

• 论 著 •

市售奶粉亚硝酸盐添加剂的检测*

陈 瑜¹, 叶猛飞¹, 丁春丽¹, 骆静波¹, 俞灵钰¹, 王远帆¹, 王 建¹, 刘丽华^{2△}

(绍兴文理学院医学院: 1. 临床医学部; 2. 检验系, 浙江绍兴 312000)

摘 要:目的 检测并分析市售奶粉中亚硝酸盐添加剂水平。方法 选取 6 种不同品牌的市售奶粉, 采用亚铁氰化钾-乙酸锌去蛋白预处理的方法, 去除奶粉中蛋白质等干扰物质, 运用荧光分光光度法对亚硝酸盐水平进行测定, 并与奶粉中亚硝酸盐水平的国家标准(2 mg/kg)进行比较评价。结果 6 种奶粉的亚硝酸盐水平均低于国家标准, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 所选 6 种市售奶粉的亚硝酸盐水平均未超标。

关键词:奶粉; 亚硝酸盐; 荧光分光光度法; 2,3-二氨基萘

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1837-02

Determination of nitrite additives in marketed milk powder*

Chen Yu¹, Ye Mengfei¹, Ding Chunli¹, Luo Jingbo¹, Yu Lingyu¹, Wang Yuanfan¹, Wang Jian¹, Liu Lihua^{2△}

(1. Department Clinical Medicine; 2. Department of Laboratory, Medicine College of Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

Abstract: Objective To detect and analyse the levels of nitrite in marketed milk powder. Methods 6 brands of marketed milk powder were selected in this study. Interferents, such as protein, were removed from milk powder preliminarily by using potassium ferrocyanide and zinc acetate. The levels of nitrite were detected by using fluorospectrophotometry method, and compared with national standard(2 mg/kg). Results The levels of nitrite in the 6 brands of marketed milk powder were lower than the national standard limit, had statistically significant differences($P < 0.05$). Conclusion The levels of nitrite of 6 brands of milk powders do not exceed the national standard.

Key words: milk powder; nitrite; fluorospectrophotometry; 2,3-diaminonaphthalene

亚硝酸盐是一种广泛使用的食品防腐剂,在一定浓度范围内可有效并安全地起到防腐作用。近年来,食品中防腐剂水平超标问题日益严重,奶粉也出现了亚硝酸盐超标的问题。2009 年 5 月 10 日,国家质检总局公布我国 2009 年 2 月进境食品、化妆品的不合格信息,其中韩国第 3 大奶制品生产商每日乳业的一款奶粉因亚硝酸盐超标被列入质检总局“黑名单”^[1]。国家质检总局公布的 2013 年 5~6 月进境不合格食品名录显示,来自新西兰、法国、德国等多地的乳制品发现质量问题,其中有 3 批次近百吨奶粉亚硝酸盐水平超标。为了解我国市场现售奶粉中亚硝酸盐水平是否符合国家限制标准,本研究随机抽取市售各种品牌奶粉,检测其亚硝酸盐水平。亚硝酸盐的测定有多种方法,如 Wu 等^[2]采用电化学传感器检测河水和雨水中的亚硝酸盐水平, Pistón 等^[3]曾记录以显色试剂在不同样品产生的有色物质的吸光度来测定亚硝酸盐水平。本研究采用荧光分光光度法检测亚硝酸盐水平,该方法具有灵敏度高、选择性强、样品用量少,且不易受检测液和样品稀释度干扰的优点^[4]。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源 市售惠氏、贝因美等 6 种不同品牌奶粉,各取 20 g,记为 1~6 号。

1.2 仪器与试剂 1.45 mmol/L 亚硝酸钠(NaNO_2)储备液:称取 NaNO_2 250 mg,溶于去离子水,定容至 500 mL 配成;0.72 $\mu\text{mol/L}$ NaNO_2 工作液:取 0.25 mL 储备液,加去离子水至 500 mL 配成,4 ℃暗处保存;硼砂饱和溶液;0.75 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2);0.58 mol/L 氢氧化钠(NaOH);0.25 mol/L 盐酸;106 g/L 亚铁氰化钾溶液;220 g/L 乙酸锌溶液;0.63 mmol/L 2,3-二氨基萘(DAN,杭州欣科生物科技有限公司);称取 DAN 5 mg,用 0.25 mol/L 盐酸(HCl)

溶解,调 pH 至 2.0,定容至 50 mL 配成,4 ℃暗处保存。F96 型荧光分光光度计(上海比朗仪器有限公司,氙灯,灵敏度 150:1),检测条件为激发波长(Ex)365 nm,发射波长(Em)405 nm。

1.3 方法

1.3.1 制作标准曲线 取 NaNO_2 工作液,加去离子水至 5 mL,配成一组浓度分别为 0.00、0.07、0.14、0.21、0.29 $\mu\text{mol/L}$ 的亚硝酸盐溶液。在前 5 支试管中各加 0.3 mL DAN 溶液,混匀,20 ℃水浴 15 min;再依次加入 NaOH 0.15 mL, EDTA-Na_2 0.2 mL,混匀,最终 pH 为 10.0,测荧光强度并制作标准曲线。

1.3.2 奶粉样品的制备 称取奶粉 2.0 g 于 50 mL 烧杯中,加入 5.2 mL 硼砂饱和溶液,用 70 ℃以上的水 30 mL 将样品搅拌均匀,放入沸水浴中加热 15 min。取出冷却后,边转动烧杯边加入亚铁氰化钾溶液 2 mL,摇匀后,再加入乙酸锌溶液 2 mL,以沉淀蛋白质。用滤纸或脱脂棉过滤,得到澄清溶液。将其吸入 100 mL 容量瓶中,加水至刻度并混匀。

1.3.3 奶粉中亚硝酸盐的测定 取上述溶液 5 mL 于 6 支试管,加 0.3 mL DAN 溶液,混匀,20 ℃水浴 15 min。加 0.15 mL NaOH ,0.2 mL EDTA-Na_2 ,混匀后测定荧光强度,每份样品重复实验 6 次,取平均值,通过标准曲线得出样品 NaNO_2 浓度。与奶粉中亚硝酸盐水平的国家标准(2 mg/kg)进行比较并评价。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,奶粉中亚硝酸盐水平与国家标准比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 标准曲线 根据不同浓度 NaNO_2 与 DAN 反应测得荧光强度,绘制标准曲线,见图 1。亚硝酸盐浓度与荧光强度呈

* 基金项目:绍兴文理学院科研项目(20130614)。 作者简介:陈瑜,在读本科生,主要从事生物化学与分子生物学检测研究。 △ 通讯作者,E-mail:li9544@sina.com。

线性关系,线性方程为 $Y=63.729X-1.2435(r=59.675,P=0.005)$ 。

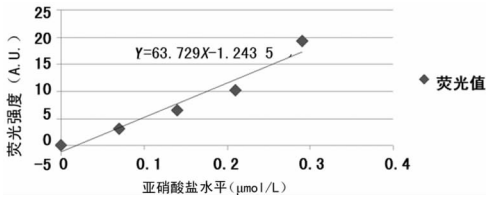


图 1 亚硝酸盐标准曲线

2.2 奶粉荧光强度 6 种奶粉亚硝酸盐水平与国家标准(2 mg/kg)比较差异均有统计学意义($P<0.05$),且均低于国家标准,表明本实验所测 6 种奶粉中亚硝酸盐水平未超标。见图 2。

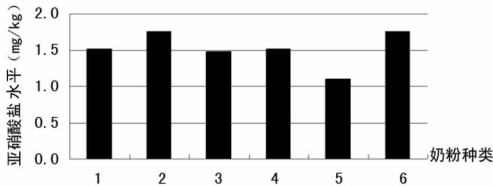


图 2 6 种奶粉中亚硝酸盐浓度柱状图

3 讨 论

亚硝酸盐被血液吸收后,可使正常的血红蛋白变性,从而使其失去携氧功能,出现组织缺氧现象;它还可以与蛋白质的代谢中间产物仲胺反应生成亚硝胺,该物质具有一定的致癌性^[5]。此外,亚硝酸盐参与超氧化物歧化酶(SOD)的代谢,对脏器细胞增殖、组织功能产生不良影响^[6]。奶粉中含有一定量的亚硝酸盐,但由于其使用群体主要为婴幼儿,体质较差,容易受奶粉中亚硝酸盐的危害,因此 1999 年我国对乳粉卫生标准进行了修订,对乳粉中亚硝酸盐的水平提出了严格的限制,即亚硝酸盐的水平不得超过 2 mg/kg。

目前对亚硝酸盐水平的测定方法有气相化学光检测法、离子色谱法、高效液相色谱法和分光光度法等。气相化学光检测法建立在一氧化氮和臭氧反应的基础上,具有较大的检测范围,但增加了设备的复杂性,且反应需要在 600 ℃ 的高温下进行。离子色谱法虽选择性好,灵敏度也较高,但对于非金属元

素的测定较为困难,而且其对相当大一部分元素测定的灵敏度还不令人满意。高效液相色谱法对样品的预处理要求高,操作也比较复杂。盐酸萘乙二胺分光光度法操作简便,灵敏度也较好,但与荧光分光光度法相比还有一定的不足。

荧光分光光度法则投资小,操作简便,方法成熟、重现性好,且准确度高,可用于测定亚硝酸盐在牛奶和奶粉中的水平^[7]。但是奶粉中含有大量蛋白质,配成溶液时极易浑浊,对荧光强度的测定有很大影响,所以本实验采用乙酸锌(2 mL)与亚铁氰化钾(2 mL)沉淀蛋白,可在短时间内过滤得到澄清溶液。本研究结果显示,检测的惠氏、贝因美等 6 种奶粉中亚硝酸盐水平均低于奶粉中亚硝酸盐水平的国家标准(2 mg/L)要求($P<0.05$),亚硝酸盐水平均未超标。

参考文献

[1] 李静. 韩奶粉检出致癌物[J]. 农产品市场周刊, 2011, 12(19): 29.
[2] Wu H, Fan S, Jin X, et al. Construction of a zinc porphyrin-fullerene-derivative based nonenzymatic electrochemical sensor for sensitive sensing of hydrogen peroxide and nitrite[J]. Anal Chem, 2014, 86(13): 6285-6290.
[3] Pistón M, Mollo A, Knochen M. A simple automated method for the determination of nitrate and nitrite in infant formula and milk powder using sequential injection analysis[J]. J Autom Methods Manag Chem, 2011, 2011: 148183.
[4] 方步武, 靳殊华, 林秀珍. 测定血中亚硝酸盐的荧光分光光度法[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(2): 235-239.
[5] 刘文. 奶粉中亚硝酸盐含量超标的原因[J]. 监督与选择, 2008, 22(9): 58.
[6] Wang L, Frizzell SA, Zhao X, et al. Normoxic cyclic GMP-independent oxidative signaling by nitrite enhances airway epithelial cell proliferation and wound healing[J]. Nitric Oxide, 2012, 26(4): 203-210.
[7] Li W, Ai L, Guo C, et al. Simultaneous determination of penicillin and their major enzymatic metabolites in milk and milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Se Pu, 2013, 31(10): 946-953.

(收稿日期: 2015-04-28)

(上接第 1836 页)

中的这些抗体均能与大肠杆菌表达的重组抗原 HBcAg 混杂的菌体蛋白结合而出现假阳性相关^[8]。因此, 将竞争 ELISA 法改为双抗原夹心, 检测更为直接; 或利用杆状病毒表达载体系统来生产重组核心抗体, 或采用酵母、质粒、其他亚型的大肠杆菌等载体来表达核心抗原, 减少非特异性反应。总之, 检测 HBcAb 的技术仍有待提高。

HBcAb 阳性结果尤其是单独弱阳性标本在不同的医院可能有不同的应对措施, 从本研究结果得出如下措施可供参考: 微粒子发光检测乙型肝炎两对半结果中的 HBcAb 阳性, HBcAb 的 COI 值大于或等于 11.0 可作为判断 HBV 现症感染的参考指标; 其 COI 为 1.0~<9.0 可作为判断 HBV 既往感染的参考指标; 其 COI 为 1.0~<9.0 时为灰区, 临床意义不肯定。总之在临床应用时, 应将 HBV 各种标志物综合分析才能提高 HBcAb 的实验室诊断性能。

参考文献

[1] Zaatari M, Kzama H, Majzoub M, et al. Hepatitis B virus DNA in serum of anti-HBc only-positive healthy Lebanese blood donors: significance and possible implications[J]. Hospit Infect, 2007, (66): 278-282.
[2] Dhawan HK, Marwaha N, Sharma R, et al. Anti-HBc screening in

Indian blood donors: still an unresolved issue[J]. World J Gasastroenterol, 2008, 14(34): 5327-5330.
[3] Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors[J]. Transfusion, 2001, 41(9): 1093-1099.
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 User verification of performance for precision and trueness[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
[5] Nassal M, Skamel C, Vogel M, et al. Development of hepatitis B virus capsids into a whole-chain protein antigen display platform: new particulate Lyme disease vaccines[J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(1/2): 135-142.
[6] Qiao CX, Zhai XF, Ling CQ, et al. Health-related quality of life evaluated by tumor node metastasis staging system in patients with hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(21): 2689-2694.
[7] 李金明. 乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 385-389.
[8] 成军, 谢珏, 王国政, 等. 乙型肝炎血清学标志物单项抗-HBc-IgG 阳性结果的解释及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 203-205.

(收稿日期: 2015-05-10)