

利用離子層析法檢測蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽含量

陳瑋芸 蔡沁玓 郭景豪 黃立宇 蔡佳芬 曾素香 闕麗卿 施養志

食品藥物管理局研究檢驗組

摘 要

本研究以高效離子層析法(ion chromatography, IC)建立蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽含量之檢驗方法，並比較不同前處理對於蔬菜中硝酸鹽去除之效果。以去離子水萃取不同前處理之蔬菜檢體，經75°C加熱5分鐘，定容、離心後，取上清液，以濾膜過濾，濾液作為檢液，利用離子層析儀進行檢測。於蔬菜檢體中分別添加硝酸根200 ppm及亞硝酸根20 ppm進行回收試驗，回收率分別為91.60及94.81%，變異係數為1.43及3.50%，顯示本方法適用於蔬菜中硝酸根及亞硝酸根之分析。以所建立之方法分析市售生鮮蔬菜檢體6件，結果顯示，蔬菜未處理之硝酸根含量為114-6936 ppm；經水洗後之硝酸根含量為92-5859 ppm，硝酸根之去除率為0.5-29.3%；水洗後汆燙之硝酸根含量為67-5129 ppm，硝酸根之去除率為26.1-55.0%。6件檢體均未檢出亞硝酸根。以上試驗顯示水洗後汆燙可有效降低蔬菜中硝酸鹽含量。

關鍵詞：離子層析法、蔬菜、硝酸鹽、亞硝酸鹽

前 言

蔬菜含有大量的維生素、礦物質及膳食纖維，具有調節生理功能，在人類飲食中，扮演非常重要的角色⁽¹⁾。

硝酸鹽是氮循環中自然產生的物質，普遍存在蔬菜水果中，其濃度因植物品種、栽種環境、栽種方式、日照長度及季節因子而異^(2,3)。

研究發現，許多葉菜類植物(萵苣、菠菜、甜菜、芹菜)含有高含量的硝酸鹽^(4,5)，其硝酸鹽濃度視植物品種而有不同，一般介於1-10000 ppm不等⁽⁶⁾。人們自蔬果、飲水及肉品中攝取的硝酸鹽約佔總量的85%，亞硝酸鹽約佔43%⁽⁵⁾，其中約有5%的硝酸鹽可被唾液或腸道中的微生物還原成亞硝酸鹽，繼而形成致癌物—亞硝胺^(7,8)。另外，由於嬰幼兒體內的低濃度胃酸可能使過量的硝酸鹽轉變成亞硝酸鹽，因此嬰幼兒若攝取大量含有硝酸鹽的食品，將可能導致藍嬰症⁽⁹⁻¹²⁾。

硝酸鹽與亞硝酸鹽相當的不穩定，不同樣品與萃取過程皆可能影響其回收率。而影響因子包括：(1)溫度：高溫使得硝酸鹽與亞硝酸鹽離子不穩定；(2)水煮環境：影響樣品中水分的pH值以及暴露於大氣中的氧氣；(3)樣品中水分的pH值：酸性可使亞硝酸鹽轉變成硝酸或一氧化氮；(4)樣品來源：樣品中可能含有干擾物質，如鐵和鎂會使得硝酸鹽與亞硝酸鹽離子不穩定⁽¹³⁾。

目前針對硝酸鹽、亞硝酸鹽所開發的檢測方法已廣泛應用於食品、水、生化材料、土壤、植物及動物飼料等，包括分光光度法(spectrophotometry)、高效能液相層析法(high performance liquid chromatography, HPLC)、氣相層析法(gas chromatography, GC)、離子層析法(ion chromatography, IC)、毛細管電泳法(capillary electrophoresis, CE)⁽¹⁴⁾、極譜法(polarography)⁽⁶⁾及流動注入分析(flow injection analysis, FIA)⁽¹⁵⁾等方法。在這些方法中，以AOAC所採納之分光光度

法較常被使用，但該法使用較多的有毒溶劑⁽¹⁶⁾，且必須先分析亞硝酸鹽含量後，另將所含硝酸鹽還原成亞硝酸鹽，兩相扣除之計量方式較為耗時⁽⁶⁾，不符例行性分析之簡單快速需求⁽¹⁵⁾。而IC方法快速並可同時獲得硝酸根及亞硝酸根含量，依McMullen等學者於2005年之研究結果顯示，IC方法可獲得與AOAC法相當之檢驗結果⁽¹⁷⁾。

99年10月間，財團法人主婦聯盟環境保護基金會發表於蔬菜中檢出過量硝酸鹽之報告，致使民眾擔心會因食用過量硝酸鹽之蔬菜，而影響身體健康。為消除國人對食用生鮮蔬菜之疑慮，本研究特以IC方法檢測市售蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽含量，並比較前處理步驟對蔬菜中硝酸鹽去除率。

材料與方法

一、檢體來源

本研究於99年10月至100年7月間，於台北市抽購市售小葉菜類、瓜菜類及包葉菜類菜，共計6件蔬菜檢體(表一)。

二、試藥

50%氫氧化鈉溶液及亞硝酸鈉均採用試藥級，購自德國Merck公司；硝酸鈉採用試藥級，購自日本和光公司。

三、儀器設備與裝置

(一)離子層析儀：DIONEX ICS-3000 Ion Chromatograph，包含自動取樣器AS，美商

戴安股份有限公司，台灣分公司

(二)離心機：Beckman Coulter Allegra 25R Centrifuge，美商貝克曼庫爾特有限公司，台灣分公司

(三)超音波震盪器：Transsonic Digital Elma，台灣尚偉股份有限公司

(四)振盪式水浴鍋：YIHDER, BT-350，台灣裕德科技有限公司

(五)均質攪拌機：Osterizer blender，美國Oster公司，台灣金世國際股份有限公司

(六)去離子水製造機：Millipore milli-Q，所製造去離子水之比電阻於25°C可達18 MΩ·cm，美國Millipore公司(Beford, MA)

(七)淨化匣：OnGuard II Ag cartridge，1 mL，美商戴安股份有限公司，台灣分公司

(八)針筒式濾頭(Syringe filter)：孔徑0.22 μm，Nylon材質

四、檢驗方法

(一)流洗液之調製

1. 流洗液A：

取去離子水1 L除氣後，加入50%氫氧化鈉溶液2.5 mL，混合後供作流洗液A。

2. 流洗液B：

取去離子水1 L除氣後，加入50%氫氧化鈉溶液5 mL，混合後供作流洗液B。

3. 流洗液C：

取去離子水1 L，除氣後供作流洗液C。

(二)標準溶液之調製

1. 硝酸根標準原液：

精確稱取硝酸鈉137 mg，以去離子水溶解並定容至100 mL，供作標準原液(相當於含硝酸根1000 μg/mL)，貯存於4°C備用。

2. 亞硝酸根標準原液：

精確稱取亞硝酸鈉150 mg，以去離子水溶解並定容至100 mL，供作標準原液(相當於含亞硝酸根1000 μg/mL)，貯存於4°C備用。

3. 標準溶液：

分別精確量取適量上述硝酸根及亞硝酸根

表一、檢體類別、名稱及件數

檢體類別	名稱	件數
小葉菜類	小白菜(Bok choy)	1
	青江菜(Bok choy)	1
瓜菜類	小黃瓜(Cucumber)	1
	花椰菜(Broccoli)	1
包葉菜類	紫色高麗菜(Red cabbage)	1
	高山娃娃菜(Baby cabbage)	1
合計		6

標準原液混合，以去離子水稀釋成濃度含硝酸根及亞硝酸根為0.5-100 µg/mL，供作標準溶液，臨用時調製。

(三)檢液之調製

1. 檢體前處理：

(1)未處理：以衛生紙將蔬菜檢體表面水份或灰塵擦拭。

(2)清洗：蔬菜檢體以流水清洗30秒後，擦乾備用。

(3)清洗後汆燙：蔬菜檢體以流水清洗30秒後擦乾，置於沸水中汆燙1.5分鐘後取出，待涼備用。

上述檢體不加水，以果汁機均質，製成蔬菜汁。

2. 萃取：

稱取已均質之蔬菜檢體5 g，精確稱定，加入去離子水50 mL，以超音波萃取30分鐘(每隔5分鐘取出搖勻，以確定檢體均勻分散)，於75℃水浴中加熱5分鐘後，冷卻至室溫。再以去離子水洗入容量瓶，並定容至100 mL，混勻。取10 mL，以3500 rpm離心15分鐘，取上清液經0.22 µm濾膜過濾後，供淨化用。

3. 淨化：

取供淨化用溶液，注入預先以去離子水10 mL潤洗之淨化匣，棄前段濾液5 mL，收集後段濾液，供作為檢液。

(四)鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各25 µL，分別注入高效離子層析儀中，參照下列條件進行離子層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中硝酸根或亞硝酸根之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中硝酸根或亞硝酸根之含量(g/kg)} = \frac{C \times V}{M \times 100}$$

C：由標準曲線求得檢液中硝酸根或亞硝酸根之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

表二、液相層析之移動相溶液組成及時間梯度

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相溶液		
		A (%)	B (%)	C (%)
0.0	1	10	0	90
8.0	1	10	0	90
8.1	1	0	100	0
10.0	1	0	100	0
10.1	1	10	0	90
15.0	1	10	0	90

M：取樣分析檢體之重量(g)

(五)離子層析條件

1. 管柱：

(1)層析管：IonPac® AS11-HC，內徑4 mm × 25 cm。

(2)保護管：IonPac® AG11 guard，內徑4 mm × 5 cm。

2. 陰離子自我再生型抑制器：ASRS 300。

3. 檢出器：電導度檢出器(Electroconductivity detector, ECD)。

4. 移動相溶液：由流洗液A、B、C組成，流速為1 mL/min，移動相溶液之組成分及時間梯度如表二。

五、回收試驗

稱取已均質之蔬菜檢體5 g，加入硝酸根及亞硝酸根標準原液，使其所含硝酸根及亞硝酸根濃度分別為200及20 ppm，靜置20分鐘後，依檢液製備流程製得檢液，再以離子層析儀進行檢測，求出回收率。每一添加量進行三重複試驗。

結果與討論

一、標準品的線性關係

以IC偵測硝酸根及亞硝酸根之混合標準溶液，所得高效離子層析圖譜如圖一(a)。硝酸根及亞硝酸根標準曲線之線性迴歸決定係數(R²)皆為0.9999 (表三)，顯示濃度在0.5-100 µg/mL之量測範圍內，其線性關係良好。

表三、硝酸根及亞硝酸根標準曲線之線性關係

標準品	線性方程式	決定係數(R ²)
硝酸根	$Y = 0.1211X - 0.1163$	0.9999
亞硝酸根	$Y = 0.1245X + 0.0023$	0.9999

二、添加回收試驗

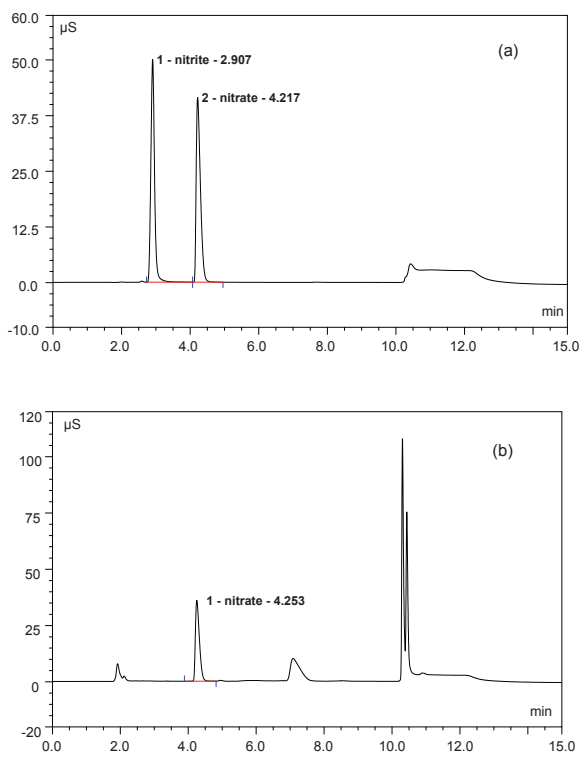
於蔬菜檢體中添加硝酸根及亞硝酸根標準溶液使其所含濃度分別為200及20 ppm，再依本研究建立之方法進行回收試驗，其回收率分別為硝酸鹽91.6%及亞硝酸鹽94.81%，變異係數分別為1.43及3.50%，顯示本方法對硝酸根及亞硝酸根之回收狀況良好，可據以進行蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽之檢驗。

三、市售蔬菜中硝酸鹽之檢驗結果

本研究共抽驗小葉菜類、瓜菜類及包葉菜類等蔬菜檢體，包括小白菜、青江菜、小黃瓜、花椰菜、紫色高麗菜及高山娃娃菜共6件。檢測結果，其硝酸根含量為114-6936 ppm；6件均未檢出亞硝酸根。以IC檢測高山娃娃菜所得離子層析圖譜如圖一(b)。

四、前處理步驟對硝酸根含量之去除率

為了解不同前處理步驟對硝酸根之去除率，將檢體進行水洗及水洗後汆燙之不同前處理，比較未經處理與經水洗或水洗後汆燙等不同處理步驟後之硝酸根含量變化。結果如表四，6件蔬菜



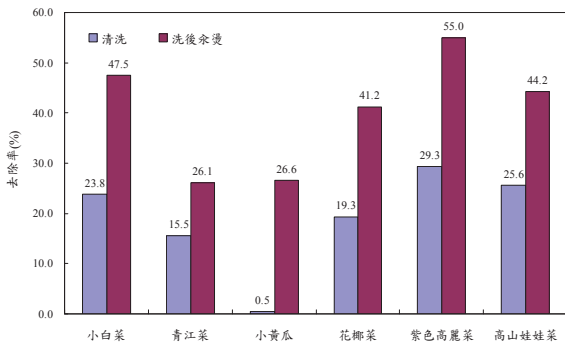
圖一、離子層析圖譜(a)硝酸根(50 µg/mL)及亞硝酸根(50 µg/mL)混合標準溶液；(b)高山娃娃菜檢體

檢體於未經前處理測得之硝酸根含量最低者為花椰菜(114 ppm)，硝酸根含量最高者為青江菜(6936 ppm)，推究可能為因係植物品種，及抽驗季節不同導致蔬菜中硝酸鹽含量有所差異。比較前處理對硝酸根含量去除率，結果如圖二，蔬菜以水洗步驟處理後，以紫色高麗菜的去除率最高(29%)，

表四、前處理步驟對蔬菜中硝酸根含量之影響

檢體類別	未處理(ppm)	清洗		洗後汆燙	
		含量(ppm)	去除率(%)	含量(ppm)	去除率(%)
小白菜(Buk choy)	2642	2014	23.8	1388	47.5
青江菜(Bok coy)	6936	5859	15.5	5129	26.1
小黃瓜(Cucumber)	207	206	0.5	152	26.6
花椰菜(Broccoli)	114	92	19.3	67	41.2
紫色高麗菜(Red cabbage)	845	597	29.3	380	55.0
高山娃娃菜(Baby cabbage)	848	631	25.6	473	44.2

*六種蔬菜檢體均未檢出亞硝酸根



圖二、前處理步驟對不同蔬菜中硝酸根去除之比較

小黃瓜影響不大(0.40%)，可能原因為小黃瓜較厚實，內部不易清洗。經水洗並汆燙處理後之蔬菜，也是以紫色高麗菜的去除率最高(55%)。汆燙處理使得蔬菜組織發生變化，滲透率變高，因此硝酸根易從蔬菜組織中流失，故大多數蔬菜於汆燙處理後硝酸根濃度皆降低。

五、國外相關文獻調查結果

Ximenes等學者之研究結果顯示，許多葉菜類植物(萵苣、菠菜、甜菜、芹菜)之硝酸鹽含量為1-10000 ppm⁽⁶⁾，與本研究葉菜類植物研究結果相符。另外參考Hsu等學者使用HPLC-UV分析5種蔬菜(包括菠菜、小白菜、油菜、大白菜、芥菜及球莖萵苣)經清洗後汆燙所得到的硝酸根與亞硝酸根含量，結果硝酸根含量介於48-4849.6 ppm，其中小白菜所含硝酸根含量為1841.1 ppm，較本研究之結果高，其原因可能為植物品種、環境溫度、水煮時之條件及樣品來源不同所導致的差異；亞硝酸根的部分，除了芥菜測得亞硝酸根含量為19.6 ppm之外，其餘未檢出亞硝酸根，作者認為芥菜檢出亞硝酸根的原因可能是儲放於室溫時空氣中的細菌將硝酸根還原成亞硝酸根⁽¹⁸⁾。此外，Prasad等學者使用FIA分析4種不同的新鮮蔬菜(包括甘藍菜、萵苣、芹菜及大白菜)分別進行清洗及洗後汆燙，其硝酸根的含量變化，結果清洗後之蔬菜的硝酸根含量為1297.14-5658.08 ppm，而洗後汆燙之硝酸根去除率為46.69-59.14%，略高於本研究之去除率⁽⁶⁾。

依國外相關文獻及本調查結果顯示⁽²⁻⁶⁾，蔬菜中所含硝酸鹽含量與植物品種、環境、溫度、施肥次數、日照長短等因子相關。另依據水洗、水洗後汆燙等不同之前處理比較硝酸根去除率之結果推論，越嚴苛的前處理過程越能去除硝酸鹽，因此建議在食用前應多清洗蔬菜並以汆燙方式烹煮。

結 論

本研究建立以離子層析法檢測蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽含量之檢驗方法，以簡單之萃取步驟快速完成蔬菜檢體之檢驗。

由本研究之結果顯示，國內市售蔬菜中硝酸鹽含量與國際間並無差異，且亦無亞硝酸鹽之檢出，再加上蔬菜中含有許多活性成分，能有效阻斷亞硝酸鹽轉換成致癌物質⁽¹⁹⁾，因此目前美國、加拿大等國家均未制定蔬菜中硝酸鹽之限量標準。惟為確保食用安全，建議消費者使用前以清水多次漂洗蔬菜並採用汆燙烹煮方式，以避免攝入過量硝酸鹽。

本研究之檢驗結果，可作為蔬菜中硝酸鹽含量監控之參考依據，並提供作為行政管理與衛生標準修訂之參考。

參考文獻

1. Kmiecik, W., Lisiewska, Z. and Slupski, J. 2004. Effects of freezing and storage of frozen products on the content of nitrate, nitrites, and oxalates in dill (*Anethum graveolens* L.). Food Chem. 86: 105-111.
2. Elia, A., Santamaria, P. and Serio, F. 1998. Nitrogen nutrition, yield and quality of spinach. J. Sci. Food Agric. 76: 341-346.
3. Lips, S., Leidi, E., Siberbush, M., Soares, M. and Lewis, O. 1990. Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. J. Plant Nutr. 13: 1271-1289.
4. MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1998. 1997/98 UK Monitoring Programme for Nitrate in Lettuce and Spinach Food

- Surveillance Information Sheet No. 154, London.
5. Wolff, I. A. and Wasserman, A. E. 1972. Nitrates, nitrites and nitrosamines. *Science* 177: 15-18.
 6. Ximenes, M. I. N., Rath, S. and Reyes, F. G. R. 2000. Polarographic determination of nitrate in vegetables. *Talanta* 51: 49-56.
 7. Cassens, R. 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.* 50: 72-80.
 8. Tannenbaum, S. R. and Correa, P. 1985. Nitrate and gastric cancer risks. *Nature* 317: 675-676.
 9. Huarte-Mendicoa, J. C., Astiasaran, I. and Bello, J. 1997. Nitrate and nitrite levels in frozen broccoli: effect of freezing and cooking. *Food Chem.* 58: 39-42.
 10. Ezeagu, I. E. 1996. Nitrate and nitrite contents in ogi and the changes occurring during storage. *Food Chem.* 56: 77-79.
 11. Gundimeda, U., Naidu, A. N. and Krishnaswamy, K. 1993. Dietary intake of nitrate in India. *J. Food Comp. Anal.* 6: 242-249.
 12. Swann, P. F. 1975. The toxicology of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. *J. Sci. Food Agric.* 26: 1760-1770.
 13. Usher, C. D. and Telling, G. M. 1975. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. *J. Sci. Food Agric.* 2: 1793-1805.
 14. Merusi, C., Corradini, C., Cavazza, A., Borromei, C. and Salvadeo, P. 2010. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. *Food Chem.* 120: 615-620.
 15. Prasad, S. and Chetty, A. A. 2008. Nitrate-N determination in leafy vegetables: study of the effects of cooking and freezing. *Food Chem.* 106: 772-780.
 16. Andrade, R., Viana, C. O., Guadagnin, S. G., Reves, F. G. R. and Rath, S. 2003. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. *Food Chem.* 80: 597-602.
 17. McMullen, S. E., Casanova, J. A., Gross, L. K. and Schenck, F. J. 2005. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in vegetable and fruit baby foods. *J. AOAC Int.* 88: 1793-1796.
 18. Hsu, J., Arcot, J. and Lee, A. 2009. Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chem.* 115: 334-339.
 19. Eichholzer, M. and Gutzwiller, F. 1998. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr. Rev.* 56: 95-105.

Determination of the Nitrate and Nitrite Contents in Vegetables by Ion Chromatography

WEI-YUN CHEN, CHING-HSUAN TSAI, CHING-HAO KUO,
LI-YU HUANG, CHIA-FEN TSAI, SU-HSIANG TSENG, LI-CHING CHIUE AND
DANILE YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

This study was aimed to develop the analytical method for nitrate and nitrite contents in vegetables by ion chromatography (IC), and to compare the effects of various treatments on the reduction of nitrate in vegetables. The vegetables dealt with different treatments were extracted by deionized water, heated at 75°C for 5 min, and diluted to 100 mL with deionized water. After centrifugation, the supernatants were filtered and the filtrates were injected into IC for analysis. For recovery testing, samples were spiked with 200 µg/g of nitrate or 20 µg/g of nitrite respectively. The recoveries of nitrate and nitrite were 91.6 and 94.8%, and the coefficients of variation were 1.4 and 3.5%, respectively. The result indicated that the developed method was suitable for the determination of nitrate and nitrite in vegetables. Six samples purchased from the market were analyzed by this method. The results showed that the contents of nitrate in these samples were in the range of 114 to 6936 ppm for non-treatment, 92-5859 ppm for washing, and 67-5129 ppm for blanching after washing, and nitrite was not detected for all. The nitrate removal rates were in the range of 0.5-29% for washing, and 26-55% for blanching after washing, indicating that the treatment of blanching after washing was an effective approach for reducing the nitrate levels in vegetables.

Key words: ion chromatography, vegetable, nitrate, nitrite