

柠檬酸 (citric acid, CA) 含量测定试剂盒说明书

微板法 96 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呈正比，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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃保存	临用前每支甩几下或离心使试剂落入底部，再分别加 1mL 蒸馏水溶解备用，现配现用。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 5mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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℃离心 10min 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000g, 4℃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℃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 (10⁴ 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 酶标仪预热 30 min，调节波长到 470 nm。

② 在 96 孔板中依次加入：

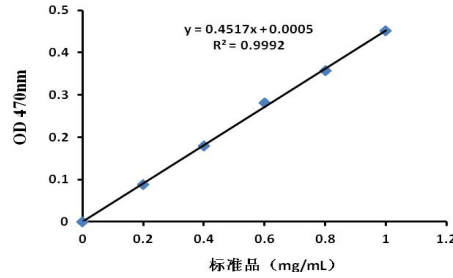
试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
试剂一	10	10
试剂二	40	40
提取液	40	40
样本	10	

蒸馏水	100	110
混匀，室温（25℃）条件下孵育 20min，于 470nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

- 【注】1. 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。
2. 若 A 测定管接近空白管或 ΔA 值在零附近，可增加样本加样体积 V1（如增至 50 μ L，则提取液或蒸馏水相应减少）。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.4517x + 0.0005$ ；x 是标准品浓度（mg/mL），y 是 ΔA 。



2、按组织质量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.4517 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 2.2 \times (\Delta A - 0.0005) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0005) \div 0.4517 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.0044 \times (\Delta A - 0.0005) \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{柠檬酸含量(mg/mL)} = [(\Delta A - 0.0005) \div 0.4517 \times V1] \div V1 \times D = 2.2 \times (\Delta A - 0.0005) \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

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。