

纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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：

纤维素是由葡萄糖组成的大分子多糖，通常与半纤维素、果胶和木质素结合在一起，是植物细胞壁的主要结构成分。纤维素是一种重要的膳食纤维，是自然界中分布最广、含量最多的一种多糖。

测定原理：

纤维素为 β -葡萄糖残基组成的多糖，在酸性条件下加热能分解成 β -葡萄糖。 β -葡萄糖在强酸作用下，可脱水生成 β -糠醛类化合物。 β -糠醛类化合物与蒽酮脱水缩合，生成糠醛衍生物。颜色的深浅可间接定量测定纤维素含量。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔酶标板、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：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 6mL×1 支，4℃保存。

样品的前处理：

1、样品 80℃烘干至恒重^{【注1】}，粉碎，过 40 目筛。称取 0.01g 样本，加入 1mL 80%乙醇，90℃水浴 20min^{【注2】}，冷却至室温，8000g 25℃离心 10min，弃上清。沉淀中加入 1.5mL 80%乙醇和丙酮各清洗一遍（涡旋振荡 2min 左右，8000g 25℃离心 10min，弃上清），沉淀烘干后即粗细胞壁。

2、在上述粗细胞壁中加入 1mL 试剂一，充分混匀，90℃水浴 30min^{【注2】}。取出冷却后 8000g 25℃离心 10min，弃上清。沉淀中加入 1mL 蒸馏水混匀，涡旋振荡 2min 左右，8000g 25℃离心 10min，弃上清，沉淀用蒸馏水重复清洗 3 次（加入 1mL 蒸馏水混匀，涡旋振荡 2min 左右，8000g 25℃离心 10min，弃上清）。沉淀中加入 1mL 丙酮，混匀后 8000g 25℃离心 10min，弃上清，沉淀烘干待用。

3.在上述烘干的沉淀中加入 0.5mL 蒸馏水，置于冰水浴中，缓慢加入 0.75mL 浓硫酸，混匀，冰水浴中静置 30min。8000g 4℃离心 10min，取上清液，用蒸馏水稀释 20 倍后待测^{【注3】}。

注意事项：

【注 1】 80℃烘干的时间为 2 小时，依据样本情况可延长烘干时间。

【注 2】 90℃加热过程中 EP 管可能爆开，建议用胶带封口或使用带螺旋盖的防爆 EP 管。

【注 3】 部分样本中纤维素含量较低（淀粉含量较高），如米粉、板栗、甘薯等，可不稀释或减小稀释倍数。

测定步骤：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm。
- 2、调节水浴锅至 95 度。
- 3、工作液的配制：在试剂二中加入 4mL 试剂三，充分溶解，如较难溶解，可加热搅拌；用不完的试剂 4℃保存一周；
- 4、加样表（在 EP 管中反应）：

试剂（ μL ）	空白管	测定管
样本		150
蒸馏水	150	
工作液	35	35
浓硫酸	315	315

混匀，置 95 度水浴中 10min（盖紧，以防止水分散失），冷却至室温后，取 200 μL 至 96 孔酶标板中，于 620nm 处，分别读取空白管和测定管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

注意：

- 1、空白管只要做一管。
- 2、由于浓硫酸具有强腐蚀性，请谨慎操作。

纤维素含量计算：

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 5.25x - 0.0043$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为吸光值。

2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素 (mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0043) \div 5.25 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 20 \\ &= 4.76 \times (\Delta A + 0.0043) \div W \end{aligned}$$

V1：加入样本体积，0.15mL；V2：加入提取液体积，1.25mL；W：样本干重；W：样本干重，0.01g；20：样本稀释倍数。

注意：最低检测限为 1mg/g 干重或 10 μg / mg prot