

多糖中糖醛酸含量试剂盒说明书

(货号: G05105W 微板法 96 样)

一、产品简介:

天然植物的多糖以酸性杂多糖的形式存在较多,糖醛酸是糖的衍生物,对从天然植物中得到的多糖,在结构研究中对糖组成分析,确定其中是否含有糖醛酸残基具有重要的意义。

糖醛酸与硫酸硼砂溶液在沸水浴中水解,水解产物将进一步和间羟基联苯反应,产生粉红色衍生物,在 525nm 处和一定的浓度范围内有最高吸收峰。

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×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再缓慢加入 35mL 浓硫酸 ,混匀,完全溶解备用。
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部,再加 0.65mL 试剂三混匀溶解备用。
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	
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:

酶标仪、96 孔板、水浴锅/金属浴、可调式移液器、**浓硫酸 (自备)**、研钵。

四、多糖中糖醛酸含量的测定:

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!

建议:选取样本做几个梯度的稀释,选取适合本次实验的稀释倍数 D。

1、待检液制备:

a.组织样本:

- ① 若是烘干研磨且过 40 目筛后的样本,称取 3mg 过筛后的细末,至 2mLEP 管中,加入 2mL 蒸馏水;(若是鲜样则可取 0.1g 或 0.5g (水份足的样本)至 2mLEP 管中,加入 2mL 蒸馏水),于沸水浴(95-100℃)加热 1 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(中间过程液体若挥发严重,最后可用蒸馏水定容到 2mL),最后于 8000rpm 室温离心 5min,上清液待用。
- 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 30 分钟,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 1mL 的 80%乙醇混匀(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中),8000rpm 离心 5min 后弃上清,留沉淀(可将 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)即待检液。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 525nm,调节水浴锅或金属浴至 95-100℃。

② 在 EP 管中依次加入：

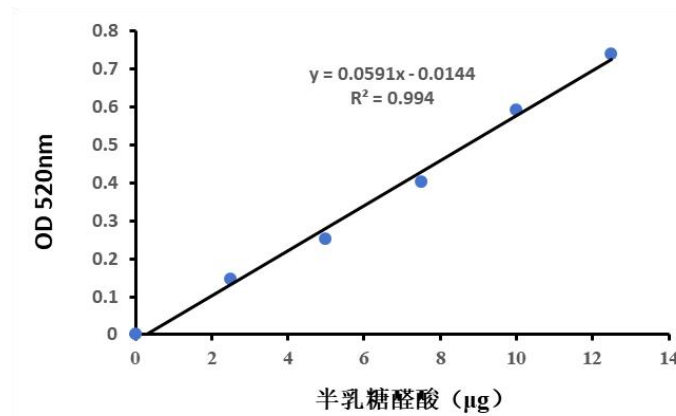
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	25	
蒸馏水	25	50
试剂一	300	300
混匀, 95°C 孵育 5min 后, 取出冷却至室温待用		
试剂二	4	4
混匀后, 室温静置 5min 后, 取 200μL 转移至 96 孔板中, 于 525nm 读取吸光值, ΔA=A 测定管-A 空白管。		

【注】:1. 如果ΔA 大于 1, 需要将待检液用蒸馏水稀释, 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

2. 若ΔA 值在低于 0.01, 则可增加样本取样质量 W 或增加样本量 V1(如 25μL 增至 50μL, 则蒸馏水相应减少), 则改变后的 W 和 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准方程为 $y = 0.0591x - 0.0144$; x 为标准品质量 (μg), y 为吸光值ΔA。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{糖醛酸(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0144) \div 0.0591] \div 10^3 \div (W \times V1 \div V) \times 10 \times D \\ &= 13.54 \times (\Delta A + 0.0144) \div W \times D \end{aligned}$$

V---样品提取液总体积, 2mL;

V1---测定时待检液体积, 0.025mL;

W---样本质量, g;

10---②步中取 0.2mL 处理后变成 2mL 体积;

D---自行稀释倍数, 未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (20mg/mL)：标准品管中加入 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即 20mg/mL 的半乳糖醛酸 (母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. 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。