

食品中硝酸盐酶法快速检测试纸条的设计与应用

孙京新¹, 李凤梅^{2,*}

(1.青岛农业大学 青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 山东 青岛 266109;

2.青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 目的: 对食品中硝酸盐酶法快速检测试纸条进行了设计并应用于几种蔬菜进行验证。方法: 用 2.0% 的 N-1-萘基乙二胺二盐酸、3.0% 的对氨基苯磺酸和 6.0% 酒石酸溶液按体积 1:1:1 混合作为显色剂, 利用定量滤纸为试纸条载体和硝酸盐还原酶为还原剂制作了酶法快速检测试纸条并与国家标准法对比检测了几种蔬菜中硝酸盐含量。结果: 利用显色剂和硝酸盐还原酶还原剂与硝酸盐发生的显色反应可以实现对硝酸盐的快速检测。结论: 该试纸条能够比较快速(1min)地对食品中的硝酸盐进行检测且准确度高、灵敏度高、体积小、成本低廉, 开发潜力巨大。
关键词: 硝酸盐; 试纸条; 硝酸盐还原酶; 快速检测

Designing and Application of Test Strip for Fast Detection of Nitrate in Food Based on Enzymatic Method

SUN Jing-xin¹, LI Feng-mei^{2,*}

(1.Qingdao Key Laboratory of Modern Agricultural Quality and Safety Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Objective: A test strip for fast detection nitrate in food was designed based on enzymatic method and applied in several vegetables. Methods: With 2.0% N-1-naphthylethylenediamin dihydrochloride, 3.0% sulfanilic acid and 6.0% tartaric acid mixed by the volume 1:1:1 as the color-developing reagent, qualitative filter paper used for the test strip carrier and nitrate reductase used for the reductant, the test strip was made successfully and used to detect nitrate levels in several vegetables compared with national standard method of China. Results: the color-developing reagent and nitrate reductase could react for fast detection of nitrate. Conclusion: The designed test strip can be used to detect nitrate in food, with higher precision and sensitivity, smaller volume and lower cost, therefore it would have huge potential for development.

Key words: nitrate; test strip; nitrate reductase; fast detection

中图分类号: TS251.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0575-04

在现代食品的安全检测中, 硝酸盐检测意义十分重要。硝酸盐本身没有危害但可转化成亚硝酸盐, 引起中毒, 一定情况下可形成据有致癌作用的亚硝胺类化合物^[1]。研究表明人体内 80% 的硝酸盐来自于蔬菜^[2], 而在我国每年大量、超量或不合理地使用化肥尤其是氮肥于农作物上, 致使果蔬中硝酸盐污染问题相当严重, 特别是叶菜类蔬菜^[2-3], 这对我国食品行业造成了严重的危害。目前, 在国家标准中用于检测硝酸盐的方法为镉柱还原法。此法必须在实验室中操作, 并且操作时间长; 镉可以挥发, 对人体具有很大的毒性。研究与开发新的快速、简便、安全的硝酸盐检测方法对于无

公害和绿色食品生产、贸易和市场监管具有重要意义。国外对硝酸盐快速检测试纸条的研究较多且有了相应的商品^[4-7], 我国学者也进行了此方面的初步研究^[8-11], 但还不能有效地应用于实际的检测。本研究旨在根据硝酸盐快速测定(主要是显色)的原理, 研究设计一种酶法快速检测食品中硝酸盐的试纸条并应用于蔬菜进行检测, 验证该试纸条的准确可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硝酸盐还原酶(E.C. 1.7.1.2, 300U/g)、NADH Sigma

收稿日期: 2007-10-25

作者简介: 孙京新(1970-), 男, 副教授, 博士, 主要从事肉品质量控制与食品安全研究。E-mail: jxsun20000@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 李凤梅(1970-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事酶研究。E-mail: lifm1114@126.com

公司; N-1- 萘基乙二胺二盐酸($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$)、对氨基苯磺酸、酒石酸、 $NaNO_3$ 、 $NaNO_2$ 、盒体(实验室中可用小烧杯代替)、具有凹穴的显色板、定量分析用滤纸(Whatman, 直径: 90mm)。

1.2 方法

1.2.1 标准色卡的设计

标准显色溶液的制备: 根据所确定的硝酸盐的浓度计算出亚硝酸盐的浓度并配制(以蒸馏水作溶剂, 下同)各个浓度的亚硝酸盐于标记好的锥形瓶中备用, 每个瓶中的亚硝酸盐的体积约 50ml 左右。硝酸盐与亚硝酸盐关系见表 1。

表 1 硝酸盐含量和亚硝酸盐含量的对应关系

Table 1 Corresponding relationship between nitrate concentration and nitrite

硝酸盐的含量(mg/L)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
亚硝酸盐的含量(mg/L)	0	60	120	180	250	300	370	430	500	550	620

注: 由于亚硝酸盐浓度相差不大时所显的颜色差别不大, 所以硝酸盐浓度所对应的亚硝酸盐浓度都取了整数。

显色剂的配制: 分别配制 2.0% 的 N-1- 萘基乙二胺二盐酸、3.0% 的对氨基苯磺酸和 6.0% 酒石酸溶液, 并将它们等体积混合后置于标号的小烧杯中(即盒体)备用。

显色: 分别用胶头滴管取盒体中的溶液 30ml 放在显色板上, 再加入一滴亚硝酸盐溶液, 1min 后观察颜色, 并用彩色笔在白纸上画出所观察到的颜色。

制作标准色卡: 重复上述的操作, 画出各个浓度的亚硝酸盐所对应的颜色。将所画的不同颜色用剪刀剪成 $1cm \times 1cm$ 的小方块, 按亚硝酸的浓度由低到高排好得到不同硝酸盐浓度的图像, 就制成了检测不同浓度硝酸盐的标准色卡。

1.2.2 酶法硝酸盐试纸条的设计

将定量滤纸剪成 $0.6mm \times 100mm$ 的长纸条, 浸泡于 2.0% N-1- 萘基乙二胺二盐酸的水溶液 15min 后, 于 $35^\circ C$ 干燥或用冷风吹干; 后于 3.0% 对氨基苯磺酸、6.0% 酒石酸、 $7000\mu mol/L$ 硝酸盐还原酶、 $10mmol/L$ NADH 的等体积混合水溶液中浸泡 15min, 再于 $35^\circ C$ 干燥或用冷风吹干; 将显色试纸片切割成规格为 $0.6mm \times 0.8mm$ 的试纸片粘接在准备好的长形硬白纸条上; 为消除亚硝酸盐干扰, 特制作未泡硝酸盐还原酶显色试纸片, 粘接在试纸条上部, 作为警示区。制作好的试纸条在避光、干燥、低温($2\sim 8^\circ C$)下保存, 即制成硝酸盐试纸条。注意试纸条免于污染。

1.2.3 酶法硝酸盐试纸条准确性的验证

纯硝酸盐溶液的配制: 准确称量硝酸盐试剂, 配制 450、400、350、300、250、200、150、100、

50、0mg/L 的硝酸盐溶液, 分别放在不同的锥形瓶中备用, 每个锥形瓶中的硝酸盐溶液约为 50ml 左右。

验证: 取一做好的试纸条放在 450mg/L 硝酸盐(常温 $25\sim 30^\circ C$)的锥形瓶中, 停留 1s 后拿出, 静置 1min 后放在白纸上观察试纸条的颜色; 依次测定其它各个浓度的硝酸盐试剂条所显示的颜色并与标准色卡对比, 以验证硝酸盐试纸条的检测是否准确。另 400mg/L 浓度组再静置 30min 后放在白纸上观察试纸条的颜色。

1.2.4 酶法硝酸盐试纸条检测几种新鲜蔬菜中的硝酸盐含量

切割几种新鲜蔬菜的可食组织, 让切断面渗出或压出汁水; 把试纸条直接按在蔬菜的切面或滴在试纸条上, 持续 1s; 取下试纸条静置 1min 后观察试纸条的颜色, 并与标准色卡对比目测出该种蔬菜的硝酸盐含量。同时按国家标准测定法(GB/T5009.33—2003)测定这几种蔬菜的硝酸盐含量。每种蔬菜三个重复, 含量以汁液计, 单位 mg/L。

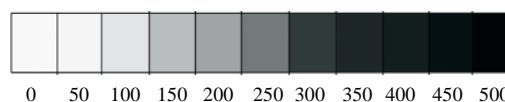
1.3 统计分析

采用统计分析软件 SAS6.12 版进行分析, 多重差异显著分析采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 设计的硝酸盐标准色卡和酶法硝酸盐试纸条

图 1 为设计的硝酸盐标准色卡。可看出, 随硝酸盐浓度增大, 标准色卡的颜色由浅粉色、粉色、紫红、紫色、深紫色而加深且相互间颜色目视时差异明显, 低浓度时差异更分明。



注: 图中的单位是 mg/L, 硝酸盐含量从左到右是依次增大。

图 1 硝酸盐标准色卡

Fig.1 Standard color scale for different concentrations of nitrate

图 2 为设计了一个反应区(测试区)的酶法硝酸盐试纸条, 图 3 为设计了两个反应区(警示区和测试区)的酶法硝酸盐试纸条。

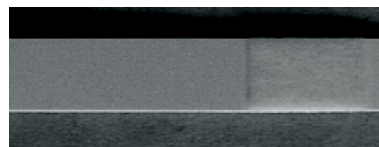


图 2 设计了一个反应区的硝酸盐试纸条

Fig.2 Test strip designed with one reaction zone (test zone)

2.2 酶法硝酸盐试纸条准确性的验证

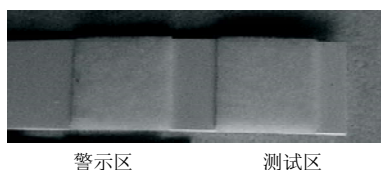
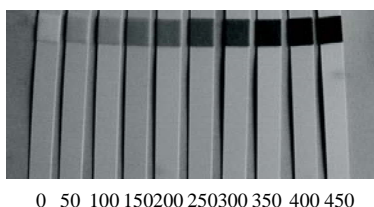


图3 设计了两个反应区的硝酸盐试纸条

Fig.3 Test strip designed with two reaction zones (alert zone and test zone)

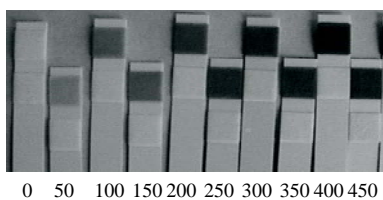
图4、5分别为不同标准浓度的硝酸盐经酶法硝酸盐试纸条(带一个反应区和带两个反应区)检测后的显色。可看出,硝酸盐试纸条所显示的颜色与标准色卡(图1)所对应的硝酸盐浓度的颜色是基本相同的,试纸条的颜色也由浅粉色、粉色、紫红、紫色、深紫色随着标准纯硝酸盐浓度的增高而加深。同时在未有亚硝酸盐干扰的情况下,警示区未显色。表明所设计的硝酸盐试纸条失真很小,为实物检测的准确度奠定了基础。



注:图中的单位是mg/L,硝酸盐含量从左到右是依次增大。

图4 不同标准浓度的硝酸盐经硝酸盐试纸条检测后的显色(带一个反应区)

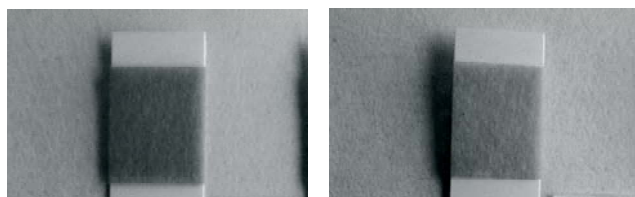
Fig.4 Color development of different standard concentrations of nitrate by test strips (with one reaction zone)



注:图中的单位是mg/L,硝酸盐含量从左到右是依次增大。

图5 不同标准浓度的硝酸盐经硝酸盐试纸条检测后的显色(带两个反应区)

Fig.5 Color development of different standard concentrations of nitrate by test strips (with two reaction zones)



注:均为与400mg/L的硝酸盐标准溶液反应。

图6 反应时间对硝酸盐试纸条显色的影响

Fig.6 Effects of reaction time on color development of test strips

图6为反应时间对试纸条显色的影响。在室温下,以400mg/L的硝酸盐标准溶液为样品,观察反应时间对测定结果的影响。结果表明,检测试纸条在1~2min内能够完全显色,由无色变为深紫色,30min后褪色变浅,故选择溶液的反应时间为1min时最好。

2.3 酶法硝酸盐试纸条检测几种新鲜蔬菜中的硝酸盐含量

酶法硝酸盐试纸条与国家标准法检测几种新鲜蔬菜中的硝酸盐含量的比较见表2。可看出,酶法硝酸盐试纸条法检测的新鲜蔬菜中的硝酸盐含量均低于国家标准法相应含量,且标准偏差偏大,但差异均不显著($p > 0.05$)。结果表明,硝酸盐试纸条法基本能够满足检测的准确度;对硝酸盐含量较低的辣椒和黄瓜也表现了较好的灵敏度,但精确度略差。

表2 酶法硝酸盐试纸条与国家标准法检测几种新鲜蔬菜中的硝酸盐含量的比较(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparative data between nitrate levels in vegetables detected with designed test strip and national standard method of China (n=3, $\bar{x} \pm s$)

蔬菜种类	酶法硝酸盐试纸条法含量(mg/L)	国家标准法含量(mg/L)
茄子	238.0 ± 20.2	250.8 ± 15.5
辣椒	81.0 ± 9.2	85.2 ± 6.5
黄瓜	109.5 ± 14.3	131.6 ± 9.2
甘蓝	756.4 ± 58.9	826.3 ± 30.4
芹菜	1518.0 ± 96.2	1560.2 ± 51.2
大白菜	1231.8 ± 65.6	1271.5 ± 48.1

3 讨论

本研究设计了两种试纸条,其中图3首次设计了两个反应区,警示区主要针对样品中若亚硝酸盐含量过高对硝酸盐含量结果的干扰,给予警示;可在5ml样品液中加入10%氨基磺酸,煮沸片刻后冷却以排除亚硝酸盐干扰。而测试区首次采用硝酸盐还原酶和NADH还原样品中硝酸盐,比目前普遍采用的锌粉还原法^[10]更灵敏,酶法专一性强,无需样品特殊前处理;但最好在低温(2~8℃)、避光、干燥下保存。若测试区颜色比标准比色卡深,则需适当稀释样品液。

通过提高试剂的浓度可以提高试纸条的灵敏度^[12],在对氨基苯磺酸和N-1-萘基乙二胺盐酸盐浓度比不变的情况下,扩大配制的试剂浓度从而缩短测量时间,提高灵敏度。

样品的酸度对试纸条的显色结果也有一定影响,通过实验发现当pH值低于3.0时,试纸很快显色;pH值高于6.0时,反应速度又变得非常缓慢。所以样品pH值的选择最好在6.0以下,这样能够快速检测出食品中硝酸盐的含量,同时也能减少许多不利因素的影响。另外,研究发现酒石酸溶液可以消除一些干扰离

子的影响,对显色剂有很好的稳定作用,有利于试纸条的保存期,又可以调节反应液的酸度条件,经实验优选浓度为50g/L的洒石酸的稳定作用较好^[13-14]。

试纸条所显现的颜色不是用仪器而是用肉眼观察的,因每个人对颜色的判断不一,这就不免存在着误差,影响了精确度;但使用试纸条检测硝酸盐比用仪器要方便、快捷且操作简单,无需特殊处理,用于半定量分析,准确度、灵敏度可以达到要求,适于大批量样品的同时检测,并判断食品中硝酸盐含量是否符合国家安全标准,为食品硝酸盐快速测定方法的建立奠定了基础。它的研究对我国的食品质量安全具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 宁霞,爱华.肉制品中亚硝酸盐的快速测定[J].中国乡村医药杂志,2003,10(7):46-47.
- [2] 王晶.蔬菜中硝酸盐的危害和标准管理[J].中国蔬菜,2003(2):1-3.
- [3] 杨琳.蔬菜硝酸盐污染现状调查及安全性问题研究[J].安徽农业科学,2005,33(1):114-115.
- [4] SCHAEFER N L. Evaluation of a hand held reflectometer for rapid quantitative determination of nitrate[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1986, 17(17): 937-951.
- [5] ROTH G W, FOX R H, FOX R H, et al. Development of a quick test kit method to measure soil nitrate[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1991, 22(3): 191-200.
- [6] BISCHOFF M, HIAR A, TURCO R. Evaluation of nitrate analysis using test strips: comparison with two analytical laboratory methods[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1996, 27(15/17): 2765-2774.
- [7] JIMENÉZ S, ALÉS J I, LAO M T, et al. Evaluation of nitrate quick tests to improve fertigation management[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2006, 37(15/20): 2461 - 2469.
- [8] 王立忠.银离子催化锌粉还原法测定饮用水中硝酸盐氮初探[J].中华预防医学杂志,1991,25(2):125.
- [9] 齐凤元,刘丽萍.蔬菜硝酸盐快速检测方法[J].中国蔬菜,2004(2):59.
- [10] 杜应琼,王富华,李乃坚,等.新鲜蔬菜硝酸盐含量测定的改进试粉法[J].园艺学报,2005,32(1):49-53.
- [11] 吴良欢,伍少福,许超.硝酸盐、亚硝酸盐,快速测定试纸及其应用:中国,200510048918.4[P].2005-01-17.
- [12] 楼明.食品中亚硝酸盐在线检测技术、测试盒研究[J].肉类工业,2003,5(4):30-34.
- [13] 魏复盛.水和废水监测分析方法指南:上册[M].北京:中国环境科学出版社,1990.
- [14] SINGH J P,张玉龙.土壤和植株提取液中硝酸盐快速测定法[J].土壤学进展,1990,18(3):50-52.