

婴幼儿谷类辅助食品中亚硝酸盐测定方法的改进

任雪梅, 田洪芸, 徐立清, 张海红, 王 骏*

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘 要: **目的** 改进国标方法测定婴幼儿谷类辅助食品中亚硝酸盐含量。**方法** 使用高峰氏 Taka 淀粉酶降解样品中的淀粉、蛋白质和脂肪, 酶解后的样品经过滤, 使用分光光度法测定亚硝酸盐含量。**结果** 与国标方法相比, 改进方法不需使用沉淀剂, 过滤时间缩短, 滤液澄清, 方法回收率为 92.7%~101.2%, 相对标准偏差为 0.64%~2.89%。**结论** 经验证, 改进后的方法能满足方法学要求, 实验效率大大提高, 可以满足产品质量控制的要求。

关键词: 婴幼儿谷类辅助食品; Taka 淀粉酶; 亚硝酸盐

Improvement of determination method of nitrite in cereal supplementary food for infants and young children

REN Xue-Mei, TIAN Hong-Yun, XU Li-Qing, ZHANG Hai-Hong, WANG Jun*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China)

ABSTRACT: Objective To improve the national standard method for the determination of nitrite in infant cereal auxiliary food. **Methods** Starch, protein and fat in the sample were degraded by Taka amylase. The sample after enzymatic hydrolysis was filtered and the content of nitrite was determined by spectrophotometry. **Results** Compared with the national standard method, the improved method did not need precipitant, the filtration time was shortened and the filtrate was clarified. The recovery rate were 92.7%–101.2%, and the relative standard deviation were 0.64%–2.89%. **Conclusion** It is proved that the improved method can meet the requirements of methodology, greatly improve the experimental efficiency and meet the requirements of product quality control.

KEY WORDS: cereal supplementary food for infants and young children; Taka amylase; nitrite

1 引 言

近年来, 随着居民消费水平的提高以及科学喂养观念的建立, 我国婴幼儿谷类辅助食品的市场年增速在 20% 左右, 2018 年的市场规模接近 142 亿元。2014~2018 年, 产品食品安全国家监督抽检合格率分别为 91.8%、88.7%、94.9%、95.7%、96.0%, 虽整体质量状况有所好转, 但仍存在一定的安全风险。婴幼儿谷类辅助食品以一种或多种谷物为主要原料, 适于 6 月龄以上婴儿和幼儿, 因食用人群

特殊, 其质量安全一直是社会关注的热点。亚硝酸盐是该类食品重要的污染物指标之一, GB 10769-2010《食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品》标准中的限量要求为 $\leq 2 \text{ mg/kg}$ ^[1,2]。

婴幼儿谷类辅助食品以谷物(大米、小米、小麦粉)为主要原料, 加工过程中通常经过蒸煮、膨化等熟化工艺过程。前期实验过程发现试样按食品安全国家标准规定的前处理方法会出现比较严重的糊化现象, 导致后续的过滤速度慢、滤液混浊, 此外糊化的淀粉因黏度大, 试样中的亚

*通讯作者: 王骏, 研究员, 主要研究方向为食品色谱质谱分析技术研究。E-mail: 13953105081@163.com

*Corresponding author: WANG Jun, Professor, Shandong Institute of Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China. E-mail: 13953105081@163.com

硝酸盐不能充分过滤提取, 标准方法存在回收率低、精密度差等问题, 不能满足产品质量控制的要求。本研究在文献研究的基础上, 对现行 GB 5009.33-2016 标准中的第二分光光度法测定方法进行改进, 验证样品类型涉及市售产品种类^[3-8]。改进实验使用 Taka 淀粉酶对样品进行酶解处理, Taka 淀粉酶内含 30 多种酶, 主要是 α -淀粉酶和 β -淀粉酶, 还有纤维素酶、胰蛋白酶、脂肪酶等, 在充分酶解淀粉的同时, 可将样品中的蛋白质、脂肪进行酶解。经验证, 在不使用沉淀剂的情况下, 方法过滤速度快、滤液澄清、方法的准确度和精密度能满足方法学要求。本研究建立的婴幼儿谷类辅助食品亚硝酸盐的测定方法解决了标准方法过滤速度慢、滤液混浊、回收率低等问题, 可以实现样品中亚硝酸盐的准确、快速测定。以期为婴幼儿谷类辅助食品中亚硝酸盐的快速测定提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

5 种不同基质的样品: 1 号为婴幼儿米粉(主要配料为大米), 市售; 2 号为婴幼儿高蛋白小米粉(主要配料为小米), 市售; 3 号为婴幼儿果蔬营养米粉(主要配料为大米、小米), 市售; 4 号为婴幼儿营养饼干(主要配料为小麦粉、脱脂奶粉), 市售; 5 号为婴幼儿生制面条(主要配料为小麦粉), 市售。

亚铁氰化钾、乙酸锌、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺(分析纯, 国药集团试剂有限公司); 硼酸钠(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 亚硝酸钠基准试剂(济南众标科技有限公司); Taka 淀粉酶(美国 Sigma 公司)。

2.2 试剂配制

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。

亚硝酸钠标准溶液(200 $\mu\text{g/mL}$, 以亚硝酸钠计): 准确称取 0.1000 g 于 110~120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥恒重的亚硝酸钠, 加水溶解, 移入 500 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

2.3 仪器

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); BP211D 电子分析天平(瑞士梅特勒公司)

2.4 方法原理

试样经高峰氏 Taka 淀粉酶酶解淀粉、蛋白质和脂肪后, 经过滤, 在弱酸条件下, 亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后, 再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色染料, 外标法测得亚硝酸盐含量。

2.5 酶解条件

本实验中 Taka 淀粉酶的使用量为实验样品称样量的 5%, 酶解温度为(60 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 1 h 左右。为检验淀粉是否水解完全可加入 2 滴约 0.1 mol/L 的碘溶液, 如无蓝

色出现说明水解完全, 否则将锥形瓶重新置于水浴中, 直至无蓝色产生。

2.6 测定过程

称取 10.0 g 粉碎混合均匀的试样于 250 mL 锥形瓶中, 加入 150 mL 70 $^{\circ}\text{C}$ 左右的热开水, 加入 0.5 g Taka 淀粉酶搅拌均匀, 于(60 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 水浴中酶解 1 h, 每隔 5 min 摇混 1 次。为检验淀粉是否水解完全可加入 2 滴约 0.1 mol/L 的碘溶液, 如无蓝色出现说明水解完全, 否则将锥形瓶重新置于水浴中, 直至无蓝色产生。酶解结束后, 加 12.5 mL 50 g/L 饱和硼砂溶液, 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, 加水至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 上清液用滤纸过滤, 弃去初滤液 30 mL, 滤液备用。

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, 同时做试剂空白。

3 结果与分析

3.1 亚硝酸盐标准曲线

按 2.6 步骤配制标准工作溶液, 以零管调节零点, 于波长 538 nm 处测吸光度, 绘制标准曲线(图 1), 所得标准曲线线性关系良好, 相关系数符合 GB/T 27404 标准要求。

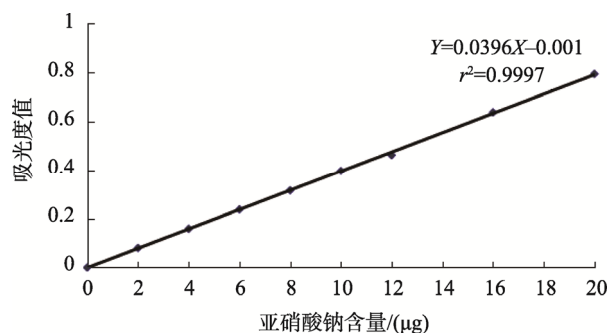


图 1 亚硝酸盐测定标准曲线

Fig.1 Standard curve for determination of nitrite

3.2 改进方法的验证

前期实验发现, 按 GB 5009.33 标准处理样品后, 样品的黏度很大, 过滤速度慢, 滤液混浊, 无法进行分光光度

法测定。本文将改进的方法与 GB5009.33 标准进行比对, 相关验证数据如下。

3.2.1 过滤所需时间和滤液体积比较

将 5 种样品分别采用标准方法和改进的方法进行前处理, 对过滤所需时间和得到的滤液体积进行比对, 结果详见表 1。

由表 1 可知, 5 种样品按国标方法进行过滤, 所需过滤时间均长于改进方法, 因样品中淀粉类原料吸水溶胀, 导致国标方法所得滤液体积仅为改进方法的 50%左右, 滤液体积小, 不能满足实验要求。

3.2.2 滤液透光率比较

将 2.6 实验所得滤液采用分光光度计测定其透光率,

结果详见表 2。

由表 2 可知, 国标方法所得滤液的透光率分布在 54.3%~85.1%之间, 说明滤液比较浑浊, 滤液中存在影响比色测定的物质, 不能保证检测结果的准确。改进方法所得滤液澄清, 透光率分布在 96.4%~99.6%之间, 说明改进方法可将淀粉进行充分酶解, 所得的提取液较为澄清, 干扰物质少, 能满足定量测定的要求^[9,10]。

3.2.3 加标回收实验

将实验样品分为 2 组, 其中一组用于亚硝酸盐含量测定, 另一组进行加标回收实验, 亚硝酸钠的加标量为 30 μg, 按 2.5 中规定的步骤进行实验, 计算检测结果和回收率, 结果详见表 3。

表 1 2 种方法过滤时间和所得滤液体积的比较

Table 1 Comparison of 2 methods for filtration time and volume of obtained leachate

样品编号	1 号		2 号		3 号		4 号		5 号	
	时间/min	体积/mL	时间/min	体积/mL	时间/min	体积/mL	时间/min	体积/mL	时间/min	体积/mL
国标方法	45	32	42	28	40	32	38	54	36	59
改进方法	22	96	20	104	24	102	18	113	16	108

表 2 2 种方法所得滤液透光率比较(%)

Table 2 Comparison of transmittance of leachate obtained by 2 methods (%)

样品编号	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号
国标方法	68.2	54.3	76.2	85.1	80.9
改进方法	97.8	96.4	98.8	99.2	99.6

表 3 实验结果和回收率

Table 3 Experimental results and recovery rates

样品编号	国标方法		改进方法	
	含量/(mg/kg)	回收率/%	含量/(mg/kg)	回收率/%
1 号	未检出	65.0	0.3	98.3
2 号	0.2	46.8	0.7	96.5
3 号	未检出	52.3	0.4	102.7
4 号	1.2	75.5	2.7	100.6
5 号	0.8	72.4	0.1	97.3

由表 3 可知, 改进方法所测样品的含量和回收率高于国标方法, 改进方法回收率分布在 96.5%~102.7%之间, 满

足 GB/T 27404 标准要求。国标方法的回收率分布在 46.8%~75.5%之间, 回收率偏低与糊化的淀粉将亚硝酸钠包裹导致不能充分提取, 且与滤液混浊也有一定的关系, 导致国标方法的测定结果偏低, 回收率也不满足方法学的要求, 不能满足产品质量控制的要求。

3.2.4 准确度实验

选择 1 号样品、5 号样品分别进行 3 水平加标试验, 加标量分别为 10、30、60 μg, 均平行测定 6 次, 计算回收率和相对标准偏差 RSD。

由表 4 结果可知, 5 种婴幼儿谷类辅助食品在 3 个水平加标后回收率及相对标准偏差结果满足 GB/T 27404-2008 标准中实验方法确认的技术要求^[11,12]。

3.2.5 精密度实验

选择 1 号样品、5 号样品分别进行 3 个水平加标试验, 加标量分别为 10、30、60 μg, 平行测定 6 次, 计算测定结果和相对标准偏差, 结果详见表 5。

由表 5 可知, 精密度实验结果满足 GB/T 27404-2008 标准中实验方法确认的技术要求^[13,14]。

表 4 方法准确度实验结果

Table 4 Method accuracy experimental results

编号	加标量/μg	回收率/%					平均值/%	RSD/%
1 号	10	95.3	92.7	96.4	98.9	97.6	101.2	2.94
	30	98.7	94.6	95.1	99.6	95.1	93.9	2.36
	60	100.8	98.2	92.8	94.6	98.7	95.6	2.96

续表 4

编号	加标量/ μg		回收率/%					平均值/%	RSD/%
2 号	10	96.7	97.2	98.3	100.7	100.5	99.5	98.8	1.71
	30	98.4	99.2	101.2	100.7	96.8	97.2	98.9	1.82
	60	96.5	95.7	96.5	97.2	96.7	98.2	96.8	0.87
3 号	10	98.2	97.6	99.2	96.4	95.7	99.2	97.7	1.48
	30	95.8	96.2	98.8	97.6	99.1	96.5	97.3	1.43
	60	96.9	97.2	94.6	97.1	98.2	99.8	97.3	1.75
4 号	10	100.2	98.6	97.3	96.9	97.8	95.9	97.8	1.52
	30	98.2	97.4	95.9	96.8	97.5	96.8	97.1	0.81
	60	96.7	95.9	96.2	98.7	99.4	97.2	97.4	1.45
5 号	10	94.3	93.7	95.4	97.9	98.6	93.7	95.6	2.16
	30	92.7	95.6	97.5	96.6	93.9	98.9	95.9	2.3
	60	94.2	93.2	96.8	98.9	97.4	97.1	96.3	2.13

表 5 方法精密度实验结果
Table 5 Method precision experimental results

编号	加标量/ μg		含量/(mg/kg)					平均值/(mg/kg)	RSD/%
1 号	10	1.32	1.28	1.26	1.32	1.32	1.3	1.31	2.53
	30	3.32	3.29	3.25	3.28	3.27	3.32	3.3	2.79
	60	6.32	6.28	6.26	6.3	6.29	6.32	6.31	2.35
2 号	10	1.26	1.31	1.25	1.24	1.32	1.28	1.25	2.56
	30	3.36	3.43	3.37	3.41	3.25	3.39	3.37	1.88
	60	6.32	6.36	6.27	6.39	6.37	6.38	6.34	0.71
3 号	10	1.45	1.52	1.43	1.48	1.42	1.45	1.49	2.51
	30	3.58	3.59	3.68	3.48	3.58	3.57	3.58	1.78
	60	6.59	6.58	6.48	6.52	6.57	6.54	6.55	0.64
4 号	10	1.17	1.21	1.24	1.19	1.18	1.14	1.19	2.89
	30	3.14	3.15	3.18	3.13	3.15	3.09	3.14	0.94
	60	6.12	6.18	6.21	6.25	6.08	6.07	6.15	1.19
5 号	10	1.11	1.08	1.04	1.06	1.04	1.06	1.06	2.34
	30	3.12	3.13	3.15	3.12	3.14	3.16	3.14	1.63
	60	6.12	6.14	6.16	6.12	6.14	6.08	6.13	2.73

4 结 论

本实验通过针对婴幼儿谷类辅助食品淀粉含量高, 前处理过程中因糊化导致的过滤速度慢、滤液混浊、目标

物提取率等问题, 采用 Taka 淀粉酶(高峰淀粉酶)对样品进行酶解处理, 且不需使用沉淀剂。经验证, 改进后的方法所需过滤时间大大缩短、所得滤液体积大, 且避免了因淀粉糊化导致的提取效率低的问题。经验证, 方法准确度实

验的回收率分布在 92.7%~101.2%, 相对标准偏差 RSD 分布在 0.64%~2.89%之间, 满足 GB/T 27417-2017 标准中实验方法确认的技术要求, 能够满足婴幼儿谷类辅助食品亚硝酸盐质量控制的要求^[15]。

参考文献

- [1] 蒋可心, 栗志伟, 耿偲涓. 浅析整合前后我国婴幼儿食品国家标准[J]. 标准科学, 2010, 8: 82-84.
Jiang KX, Li ZW, Geng SJ. A brief analysis of China's national standard of infant food before and after integration [J]. Standard Sci, 2010, (8): 82-84.
- [2] GB 10769-2010 食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].
GB 10769-2010 Food safety national standard-Infant cereal auxiliary food [S].
- [3] 李党生, 张尧旺. 亚硝酸盐测定方法研究进展[J]. 黄河水利职业技术学院学报, 2005, 7(1): 50-52.
Li DS, Zhang YW. Progress in the determination of nitrite [J]. J Yellow River Water Conserv Vocat Tech Coll, 2005, 7(1): 50-52.
- [4] 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 food [S].
- [5] 于村俞莎, 浦惠莉. 食品中亚硝酸盐国际测定方法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 1999, 10(1): 69.
Yu CYS, Pu HL. Study on international determination method of nitrite in food [J]. Chin J Health Lab Technol, 1999, 10(1): 69.
- [6] 王树庆, 范维江, 潘洪民. 食品中的硝酸盐与亚硝酸盐[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2016.
Wang SQ, Fan WJ, Pan HM. Nitrate and nitrite in food [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2016.
- [7] 赵静, 王娜, 冯叙桥, 等. 蔬菜中硝酸盐和亚硝酸盐检测方法的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 42(8): 42-49.
Zhao J, Wang N, Feng XQ, et al. Research progress on detection methods of nitrate and nitrite in vegetables [J]. Food Sci, 2014, 42(8): 42-49.
- [8] GB/T 27417-2017 合格评定化学分析方法确认和验证指南[S].
GB/T 27417-2017 Guidelines for the validation and validation of chemical analysis methods for conformity assessment [S].
- [9] 张晓红, 王志琴. 奶牛常用饲料中亚硝酸盐含量的测定与分析[J]. 草食家畜, 2018, 7(4): 11-17.
Zhang XH, Wang ZQ. Determination and analysis of nitrite content in common feed for dairy cows [J]. Grass-feed Livestock, 2018, 7(4): 11-17.
- [10] 田大民, 刘向云. 可见分光光度法测定酸腌菜中亚硝酸根的含量[J]. 安徽农业科学, 2010, 8(10): 18-22.
Tian DM, Liu XY. Determination of nitrite in pickled vegetables by visible spectrophotometry [J]. J Anhui Agric Sci, 2010, 8(10): 18-22.
- [11] 丁杨, 邓美荣. 婴幼儿奶粉及米粉中亚硝酸盐的检测[J]. 黑龙江医学, 2016, 6(11): 23-27.
Ding Y, Deng MR. Detection of nitrite in infant milk powder and rice flour [J]. Heilongjiang Med J, 2016, 6(11): 23-27.
- [12] 周荣芬. 酶水解法应用于高淀粉含量食品中亚硝酸盐测定——样品前处理方法的探讨[J]. 职业卫生与病伤, 2013, 37(2): 47-50.
Zhou RF. Application of enzymatic hydrolysis in the determination of nitrite in food with high starch content-Discussion on the method of sample pretreatment [J]. Occup Health Injur, 2013, 37(2): 47-50.
- [13] 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[S].
GB 5009.33-2016 National food safety standard-Determination of nitrite and nitrate in food [S].
- [14] 陈新峰, 徐龙. 基于快速黏度分析仪评价婴幼儿营养米粉品质[J]. 浙江农业科学, 2016, 5(8): 24-27.
Chen XF, Xu L. Quality evaluation of nutritional rice flour for infants and young children based on rapid viscosity analyser [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2016, 5(8): 24-27.
- [15] 秦奉达, 钱锋. 酶解工艺生产米粉的酶解效果研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 37(8): 27-35.
Qin FD, Qian F. Study on enzymatic hydrolysis effect of rice flour produced by enzymatic hydrolysis process [J]. Food Res Dev, 2013, 37(8): 27-35.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



任雪梅, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 404055322@qq.com

王 骏, 研究员, 主要研究方向为食品色谱质谱分析技术研究。
E-mail: 13953105081@163.com