

## 柠檬酸 (citric acid, CA) 含量测定试剂盒说明书

## 分光法 48 样

## 一、产品简介:

柠檬酸广泛用于食品、医药与工业中。同时柠檬酸(CA)也是三羧酸循环第一步反应的产物,参与呼吸代谢等生理代谢活动。

铁(III)-磺基水杨酸生成紫红色络合物,柠檬酸可使该络合物颜色褪至橙红。于 470nm 波长下,其吸光度的减小与柠檬酸含量在一定条件下成正比,从而可求得样品中柠檬酸含量

## 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	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4°C保存	临用前每支甩几下或离心使试剂落入底部,再分别加 1.5mL 蒸馏水溶解备用,现配现用。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加 10mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂

## 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、柠檬酸 (CA) 含量测定:

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

## 1、样本制备:

## ① 组织样本:

12000rpm, 4°C离心 10min 称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取

## ② 细菌、真菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;冰浴超声波破碎细菌或细胞(功率 300w, 超声 3 秒,间隔 7 秒,总时间 3min); 12000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌或细胞数量( $10^4$ 个):提取液体积(mL)为 1000~5000:1 的比例进行提取

## ③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

## 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 470 nm, 蒸馏水调零。

② 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

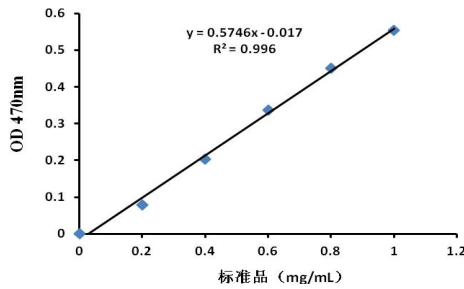
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	空白管 (仅做一次)
试剂一	40	40
试剂二	160	160

提取液	160	160
样本	40	
蒸馏水	400	440
混匀，室温（25℃）条件下孵育 20min，于 470nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 空白-A 测定。		

【注】若 A 测定管值在零附近或者 A 测定最后颜色接近无色，表明样本中柠檬酸含量较高，可对样本用蒸馏水稀释后再检测，则稀释倍数 D 需代入公式重新检测。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.5746x - 0.017$ ；x 是标准品浓度（mg/mL），y 是  $\Delta A$ 。



2、按组织质量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.017) \div 0.5746 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.74 \times (\Delta A + 0.017) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.017) \div 0.5746 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.0035 \times (\Delta A + 0.017) \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{柠檬酸含量(mg/mL)} = [(\Delta A + 0.017) \div 0.5746 \times V1] \div V1 \times D = 1.74 \times (\Delta A + 0.017) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.04mL；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数；500 万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。