

食品中亚硝酸盐含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10382W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

在食品中, 亚硝酸盐是肉制品及其他食品加工过程中常用的一种食品添加剂, 但是人体长期摄入亚硝酸盐过量的食品, 产生直接毒害和慢性毒害, 因此硝酸盐的检测具有特别重要的意义。

待检样经沉淀蛋白质、除去脂肪后, 在弱酸条件下, 亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后, 再与盐酸萘乙二胺偶合形成紫红色染料, 在 540nm 处有特征吸收峰。进而计算得出亚硝酸盐含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 A1	液体 13 mL×1 瓶	4°C保存	
提取液 A2	粉体 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 6mL 的蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
提取液 A3	粉体 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 先加 0.18mL 的 乙酸 , 再加 5.82mL 的蒸馏水, 溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	粉体 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 5mL 的 20%盐酸水溶液(1mL 盐酸 缓慢加入 4mL 蒸馏水中), 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4°C避光保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、**乙酸**、**盐酸**、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本处理

- ① 干酪奶酪样本: 称取约 0.3g 样本于研钵中, 加 1mL 蒸馏水研磨成匀浆后全部转移至 2mLEP 管中, 再加入 0.04mL 的 3%乙酸溶液(0.3mL 冰乙酸缓慢加入 9.7mL 水中), 最后用蒸馏水定容到 2mL。4°C静置 20min 后, 除去上层脂肪, 12000rpm 室温离心 10min, 取上清液检测。
- ② 液体奶制品: 0.5mL 样本, 加入 0.125mL 提取液 A1, 混匀后加入 0.6mL 蒸馏水, 沸水浴 15min, 冷却至室温, 加入 0.05mL 提取液 A2, 混匀后加入 0.05mL 提取液 A3, 混匀, 用蒸馏水定容到 2mL, 室温静置 30min, 除去上层脂肪, 12000rpm 离心取上清液检测。
- ③ 其他样本: 称取约 0.1g 样本(含水量高可取 0.5)于 2mLEP 管中, 加入 0.125mL 提取液 A1, 混

匀后加入 1.5mL 蒸馏水，组织研磨机破碎或者用研钵磨碎后再全部转移至 2mLEP 管中；沸水浴 15min，冷却至室温，加入 0.05mL 提取液 A2，混匀后加入 0.05mL 提取液 A3，混匀，用蒸馏水定容到 2mL，室温静置 30min，除去上层脂肪，12000rpm 室温离心 10min，取上清液检测。

【注】：若高蛋白样本，提取后上清液依然浑浊，可以减少样本取样量 W，或在提取过程中将提取液 A2 和 A3 分别增加到 0.1mL（不能超过 0.1mL），蒸馏水相应减少。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。
- ② 标准品使用液配制：称取 2mg 标准品至一新 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水溶解标准品即 1mg/mL 的亚硝酸钠标准品溶液，再用蒸馏水稀释 500 倍（1 份母液+499 份蒸馏水）即 2μg/mL 的亚硝酸钠标准品使用液。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	190		
蒸馏水		190	
标品使用液			190
试剂一	40	40	40
混匀，室温（25℃）准确反应 5min			
试剂二	20	20	20
混匀，室温（25℃）准确反应 15min，立即于 540nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$			

【注】：最低检出限：液体乳是 0.06mg/kg；干酪及其他样本是 1mg/kg。

五、结果计算：

1、液体样本计算公式：

$$\text{食品中亚硝酸盐含量(以亚硝酸钠计)}(\text{mg/L}) = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标}} \times V \div V_{\text{样}} \times D \\ = 8 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

2、固体样本计算公式：

$$\text{食品中亚硝酸盐含量(以亚硝酸钠计)}(\text{mg/kg}) = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{标}} \times V \div W \times D \\ = 4 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

V---提取液总体积，2mL；

V 样---液体样本取样检测体积，0.5mL；

W---实际取样质量，g。

C_标---标准品浓度，2μg/mL 亚硝酸钠；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；