



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5120—2019

进出口食用动物、饲料中亚硝酸盐测定 比色法和离子色谱法

Determination of nitrite in edible animal and feeds for import and export—
Colorimetric analysis and ion chromatography

行业标准信息服务平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳海关、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：杨俊兴、王丙涛、孙洁、刘建利、张彩虹、涂小珂、林彦星、吕建强、花群义、秦智锋。

行业标准信息服务平台

进出口食用动物、饲料中亚硝酸盐测定

比色法和离子色谱法

1 范围

本标准规定了进出口食用动物、饲料中亚硝酸盐的测定方法。

本标准适用于进出口食用动物、饲料中亚硝酸盐的测定。

本标准的方法检出限:比色法为 0.5 mg/kg(或 mg/L);离子色谱法为 0.1 mg/kg(或 mg/L)。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料

3 比色法

3.1 原理

在弱碱性条件下去除样品中的蛋白质、脂肪等,亚硝酸盐和对氨基苯磺酸在弱酸性条件下反应,生成重氮化合物,再与盐酸萘乙二胺偶合生成紫红色化合物,颜色深度与亚硝酸盐含量成正比,比色法定量。

3.2 试剂

除另有说明外,所用试剂均为优级纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

3.2.1 无水对氨基苯磺酸($C_6H_7NO_3S$)

3.2.2 盐酸萘乙二胺($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$)

3.2.3 氯化铵缓冲液:取 500 mL 水,加 25 mL 盐酸和 60 mL 氨水至 1 000 mL 容量瓶中,混匀,定容至 1 000 mL,调节 pH 至 9.6—9.7。

3.2.4 氢氧化钠溶液(20 g/L):称取 20.0 g 氢氧化钠,用水溶解,定容至 1 000 mL。

3.2.5 乙酸锌溶液(220 g/L):称取 110.0 g 乙酸锌,加 15 mL 冰乙酸溶解,用水稀释至 500 mL。

3.2.6 对氨基苯磺酸溶液(4 g/L):称取 4.0 g 无水对氨基苯磺酸,加 300 mL 热水溶解,加 200 mL 冰乙酸,稀释至 1 000 mL,于棕色瓶避光保存。

3.2.7 盐酸萘乙二胺溶液(1 g/L):称取 1.0 g 盐酸萘乙二胺,加水溶解,稀释至 1 000 mL,棕色瓶避光保存。

3.2.8 亚硝酸盐标准储备液(1 000 mg/L):购买国家标准溶液;或者准确称取 0.150 g 于 110 °C ~ 120 °C 干燥恒重的亚硝酸钠,加水溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀,避光保存。

3.2.9 亚硝酸盐标准工作液(10.0 mg/L):使用前,准确吸取标准储备溶液(3.2.8)1.0 mL 于 100 mL

容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀备用。

3.3 仪器

3.3.1 分光光度计

3.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g

3.3.3 恒温水浴锅

3.3.4 涡旋混合器

3.4 分析步骤

3.4.1 试样制备

3.4.1.1 饲料:按照 GB/T 14699.1 采集代表性样品,按照 GB/T 20195 制备饲料试样供实验室检测使用。

3.4.1.2 血液:采集动物血液 10 mL,室温静置约 30 min,使血液自然凝固。必要时,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液转移至另一离心管中备用。

3.4.1.3 尿液:取动物新鲜尿液 50 mL,混匀,5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液备用。

3.4.2 提取净化

3.4.2.1 粗饲料:称取 3~5 g 试样(精确至 0.01 g),置于 100 mL 具塞比色管中,加 60 mL 水,涡旋混匀,置于 70 ℃ 水浴中加热 15 min,取出冷却,转移至 100 mL 容量瓶中,定容,静置 15 min,过滤,弃去初滤液 25 mL,收集备用。

3.4.2.2 配合饲料、鱼粉、酵母蛋白等:称取 3~5 g 匀质试样(精确至 0.01 g),置于 100 mL 具塞比色管中,加 60 mL 水混匀,加入 2.0 mL 氢氧化钠溶液(3.2.4),置于 70 ℃ 水浴中加热 15 min,取出冷却,转移至 100 mL 容量瓶中,加 8.0 mL 乙酸锌溶液(3.2.5)混匀以沉淀蛋白,定容,静置 15 min,除去上层脂肪,过滤,弃去初滤液 25 mL,收集备用。

3.4.2.3 血液、尿样:准确吸取 2.0 mL 匀质试样,置于 100 mL 具塞比色管中,加 60 mL 水和 2.0 mL NaOH 溶液(3.2.4)混匀,置于 70 ℃ 水浴中加热 15 min,取出冷却,转移至 100 mL 容量瓶中,加入 8.0 mL 乙酸锌溶液(3.2.5)混匀以沉淀蛋白,定容,静置 15 min,过滤,弃去初滤液 25 mL,收集备用。

3.4.3 亚硝酸盐的测定

吸取 0.0,0.25,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 亚硝酸盐标准工作液(3.2.9)到 25 mL 容量瓶中(相当于配制 0、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg 亚硝酸盐标准系列),分别加入 4.0 mL 氯化铵缓冲液(3.2.3)和 1.0 mL 盐酸,立即加入 2.0 mL 对氨基苯磺酸溶液(3.2.6)和 2.0 mL 盐酸萘乙二胺溶液(3.2.7)进行显色,加水至刻度,混匀,静置 10 min,用 2 cm 比色杯,以零管调节零点,于 538 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,标准溶液中所含亚硝酸盐质量为横坐标,绘制标准曲线。同样方法,取 10 mL 提取净化后的试液(3.4.2)于 25 mL 容量瓶中,分别加入 4.0 mL 氯化铵缓冲液(3.2.8)和 1.0 mL 盐酸,立即加入 2.0 mL 对氨基苯磺酸溶液(3.2.6)和 2.0 mL 盐酸萘乙二胺溶液(3.2.7)进行显色,用水定容至刻度,混匀,静置 10 min,上机测定。

3.5 结果计算

试样中亚硝酸盐的含量按式(1)进行计算。

$$X = \frac{m_2 \times V_1}{m_1 \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

X ——试样中亚硝酸盐的含量,mg/kg 或 mg/L;

m_2 ——测定用样液中亚硝酸盐的质量, μg ;

V_1 ——试样处理液总体积,mL;

m_1 ——试样质量或体积,g 或 mL;

V_2 ——测定用样液体积,mL。

计算结果保留两位有效数字。

3.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

4 离子色谱法

4.1 原理

加水超声提取试样中的亚硝酸盐,过固相萃取柱净化,以氢氧化钾溶液为淋洗液,阴离子交换柱分离,电导检测器检测,以保留时间定性,外标法定量。

4.2 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为优级纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.2.1 氢氧化钾(KOH)。

4.2.2 乙腈(CH_3CN)。

4.2.3 亚硝酸根离子(NO_2^-)标准储备溶液(100 mg/L):国家标准溶液,浓度 100 mg/L。

4.2.4 亚硝酸盐标准工作液:吸取标准溶液(4.2.3)配制成含亚硝酸根离子 0.0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L 的标准溶液系列。

4.3 仪器和设备

4.3.1 离子色谱仪:包括电导检测器,配有抑制器,或者带 KOH 淋洗液在线自动发生器。

4.3.2 天平:感量为 0.1 mg 和 1 mg。

4.3.3 固相萃取装置。

4.3.4 超声波清洗器。

4.3.5 离心机:转速 10 000 r/min,配 10 mL 或 50 mL 离心管。

4.3.6 净化柱:包括 HLB 柱、C 18 柱、Ag 柱或等效柱。

4.3.7 滤膜:0.22 μm 水性滤膜。

4.4 分析步骤

4.4.1 提取

4.4.1.1 固体试样:称取匀质试样 3~5 g(精确至 0.01 g),以 60 mL 水洗入 100 mL 具塞比色管中,涡旋混匀使固相完全分散,超声提取 30 min。于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min,取出冷却至室温,转移到 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,取部分溶液于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

4.4.1.2 血清、尿样:准确吸取 1.0 mL 匀质试样,置于 50 mL 离心管中,加 2 mL 乙腈,再加入 30 mL 水混匀,超声提取 30 min,转移至 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,取部分溶液于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

4.4.2 净化

将 4.4.1 中的上清液依次通过固相萃取柱 C18 柱(或 HLB 柱)、Ag 柱净化,弃去前面 5 mL,收集后面洗脱液,过 0.22 μm 水性滤膜后上机。固相萃取柱使用前需进行活化,C18 柱(或 HLB 柱)使用前依次用 10 mL 甲醇、10 mL 水通过,静置活化 20 min;Ag 柱使用前用 10 mL 水静置活化 20 min。

4.4.3 参考色谱条件

4.4.3.1 色谱柱:大容量阴离子交换柱,如 Dionex IonPac AS19 250 mm ×4 mm(带 IonPac AG19 保护柱 50 mm×4 mm),或性能相当的离子色谱柱。

4.4.3.2 淋洗液:氢氧化钾溶液,浓度为 6 mmol/L~70 mmol/L(或者使用在线 KOH 淋洗发生器);洗脱梯度为 6 mmol/L 35 min,70 mmol/L 5 min,6 mmol/L 5 min;流速 1.0 mL/min。

4.4.3.3 抑制器:连续自动再生膜阴离子抑制器或等效抑制装置。

4.4.3.4 检测器:电导检测器,检测池温度为 35 ℃。

4.4.3.5 进样体积:250 μL(可根据试样中被测离子含量进行调整)。

4.4.4 测定

吸取亚硝酸盐标准系列溶液依次注入离子色谱仪进行检测,保留时间定性,亚硝酸盐浓度为横坐标,以峰高(μS)或峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。分别吸取空白和试样溶液 50 μL,在相同工作条件下,依次注入离子色谱仪中,记录色谱图(参见附录 A)。

4.5 结果计算

按式(2)计算试样中亚硝酸盐的含量:

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m} \dots\dots\dots(2)$$

X ——试样中亚硝酸盐的含量,mg/kg 或 mg/L;

C ——试样中亚硝酸盐的浓度,mg/L;

C₀ ——试剂空白液中亚硝酸盐的浓度,mg/L;

V ——定容体积,mL;

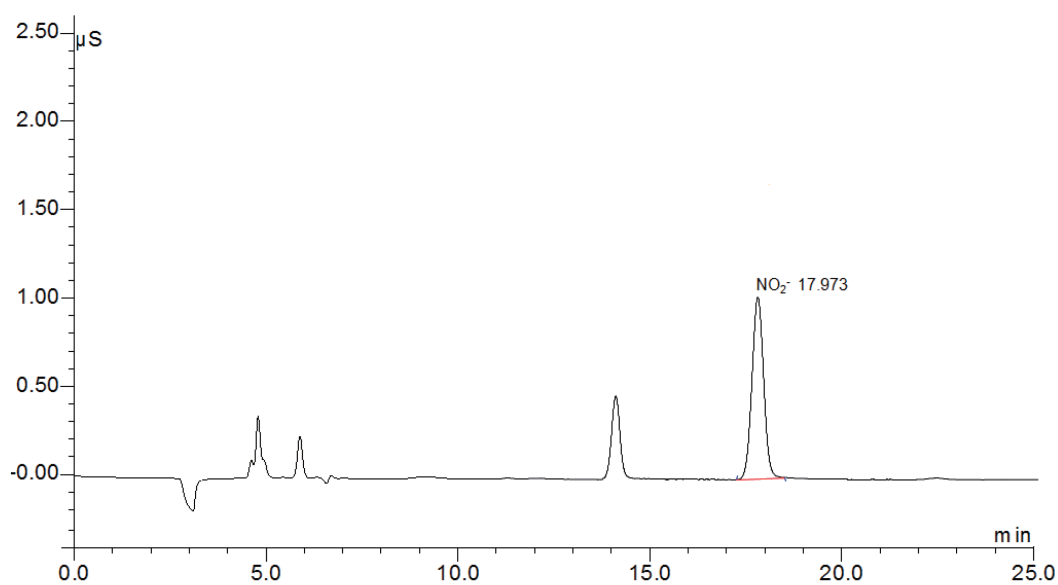
m ——取样质量或体积,g 或 mL。

计算结果保留两位有效数字。

4.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性附录)
亚硝酸盐标准色谱图



行业标准信息服务平台