

改良比色法检测食品中的亚硝酸盐

苗攀登,刘钟栋*

(河南工业大学粮油食品学院,河南郑州 450001)

摘要:近些年,与亚硝酸盐有关的食物安全问题时有发生,传统比色法又有其局限性,因此本实验对传统比色法进行了改良。将对氨基苯磺酚和萘基乙二胺盐分别修饰到金纳米颗粒上,通过与 NO_2^- 的化学反应使金纳米颗粒发生聚集,并且聚集程度与 NO_2^- 的浓度呈正相关,此方法的标准曲线的 $R^2 = 0.9946$,回收率 97.00%~100.28%,相对标准偏差(RSD)是 0.77%~3.88%,检测限达到了 5.12 ng/mL,并比较了三种常见食品的亚硝酸盐含量的变化。通过与传统比色法的对比,此方法操作简单(一步法)、稳定性好、响应快、检测限低,可用于分析食品中微量亚硝酸盐产生过程和水中微量亚硝酸盐的检测,有利于食品工业的发展进步。

关键词:金纳米颗粒,亚硝酸盐,检测限,改良

Determination of Nitrite in Food by Improved Colorimetry

MIAO Pan-deng, LIU Zhong-dong*

(Grain College, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In recent years, food safety problems related to nitrite have occurred from time to time, and traditional colorimetry has its limitations. Therefore, traditional colorimetric method was improved in this paper. The p-aminothiophenol and naphthylethylenediamine salt were respectively modified onto the gold nanoparticles, and the gold nanoparticles were aggregated by chemical reaction with NO_2^- , and the degree of aggregation was positively correlated with the concentration of NO_2^- . The standard curve of this method was $R^2 = 0.9946$, the recovery rate was 97.00%~100.28%, the relative standard deviation (RSD) was 0.77%~3.88%, and the detection limit reached 5.12 ng/mL. The changes in nitrite content of three common foods were compared. Compared with the traditional colorimetric method, this method had the advantages of simple operation (one-step method), good stability, fast response and low detection limit. It could be used to analyze the production process of trace nitrite in food and water, which was conducive to the development of the food industry.

Key words: gold nanoparticles; nitrite; detection limit; improvement

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)23-0254-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.041

引文格式: 苗攀登, 刘钟栋. 改良比色法检测食品中的亚硝酸盐[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 254-260, 289.

亚硝酸盐是一种很常见的食品添加剂和天然衍生物^[1],在香肠、果酱、腌制品、肉脯等食品中都有不同剂量的添加,主要是起着着色和防腐的作用。亚硝酸盐是剧毒物质,其成人中毒剂量为 0.2~0.5 g,致死剂量为 3 g。在胃酸等环境下亚硝酸盐与食物中的仲胺、叔胺和酰胺等反应生成强致癌物 N-亚硝胺,它有极强的致癌作用。亚硝酸盐还能使血液中正常携氧的低铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,因而失去携氧能力而引起组织缺氧。此外,亚硝胺还能够透过胎盘进入胎儿体内,对胎儿有致畸作用。6 个月以内的婴儿对亚硝酸盐特别敏感,临床上患“高铁血红蛋白症”的婴儿即是食用亚硝酸盐浓度高的食品引起的,症状为缺氧,出现紫绀,甚至死亡^[2-4]。

食品在生产、销售等过程中,均存在着各种各样

的安全隐患,其中亚硝酸盐超标是一个非常严重的问题。亚硝酸盐的危害无需赘述,所以详细记录低值食品原料中的亚硝酸盐含量的变化,是控制亚硝酸盐含量的必要手段。现阶段的检测手段有光度法、化学发光法、电化学法、色谱法、毛细管电泳法。最常见的光度法即是比色法,其原理是:在酸性环境下,对氨基苯磺酚首先与亚硝酸根反应生成重氮化合物,然后再与 N-(1-萘基)-乙二胺发生偶合反应,形成紫红色偶氮化合物,在 540 nm 波长处具有最大吸收且与亚硝酸盐含量呈正相关,检测限为 0.06 $\mu\text{g/mL}$ 。此方法已经非常成熟、重复性好,准确度高,但步骤繁杂,易受其它杂质干扰,试剂毒性较大,也鉴于其检测限的限制,近些年逐步被离子色谱法取代^[5-9]。化学发光法的原理是根据亚硝酸盐浓

收稿日期:2019-01-03

作者简介:苗攀登(1994-),男,硕士研究生,主要从事食品添加剂及配料方面的研究,E-mail:miaowork123@163.com。

*通讯作者:刘钟栋(1959-),男,博士,教授,主要从事食品添加剂及配料方面的研究,E-mail:liuzhongdong@aliyun.com。

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0400800)。

度与分子发光强度呈线性关系,通过检测分子发光强度来得到亚硝酸盐的浓度。此方法具有操作方便、灵敏度高、试剂消耗少、仪器设备简单等优点,但也有实验仪器昂贵、操作人员专业要求高、工作环境要求高等缺陷^[10-11]。电化学方法中常见的极谱法,是利用电解过程中所得到的极化电极的电流电位曲线来确定溶液中物质浓度的电化学分析方法,具有设备简单、分析速度快、准确度高、灵敏度高的优点,但是有设备昂贵、不易保养以及重现性差等缺陷^[12-13]。离子色谱法是利用阴阳离子对载体(树脂)的吸附能力不同达到分离的目的^[14-16]。总的来说,色谱法具有线性范围宽、抗干扰能力强、操作简便特点,但有设备仪器昂贵、操作人员要求高、耗时等缺点;此外,亚硝酸盐的检测方法还有毛细管电泳法、催化光度法、荧光光度法、流动注射分光光度法、电化学伏安法、气相色谱法以及高效液相色谱法等。光度法使用方便但是不够灵敏,容易受干扰,其他方法虽有达到较低检测限,但是设备昂贵,不易保养,操作繁杂,不宜大批检测样品,又或者耗时长,时效性不高。因此改进光度法,使其克服固有的缺点是一个建立新方法的思路。

在本研究中,将对氨基苯硫酚(ATP)和萘基乙二胺(NED)分别修饰在纳米金颗粒上之后,在酸性条件下,再加入亚硝酸盐,体系将会发生重氮化耦合反应,使金纳米颗粒发生聚集,从而导致体系光学性质(颜色)发生变化。通过探究颜色变化与亚硝酸盐浓度的关系来建立亚硝酸盐检测方法,计算检测限。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

面包 包头市味多美食品有限公司;火腿 河南双汇投资发展股份有限公司;海带丝 山东烟台万历海藻食品有限公司;袋装牛奶 内蒙古伊利实业集团股份有限公司;瓶装水 康师傅控股有限公司;实验所用食品材料 为市场随机购买所得;水合氯金酸(HAuCl_4) Sigma Aldrich 公司;柠檬酸钠、对氨基苯磺酸、对氨基苯硫酚 ATP、盐酸萘乙二胺 NED、巯基乙酸 北京化学试剂公司;亚硝酸钠标准溶液($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$) 成都博瑞特化学技术有限公司,可直接使用无需校准;浓盐酸、氢氧化钠 天津市大茂化学试剂厂;无水乙醇、亚铁氰化钾、乙酸锌 麦克林试剂有限公司;去离子水 天津卓精虹科仪器设备技术有限公司;其他化学试剂 均为分析纯。

U-2900 型紫外分光光度计 Hitachi; ZS90 型粒度电位仪 Malvern; 琼脂糖电泳设备 天津市华茂电泳设备有限公司;磁力搅拌器及其配套电热套 巩义市予华仪器设备有限公司;小型振荡器 上海亚荣生化仪器厂;离心机 上海卢湘仪; JR05-300 型食品粉碎机 浙江苏泊尔股份有限公司; KQ-100DE 型超声波仪(输出功率:400 W) 昆山市超声仪器有限公司以及其他常规实验室器皿。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理方法 取面包、火腿、海带丝各 0.25 g 分别放入食品粉碎机再加入 10 mL 水,粉碎

25 min,并转移到 25 mL 容量瓶中,三次用少量水(2 mL 左右)清洗粉碎机杯壁倒入容量瓶中,再定容到 25 mL;瓶装水和袋装牛奶直接转移到容量瓶并定容到 25 mL^[17-19]。所有样品定容后,在超声清洗机中(400 W)浸泡 30 min,然后 2000 r/min 离心 15 min,取上清液 5 mL(其中瓶装水样品无分层),加入 200 μL 亚铁氰化钾溶液(106 g/L),再加入 0.5 mL 乙酸锌溶液(220 g/L),手动搅拌 5~10 min,过滤得到样品液^[20];用体系检测样品液亚硝酸盐浓度 $c(\mu\text{g/mL})$,即样品的亚硝酸盐含量: $C = c \times 25/0.25(\mu\text{g/g})$, $C = 100c$ 。

1.2.2 传统比色法检测亚硝酸盐

1.2.2.1 传统比色法的标准曲线的绘制 参考国标 GB 5009.33-2016, $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸钠标准液用去离子水分别稀释到 0.05、0.1、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$,再分别取 4.7 mL 稀释液和去离子水(空白),分别放在试管中,加入 0.2 mL 4 g/L 对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置 3~5 min 后各加入 1 mL 2 g/L 盐酸萘乙二胺溶液,混匀静置 10 min。用 1 cm 比色杯,以空白管调节零点,于波长 538 nm 处测吸光度,绘制标准曲线^[21]。

1.2.2.2 常见离子对传统比色法的干扰实验 分别将等摩尔浓度的各种常见离子(NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 BH^- 、 Cl^- 、 CO_3^{2-} 、 CH_3COO^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+}) 4.7 mL 分别按照 1.2.2.1 的方法添加对氨基苯磺酸溶液和盐酸萘乙二胺溶液,用 1 cm 比色杯,以空白管调节零点,于波长 538 nm 处测吸光度。

1.2.2.3 传统比色法的加标回收试验 以正常销售的鲜牛奶和瓶装水为空白,分别取鲜牛奶和瓶装水 2.5 g。向两种样品中分别加入 1.00、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 的亚硝酸盐标准品,用去离子水定容 25 mL,在输出功率 400 W 的超声仪中浸泡 30 min;离心取上清液 5 mL,加入 200 μL 亚铁氰化钾溶液(106 g/L),再加入 0.5 mL 乙酸锌溶液(220 g/L),搅拌 5~10 min,过滤得到样品液,然后用传统比色法检测样品液的亚硝酸盐浓度 c ,即亚硝酸盐的添加量 $m = c \times 25$,计算出回收率并重复 10 次计算相对标准偏差。

1.2.3 改良比色法检测亚硝酸盐

1.2.3.1 实验原理 利用金纳米颗粒优秀的光学性质,将对氨基苯硫酚通过 S-Au 键修饰到水相金纳米颗粒记为 ATP-GNPs;将萘基乙二胺(NED)通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)催化,连接到双亲性聚合物包裹的油相金纳米颗粒(AP-GNPs)上得到萘基乙二胺修饰的金纳米颗粒记为 NA-GNPs,在酸性条件下,加入 NO_2^- 后,发生重氮化耦合反应,两种修饰过的金纳米颗粒被连在一起,发生聚合,金纳米颗粒的颜色发生明显变化,这种变化与 NO_2^- 的浓度呈良好线性关系。总之,改进比色法用金纳米颗粒的灵敏的光学变化代替了耦合反应生成的染料分子的颜色变化,使体系的检测线更低,灵敏度更高,如图 1。

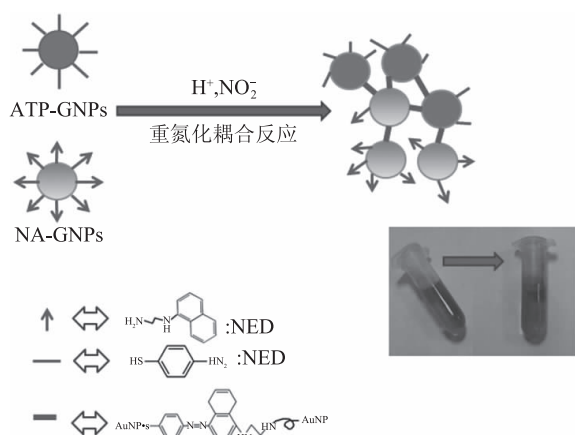


图1 改良比色法基本原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of the the improved colorimetric basic principle

1.2.3.2 ATP-GNP 的制备及表征 取 17 mg 水合氯金酸溶于 50 mL 的去离子水中, 沸腾回流 10 min, 溶液呈淡黄色; 78 mg 柠檬酸钠溶于 5 mL 去离子水中, 预热到 60~70 °C, 快速加入到回流后的水合氯金酸的溶液中, 继续加热回流 20 min, 溶液颜色由黄色变无色随后颜色逐渐加深, 最后呈透亮的深红色, 冷却至室温, 调节 pH 到 7, 用 0.45 μm 的滤膜过滤两次, 室温备用, 这时的金纳米颗粒 GNPs 的粒径大约为 10 nm^[22]。由郎伯比尔定律(式 1)计算得到的 GNPs 的吸光度为 $A = 1.924$, 可计算得知 GNPs 的浓度 $c = 1.40 \times 10^{-8}$ mol/L。

郎伯比尔定律 $A = \varepsilon \times C \times l$ 式(1)

式中: A 是吸光度值, ε 是吸收常数, l 是光径长度 (cm, 所使用的仪器光径长度规格为 1 cm), $\varepsilon_{10\text{ nm}} = 1.37 \times 10^8 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ 。

将制备好的金纳米颗粒稀释 10 倍, 将 pH 调整到弱酸性 (pH = 3~4), 用 10 mmol/L 的 ATP (溶解于无水乙醇) 与稀释后的纳米金颗粒按体积 1:8 的比例混合均匀, 在摇床上匀速振荡 6 h, 反应后, 用 5000 r/min 离心 30 min, 去上清, 再用去离子水溶解, 反复 3~5 次, 即得到 ATP-GNPs。ATP-GNPs 的粒径约为 10 nm, 由郎伯比尔定律^[23-24], 计算出 ATP-GNPs 浓度约为 10^{-9} mol/L。

制备 ATP-GNPs 之后, 在室温下利用粒径电位仪、全波谱紫外分光光度计表征 GNPs 和 ATP-GNPs 的粒径分布、电位变化以及吸收图谱的变化, 其中样品皿的规格为: 1 × 1 cm 的石英皿。

1.2.3.3 NA-GNPs 的制备及表征 有机相金纳米颗粒是在有机相中用硼氢化钠快速还原氯金酸得到的, 再利用两亲性的聚合物的包裹使其“溶解”到水相中, 再通过反应将萘基乙二胺连接到两亲性聚合物的羧基上, 最终得到萘基乙二胺修饰的金纳米颗粒 (NA-GNPs), 详细反应步骤见 a~d。

a: 有机相合成金纳米颗粒 GNPs: 取 2.17 g 四辛基溴化铵溶于 80 mL 甲苯中, 在输出功率 400 W 的超声仪中浸泡 2~3 min 使四辛基溴化铵完全溶解, 溶液澄清透明无杂质^[25]。取 300 mg 氯金酸溶于 25 mL 纯水中, 溶液为澄清的黄色。上述两种溶液混合, 轻

摇直到水相中的黄色完全消失, 有机相变成红色。用分液漏斗将水油分开, 有机相转移到烧瓶中。334 mg 硼氢化钠溶于 25 mL 纯水。硼氢化钠溶液在 1 min 之内加入之前含有金的甲苯溶液中, 边搅拌边滴加。然后金溶液在室温下搅拌 1 h。搅拌 1 h 之后, 再利用分液漏斗溶液将水油分开, 有机相先用 10 mmol/L 盐酸洗 3 遍, 再用 10 mmol/L 氢氧化钠洗 3 遍。将溶液转到烧瓶中搅拌 12 h 后加入 10 mL 十二硫醇, 65 °C 水浴搅拌 3 h。所得溶液 2000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 去除杂质。再按 1:1 加入甲醇 2000 r/min 离心 5 min。去除含有四辛基溴化铵和十二硫醇的上清液, 收集 GNPs 沉淀溶于氯仿中。合成的 GNPs 粒径约 5 nm。

b: 制备两亲性聚合物: 2.7 g 十二胺和 3.084 g 聚(异丁烯-alt-马来酸酐)溶于 100 mL 四氢呋喃, 55~60 °C 水浴搅拌 1 h。此过程四氢呋喃会挥发, 溶液大概浓缩到 30~40 mL。停止加热, 剩余溶液在室温下搅拌 12 h。利用真空旋转蒸发仪使四氢呋喃完全挥发, 加入 40 mL 氯仿剧烈搅拌, 使瓶底附着的物质完全溶解, 最终所得两亲性聚合物 AP。

c: AP 包被 GNPs: 取 1 mL GNPs (溶于氯仿) 于圆底烧瓶, 再加入 0.2 mL AP, 摇晃均匀, 加入 5 mL 的氯仿降低体系浓度。缓慢抽真空使氯仿挥发直到混合物完全干燥。加入适量 SB₁₂ (0.05 mol/L 硼酸缓冲液, pH = 12) 剧烈搅拌, 使粘附在瓶壁上的物质完全溶解。用 60000 r/min 离心 30 min 进行纯化, 去上清用去离子水复溶, 重复 3~5 次, 就得到两亲性聚合物包被的金纳米颗粒, 记为 AP-GNPs, 如图 2。

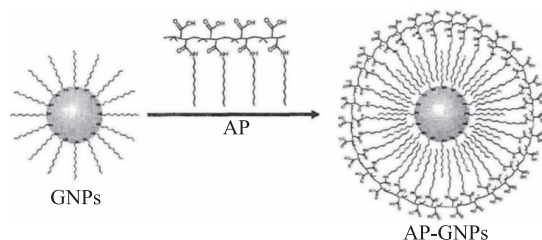


图2 AP 包被 GNPs 的示意图

Fig.2 Scheme of AP coating on GNPs

d: 萘基乙二胺修饰 AP-GNPs 得到 NA-GNPs: 10 mL 20 mmol/L 盐酸萘基乙二胺溶液 (溶于硼酸缓冲液, pH 调到 9) 与 1 mL AP-GNPs 混匀, 再加入 1 mL 0.5 mol/L 的 EDC, 混匀静置 3 h。用 60000 r/min 离心 30 min 进行纯化, 去上清用去离子水复溶, 重复 3~5 次, 就得到 NA-GNPs, 其粒径约为 10 nm。由郎伯比尔定律, 计算出 NA-GNPs 浓度约为 210^{-7} mol/L。将 NA-GNPs 稀释 20 倍后, 与 ATP-GNPs 等体积混合, 将体系 pH 调整到 5, 作为反应液存放于 -4 °C 备用。将亚硝酸钠标准溶液分别稀释到 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5 μg/mL。分别取浓度梯度的标准液和去离子水 (空白) 0.5 mL, 再加入 0.5 mL 反应液, 混匀静置 15~20 min, 测体系的吸光度, 绘制标准曲线。

e: 表征: 在室温下利用粒径电位仪、全波谱紫外分光光度计表征油相 GNPs、AP-GNPs 和 NA-GNP

的粒径分布、电位变化以及吸收图谱的变化,其中样品皿的规格为:1×1 cm 的石英皿。

1.2.4 存放时间和其他离子对检测体系的影响 将反应液存放 1、2、3、4、5 周,分别测紫外吸光度,观察金纳米颗粒 520 nm 处的特征吸收峰,证明反应液的稳定性。

分别将等摩尔浓度的各种常见离子 (NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 BH^- 、 Cl^- 、 CO_3^{2-} 、 CH_3COO^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+}) 加入到反应液中,检测体系在 520 nm 处的吸光度值。如果 520 nm 处,体系的吸光度值明显降低,说明干扰离子使金纳米颗粒发生聚集,即此离子对检测体系有强干扰,验证测试反应液对 NO_2^- 的专一性。

1.2.5 改良比色法的加标回收试验 以正常市售的鲜牛奶和瓶装水为空白,分别取鲜牛奶和瓶装水 2.5 g。向两种样品中分别加入 5、10、20 μg 的亚硝酸盐标准品,定容 25 mL,搅拌超声浸泡 30 min;以 2000 r/min 离心 15 min 取上清液 5 mL,加入 200 μL 亚铁氰化钾溶液 (106 g/L),再加入 0.5 mL 乙酸锌溶液 (220 g/L),搅拌 5~10 min,过滤得到样品液,然后用改良比色法检测样品液的亚硝酸盐浓度 c ,即亚硝酸盐的添加量 $m = c \times 25$,计算出回收率并重复 10 次计算相对标准偏差^[26-27]。

1.2.6 两种比色法的实际应用 将面包、火腿、海带丝打开包装,放置在常温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下 0、5、10、15、20、25、30、35、40 h,分别取 0.25 g 各个时段的面包、火腿、海带丝,按照 1.2.1 制备样品液, $C_{\text{样品}} = 100c_{\text{样品液}} (\mu\text{g/g})$ 。用传统比色法和改良比色法检测样品液,对比两种比色法的差异。

2 结果与分析

2.1 传统比色法检测亚硝酸盐

2.1.1 标准曲线的绘制 按照 1.2.2.1 传统比色法的方法步骤得到标准曲线: $y = 0.0942x + 0.0003$, $R^2 = 0.9985$,如图 3。利用空白样品液 10 次测量吸光度得到 10 个空白值,其吸光度平均值为 $\bar{y} = 0.0025$,以信噪比 = 3 计算可得,其中检测限 $\text{LOD} = 76.43 \text{ ng/mL}$ 。

2.1.2 其他离子对传统比色法的影响 按照 1.2.2.2 传统比色法操作步骤,分别用 0.145 mmol/L 浓度 (相当于 10 $\mu\text{g/mL}$ 亚硝酸钠) 的各种常见离子代替亚硝酸钠标准溶液加入到反应液中,测试传统比色法对 NO_2^- 的专一性或者对环境的抗干扰能力,其结果如图 4。由图可知,只有 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对传统比色法体系有少许影响,其他离子皆不能引起检测体系变色,传统比色法对 NO_2^- 具有较高的专一性。

2.1.3 传统比色法的加标回收试验 按照 1.2.2.3 的

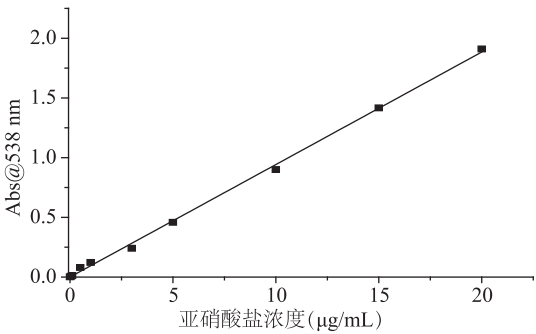


图 3 传统比色法的标准曲线和各样品的颜色变化
Fig.3 Standard curve of traditional colorimetric method and the color changes of the samples

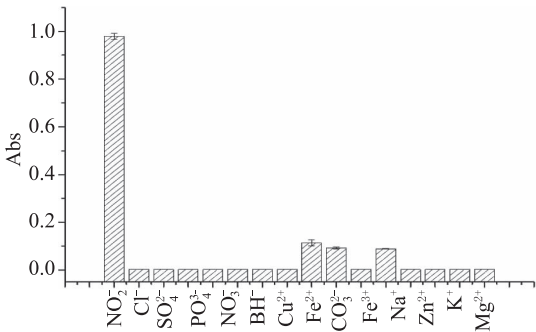


图 4 不同离子对体系的影响

Fig.4 Effect of different ions on the reaction solution

方法,传统比色法的加标回收试验结果如表 1。由表 1 可见,在加入 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,传统比色法无法检测出准确的亚硝酸盐含量,显然加标样品的亚硝酸盐含量已经低于其检测限,因此传统比色法在应用方面有检测限的局限。在 5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 的加标样品的回收率为 97.88%~100.24%,相对标准偏差 (RSD) 为 3.53%~7.22%。

2.2 ATP-GNPs 的表征

通过 1.2.3.2 的方法制备出水相金纳米颗粒 (GNPs),对氨基苯硫酚 (ATP) 修饰到金纳米颗粒之后,由于金纳米颗粒表面配体的变化,紫外吸收峰有少许偏移,纯化过程有少量损失,所以吸收峰强度下降,如图 5;表面电位也有变化,如图 6;ATP-GNPs 的粒径约是 10 nm,如图 7。

2.3 油相 GNPs、AP-GNPs、NA-GNPs 的表征

用 1.2.3.3 方法步骤制作出油相 GNPs 的粒径约为 5 nm,用 AP 包被后的 AP-GNPs 的粒径约为 10 nm,而且紫外吸收吸收峰发生偏移;由于疏水性,油相 GNPs 被 AP 包被,亲水的羧基暴露在外侧,在 EDC 的催化下与氨基乙二胺 (NED) 的氨基连接在一

表 1 传统比色法的回收率以及相对标准偏差

Table 1 Recovery rate and relative deviation (RSD) of the traditional colorimetric method (n = 10)

鲜牛奶					瓶装水			
NO_2^- 添加量 (μg)	1.00	5.00	10.00	20.00	1.00	5.00	10.00	20.00
NO_2^- 平均检出量 (μg)	0.042	5.005	10.024	19.67	0.041	4.984	9.788	19.91
回收率 (%)	4.2	100.1	100.24	98.36	4.10	99.68	97.88	99.55
相对标准偏差 (%)	5.81	3.53	7.22	5.29	5.80	3.67	7.34	4.01

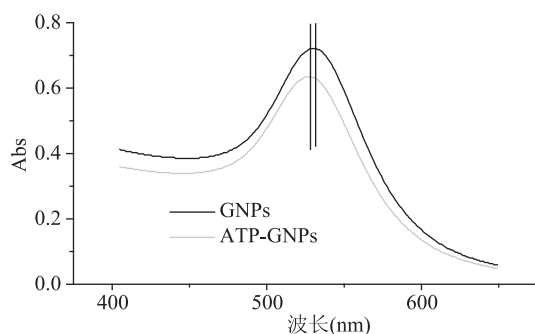


图5 ATP修饰GNPs前后紫外吸收图谱的变化

Fig.5 Changes in UV absorption spectra before and after ATP-modified GNPs

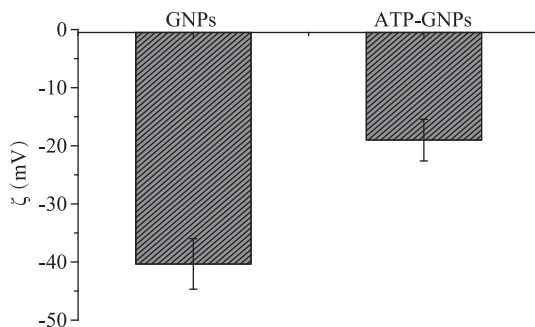


图6 ATP修饰GNPs前后表面电位的变化

Fig.6 Changes in surface potential before and after ATP-modified GNPs

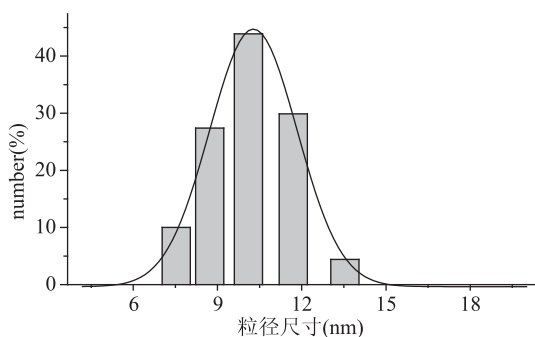


图7 ATP-GNPs的粒径表征

Fig.7 Particle size characterization of ATP-GNPs

起。纯化后把多余的 NED 去除,就得到了 NA-GNPs,由于 NED 的分子较小,因此 NA-GNPs 的紫外吸收峰相对于 AP-GNPs 几乎没有变化,粒径的变化也不大,只有纯化过程中有损失,峰强度降低。油相 GNPs、AP-GNPs、NA-GNPs 的紫外吸收图谱、粒径,如图 8、图 9。

2.4 改良比色法的结果分析

在 1 mL 反应液中分别加入 0.5 mL 去离子水和浓度梯度的亚硝酸盐溶液,反应之后,检测体系的紫外吸收图谱,如图 10。由图谱发现,随着 NO_2^- 的浓度增高,金纳米颗粒的 520 nm 特征峰逐渐降低,580 nm 处的吸收峰逐渐升高, $A_{580 \text{ nm}}/A_{520 \text{ nm}}$ 的值与 NO_2^- 浓度呈正相关,而且 NO_2^- 浓度在 0~1 $\mu\text{g/mL}$ 时,呈良好的线性关系,具体公式为 $y = 0.645x + 0.3613$, $R^2 = 0.9946$,如图 11。加入 NO_2^- 溶液前后,反应体系的电镜图对比,可以明显看到:加入 NO_2^- 溶液

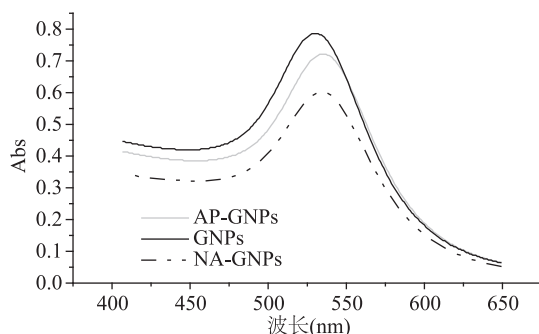


图8 油相GNPs、AP-GNPs、NA-GNPs的紫外吸收图谱

Fig.8 Ultraviolet absorption spectra of oil phase GNPs, AP-GNPs and NA-GNPs

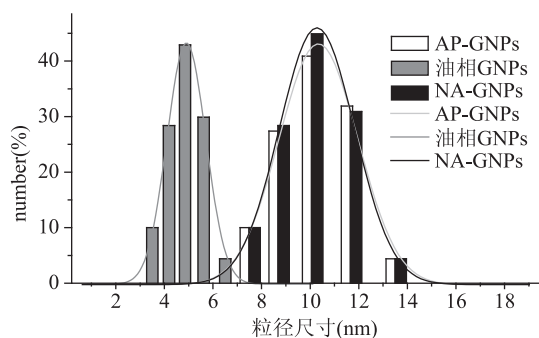
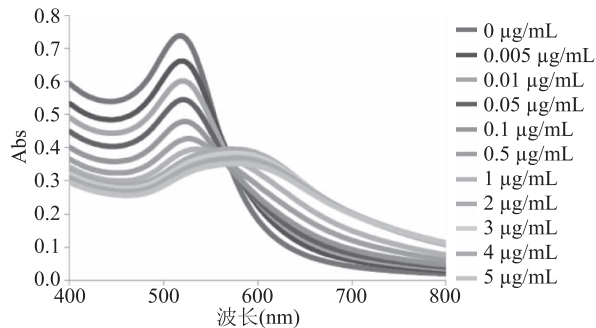


图9 油相GNPs、AP-GNPs、NA-GNPs的粒径表征

Fig.9 Size characterization of oil phase GNPs, AP-GNPs and NA-GNPs

后,体系中的金纳米颗粒明显聚集,由于 NA-GNPs 被 AP 包被了一层,所以相对 ATP-GNPs 较“松散”,因此 NA-GNPs 用电子显微镜显示较“透明”,ATP-GNPs 则类似实心球,如图 12。

利用空白样品液 10 次测量吸光度得到 10 个 $A_{580 \text{ nm}}/A_{520 \text{ nm}}$ 的值,其标准偏差为 0.11%。由公式 $dl = 3\sigma/k$,其中 dl 是检测限, σ 是指空白样品的标准偏差, k 是指标准曲线的斜率。通过计算体系的检测限 $dl = 5.12 \text{ ng/mL}$ 。

图10 加入浓度梯度 NO_2^- 溶液后体系的紫外吸收图谱Fig.10 UV absorption spectrum of the system by adding a concentration gradient NO_2^- solution

2.5 存放时间和其他离子对检测体系的影响

按照 1.2.4 的方法,将反应液在 -4°C 存放 5 周,反应液的紫外吸收图谱几乎没有变化,证明反应液没有“变质”,具有较好的稳定性,如图 13。将常见的等摩尔浓度的各种离子代替亚硝酸钠标准溶液加入

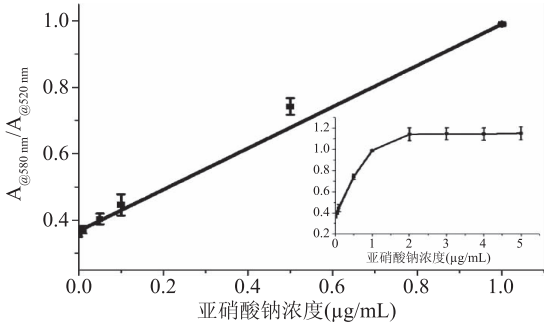


图 11 浓度梯度的 NO₂⁻ 的标准曲线

Fig.11 Standard curve of NO₂⁻ concentration gradient

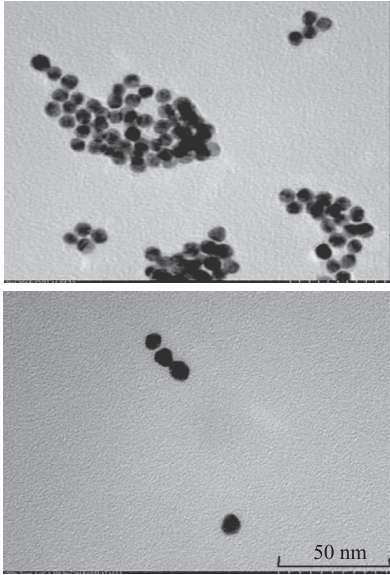


图 12 同等条件下,加入 NO₂⁻ 溶液前(右)和后(左),金纳米颗粒的聚集情况

Fig.12 Aggregation of gold nanoparticles before(right) and after(left) addition of NO₂⁻ solution under equivalent conditions

反应液中,检测体系在 520 nm 的吸光度,发现只有 Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 对反应液有少许影响,其他离子皆不能引起反应液的聚集、变色,如图 14,因此反应液对 NO₂⁻ 具有较高的专一性。

2.6 改良比色法的加标回收试验

按照 1.2.5 的方法,改良比色法的加标回收实验结果如表 2。

由表 2 可见,样品回收率为 97.00%~100.28%,相对标准偏差(RSD)为 0.77%~3.88%,表明本实验方法具有可靠地准确度和精密度。

2.7 改良比色法与传统比色法的比较

2.7.1 检测范围和检出限的比较 两种方法的检测

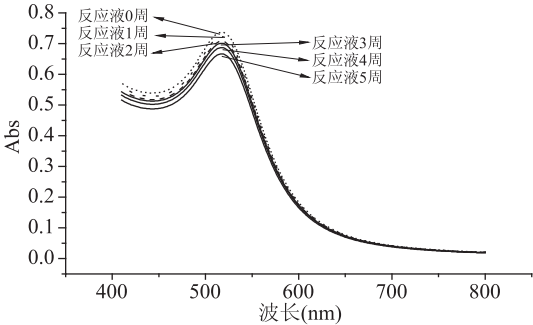


图 13 不同存放时间,反应液的紫外吸收图谱

Fig.13 UV absorption spectrum of the reaction solution at different storage time

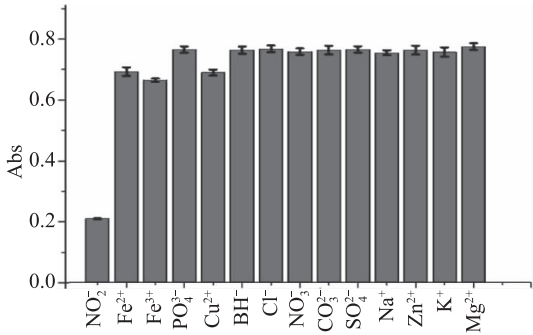


图 14 不同离子对反应液的影响

Fig.14 Effect of different ions on the reaction solution

范围差异很大,表明了改良比色法检测极微量的亚硝酸盐方面的优势,但是传统比色法检测范围更广。改良比色法的检测限低至 5.12 ng/mL,比传统比色法灵敏度更高。在 2.6 中也能得到证实,加标 1.00 μg 的样品处理液的浓度为 40 ng/mL,传统比色法无检测信号,然而改良比色法能够正常的检测其浓度,因此显示出改良比色法的优势。

2.7.2 回收率的比较 改良比色法和传统比色法各自的检测范围内的回收率相差无几,约为 97%~100%,说明两种方法在各自的检测范围内都有良好的准确性和可靠性;传统比色法的 RSD 为 3.53%~7.22%,明显比改良比色法大,说明改良比色法检测结果的离散度程度较小,即检测稳定性比传统比色法优秀。

2.7.3 响应时间的比较 传统比色法是先对氨基苯磺酸与亚硝酸根发生重氮化反应(3~5 min),再与萘基乙二胺盐酸盐发生耦合显色(15 min),整个过程需要 15~20 min,而改良比色法的对氨基苯磺酸和萘基乙二胺连接到金纳米颗粒后,使用时只加入亚硝酸钠溶液即可,这一过程约 15 min,所以改良比色法操作简单,节约反应时间,提高效率。

表 2 改良比色法的回收率以及相对标准偏差

Table 2 Spike recovery rate and relative deviation(RSD) of the improved colorimetric method(n = 10)

	鲜牛奶				瓶装水			
NO ₂ ⁻ 添加量(μg)	1.00	5.00	10.00	20.00	1.00	5.00	10.00	20.00
NO ₂ ⁻ 平均检出量(μg)	0.97	4.95	9.95	19.91	0.97	4.924	9.96	20.05
回收率(%)	97.00	98.94	99.47	99.55	97.36	98.48	99.57	100.28
相对标准偏差(%)	2.48	1.59	1.15	0.79	3.88	1.57	1.19	0.77

表3 改良比色法与传统比色法的比较

Table 3 Comparison between improved colorimetry and traditional colorimetry

	检测范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 (ng/mL)	回收率 (%)	响应时间 (min)	影响体系离子	RSD (%)	操作步骤
传统比色法	0~20	76.43	97.88~100.24	15~20	Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}	3.53~7.22	两次添加试剂
改良比色法	0~1	5.12	97.00~100.28	15	Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}	0.77~3.88	一步法

2.7.4 稳定性的比较 改良比色法的两种金纳米颗粒混合后可以稳定存放5周以上, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对新旧两种检测体系都有少许影响,可能是因为较高浓度的干扰离子本身的颜色对检测体系的吸光度有一些影响;总之改良比色法具有良好的稳定性和抗离子干扰的能力。

2.7.5 相对标准偏差 RSD 的比较 传统比色法的 RSD 为 3.53~7.22,明显比改良比色法大,说明改良比色法检测结果的离散度程度较小,即检测稳定性比传统比色法优良。

总的来说,与传统比色法相比,改良比色法具有检测限低、灵敏度高、操作简单、检测效率高、稳定性好等优势,但是检测范围窄是改良比色法的缺点。改良比色法适用于极微量的亚硝酸盐的检测,如饮用水、牛奶、婴儿食品等亚硝酸盐含量允许添加量极低的食品的检测,或者研究食品中亚硝酸盐的产生过程。

2.8 两种比色法的实际应用

查阅中国的食品标准,面包的允许残留量为 2 g/mg,火腿的允许残留量为 70 $\mu\text{g}/\text{mg}$,海带丝的允许残留量为 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。如图 15,面包的亚硝酸盐含量较低,传统比色法检测时,30 h 之前无法响应,只有亚硝酸盐增加到传统比色法的检测限后,才能有响应。然而改良比色法检测样品时,能够很好地反应亚硝酸盐的增长过程;火腿的亚硝酸盐含量较高,如图 16,20 h 后,样品的亚硝酸盐含量就达到了新方法的检测极限,于是体系处于饱和状态,无法准确记录后面的样品。火腿中亚硝酸盐含量较高,而且暴露 15 h 后,亚硝酸盐增速加大,25 h 左右就超过了允许残留量,如图 17。海带丝在工厂腌制过程中,一般都存放超过 20 d,产品中有一定的乳酸菌消耗了亚硝酸盐,因此样品的亚硝酸盐含量增速较慢,但是也不宜存放超过 30 h。总之,改良比色法优化了检测限,但是检测范围较窄(0~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),因此改良比色法适用于极低含量亚硝酸盐的测定,如奶制品、面制

品等;另一方面,改良比色法可以用于环境污染监测,如水库、江河水的亚硝酸盐含量的检测等。

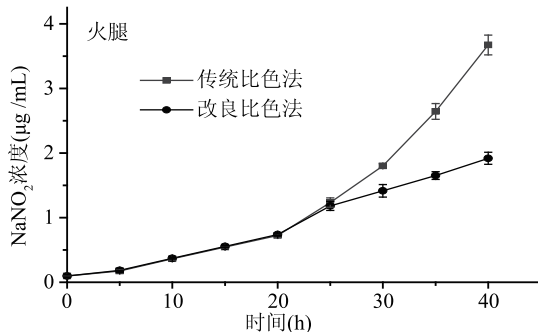


图 16 火腿中的亚硝酸盐的含量变化

Fig.16 Changes in nitrite content in ham

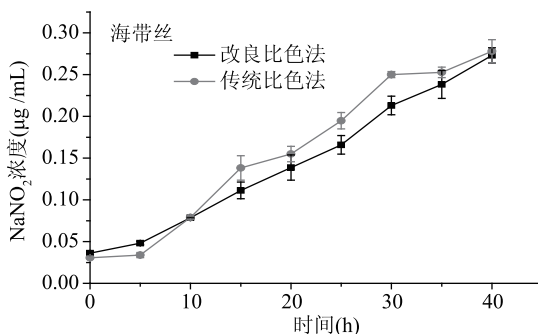


图 17 海带丝中的亚硝酸盐的含量变化

Fig.17 Changes in nitrite content in seaweed strips

3 结论

在本研究中,利用功能化金纳米颗粒对传统比色法进行了改良。相比传统比色法,改良比色法的检测限达到了 5.12 ng/mL ,远远低于传统比色法(76.43 ng/mL)。改良比色法的操作步骤简便、响应时间短,大大提高了工作效率。虽然 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对传统比色法和改良比色法都有影响,但是改良比色法在回收率、RSD 方面有很大优势,说明此方法的稳定性更高,更能适应更复杂的工作环境。改良比色法的检测范围较窄,更加适用于微量亚硝酸盐含量的检测,是传统比色法的有效补充和改进。在应用中发现,食品打开包装后,应尽快用完,否则有亚硝酸盐超标的危险。改良比色法具有高灵敏性的特点,有利于研究亚硝酸盐产生的过程和原因,以及预防亚硝酸盐的产生。

参考文献

- [1] 汪杨峻杰.亚硝酸盐及其对人体的危害[J].化工管理,2017(5):118,120.
- [2] 刘克明,张振国,王娜,等.氨氮和亚硝酸盐对北极红点鲑

(下转第 289 页)

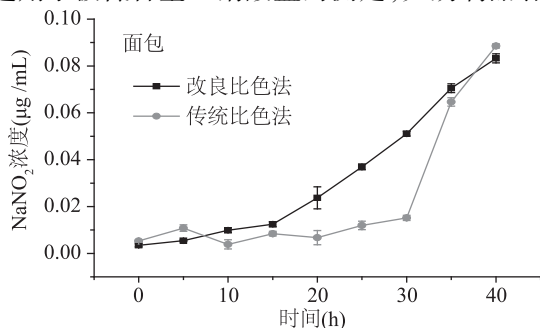


图 15 面包中的亚硝酸盐的含量变化

Fig.15 Changes in nitrite content in bread

methoxy groups and structure-activity relationship[J]. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 2007, 10(4): 537.

[29] Mohamed M, Van S G P F, Maud B, et al. A planar conformation and the hydroxyl groups in the B and C rings play a pivotal role in the antioxidant capacity of quercetin and quercetin derivatives[J]. Molecules, 2011, 16(11): 9636-9650.

[30] 席利莎, 孙红男, 木泰华, 等. 甘薯茎叶多酚的体外抗氧化活性与加工稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 147-156.

[31] Zhang L, Tu Z C, Wang H, et al. Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from *Ipomoea batatas* leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships[J]. Food Chemistry, 2016, 208: 61-67.

[32] 罗丽萍, 高荫榆, 洪雪娥. 液质联用测定薯蓣中黄酮类化合物的构成[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 52-55.

(上接第260页)

幼鱼急性毒性研究[J]. 科学养鱼, 2018(11): 57-58.

[3] 任志彬. 腌渍蔬菜中亚硝酸盐检测方法及应用[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2017.

[4] 樊海平, 薛凌展, 陈玉红, 等. 氨氮及亚硝酸盐对大刺鲃幼鱼的急性毒性[J]. 水产学杂志, 2018, 31(3): 25-28.

[5] 刘佳铭. 过硼酸钠氧化荔枝红色素催化褪色光度法测定亚硝酸盐[J]. 分析化学, 1997(11): 1315-1317.

[6] 俞芸, 施文健, 杨凝非. 磺胺-N-苯基 J 酸分光光度法测定亚硝酸盐研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(3): 573-576.

[7] 董捷, 杨景和, 蔡红. 紫外分光光度法测定亚硝酸盐的研究及应用[J]. 中国环境监测, 2002, 18(1): 26-30.

[8] 金尚满, 程英明. 对硝基苯胺-N,N-二甲基苯胺光度法测定痕量亚硝酸盐[J]. 环境化学, 1992(3): 75-77.

[9] Ramakrishna T V, Balasubramanian N. Spectrophotometric determination of nitrite[J]. Microchemical Journal, 1984, 29(3): 307-310.

[10] 李健, 黎晨晨, 刘宁, 等. 化学发光法测定风干肠中的亚硝酸盐[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 383-386.

[11] 吴婉娥, 王天生, 张泽洋. 溴酸钾-酸性铬蓝 K 化学发光法检测水中微量 NO_2^- [J]. 分析科学学报, 2008, 24(3): 327-330.

[12] Zhao K, Song H Y, Zhuang S Q, et al. Determination of nitrite with the electrocatalytic property to the oxidation of nitrite on thionine modified aligned carbon nanotubes [J]. Electrochem. Commun, 2007, 9(1): 65-70.

[13] 罗宿星, 伍远辉, 勾华. 用稀土(镱)杂多酸盐/多壁碳纳米管修饰的玻碳电极测定亚硝酸根[J]. 理化检验化学分册, 2010, 46(3): 254-256.

[14] 张林, 郑海峰, 罗陶, 等. 离子色谱法检测泡菜中亚硝酸

[33] 张侠, 马庆一, 熊卫东, 等. 甘薯叶中抗油脂氧化活性成分的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 49-51.

[34] Qi H, Zhang Q, Zhao T, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*) *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(4): 0-199.

[35] Singh R, Sharma S, Sharma V. Comparative and quantitative analysis of antioxidant and scavenging potential of *Indigofera tinctoria* Linn. extracts [J]. Journal of Integrative Medicine, 2015, 13(4): 269-278.

[36] 范莉, 王业玲, 唐丽. 天然来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(2): 313-321, 306.

[37] 张或, 高荫榆, 张锡彬. 薯蓣提取物降血糖作用机理初探[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 466-469.

[38] 高荫榆, 罗丽萍, 王应想, 等. 薯蓣黄酮降血糖作用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 218-220.

盐含量的校准曲线线性性能评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1679-1683.

[15] 姜莉莉, 李柚. 离子色谱法测定火腿中的硝酸盐和亚硝酸盐[J]. 中国无机分析化学, 2018, 8(6): 18-20.

[16] 毕建玲. 离子色谱法快速测定土壤中的亚硝酸盐氮和硝酸盐氮[J]. 化学分析计量, 2018, 27(6): 38-41

[17] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(9): 699-712.

[18] 徐增奇, 张宏杰, 赵树人, 等. 流动注射法快速测定乳粉中的亚硝酸盐及硝酸盐[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 296-298.

[19] 徐阳纯, 梁洁怡, 王志强. 食品中亚硝酸盐的检测[J]. 山东化工, 2018, 47(18): 55-56.

[20] GB 1886.11-2016, 食品安全国家标准 食品添加剂 亚硝酸钠[S].

[21] GB/T 13085-2018, 饲料中亚硝酸盐的测定 比色法[S].

[22] 王鹏, 钟睿博, 袁鸣, 等. 基于纳米颗粒光学特性的癌症检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(10): 2051-2057.

[23] 侯亚辉. 基于朗伯—比尔定律的食品安全快速检测仪的设计与实现[D]. 北京: 中国地质大学, 2017.

[24] 陈婷, 孟建昇, 谢华相. 朗伯—比尔定律在血红蛋白浓度检测中的应用研究[J]. 科技创新导报, 2015, 12(24): 32-33.

[25] 钟睿博. 研究两性亲聚合物包被的金纳米颗粒与血浆蛋白形成的蛋白晕[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.

[26] 李丽, 周洪斌, 王现平. 《分析方法目的的适宜性》在农药残留检测领域的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 268-274.

[27] 陈根伟. 数理统计及质控图在水质铍加标回收实验中的应用[J]. 福建分析测试, 2018, 27(6): 56-59.

权威 · 高效 · 核心 · 领先 · 精湛 · 实用