

法和试剂盒方法均能在前增菌 6 h 时检出副溶血性弧菌, IAC 均扩出, 表明两种方法均可采用。对于两种不同的细菌基因组 DNA 提取方法, 水煮法更简便, 费用低, 试剂盒方法提取的核酸纯度较水煮法高, 杂质少, 因而在实际检测中, 建议根据不同基质样品和食品检测需求选择提取方法。

综上所述, 本研究所建立的基于内参的副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 方法, 既能快速检测样品中的副溶血性弧菌, 又能实时监控 PCR 体系以防止假阴性结果的发生, 在进行大量食品样品的检测工作时, 是一种可靠、有效的初筛方法。

参考文献

- [1] Akio Y, Jun'ichiro I, Varaporn V, et al. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand[J]. *Internat J Food Microbiol*, 2008, 124(1): 70-78.
- [2] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 牡蛎中副溶血性弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(1): 96-102.
- [3] 刘阳, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 副溶血性弧菌检测技术的研究进展[J]. *经济动物学报*, 2012, 16(1): 49-62.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789. 7—2013 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [5] 孙宏迪, 杜晰颖, 汪周佳, 等. 副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(8): 969-972.

- [6] 王淑娜, 周向阳, 胡兴娟, 等. 基于 TaqMan 探针的双重荧光定量 PCR 方法检测海产品中的副溶血性弧菌[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(5): 455-458.
- [7] HE P Y, CHEN Z W, LUO J Y, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2014, 28(5): 246-250.
- [8] 覃倚棠, 吴晖, 肖性龙, 等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血性弧菌[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(10): 1837-1842.
- [9] WEI S, ZHAO H, XIAN Y, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014, 79(2): 115-118.
- [10] 张晓君, 梁利国, 阎斌伦, 等. 水产动物致病性副溶血性弧菌双重 PCR 检测方法的研究[J]. *海洋科学*, 2010, 34(10): 7-12.
- [11] Pascual J, Macian M C, Arahall D R, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *retB* and *toxR* genes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 60(1): 154-165.
- [12] Siebert P D, Larrick J W. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR[J]. *Biotechnology*, 1993, 14(2): 244-249.
- [13] 苏裕心, 高珊, 康琳, 等. 荧光定量 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌方法的建立[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(1): 25-29.
- [14] 何晓华, 余水静, 陈万义, 等. 添加有扩增内标的副溶血性弧菌 PCR 检测方法[J]. *微生物学报*, 2010, 50(3): 387-394.

实验技术与方法

离子色谱法测定辣椒粉中的二氧化硫

徐慧, 沈文雯, 王柯, 刘畅

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要:目的 建立一种快速准确的离子色谱法测定辣椒粉中二氧化硫残留量。方法 样品在酸性条件下加热蒸馏, 二氧化硫被 H_2O_2 吸收氧化为硫酸根, 通过离子色谱法测定。结果 二氧化硫含量在 0~667.0 mg/kg 范围内线性良好, 回归方程 $y = 1.01809x - 0.07779$, 相关系数 $r = 0.9999$; 加标浓度为 1.0、10、100 mg/kg 时, 回收率为 82.79%~108.7%, 相对标准偏差(RSD)均 < 5% ($n = 6$); 检出限为 0.1 mg/kg。结论 本方法前处理简单, 干扰少, 准确度、灵敏度高, 适合辣椒粉中二氧化硫残留检测。

关键词: 二氧化硫; 离子色谱; 辣椒粉; 食品污染物; 残留限量

中图分类号: R155.5; S641.3; O622.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2015)04-0413-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.014

收稿日期: 2015-03-31

作者简介: 徐慧 女 初级检验技师 研究方向为食品理化检验 E-mail: hui.xu1988@gmail.com

通讯作者: 刘畅 女 副主任药师 研究方向为食品、药品分析 E-mail: ccchangchang@hotmail.com

The detection of sulfur dioxide in paprika by ion chromatography

XU Hui, SHEN Wen-wen, WANG Ke, LIU Chang

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of sulfur dioxide in paprika by ion chromatography.**Methods** After the sample being crushed in acidic condition, sulfur dioxide in the sample was distilled and oxidized to sulfate by H_2O_2 , and determined by ion chromatography. **Results** The calibration curve was linear in the concentration range of 0-667.0 mg/kg ($r=0.9999$), the recovery was in the range of 82.79%-108.7%, the relative standard deviation (RSD) was less than 5%, and the limit of detection of sulfur dioxide was 0.1 mg/kg. **Conclusion** This simple method has less interference, good specificity, accuracy and sensitivity.**Key words:** Sulfur dioxide; ion chromatography; paprika; food contaminant; maximum residue limit

亚硫酸盐,通常是指二氧化硫(SO_2)及能够产生 SO_2 的无机性亚硫酸盐的统称,对食品有漂白、抗氧化、防腐的作用,广泛应用于食品工业生产中^[1-3]。长期摄入过量二氧化硫会出现恶心、呕吐、腹泻等症状,还可造成免疫力低下、影响钙磷吸收、破坏B族维生素、肝脏损害等健康损害^[4-6]。我国GB 2760—2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[7]中对亚硫酸盐在食品中的使用范围、使用量及残留量等都作了明确限制,规定辣椒中的残留限量为0.2 g/kg。一些不法商人,为了使食品颜色亮泽、不长虫、延长保质期,超标使用亚硫酸盐,二氧化硫残留超标较普遍^[8]。在辣椒粉的生产中,常用工业硫磺熏制,从而产生过量二氧化硫残留。食品中二氧化硫残留的常用检测方法有滴定法、分光光度法、电化学法和酶法等^[9-10],国标GB/T 5009.34—2003《食品卫生检验方法 理化部分》^[11]检测食品中的二氧化硫采用盐酸副玫瑰苯胺法(第一法)和蒸馏滴定法(第二法)。在实际检测应用中,检测辣椒粉等基质复杂的样品时,盐酸副玫瑰苯胺法因显色条件影响因素多,稳定性差,而难以控制;蒸馏滴定法在滴定过程中会产生悬浊物,从而影响滴定终点的判断,容易产生假阳性、假阴性等问题。本研究建立了用离子色谱法测定辣椒粉中二氧化硫的残留量的方法,该方法能够较准确地测定辣椒粉中二氧化硫的含量,且具有简便、快速、干扰少、污染少、准确度高、灵敏度高等特点。

1 材料与方**1.1 主要仪器与试剂**

Metrohm 850型离子色谱仪(配备进样器、色谱工作站、电导检测器)、双抑制系统、Metrosep A Supp 5-150阴离子分析柱(4.0 mm × 250 mm)、Metrosep RP 2 Guard(3.5 mm)保护柱均购自瑞士万通,蒸馏装置,Milli-Q超纯水制备系统。

无水碳酸钠、无水碳酸氢钠(色谱纯)均购自上海安谱科学仪器有限公司;30%过氧化氢、浓盐酸、浓

硫酸、无水亚硫酸钠均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)、碘、硫代硫酸钠、淀粉均为分析纯,均购自上海凌峰化学试剂公司;硫酸根标准溶液[GBW(E)081230 140718, 1.000 g/L,上海市计量测试技术研究院];超纯水(电导率 $<1.0 \mu\text{s}/\text{cm}$),由Milli-Q超纯水系统制得。

1.2 方法**1.2.1 样品溶液的制备**

精密称取5.00~10.00 g样品粉碎均匀,置蒸馏装置的样品瓶中,加水50 ml,摇匀,打开冷凝装置,冷凝管下端插入含有20 ml 1% H_2O_2 溶液的100 ml容量瓶底部,加5 ml浓盐酸于样品瓶中,立即盖塞,加热蒸馏,收集馏出液约90 ml,停止蒸馏,加水定容至100 ml,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,供离子色谱测定。

1.2.2 硫酸根标准溶液的配制

硫酸根标准中间液(10 mg/L):精密量取硫酸根标准溶液(1.000 g/L)1 ml,至100 ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。分别精密量取硫酸根标准中间液(10 mg/L)0、50、100、500、1 000 μl 及硫酸根标准溶液(1.000 g/L)50、100、200、500 μl ,至不同的10 ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,配制成浓度为0、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、50 mg/L的标准溶液。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: Metrosep A Supp 5-150阴离子分析柱(4.0 mm × 250 mm), Metrosep RP 2 Guard保护柱(3.5 mm);淋洗液: 3.2 mmol/L Na_2CO_3 + 1.0 mmol/L $NaHCO_3$;抑制系统溶液:超纯水和50 mmol/L硫酸溶液;流速0.7 ml/min;进样量100 μl ;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4 二氧化硫含量计算

$$X = \frac{c \times V \times 1000 \times 0.6667}{m}$$

式中: X:样品中二氧化硫的含量, mg/kg; c:测得硫

酸根的浓度, mg/L; V : 样品蒸馏定容体积, L; m : 样品取样质量, g; 0.666 7: 硫酸根折算成二氧化硫的系数(由于二氧化硫在蒸馏过程中被氧化为硫酸根, 要得到样品中二氧化硫的量需对离子色谱测得硫酸根的量进行折算, 此折算系数为 0.666 7)。

2 结果与分析

2.1 样品前处理的选择

由于辣椒粉成分复杂, 含有较多的色素、纤维素等大分子, 本试验采用水蒸气蒸馏法, 通过收集馏出液能够有效去除杂质, 防止大分子化合物进入色谱柱。另外, 由于亚硫酸根与硫酸根相比不稳定, 易被氧化, 本试验将二氧化硫氧化为硫酸根, 通过测定硫酸根的值计算二氧化硫的残留量, 稳定性较好。

2.2 接收液的选择

高氯酸和 H_2O_2 均可将二氧化硫氧化为硫酸根, 但有研究表明^[12], 用稀高氯酸作为吸收液, 残留的高氯酸会水解出大量的氯化物, 使色谱柱超载而影响分离, 而 H_2O_2 不会产生其他杂质, 且方便购买和使用。但 H_2O_2 在满足高浓度样品饱和和吸收的同时, 也要防止其残留浓度过高, 造成色谱柱被氧化损坏^[5]。本试验分别考察了浓度为 1%、2%、3%、4% 和 5% H_2O_2 溶液对硫酸根测定的影响, 试验结果表明, H_2O_2 浓度对二氧化硫的氧化效果没有明显影响, 但随 H_2O_2 浓度的升高, 杂质峰逐渐变大, 故选择浓度为 1% 的 H_2O_2 作为吸收液。

2.3 色谱柱的选择

本试验比较考察了 Metrosep A Supp 5-150、Metrosep A Supp 7-250、Metrosep A Supp 5-250 3 种常用阴离子色谱柱对硫酸根的分离情况, 发现 Metrosep A Supp 5-150 能够很好的分离出硫酸根离子, 出峰时间较快; 而另两种色谱柱存在分析时间长、峰型宽等缺点。因此选择 Metrosep A Supp 5-150 作为分离色谱柱。

2.4 淋洗液的选择

由于辣椒粉基质复杂, 存在较多无机离子, 要准确检测硫酸根, 须用合适的淋洗液使硫酸根与共存离子有效分离。本试验比较了不同浓度 Na_2CO_3 与 $NaHCO_3$ 混合作为淋洗液的分离效果, 当 3.2 mmol/L Na_2CO_3 和 1.0 mmol/L $NaHCO_3$ 混合溶液作为淋洗液, 流速为 0.7 ml/min 时, 硫酸根能够与各共存离子及基质峰较好的分离, 且出峰时间较短, 分离图谱见图 1~4。

2.5 线性范围和检出限

配制 0~50 mg/L 的硫酸根标准溶液, 以峰面积对质量浓度作图, 得到工作曲线, 回归方程为 $y =$

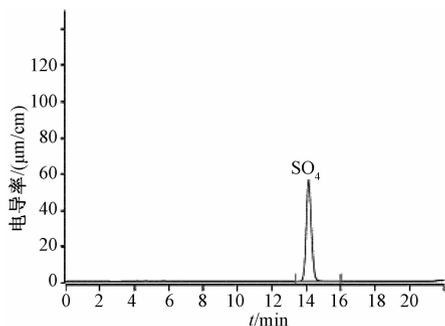


图1 硫酸根标准溶液离子色谱图

Figure 1 Chromatogram of sulfate standard solution

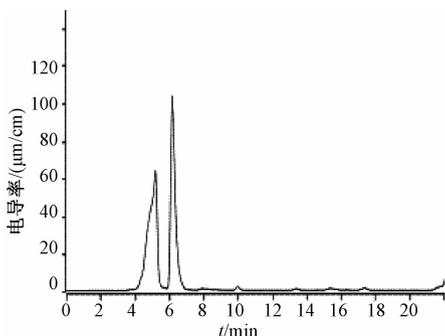


图2 空白样品离子色谱图

Figure 2 Chromatogram of blank sample

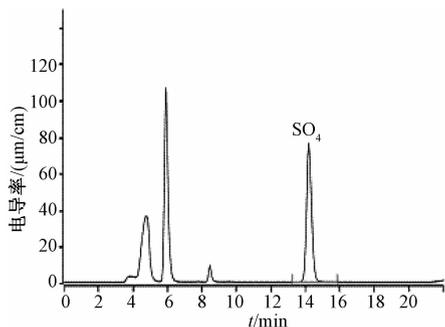
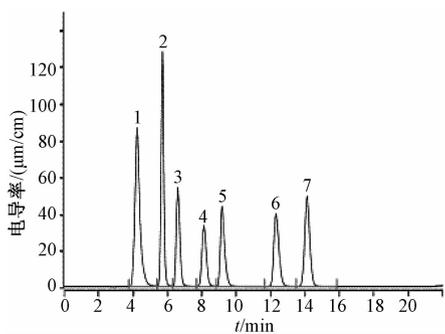


图3 阳性样品离子色谱图

Figure 3 Chromatogram of positive sample



注: 1 为 F^- ; 2 为 Cl^- ; 3 为 NO_2^- ; 4 为 Br^- ;
5 为 NO_3^- ; 6 为 PO_4^{3-} ; 7 为 SO_4^{2-}

图4 共存干扰离子分离色谱图

Figure 4 Chromatogram of interference ions

$1.01809x - 0.07779$, 相关系数 $r = 0.999 9$ 。检出限采用无限稀释法测定, 硫酸根的检出限根据 3 倍信

噪比为0.0075 mg/L,当取样量为5.00 g,定容体积为100 ml时,二氧化硫的检出限为0.1 mg/kg。

2.6 回收率和精密度

对本底不含二氧化硫的辣椒粉分别添加1.0、10、100 mg/kg 3水平的二氧化硫(精密称取2.250 g无水亚硫酸钠,以0.05% EDTA溶液溶解定容至1 000 ml,临用前用碘量法标定二氧化硫浓度为1 015.28 mg/L),进行加标回收试验,每一水平进行6次平行操作,回收率和相对标准偏差见表1。结果表明,不同水平的添加回收率在82.79%~108.7%,相对标准偏差(RSD)均<5%。本方法具有较高的回收率和精密度,结果较满意。

表1 回收率、精密度试验结果($n=6$)

Table 1 Results of recovery and precision

实际加标浓度 /(mg/kg)	实测浓度 /(mg/kg)	回收率 /%	平均实测浓度 /(mg/kg)	RSD /%
1.015	0.882 6	86.96	0.876 1	3.14
	0.897 7	88.44		
	0.840 3	82.79		
	0.852 2	83.96		
	0.870 5	85.76		
	0.913 3	89.98		
10.15	9.77 7	96.33	10.12	4.72
	11.03	108.7		
	10.26	101.1		
	9.958	98.11		
	9.827	96.82		
	9.864	97.18		
101.5	99.60	98.13	97.19	1.56
	97.28	95.84		
	96.39	94.97		
	96.44	95.01		
	95.29	93.88		
	98.11	96.66		

2.7 方法比较

分别按本法和蒸馏滴定法(GB/T 5009.34—2003第二法)测定4批典型辣椒粉样品,每批样品每种方法平行操作6次,对结果进行 t 检验。由表2可知,当样品中二氧化硫含量较高时,两种方法差异无统计学意义($P>0.05$);当二氧化硫含量较低时,由于辣椒粉的基质干扰,影响了滴定终点的判断,蒸馏滴定法结果明显偏高。而本法则能够较好地排除基质干扰,得到更加准确的结果。

表2 蒸馏滴定法与本法比较试验结果

Table 2 Comparison results of the national standard method and this method

样品	测得值/(mg/kg)		t 值
	蒸馏滴定法	本法	
1	209.30	207.200	1.358
2	623.00	620.200	1.819
3	35.70	4.160	51.070
4	57.21	7.506	72.110

3 小结

本文采用水蒸气蒸馏法对辣椒粉进行前处理,样品在酸性条件下加热,二氧化硫得到释放,经 H_2O_2 溶液吸收氧化为硫酸根,通过离子色谱测定硫酸根的量,最后折算出样品中二氧化硫的量。该方法操作简单、干扰少、灵敏度高,精密度、回收率和准确度均符合分析要求,弥补了国标方法的一些不足,适用于辣椒粉中二氧化硫残留量的测定。

参考文献

- [1] 吴红雨. 离子色谱法测定食品中二氧化硫的含量[J]. 仪器仪表与分析监测, 2011(4):42-43.
- [2] 雒丽丽, 王海波, 刘汉霞, 等. 离子色谱法测定食品中的二氧化硫[J]. 食品科技, 2011, 36(8):297-299.
- [3] 赵海霞, 刘伟, 曹晖, 等. 硫磺熏蒸对山药中二氧化硫含量的影响[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(3):176-177.
- [4] 蔡刚, 邢海龙, 林永通. 离子色谱法测定食品中二氧化硫的应用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(4):338-341.
- [5] 陈秀杰, 谭倩, 余涛. 离子色谱法测定食品中二氧化硫与传统化学法的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(1):38-40, 43.
- [6] 陈飞东, 戴志远. 食品中亚硫酸盐测定方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8):1339-142.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2011.
- [8] 廖艳华, 刘展华, 陈琨, 等. 广西省八角二氧化硫残留量检测结果分析与卫生标准的探讨[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5):486-488.
- [9] 陈国荣. 水蒸气蒸馏离子色谱法测定食品中亚硫酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(4):483-485.
- [10] 曹若明, 于明, 刘岚峰. 离子色谱法测定食品中亚硫酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(16):2331-2333.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.34—2003 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
- [12] 柯洋丽, 李才津, 蒋家保, 等. 工作场所空气中二氧化硫的测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2):276-277.