

食品中亚硝酸盐含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A1	液体 13 mL×1 瓶	4℃保存	
提取液 A2	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用甩几下使粉剂落入底部，再加 6mL 的蒸馏水充分溶解备用。
提取液 A3	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用甩几下使粉剂落入底部，先加 0.18mL 的乙酸，再加 5.82mL 的蒸馏水，溶解备用。
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃避光保存	临用甩几下使粉剂落入底部，再加 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。
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃避光保存	临用甩几下使粉剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、蒸馏水、天平、常温离心机、乙酸、盐酸。

四、食品中亚硝酸盐含量测定：

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℃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、上机检测:

- 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 2 μ g/mL 的亚硝酸钠标准品使用液。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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 $^{\circ}$ C) 准确反应 5min			
试剂二	20	20	20
混匀, 室温 (25 $^{\circ}$ C) 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:

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

2、固体样本计算公式:

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

V---提取液总体积, 2mL;

$C_{\text{标}}$ ---标准品浓度, 2 μ g/mL 亚硝酸钠;

$V_{\text{样}}$ ---液体样本取样检测体积, 0.5mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---实际取样质量, g。