

棉籽糖含量试剂盒说明书

HPLC 法 50 管/48 样

请客户正式实验前做预实验确定样本稀释倍数！注意事项必读！

测定意义：

棉籽糖是除蔗糖外植物界中分布最广的低聚糖，广泛存在于棉籽、甜菜糖蜜、桉树叶液、小麦胚芽和其他谷物和豆类中。近年来，研究发现棉籽糖不仅是一种优良的双歧杆菌增殖因子，还具有低能量、能抑制肠内腐败产物、改善排便功能、防止便秘及增强机体免疫力、抵抗肿瘤等多种生理功能，是一种具有独特保健功能的活性物质。

测定原理：

棉籽糖可通过示差折光检测器进行检测，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

需自备的实验用品：

高效液相色谱仪、低速离心机、溶剂抽滤装置、氮吹仪、涡旋振荡器、针头式过滤器（有机系，50 个，0.22 μ m）、滤膜（水系和有机系各 1 个，0.45 μ m）、氨基柱（4.6 \times 250 mm）、可调式移液器、样品瓶（50 个，2mL）、内衬管（50 个，放置在样品瓶内用于微量样品进样）、乙腈（色谱级，1800 mL）和超纯水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 60mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；

试剂二：棉籽糖标准品 1.0 mg \times 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存。

实验前的准备工作：

- 1、将超纯水 250 mL 和乙腈 750 mL 用 0.45 μ m 的滤膜抽滤，以除去溶剂中的杂质，防止堵塞色谱柱。（注：蒸馏水用水系滤膜抽滤，乙腈用有机系滤膜抽滤）。
- 2、流动相的配制：将乙腈和超纯水按照 75：25 的比例配成流动相，可取 600mL 乙腈和 200mL 超纯水混合，混匀。
- 3、将配好的流动相超声 30 分钟，以脱去溶剂中的气泡，防止堵塞色谱柱。

棉籽糖的提取：

组织的处理：取 0.2 g 组织，加入 1.0 mL 试剂一，冰浴匀浆，转移到 2mL 有盖离心管中，50 $^{\circ}$ C 超声 40min，8000g 离心 10 min，取上层液体至 1.5mL 离心管中，氮气吹干，加入 0.2 mL 水，涡旋震荡溶解，用针头式过滤器过滤后待测。

标准品的配制：

在试剂五中加入 1mL 超纯水，配成 1 mg/mL 母液，将母液用超纯水分别稀释成 500 μ g/mL、400 μ g/mL、300 μ g/mL 和 200 μ g/mL 的棉籽糖标准品溶液。针头式过滤器过滤后待测。

棉籽糖含量测定操作步骤：

1. 开启电脑、检测器和泵，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量 25 μ L，流速 1.2 mL/min，柱温 35 $^{\circ}$ C，保留时间 24 min，设置完毕保存方法组。
2. 用流动相过柱子，待基线稳定后开始加样。
3. 加入标准品 25 μ L，在 30min 内可分离棉籽糖，棉籽糖的保留时间在 24 min 左右（柱子不同，保留时间有差异），计算不同浓度的棉籽糖标准品的峰面积。

4. 加入样品 25 μL ，在相应保留时间处检测棉籽糖的峰面积。

棉籽糖含量的计算：

以标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标，峰面积为纵坐标计算棉籽糖标准曲线。将样品峰面积代入标准曲线，计算样品棉籽糖含量。

注意事项：

- 1、若样品含水量较高，可适当提高样品量，并降低试剂一的用量。如样品为果肉，可以称取 0.5 g 样品，加入 0.7 mL 试剂一进行匀浆操作。
- 2、为了避免使用过程中柱压过大，流速由小到大调节。
- 3、使用完毕时，用 100% 的异丙醇洗色谱柱 30min。
- 4、标准品的稀释倍数要根据样品中棉籽糖浓度确定，样品中棉籽糖的峰面积必须落在不同浓度的棉籽糖标准品的峰面积之内，该标准品稀释倍数只是一个参考。