

气相分子吸收光谱法测定酱腌菜中亚硝酸盐

徐 晓, 郝桂娟*, 郭利攀, 邢丽丽, 宋 婷

(绿城农科检测技术有限公司, 杭州 310052)

摘要: **目的** 建立了一种气相分子吸收光谱法测定酱腌菜中亚硝酸盐的方法。**方法** 酱腌菜中的亚硝酸盐用沸水浴浸提, 浸提液沉淀蛋白质后定容并过滤, 以柠檬酸-乙醇溶液作为还原剂, 用气相分子吸收光谱测定滤液中亚硝酸盐的含量。**结果** 亚硝酸盐在 0.1~1.0 mg/L 浓度范围内有良好的线性关系, 相关系数大于 0.999, 检出限为 0.6 mg/kg, 定量限为 1.8 mg/kg, 加标回收率为 81.3%~99.8%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 4.7%。**结论** 该方法简便、快捷、有效, 结果稳定性高, 可用于酱腌菜中亚硝酸盐的检测。**关键词:** 气相分子吸收光谱; 亚硝酸盐; 酱腌菜

Determination of nitrite in pickles by gas-phase molecular absorption spectroscopy

XU Xiao, HAO Gui-Juan*, GUO Li-Pan, XING Li-Li, SONG Ting

(Greentown Agricultural Testing Technology Co., Ltd., Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of nitrite in pickles by gas-phase molecular absorption spectroscopy. **Methods** The nitrite in pickled vegetables was extracted with a boiling water bath. After the protein was precipitated in the extract, the volume was fixed and filtered. The content of nitrite in filtrate was determined by gas phase molecular absorption spectrometry with citric acid - ethanol solution as reducing agent. **Results** Nitrite had a good linear relationship in the range of 0.1~1.0mg/L, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The limit of detection was 0.6 mg/kg, the limit of quantification was 1.8 mg/kg, the recoveries were 81.3%~99.8%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 4.7%. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate, which is suitable for the determination of nitrite in pickles.

KEY WORDS: gas-phase molecular absorption spectroscopy; nitrite; pickles

1 引言

酱腌菜是我国人民喜食的一种佐餐小菜, 具有悠久的历史, 最早可以追溯到二千多年前^[1]。它最初只是作为一种储存蔬菜的方法, 后来经过长期尝试和改良, 发展成为现在的许多带有浓厚民族特色和地方风味的酱腌菜制品, 富有营养, 又经济实惠, 因而备受人们的喜爱。

新鲜蔬菜中有一定含量的硝酸盐存在, 在腌制过程

中, 硝酸盐在微生物的作用下会转化为亚硝酸盐。亚硝酸盐作为一种强氧化剂, 能将人体血液中的低铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白, 因此亚硝酸盐进入人体后可使血红蛋白失去携带氧气的的能力, 从而导致人体缺氧^[2-4]。亚硝酸盐还能与食物或者胃中的仲胺类物质作用转化为亚硝胺, 亚硝胺具有强烈的致癌作用, 会诱发食管癌、胃癌、肝癌和大肠癌^[5,6], 我国在 GB 2762-2014《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[7]中规定, 腌渍蔬菜中亚硝酸盐(以亚硝

*通讯作者: 郝桂娟, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 1591913740@qq.com

*Corresponding author: HAO Gui-Juan, Assistant Engineer, Greentown Agricultural Testing Technology Co., Ltd., No.688, Binan Road, Binjiang District, Hangzhou 310052, China. E-mail: 1591913740@qq.com

酸钠计)含量不得超过 20 mg/kg。

目前,亚硝酸盐的测定有分光光度法、离子色谱法、荧光光谱法、化学发光法和电化学检测法等多种方法。分光光度法操作简便,结果直观;离子色谱法和荧光光度法灵敏度高;化学发光法检测安全可靠,操作简单;电化学检测法检测速率快^[8-11]。其中分光光度法中的重氮偶合比色法(Griess 法)^[12]是目前国际上检测亚硝酸盐的标准方法,该方法用于测定酱腌菜中亚硝酸盐具有操作简单、精密度高的优点,但在测定一些浸提液有本底颜色的样品时需要用活性炭进行脱色,操作过程繁琐,后续显色过程中所用的试剂配制繁琐、不易储存且具有毒性。气相分子吸收光谱法是 20 世纪 70 年代兴起的一种简便、快速的分析手段,利用基态的气体分子吸收特定紫外光谱进行定量的一种测量方法,其在水质和土壤检测中有较为广泛的应用,但在食品检测的领域中尚未有较成熟的检测方法^[13-16]。

本研究建立了一种气相分子吸收光谱法测定酱腌菜中亚硝酸盐的含量,该方法对前处理的要求较低,浸提液的本底颜色对结果不会产生干扰,同时可以利用自动进样器自动测定大批量样品,具有检出限低、准确度和精密度高、抗干扰能力强和检测速度快的优点,可以短时间内快速准确的测定大批量不同种类的酱腌菜中的亚硝酸盐含量,为食品安全提供有力的保障。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

GMA3386 气相分子吸收光谱(上海北裕分析仪器股份有限公司);BSA224S 分析天平(德国赛多利斯公司);HWS-28 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);KnifetecTM 1095 食物粉碎机(丹麦福斯分析仪器公司);Milli-Q Reference 超纯水仪(美国密理博公司)。

硼酸钠、亚铁氰化钾、一水合柠檬酸、无水乙醇、冰乙酸(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);乙酸锌(分析纯,西陇科学股份有限公司);盐酸(优级纯,永华化学股份有限公司);亚硝酸盐准溶液(200 mg/L,以亚硝酸钠计,北京坛墨质检科技有限公司);实验用水为一级水。

样品来源为市面上随机采购的市售酱腌菜制品。

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: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。

0.5 mol/L 柠檬酸+30%乙醇溶液:称取 105.1 g 一水合柠檬酸,溶解于 1000 mL 30%的乙醇溶液中。

1.5 mol/L 乙酸+30%乙醇溶液:称取 90.1 g 冰乙酸,溶解于 1000 mL 30%的乙醇溶液中。

25%(V:V)盐酸+30%乙醇溶液:量取 250 mL 浓盐酸,用 30%的乙醇溶液定容至 1000 mL。

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

标准工作曲线:分别准确吸取 1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 亚硝酸盐标准使用液于 7 个 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。

2.2.2 样品前处理

①样品选择和制备

选取 7 种市售酱腌菜样品各 200 g,用食物粉碎机分别搅拌均匀后备用。

②提取

参照 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》^[17],采用沸水浴浸提酱腌菜中的亚硝酸盐,本研究对定容体积进行了优化,由原先的 200 mL 改为了 100 mL,在保证提取效率的前提下提高了上机滤液中亚硝酸盐的浓度。提取步骤如下:

称取 5 g(精确至 0.001 g)匀浆试样,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加 12.5 mL 50 g/L 饱和硼砂溶液,加入 70℃的水 70 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 100 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 10 mL,滤液上气相分子吸收光谱进行测定。

2.2.3 仪器条件

光源:锌(Zn)空心阴极灯,测量波长:213.9 nm,载气:氮气,载气流速:0.5 L/min,样品泵转速:50 rpm,试剂泵转速:25 r/min,延迟时间:15 s,测量时间:30 s,定量方式:峰高,还原剂:0.5 mol/L 柠檬酸+30%乙醇溶液。

3 结果与分析

3.1 仪器条件优化

3.1.1 测量波长的选择

二氧化氮气体在 213.9 nm 处有吸收且符合朗伯比尔定律 $A=\lg(1/T)=Kbc$,当一束平行单色光垂直通过比色管中的二氧化氮气体时,其吸光度 A 与吸光物质的浓度 c (mg/L)及吸收层厚度 b (mm)成正比,而与透光度 T 成反相关,因此本研究采用锌(Zn)空心阴极灯作为光源,在波长 213.9 nm 处进行测定。

3.1.2 延迟时间和测量时间的选择

本研究对延迟时间和测量时间的选择进行了研究,在其他仪器参数相同的情况下分别在不同的延迟时间和测量时间设定下对 2.00 mg/L 的标样进行了测定,得到了图 1~6 的图谱,无论延迟时间和测量时间如何变化,峰型的最高点均在 45 s \pm 5 s 的范围内,而通过图 3 和图 4 之间的比较以及图 4 和图 5 之间的比较可以看出,出峰时间会随着延迟时间和测量时间的不同而变化,本方法采用峰高进行定量,同时需要确认测量前的基线是否稳定,综合考虑这 2 个因素,最终本研究确定采用延迟时间 15 s,测量时间 30 s,来进行样品的测定。

3.2 还原剂的选择

本研究选择了 0.5 mol/L 柠檬酸+30%乙醇溶液、1.5 mol/L 乙酸+30%乙醇溶液和 25%(V:V)盐酸+30%乙醇溶液 3 种还原剂在相同的仪器条件下对 2.00 mg/L 的标样和试剂空白进行测定。

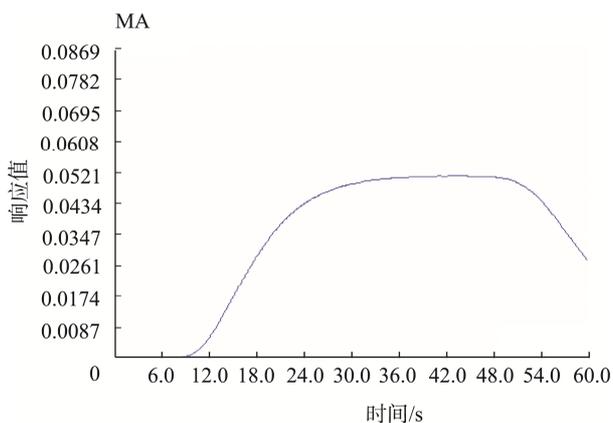


图 1 延迟时间 0 s, 测量时间 60 s 时的图谱

Fig.1 Graph of 0 s delay time and 60 s measurement time

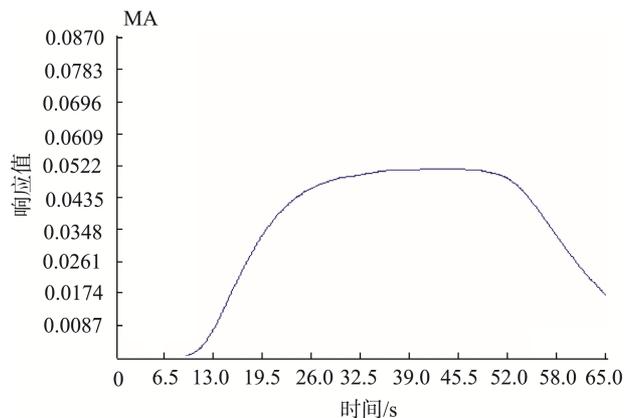


图 2 延迟时间 5 s, 测量时间 60 s 的图谱

Fig.2 Graph of 5 s delay time and 60 s measurement time

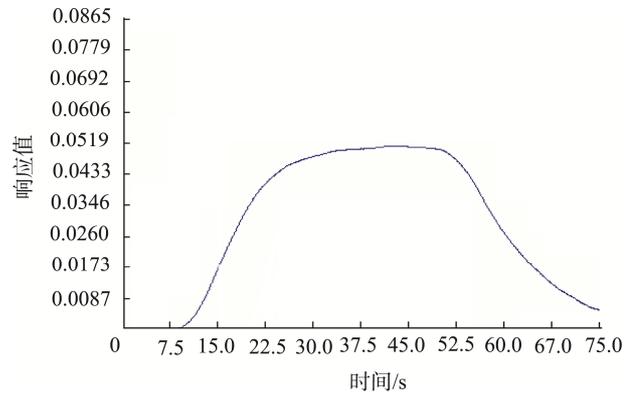


图 3 延迟时间 15 s, 测量时间 60 s 的图谱

Fig.3 Graph of 15 s delay time and 60 s measurement time

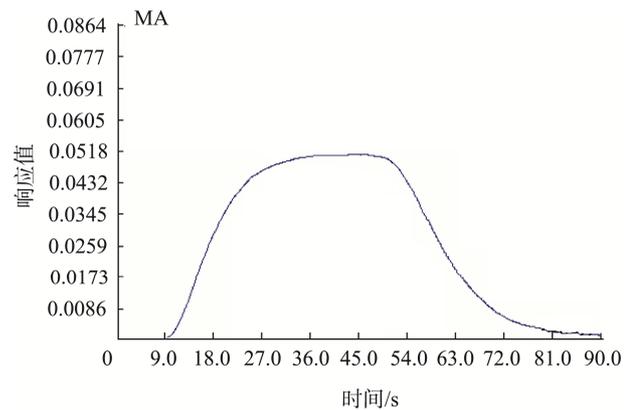


图 4 延迟时间 30 s, 测量时间 60 s 的图谱

Fig.4 Graph of 30 s delay time and 60 s measurement time

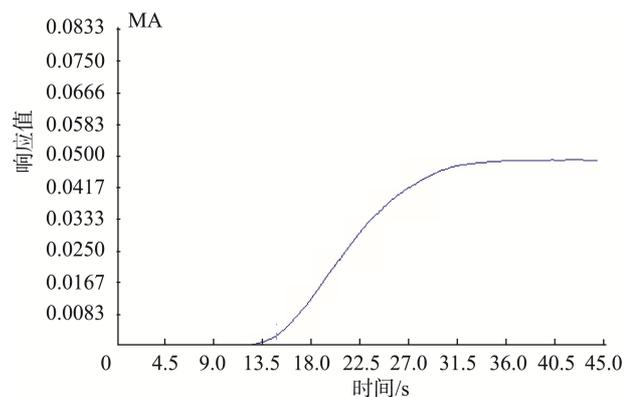


图 5 延迟时间 15 s, 测量时间 30 s 的图谱

Fig.5 Graph of 15 s delay time and 30 s measurement time

由表 1 中数据可以看出在相同的仪器条件下 3 种不同还原剂的标样吸光度较为一致,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 2%,稳定性较好,但 1.5 mol/L 乙酸+30%乙醇溶液的试剂空白过高,25%(V:V)盐酸+30%乙醇溶液的试剂空白的稳定性差。综合以上 2 个因素考虑,本研究采用 0.5 mol/L 柠檬酸+30%乙醇溶液作为还原剂进行样品测定。

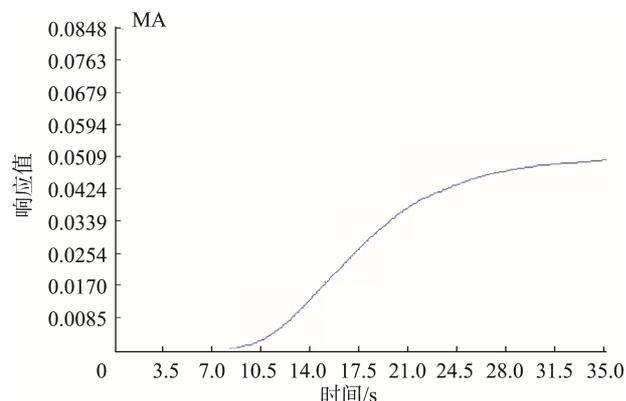


图 6 延迟时间 15 s, 测量时间 20 s 的图谱
Fig.6 Graph of 15 s delay time and 20 s measurement time

3.3 方法的线性范围及检出限

按照 0.1、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/L 的梯度建立标准曲线, 线性方程为 $Y=0.02549X+0.00066$, 相关系数为 0.99993, 说明在 0.1~1.00 mg/L 的范围内, 亚硝酸盐的浓度与其吸光度具有良好的线性关系。

取与样品相同步骤处理的空白试验滤液重复测定 20 次, 得到空白试验的吸光度如表 2。检出限的计算公式 $IDL=3s/b$ 进行计算, 式中 IDL 代表仪器检出限, s 为 20 次空白值的标准偏差, b 为标准曲线回归方程中的斜率, 3 为根据一定置信度确定的系数。由表 2 中的数据计算得到 20 次空白值的标准偏差为 0.0003, 代入公式计算得到仪器的检出限为 0.03 mg/L, 当样品取样量为 5.00 g, 定容体积为 100 mL 时, 方法检出限为 0.60 mg/kg, 以 3 倍的检出限为定量限, 该方法的定量限为 1.8 mg/kg。

3.4 回收率及精密度实验

分别选择 0.6、1.8、6.0 mg/kg 3 个水平进行添加回收试验, 每个加标水平取不含本底的样品 6 份, 每份 5 g(精确至 0.001 g), 按实验方法先测定出亚硝酸盐的含量, 以加标质量计算亚硝酸盐在不同添加水平的回收率, 计算添加回收率及相对标准偏差, 结果表明该方法的回收率在 80%~100% 之间, 回收率结果比较满意, 方法的准确性高, 方法相对标准偏差值 < 4.7%, 如表 3, 说明方法的精密度好。

表 1 不同还原剂下的试剂空白和标样实验结果
Table 1 Experiment results of reagent blanks and standard samples under different reducing agents

还原剂	平行	试剂空白吸光度	RSD/%	标样吸光度	RSD/%
0.5 mol/L 柠檬酸+ 30%乙醇溶液	1	0.0006	14.9	0.0480	1.2
	2	0.0008		0.0466	
	3	0.0009		0.0468	
	4	0.0008		0.0467	
	5	0.0007		0.0469	
	6	0.0009		0.0475	
1.5 mol/L 乙酸+ 30%乙醇溶液	1	0.0074	4.5	0.0477	1.6
	2	0.0073		0.0479	
	3	0.0068		0.0488	
	4	0.0072		0.0483	
	5	0.0078		0.0472	
	6	0.0075		0.0467	
25%(V:V)盐酸+ 30%乙醇溶液	1	0.0024	32.3	0.0494	1.8
	2	0.0036		0.0497	
	3	0.0018		0.0495	
	4	0.0027		0.0475	
	5	0.0035		0.0481	
	6	0.0046		0.0489	

表 2 亚硝酸盐的检出限实验结果
Table 2 Experiment results of detection limit of nitrite

编号	吸光度	编号	吸光度	编号	吸光度	编号	吸光度
CK1	0.0003	CK6	0.0003	CK11	0.0002	CK16	0.0003
CK2	0.0003	CK7	0.0008	CK12	0.0003	CK17	0.0007
CK3	0.0003	CK8	0.0009	CK13	0.0000	CK18	0.0003
CK4	0.0003	CK9	0.0007	CK14	0.0001	CK19	0.0004
CK5	0.0006	CK10	0.0006	CK15	0.0002	CK20	0.0000

表 3 亚硝酸盐的回收率和精密度实验结果
Table 3 Experiment results of the spike recovery and RSDs of nitrite

加标浓度 (mg/kg)	本底含量 (mg/kg)	样品名称	回收率/%			精密度/%			
0.6		寸金小黄瓜	84.2	86.3	85.2	83.1	87.6	84.3	1.9
1.8	1.4		88.2	87.6	85.8	88.1	89.3	83.6	2.4
6.0			92.3	93.6	93.7	94.7	93.2	93.4	0.8
0.6		红油泡豇豆	85.4	86.3	84.2	83.8	84.6	87.9	1.8
1.8	0		86.9	90.2	88.7	85.9	91.2	86.8	2.4
6.0			95.8	99.2	96.7	93.6	96.5	90.3	3.2
0.6		爽口萝卜	87.8	88.6	85.4	82.1	81.3	88.6	3.8
1.8	2.4		90.3	95.6	88.7	85.3	84.2	88.9	4.6
6.0			99.5	98.7	92.3	99.8	93.6	94.5	3.4
0.6		雪菜	92.1	90.2	82.5	83.4	85.8	86.2	4.3
1.8	6.1		88.3	86.2	87.9	91.2	95.4	96.7	4.7
6.0			92.5	88.6	89.7	94.6	97.5	86.3	4.5
0.6		榨菜	87.6	91.3	90.2	88.5	85.4	84.5	3.0
1.8	5.2		91.3	87.6	88.7	88.9	84.3	86.8	2.7
6.0			89.7	93.4	92.5	87.6	95.3	96.4	3.6
0.6		开胃菜	84.5	83.6	85.7	84.7	88.6	83.2	2.3
1.8	2.6		87.5	89.8	86.5	93.2	91.3	92.5	3.0
6.0			94.8	97.6	91.3	89.8	88.6	93.2	3.6
0.6		脆口萝卜	83.8	86.5	84.2	88.9	87.6	89.4	2.7
1.8	1.9		89.8	90.5	94.3	95.6	92.1	90.4	2.6
6.0			96.8	94.7	95.3	93.6	89.3	91.3	3.0

表 4 与国标方法比对实验结果
Table 4 Experiment results compared with national standard methods

样品名称	分光光度法测定结果/(mg/kg)	气相分子吸收光谱法测定结果/(mg/kg)	相对偏差/%
寸金小黄瓜	1.4	1.3	3.7
爽口萝卜	2.4	2.5	2.0
雪菜	6.1	5.9	1.7
榨菜	5.2	5.1	1.0
开胃菜	2.6	2.4	4.0
脆口萝卜	1.9	1.9	0.0

3.5 与国标方法比对

选取 6 个阳性酱腌菜样品, 分别采用 GB 5009.33-2016 中的分光光度法以及本研究的方法进行检测, 所得检测结果的相对偏差均小于 4%(表 4), 说明该方法的准确度与国标方法较为一致。

4 结 论

本研究建立了一种气相分子吸收光谱测定酱腌菜中亚硝酸盐的方法, 具有抗干扰能力强、准确度高、灵敏度高、稳定性好的优点。相比 GB 5009.33-2016 分光光度法,

气相分子吸收光谱法的检测过程中无需进行显色和比色步骤, 消除了因样品提取液可能存在颜色而造成的显色过程的干扰, 且 GB 5009.33-2016 分光光度法中酱腌菜类亚硝酸盐的检出限为 1.0 mg/kg, 本方法亚硝酸盐的检出限为 0.60 mg/kg, 相较国标而言, 本方法具有更高的灵敏度。同时仪器自动进样代替人工操作, 提高了检测效率, 具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 尹立明, 李旭, 魏莹, 等. 浅谈我国酱腌菜的生产现状及发展[J]. 中国调味品, 2012, 37(9): 16-18.
Yin LM, Li X, Wei Y, *et al.* Talking about the development of pickles [J]. China Cond, 2012, 37(9): 16-18.
- [2] 范亚娜, 盖轲. 几种腌制蔬菜中亚硝酸盐含量的测定[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2008, 28(1): 41-43.
Fan YN, Ge K. The determination of the nitrite content of several pickled vegetables [J]. J Baoji Univ Arts Sci (Nat Sci Ed), 2008, 28(1): 41-43.
- [3] 周慧, 马义度, 张建. 市售酱腌菜和肉制品中亚硝酸盐含量测定及安全性评价[J]. 广州化工, 2017, 45(13): 117-120.
Zhou H, Ma YQ, Zhang J. Determination and edible safety for nitrite content in commercial pickles and meat products [J]. Guangzhou Chem Ind, 2017, 45(13): 117-120.
- [4] 蔡洁娜. 不同贮存条件下四种新鲜蔬菜亚硝酸盐含量变化探究[J]. 食品安全导刊, 2018, (12): 74-75.
Cai JN. Study on the changes of nitrite content in four fresh vegetables under different storage conditions [J]. China Food Saf Magaz, 2018, (12): 74-75.
- [5] 刘法佳, 吴燕燕, 李来好, 等. 降低腌制食品中亚硝酸盐含量的研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(1): 165-167.
Liu FJ, Wu YY, Li LH, *et al.* Development of reducing nitrite in salted food [J]. Guangdong Agric Sci, 2011, 38(1): 165-167.
- [6] 石岩. 食品中亚硝酸盐过量的危害与防治[J]. 食品与健康, 2006, (2): 39-39.
Shi Y. Harm and prevention of nitrite excess in food [J]. Food Health, 2006, (2): 39.
- [7] GB 2762-2014 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
GB 2762-2014 National food safety standard-Limits of contaminants in food [S].
- [8] Nam J, Jung IB, Kim B, *et al.* A colorimetric hydrogel biosensor for rapid detection of nitrite ions [J]. Sensor Actuat B Chem, 2018, 270(4): 112-118.
- [9] Li D, Ma Y, Duan H, *et al.* Griess reaction-based paper strip for colorimetric/fluorescent/SERS triple sensing of nitrite [J]. Biosens Bioelectron, 2017, (99): 389-398.
- [10] Deng C, Chen J, Zhou N, *et al.* Electrochemical detection of nitrite based on the polythionine/carbon nanotube modified electrode [J]. Thin Solid Films, 2012, 520(23): 7026-7029.
- [11] Kanda Y, Taira M. Flow-injection analysis method for the determination of nitrite and nitrate in natural water samples using a chemiluminescence NOx monitor [J]. Anal Sci Int J Japan Soc Anal Chem, 2003, 19(5): 695-699.
- [12] Wang GF, Satake M, Horita K. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using column preconcentration [J]. Talanta, 1998, 46(4): 671-678.
- [13] 代阿芳, 黄依凡, 范慧, 等. 气相分子吸收光谱法测定地下水中亚硝酸盐氮、氨氮、硝酸盐氮[J]. 化学分析计量, 2020, 29(1): 75-78.
Dai AF, Huang YF, Fan H, *et al.* Determination of nitrite nitrogen, ammonia nitrogen and nitrate nitrogen in groundwater by gas phase molecular absorption spectrometry [J]. Chem Anal Meter, 2020, 29(1): 75-78.
- [14] 蓝月存, 潘艳, 吕保玉, 等. 气相分子吸收光谱法快速测定土壤中亚硝酸盐氮[J]. 化学分析计量, 2019, 28(6): 82-84.
Lan YC, Pan Y, Lv BY, *et al.* Rapid determination of nitrite nitrogen in soil by gas phase molecular absorption spectrometry [J]. Chem Anal Meter, 2019, 28(6): 82-84.
- [15] 程珂. 水质亚硝酸盐氮的检测方法综述[J]. 河南化工, 2020, 37(3): 13-15.
Cheng K. Summary of water quality detection methods for nitrite nitrogen [J]. Henan Chem Ind, 2020, 37(3): 13-15.
- [16] 臧平安. 气相分子吸收光谱法测定水中亚硝酸盐氮[J]. 中国环境监测, 1995, (3): 3-4.
Zang PA. Determination of nitrite nitrogen in water by gas phase molecular absorption spectrometry [J]. China Environ Monitor, 1995, (3): 3-4.
- [17] 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].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



徐 晓, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: akaziki@dingtalk.com



郝桂娟, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 1591913740@qq.com