

## 离子结合型果胶(ISP)含量试剂盒说明书

(货号: G0705F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

果胶是构成细胞初生壁和中胶层的主要成分, 主要由原果胶、果胶酸甲酯和果胶酸等形式广泛分布于植物果实、根茎和叶中。果胶间以  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、氢键、糖苷键、酯键等方式与其他物质交联, 通过特异的提取方式可以提取得到离子结合型果胶 (ISP) 和共价结合果胶 (CSP)。

本试剂盒用带有螯合剂的酸溶液特异提取离子结合型果胶 (ISP), 采用硫酸-吡啶比色法测定果胶含量。果胶水解为半乳糖醛酸, 在硫酸溶液中与吡啶进行缩合反应, 生成紫红色物质, 经光谱扫描该物质在 530nm 处有最大吸收峰, 颜色深浅与果胶含量成正比, 进而得离子结合型果胶含量。

### 二、测试盒组成和配制:

| 试剂名称  | 规格           | 保存要求  | 备注             |
|-------|--------------|-------|----------------|
| 提取液 A | 液体 60 mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                |
| 提取液 B | 液体 60 mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                |
| 试剂一   | 液体 1.5mL×1 支 | 4℃ 保存 |                |
| 标准品   | 粉剂 mg×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、可调式移液器、乙醇、浓硫酸、研钵。

### 四、离子结合型果胶 (ISP) 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 取 0.1g 组织 (烘干且过筛后的粉末组织可取 0.02g), 加 1.5mL 的 80%乙醇, 研磨匀浆, 85℃水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25℃10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ② 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇震荡混匀 2min, 85℃水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25℃10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液 A, 90℃水浴 15min (间隔 3min 晃动一次), 8000rpm, 室温 (25℃) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入 1mL 丙酮震荡混匀, 8000rpm, 室温 (25℃) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, (注:若色素仍很多, 继续用丙酮提取 1-2 次), 打开 EP 管置于 90℃孵育 20min, 使沉淀干燥。
- ④ 向沉淀中加入 1mL 提取液 B, 室温 (25℃) 震荡提取 1 小时后, 8000rpm, 25℃离心 10min, 上清液待测。

#### 2、上机检测:

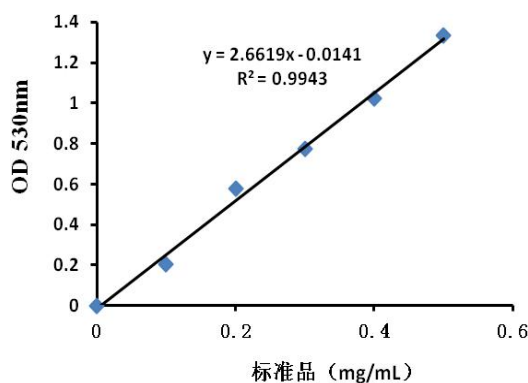
- ① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长为 530nm, 蒸馏水调零。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释 (如 4 倍, 即 1 份上清液+3 份蒸馏水), 确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称<br>( $\mu\text{L}$ )                                                                                                          | 测定管 | 空白管<br>(仅做一次) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
| 样本                                                                                                                                 | 105 |               |
| 蒸馏水                                                                                                                                |     | 105           |
| 浓硫酸                                                                                                                                | 630 | 630           |
| 可用封口膜缠紧, 85°C水浴 15min 后,<br>流水冷却至室温。                                                                                               |     |               |
| 试剂一                                                                                                                                | 21  | 21            |
| 混匀, 室温 (25°C) 暗处反应 30min (间隔 10min<br>混匀一次), 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中,<br>于 530nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 |     |               |

- 【注】: 1、浓硫酸必须是分析纯级别, 且不能长期开口放置, 否则影响显色结果。另外浓硫酸具有强腐蚀性, 操作时需特别注意, 85°C加热取出后冷却再打开盖子, 以防液体飞溅烧伤。
- 2、显色反应必须在暗处反应, 否则颜色很快消失或者变淡, 影响吸光值。
- 3、若 A 测定管值大于 1.8, 可用蒸馏水稀释样本即待检测上清液, 则稀释倍数 D 需代入公式计算; 或若 A 值再零附近可增加样本取样质量 W。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 2.6619x - 0.0141$ ; , x 为标准品浓度 (mg/mL), y 是  $\Delta A$ 。



2、离子结合型果胶(mg /g 重量)  $= [(\Delta A + 0.0141) \div 2.6619 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times D$   
 $= 0.37 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$

W---样本重量, g;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.105mL;

D---稀释倍数。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (0.5mg/mL): 临用前向标准品中加入 2mL 蒸馏水 (现配现用)。
- 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。