 电化学法去除电镀废水中高浓度硝酸盐的研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2017.
He X. Research on the treatment of high-concentration nitrate in electroplating wastewater by electrochemical technology [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2017.

[7] 王秋花. 荧光光度法测定食品中亚硝酸盐的研究与应用[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2015.
Wang QH. Study and Application of Fluorimetric Determination of Nitrite in Food [D]. Beijing: China Institute of Food and Drug Test, 2015.

[8] 金世良, 段正康, 伍君, 等. 高效液相色谱法测定工业硝酸钾中痕量亚硝酸根离子[J]. 现代化工, 2014, 34(3): 158-160.
Jin SL, Duan ZK, Wu J, et al. Determination of trace amounts of nitrite ion in industrial potassium nitrate by high performance liquid chromatography [J]. Mod Chem Ind, 2014, 34(3): 158-160.

[9] 胡彩霞, 李红, 刘美霞, 等. 离子色谱法检测乳及乳制品中硝酸盐和亚硝酸盐方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2235-2240.
Hu CX, Li H, Lu MX, et al. Determination of nitrate and nitrite content in milk and dairy products using ion chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(7): 2235-2240.

[10] 卞玲娟, 何浩. 改进分光光度法测定食品中的亚硝酸盐含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1490-1493.
Bian LJ, He H. Determination of nitrite in food by an improved spectrophotometry method [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(4): 1490-1493.

[11] 曹江平, 解启龙, 周继梅, 等. 分散液液微萃取技术在食品分析中的应用进展[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 616-624.
Cao JP, Xie QL, Zhou JM, et al. Application progress of dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis [J]. J Instrum Anal, 2015, 34(5): 616-624.

[12] 张宪臣, 华洪波, 薄艳娜, 等. 超声辅助分散液液微萃取-高效液相色谱测定护肤水中 9 种荧光增白剂[J]. 分析测试学报, 2016, 35(11): 1451-1455.
Zhang XC, Hua HB, Bo YN, et al. Simultaneous determination of nine fluorescent whitening agents in skincare water using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2016, 35(11): 1451-1455.

[13] 葛晓鸣, 冯睿, 孙骥, 等. 超声辅助提取-高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析食品中水溶性铬价态[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 670-675.
Ge XM, Feng R, Sun J, et al. Analysis of water soluble chromium valence in food by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with ultrasonic assisted extraction [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(3): 670-675.

[14] Ojeda CB, Rojas FS. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME): The latest applications [J]. Chromatographia, 2018, 81(1): 89-103.

[15] Chen B, Huang YM. Dispersive liquid-phase microextraction with

solidification of floating organic droplet coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sudan dyes in foodstuffs and water samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(25): 5818–5826.

[16] Pourreza N, Fathi MR, Hatami A. Indirect cloud point extraction and spectrophotometric determination of nitrite in water and meat products [J]. *Microchem J*, 2012, 104: 22–25.

[17] Zhao J, Lu Y, Fan C, *et al.* Development of a cloud point extraction and spectrophotometry-based microplate method for the determination of nitrite in human urine and blood [J]. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 136: 802–807.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



张凯歌, 博士, 主要研究方向为样品前处理技术。

E-mail: zhangkaige@htu.edu.cn

“淀粉及其功能化修饰与深加工”专题征稿函

淀粉是自然界最丰富的物质之一, 作为重要的可再生环境友好工业原料, 主要用于食品、纺织、造纸、水产饲料、制药、化工、机械、石油、建筑等行业, 越来越受到社会的广泛重视。对淀粉的极大需求推动了淀粉工业的发展, 因此淀粉工业也被称为黄金产业, 对国民经济具有重要作用。改革开放以来, 我国淀粉及其相关制品工业迅速发展。中国淀粉工业协会联合艾格农业发布报告称, 2017 年我国淀粉产量为 2720 万吨, 创历史新高, 同比增幅 15.4%, 淀粉深加工产品产量达到 1,450 万吨。其中仅玉米淀粉产量达到 2,595 万吨, 需求量达到 2,550 万吨, 增幅为 13.8%。

淀粉工业领域基础研究、产品开发等各方面的发展, 有力地支撑了我国高速发展的淀粉及相关制品工业。近年来, 在淀粉科学与工程研究领域, 科研工作者不断与生物化工、营养学、医学、材料科学等多学科知识和生物技术、医疗技术、纳米技术等前沿高新技术交叉融合, 推动了淀粉基础研究与高新技术新的突破。

鉴于此, 本刊特别策划了“淀粉及其功能化修饰与深加工”专题, 由华南理工大学 陈玲 教授担任专题主编, 华南理工大学 李晓玺 教授担任专题副主编, 主要包括淀粉的生物合成与转化, 淀粉的结构与功能特性, 淀粉修饰、转化与应用, 淀粉现代分析检测与质量控制, 变性淀粉生产新工艺新技术等方面内容或您认为本领域有意义的问题进行论述。本专题计划在 2019 年 10 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员、专题主编陈玲教授和专题副主编李晓玺教授特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2019 年 8 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同行之间转发, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部