

植物花色苷含量试剂盒说明书

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：

花色苷是一类易溶于极性溶剂的天然色素，属黄酮类化合物。花色苷广泛存在于植物的根、茎、叶、花和果实中，使其呈现由红到紫等不同颜色，是植物主要的呈色物质。

测定原理：

采用 pH 示差法测定花色苷含量，当 pH 为 1.0 时花色苷在 530nm 处有最大吸收峰，而当 pH 为 4.5 时，花色苷转变为无色查尔酮形式，在 530 处无吸收峰，利用此特性分别测定在不同 pH 下的 530nm 和 700nm 处的吸光度值。pH 示差法减少了溶液 pH 和溶剂差异的影响，排除了其他非花色苷类物质对检测结果的干扰。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 20 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：液体 20 mL×1 瓶，4℃ 保存；

花色苷的提取：

按照烘干样品质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 烘干样品，加入 1mL 提取液），充分匀浆后转移到 EP 管中，提取液定容至 1 mL，盖紧后 4℃ 浸提 24 h，8000 g，常温离心 10 min，取上清液待测。

测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上；试剂一和试剂二 25℃（室温）预热 10min 以上；
- 2、取 20 μL 上清液和 180 μL 试剂一（相当于稀释 10 倍），40℃ 水浴 20min，分别测定 530nm 和 700nm 处的吸光值，分别记为 A1 和 A2。
- 3、取 20 μL 上清液和 180 μL 试剂二（相当于稀释 10 倍），40℃ 水浴 20min，分别测定 530nm 和 700nm 处的吸光值，分别记为 A3 和 A4。
- 4、计算 $\Delta A = (A1 - A2) - (A3 - A4)$

注意：如果 A1 大于 1，可以适当加大稀释倍数，保证总体积 200 μL 不变，如 10 μL 上清液和 190 μL 试剂一（相当于稀释 20 倍）；如果 A1 小于 0.1，可以适当缩小稀释倍数，保证总体积不变，如 100 μL 上清液和 100 μL 试剂一（相当于稀释 2 倍），使 A1 保持在 0.1~1 范围内，可提高检测灵敏度；同样调整上清液和试剂二体积比例；计算时以实际稀释倍数代入下述公式中。

花色苷含量计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

花色苷含量 (μg/g 干重) = $[\Delta A \times V \div (\epsilon \times d) \times M \times F \times 10^6] \div W = 16.7 \times \Delta A \times F \div W$

V：提取液体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：花色苷的摩尔消光系数， 2.69×10^4 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；M：花色苷的相对分子质量：449.2g/mol；F：稀释倍数； 10^6 ： $1g = 10^6 \mu g$ ；W：样本干重：g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

花色苷含量 (μg/g 干重) = $[\Delta A \times V \div (\epsilon \times d) \times M \times F \times 10^6] \div W = 33.4 \times \Delta A \times F \div W$

V：提取液体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：花色苷的摩尔消光系数， 2.69×10^4 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；M：花色苷的相对分子质量：449.2g/mol；F：稀释倍数； 10^6 ： $1g = 10^6 \mu g$ ；W：样本干重：g。

ΔA 线性范围为 0.005-0.5。

上海抚生实业有限公司
<http://www.affandi-e.com>