附件4

食品中亚硝酸盐的快速检测

盐酸萘乙二胺法（KJ201704）

1. 范围

本方法规定了食品中亚硝酸盐的快速检测方法。

本方法适用于肉及肉制品（餐饮食品）中亚硝酸盐的快速测定。

1. 原理

样品中的亚硝酸盐经提取后，在弱酸性条件下与对氨基苯磺酸重氮化后，再与盐酸萘乙二胺反应生成紫红色偶氮化合物，其颜色的深浅在一定范围内与亚硝酸盐含量成正相关，通过色阶卡进行目视比色，对样品中亚硝酸盐进行定性判定。

1. 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T6682规定的二级水。

* 1. 试剂
     1. 对氨基苯磺酸。
     2. 盐酸萘乙二胺。
     3. 盐酸。
     4. 盐酸（20%）：量取20mL盐酸，用水稀释至100mL。
     5. 对氨基苯磺酸溶液（4g/L）：称取0.4g对氨基苯磺酸，溶于100mL20%盐酸中，混匀，置棕色瓶中，临用新制。
     6. 盐酸萘乙二胺溶液（2g/L）：称取0.2g盐酸萘乙二胺，溶解于100mL水中，混匀，置棕色瓶中，临用新制。
  2. 参考物质

亚硝酸钠参考物质中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量见表1，纯度≥99%。

表1 亚硝酸钠中文名称、英文名称、CAS登记号、分子式、相对分子质量

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子质量 |
| 亚硝酸钠 | Sodiumnitrite | 7632-00-0 | NaNO2 | 69.00 |

* 1. 标准溶液配制

亚硝酸钠标准工作液（200µg/mL，以亚硝酸钠计）：精密称取适量经110℃—120℃干燥恒重的亚硝酸钠参考物质（3.2），加水溶解，移入250mL容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀。

* 1. 材料

亚硝酸盐快速检测试剂盒：适用基质为肉及肉制品，需在阴凉、干燥、避光条件下保存。

1. 仪器和设备
   1. 移液器：200µL，1mL。
   2. 涡旋混合器或超声仪。
   3. 电子天平或手持式天平：感量为0.01g和0.0001g。
   4. 离心机。
   5. 微孔滤膜：0.45μm（水系）。
2. 分析步骤
   1. 试样制备

取适量有代表性样品的可食部分，充分粉碎混匀。

* 1. 试样的提取

准确称取试样1g（精确至0.01g），置于离心管中，准确加水10mL，超声或涡旋振荡提取5min，静置10min。准确吸取1mL上清液（如样品浑浊，≥3000r/min离心5min取上清液，或经微孔滤膜过滤后取续滤液）于检测管中，向检测管中滴加对氨基苯磺酸溶液200μL，混匀静置1min，再加入盐酸萘乙二胺溶液100μL，混匀静置5min，即得待测液。

* 1. 测定步骤

将待测液与标准色阶卡目视比色，10min内判读结果。进行平行试验，两次测定结果应一致，即显色结果无肉眼可辨识差异。

* 1. 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和质控样品试验（或加标质控试验）。用色阶卡和质控试验同时对检测结果进行控制。

* + 1. 空白试验

称取空白样品，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

* + 1. 质控样品试验（或加标质控试验）

亚硝酸盐质控样品：采用典型样品基质或相似样品基质按照实际生产工艺生产的，含有一定量亚硝酸盐，并可稳定保存的样品。经参比方法确认的质控样品中亚硝酸盐含量（以亚硝酸钠计）应包括但不限于10mg/kg。

加标质控样品：准确称取空白试样1g（精确至0.01g），置于离心管中，加入适量亚硝酸钠标准工作液（200µg/mL）（3.3）使样品中亚硝酸钠含量为10mg/kg。

质控样品（或加标质控样品）按5.2和5.3步骤与样品同法操作。

1. 结果判定要求

观察检测管中样液颜色，与标准色阶卡比较判读样品中亚硝酸盐（以亚硝酸钠计）的含量。颜色浅于检出限（1mg/kg）则为阴性样品；颜色深于10mg/kg则为阳性样品。色阶卡见图1。

注：1.颜色接近或深于1mg/kg，但浅于或接近10mg/kg时，则考虑本底污染或带入所

2.10mg/kg仅作为本方法的本底控制限。

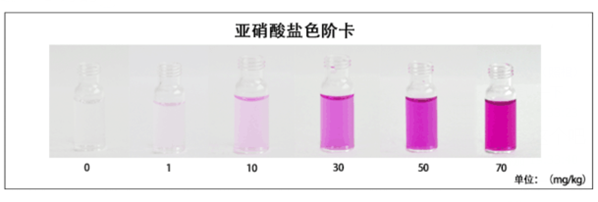


图1 亚硝酸盐色阶卡

质控试验要求：空白试验测定结果应为阴性，质控样品试验测定结果应在其标示量值允差范围内，加标质控试验测定结果应与加标量相符。

1. 结论

由于色阶卡目视判读存在一定误差，为尽量避免出现假阴性结果，读数时遵循就高不就低的原则。当测定结果大于10mg/kg时，应对结果进行确证。

1. 性能指标
   1. 检测限：1mg/kg。
   2. 灵敏度：灵敏度应≥99%
   3. 特异性：特异性应≥85%。
   4. 假阴性率：假阴性率应≤1%。
   5. 假阳性率：假阳性率应≤15%。

注：性能指标计算方法见附录A。

1. 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不作限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为GB 5009.33-2016《食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定—第二法分光光度法》。

待测样品中若存在高含量的亚硫酸氢钠、抗坏血酸或酱油时，会对本法的显色结果产生一定影响，检测时应予以注意。

色阶卡应确保在试剂盒保质期内不出现褪色或变色的情况。

附录A

快速检测方法性能指标计算表

**表A.1 性能指标计算表**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品情况a | 检测结果b | | 总数 |
| 阳性 | 阴性 |
| 阳性c | N11 | N12 | N1.=N11+N12 |
| 阴性 | N21 | N22 | N2.=N21+N22 |
| 总数 | N.1=N11+N12 | N.2=N21+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异(х2) | χ2=(|N12-N21|-1)2/(N12+N21),  自由度（df）=1 | | |
| 灵敏度(p+，%) | p+=N11/N1. | | |
| 特异性(p-，%) | p-=N22/N2. | | |
| 假阴性率(pf-，%) | pf-=N12/N1.=100-灵敏度 | | |
| 假阳性率(pf+，%) | pf+=N21/N2.=100-特异性 | | |
| 相对准确度，%d | (N11+N22)/(N1.+N2.) | | |
| 注：  a由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果；  b由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。用于确认方法时，结果≥1mg/kg时，判定为阳性（仅用于计算性能指标）；  c本方法规定：用于计算灵敏度和假阴性率的阳性样品，由参比方法检验得到的结果范围应在1—10mg/kg之间。  N：任何特定单元的结果数，第一个下标指行，第二个下标指列。例如：N11表示第一行，第一列，N1.表示所有的第一行，N.2表示所有的第二列；N12表示第一行，第二列。  d为方法的检测结果相对准确性的结果，与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。 | | | |

本方法负责起草单位：陕西省食品药品监督检验研究院

验证单位：四川省食品药品检验检测院、山西省食品药品检验所

主要起草人：刘海静、李涛、林芳、王一欣、袁磊