

柠檬苦素含量测定试剂盒(微板法)

一、产品简介:

柠檬苦素是一种三萜类的植物次生代谢产物, 主要存于芸香科植物和楝科植物中。也是柑橘类水果呈现苦味的主要原因, 一般在柑橘属果实和种子中浓度较高, 具有一定的抗癌和抗病毒作用及其他有益生物活性。柠檬苦素与 Ehrlich 试剂形成稳定的红色配合物, 测定其吸光度 OD 值, 其颜色深浅与柠檬苦素浓度成正比。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格R45162-96S	保存要求	备注
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃保存	
试剂一	一A: 粉体mg×1支 一B: 粉体mg×9支	2-8℃保存	一A试剂在临用前甩几下使粉体落入底部, 再向一A中加0.5mL水溶解备用。
			取一支一B试剂, 甩几下使粉体落入底部, 再加4mL的35%硫酸(溶剂是乙醇, 即硫酸: 无水乙醇=35:65)溶解备用, 避光保存, 溶解后的一B尽量两天内用完(操作过程可戴上手套谨慎操作)。
标准品	粉体mg×1支	2-8℃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、台式离心机、可调式移液器、96孔防腐蚀UV板、石油醚、无水乙醇、浓硫酸、研钵。

四、柠檬苦素含量测定:

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: 称取 0.1g, 加入1mL石油醚进行研磨, 12000rpm, 25℃离心10min, 弃上清(尽量保留沉淀), 再加入1mL石油醚重复以上操作, 最后一步沉淀中加入1mL提取液, 涡旋震荡混匀, 45℃水浴提取10min后, 8000rpm, 25℃离心10min, 取上清液待测。

【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的比例进行提取

② 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 30min, 调节波长到 500 nm。

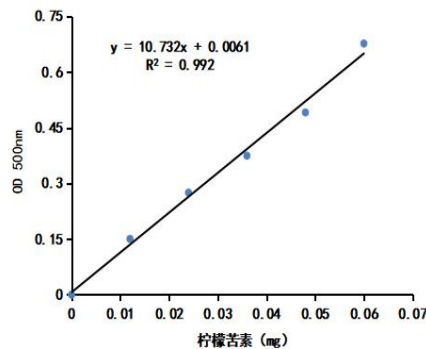
② 试剂一 mix 配制: 向一支已经溶解成液体的一 B 中加 20μL 的一 A, 混匀后作为试剂一 mix (最好现配现用)。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。在EP管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白 (仅做一次)
样本	120	
提取液		120
试剂一mix	280	280
混匀, 室温孵育30min (若孵育期间发现分层现象, 可混匀后继续孵育, 检测读值前也需混匀), 取200μL澄清液体转移至UV板中, 立即于500nm处读值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

五、结果计算

1、标准曲线方程为 $y = 10.732x + 0.0061$; x为标准品质量 (mg), y为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\text{柠檬苦素含量(mg/g重量)} = [(\Delta A - 0.0061) \div 10.732] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 1.553 \times (\Delta A - 0.0061) \div W \times D$$

3、按液体体积计算:

$$\text{柠檬苦素含量(mg/mL)} = [(\Delta A - 0.0061) \div 10.732] \div V1 \times D = 1.553 \times (\Delta A - 0.0061) \times D$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.06mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为1;

六、注意事项

1、本体系含有有机溶剂成分, 加入反应体系后, 随着放置时间延长, 可能对UV微孔板状态产生影响, 从而影响检测结果稳定性。为保证检测准确性, 建议加样后立即进行检测, 并尽量于2 min内开始读值。样本量较大时建议采用分批加样、分批检测。



2、不同品牌及材质UV微孔板在本体系中的适配性可能存在差异。建议使用质量稳定、适配性较好的UV微孔板进行检测。

3、UV微孔板属于一次性检测耗材，不建议重复使用，以保证检测结果一致性。

附：标准曲线制作过程（标曲为非必做实验，可直接用试剂盒自带的标曲计算结果）：

- 1 标准品浓度（2mg/mL）：称取2mg标准品至EP管中，加入1mL提取液溶解成2mg/mL。
- 2 把标准品用提取液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

依据测定管加样体系，于500nm处测定；根据结果即可制作标准曲线。

保质期：3个月。