

离子色谱法测定肉制品中亚硝酸盐与硝酸盐的改进研究

Improved research for determination of nitrite and nitrate in meat products by Ion Chromatography

刘岚松¹ 康绍英¹ 张丽¹

LIU Lan-song¹ KANG Shao-ying¹ ZHANG Li¹

杨红美² 张继红¹ 荆辉华¹

YANG Hong-mei² ZHANG Ji-hong¹ JING Hui-hua¹

(1. 湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410111; 2. 湖南省产商品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410007)

(1. Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Changsha, Hunan 410111, China;

2. Hunan Testing Institute of Product and Commodity Supervision, Changsha, Hunan 410007, China)

摘要:改进中国 GB 5009.33—2010 标准方法中离子色谱法测定肉制品中亚硝酸盐与硝酸盐的样品前处理条件。GB 5009.33—2010 标准采用滤纸过滤样品提取液除脂肪, 研究发现滤纸的使用会干扰硝酸盐检测导致其结果严重偏高。本研究改用三氯甲烷除去脂肪有效地解决了该标准方法存在的弊端, 同时查明了肉制品中硝酸盐普遍超标并非因企业违规使用含有硝酸盐的添加剂, 而是因加工过程中使用了富含硝酸盐的香辛料、辣椒等植物性原料本底。试验证明: 改进方法简便、快速、灵敏、准确, 适用于肉制品中亚硝酸盐与硝酸盐的定量测定。亚硝酸盐和硝酸盐在所测浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, 加标回收率为 94.5%~100.5%, 相对标准偏差(RSD)为 0.70%~3.5%。

关键词:改进; 离子色谱; 肉制品; 亚硝酸盐; 硝酸盐

Abstract: Improvement of sample pretreatment conditions of ion chromatography method of national standard methods to determinate the nitrite and nitrate in meat products. The national standard methods employ filter paper to remove the fat in the sample extract. However, it is found the usage of filter paper can disturb the detection of nitrate, and cause serious high detection results. In this study, using chloroform to remove the fat can efficiently solve the disadvantages exist in the national standard methods. The generally exceed the standard of nitrate in the meats is not caused by the enterprise of illegal use of additives containing nitrate, and it is caused by the usage of spice, which is rich in nitrate, and peppers etc. plant

material in the process of machining. Experiments proved that the improved method is simple, rapid, sensitive, accurate and suitable for the quantitative determination of nitrite and nitrate in meat products. Nitrite and nitrate in the measured concentration range showed a good linear relationship with the peak area. The recoveries were between 94.5% and 100.5%. The relative standard deviations were between 0.70% and 3.5%.

Keywords: improve; ion chromatography; meat products; nitrite; nitrate

在肉制品加工生产中, 亚硝酸盐和硝酸盐通常作为护色剂和防腐剂使用, 它们不仅可以使肉制品保持其鲜艳的色泽, 更重要的是可以抑制肉毒梭菌的生长和繁殖, 此外还能改善产品风味。硝酸盐在硝酸盐还原菌的作用下可转化为亚硝酸盐, 在酸性条件下进一步转化为亚硝酸, 亚硝酸易分解出亚硝基并很快与肌红蛋白结合生成鲜艳的、亮红色的亚硝基红蛋白, 从而赋予肉品鲜艳的红色^[1]。亚硝酸盐在人体内转化成亚硝胺, 而亚硝胺是早已公认的致癌物质^[2], 除致癌外, 还会引起胎儿畸形和胎盘毒性^[3,4]。硝酸盐是亚硝酸盐的前体物质, 在人体内也可转化为亚硝酸盐, 因此硝酸盐往往表现为亚硝酸盐的毒性。关于硝酸盐和亚硝酸盐使用不当引起的食物中毒事故已发生多起。从 2013 年起, 中国食品药品监督管理局和湖南省食品药品监督管理局都将肉制品中硝酸盐含量纳入风险监测项目, 重点关注肉制品中硝酸盐含量对消费者身体健康及食品安全可能带来的危害。GB/T 5009.33—2003 中采用传统光度法测定亚硝酸盐和硝

作者简介:刘岚松(1964—), 男, 湖南省食品质量监督检验研究院高级工程师。E-mail: liuls55@qq.com

通讯作者:康绍英

收稿日期:2015-01-09

酸盐的含量,其原理是试样中亚硝酸盐在弱酸条件下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。采用镉柱将硝酸盐还原成亚硝酸盐,测得亚硝酸盐总量,减去试样中亚硝酸盐本身的含量,即得试样中硝酸盐含量^[5]。若样品本身有颜色,会影响比色结果进而影响检测结果的准确性,且镉柱还原法操作比较繁琐,结果受镉柱还原效率的影响大。因此,2008 年中国修订了食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定方法,将仲裁法定为离子色谱法,以此代替操作繁琐且需要使用有害试剂的光度法^[6],并于 2010 年将该方法提升为食品安全国家标准^[7],近几年也出现了一些应用离子色谱法检测食品中的亚硝酸盐和硝酸盐的文献报道^[8,9]。但笔者在实际检测过程中发现国家标准仲裁法存在一定的缺陷性:在样品前处理中样品提取液用滤纸过滤,滤纸本身对硝酸盐的检测存在一定的干扰,导致硝酸盐的检测结果严重偏高,从而影响硝酸盐的准确定量,且定性滤纸的干扰远远大于定量滤纸。本研究拟以中国 GB 5009.33—2010 标准为基础,对样品前处理方法进行改进,旨在有效消除杂质物质对硝酸盐检测的干扰,为食品安全监管提供了更可靠的检测数据支撑;研究还查明了湖南肉制品硝酸盐大面积超标的行业问题,对指导企业安全生产提高湖南省肉制品产品在市场上的竞争力具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

离子色谱仪:ICS-3000 型,带电导检测器和抑制器,可进行二步梯度洗脱,美国 DIONEX 公司;

电子天平:BS224S 型,赛多利斯(北京)仪器系统有限公司;

超声波清洗器:KQ-500B 型,昆山市超声仪器有限公司;

水浴锅:DK-98-II a 型,天津市奥斯特仪器有限公司;

离心机:TG16-WS 型,长沙市平凡仪器有限公司;

净化柱:包括 C₁₈ 柱(600 mg,6 mL)、Ag 柱和 Na 柱,上海安谱科学仪器有限公司;

固相萃取装置:VM12 型,天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 试剂

超纯水:电阻率>18.2 MΩ·cm,本实验室自制;

三氯甲烷:分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司;

甲醇:色谱纯,美国 Tedia 公司;

氢氧化钠溶液(50%,*m/m*):飞世尔实验器材(上海)有限公司;

200 mmol/L 氢氧化钠溶液:准确移取氢氧化钠溶液(50%,*m/m*)10.5 mL,用水稀释至 2 000 mL 摇匀;

亚硝酸根(NO₂⁻)标准溶液(1 000 mg/L,水基体):德国 MERCK 公司;

硝酸根(NO₃⁻)标准溶液(1 000 μg/mL,水基体):中国

计量科学研究院。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制

(1) 混合标准工作液:分别准确移取亚硝酸根和硝酸根的标准溶液 0.25 mL 和 2.5 mL 于 25 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,得到混合标准工作液,此溶液每 1 L 含亚硝酸根 10 mg 和硝酸根 100 mg。

(2) 标准工作溶液:准确移取一定量的混合标准工作液,用水稀释,制成系列标准工作溶液,亚硝酸根离子浓度为 0.00,0.02,0.04,0.08,0.10,0.15,0.20 mg/L;硝酸根离子浓度为 0.0,0.2,0.4,0.8,1.0,1.5,2.0 mg/L。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:戴安公司 IonpacTM AS19 分析柱(4 mm×250 mm)和 IonpacTM AG19 保护柱(4 mm×50 mm);柱温:30℃;抑制器:戴安 ASRS 4 mm 阴离子抑制器,抑制电流 112 mA;检测器:电导检测器,检测池温度 35℃;进样体积:500 μL;淋洗液:A:200 mmol/L 氢氧化钠溶液,B:纯水,流速 1.0 mL/min,梯度洗脱条件:0~10 min,10% A;10~25 min,10%~45% A;25~30 min,45% A;30~36 min,10% A。

1.3.3 样品提取 称取 2 g 样品于 100 mL 比色管中,加水 80 mL,超声提取 30 min,每隔 5 min 振摇一次,保持固相完全分散。于 75℃水浴中放置 5 min,取出放置至室温,加水稀释至刻度并充分摇匀。取约 8 mL 溶液于 10 mL 具塞塑料离心管中,加 1 mL 三氯甲烷剧烈振摇后于 10 000 r/min 离心 15 min,上清液备用。

1.3.4 样品净化 固相萃取柱使用前需进行活化,其活化过程为:C₁₈ 柱使用前依次用 10 mL 甲醇和 15 mL 超纯水通过,静置活化 30 min;Ag 柱和 Na 柱使用前用 10 mL 超纯水通过,静置活化 30 min。将活化后的 C₁₈ 柱、Ag 柱和 Na 柱依次串联并将其连接在固相萃取装置上,取上清液经固相萃取小柱于固相萃取装置上自动过柱净化,将真空泵与固相萃取装置连接,调节压力以控制流速 1 mL/min,使上清液依次通过 C₁₈ 柱、Ag 柱和 Na 柱,弃去前面 3 mL,收集后面的洗脱液经 0.22 μm 水性针头过滤器后进样测试。

2 结果与分析

2.1 样品提取条件的改进

前期试验中,研究发现 GB 5009.33—2010 标准方法在前处理过程中采用滤纸过滤会对硝酸盐的检测带入本底干扰。为了消除滤纸使用引入的干扰,起初采用样品提取液离心后取上清液直接过固相萃取柱净化,但由于肉制品脂肪含量高,过柱净化速度很慢,导致检测工作效率低。后来尝试使用三氯甲烷除去样品中的脂肪后离心得到澄清的提取液,试验结果表明:用三氯甲烷处理后的提取液很容易通过净化小柱,大大缩短了样品过柱净化的时间。为了证明三氯甲烷的使用不会影响检测结果的准确性,采用 8 个肉制品样品做

了一组比较试验,取同一份样品提取液中的一部分离心后直接过净化小柱,而另一部分用三氯甲烷除去脂肪后再离心过净化小柱,两种处理方法硝酸盐检测结果对比见表 1。由表 1 可知,使用三氯甲烷除脂肪的处理过程不会影响检测结果的准确性。同时选取 3 个样品做了一组对比试验来说明滤纸对检测结果的影响,同一样品提取液分别按 GB 5009.33—2010 标准方法和改进方法处理,其检测结果见表 2。由表 2 可知,GB 5009.33—2010 标准方法中滤纸的使用导致硝酸盐的检测结果严重偏高。

表 1 两种处理方法结果对比

Table 1 Results were given by two kinds of treatment methods ($n=3$)			
样品	直接过柱结果/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	除脂肪后过柱结 果/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RSD/ %
风鹅	7.8	8.4	2.45
牛筋大王	41.5	43.2	1.47
牛筋大王	35.2	36.8	2.89
咔咔脆骨	35.8	35.1	3.07
功夫鸭翅	20.8	21.1	2.18
麻辣牛肉干	55.6	54.8	1.12
柳叶湖酱板鸭	40.8	42.0	2.54
缺牙齿黄金鸡爪	47.3	48.0	3.43

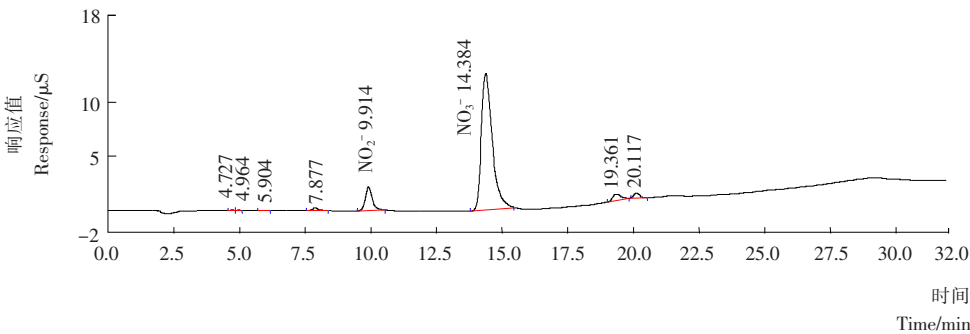


图 1 亚硝酸盐和硝酸盐标样的色谱图

Figure 1 The chromatograms for nitrite and nitrate standard

2.3 回收率和精密度

选取未检出亚硝酸盐和硝酸盐的空白样品做加标回收试验,在空白样中添加表 4 中所列的 3 组浓度水平的亚硝酸盐和硝酸盐,按上述试验条件进行加标回收试验,每个浓度水平平行测定 6 次,其回收率和精密度结果见表 4。由表 4 可知,平均加标回收率在 94.5%~100.5%,相对标准偏差在 0.70%~3.50%,说明本方法的精密度好,能满足肉制品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定要求。

2.4 验证结果及超标原因分析

用改进方法检测湖南生产的肉制品样本共 185 份,其中亚硝酸盐含量合格率为 98.4%,超标率 1.6%;硝酸盐含量合格率为 76.8%,超标率 23.2%(表 5)。

表 2 滤纸对检测结果的影响

Table 2 Effect of filter paper on detection results ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
样品	滤纸过滤结果	改进方法结果
牛筋大王	53.1	43.2
麻辣牛肉	73.5	58.6
香辣鸡腿	17.3	5.3

2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的标准工作溶液依次进样分析,以亚硝酸根离子或硝酸根离子的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标作图,得到亚硝酸根和硝酸根的标准曲线、线性回归方程、相关系数,结果表明亚硝酸根和硝酸根在各自浓度范围内线性关系好,检出限分别为 0.02 mg/kg 和 0.04 mg/kg(见表 3),标样色谱图见图 1。

表 3 亚硝酸盐和硝酸盐的线性方程、线性范围和相关系数

Table 3 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and LOD of nitrite and nitrate				
分析物	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回归方程	R^2	检测限/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
亚硝酸根	0.02~0.20	$y=3.312x$	0.999 4	0.02
硝酸根	0.20~2.00	$y=2.983x$	0.999 8	0.04

表 4 回收率和精密度试验

Table 4 The recovery and the precision test ($n=6$)					
样品	分析物	添加量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测定值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均回 收率/%	精密度 RSD/%
香肠	亚硝酸盐	2.0	1.89	94.5	3.5
		10.0	9.81	98.1	2.7
		20.0	20.10	100.5	1.5
香肠	硝酸盐	2.0	1.95	97.5	2.1
		10.0	9.97	99.7	1.2
		20.0	19.76	98.8	0.70

表 5 肉制品中亚硝酸盐和硝酸盐检测结果				
Table 5 The detection results of nitrite and nitrate in meat products				
分析物	检测份数	超标份数	合格率/%	超标率/%
亚硝酸盐	185	3	98.4	1.6
硝酸盐	185	43	76.8	23.2

由表 5 可知,目前湖南肉类加工企业使用亚硝酸盐的情况良好,这得益于食品监管部门的高度重视;对少数亚硝酸盐残留量超标的企业,有必要加强食品安全风险意识教育,使生产销售企业员工了解过量使用亚硝酸盐的危害。但是抽检结果表明湖南肉制品硝酸盐含量超标问题非常严重,为了查明硝酸盐大面积超标的原因,监管人员对相关企业进行了走访摸底调研,企业均表明在加工过程中没有使用硝酸盐,监管人员现场也未发现有硝酸盐类物质。为了查明问题真相,从产品原辅材料方面展开了风险排查,对新鲜畜禽产品、食用盐、干辣椒、香辛料等进行摸底检测,结果表明新鲜畜禽产品、食用盐带入硝酸盐的含量甚微,几乎可以忽略不计,而在干辣椒和香辛料中检出高含量的硝酸盐,结果在 68~934 mg/kg。经核实硝酸盐超标产品的标签中均标示有香辛料,因此肉制品中硝酸盐含量超标并非企业违规添加,而是由香辛料、辣椒等植物性原料本底带入。这一结论在孙震钱等^[10]的研究中得到印证,该文献提及 1973 年世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)制订了食品中硝酸盐的限量标准,并且将蔬菜中硝酸盐积累程度分为四级:一级≤432 mg/kg,允许生食;二级≤785 mg/kg,不宜生食,允许盐渍和熟食;三级≤1 440 mg/kg,只能熟食;四级≥3 100 mg/kg,不能食用,该限量标准说明植物能积累较高含量的硝酸盐,而蔬菜中的硝酸盐残留量过高也已成为世界各国普遍关注的问题,因此肉制品生产企业在加工过程中使用本身富含硝酸盐的香辛料、辣椒等极易导致产品硝酸盐超标。

3 结论

本试验建立了一种同时测定肉制品中亚硝酸盐和硝酸盐的离子色谱方法,改进了现有国家标准方法中的样品前处理条件,有效地消除了杂质物质对硝酸盐检测的干扰,使之能够满足日常检测工作中准确定量检测的需求,同时查明了湖南肉制品硝酸盐普遍超标的真正原因。笔者建议肉制品生产企业在加工过程中使用香辛料、辣椒等起调香、调味、掩盖异味、抑臭、赋予辣味及着色等作用时,在达到预期目的前提下尽可能降低其在产品中的使用量以控制产品中硝酸盐的含量;广大种植者应减少化学氮肥的使用,从源头降低植物大量积累硝酸盐的风险。

参考文献

1 杨惠芬,李明元,沈文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社,1997:370.

2 鲁本契克. 饮食致癌物和癌[M]. 北京:人民出版社,1983:184~188.

3 夏延斌. 食品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2001:358~360.

4 陈青川,牟世芬. 离子色谱在药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志,1997(1):54~58.

5 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.33—2003 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

6 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.33—2008 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

7 中华人民共和国卫生部. GB 5009.33—2010 食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

8 张艳,严利民,高萍. 离子色谱法测定牛奶或奶粉中亚硝酸盐 硝酸盐及氯化物[J]. 食品与机械,2006(3):139~141.

9 郭坚,何光源,崔海容,等. 抑制型离子色谱法检测蔬菜中的亚硝酸盐与硝酸盐[J]. 检验检疫学刊,2010(6):16~18.

10 孙震钱,蒋将. 蔬菜中硝酸盐与亚硝酸盐检测方法的研究进展[J]. 食品与机械,2006(5):123~125.

信息窗

西班牙展示 3D 打印肉 用类似肉纤维蛋白食材喷涂堆积而成

3月17日消息 据中国之声《新闻纵横》报道,鸡肉、鸭肉、鱼肉都不稀罕,您吃过打印肉吗?近日,在西班牙塞维利亚举行的“奇点大学第三届欧洲峰会”上这“打印肉”可谓吸人眼球。原来,这“打印肉”就是用类似肉纤维蛋白的食材,一点点喷涂堆积成肉形状的 3D 打印技术。目的是为了提

高全球食品供应能力,节省资源消耗,就是不知道未来从打

印机里出来的肉味道怎么样? 您敢不敢吃?

这次峰会的主办方奇点大学是美国未来学家库兹韦尔等人在硅谷成立的一家机构,用来探索未来科技对人类的影响。它借用了数学和物理上的“奇点”概念,来表示未来科技可能出现的如今人们难以想象的进步。

(来源:www.foodmate.net)