天净沙系列

CAT#:7-C14265-45-3

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 亚硫酸根离子含量测定试剂盒

# Sulfite Ion Content Assay Kit

## 使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

本产品是亚硫酸根离子含量测定试剂盒。亚硫酸盐包含亚硫酸根离子（$SO_3^{2-}$）以及各种结合态的亚硫酸盐；亚硫酸盐作为一类常见的食品添加剂，具有漂白、防腐、抗氧化及抑制细菌生长等多种功能，在食品工业中应用广泛。然而，过量摄入二氧化硫（SO2）会对人体的呼吸和消化系统造成损害（对哮喘患者的危害尤为显著），并具有诱导突变甚至致癌的风险。其经典比色检测原理为：亚硫酸盐与甲醛反应生成羟甲基磺酸盐（hydroxymethylsulfonate，HMS）中间体，该中间体在强酸性条件下与盐酸副玫瑰苯胺（pararosaniline hydrochloride，PRA）发生特异性显色反应，生成最大吸收波长为 585 nm 的紫红色络合物。通过测定该波长下的吸光度，即可实现对亚硫酸盐（或 SO2）的定量分析。本产品特点如下：

1．本产品可测食品、血清（浆）、动（植）物组织、细胞的亚硫酸根离子含量。

2．本试剂盒足够 100 次的反应检测，每次 250 μL 的 96 孔板/EP 管检测。

3．线性范围 0.01-0.3 mmol/L，检出限 0.01 mmol/L。

4．本产品仅能用于科研。

## 规格及成分

本产品使用小扁盒包装

| 成分 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| 测定溶液 A | 7-C14265-45-3a | 4.0 mL | 5.0 mL 本色瓶 |
| 测定溶液 B | 7-C14265-45-3b | 2.0 mL | 5.0 mL 本色瓶 |
| 测定溶液 C | 7-C14265-45-3c | 18.0 mL | 20.0 mL 本色瓶 |
| 标准品 | 7-C14265-45-3d | 100 T | 1.5 mL 本色瓶 |
| 标准品溶液 | 7-C14265-45-3e | 30 mL | 30.0 mL 本色瓶 |
| 使用手册 | 7-C14265-45-3sc | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期 2 年。

## 自备物品

样本，蒸馏水等。

## 使用流程

**一、试剂准备**

1. 测定混合液：临用前根据样本量，按照测定溶液 B: 测定溶液 C = 15 μL：135 μL (150 L，1 T)混匀，现用现配，当天用完。
2. 测定反应液:临用前根据样本量，按照测定溶液 A：测定混合液 = 50 μL：150 μL (200 L，1 T)混匀，现用现配，当天用完。
3. 对照溶液:临用前根据样本量，按照蒸馏水：测定混合液 = 50 μL：150 μL (200 μL，1 T)混匀，现用现配，当天用完。

4. 标准品:试剂放于试剂瓶内玻璃管中。临用前取 1 支标准品加入 11.9 mL 标准品溶解液中，为 10 mmol/L 亚硫酸钠标准品，2-8℃保存 1 天。

**二、样本处理（可适当调整待测样本量），实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验**

5. 组织: 按照质量(g): 蒸馏水体积(mL)为 1: 5 ~ 10 的比例(建议称取约 0.1 g，加入 1 mL 蒸馏水)加入蒸馏水，冰浴匀浆后，10000 ×g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
6. 细胞/细菌: 按照细胞/细菌数量(1×E6 个): 蒸馏水体积(mL)为 5~10: 1 的比例(建议 5 百万细胞/细菌加入 1 mL 蒸馏水)，冰浴超声波破碎细胞/细菌(功率 200 W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min);10000 ×g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
7. 血浆/血清等液体样本: 直接测定。如有浑浊，可 10000 ×g，4℃离心 10 min，取上清使用。
8. 注意:
   a) 对于颜色深的样本，例如红酒，不建议使用脱色剂包括活性炭和 PVPP 等进行脱色，两种物质均会导致亚硫酸盐含量的明显损失，需谨慎使用，建议采用蒸馏水稀释，从而降低样本自身颜色对测定的干扰。
   b) 不建议使用 Carrez 试剂对样本进行脱蛋白处理，尽管 Carrez 的两个主要成分并不会直接影响亚硫酸盐，但脱蛋白过程中，会使样本中的亚硫酸盐暴露于复杂的体系中，从而间接造成损失。
   c) 在本实验室条件下，对动物组织和血清/血浆，用 Carrez 试剂进行蛋白澄清处理后，会造成亚硫酸盐的完全损失。所以如需使用 Carrez 试剂进行脱蛋白处理，请务必在正式实验前进行加标测试，判断损失率是否在可接受范围。
   d) 对于高脂样本，提取后进行低温(4℃)离心，通常可获得清晰分层，轻微乳白色现象不影响后续测定，无需额外处理。

**三、测定步骤**

9. 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 585 nm。
10. 标准品准备:将 10 mmol/L 标准品用蒸馏水稀释至 0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.01 mmol/L。
11. 标准品稀释表，先稀释到 1 mmol/L 的标准品；再用 1 mmol/L 标准品逐级稀释

| 管号 | 标准品体积 | 蒸馏水 | 稀释后浓度 |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 100 μL（10 mmol/L) | 900 μL | 1 mmol/L |
| 2 | 150 μL（1 mmol/L) | 350 μL | 0.3 mmol/L |
| 3 | 250 μL（1 mmol/L) | 750 μL | 0.25 mmol/L |
| 4 | 200 μL（1 mmol/L) | 800 μL | 0.2 mmol/L |
| 5 | 150 μL（1 mmol/L) | 850 μL | 0.15 mmol/L |
| 6 | 100 μL（1 mmol/L) | 900 μL | 0.1 mmol/L |
| 7 | 50 μL（1 mmol/L) | 950 μL | 0.05 mmol/L |
| 8 | 100 μL（0.05 mmol/L) | 400 μL | 0.01 mmol/L |

12. 下述实验中每个标准管需 50 μL 标准品(注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度)

13. 操作表:在 96 孔板/EP 管中分别加入下列试剂。

| 试剂 | 测定管 | 空白测定管 | 对照管 | 空白对照管 | 标准管 |
|---|---|---|---|---|---|
| 样本（μL) | 50 | | 50 | | |
| 蒸馏水(μL) | | 50 | | 50 | |
| 标准品(μL) | | | | | 50 |
| 测定反应液(μL) | 200 | 200 | | | 200 |
| 对照溶液(μL) | | | 200 | 200 | |

14. 混匀后，常温避光静置反应 20 min，585 nm 下测定吸光度值(在 96 孔板中反应的，20 min 后直接检测；在 EP 管中反应的，所有管保持相同的上样体积即可(200-240 μL)，分别记为 A 测定、A 对照、A 空白测定、A 空白对照、A 标准。△A 测定 = (A 测定-A 对照) - (A 空白测定-A 空白对照)，△A 标准 = A 标准-A 空白测定。

15. 注意:反应结束后，请在 10 min 内完成检测，如果样本数量较多，请分批反应。

**四、计算公式**

16. 标准曲线的绘制：以亚硫酸钠标准品浓度(x，mmol/L)为横坐标，△A 标准(y)为纵坐标绘制标准曲线，得到线性回归方程 y = kx + b，将△A 测定(y)代入方程得到 x (mmol/L)。

**五、亚硫酸盐/SO2 含量计算**

17. 按照样本蛋白浓度计算：亚硫酸盐含量(mmol/g prot) = x + Cpr × F ；

SO2 含量 (mg/g prot) = 64 × x - Cpr × F

18. 按照样本质量计算：亚硫酸盐含量(mmol/g) = x × V 提 ÷ W × F = 0.001 ×

| | |
|---|---|
| | x ÷ W × F；SO2 含量(mg/g) = 0.064 × x ÷ W × F<br>19. 按照液体体积计算：亚硫酸盐含量(mmol/L) = x × F；SO2 含量(mg/L) = 64 × x × F<br>20. 按照细菌或者细胞数计算：亚硫酸盐含量(mmol/E6 cells) = x × V提 ÷ N × F = 0.001 × x ÷ N × F；SO2 含量(mg/E6 cells) = 0.064 × x ÷ N × F<br>21. V 提:提取样本用的蒸馏水体积，0.001 L；Cpr:样本蛋白浓度，g/L；W:样本质量，g；N:细菌或细胞总数，以 E6 cells 计； F:样本上清或者液体样本的稀释倍数；64：SO2 的相对分子质量，64 g/moL = 64 mg/mmoL。<br>**六、注意事项**<br>22. 如果预实验中测得的△A>1.4，请将样本上清或者液体样本用蒸馏水稀释后测定。如果△A 较小，可适当加大样本量，注意同步修改计算公式<br>23. 对于待测样本(例如食品)中亚硫酸盐的存在形式包括游离态、可逆结合态和不可逆结合态。在不同的酸度条件下，游离态的亚硫酸盐可在 $HSO_3^-$ 、$SO_3^{2-}$和二氧化硫 3 种形态间转化。亚硫酸盐易与醛类、酮类、己醛糖(如葡萄糖)、己酮糖(如果糖、单糖)等进行不可逆结合。由于不可逆结合的亚硫酸盐在生理环境下一般不会解离，故不会危害身体健康，所以，目前对食品中亚硫酸盐用量的限制主要是游离态和可逆结合态部分。<br>24. 针对该试剂盒所建议的提取方法和检测方法，对于食品，仅能测定游离态和可逆结合态亚硫酸盐;对于动植物组织，主要测定游离态亚硫酸盐;该试剂盒无法测定不可逆结合态的亚硫酸盐，故结果不能作为总亚硫酸盐含量。 |
| **关联产品** | 硫代硫酸根离子含量测定试剂盒 |