

## 柠檬酸（citric acid, CA）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10404F 分光法 48 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度    | 注意事项                                                                             |
|------|-------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C避光保存 |                                                                                  |
| 试剂一  | 粉剂 2 支      | 4°C保存   | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）；<br>2. 再分别加 1.5mL 蒸馏水溶解备用，现配现用。 |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶      | 4°C避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 10mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。             |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | 4°C保存   | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                     |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### ① 组织样本：

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 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

##### ③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<sup>4</sup> 个）：提取液体积（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

## 2、检测步骤:

- ① 分光光度计预热 30 min (等仪器过自检程序亦可), 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:

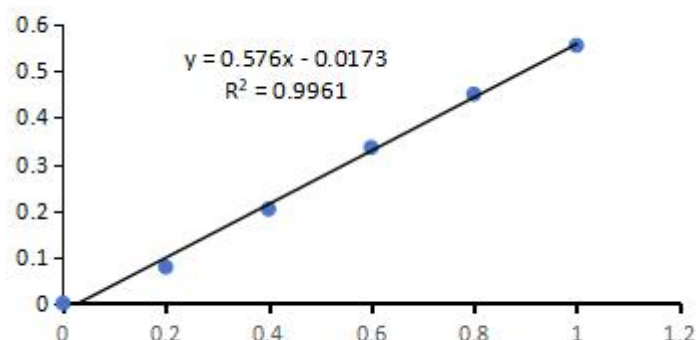
| 试剂组分 (μL)                                                                                  | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| 试剂一                                                                                        | 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, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 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:  $y = 0.576x - 0.0173$ ; x 是标准品浓度 (mg/mL), y 是  $\Delta A$ 。



- 2、按组织质量计算:

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量 (mg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0173) \div 0.576 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 1.736 \times (\Delta A + 0.0173) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量 (mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0173) \div 0.576 \times V_1] \div (V_1 \times C_{pr} \div V) \\ &= 1.736 \times (\Delta A + 0.0173) \div C_{pr} \end{aligned}$$

- 3、按液体体积计算:

$$\text{柠檬酸含量 (mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0173) \div 0.576 \times V_1] \div V_1 \times D = 1.736 \times (\Delta A + 0.0173) \times D$$

- 4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量 (mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0173) \div 0.576 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.0035 \times (\Delta A + 0.0173) \times D \end{aligned}$$

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, 万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 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）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度；

| 标品浓度<br>mg/mL | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品母液 uL       | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 蒸馏水 uL        | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。     |     |     |     |     |     |     |

- 4 标品稀释参照表如下：

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分（μL）                                                                                | 标准管 | 0 浓度管（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， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0 \text{ 浓度}}$ 。 |     |             |