

乙醇含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

酒是含酒精（乙醇）饮料的统称，乙醇是酒的主要成分，是衡量酒质量的重要指标之一。我国是世界上最早发明酿酒的国家，也是酒类产品消费大国，其消费量居世界之首。因此，快速、准确测定酒中乙醇含量，对于确保酒的质量和保护消费者的健康具有重大意义。

测定原理：

乙醇在乙醇脱氢酶的催化下氧化脱氢生成乙醛，同时，NAD 被还原生成 NADH，NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 显橙黄色，通过 450 nm 下测定吸光值变化可测得乙醇含量。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 30 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 15 mL 试剂三充分溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂三：液体 20 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 3mL×1 管，4℃避光保存。

乙醇提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：蒸馏水体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水），进行匀浆，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
2. 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：蒸馏水体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水），超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
3. 血清（浆）等液体样品：直接测定。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
2. 工作液的配制：临用前按照样本数量，按以下比例配制工作液

试剂名称	体积（ μ L）
试剂一	500

试剂二	250
试剂四	50

3. 样本测定

按下表加入如下试剂

试剂名称	体积 (μL)
样本	200
测定工作液	800

混匀后记录 450nm 下测定初始吸光值 A1, 和 37℃避光孵育 10min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

乙醇含量计算:

标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0512x + 0.0055$ $R^2 = 0.9991$;

x 为乙醇含量 (μmol/mL), y 为吸光值差值 ΔA 。

1.按照血清(浆)体积计算

$$\begin{aligned} \text{乙醇含量 (}\mu\text{mol/mL)} &= (\Delta A - 0.0055) \div 0.0512 \\ &= 19.5 \times (\Delta A - 0.0055) \end{aligned}$$

2.按照样品质量计算

$$\begin{aligned} \text{乙醇含量 (}\mu\text{mol/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0055) \div 0.0512 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= 19.5 \times (\Delta A - 0.0055) \div W \end{aligned}$$

3.按照细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{乙醇含量 (}\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0055) \div 0.0512 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= 0.039 \times (\Delta A - 0.0055) \end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.2mL; V2: 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; 500: 细菌或细胞总数, 500 万;

注意事项:

测定前取 1-2 个样做预实验, 若 $\Delta A > 0.6$ 或乙醇含量 $> 10 \mu\text{mol/mL}$, 需将样本用蒸馏水稀释后再测定, 以确保测定的准确性。

最低检测限: $0.02 \mu\text{mol/mL}$ 。