

# 山梨醇含量测定说明书

(分光法 48 样)

## 一、产品简介:

山梨醇广泛存在于动物、植物、微生物细胞中,作为一种糖的运输形式,与生物抗逆性有关,可作为食品添加剂,增加食物风味。在糖代谢、抗逆性和食品研究中经常需要检测山梨醇含量。

山梨醇在碱性溶液中与铜离子形成蓝色络合物,在 655nm 波长有特征吸收峰,进而得出样本中山梨醇含量。

## 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 mg×2 支	4℃ 保存	每支临用前甩几下使粉体落入底部,再分别加 3mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 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、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、山梨醇含量检测:

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!

### 1、样本制备:

#### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 蒸馏水,研磨匀浆后,95℃ 水浴浸提 10 分钟(盖紧用封口膜封口,以防止水分散失),冷却后,4℃×12000rpm 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

#### ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);95℃ 水浴浸提 10 分钟(盖紧用封口膜封口,以防止水分散失),冷却后,4℃×12000rpm 离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10<sup>4</sup>):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

#### ③ 液体样本:直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

### 2、上机检测:

#### ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 655nm,所有试剂解冻至室温(25℃)。

#### ② 在 EP 管中依次加入:

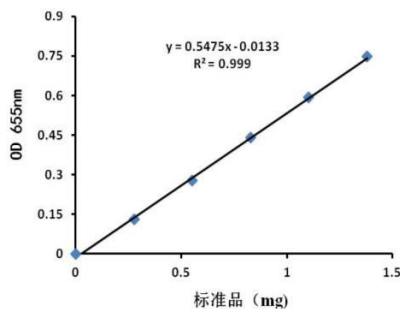
试剂名称(μL)	测定管	空白管(只做一次)
试剂一	105	105
试剂二	105	105
样本	690	

蒸馏水		690
震荡显色 15min, 12000rpm、25℃离心 5min, 上清液转移至 1mL 比色皿中, 在 655nm 处读吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管。		

【注】若 A 测定大于 1, 可对样本用蒸馏水进行稀释后测定, 或减少样本量 V1 (如减至 400 $\mu$ L, 则补加 390 $\mu$ L 的蒸馏水), 则稀释倍数 D 或改变后的加样量 V1 重新代入公式计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.5475x - 0.0133$ , x 是标准品质量 (mg), y 是  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算:

$$\text{山梨醇含量(mg/g)} = [(\Delta A + 0.0133) \div 0.5475] \div (W \times V1 \div V) \times D = 2.65 \times (\Delta A + 0.0133) \div W \times D$$

3、按细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{山梨醇含量(mg / } 10^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0133) \div 0.5475] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.005 \times (\Delta A + 0.0133) \times D \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算:

$$\text{山梨醇含量 (mg/mL)} = [(\Delta A + 0.0133) \div 0.5475] \div V1 \times D = 4.47 \times (\Delta A + 0.0133) \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.69mL ;

W---样本鲜重, g;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

D---稀释倍数, 若未稀释则值为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10mg/mL): 标准品用 1mL 试剂一超声溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。