

蔗糖 (sucrose) 含量 (蒽酮比色法) 试剂盒说明书

(货号: G0506W 微板法 96 样)

一、产品简介:

蔗糖是光合作用的主要产物,广泛分布于植物体内,特别是甜菜、甘蔗和水果中含量极高。蔗糖由葡萄糖和糖脱水缩合形成,易溶于水较难溶于乙醇。

在酸性条件下,将蔗糖水解生成果糖和葡萄糖,采用蒽酮比色法,生成的产物在 620nm 下有特征吸收峰,进而计算出蔗糖的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 2mL×1 支	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×4 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂×1 支	4°C保存	临用前称量取出2mg标准品至一新EP管中,再加2mL蒸馏水溶解即1mg/mL标准品,再用蒸馏水稀释成0.3mg/mL蔗糖标准品溶液,备用(现配现用,三天内用完)。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、水浴锅、移液器、研钵、常温离心机、乙醇、浓硫酸、蒸馏水。

四、蔗糖含量检测:

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、样本制备

① 组织样本:

称取 0.1g 样本(若是干样,如烘干烟叶等可取 0.05g;若是水分充足的样本可取 0.2g),先加入 0.8mL 的 80%乙醇(自备:取 80mL 乙醇溶于 20mL 蒸馏水中),冰浴匀浆,倒入有盖离心管中,再用 80%乙醇冲洗研钵并转移至同一 EP 管中,使 EP 管中粗提液终体积定容为 1.5mL(若用自动研磨机可直接加入 1.5mL 的 80%乙醇研磨);置 50°C水浴 20min(封口膜缠紧,防止液体散失,且间隔 2min 振荡混匀一次),冷却后(若有损失,可加 80%乙醇补齐至 1.5mL),12000rpm,室温离心 10min,取上清液备用。

② 液体样本:

澄清的液体样本直接检测,若浑浊则需 12000rpm,室温离心 10min,取上清液备用。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 620nm。

② 调节水浴锅至 95°C,工作液的配制:临用前在一瓶试剂二中加入 1.5mL 蒸馏水后,缓慢加入 8.5mL 浓硫酸,充分溶解(若难溶解,70°C加热溶解;剩余试剂 4°C保存一周)。

③ 上清液稀释:可先取 2 个样本预测,确定适合本批样本的稀释浓度 D:叶片类样本可稀释 10 倍,含糖量高的果肉类样本可稀释 20 倍左右。

④ 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	40		
标准品		40	
蒸馏水			40
试剂一	20	20	20
务必混匀 (可用枪吸打混匀), 95°C煮沸 10min (盖紧, 防止水分散失)			
工作液	360	360	360
混匀, 95°C水浴 10min (封口膜缠紧, 防止水分散失), 冷却至室温后, 取 200μL 转移至 96 孔板中, 于 620nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。			

【注】: 如果 ΔA 大于 1, 需要将样本用蒸馏水稀释 (严禁稀释加热反应后的混合液, 否则会出现浑浊现象), 计算公式中乘以相应稀释倍数 D。

五、结果计算:

1、按照重量计算:

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/g 重量)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.45 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{蔗糖含量(mg/mL 液体)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= 0.3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---蔗糖标准品浓度, 0.3mg/mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

V---加入提取液体积, 1.5mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

W---样本鲜重, g。