

顶空—气相色谱法测定食品中亚硝酸盐

Determination of nitrite in food by using headspace-gas chromatography

何 浩 陈幸莺 孙映球 赵 娟

HE Hao CHEN Xing-ying SUN Ying-qiu ZHAO Juan

(湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411100)

(Xiangtan Institute for Food and Drug Control, Xiangtan, Hunan 411100, China)

摘要:对顶空—气相色谱测定饮用水、烟笋、外婆菜和烤耳尖中亚硝酸含量进行研究,建立亚硝酸盐的快速、准确、定量检测方法,对该方法的反应机理进行推断,并用顶空—气质联用仪对反应产物进行验证。烟笋、外婆菜和烤耳尖经粉碎、沸水提取、沉淀剂沉淀和过滤后,取样品溶液分析,饮用水直接取样分析。样品处理液中先后加入环己氨基磺酸钠溶液和硫酸溶液,在顶空瓶中 50 ℃ 条件下发生重氮化反应,以衍生产物环己烯作为目标产物,定量分析。结果表明,低浓度标准物质标准曲线 r^2 为 0.999 0,取样量为 5 mL 时,对应的检测范围为 0.001~0.200 mg/L;高浓度标准物质标准曲线 r^2 为 0.999 5,取样量为 3 g 时,对应的检测范围为 0.67~167.00 mg/kg。该方法检出限低,线性范围宽,重复性和回收率好,是快速检测食品中亚硝酸盐较好的方法。

关键词:亚硝酸盐;顶空;气相色谱;气质联用;反应机理;环己烯

Abstract: The determination of nitrite content in drinking water, smoked bamboo shoot, grandmother food and roasted ear tip was studied by using headspace-gas chromatography, and a fast, accurate and quantitative detection method of nitrite was established. The reaction mechanism of this method was deduced, and the relative products were validated by the headspace gas chromatography-mass spectrometry. The sample solution of smoked bamboo shoot, grandmother food and roasted ear tip were analyzed after crushing, boiling water extraction, precipitation and filtration, and then sodium cyclamate and sulfuric acid solution were added to pretreated sample. Diazo reaction was reacted in headspace bottle at 50 ℃, using the derivatives of cyclohexene as the target product and quantitative analysis. In this paper, the low concentration standard material standard curve r^2 was 0.999 0. Moreover, the corresponding detection range was 0.001 ~ 0.200 mg/L when 5 mL sample was used. However, the high concentration standard material standard curve

r^2 was 0.999 5, and the corresponding detection range was 0.67 ~ 167.00 mg/kg while was 3 g sample was used. It was verified to be a good method for the detection of nitrite in food, with low detection limit, wide linear range, and good repeatability and recovery rate.

Keywords: nitrite; headspace; gas chromatography; gas chromatography-mass spectrometer; reaction mechanism; cyclohexene

亚硝酸盐广泛存在于环境中,是食品工业中最常用的护色剂和防腐剂之一,可与肉品中的肌红蛋白反应生成玫瑰色亚硝基肌红蛋白,增进肉的色泽,还具有改善肉的风味和防腐的作用,防止肉毒梭菌的生长和延长肉制品的货架期^{[1]267}。但过量的亚硝酸钠会致癌。亚硝酸钠在烹调 and 消化过程中会和食物中的胺反应,产生致癌物质亚硝胺类化合物^{[1]268}。GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定,普通肉制品类亚硝酸盐残留量(以 NaNO_2 计) ≤ 30 mg/kg,肉罐头类 ≤ 50 mg/kg,西式火腿 ≤ 70 mg/kg,其他食品中不得添加。泡菜及变质的蔬菜中化学物质也可转化成为亚硝酸盐。食品和饮用水中亚硝酸盐并不一定是人工添加的,因为食品在加工和存放过程中也会生成亚硝酸盐^{[1]267-268}。目前,检测食品中亚硝酸盐的方法主要有分光光度法^[2]、离子色谱法^[3-4]、气相色谱法(ECD 检测器)^[5]、顶空—气相色谱法(FID 检测器)^[6-9]、顶空—气质联用法^[10]等。本试验拟探讨顶空—气相色谱(FID 检测器)检测食品和包装饮用水中亚硝酸盐,在前人研究的基础上^[6-9]改进样品前处理步骤,并对试验过程进行优化和改进,建立饮用水和其它复杂基质食品中亚硝酸盐的测定都适用的方法。本试验对反应机理进行预测,并用顶空—气质联用仪对反应产物进行验证,为检测各种食品基质中亚硝酸盐提供一种快速、灵敏、准确的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

亚硝酸钠:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

四硼酸钠(硼砂):分析纯,天津市永大化学试剂有限

作者简介:何浩(1986—),男,湘潭市食品药品检验所工程师,硕士。
E-mail: 710754686@qq.com

收稿日期:2017—01—05

公司；

亚铁氰化钾:分析纯,天津市光复科技发展有限公司；

二水乙酸锌:分析纯,西陇化工股份有限公司；

环己基氨基磺酸钠:化学纯,≥98.0%,天津市光复精细化工研究所；

浓硫酸:分析纯,湖南省株洲市化学工业研究所；

DB-1 石英毛细管柱:15.0 m×0.53 mm,0.50 μm,美国安捷伦科技有限公司；

HP-5MS 石英毛细管柱:30 m×0.32 mm,0.25 μm,美国安捷伦科技有限公司；

高纯氮气:纯度≥99.999%,湖南湘钢梅塞尔气体产品有限公司金阳分公司；

高纯氮气:纯度≥99.999%,广州市恒源气体有限公司。

1.2 仪器与设备

顶空进样器:HSS86.50 plus 型,意大利 DANI 公司；

气相色谱仪:GC2010plus 型,配 FID 检测器,日本岛津公司；

全自动空气源:SPB-3 型,北京中惠普分析技术研究所；

空气发生器:SPH-300 型,北京中惠普分析技术研究所；

顶空—气相色谱—质谱联用仪:7697A-7890A-5975C 型,配 NIST 11 谱库,美国安捷伦公司；

电子天平:ATY224 型,日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准物质和主要溶液的配制 准确称取 0.062 5 g 于 110 ℃干燥至恒重的亚硝酸钠,加水溶解后移入 250 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀,配成浓度为 250.0 μg/mL 的亚硝酸钠标准储备液 A。将亚硝酸钠标准储备液分别逐级稀释到 5.0,0.5,0.05 μg/mL,作为标准使用液 B、C、D。标准储备液置于 4 ℃的冰箱中可保存 2 个月,标准使用液 B、C、D 现配现用。乙酸锌溶液:220 g/L,每 1 000 mL 中加入 30 mL 冰乙酸;亚铁氰化钾溶液:106 g/L;饱和硼砂溶液。

1.3.2 样品前处理 将固体样品用匀浆机打碎,称取 3 g(精确至 0.000 1 g)样品至 100 mL 试管中,加入 5.0 mL 饱和硼砂溶液,摇匀,加入 60 mL 70 ℃的热水,在沸水浴中加热 15 min,冷却至室温。在提取液中加入 2.0 mL 亚铁氰化钾溶液,摇匀后加入 2.0 mL 乙酸锌溶液,摇匀,定容至刻度后摇匀,静置 30 min,备用。上清液用滤纸过滤,弃去 10.0 mL 初始滤液,滤液备用。

液体样品(包括含酒精或二氧化碳的饮料和饮用水)可直接取样 5.0 mL 至顶空瓶中分析。

1.3.3 顶空方法 加热箱温度 50 ℃,定量环温度 55 ℃,传输线温度 60 ℃,GC 循环时间 11.0 min,样品瓶平衡时间 30.0 min,定量阀体积 1.0 mL。

1.3.4 气相色谱参数

(1) 柱箱升温程序:80 ℃(保持 1 min),40 ℃/min 升温到 100 ℃(保持 2 min),40 ℃/min 升温到 200 ℃(保持 2 min),共 8 min。

(2) 其他色谱参数:气化室温度 150.0 ℃,FID 检测器温度 300.0 ℃,载气为高纯氮气,氢气流量 40.0 mL/min,空气流量 400.0 mL/min,色谱柱流量 1.99 mL/min,尾吹气流量

30.0 mL/min,分流比 20:1。

1.3.5 气质联用仪参数

(1) 柱箱升温程序:80 ℃(保持 1 min),25 ℃/min 升温到 155 ℃(保持 6 min),共 10 min。

(2) 其他色谱和质谱参数:气化室温度 150.0 ℃,载气为高纯氮气,色谱柱流量 1.0 mL/min,分流比 100:1,气质接口温度 280 ℃,离子源温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,EI 能量 70 eV,溶剂延迟时间 0.0 min,扫描方式为全扫描,扫描质量数 30~250 amu。

1.3.6 亚硝酸盐的测定 向 8 个顶空瓶中分别加入 0.0, 0.1,0.2,0.5,1.0,5.0 mL 标准使用液 D 和 1.0,2.0 mL 标准使用液 C(相当于 0.000,0.005,0.010,0.025,0.050,0.25,0.500,1.000 μg 亚硝酸钠),补齐水至 5 mL,加入 1.0 mL 10 mg/mL 环己基氨基磺酸钠溶液,摇匀放置 2 min,加入 1.0 mL 100 g/L 硫酸溶液,迅速压紧瓶盖,摇匀,上机。以亚硝酸钠与环己基氨基磺酸钠的衍生产物环己烯作为目标物质,绘制低浓度标准曲线,该曲线适应于纯净水和矿泉水中亚硝酸盐的检测。

向 6 个顶空瓶中分别加入 0.0,0.1,0.2,1.0,2.0,3.0 mL 标准使用液 B(相当于 0.0,0.5,1.0,5.0,10.0,15.0 μg 亚硝酸钠),其他步骤同低浓度标准曲线。绘制成高浓度标准曲线,该曲线适应于其他食品中亚硝酸盐的检测。

向顶空瓶中加入 5.0 mL 1.3.2 样品处理滤液或液体样品,其他步骤同低浓度标准曲线,上机检测。

2 结果与分析

2.1 顶空—气相色谱试验结果

0.5 μg 亚硝酸钠标准物质、饮用水、烤耳尖气相色谱图分别见图 1~3。以亚硝酸钠进样量(μg)为横坐标,以峰面积为纵坐标,分别绘制低浓度和高浓度标准曲线,见图 4~5,低浓度标准曲线中峰面积为扣除去离子水作为空白的峰面积值。亚硝酸盐衍生产物保留时间为 1.750 min。低浓度标准曲线适合于纯净水和矿泉水中亚硝酸盐的检测,线性方程为: $y=11\,149x+377.8$, r^2 为 0.999 0,取样量为 5.0 mL 时,对应的检测范围为 0.001~0.200 mg/L。高浓度标准曲线适合于其他食品中亚硝酸盐的检测,线性方程为: $y=11\,417x+3\,623.7$, r^2 为 0.999 5,称样量为 3 g 时,对应的检测范围为 0.67~167.00 mg/kg。

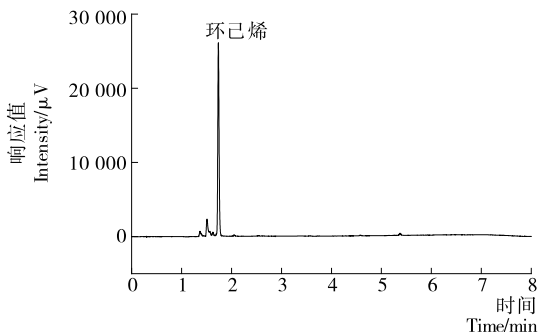


图 1 0.5 μg 亚硝酸盐标准物质气相色谱图
Figure 1 Gas chromatogram of 0.5 μg nitrite standard substance

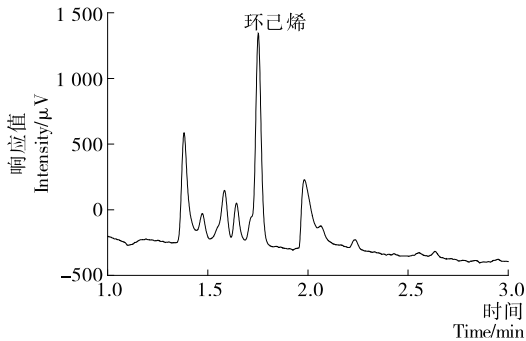


图 2 饮用水中亚硝酸盐气相色谱图
Figure 2 Gas chromatogram of nitrite in drinking water

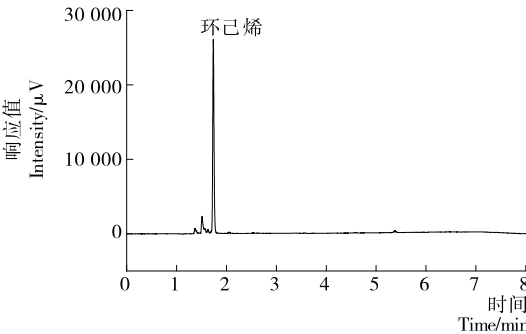


图 3 烤耳尖中亚硝酸盐气相色谱图
Figure 3 Gas chromatogram of nitrite in roasted ear tip

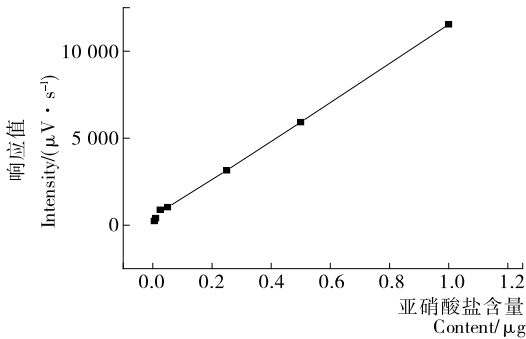


图 4 低浓度标准物质标准曲线(以 NaNO₂ 计)
Figure 4 Standard curve of low concentration (evaluated by NaNO₂)

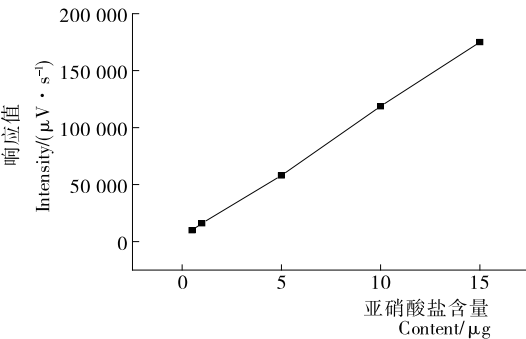


图 5 高浓度标准物质标准曲线(以 NaNO₂ 计)
Figure 5 Standard curve of high concentration (evaluated by NaNO₂)

2.2 顶空—气质联用仪验证结果

用顶空—气质联用仪对亚硝酸盐标准物质衍生物进行分析,总离子流图见图 6,主要衍生产物的出峰时间为

1.642 min,用 Nist 11 谱库对其进行检索,证实了该反应产物为环己烯,其特征离子为 $m/z=54,67,82$,质谱图见图 7。环己基亚硝酸酯的特征离子为 $m/z=57,82,98$,对亚硝酸盐衍生物提取这 3 个特征离子未发现特征峰。证实了顶空气相反应的原理为亚硝酸钠和环己基氨基磺酸钠在酸性条件、常温状态下重氮化反应生成环己烯,在 50 ℃ 顶空瓶中,环己烯挥发到顶空瓶上方气体相部分。GB 5009.97—2003《食品中环己基氨基磺酸钠的测定》中表明,亚硝酸钠和环己基氨

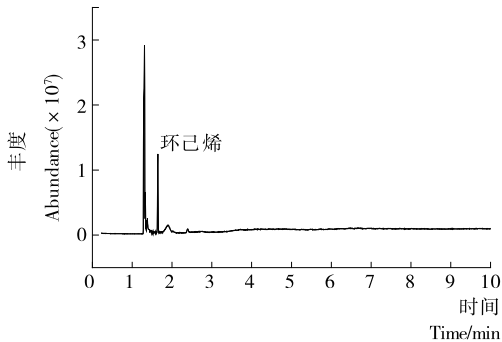


图 6 亚硝酸盐总离子流图
Figure 6 Total ion current of nitrite

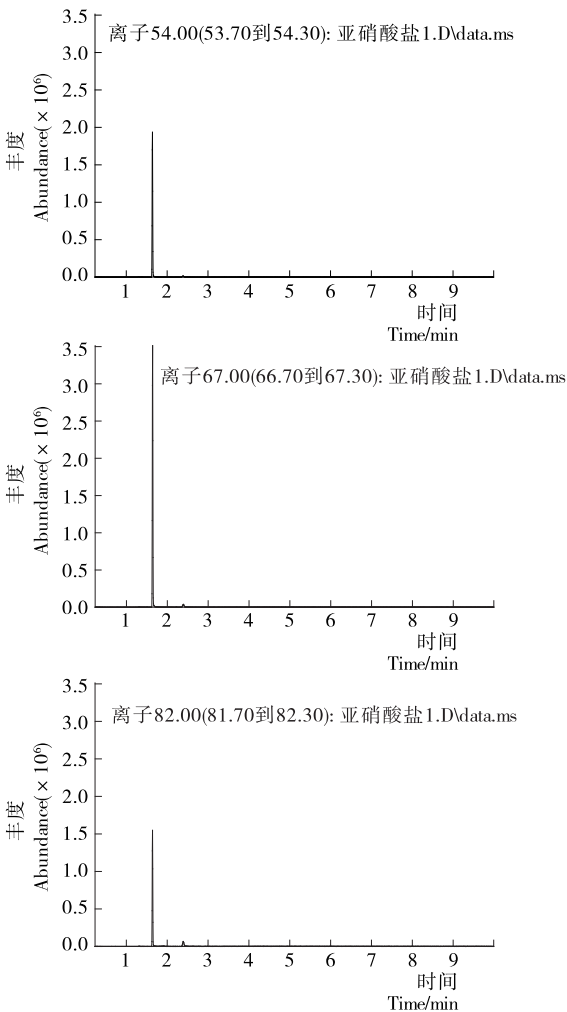


图 7 亚硝酸盐衍生物提取离子质谱图
Figure 7 Extraction ion mass spectrometry of nitrite derivative

基磺酸钠在酸性、冰浴条件下生成环己基亚硝酸酯，有学者^[7]便因此认为顶空条件下反应产物也为环己基亚硝酸酯，未考虑反应温度的不同会导致反应机理和反应产物不同。

2.3 回收率、精密度、准确度与检出限

回收率与相对标准偏差见表 1。以国标方法测量值作为真值，则本方法测量值与真值的偏差见表 2，分别为 9.4%，8.7%与5.6%。本方法的回收率、精密度与准确度均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》附录 F 要求。以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍性噪比计算定量限，纯净水、矿泉水的检出限为 0.000 3 mg/L，定量限为 0.001 6 mg/L；其他食品的检出限为 0.1 mg/kg，定量限为 0.33 mg/kg，均优于 GB 5009.33—2010 检测方法。

表 1 相对标准偏差和加标回收率				
Table 1 Relative standard deviation and recovery rate (n=6)				
样品	GB/T 5009.33—2010 方法		本文方法	
	回收率 /%	相对标准偏差 (RSD)/%	回收率 /%	相对标准偏差 (RSD)/%
饮用水加标 0.025 μg	90.3	4.7	94.7	4.0
外婆菜加标 10 μg	86.9	4.5	90.7	5.6
外婆菜加标 60 μg	89.2	4.3	91.9	5.0

表 2 不同方法计算得到的样品中亚硝酸盐含量

Table 2 The content of nitrite in the samples obtained by different methods (n=6)

样品名称	GB/T 5009.33—2010/ (mg·kg ⁻¹)	本方法/ (mg·kg ⁻¹)	相对偏差/ %
烟笋	0.61	0.67	9.4
外婆菜	0.66	0.72	8.7
烤耳尖	25.64	27.12	5.6
包装饮用水	未检出(<0.003 3)	0.002 5	/

2.4 试验分析

2.4.1 GB/T 5009.33—2010 和本方法回收率均偏低的原因分析 食品中亚硝酸盐含量的测定(分光光度法)是一个比较成熟的方法,但本研究发现,回收率在 86.9%~89.2%,当试验过程控制不好时,甚至更低。本方法回收率也不高,为 90.7%~91.9%,主要原因是样品前处理过程的损失:① 样品在煮沸提取和沉淀剂沉淀蛋白质时,将导致一定的损失;② 研究发现滤纸的使用会干扰硝酸盐和亚硝酸盐的测定,导致结果严重偏离^[11];③ 各个试剂的添加顺序和添加后的平衡时间不固定造成的影响。

2.4.2 试验用水的选择和峰面积处理 对自来水、实验室自制去离子水和市场上 3 个大品牌纯净水进行试验发现,气相色谱中均有较大的环己烯色谱峰,说明这些水中均存在着亚

硝酸盐,本试验选用实验室自制去离子水作为试验用水。绘制低浓度标准曲线时,标准物质的峰面积均为扣掉空白水峰面积后的值。而肉制品、蔬菜制品等前处理过程中均用到实验室用去离子水,因此标准物质的峰面积未扣除空白水的峰面积值。

2.4.3 其他注意事项 应注意顶空和气相色谱仪的维护,防止水对顶空进样系统和石英毛细管色谱柱的损坏。试验表明,当顶空进样器和气相色谱连续进样 50 次以上未维护时,环己烯的峰形和重复性变差。应在连续进样 20 次后,将顶空进样器的炉温、定量环和传输线在 130 ℃老化 2 h 以上,将色谱柱在最高耐受温度下老化 0.5~1.0 h。

3 结论

本试验研究了顶空—气相色谱(FID 检测器)测定饮用水、烟笋、外婆菜和烤耳尖中亚硝酸盐的方法。本试验优化了样品前处理步骤,对试验过程中影响加标回收率的因素进行分析。包装饮用水和其他复杂基质食品分别采用不同的线性方程进行分析。与 GB/T 5009.33—2010 相比,本方法前处理简单,灵敏度高,分析不受样品溶液颜色的影响,且回收率、精密度、准确度均能达到实验室质量控制规范(GB/T 27404—2008)要求,检出限明显优于 GB/T 5009.33—2010。用顶空—气质联用仪对反应产物进行分析,发现该试验主产物为环己烯,而不是一些研究人员^[7]推断的环己基亚硝酸酯。

参考文献

[1] 王竹天. 食品卫生检验方法(理化部分)注解(下)[M]. 北京:中国质检出版社, 2013.

[2] 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和硝酸盐的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.

[3] 刘晓军, 蔡玉文, 胡强, 等. 食品中亚硝酸盐检测方法研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 239-242.

[4] SIU D C, HENSHALL A. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 804(1/2): 157-160.

[5] 史东坡. 蔬菜中硝酸盐、亚硝酸盐的气相色谱法测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 27(2): 245-247.

[6] 孙震, 钱和, 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, 22(5): 123-125.

[7] 武和平. 顶空法测定食品中的亚硝酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(1): 97, 122.

[8] 张燕, 李燕, 王开宇, 等. 气相色谱-顶空进样法测定葡萄酒中的亚硝酸盐[J]. 酿酒科技, 2009(7): 117-118.

[9] 王志元, 张思群, 容慧. 衍生化顶空气相色谱法测定食品中的亚硝酸盐[J]. 分析化学, 1999, 27(7): 865-865.

[10] 刘国杰, 申小爱, 刘俊亭. 2,3-二氨基奈衍生化-气相色谱法-质谱法测定血浆中的亚硝酸盐含量[J]. 湘潭大学自然科学学报, 2015, 37(4): 54-58.

[11] 刘岚松, 康绍英, 张丽, 等. 离子色谱法测定肉制品中亚硝酸盐与硝酸盐的改进研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 83-86.