

多糖含量试剂盒说明书

(货号: G0593F 分光法 48 样)

一、产品简介:

糖在浓硫酸作用下,水解生成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚缩合成橙黄色化合物,且颜色稳定,在波长 488 nm 处和一定的浓度范围内,其吸光度与多糖含量呈线性关系正比,从而可以利用分光光度计测定其吸光度,并利用标准曲线定量测定样品的多糖含量,本方法可用于多糖含量的测定

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂×3 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,每支分别加 1.9mL 水溶解备用。
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、水浴锅/金属浴、可调式移液器、乙醇、浓硫酸(不允许快递)、研钵。

四、多糖含量的测定:

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 多糖待检液制备:

a. 组织样本:

- ① 样本烘干研磨过 40 目筛,称取 3mg 过筛后细末至 2mLEP 管中,加入 2mL 蒸馏水,于沸水浴(95-100℃)加热 2 小时(若放在金属浴上面可用重物压盖防止 EP 管崩开;间隔 20min 带防护手套轻轻晃动混匀几下),加热结束后取出放置至室温,8000rpm 离心 5min,
- ② 取 0.2mL 上步离心后的上清液至新 EP 管中,再加入 1mL 乙醇混匀,于 4℃放置 1 小时,取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清,留沉淀;
- ③ 上步所得沉淀中再加入 1mL80%乙醇混匀几下(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中),8000rpm 离心 5min 后弃上清,留沉淀(可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液,尽量**避免沉淀损失**);
- ④ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水,于沸水浴(95-100℃)加热直到沉淀全部溶解(约 5min)即多糖待检液。

b. 液体样本:

- ① 取 0.2mL 液体(可先做两个样本预测定,确定适合本批液体样本取样量 V2),至新 EP 管中,再加入 1mL 乙醇混匀(使乙醇在整个液体中占比至少 80%),于 4℃放置 1 小时,取出后 8000rpm 离心 5min 后弃上清,留沉淀;
- ② 上步所得沉淀中再加入 1mL80%乙醇混匀几下(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中),8000rpm 离心 5min 后弃上清,留沉淀(可采用使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余上清液,尽量**避免沉淀损失**);
- ③ 向上步所得沉淀中加入 2mL 蒸馏水,于沸水浴(95-100℃)加热直到沉淀全部溶解(约 5min)即多糖待检液。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 488nm，调节水浴锅或金属浴至 95-100℃。
- ② 向标准品中加入 1mL 蒸馏水即 1mg/mL 葡萄糖母液，用蒸馏水稀释 20 倍(1 份母液:19 份水)成 0.05mg/mL 葡萄糖，用于测定。在 EP 管中依次加入：

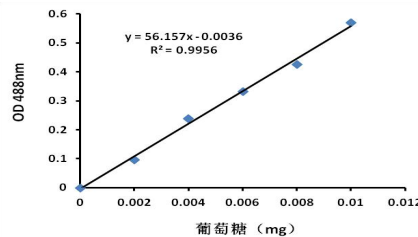
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
多糖待检液	200	
标准品		
蒸馏水		200
试剂一	100	100
浓硫酸(务必缓慢加入)	500	500

混匀放入 95℃水浴 20min (封口膜缠紧，防止水分散失)，冷却至室温后，取全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 488nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

- 【注】:1. 如果 ΔA 大于 1.5，需要将样本用蒸馏水稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数 D。
2. 若 ΔA 值在零附近即低于 0.005，则可增加样本取样质量 W，则改变后的 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准方程为 $y = 56.157x - 0.0036$ ；x 为标准品质量 (mg)，y 为吸光值 ΔA 。



- 2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\text{mg/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 56.157] \div (W \times V1 \div V) \times 10 \times D \\ &= 1.781 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times D \end{aligned}$$

- 3、按质量分数 (%) 计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\% \text{重量}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 56.157] \div (W \times V1 \div V) \times 10 \times D \times 10^{-3} \times 100\% \\ &= [0.1781 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times D]\% \end{aligned}$$

- 4、按液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{多糖}(\text{mg/mL 液体}) &= [(\Delta A - 0.0065) \div 86.454] \div (V2 \times V1 \div V) \times 10 \times D \\ &= 2.313 \times (\Delta A - 0.0065) \div V2 \times D \end{aligned}$$

V---样品提取液总体积，2mL；

V1---测定时待检液体积，0.2mL；

V2---液体取样体积，mL；

10---②步中取 0.2mL 处理后变成 2mL 体积；

W---样本质量，g；

D---自行稀释倍数，未稀释即为 1W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。