

文章编号:1673-1689(2009)02-0206-04

磺胺-8-氨基萘磺酸光度法测定食品中亚硝酸盐

钟晓永, 施文健*, 陈肖云, 俞芸, 宋伟

(上海理工大学城市建设与环境工程学院, 上海 200093)

摘要: 筛选了重氮组分和偶合组分。研究了重氮反应和偶合显色反应的条件和方法, 提出了磺胺-8-氨基-1-萘磺酸分光光度法测定食品中亚硝酸盐。常温, 溴化钾共存下, 亚硝酸盐在 pH 3 的磷酸-磷酸二氢钠缓冲溶液中与磺胺发生重氮化反应, 重氮盐与 8-氨基-1-萘磺酸偶合生成红色偶氮化合物, 最大吸收峰在 518 nm 波长处。磺胺-8-氨基-1-萘磺酸偶氮化合物的表观摩尔吸光系数 $3.9 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 线性范围 0.02~1.4 mg/L, 相对标准偏差 2.22%, 回收率 98.0%~102%。该方法可用于食品中痕量亚硝酸盐的测定。

关键词: 亚硝酸盐; 磺胺; 8-氨基-1-萘磺酸; 分光光度法

中图分类号: O 657.3

文献标识码: A

Spectrophotometric Determination of Nitrite in Food with Sulfanilamide and 8-Naphthylamine-1-Sulfonic Acid

ZHONG Xiao-yong, SHI Wen-jian*, CHEN Xiao-yun, YU Yun, SONG Wei

(College of Urban Construction, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In this manuscript, A novel method of diazotizing-coupling spectrophotometry with sulfanilamide and 8-Naphthylamine-1-Sulfonic acid to determine nitrites in foodstuffs was developed. Room temperature, In the presence of potassium bromide, nitrite could reacted with sulfanilamide in $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ buffer medium of pH 3 at room temperature. Then diazonium salt reacted with 8-Naphthylamine-1-Sulfonic acid, forming red azo compounds, of which the absorption peak was 518nm. The apparent molar absorptivity was $3.9 \times 10^4 \text{ L/mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The Beer's law was obeyed in the range of 0.02 to 1.4 mg/L. RSD was 2.22%. The recoveries were in the range from 98.0% to 102%. This method has been successfully used to determine the trace nitrite in food.

Key words: nitrite, sulfanilamide, 8-Naphthylamine-1-Sulfonic acid, spectrophotometry

亚硝酸盐作为一种添加剂被广泛应用于肉制品中, 因其具有抑制肉毒梭状芽胞杆菌的能力, 在肉制品的保藏过程中发挥有益作用^[1-2]。亚硝酸盐

在胃肠道酸性环境中可以转化为致癌物质亚硝胺, 在人体内还容易形成高铁血红蛋白, 导致组织缺氧^[3]。因此, 世界各国将食品中的亚硝酸盐列为严

收稿日期: 2008-03-03

基金项目: 上海市世博重大科技专项资助项目(06dz05809); 上海理工大学城建学院创新基金资助项目(CJCX0602)。

* 通讯作者: 施文健(1957-), 男, 上海人, 教授, 主要从事分析化学与环境科学研究。Email: swj1957@msn.com

格控制对象^[4]。

目前食品中亚硝酸盐的测定方法主要有光谱法、色谱法、电化学法等三大类,其中以分光光度法应用最为广泛。酸性条件下亚硝酸与芳香族伯胺的重氮化反应是亚硝酸盐特有的反应,这种反应不受其他共存离子的影响,选择性好、灵敏度高,因此,许多科研人员对重氮偶合光度法测定亚硝酸盐进行了大量研究工作^[5-6]。王丹等人采用邻苯二胺紫外光度法对市售肉制品中的亚硝酸盐含量进行了测定,该方法快速、简便、适用于大批量试样的分析检测,但是该方法易受其他离子以及色素的干扰^[7]。Reddy M. C用二氨基芪二磺酸作重氮试剂,2-萘酚为偶合试剂,反应速度快,表观摩尔吸光系数为 $3.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[8]。我国测定亚硝酸盐的国家标准方法是以磺胺为重氮组分,盐酸萘乙二胺为偶合组分的分光光度法测定。该方法中重氮反应与偶合反应在同一介质中进行,操作简便且灵敏度高,但是盐酸萘乙二胺是一种强致癌物,毒性大;作者对重氮和偶合试剂进行了筛选,提出了磺胺-8-氨基-1-萘磺酸分光光度法测定食品中亚硝酸盐。该方法具有仪器简单、操作简便、快速,灵敏度高、分析结果准确等优点。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

$1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠储备液; $2.9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠标准溶液; $4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸-磷酸二氢钠缓冲溶液;质量分数25%溴化钾水溶液; $2.9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磺胺(以下简称为SM)水溶液; $3.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-氨基-1-萘磺酸(以下简称为NSA)水溶液; $6.98 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 甲萘胺溶液; $2.93 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ H酸溶液; $4.18 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ J酸溶液。以上所用试剂均为分析纯。

UV757CRT分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;PHS-2C精密酸度计:上海雷磁仪器厂产品。

1.2 实验方法

在25 mL容量瓶中依次移入2.0 mL磷酸-磷酸二氢钠缓冲溶液、0.5 mL溴化钾水溶液,加入蒸馏水至20 mL左右,再加1.0 mL亚硝酸钠标准溶液,摇匀后移入1.0 mL SM水溶液,摇匀,静置5 min,加入1.0 mL NSA水溶液,摇匀后,用蒸馏水稀释至刻度。1 cm比色皿,以不加亚硝酸钠的试剂溶液作参比,在518 nm波长处测定溶液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 重氮组分和偶合组分的选择

在食品样品的预处理过程中,需要加入乙酸锌以沉淀蛋白质,在碱性条件下进行偶合反应时会产生少量白色的氢氧化锌沉淀影响对样品的测定,因此,在酸性水溶液中筛选了重氮组分和偶合组分,筛选结果列于表1。由表1可以看出,酸性条件下以SM-甲萘胺和SM-NSA组成的偶氮化合物表观摩尔系数最高,由于甲萘胺为致癌物,因此选定SM作为重氮试剂,NSA作为偶合试剂。SM和NSA偶氮化合物的吸收光谱见图1。

表1 酸性水溶液中重氮组分和偶合组分的选择(pH=3.4)
Tab.1 Selection of diazo compounds and coupling compounds in the acid medium (pH=3.4)

重氮组分	偶合组分	最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	摩尔吸光系数 $\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
Alpha naphthylamine	J acid	515	8.80×10^3
Alpha naphthylamine	SM	520	1.36×10^4
H acid	J acid	428	1.19×10^4
H acid	NSA	430	1.16×10^4
H acid	Alpha naphthylamine	430	1.12×10^4
H acid	SM	438	1.21×10^4
J acid	H acid	424	1.00×10^4
SM	J acid	484	1.54×10^4
SM	H acid	522	1.97×10^4
SM	NSA	518	3.90×10^4
SM	Alpha naphthylamine	516	4.44×10^4

2.2 SM和NSA的结构分析

SM苯环上氨基与亚硝酸发生重氮化反应生成重氮盐,磺酰胺基的存在增大了SM的水溶性。偶氮化合物的分子结构图见图2。磺酸基团的存在大大增加了偶氮化合物的水溶性。NSA的萘环共轭体系较大,显色灵敏。因此,从结构上分析,NSA是比较理想的偶合组分。

2.3 重氮偶合反应条件的选择

2.3.1 反应酸度的选择 按实验方法,试验了酸度对重氮偶合反应的影响。试验结果:pH值在2.5~5.0范围内时,吸光度比较稳定(见图3),灵敏度高。为操作简便,作者选择重氮反应和偶合反

应在同一介质体系中进行。因此选择 4×10^{-3} mol/L 的磷酸一磷酸二氢钠 2.0 mL 作为缓冲溶液,将溶液的 pH 值保持在 3 左右,此时,吸光度最大。

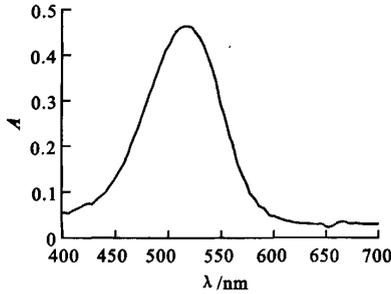


图1 吸收光谱

Fig. 1 Adsorption Spectra of Azo Compounds

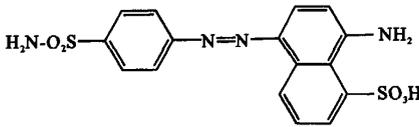


图2 SM-NSA 偶氮化合物结构图

Fig. 2 Structure of SM-NSA Compounds

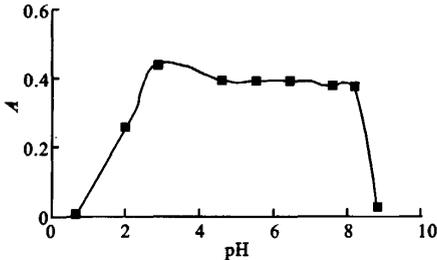


图3 pH 值对反应的影响

Fig. 3 Effect of pH on Diazotization

2.3.2 温度对反应的影响 通常重氮盐在低温下较稳定,在高温下则易分解。按实验方法,在 0~25 °C 之间试验温度对实验的影响。结果表明,SM 重氮盐在 5~25 °C 吸光度平稳,说明该重氮盐比较稳定,重氮化在常温下进行即可。

2.3.3 反应时间的确定 在重氮反应阶段,由于磺酰基为吸电子基团,减弱了芳胺的碱性,故重氮化反应所需时间很短,往往数十秒至数分钟内完成。按实验方法,试验了重氮化时间 1~20 min,结果表明 5~20 min 内,吸光度稳定且最大,因此选择反应时间 5 min。

分别在 0, 5, 10, 17, 25 °C 下研究偶合时间对反应的影响,结果见图 4。温度对反应时间有较大影响,温度较低时偶合反应完成需较长时间,反之,温度较高时反应较快。实验选择 25 °C 反应 20 min。

2.3.4 溴化钾用量的选择 为了加快重氮化反应

的速度,添加溴化钾作为催化剂。按实验方法,分别加入不同量的质量分数为 25% 溴化钾溶液,考察溴化钾用量对反应的影响,实验结果见图 5。试验结果表明,溴化钾能有效加快重氮化反应速率。选择加入溴化钾溶液为 0.5 mL。

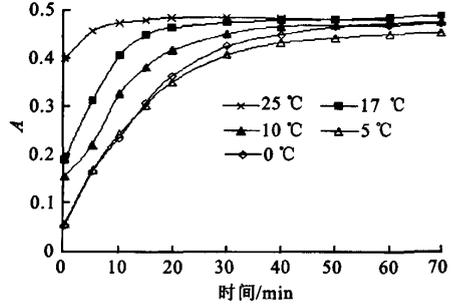


图4 时间对反应的影响

Fig. 4 Effect of Time on Diazotization

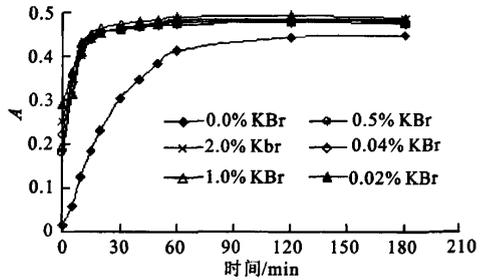


图5 溴化钾质量分数对偶合反应速度的影响

Fig. 5 Effect of Potassium bromide on Diazotization

2.3.5 各组分用量的影响 按实验方法,质量浓度为 1.07 mg/L 的亚硝酸钠水溶液,分别试验了 SM 和 NSA 浓度对反应的影响。结果表明: SM 浓度在 $4.64 \times 10^{-5} \sim 4.64 \times 10^{-4}$ mol/L, NSA 浓度在 $5.28 \times 10^{-5} \sim 5.28 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内吸光度稳定,选择 SM 浓度 2.9×10^{-3} mol/L 溶液 1.0 mL, NSA 浓度 3.3×10^{-3} mol/L 溶液 1.0 mL。

2.3.6 共存离子的影响 按实验方法,对食品中常见共存离子的影响进行了试验。在试验条件下,在亚硝酸钠含量为 10 mg/kg 时,加入以下量的常见共存离子 (mg/kg, 未做上限): K^+ (300)、 Na^+ (500)、 Ca^{2+} (300)、 Mg^{2+} (300)、 Al^{3+} (50)、 Fe^{3+} (50)、 Zn^{2+} (50)、 Cu^{2+} (50)、 NO_3^- (300)、 SO_4^{2-} (300)、 Cl^- (500)、 F^- (100)、 Br^- (100)、 I^- (100)、 SCN^- (50)、 CN^- (50)。结果表明:被测试液吸光度相对误差均小于 5%,上述共存离子不干扰 NO_2^- 的测定。

2.4 工作曲线

按文献[9]绘制工作曲线,结果见表 2。

2.5 样品分析

分别称取食品样品(咸肉 5.0 g、罐装午餐肉 20.0 g、咸菜 20.0 g),经绞碎混匀后置于 250 mL 烧杯中,加 12.5 mL 硼砂饱和液,搅拌均匀。以 70 ℃ 左右的水约 300 mL 分数次将试样洗入 500 mL 容量瓶中,于沸水浴中加热 15 min,取出后冷却至室温。加入 5 mL 10.6% 亚铁氰化钾溶液,摇匀,再加入 5 mL 质量分数 22% 的乙酸锌溶液,以沉淀蛋白质。加水至刻度,摇匀,放置 30 min,除去上层脂肪,清液用滤纸过滤,弃去初滤液 30 mL,滤液备用。

在 25 mL 容量瓶中分别用移液管移取 2.0 mL

磷酸-磷酸二氢钠缓冲溶液、0.5 mL 溴化钾水溶液、20 mL 待测样品,摇匀后移入 1.0 mL SM 水溶液,摇匀,静置 5 min,加入 1.0 mL NSA 水溶液,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。20 min 后,1 cm 比色皿,以试样空白(除不加试样,其余操作步骤完全相同)溶液作参比,在波长 518 nm 处测定溶液的吸光度。用标准加入法做回收实验($n=8$)并与国家标准方法进行了对照实验,测定结果一并列入表 3。由表 3 可知,本法测定值与国家标准方法的测定值相吻合,且有较高精密密度。

表 2 工作曲线

Tab. 2 The standard curve

方法	回归方程	相关系数 r	线性范围/ (mg/L)	摩尔吸光系数 ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
SM-NSA	$A=0.419C + 0.0022$	0.999 4	0.02~1.4	3.9×10^4
National Standard Method	$A=0.471C+0.0036$	0.999 4	0.01~1.3	4.3×10^4

表 3 食品样品分析结果

Tab. 3 Analytical results of NO_2^- in foodstuffs samples

样品	方法	测定值/ (mg/kg)	相对标准偏差 RSD/%	加入量/ (mg/kg)	总测定值/ (mg/kg)	回收 率/%
腌肉	SM-NSA	49.8	2.00	26.8	76.1	98.2
	国家标准	50.3	1.84	26.8	76.7	98.5
罐装午餐肉	SM-NSA	12.5	2.98	11.6	24.2	102
	国家标准	13.1	1.96	11.6	24.6	99.2
咸菜	SM-NSA	6.50	2.22	11.6	17.8	98.0
	国家标准	6.74	2.68	11.6	18.4	101

参考文献(References):

- [1] 刘志诚,于守洋. 营养与食品卫生学(第 2 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1987. 202-204.
- [2] 杨锡洪,夏文水. 亚硝酸盐替代物——组氨酸发色作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 5(24): 102-106.
YANG Xi-hong, XIA Wen-shui. Research on color fixation of histidine as a substitute for nitrite[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 5(24): 102-106. (in Chinese)
- [3] Mousavi M F, Jabbari A, Nouroozi S. Ultrasensitive and selective determination of trace amounts of nitrite ion with a novel fluorescence probe mono[6-N(2-carboxy-phenyl)]- β -cyclodextrin[J]. *Talanta*, 1998, 45 (6): 1247-1255.
- [4] Adnan Aydin, Özgen Ercan. A novel method for the spectrophotometric determination of nitrite in water[J]. *Talanta*, 2005, 66 (5): 1181-1186.
- [5] Nagaraja Padmarajaiah, Kumar Mattighatta, Mallikarjuna Nadagouda. Dapsone a new diazotizing reagent for the spectrophotometric determination of nitrite in waste and natural water samples[J]. *Annali di Chimica*, 2002, 92(1-2), 127-134.
- [6] Hensley Kenneth, Mou Shenyun, Pye Quentin N. Nitrite determination by colorimetric and fluorometric Griess diazotization assays: simple, reliable, high-throughput indices of reactive nitrogen species in cell-culture systems[J]. *Methods in Biological Oxidative Stress*, 2003, 185-193.
- [7] 王丹. 紫外分光光度法对肉制品中亚硝酸盐化合物的测定[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2213-2214.
WANG Dan. Measurement of nitrite compounds study in meat products by UV spectrophotometry[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2007, 35(8): 2213-2214. (in Chinese)
- [8] Reddy M C. New reagent for determination of trace levels of nitrite in environmental samples[J]. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2004, 63 (2): 172-176.
- [9] Barzegar M, Mousavi M F, Nemati A. Kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite by its reaction with molybdosilicic acid blue[M]. *Microchemical Journal*, 2000, 65 (2): 159-163. (责任编辑:朱明)