

## 淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（分光法 48 样）

### 一、产品简介：

淀粉是一种多糖，广泛存在于生物体中。测定淀粉的方法大致分为酸水解或酶法：酸水解方法仅适用于纯淀粉样品，因此应用有限。

本试剂盒提供一种酶法来检测样本中的淀粉含量，按照步骤使样本中的淀粉分离出来，再用仅水解淀粉的酶复合物使淀粉水解为葡萄糖，通过检测葡萄糖含量得到淀粉的含量。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 g×1 瓶	4℃ 保存	用前加 50mL 蒸馏水溶解，并用 50%的乙酸（1mL 蒸馏水+1mL 冰乙酸）逐滴加入约 20 $\mu$ L， <b>务必核定 PH 为 6.4, (不能低于 6.4, 否则重新配置)</b> <b>试剂一稀释液：</b> 30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 的试剂二溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×瓶	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 4.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 的试剂二溶解，即为 1mg/mL 葡萄糖。

### 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、研钵、冰、二甲基亚砷（DMSO）、乙醇、乙酸和蒸馏水。

### 四、淀粉含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

① a. 干样处理：取 1-5g 样本烘干（50℃）至恒重，磨碎并过筛（60 目筛）得到待检均匀粉末样本；取 10mg 粉末样本，至 2mLEP 管中；**除脂：**向 EP 管中加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（**若样本含脂量少，此步可省去**）；**除糖：**接着向沉淀中加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min（间隔 3min 晃动几下），取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（**若样本含糖量少，此步可省去**）。向最后得到的沉淀中加入 0.5mL 的 DMSO 并涡旋振荡使样本**分散悬浮**于液体中（勿沉积于管底或块状悬浮）。

b. 鲜样处理：称取 0.1g 鲜样于研钵中，**除脂：**加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，转移至 2mLEP 管中并定容至 1mL，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（**若样本含脂量少，此步可省去**）；**除糖：**向沉淀中接着加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min，取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（**若样本含糖量少，此步可省去**）。向沉淀中加入 0.5mL 的 DMSO 并涡旋振荡使样本**分散悬浮**于液体中（勿沉

积于管底或块状悬浮)。

- ② 沸水浴直到样本呈分散溶解状态 (约 2min, **确保没有凝胶块状**); 高速涡旋振荡后再沸水浴 15min (**间歇 2-3min 振荡一次, 使样本全部分散溶解, 若凝胶块仍存在, 可增加沸水浴时间和振荡次数直到凝胶块完全溶解**);
- ③ 样本取出置室温约 5min 使样本**冷却**后再加 1mL 无水乙醇**立即**高速涡旋振荡, **避免聚合 (建议逐个样本操作)**, 再加 0.5mL 无水乙醇来回颠倒 EP 管, 静置 5min(有淀粉白色沉淀物产生), 5000rpm 室温离心 5min, 弃上清留沉淀 (**使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余乙醇**);
- ④ 向沉淀中加 1mLDMSO 涡旋振荡混匀, 沸水浴 15min (**间歇 2-3min 振荡一次, 使样本全部分散溶解, 确保没有凝胶块, 若凝胶块最终难完全溶解需弃掉重新制备**)。
- ⑤ 若是谷物样本, 第④步得到的溶液中有杂质, 需待自然冷却 5min 后于 3000rpm 室温 (25℃, 低于 10℃会结冻) 离心 5min, 上清液备用; 若是纯淀粉样本, 第④步得到的溶液呈澄清状, 不需离心自然冷却 5min 备用; 取出 0.1mL 澄清备用液于新 2mL 的 EP 管中, 再加 0.9mL **试剂一稀释液**即为待检测液, 即**稀释 10 倍** (测定务必在 2 个小时内完成)。

**备注: 若样本自身淀粉含量较低, 可降低稀释倍数, 如稀释 2-5 倍。**

## 2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 条件波长至 510nm, 蒸馏水调零。
- ② 总淀粉上清液制备: 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	总淀粉测定管
待检液	40
试剂二	300
试剂三	50
40℃温育 30min 后, 混合液待测, <b>转第③步</b>	

- ③ 显色反应, 在 1mL 玻璃比色皿中或在 EP 管中 (反应结束后再转移全部液体至 1mL 玻璃比色皿中) 依次加入:

试剂名称 (μL)	总淀粉测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
液体	160μL 总淀粉上清液	160μL 试剂二	16μL 标准品 +144μL 试剂二
试剂四	80	80	80
试剂五	560	560	560
混匀, 40℃下, 避光温育 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A。			

## 五、结果计算:

$$\text{总淀粉含量(mg/g 重量)} = (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 2.4375 \times 0.9$$

$$= 9.75 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times 0.9$$

$$\text{总淀粉含量(\%)} = (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 2.4375 \div 10 \times 0.9$$

$$= 0.975 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times 0.9$$

V---定容后待检液总体积, 1 mL;

V1 总淀粉---待检液体积, 0.04mL;

V2---显色反应中标品体积, 0.16mL;

D---稀释 10 倍;

C 标准---0.1mg/mL 葡萄糖

W---样本质量, g;

9.75---总淀粉的稀释倍数;