

英蓝渗析离子色谱电导—紫外联用法测定食品中亚硝酸根、硝酸根的方法学研究

欧阳云¹，容晓文²，徐晓波¹，谭建华¹，宁红卫¹

(1. 湖南省桂阳县疾病预防控制中心，湖南桂阳 424400; 2. 瑞士万通中国有限公司，广东广州 510000)

[摘要] **目的:** 利用英蓝在线渗析技术净化处理经超声直接提取后含大量有机质及高盐的样品，建立各类食品中 NO_2^- 、 NO_3^- 的电导、紫外联用分析方法。**方法:** 样品经切碎匀浆后，超声提取30min后，用定量滤纸过滤，弃去最初过滤液10ml，中间滤液直接置于样品管中，进样渗析分析，采用 Metrosep A Supp 7-250/4.0 阴离子交换柱，压力11.0MPa；柱温45℃，淋洗液为3.8mmol/L 碳酸钠，流速0.8mL/min，抑制电导法检测样品的 NO_2^- 、 NO_3^- ，对于高盐样品串联紫外可见光检测器，在波长215nm 下测定 NO_2^- 。**结果:** 在该色谱条件下，电导检测器在36min 内完成 NO_2^- 、 NO_3^- 的分析；标准曲线在0.05 mg/L~0.5 mg/L 范围内线性关系良好 ($r=0.9998$ 和 $r=0.9999$)；紫外检测器 NO_2^- 在0.05 mg/L~0.5 mg/L 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$)，两种检测器的样品峰面积 RSD ($n=7$) 为1.75%~2.30%；加标回收率为94.8%~107.4%。 NO_2^- 和 NO_3^- 的电导检测法检出限分别为0.0092mg/kg 和0.017mg/kg，紫外检测器方法 NO_2^- 检出限为0.0126mg/kg。**结论:** 该方法适用于各类不同含盐量食品中 NO_2^- 、 NO_3^- 等肮脏样品的超声提取后直接进样渗析法测定。

[关键词] 英蓝渗析；离子色谱；高盐食品；亚硝酸根；硝酸根；

Technical study of determination of NO_2^- , NO_3^- in food by ion chromatography sing conductivity and ultraviolet detector coupled with Metrohm Inline Dialysis

OU Yang-yun Rong Xiao-wen Xu Xiao-bo

(Guiyang Center for Disease Prevention and Control, Hunan, 424400 China)

[Abstract]**Objective** To establish the method of determination of NO_2^- , NO_3^- in food which were purified by Metrohm Inline Dialysis after Ultrasonic extraction using conductivity and ultraviolet detector.**Method** Food samples were extracted by ultrasound .After 30 minutes, massive samples were filtered by quantitative filter paper. 10ml upper filtrate were discarded and middle filtrate were injected in Metrosep A Supp 7-250/4.0 anion exchange column with 3.8 mmol/L Na_2CO_3 eluent solution at 0.8 mL /min. The temperature and pressure of 0 anion exchange column were 45℃ and 11.0 Mpa. Suppression-conductivity detection was used to determinate NO_2^- , NO_3^- in food samples .For high salt samples, UV-VIS detector was used for determination of NO_2^- in samples at 215nm wavelength.**Result** The analysis of NO_2^- , NO_3^- using conductivity detection was finished within 36 minutes under the chromatographic condition presented above. Calibration curve obtained by conductivity detection showed good linearity with $r=0.9998$ (NO_2^-) and $r=0.9999$ (NO_3^-) (from 0.05mg/L to 0.5 mg/L). Calibration curve obtained by UV-VIS detection showed good linearity $r=0.9999$ (from 0.05mg/L to 0.5 mg/L). The presicion (RSD, $n=7$) of these two detections was ranging from 1.75% to 2.30%. The recoveries were ranging from 94.8% to 107.4%. The limits of NO_2^- , NO_3^- detecting by conductivity detector were 0.0092 mg/kg and 0.017mg/kg respectively. The limit of NO_2^- detecting by UV-VIS detector was 0.0126 mg/kg.**Conclusion** The method can apply to the determination of NO_2^- , NO_3^- in food samples with different salt content.

Key words: Metrohm Inline Dialysis; ion chromatography; high salt food; nitrite; nitrate

作者简介：欧阳云（1971-），男，本科，副主任技师，主要从事理化检验及仪器分析。

目前食品中亚硝酸盐和硝酸盐的测定方法有多种^[1-9]，首选离子色谱法^[4]，但是复杂样品中共存离子的干扰和净化过程难以让操作者接受，国家食品安全标准方法中运用电导检测时，因高 Cl^- 的干扰较大，需要高速离心后去氯处理才能用电导法测定，样品前处理十分费时烦琐^[6-8]，不适合批量样品的快速准确检测。高氯样品不可能直接测定亚硝酸盐，只能测定硝酸盐，在215nm 波长下，亚硝酸根有吸收而氯离子无吸收的原理，利用紫外检测器可避免 Cl^- 的干扰，从而在不去氯的前题下测定亚硝酸盐，为此建立离子色谱法采用电导紫外联用检测技术 测定高盐食品中亚硝酸盐和硝酸盐的方法，可优化条件后，缩短检测时间， 样品超声提取后直接进样测定，操作简单、快速准确，测量结果满意。

1. 材料与方法

1.1 主要仪器

1.1 Metrohm-881 型离子色谱仪、Metrohm-858 自动进样器（瑞士万通），配有色谱柱恒温箱、智能电导检测器、紫外可见光检测器，智能低脉冲串联式双活塞往复泵、电子六通进样阀、双通道化学抑制泵，色谱工作站，英蓝超滤渗析系统；0.22 μm 的滤膜；Direct-Q™5 超纯水器；超声波清洗器。

1.2 主要试剂 亚硝酸根和硝酸根标准溶液 1000mg/L :Fluka; aladdin; 碳酸钠：优级纯，国药集团；电阻率大于 18.25M 的超纯水。

1.3 色谱条件 色谱柱：Metrosep A Supp 7-250（250mm×4 mm）+ Metrosep A 4 Guard/4 阴离子柱保护柱；淋洗液：3.8mmol/L 碳酸钠；流速：0.8mL/min；压力 11.0MPa；柱温 45℃；进样体积：25 μL ，电导检测器。紫外可见光检测器，波长 215nm。

1.4 样品前处理

对于低盐样品取混匀或匀浆样10g，高盐样品取混匀或匀浆样2g，用80ml 水洗入100ml 容量瓶中，超声提取30min，摇匀，放置室温后，定容，如样品含油脂，放入冰箱中使油脂固化，直接取上清液经定量滤纸过滤，弃去初滤液10ml,取中间滤液直接置于样品管中进样测定。高浓度样品经适宜稀释后测定，根据所得峰面积在标准曲线上查得样品溶液中 NO_2^- 和 NO_3^- 的含量。

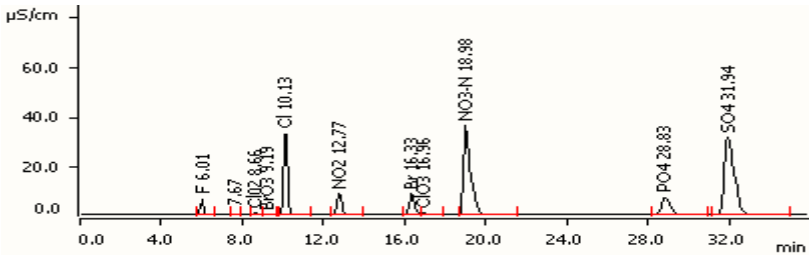


图1 Metrosep A Supp 7 250 标准离子色谱图

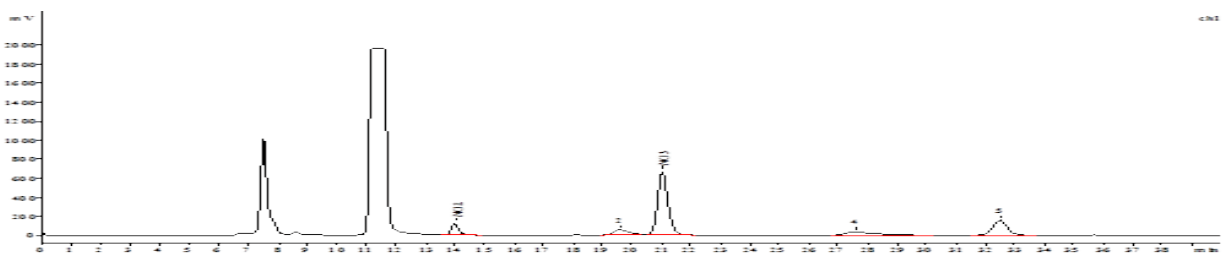


图2 咸菜电导检测色谱图

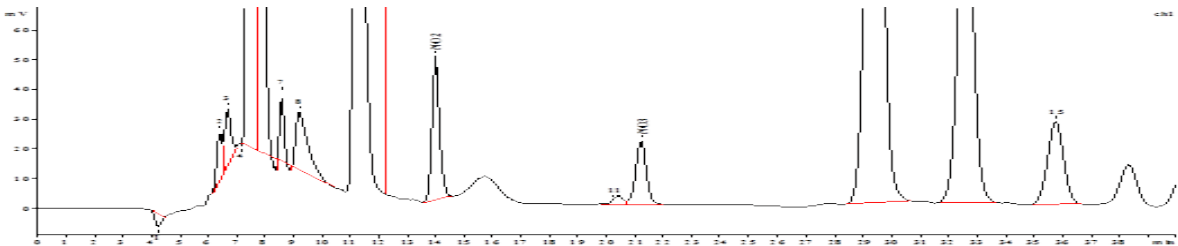


图3 咸菜紫外检测色谱图

2 结果

2.1 色谱柱和检测器的选择 Metrosep A Supp 7 250 (250mm×4 mm) 分离能力强；适合于低氯样品的多种阴离子分离，见图1，但是对于腌制品等肉类样品，氯离子含量高，会严重干扰亚硝酸根的分离，出现峰形重叠难以区分的情况，见图2，这类样品宜采用紫外可见检测器读取数据，见图3。

2.2 淋洗液及淋洗液流速的选择

对于食品样品而言，因成分复杂，选择中等强度的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液为淋洗液时，难以区分各种离子间的峰， Na_2CO_3 洗脱能力较强，适合于多成分复杂样品的分离。对本次试验对比了几种 Na_2CO_3 浓度作为淋洗液时各个离子的分离效果(分别为3.0；3.2；3.4；3.6；3.8；4.0mM)；对比了淋洗液流速条件下各个离子的分离效果(分别为0.6、0.7、0.8、0.9ml/min)，根据被测峰与干扰峰的分离以及仪器的压力状况，选用3.8mM Na_2CO_3 淋洗液，流速为0.8ml/min，各个离子分离良好。

2.3 渗析时间条件的选择

本实验采用在线渗析技术，样品液连续通过渗析池，同时接受液在密闭的循环通中保持静止。样品液中的离子浓度和接受液中的离子浓度最终达到平衡，从而直接避免了繁琐的样品前处理，也节省了时间，提高了效率，从图4中可知选择渗析时间为420秒。

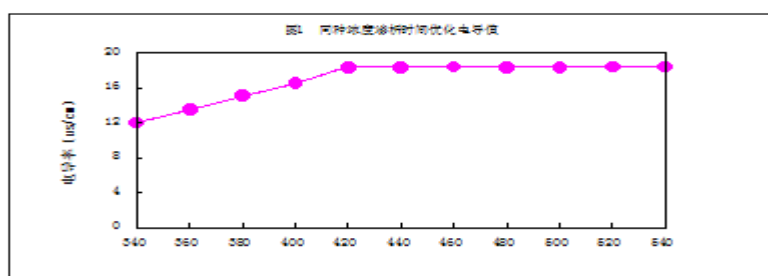


图 4 渗析时间优化图

2.4 渗析后样品转移时间的优化

样品转移时间受蠕动泵转速和渗析池至定量环间距离的影响。转移时间的选择至关重要，必须在渗析池和转移池二者刚好达到平衡时，把样品液转移至色谱柱，时间过短或过长均会发生峰形改变，在固定渗析时间420秒的情况下，选择转移时间8、10、13、15、17、20、22、25、27、30、35秒，对0.1mg/L的亚硝酸根进样测试峰面积，峰面积与转移时间的关系见图5，从结果分析来看，以25秒为最佳转移时间。

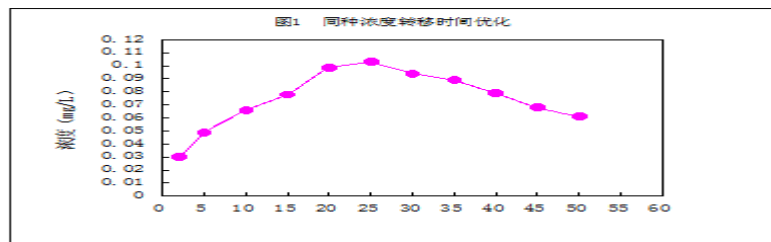


图 5 转移时间优化结果

2.5 线性范围、检出限

配制亚硝根和硝酸根混合标准系列，为0.05mg/L、0.10 mg/L、0.20mg/L、0.30mg/L、0.40mg/L、0.50mg/L 溶液，按选定的条件进行电导检测和紫外可见光检测器检测，电导检测器的回归方程： NO_2^- 为 $Q=0.007897223E+0.769769$, $r=0.9998$; NO_3^- 为 $Q=0.0106618E+0.493818$, $r=0.9999$; 紫外可见光检测器 NO_2^- 为 $Q=0.0960489E+0.327759$, $r=0.9999$ 。检测按计算公式 $\text{IDL}=3\text{Noise}/\text{Height} \times \text{Conc.}$ 分别计算检测限，电导检测器的检测限： NO_2^- 为 0.0092mg/kg; NO_3^- 为 0.017mg/kg, 紫外可见光检测器 NO_2^- 的检测限为 0.0126 mg/kg。见表 1。

表 1 两种检测器的检出限

指标		电导检测器	紫外检测器
最低可检测浓度(mg/L)	NO_2^-	0.05	0.05
	NO_3^-	0.05	
Noise		0.00395mV	0.0474mAu
方法检测限(MDL)(mg/L)	NO_2^-	0.0092	0.0126
	NO_3^-	0.017	

2.6 方法回收率实验和精密度试验及样品分析结果

从市场上购买蔬菜、腊肉、萝卜、奶粉、面粉、咸菜六份样做加标回收试验，每份样分别添加一个至二个水平的亚硝酸根和硝酸根标准，每个浓度重复测定 7 次，按样品前处理方法处理，并计算回收率 94.8%~107.4%，精密度由软件自动分析计算。结果在 1.75%~2.30%间。结果见表 2。

表 2 加标实验结果

样品	本底值 (mg/kg)		NO ₂ ⁻ 添加量 (mg/kg)	NO ₃ ⁻ 添加量 (mg/kg)	测量值 (mg/kg)		回收率 (%)		RSD (%)
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻			NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	
大白菜	1.35	230.6	1.0	100.0	0.983	98.7	98.3	98.7	1.89
			3.0	200.0	3.08	201.4	102.9	100.7	1.75
腊肉	89.4	20.4	45.0	10.0	43.88	10.1	97.5	101.0	2.09
			100.0	40.0	104.7	42.7	104.7	106.8	2.11
萝卜	0.84	2103.9	1.0	100.0	1.067	98.3	106.7	98.3	1.97
			5.0	200.0	4.92	203.4	98.3	101.7	2.30
奶粉	ND	ND	0.5	—	0.537	—	107.4	—	1.48
	ND	440	—	0.5	—	0.474	—	94.8	2.08
面粉	ND	ND	0.5	0.5	0.494	0.503	98.8	100.6	1.39
	ND	69	0.5	0.5	0.536	0.527	107.2	105.4	1.97
咸菜	204.5	ND	0.5	—	0.409	—	105.6	—	2.27
	ND	1206	—	5	—	5.22	—	104.3	1.71

ND 表示未检出。

2.7 电导检测器和紫外可见检测器结果样品分析结果对比

从市场购买蔬菜、腊肉、腌肉、奶粉、咸菜、红肠等共计 14 份样，按条件提取后测定，高氯样品按国标法用银柱除氯后经英蓝渗析处理后进系统分析，电导检测器和紫外可见检测器检测结果见表 3。比较二种检测器的数据，采用配对计量 t 检验，两种方法无显著性差异（t=0.092, p>0.05）。

表 3 电导、紫外检测亚硝酸根对比结果 (mg/kg)

样品名称	电导检测器 (亚硝酸根)	紫外检测器 (亚硝酸根)	差值
大白菜	1.26	1.30	-0.04
菠菜	2.04	2.11	-0.07
萝卜	0.67	0.71	-0.04
腊肉	90.8	89.9	0.9
腌肉	107.4	106.9	0.5
腊鱼	241.2	242.7	-1.5
腌白菜	45.7	46.2	-0.5
豆角	0.24	0.19	0.05
全脂奶粉	ND	ND	0
加标全脂奶粉	0.537	0.507	0.03
咸菜	0.409	0.406	0.003
加标咸菜	0.937	0.943	-0.006
红肠	ND	ND	0
加标红肠	0.509	0.486	0.023

ND 表示未检出。

3 讨论

当氯离子含量小于 500mg/L 时，电导检测可同时准确测定亚硝酸根及硝酸根，当氯离子含量大于 500mg/L 时，电导检测器读取到的是氯离子和亚硝酸根的重叠数据，数据不宜采用，可读取紫外检测器的数据，因此电导检测需配二种混合标准，这样能适合所有样品的直接分析，事实上，当氯离子小于 500mg/L 时，亚硝酸根及硝酸根的检测结果基本一致，从统计学分析无显著性差异。英蓝渗析技术能加快分析速度且有效避免基体复杂、干扰性大的问题。本文对食品中亚硝酸根和硝酸根采用超声后直接渗析离子色谱法测定，测定结果表明，该方法简单易行，结果准确，回收率好,灵敏度高。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国国家标准. 食品安全标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定. GB 5009.33—2010.
- [2] 高鹤娟. 食品卫生检验方法(理化部分)注解[M]. 北京:卫生部食品卫生监督检验所, 1987:244-245.
- [3] N.J. Eggers, D.L. Cattle, J. Chromatogr. 354 (1986) 490.
- [4] IARC (1978). Some N-nitroso compounds. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans (Vol. 17). Lyon: IARC.
- [5] S. Bilal Butt , M. Riaz , M. Zafar Iqbal Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography, Talanta 55 (2001) 789-797
- [6] 张书芬, 袁伟. 离子色谱法连续测定乳制品中的 NO_2^- 和 NO_3^- [J], 分析测试技术与仪器, 2005, 11(3):197-199.
- [7] 林玉娜, 罗晓燕, 刘莉治. 离子色谱快速测定牛奶中硝酸盐的研究[J], 现代预防医学, 2005, 32(4):339-340.
- [8] 郑利, 周克萍. 离子色谱法测定乳品中的硝酸盐[J], 检验检疫科学, 2006, 16(2):30-3
- [9] 戎江瑞, 陈建军. 系数补偿双波长分光光度法同时测定亚硝酸盐和硝酸盐[J], 实用预防医学, 2000, 6(6):473-474