

食品中亚硝酸盐含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

在食品中，亚硝酸盐可与肉品中的肌红素结合而更安定，在食品加工业中作为保色剂，以维持肉制品的良好外观，并防止肉毒梭状芽孢杆菌的产生，提高食用肉制品的安全，但是人体长期摄入亚硝酸盐过量的食品，可诱发消化系统癌变。

测定原理：

在酸性条件下，亚硝酸盐与对氨基苯磺酸反应生成重氮化合物，再与 N-1-萘基乙二胺形成紫红色偶氮化合物，在 540nm 处有特征吸收峰。

自备实验用品及仪器：

天平、研钵或匀浆器、水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液一：液体 50 mL×1 瓶，室温保存。

提取液二：液体 50 mL×1 瓶，室温保存。

提取液三：液体 50 mL×1 瓶，室温保存。

粉剂四：粉剂 100 mg×1 支，室温保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

样品处理：

称取样品约 0.2g 鲜重或 0.05g 干重，破碎，加入 0.5 mL 提取液一，沸水浴 15min，冷却至室温，加入 0.5 mL 提取液二，震荡摇匀，加 0.5 mL 提取液三，用镊子加少量粉剂四（约 1 mg），静置 30min，25℃，8000g 离心 15 min，取上清液待测。

测定步骤和操作表：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、操作表

	测定管	空白管
蒸馏水 (μL)		70
样品 (μL)	70	
试剂一 (μL)	65	65
试剂二 (μL)	65	65
混匀，25℃静置 15min，于微量石英比色皿/96 孔板中检测 540nm 处吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

注意：空白管只需测定一次。

亚硝酸盐含量计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y = 0.234x + 0.0002$ ， $R^2 = 0.999$ x 为标准品亚硝酸钠浓度 (μg/ml) y 为吸光值 A。

$$\begin{aligned} \text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.234 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 0.6668 \\ &= (A - 0.086) \div 0.234 \times 1.5 \times 0.6668 \div W \end{aligned}$$

$$=4.27 \times (\Delta A - 0.0002) \div W$$

V 样总：加入提取液体积，1.5 mL； V 样：反应中样品体积，0.07mL； W：样品质量，g。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线回归方程为： $y=0.141x+0.095$ ， $R^2=0.9991$ x 为标准品亚硝酸钠浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ） y 为吸光值 A。

$$\begin{aligned}\text{NO}_2^- (\mu\text{g/g}) &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.141 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \times 0.6668 \\ &= (\Delta A - 0.0002) \div 0.141 \times 1.5 \times 0.6668 \div W \\ &= 7.09 \times (\Delta A - 0.0002) \div W\end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1.5 mL； V 样：反应中样品体积，0.07mL； W：样品质量，g。

注意事项：

1. 试剂盒 2-8℃ 保存。
2. 试剂对人体有一定的危害，请穿实验服，戴手套操作。
3. 若检测出得 OD 值在标准曲线范围外，请将样品进行适当的浓缩或稀释（ $A_{540} < 0.09$ 浓缩， $A_{540} > 1.5$ 适当稀释）。
4. 最低检出限为 $0.5 \mu\text{g/g}$ 。