

植物纤维素（CLL）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHE2-C24	植物纤维素(CLL)含量检测试剂盒	24T	常量法
PYHE2-C48		48T	

一、测定意义

纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种大分子多糖，能够与半纤维素、果胶及木质素结合形成植物细胞壁的主要结构成分。纤维素是由 β -D-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的直链多聚体，经过特定的物化改性后可具有不同的功能特性，以纤维素及其衍生物为原料制作的产品广泛应用于食品加工、纺织、造纸、精细化工、能源再生、电力及科研器材等领域。

二、测定原理

纤维素在酸性条件下可水解为 β -D-葡萄糖， β -D-葡萄糖在强酸环境中脱水生成 β -糠醛类化合物，进一步与蒽酮脱水缩合生成蓝绿色糠醛衍生物，产物在 620 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测纤维素的含量。

三、试剂组成

试剂名称		试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液 A（自备）		液体 80 mL×1 瓶	液体 80 mL×2 瓶	2-8℃保存
提取液 A 的配制：80%乙醇 （64 mL 无水乙醇加入 16 mL 蒸馏水）				
提取液 B		液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃避光保存
提取液 C（自备）		液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液 C 的配制：按照蒸馏水:浓硫酸（自备）=2:3 的体积比配制（充分混匀，冷却至室温后使用）				
显色液	组分 A	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃避光保存
	组分 B	液体 3 mL×1 瓶	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液的配制：使用前每瓶组分 A 中加入 3 mL 组分 B 若较难溶解，可震荡或适当超声促溶（配制后 4℃可保存一周）。				
标准品 （10 mg 葡萄糖）		粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃保存
标准品的配制：使用前每瓶加入 1 mL 蒸馏水充分溶解，即为 10mg/mL 葡萄糖标准液。				

四、操作步骤

一、样本预处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细胞壁物质（CWM）的提取

- (1) 取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，称取 0.1 g 组织样本于 1mL EP 管中，加入 1 mL **提取液 A**，破碎匀浆，90℃处理 20 min，冷却至室温，8000 g 常温离心 10 min，弃上清，留沉淀；（注：水浴加热过程中离心管盖有爆开的可能，建议使用胶带封口或使用带卡扣的离心管）；
- (2) 沉淀使用 1.5 mL **提取液 A** 和**丙酮**（自备）交替清洗 2 遍（涡旋振荡 2 min，8000 g 常温离心 10 min，弃上清），沉淀即为粗细胞壁；
- (3) 粗细胞壁中加入 1 mL **提取液 B** 充分混匀，浸提 15 h，8000 g 常温离心 10 min，弃上清，留沉淀；将沉淀烘干后（80-100℃烘干至恒重），即为细胞壁物质（CWM），称重记为 W_2 ；

2、纤维素的提取

称取细胞壁物质 5 mg（记为 W_3 ）至离心管中，冰水浴中缓慢加入 1 mL **提取液 C**，充分振荡混匀，冰水浴静置 30 min，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清液，将上清液使用蒸馏水稀释 20 倍后即为 待测样本。（注：若细胞壁物质较为坚硬，可先研碎后再加入 1 mL 提取液 C 充分振荡混匀）

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 620nm，蒸馏水调零；
- 2、标准稀释液的制备：将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 0.08、0.06、0.03、0.015、0.0075、0.00375 mg/mL 即为标准稀释液。
- 3、操作表（在离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	标准管	空白管
样本（ μL ）	300	-	-
标准液（ μL ）	-	300	-
蒸馏水（ μL ）	-	-	300
显色液（ μL ）	70	70	70
浓硫酸（ μL ）	630	630	630
95℃显色 10 min（密封以防止水分散失），反应结束后冷却至室温，测定 620 nm 处吸光值，记为 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 和 $A_{\text{空白}}$ ；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：空白管只需测定 1-2 次。			

五、纤维素含量计算：

- 1、标准曲线的建立：根据标准管的浓度（y，mg/mL）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （x， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ （x， $\Delta A_{\text{测定}}$ ）带入公式计算样本浓度（y，mg/mL）。
- 2、按样本细胞壁物质（CWM）质量计算

$$\text{纤维素含量 (mg/g)} = y \times V_{\text{提}} \times 20 \div (W_3 \times 1.11) = 18.02 \times y \div W_3$$

3、按组织样本质量计算

$$\text{纤维素含量 (mg/g)} = y \times V_{\text{提}} \times 20 \times W_2 \div (W_3 \times W_1 \times 1.11) = 18.02 \times y \times W_2 \div (W_3 \times W_1)$$

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为纤维素含量的常数，即 111 μg 葡萄糖用蒽酮试剂显色相当于 100 μg 纤维素蒽酮试剂所显示的颜色； $V_{\text{提}}$ ：提取过程中加入提取液 C 的体积，1 mL；20：待测样本稀释倍数； W_1 ：样本质量，g； W_2 ：样本细胞壁物（CWM）质量，g； W_3 ，提取纤维素时称取的细胞壁物质（CWM）质量，g。

六. 注意事项：

- 1、若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议适当扩大待测样本稀释倍数后再进行测定；低于最低值建议适当减小待测样本稀释倍数或适当增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- 2、显色液组分 B 挥发性强且具有刺激性气味，建议在通风橱中进行显色液的配制，注意做好防护；
- 3、提取液 C 具有强腐蚀性，操作时各个步骤均需特别注意：提取纤维素过程中，为保障自身安全，且防止冰水混合物进入离心管中造成试验误差，置于冰水浴中的离心管需较好固定；纤维素提取在加入提取液 C 时，应缓慢加入以防止液面沸腾烫伤及样本碳化；95℃水浴结束取出后需冷却至室温再打开离心管盖，以防液体飞溅烧伤；
- 4、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。