

苹果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
PYHC9-M48	苹果酸含量检测试剂盒说明书	48T	微量法
PYHC9-M96		96T	

一、测定意义：

苹果酸常用于食品添加剂，食品和饮料生产中，苹果酸含量测定可以帮助优化发酵、储存等工艺，确保产品品质稳定。测定苹果酸含量有助于评估食品和饮料的质量，尤其是在果汁、葡萄酒等产品中，苹果酸是影响风味和口感的关键成分。

二、测定原理：

苹果酸在苹果酸脱氢酶（MDH）和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）的反应中，发生氧化还原反应，生成草酰乙酸和 NADH。NADH 总量可以看做 L-苹果酸总量，在 340nm 波长条件下测定 NADH 总量。

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 50mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂二：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 2.5mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂三	液体 ×1 支	液体 ×2 支	-20℃保存
试剂三：用时每支试剂加入蒸馏水 0.45mL，混匀充分混匀，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂四	液体 ×1 支	液体 ×2 支	-20℃保存
试剂四：用时每支试剂加入蒸馏水 0.45mL，混匀充分混匀，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			

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℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 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℃离心 10min，取上清置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至340nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 操作表（在96孔UV板中加入以下试剂）：

	测定管	空管
样品（μL）	20	-
双蒸水（μL）	-	20
试剂一（μL）	120	120
试剂二（μL）	40	40
试剂三（μL）	10	10
混匀，3min 后读取吸光度（A1），再加以下试剂继续反应		
试剂四（μL）	10	10
充分混匀，记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{测定} = A1_{测定} - A2_{测定}$ 。 $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$ ； $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。（空白管只做 1-2 管）		

四、苹果酸含量计算：

1、组织、细胞样本苹果酸含量计算

(1) 按样本鲜重计算：

$$\text{苹果酸 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T = \Delta A \times 0.268 \times 10^3 \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{苹果酸 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = \Delta A \times 0.268 \times 10^3 \div C_{pr}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

$$\text{苹果酸 (nmol/104 cell)} = (U/104 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times 500) \div T = \Delta A \times 0.536$$

V 反总：反应体系总体积，0.2×10⁻³ L；

ε：NADH，6.22×10³L/mol/cm；

d：比色皿光径，0.6cm；

V 样：加入样本体积，0.02mL；

V 样总：加入提取液体积，1mL；

T：反应时间，10min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol；

W: 样本质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

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;