

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

植物总黄酮含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60%乙醇，自备	常温保存	-
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	-
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	10mg/mL 单宁酸标准溶液。

产品说明：

总黄酮是一类多苯化合物，属于植物次生代谢物，对人体具有消炎，抗菌，降血脂，清除体内羟自由基，预防癌症等作用。

在碱性亚硝酸盐溶液中，总黄酮与铝离子形成在 470nm 处有特征吸收峰的红色络合物，测定样品提取液在 470nm 处的吸光值，即可计算样品总黄酮含量。

自备实验用品及仪器：

天平、烘箱、粉碎仪、筛子、超声破碎仪、60%乙醇、离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

操作步骤：

一、总黄酮提取

将样本烘干至恒重，粉碎，过 40 目筛之后，称取约 0.1g，加入 1mL 提取液，用超声提取法进行提取，超声功率 300W，破碎 5s，间歇 8s，60℃，提取 30min。12000rpm，25℃，离心 10min，取上清，用提取液定容至 1mL，待测。

二、标准溶液准备

将 10mg/mL 单宁酸标准溶液进行二倍稀释至 1.25、0.625、0.3125、0.156、0.078、0.039、0.02、0.01、0.005mg/mL 备用。

三、测定操作表

1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 470nm，蒸馏水调零。

2、操作表

	对照管	测定管	标准管	空白管
样本待测液 (mL)	0.2	0.2		
标准溶液 (mL)			0.2	
蒸馏水 (mL)				0.2
试剂一 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀，室温静置 5min				
试剂二 (mL)		0.05	0.05	0.05
混匀，室温静置 5min				
试剂三 (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4
60%乙醇 (mL)	0.35	0.3	0.3	0.3
混匀，37°C水浴 45 min，10000g，10min 离心取上清，对照管调零，1mL 玻璃比色皿，				
测定 A_{470} ，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A' = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。				

四、总黄酮含量计算

1、标准曲线绘制

以单宁酸浓度为横坐标， $\Delta A'$ 为纵坐标绘制标准曲线 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程求得 x ；

2、按样本鲜重计算

$$\text{总黄酮含量 (mg/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

3、按样本蛋白浓度计算

$$\text{总黄酮含量 (mg/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

$V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积；1mL； W ：样本鲜重，g； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL。

注意事项：

1、OD 值大于 0.5，样品适当稀释再测定，注意计算公式里乘以稀释倍数。

2、显色完成后立即测定，2 小时后吸光值会下降。