

乙腈沉淀-离子色谱法测定婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐

冷桃花^{1*}, 万丽佳², 施依文¹, 葛宇¹

(1. 上海市质量监督检验技术研究院/国家食品质量监督检验中心, 上海 200233;
2. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

摘要: **目的** 建立乙腈沉淀-离子色谱法检测婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸的分析方法。**方法** 样品经乙腈:水(5:5, V:V)溶液沉淀蛋白后, 在提取温度 35 °C, 超声提取 30 min 的条件下, 过 0.22 μm 滤膜净化。采用 KOH 水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 离子色谱检测硝酸盐与亚硝酸盐。**结果** 乙腈沉淀法比较适合婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸的提取净化。在提取试剂乙腈:水(5:5, V:V), 提取温度 35 °C, 提取时间 30 min 条件下, 米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的提取效果最好, 回收率均在 92.8%~96.8%之间。**结论** 该方法操作简便、提取速度快、检出限低, 适用于婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的检测。

关键词: 米粉; 硝酸盐; 亚硝酸盐

Determination of nitrate and nitrite in infant rice flour by acetonitrile precipitation-ion chromatography

LENG Tao-Hua^{1*}, WAN Li-Jia², SHI Yi-Wen¹, GE Yu¹

[1. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Food Quality Supervision and Inspection Center (Shanghai), Shanghai 200233, China; 2. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science Technology, Shanghai 200237, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for detecting nitrate and nitrite in infant rice flour by acetonitrile precipitation-ion chromatography. **Methods** The protein was precipitated from the sample in acetonitrile: water (5:5, V:V) solution, and then purified through a 0.22 μm filter membrane under the conditions of extraction temperature of 35 °C and ultrasonic extraction for 30 min. Gradient elution using KOH aqueous solution as the mobile phase was performed, and nitrate and nitrite were detected by ion chromatography. **Results** Acetonitrile precipitation method was more suitable for the extraction and purification of nitrate and nitrite in infant rice flour. Under the conditions of extraction reagent acetonitrile: water (5:5, V:V), extraction temperature 35 °C, and extraction time 30 min, the extraction effect of nitrate and nitrite in rice flour was the best, and the recovery rates were 92.8%~96.8%. **Conclusion** This method is easy to operate, fast to extract, low detection limit, and it is suitable for the detection of nitrate and nitrite in infant rice flour.

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(19DZ2202300)、国家重点研发计划项目 (2019YFF0217603)、上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-02-F01153)

Fund: Supported by the Shanghai Science and Technology Commission, China (19DZ2202300), National Key R&D Projects, China (2019YFF0217603), and Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (2019-02-08-00-02-F01153)

***通信作者:** 冷桃花, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全与检测。E-mail: length@sqi.org.cn

***Corresponding author:** LENG Tao-Hua, Ph.D, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, No.381, Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. E-mail: length@sqi.org.cn

KEY WORDS: rice flour; nitrate; nitrite

0 引言

随着人们生活水平的提高,婴幼儿米粉行业迅速发展,产品种类和产品数量进一步增加。大米含有丰富营养且极易被人体消化吸收,适合作为婴幼儿辅食来源,而米粉是以大米为主,加入一定的蔬菜、水果、肉类等配料制成的婴幼儿辅食,营养丰富多样且食用方便,易被人体消化吸收,不容易引起过敏,已逐渐成为 6~24 月龄婴幼儿辅食添加的首选食物^[1-3]。但谷物与蔬菜在生长过程中因为施加氮肥等原因不可避免地含有一定量的硝酸盐,这也是米粉中硝酸盐的主要来源。硝酸盐会在人体内微生物和酶的作用下转化为亚硝酸盐,亚硝酸盐具有致癌、致畸作用,并且能够把血液中携带氧气的低价铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,使血液失去携带氧气的功能,从而使人出现缺氧中毒症状,严重时还会因呼吸衰竭而危及生命^[4-5]。婴儿的身体较为脆弱且体内微生物活性远高于成年人,因此米粉中硝酸盐和亚硝酸盐对于婴幼儿的危害远高于成年人^[6-7]。我国国家标准 GB 10769—2010《食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品》规定婴幼儿米粉中硝酸盐含量不得高于 100 mg/kg,亚硝酸盐含量不得高于 2 mg/kg。因此,实时监控婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的含量至关重要。

硝酸盐和亚硝酸盐的检测方法很多,有分光光度法^[8-9]、液相色谱法^[10]、离子色谱法^[11-12]、电化学法^[13-14]等。我国国家标准 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》主要用于检测食品中的硝酸盐和亚硝酸盐,采用离子色谱法和分光光度法。食品中硝酸盐及亚硝酸盐的提取主要采用水或氢氧化钾溶液提取,后经沉淀剂沉淀蛋白后上机分析。米粉是以大米为主,因其含有大量的淀粉,在样品提取过程中加热容易糊化^[15],导致提取溶液浑浊无法进行分析,容易产生较大的干扰。基于米粉的特殊性,本研究选择淀粉酶酶解、乙腈、亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀等对米粉类样品的前处理进行比较和优化,建立适合于婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的检测新技术,本方法填补了国家标准中针对高淀粉含量食品硝酸盐和亚硝酸盐的检测空白,对婴幼儿米粉中硝酸盐及亚硝酸盐的含量评估具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

硝酸钠溶液、亚硝酸钠溶液(200 mg/L, 国家标准物质中心); 淀粉酶、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 超纯水(电阻率 ≥ 18.2 M Ω ·cm, 美国 Millipore 公司); 亚铁氰化钾(99.5%, 国药集团化学试剂有限公司); 乙酸锌(分析纯, 国

药集团化学试剂有限公司)。

5000 型 ICS DC 离子色谱仪带商品化氢氧化钾淋洗液系统、Dionex IonpacTM As11-HC (4 mm \times 250 mm, 4.6 μ m) 色谱柱(美国 Thermofisher 公司); PL2002 型百分位电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; SK8210LHC 型超声仪波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); DIGTOR21 离心机(德国 WIGGENS 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱分离条件参照 GB 5009.33-2016。色谱柱: Dionex IonpacTM As11-HC (4 mm \times 250 mm, 4.6 μ m); 流动相: 氢氧化钾溶液; 流速: 1.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样体积: 100 μ L。洗脱梯度见表 1。

表 1 离子色谱梯度洗脱程序
Table 1 Ion Chromatography gradient elution program

时间/min	0~30	30.1~38	38.1~43
洗脱液浓度/(mmol/L)	5	50	5

1.2.2 样品前处理条件

淀粉酶酶解法在文献^[16]的基础上改进: 称取 1 g 左右样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.02 g 淀粉酶, 加入 10 mL 超纯水, 涡旋混匀, 置于(40 \pm 5) $^{\circ}$ C 摇床摇荡 2 h, 至溶液基本澄清, 加水定容至 50 mL, 涡旋混匀, 超声 30 min 后 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机分析。

乙腈沉淀法(参照 SN/T 3927-2014《出口乳制品中硫氰酸钠的测定》): 称取 1 g 左右样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 水, 涡旋混匀, 样品糊化。往糊化的样品中再加入 5 mL 乙腈, 涡旋混匀, 超声提取 30 min 后 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后稀释十倍上机分析。

亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀法: 称取 1 g 左右样品, 置于 50 mL 离心管中, 加水 20 mL, 涡旋混匀, 加入 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 220 g/L 乙酸锌溶液各 1 mL, 涡旋混匀, 超声提取 30 min 后 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机分析。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法的选择

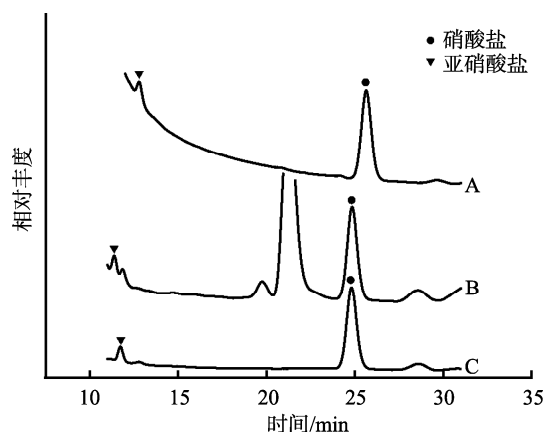
我国国家标准 GB 5009.33—2016 第一法中并未对米粉前处理提供合适的方法, 方法中植物性样品及肉蛋等类型样品的前处理并不适合于米粉的处理, 而对奶粉类样品

加入 3% 的乙酸溶液对米粉也不适合, 离心后上清液浑浊, 无法检测。考虑到高淀粉含量的米粉在用水提取过程中易糊化这一特殊性, 本研究根据文献及类似方法比较了 3 种样品前处理手段, 根据 1.2.2 的条件进行处理, 均能得到澄清的样品溶液。3 种前处理的样品经离子色谱仪分析后得到的谱图如图 1 所示。结果显示, 经淀粉酶酶解后的样品在亚硝酸盐出峰位置有干扰(图 1B), 导致亚硝酸盐与干扰峰未达到完全分离, 且相比较而言, 淀粉酶酶解引入了更多的杂质峰。采用亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀法处理的样品虽然对目标化合物没有干扰, 但因为引入了高含量离子试剂, 导致分析过程中基线不是很平稳, 容易引起定量不准确(图 1A)。由表 2 可知, 3 种前处理方法中硝酸盐的回收率均能达到 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测的要求》, 但亚硝酸盐的回收率及重现性相差比较大, 尤其是淀粉酶酶解法和亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法, 其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)大于 20%。3 种前处理方法中乙腈沉淀法峰型较好, 基线平稳, 比较适合米粉样品中硝酸盐和亚硝酸盐的测定(图 1C)。

2.2 沉淀剂比例的优化

鉴于米粉样品加水提取易糊化的特性, 加入乙腈可以破坏米粉的糊化现象, 产生澄清溶液^[17-18]。本研究比较了沉淀剂乙腈与提取试剂水的不同比例对硝酸盐和亚硝酸盐回收率的影响。根据图 2 所示, 乙腈:水比例为 1:9(V:V)时, 米粉糊化现象比较严重, 离心后溶液浑浊, 无法上机,

直至比例为 5:5 时, 提取液离心后比较澄清。研究发现, 硝酸盐和亚硝酸盐的回收率在 3:7 时大于 80%, 且随着乙腈体积的增加, 硝酸盐和亚硝酸盐的回收率也逐步稳定(图 3)。考虑到离子色谱系统中使用抑制器, 需要尽可能地降低乙腈的引入, 保护抑制器, 延长使用时间, 同时, 提取液澄清可以有效延长离子色谱柱的使用寿命, 本研究最终选择乙腈:水的比例为(5:5, V:V)。

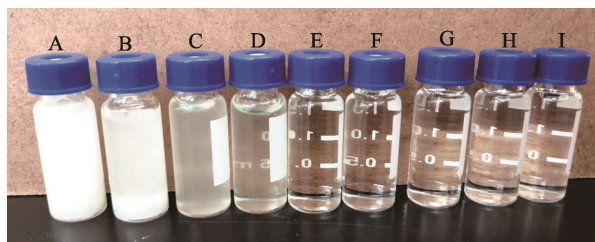


注: A: 亚铁氰化钾-乙酸锌溶液沉淀法; B: 淀粉酶酶解法; C: 乙腈沉淀法。

图 1 3 种前处理方法对色谱分离的影响
Fig.1 Effects of 3 kinds of pretreatment methods on chromatographic separation

表 2 3 种前处理方法提取回收效果(n=6)
Table 2 Effects of 3 kinds of pretreatment methods on recovery (n=6)

化合物	淀粉酶酶解法		乙腈沉淀法		亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
亚硝酸盐	161	46.3	95.2	4.18	113	86.8
硝酸盐	82.2	10.4	91.3	4.48	92.7	13.5



注: 乙腈:水体积比: A 1:9; B 2:8; C 3:7; D 4:6; E 5:5; F 6:4; G 7:3; H 8:2; I 9:1。

图 2 乙腈:水的体积比对提取效果的比较
Fig.2 Comparison of extraction effect of acetonitrile: water volume ratio

2.3 提取时间对提取效果的影响

鉴于硝酸盐和亚硝酸盐均为水溶性, 超声提取时间对硝酸盐和亚硝酸盐的提取也有一定影响。本研究比较了超声时间为 5、10、15、30、45 min 时硝酸盐和亚硝酸盐的提取效果。结果显示, 随着超声时间的增加, 硝酸盐的回收率逐渐增大, 到 30 min 后基本趋于稳定(图 4)。而亚硝酸盐随着超声时间的延长, 回收率虽然趋于稳定, 但超声时间的增加使得提取完全, 干扰杂质也增多, 直接影响亚硝酸盐的定量。因此, 本研究选择超声 30 min 为最佳提取时间。

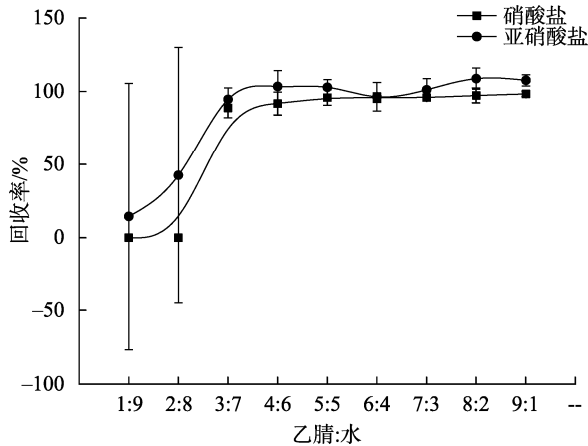


图3 乙腈:水的体积比对硝酸盐和亚硝酸盐的回收率的影响($n=6$)
Fig.3 Effects of acetonitrile: water volume ratio on the recovery of nitrate and nitrite ($n=6$)

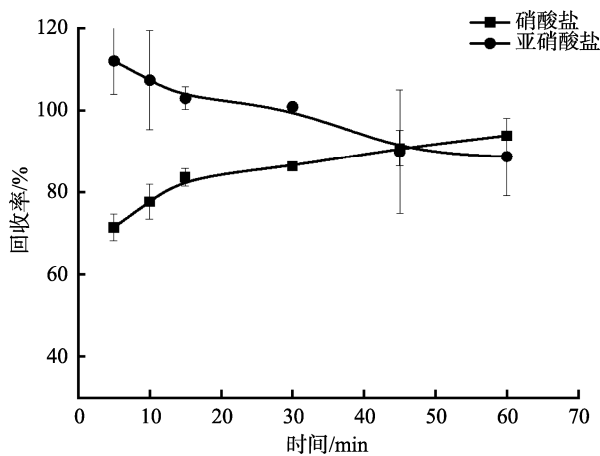


图4 提取时间对硝酸盐和亚硝酸盐的回收率的影响($n=6$)
Fig.4 Effect of extraction time on the recovery of nitrate and nitrite ($n=6$)

2.4 提取温度对提取效果的影响

婴幼儿米粉主要由大米制成, 含有大量的淀粉。淀粉不溶于冷水, 当被加热至一定温度时, 淀粉颗粒能够吸水膨胀, 水分子进入淀粉颗粒内部, 发生糊化。因此, 提取温度对硝酸盐及亚硝酸提取效果的影响至关重要^[19-20]。本研究探索了提取温度为 25、35、45、55、65 °C 时硝酸盐和亚硝酸的提取效果。研究表明, 不同的提取温度对硝酸盐的回收影响不大。相反, 提取温度对亚硝酸盐的影响比较明显, 当提取温度在 45 °C 以下时, 亚硝酸盐的回收比较稳定。而随着提取温度的逐渐上升, 亚硝酸盐的回收率逐渐下降, 且在色谱分离过程中亚硝酸盐出峰旁边出现干扰峰(图 5), 干扰峰与亚硝酸盐不能完全分离, 影响亚硝酸盐的定量。因此, 考虑到冬季和夏季室温的环境影响, 本研究选择提取温度为 35 °C。

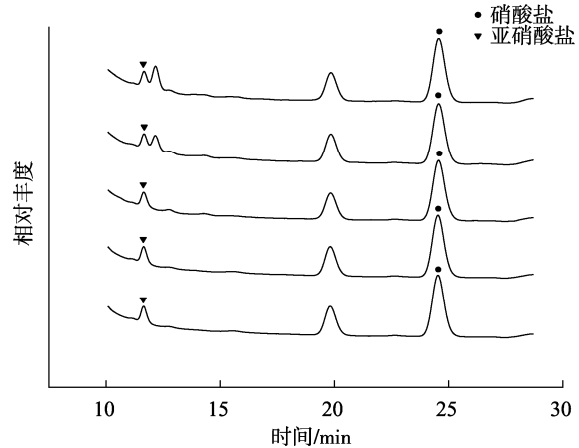


图5 提取温度对亚硝酸盐分离的影响
Fig.5 Effect of extraction temperature on nitrite separation

2.5 方法的线性范围、检出限和加标回收率

配制质量浓度 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mg/L 硝酸钠溶液和 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10 mg/L 的亚硝酸盐混合标准溶液, 在优化的条件下考察方法的线性范围, 硝酸盐在 0.1~1.0 mg/L, 亚硝酸盐在 0.01~0.10 mg/L 质量浓度范围线性良好, 线性相关系数 r^2 均大于 0.995。在空白样品中加入 0.1 mg/L 硝酸盐和 0.01 mg/L 亚硝酸盐标准溶液, 以 3 倍基线噪声测定硝酸盐和亚硝酸盐的检出限, 在取样量为 1 g, 定容体积为 100 mL 下分别为 0.8 mg/kg 和 0.2 mg/kg, 结果见表 3。

表3 硝酸盐的线性方程和相关系数
Table 3 Linear equation and correlation coefficient of nitrate and nitrite

化合物	标准曲线方程	线性范围 (mg/L)	相关系数 r^2	检出限 (mg/kg)
硝酸盐	$Y=0.3744X-0.0011$	0.1~1	0.9997	0.8
亚硝酸盐	$Y=0.3921X$	0.01~0.1	0.9977	0.2

分别向米粉样品中加入 2、20、50 mg/kg 的硝酸盐和 0.2、0.4、2.0 mg/kg 的亚硝酸盐, 各梯度处理 6 个平行样品, 扣除样品空白后, 硝酸盐和亚硝酸盐回收率如表 4, 其中硝酸盐的加标回收率在 95.1%~96.8%, 亚硝酸盐的加标回收率在 92.8%~95.7%, 2 种化合物的相对标准偏差均在 10% 以内。

3 结论

本研究采用乙腈沉淀-离子色谱法分离测定婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的含量, 通过对淀粉酶解法、乙腈沉淀法、亚铁氰化钾-乙酸锌沉淀法 3 种前处理方法的比较, 选择乙腈:水=5:5(V:V)为提取试剂, 在提取温度 35 °C

下超声提取 30 min, 米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的提取效果最好, 回收率在 92.8%~96.8% 之间, 硝酸盐检出限为 0.8 mg/kg、亚硝酸盐检出限为 0.2 mg/kg。本方法样品前处理简便快速、精密度高、回收率好, 适合于婴幼儿米粉中硝酸盐和亚硝酸盐的测定。

表 4 不同加标浓度硝酸盐和亚硝酸盐回收率($n=6$)
Table 4 Recovery rate of nitrite and nitrate at different standard addition concentration ($n=6$)

化合物	亚硝酸盐 (以亚硝酸钠计)			硝酸盐 (以硝酸钠计)		
	0.2	0.4	2.0	2	20	50
理论加标量 (mg/kg)	0.2	0.4	2.0	2	20	50
回收率/%	93.3	92.8	95.7	96.8	95.1	95.9
RSD/%	8.07	6.51	3.22	9.05	3.09	5.30

参考文献

- [1] 李湖中, 王素芳, 韩军花, 等. 《婴幼儿谷类辅助食品》(GB 10769—2010)跟踪评估研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 259–264.
LI HZ, WANG SF, HAN JH, *et al.* Research on the evaluation of GB 10769—2010 *National food safety standard Cereal-Based complementary foods for infants and young children* [J]. *Chin J Food Hyg*, 2013, 25(3): 259–264.
- [2] RUTH AP, HANNAH OO, PAA-NII TJ, *et al.* Complementary foods from rice and six other Ghanaian food ingredients provide sufficient macro and micronutrients for infants 6-12 Mo of age [J]. *J Food Nutr Sci*, 2017, 5(3). DOI: 10.11648/j.jfns.20170503.14
- [3] VARGAS E, BLANCO A, LASTRETO C, *et al.* Biological evaluation of an infant food based on soybean, rice and banana [J]. *Arch Latinoam Nutr*, 1985, 35(1): 90.
- [4] KROUPOVA H, MACHOVA J, SVOBODOVA Z. Nitrite influence on fish: A review [J]. *Vet Med*, 2005, 63: 461–471.
- [5] LUO S, WU B, XIONG X, *et al.* Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2016, 35(6): 1422–1427.
- [6] NIKLAS T, MAGNUS D, OLLE H, *et al.* Effects of age, sex and diet on salivary nitrate and nitrite in infants [J]. *Nitric Oxide*, 2020, 94: 73–78.
- [7] SAMUEL JG, AMELIA F, RAKESH PP, *et al.* Airway nitrite is increased in extremely preterm infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Respir Res*, 2020, 21: 244.
- [8] CHEN YY, ZHAO CX, YUE GZ, *et al.* A highly selective chromogenic probe for the detection of nitrite in food samples [J]. *Food Chem*, 2020, 31(7): 126361.
- [9] MIAO PD, LIU ZD, GUO J, *et al.* A novel ultrasensitive surface plasmon resonancebased nanosensor for nitrite detection [J]. *Rsc Adv*, 2019, (9): 17698.
- [10] DIEGODOS SB, CARLOS AC, VANIA M, *et al.* Quantitative and comparative contents of nitrate and nitrite in *Beta vulgaris* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence [J]. *Food Anal Methods*, 2016, 9(4): 1–7.
- [11] DELLA BF, PEREIRA LM, SIQUEIRA MA, *et al.* A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis [J]. *Meat Sci*, 2016, 119(sep): 62–68.
- [12] GILANI MR, ZHAO JM, LOU BH, *et al.* Electrochemical sensing of nitrite at aminophenol formaldehyde polymer/phosphomolybdic acid nanocomposite modified electrode [J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45(4): 1709–1712.
- [13] SALEH A, POLY RP, SYED SS, *et al.* Activated jute carbon paste screen-printed FTO electrodes for nonenzymatic amperometric determination of nitrite [J]. *J Electroanal Chem*, 2019, 832: 368–379.
- [14] KHODAEI H, MOGADDAM M, HAMIDI AA, *et al.* Determination and validation of simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction method for analysis of nitrate and nitrite contents as nitrate ions in onion and potato samples [J]. *Sep Sci Plus*, 2020, 3(6): 225–234.
- [15] BILIADERIS CG, MAURICE TJ, VOSE JR. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry [J]. *J Food Sci*, 2006, 45(6): 1669–1674.
- [16] 周柳金, 郑巨瑞, 李凤标, 等. 酶水解-离子色谱法同时测定婴幼儿谷物辅助食品中亚硝酸盐和硝酸盐含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(16): 1942–1944.
ZHOU LJ, ZHENG JR, LI FB, *et al.* Simultaneous determination of nitrate and nitrite contents in infant cereals by enzymatic hydrolysis coupled with ion chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2020, 30(16): 1942–1944.
- [17] ZHIVKA G, MARIA M, MARIANNA B. Influence of functional ingredients on starch gelatinization in sponge cake batter [J]. *Food Chem*, 2019, 297: 124997.
- [18] RGMVANDER S, LISA JM. Starch gelatinization temperature in sugar and polyol solutions explained by hydrogen bond density [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 94: 371–380.
- [19] ZENG M, MOMIS CF, BATEY IL, *et al.* Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat [J]. *Cereal Chem*, 1997, 74(1): 63–71.
- [20] HAMAKER BR, GRIFFIN VK. Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting [J]. *Cereal Chem*, 1993, 70(4): 377–380.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



冷桃花, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。
E-mail: length@sqi.org.cn