

## 柠檬酸(CA)含量检测试剂盒（高效液相色谱法HPLC）

产品货号：BA2182

产品规格：50T/48S

### 产品简介：

柠檬酸是一种重要的有机酸，又名枸橼酸。因为柠檬酸有温和爽快的酸味，普遍用于各种饮料、汽水、葡萄酒、糖果、点心、饼干、罐头果汁、乳制品等食品的制造。在所有有机酸的市场中，柠檬酸市场占有率70%以上，到目前还没有一种可以取代柠檬酸的酸味剂。

柠檬酸在210nm下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

### 试剂盒组成：

试剂名称	规格	保存要求
提取液一	液体80ml×1瓶	2-8°C
提取液二	液体80ml×1瓶	2-8°C
试剂一	液体2ml×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×2瓶	2-8°C
标准品	粉剂×1瓶	2-8°C，避光

注意：标准品临用前加入2mL蒸馏水配制成10mg/mL柠檬酸标准溶液，4°C密封保存，避免阳光直射。

### 试验中所需的仪器和试剂：

高效液相色谱仪(Polaris C18-A色谱柱(4.6×250mm)，紫外检测器(VWD))、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管(2mL)、针头式过滤器（有机系、水系），注射器，抽滤器，滤膜(水系、有机系)，棕色进样瓶(50个，1.5mL)、超纯水。

### 实验前准备工作：

1. 将1瓶试剂二溶解到1000mL超纯水中，再加入0.9mL的试剂一，混匀，得到流动相A。
2. 将1000mL配制好的流动相A用滤膜抽滤。(配制好的流动相A采用0.22 μm水系滤膜抽滤)。
3. 将抽滤好的流动相A超声20min，除去气泡。
4. 标准品的配制：将10mg/mL的柠檬酸标准溶液采用倍比稀释的方法分别用蒸馏水稀释成5000μg/mL、2500μg/mL、1250μg/mL、625μg/mL、62.5μg/mL、31.25μg/mL的柠檬酸标准溶液。(配制的标准品浓度仅供参考，可根据实际样品浓度进行调整)。4°C避光保存(密封)，测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测。

### 操作步骤：

#### 一、柠檬酸的提取：

植物样本：按质量(g):提取液体积(mL)1:5~10比例，建议称取0.15g新鲜样本，充分研磨碾碎，加入1mL提取液一，密封，混合均匀，置于75°C水浴锅中浸取20min。12000rpm离心10min，取上清液，在滤渣中再次加入0.5mL的提取液一，震荡混匀，75°C水浴锅中浸取20min。混合两次提取的提取液，12000rpm离心10min，取上清液，测试前采用水系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测(若上清液颜色过深或者浓度过高，可稀释后再次过滤待测)。

动物样本：按质量(g):提取液体积(mL)1:5~10比例，建议称取0.15g新鲜样本，充分研磨碾碎，加入1mL提取液二，密封，混合均匀，置于75°C水浴锅中浸取20min。12000rpm离心10min，取上清液，在滤渣中再次加入0.5mL



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

的提取液二，震荡混匀，75°C水浴锅中浸取20min。混合两次提取的提取液，12000rpm离心10min，取上清液，测试前采用有机系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测(若上清液颜色过深或者浓度过高，可稀释后再次过滤待测)。

## 二、测定步骤：

1. 开启电脑、打开液相色谱仪各模块开关按钮，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量为10 $\mu$ L，柱温：30°C，流速为0.4mL/min，波长为210nm，走样时间25min，设置完毕保存方法组。
2. 采用相应的流动相清洗柱子，用流动相A平衡柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 检测待测的标准品溶液，进样量为10 $\mu$ L，在25min内可分离出柠檬酸，柠檬酸的保留时间为16.9min左右(体系、柱子、流动相pH、温度等不同，保留时间有差异，仅作为参考)。
4. 检测待测的样品溶液，进样量为10 $\mu$ L，在相应的保留时间处检测柠檬酸的峰面积。

## 三、柠檬酸含量计算

以标准品浓度( $\mu$ g/mL)为横坐标，峰面积为纵坐标绘制柠檬酸的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线，计算提取液中柠檬酸的浓度  $x$ ( $\mu$ g/mL)。

$$\text{柠檬酸的含量}(\mu\text{g/g}) = x \times V_{\text{提取}} \div W = 10x$$

V提取：提取液的体积，1.5mL；W：样本质量。稀释后测试的样本，需要乘以相应的稀释倍数，再进行计算。

## 注意事项：

1. 测试完毕后，需要用高浓度的超纯水相冲洗色谱柱(约20-30个柱体积)，以防阻塞色谱柱，再用高浓度的有机相冲洗色谱柱，最后按柱子的种类规范冲洗，防止损伤色谱柱。
2. 标准品的稀释倍数要根据样品中柠檬酸的浓度确定，样品中柠檬酸的峰面积必须在不同浓度的标准品溶液的峰面积之内，该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中柠檬酸浓度过高，建议可稀释后再测。
3. 若样本量过大，建议每天测试一次标准溶液(一个标准溶液即可)，以确定相应的保留时间，所有待测溶液测试前须放置至室温状态。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com