

共价结合型果胶(CSP)含量试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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组成。果胶中含有半乳糖醛酸、乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等，是许多高等植物细胞壁中含量最丰富的多糖成分，其独特的物理、化学性质影响着植物源食品的口感和品质。果胶间以Ca²⁺桥及其他离子键、氢键、糖苷键、酯键和苯环偶联的方式交联，通过不同的抽提方法可以提取各种形式的果胶，如水溶性果胶（WSP）、离子结合型果胶（ISP）和共价结合果胶（CSP）。

测定原理：

利用带有螯合剂的碱溶液提取共价结合型果胶（CSP），采用咔唑比色法测定果胶含量。果胶水解成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与咔唑试剂进行缩合反应，生成物质在530 nm处有最大吸收峰。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、80%乙醇、丙酮、浓硫酸（不允许快递）、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体100mL× 1瓶，4℃保存。

试剂二：液体100mL× 1瓶，4℃保存。

试剂三：标准液1mL× 1支，4℃保存。

试剂四：液体5mL× 1瓶，4℃保存；

样品的前处理：

1. 细胞壁的提取：取约0.3g样本，加入1mL 80%乙醇，室温快速匀浆，95℃水浴20min，冷却至室温，4000g 25℃离心10min，弃上清。沉淀加入1.5mL80%乙醇和丙酮各洗一遍（涡旋振荡2min左右，4000g 25℃离心10min，弃上清即可），沉淀即为粗细胞壁，加入1mL试剂一（去除淀粉）浸泡15小时，4000g 25℃离心10min，弃上清，将沉淀干燥，称重得细胞壁物质（CWM）。
2. CSP的提取：称取烘干的CWM 3mg，加入1mL试剂二，充分匀浆(若烘干物质质地坚硬，可先研碎后再加入1mL试剂二匀浆，或者用匀浆器匀浆)。8000g 4℃离心10min，取上清液待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至530nm处，蒸馏水调零；试剂三和试剂四37℃预热10min以上；

2、操作表：

试剂名称（μL）	空白管	标准管	对照管	测定管
待测样本			50	50
试剂三		50		
蒸馏水	50		50	

试剂四	50	50		50
-----	----	----	--	----

混匀

浓硫酸	400	400	400	400
-----	-----	-----	-----	-----

混匀，95°C水浴5min后，冷却至室温，取200 μ L 至微量石英比色皿或96孔板中，530nm处读取吸光值，空白管、标准管、对照管和测定管吸光值分别记为A1、A2、A3和A4。若A大于2，需将待测样本用蒸馏水稀释（可稀释10倍或20倍）。空白管和标准管只要做一管，每个测定管需设一个对照管。

CSP含量计算：

$$\text{CSP含量(mg/g 干重)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times (A_4 - A_3) \div (A_2 - A_1) \div (W \times V_1 \div V_2) \times \text{稀释倍数} = 0.05 \times (A_4 - A_3) \div (A_2 - A_1) \div W \times \text{稀释倍数}$$

C标准：标准管浓度，0.05mg/mL；V1：加入样本体积，0.1mL；V2：加入提取液体积，1mL；W：样本干重，g。

注意：最低检测限为50 μ g/g 干重