

一、果酱中亚硝酸盐的测定：

亚硝酸盐广泛存在于自然界，在果酱中也有一定的含量。现已证明，亚硝酸盐与食品中固有的胺类化合物是产生致癌物质-亚硝胺的前体物质。因此，对果酱中亚硝酸盐含量的检测和控制是非常有必要的。

在果酱测定亚硝酸盐的过程中，用沉淀剂将样品处理后进行过滤，在滤液中加入磺胺和 N-1-萘基-乙二胺二盐酸盐，使其显粉红色，然后用分光光度计在其最大吸收波长下测定其吸光度。将测得的吸光度与亚硝酸钠标准系列比较定量。

亚硝酸根与芳胺或苯甲胺反应生成致癌物亚硝胺已经引起国内外的普遍关注。随着分析化学新方法和新技术的不断出现和发展，食品中亚硝酸盐的检测方法也更加多样化，新的检测方法层出不穷。亚硝酸盐是潜在的致癌物质，而乳与乳制品中亚硝酸盐含量过高会引起高铁蛋白症，因而要严格控制其含量。

1 主要试剂和仪器

1.1 仪器：UV-6100S 型紫外可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）

1.2 试剂：

标准亚硝酸盐溶液：GBW（E）0802230504 水中亚硝酸盐-氮,浓度：100mg/mL,并逐级稀释为 0.9857 μ g/mL 的标准贮备液；

硫酸锌溶液：535g/L;亚铁氰化钾溶液：172g/L;

盐酸-氨水缓冲溶液：pH9.6~9.7;

显色液 1：盐酸：水= 450：550（V：V）盐酸溶液；

显色液 2：5g/L 磺胺溶液；

显色液 3：1g/L 萘胺盐酸盐溶液。

试验中所用试剂均为分析纯，所用水为去离子水。

2 试验方法

2.1 工作曲线

标准曲线的绘制：取 6 个 50mL 容量瓶，分别加入浓度为 0.9857 μ g/mL 的亚硝酸钠标准贮备液 0.1，0.5，1.0，2.0，5.0，10.0mL，加水至 20mL，并做空白试验，然后依次加入 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，混合均匀后，静置 5min,加 1mL 显色液 3，静置 5min，用去离子水定容至刻度,此溶液浓度分别为 0.00、1.96、9.86、19.72、59.14、98.56、197.14 μ g/L。静置 5min 后于 540nm 处，用 1 cm 比色皿进行测定，并以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线(见图 1)。工作曲线方程为 $A=0.0011C+0.0026$ ，相关系数 $r^2=0.9995$ 。

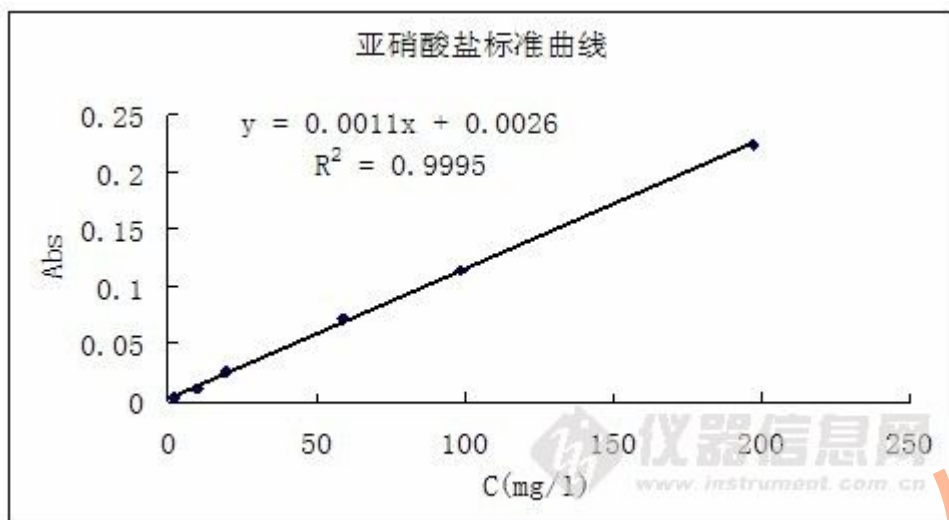


图 1 工作曲线

2.2 样品测定

2.2.1 样品前处理

将样品用粉碎机粉碎后，称 25~30g 样品，按顺序加入 25mL 硫酸锌溶液，25mL 亚铁氰化钾溶液，40mL 盐酸-氨水缓冲溶液，每加一种试剂充分混合，用去离子水定容于 250mL 容量瓶中，静置 40min，用定性中速滤纸过滤后收集滤液。

2.2.2 样品测定

移取 20mL 滤液于 50mL 容量瓶中，加 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，摇匀，静置 5min；加 1mL 显色液 3，静置 5min，定容后静置 5min，上机。同时移取 20mL 滤液于 50mL 容量瓶中做为参比溶液，加水定容至刻度，摇匀后静置，与样品同测，测定结果见表 1

表 1 样品测定数据

样品名称	样品质量 (g)	滤液颜色	单光束测定结果 (mg/kg)	双光束测定结果 (kg/kg)
猕猴桃果酱	26.5	绿	2.256	0.389
红提果酱	28.3	红	1.664	0.453
黄桃果酱	26.0	黄	1.535	0.125
草莓果酱	27.6	红	2.873	0.716

3. 结果讨论

3.1 参比选择 选择适当的参比溶液，消除滤液中有色物质的干扰。本试验以被测溶液作参比溶液，不仅能消除吸收池壁对光的反射和散射带来的干扰，还能消除滤液中共存离子对光的选择性吸收和滤液中有色物质所带来的干扰，所以采用不加显色剂的可测溶液作参比溶液。

3.2 干扰消除 在样品前处理后，在滤液中的某些成分影响被测组分吸光度时，将构成干扰，影响测量结果的准确性。某些干扰离子与试剂生成有色配合物，使测定结果偏高；某些干扰

离子与试剂反应，生成的配合物虽然无色，但消耗大量的显色剂，使被测离子的显色反应不完全，使测定结果偏低；某些干扰离子与被测离子结合成离解度小的另一种化合物，使被测离子与显色剂不反应，使测定结果偏低。

加入盐酸-氨水缓冲溶液，控制溶液的酸度，从而消除干扰。因为控制溶液酸度在一定范围，可以使亚硝酸盐与显色剂反应，干扰离子不能生成有色化合物。

3.3 分析结果及回收率

样品名称	测定平均值	RSD(%)	加标量	回收率
猕猴桃果酱	0.389	1.28	0.49	101.3%
红提果酱	0.453	2.17%	0.49	96.6%
黄桃果酱	0.125	2.05%	0.49	98.3%
草莓果酱	0.716	1.36%	0.49	95.2%

4. 结论

双光束分光光度法测定果酱中的亚硝酸盐，非常有效的消除了果酱中有色物质对测定的影响，灵敏度高，检出限低，选择性强，准确可靠，测定方法简便，快速。

5. 果料酸奶的测定

果料酸奶中果料对测定结果的影响，尤其草莓等，采用双光束消除。

下表为果酱中亚硝酸盐和硝酸盐的数值：

表 1· 样品测定数据

样品名称	样品质量 (g)	滤液颜色	单光束测定结果 (mg/kg)	双光束测定结果 (kg/kg)
猕猴桃果酱	26.5	绿	2.256	0.389
红提果酱	28.3	红	1.664	0.453
黄桃果酱	26.0	黄	1.535	0.125
草莓果酱	27.6	红	2.873	0.716

乳清蛋白粉、酸奶一类，滤液浑浊的消除，从比尔定律角度分析。

5.1 果料酸奶

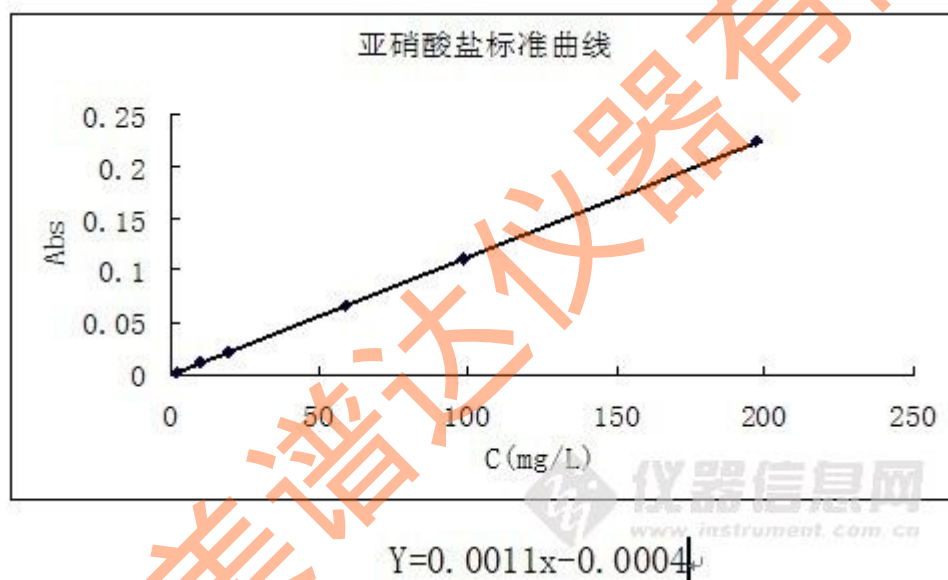
此类情况最显著的表现是滤液有颜色，草莓类果料酸奶情况尤为严重，在用硫酸锌和亚铁氰化钾沉淀过程中，果料中的色素没有被沉淀完全而进入滤液，使滤液显一定的颜色，如果完全按照国家标准 GB/T5009.33-2003 或 GB/T5413.32-1997 中直接测定，则测定结果偏高，势必造成假阳性的情况。

当滤液澄清但有颜色时，其滤液中的有色物质在可见光区有吸收，在 538nm 处与亚硝酸盐吸收峰叠加，使吸光度偏高。为此，采用双光束分光光度法来消除滤液背景的干扰，从而真实反映出亚硝酸盐的响应值。

5.2 乳清蛋白粉类

此类样品的表现是滤液无颜色，但稍微有浑浊。浑浊样品在上机过程中，偏离朗伯-比尔定律，使测定结果偏高。

样品浑浊，其中被测物质的分布不均匀，入射单色光就会因色散，反射而使透射光的强度减弱，检测器所得到的吸光度就会比实际的正确值偏大，导致偏离朗伯-比尔定律。



Griess 法的测定极限是 0.02~2⁻⁴mol/L,最大检出限为 1mg/kg，具有高灵敏性、高准确度和再现性好的特点，且简单有效，但在复杂介质中测定会受到样品本身颜色影响。格里斯试剂比色法的原理:样品经沉淀蛋白质、除脂肪后，在弱酸条件下 NO₂⁻ 与对氨基苯磺酸(磺胺)重氮化反应后，再与 N-1-萘基乙二胺(即盐酸萘乙二胺)偶合形成红色偶氮苯染料，其最大吸收波长为 550nm，若所选择的反应物不同，最大吸收光谱也有所不同(一般为 500-600nm)。目前使用最多的反应剂是磺胺和 N-1-萘基乙二胺、在 540nm 处比色测定。

二、乳与乳制品中亚硝酸盐的测定:

亚硝酸盐广泛存在于自然界，在乳与乳制品中都有一定的含量。现已证明，亚硝酸盐与食品中固有的胺类化合物是产生致癌物质-亚硝胺的前体物质，是潜在的致癌物质，亚硝酸盐含量过高会引起高铁蛋白症。因此，对乳与乳制品亚硝酸盐含量的检测和控制是非常有必要的。在乳与乳制品测定亚硝酸盐的过程中，将样品沉淀脂肪和蛋白质后，进行过滤。在滤液中加

入磺胺和 N-1-萘基-乙二胺二盐酸盐，使其显粉红色，然后用分光光度计在其最大吸收波长 538nm 下测定其吸光度。将测得的吸光度与亚硝酸钠标准系列溶液的吸光度进行比较定量。

1 主要试剂和仪器

1.1 仪器：UV-6100S 型紫外可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）

1.2 试剂：

标准亚硝酸盐溶液：GBW（E）0802230504 水中亚硝酸盐-氮，浓度：100mg/mL，并逐级稀释为 0.9857 μ g/mL 的标准贮备液；

硫酸锌溶液：535g/L；亚铁氰化钾溶液：172g/L；

盐酸-氨水缓冲溶液：pH9.6~9.7；

显色液 1：盐酸：水= 450：550（V：V）盐酸溶液；

显色液 2：5g/L 磺胺溶液；

显色液 3：1g/L 萘胺盐酸盐溶液。

试验中所用试剂均为分析纯，所用水为去离子水。

2 试验方法

2.1 入射光波长的选择

国标《GB/T5413.32-1997 乳粉 硝酸盐、亚硝酸盐的测定》中规定最大吸收波长为 538nm，但在实验过程中，做光谱扫描时，最大吸收波长往往因为样品的不同而发生变化，发上红移或蓝移的现象。考虑到测定的灵敏度，应采用最大吸收波长作为入射光波长。所以，在进行定量分析之前，应先才用光谱扫描进行峰形和峰位的确认。

以表 1 的仪器条件，对亚硝酸盐标准系列进行扫描，光谱图如图 1。图 1 中曲线均比较平滑，为了消除干扰组分的吸收，采用“吸收最大，干扰最小”的原则，即所选择的测定波长处待测组分的吸收最大，但干扰组分的吸收最小；从消除非单色光引起的对郎伯比尔定律的偏离角度考虑，应选用吸收曲线比较平坦部分对应波长的光作为入射光波长。

综上所述，应选择图 1 中 538nm 作为入射光波长，与国家标准一致。

表1 仪器条件

波长扫描范围/nm	420~650
光谱带宽/nm	0.5
采样间隔	0.5
扫描速度	中速

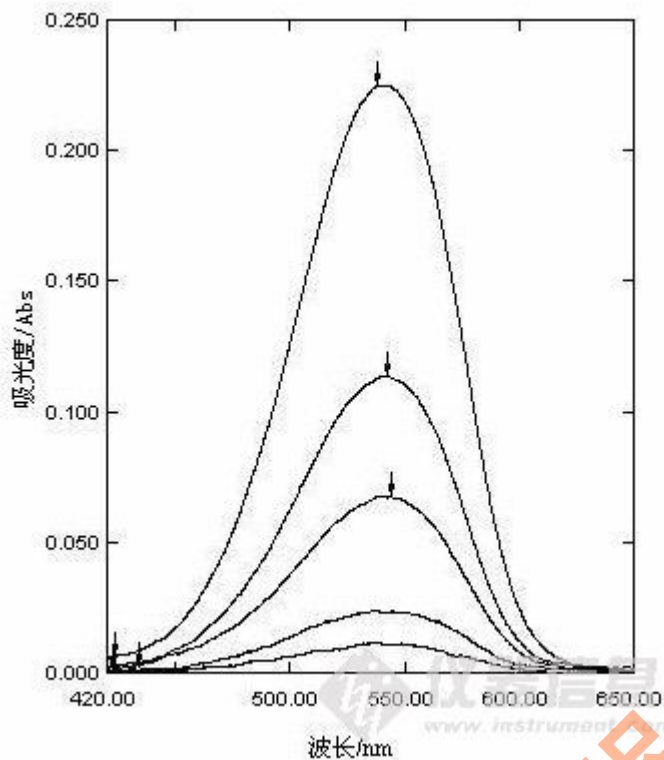


图 1 标准系列吸收光谱图

2.2 标准曲线

标准曲线的绘制：取 6 个 50mL 容量瓶，分别加入浓度为 $0.9857\mu\text{g}/\text{mL}$ 的亚硝酸钠标准贮备液 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mL，加水至 20mL，然后依次加入 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，混合均匀后，静置 5min，加 1mL 显色液 3，静置 5min，用去离子水定容至刻度，此溶液浓度分别为 0.00 、 9.86 、 19.72 、 59.14 、 98.56 、 $197.14\mu\text{g}/\text{L}$ 。静置 5min 后于 538nm 处，用 1 cm 比色皿进行测定，并以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线(见图 2)

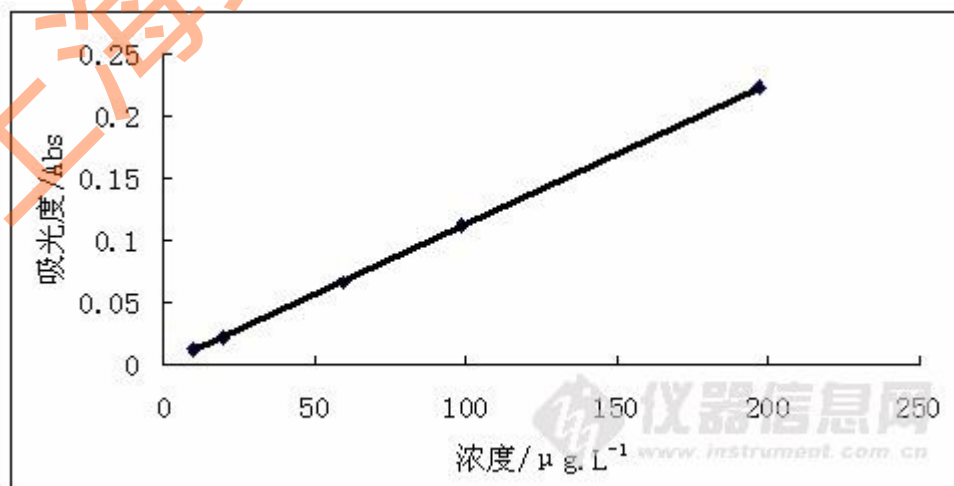


图 2 亚硝酸盐标准曲线

标准曲线方程为 $A=0.0011C-0.0005$ ，相关系数 $r^2=0.9999$ 。

2.3 样品测定

2.3.1 样品前处理

称 90.0g 左右牛乳样品，按顺序加入 25mL 硫酸锌溶液，25mL 亚铁氰化钾溶液，40mL 盐酸-氨水缓冲溶液，每加一种试剂充分混合，用去离子水定容于 250mL 容量瓶中，静置 40min，用定性中速滤纸过滤后收集滤液。

2.4.2 样品测定

移取 20mL 滤液于 50mL 容量瓶中，加 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，摇匀，静置 5min；加 1mL 显色液 3，静置 5min，定容后静置 5min，上机测定。

3 结果与讨论

干扰消除一般有两种方法，一类是不分离的情况下消除干扰，另一类是分离杂质消除干扰。因为在分离过程中，会造成硝酸盐和亚硝酸盐的损失，所以一般在不分离的情况下消除干扰。本试验采用双光束分光光度法，在不分离的情况下消除干扰。

3.1 在样品前处理后，在滤液中的某些成分影响被测组分吸光度时，将构成干扰，影响测量结果的准确性。干扰离子与试剂生成有色配合物，使测定结果偏高；干扰离子与试剂反应，生成的配合物虽然无色，但消耗大量的显色剂，使被测离子的显色反应不完全，使测定结果偏低；与被测离子结合成离解度小的另一种化合物，使被测离子与显色剂不反应，使测定结果偏低。

加入盐酸-氨水缓冲溶液，控制溶液的酸度，从而有效的消除了干扰。因为控制溶液酸度在一定范围，可以使亚硝酸盐与显色剂反应，干扰离子不能生成有色化合物。

3.2 选择适当的参比溶液，消除显色剂本身颜色和某些共存的有色离子的干扰。干扰离子本身有颜色，使测定结果偏高；

本试验选择溶剂参比和试液参比分别进行考察：溶剂参比：当显色剂及其他溶剂均无色，被测溶液中又无其他有色离子时，可用溶剂-去离子水做参比溶液。试液参比：显色剂无色，被测溶液中有其他有色离子，可采用不加显色剂的可测溶液做参比溶液。

以去离子水作溶剂参比，只能消除吸收池壁对光的反射和散射所带来的干扰；以被测溶液作试液参比，不仅能消除吸收池壁对光的反射和散射带来的干扰，还能消除滤液中共存离子对光的选择性吸收所带来的干扰。所以采用不加显色剂的滤液作试液参比。

3.3 选择适当的波长消除干扰。

入射光波长的选择必须从灵敏度与选择性两方面来考虑，从吸收曲线的峰形来看，无杂峰干扰，应选择最大吸收波长进行测定，这样灵敏度高，偏离郎伯-比尔定律的程度较小。本实验通过光谱扫描，从吸收光谱图上测定最大吸收波长后进行定量分析，避免了波长偏差带来的误差和干扰。

3.4 精密度试验

分别称取纯牛乳、原味酸牛乳、全脂乳粉和乳清蛋白粉样品，用上述方法进行测定，计算结果见表 2：（单位： $\mu\text{g/L}$ ）

表 2 精密度试验 n=6

样品名称	测定值范围/ mg·kg ⁻¹	平均值/ mg·kg ⁻¹	标准偏差/ S	相对标准偏差 RSD/ %
纯牛奶	0.21~0.22	0.21	0.010	4.76
原味酸牛奶	0.31~0.35	0.33	0.014	4.06
全脂奶粉	1.08~1.17	1.12	0.031	2.79
乳清蛋白粉	2.41~2.59	2.50	0.062	2.50

3.5 加标回收率试验

在纯牛乳、原味酸牛乳、全脂乳粉和乳清蛋白粉样品中，分别吸取 0.50, 1.00, 1.50, 2.00mL 浓度 10mg/mL 的标准亚硝酸盐溶液进行加标回收试验，结果见表 3。

表 3 加标回收率试验

样品名称	本底值/ mg·kg ⁻¹	样品质量/ g	加标量/ mg·kg ⁻¹	测定值 /... mg· kg ⁻¹	回收率/ %
纯牛奶	0.21	90.200	0.055	0.268	104.63
原味酸牛奶	0.33	71.300	0.140	0.471	97.68
全脂奶粉	1.12	10.234	1.466	2.624	102.34
乳清蛋白粉	2.50	5.145	3.887	6.203	95.36

4. 结论

双光束分光光度法测定纯牛奶中的亚硝酸盐，灵敏度高，检出限低，选择性强，准确可靠，有效的消除了共存离子干扰，测定方法简便，快速。

三、酸牛乳中亚硝酸盐测定的背景干扰及消除方法

1 前言

亚硝酸盐是潜在的致癌物质，而乳与乳制品中亚硝酸盐含量过高会引起高铁蛋白症，因而要严格控制其含量[1]。酸牛乳中由于含有各式各样的食品添加剂，在测定亚硝酸盐过程中，用硫酸锌和亚铁氰化钾沉淀不完全，导致部分小分子物质进入滤液，使滤液浑浊，而这种浑浊一般是肉眼不可见的。在分光光度计上比色时，却能引起吸收，导致测定结果偏高，造成假阳性的情况。

笔者针对此种情况，建立了以滤液为参比溶液，消除酸牛乳中细小颗粒对检测结果的影响，结果令人满意。

2 试验部分

2.1 仪器和试剂

2.1.1 仪器：UV-6100S 型紫外可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）

2.1.2 试剂：

标准亚硝酸盐溶液：GBW（E）0802230504 水中亚硝酸盐-氮，浓度： $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，并逐级稀释为 $0.9857\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准贮备液；硫酸锌溶液： $535\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；亚铁氰化钾溶液： $172\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ；盐酸-氨水缓冲溶液：pH9.6~9.7；显色液 1：盐酸：水=450：550（V：V）盐酸溶液；显色液 2： $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 磺胺溶液；显色液 3： $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘胺盐酸盐溶液。

试验中所用试剂均为分析纯，所用水为去离子水。

2.2 标准溶液的配制

标准曲线的绘制：取 6 个 50mL 容量瓶，分别加入浓度为 $0.9857\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的亚硝酸钠标准贮备液 0，0.5，1.0，2.0，5.0，10.0mL，加水至 20mL，并做空白试验，然后依次加入 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，混合均匀后，静置 5min，加 1mL 显色液 3，静置 5min，用去离子水定容至刻度，此溶液浓度分别为 0.00、9.86、19.72、59.14、98.56、197.14 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。静置 5min 后于 538nm 处，用 1 cm 比色皿进行测定。

2.3 试验过程

2.3.1 吸收光谱曲线的绘制

在光谱模式下，测定标准系列的光谱图，仪器条件见表 1。

表1. 仪器条件

波长扫描范围/nm	420~650
光谱带宽/nm	0.5
采样间隔	0.5
扫描速度	中速

在此仪器条件下，扫描出标准系列的吸收光谱图，见图 1。

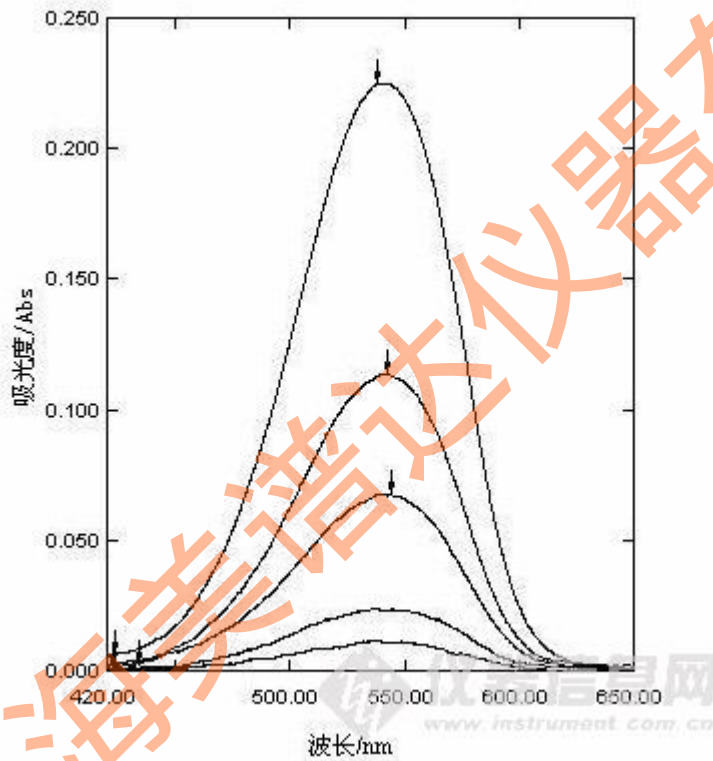


图 1 标准系列吸收光谱图

2.3.2 标准曲线的绘制

在光度测定模式下，以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线，见图 2。工作曲线方程为 $A = 0.0011C - 0.0005$ ，相关系数 $r^2 = 0.9999$ 。

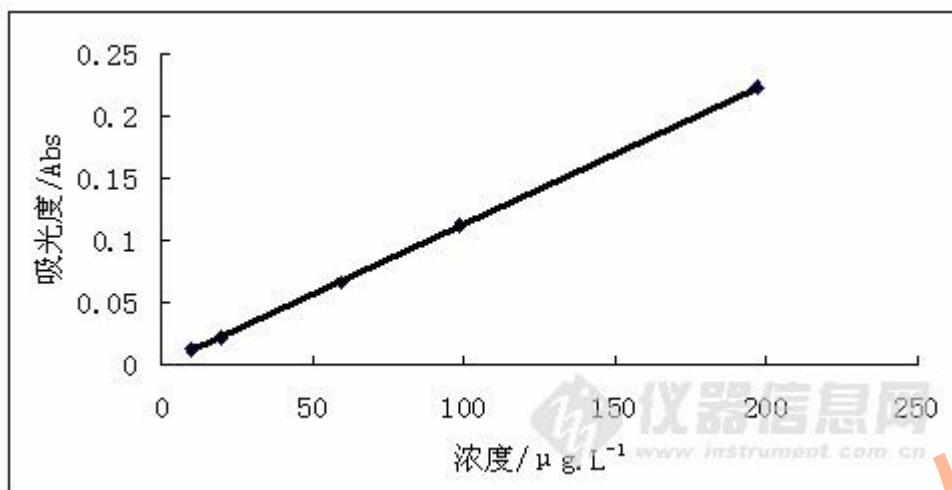


图2 亚硝酸盐标准曲线

2.2 样品测定

2.2.1 样品前处理

将酸牛乳样品混合均匀后，称 70g 左右样品，按顺序加入 35mL 硫酸锌溶液，35mL 亚铁氰化钾溶液，50mL 盐酸-氨水缓冲溶液，每加一种试剂充分混合，用去离子水定容于 250mL 容量瓶中，静置 40min，用定性中速滤纸过滤后收集滤液。

2.2.2 样品测定

移取 20mL 滤液于 50mL 容量瓶中，加 3mL 显色液 1，2.5mL 显色液 2，摇匀，静置 5min；加 1mL 显色液 3，静置 5min，定容后静置 5min，上机。同时移取 20mL 滤液于 50mL 容量瓶中做为参比溶液，加水定容至刻度，摇匀后静置，与样品同测，测定结果见表 1

表 2 样品测定数据

样品名称	样品质量 (g)	国标方法测定结 果($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	扣背景测 定结果($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
酸牛乳 1	71.4	0.44	0.07
酸牛乳 2	72.8	0.46	0.10
酸牛乳 3	70.6	0.53	0.14
酸牛乳 4	72.3	0.61	0.18

3 结果与讨论

3.1 牛乳与酸牛乳光谱图比较

国家标准 GB2746-1999[2]中规定酸牛乳中亚硝酸盐的限量为 $\leq 0.2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，而按照国加标准规定的方法检测，则均判定为阳性样品，而在扣除背景干扰后，样品检测结果均合格。

国家标准检测方法在检测牛乳类样品时，几乎不存在干扰情况。图 3（图中虚线为标样吸收光谱图，实线为样品吸收光谱图，下同）为牛乳样品光谱图与标样吸收光谱图比较，从图中可以看出，牛乳样品的亚硝酸盐样品光谱图和标样光谱图基本一致，确认其为亚硝酸盐，然后测定其峰高及吸光度值进行定量计算。

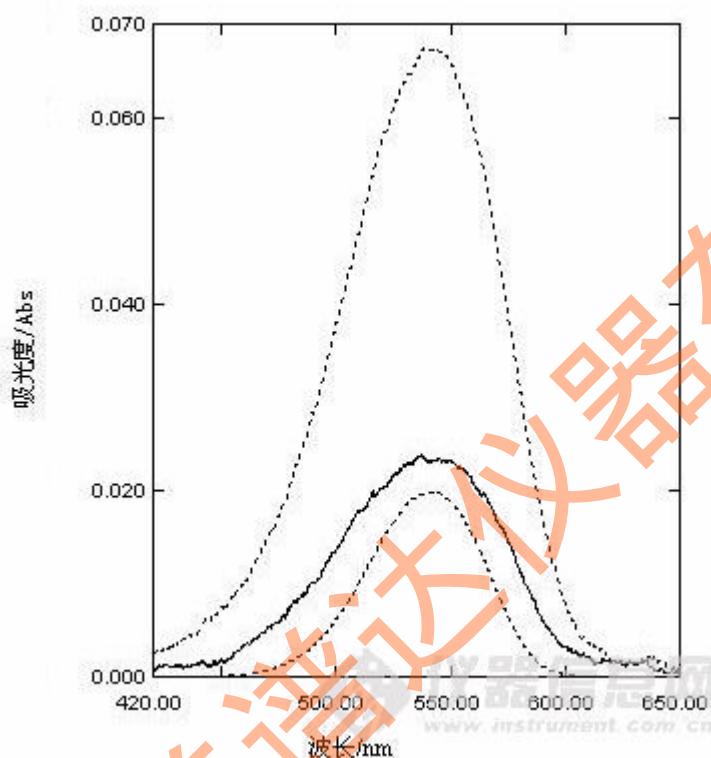


图 3 牛乳样品光谱图

酸牛乳加入各种辅料，比如食品添加剂，增稠剂，甜味剂等，经过发酵以后，成分相对比牛乳复杂的多，在经过沉淀剂沉淀以后，滤液中含有沉淀不完全或粒径较小的颗粒。而这些颗粒在测定波长 538nm 处有吸收，从而干扰目标组分的测定。

图 4 为酸牛乳样品光谱图，从图中可以看出，由于干扰的存在，各个吸收峰叠加，分辨不出亚硝酸的吸收峰。按照国标方法，直接测定吸光度定量，则造成假阳性的情况。

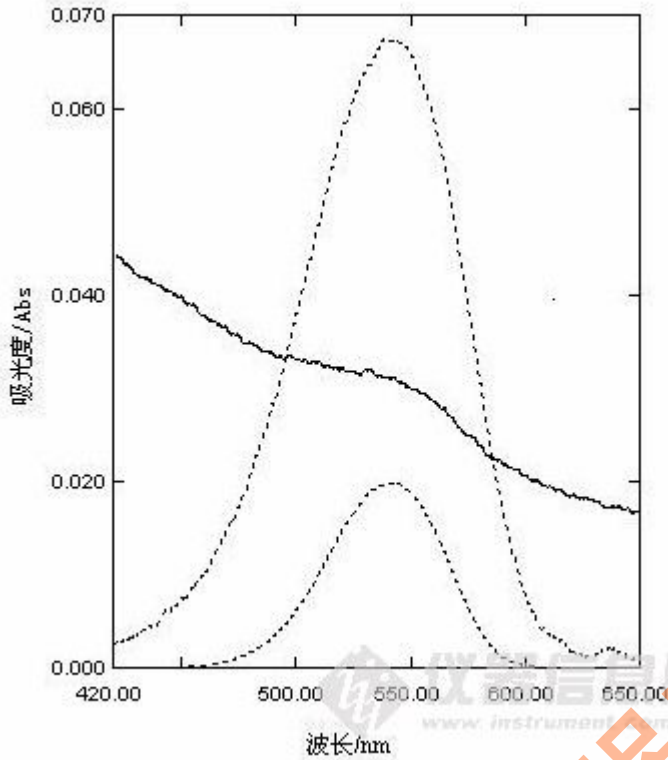


图 4 酸牛乳样品光谱图

3.2 背景干扰及消除方法

笔者经过大量的试验研究，认为背景干扰主要来自滤液中杂质组分和颗粒在 538nm 存在吸收，干扰导致酸牛乳样品吸收光谱变形，其背景干扰光谱图如图 5 所示。滤液中有杂质组分和小分子物质，入射单色光就会因色散、反射而使透射光的强度减弱，检测器所得到的吸光度就会比实际的正确值偏大[3]；量子光学认为，吸光粒子间的平均距离减小，受粒子间电荷分布相互作用的影响，其摩尔吸收系数发生变化[4]。以上两种情况导致偏离比尔定律。而这种干扰往往是肉眼不可见的，常常在检测中被忽略。

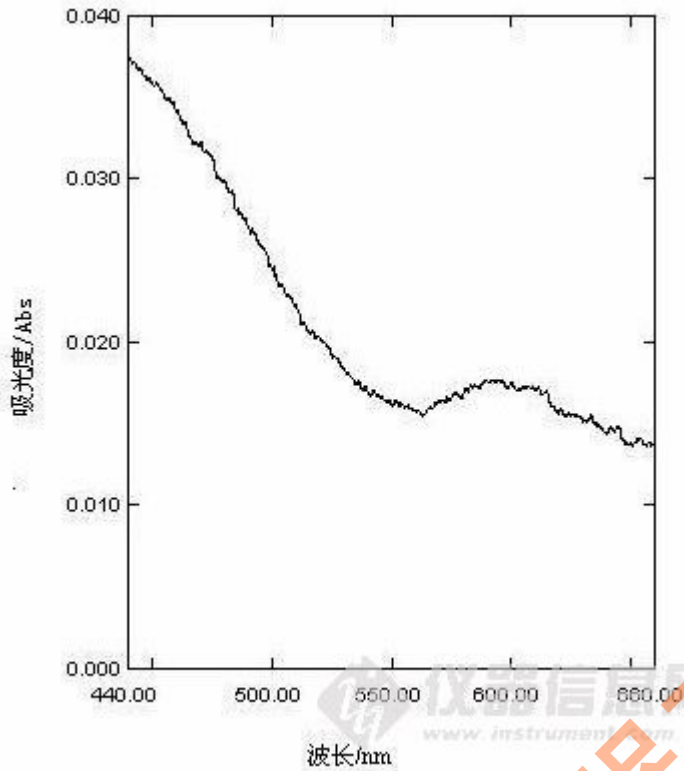


图 5 背景干扰光谱图

本试验采用 20mL 滤液为参比进行背景扣除，以此来消除干扰[5]。从图 5 中可以看出，背景干扰在 538nm 处产生一定的响应。而这种响应导致偏离比尔定律，使测定结果偏高。

扣除背景干扰后，其光谱图见图 6。从图 6 中可以看出，消除背景干扰后的光谱图和标样光谱图基本吻合，说明干扰已经消除，此时再进行吸光度测定，就能真实反应样品中亚硝酸盐的含量。

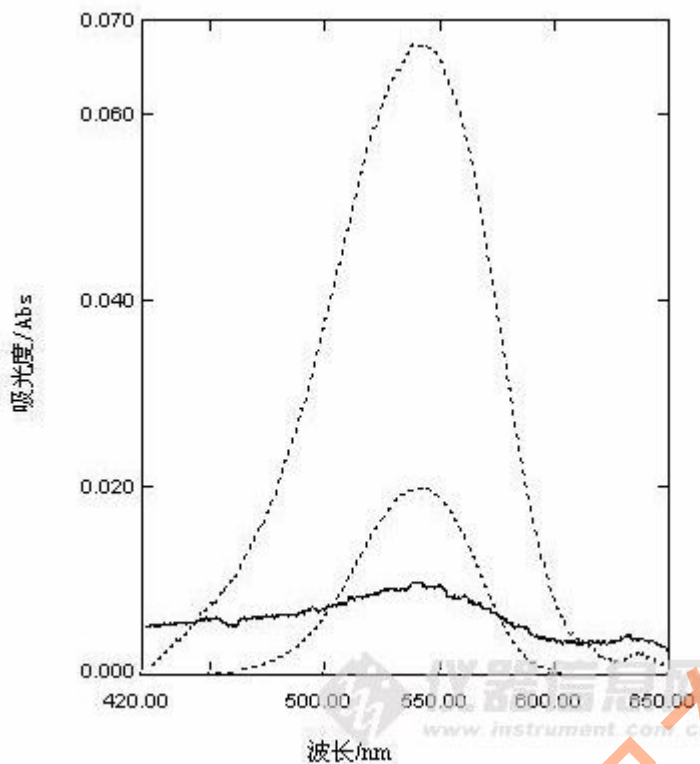


图 6 消除干扰后吸收光谱图

4 结论

通过以上试验可以说明，背景对酸牛乳中亚硝酸的测定干扰很大，容易造成假阳性。而通过滤液参比进行背景的扣除，基本消除了背景干扰对测定结果的影响。该方法操作简单，消除干扰效果好，适用于日常酸牛乳中亚硝酸盐的测定。