

柠檬酸含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHC8-M48	柠檬酸含量检测试剂盒说明书	48T	微量法
PYHC8-M96		96T	

一、测定意义：

柠檬酸是一种重要的有机酸，广泛存在于自然界（如柑橘类水果）中，同时也是食品、医药、化工等领域的重要原料。柠檬酸含量测定在食品、医药、化工、环境监测和科学研究等领域具有重要意义。通过测定柠檬酸含量，可以确保产品质量、优化生产工艺、保障食品安全，并为科学研究提供重要数据支持。

二、测定原理：

在酸性条件下，重铬酸钾（ KCrO_7 ）与柠檬酸发生氧化还原反应，重铬酸钾被还原为三价铬（ Cr^{3+} ），溶液颜色由橙黄色变为绿色。通过测定反应前后溶液在545nm的波长下的吸光度变化，可以间接计算出柠檬酸的含量。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 9mL×1 瓶	液体 18mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉体 ×2 瓶	2-8°C保存
试剂二：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 2mL，混匀充分溶解，现用现配。			
试剂三	液体 1.5mL×1 支	液体 1.5mL×2 支	2-8°C保存
标准品 10mg/mL	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8°C保存

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4°C离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个: 提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4°C离心 10min，取上清置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：待测液体与提取液 1:1 配制，混匀后直接测定。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至545nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将10mg/mL标准品用提取液依次稀释至0、0.2、0.4、0.6、0.8、1mg/mL，备用；
4. 操作表（在96孔板中加入以下试剂）：

	空白管	标准管	测定管
样品（ μL ）	-	-	20
双蒸水（ μL ）	20	-	-
不同浓度标准品（ μL ）	-	20	-
试剂一（ μL ）	140	140	140
试剂二（ μL ）	20	20	20
试剂三（ μL ）	20	20	20
充分混匀，静置 30min，显色稳定后于 545nm 读数。测定 545nm 处吸光值，别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白管只做 1-2 管）			

四、柠檬酸含量计算：

1、标准曲线绘制：以 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（y， $\mu\text{g/mL}$ ）；

2、液体样本柠檬酸含量计算

$$\text{柠檬酸} (\mu\text{g/mL}) = y$$

3、组织、细胞样本柠檬酸含量计算

(1) 按样本鲜重计算：

$$\text{柠檬酸} (\mu\text{g/g 质量}) = y \div (V_{\text{样总}} \div W) = y \times W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{柠檬酸} (\mu\text{g/mg prot}) = y \div \text{Cpr}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

$$\text{柠檬酸} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = y \div (V_{\text{样总}} \div N) = y \times N$$

V_{样总}：加入提取液体积，1 mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；

N：细菌或细胞总数，以万计。

五、注意事项：

- 1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测；
- 2、反应 30min 后有明显的黑色小颗粒，建议将样本稀释后再测。