

植物总花青素（总花色苷）含量

<编号：AP-W96-N(1720) 微量法 100 管/96 样>

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

花青素是一种广泛存在于自然界植物中的水溶性天然色素，但是在自然状态下常与各种单糖形成糖苷形式存在，即花色苷。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。

自备仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵和蒸馏水。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏
提取液	液体 100mL	x1	4℃
试剂一	液体 20mL	x1	4℃
试剂二	液体 20mL	x1	4℃

样品提取（按照步骤依次操作）：

一、组织样本

- 1、按照样本质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液），充分匀浆后转移到 EP 管中，提取液定容至 1mL；
- 2、然后盖紧后 60℃浸提 30min，期间可震荡数次；
- 3、12,000rpm，常温离心 10min，取上清液待测。

二、液体样本：

- 1、澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

实验准备:

- 1、酶标仪预热 30min 以上;
- 2、试剂一和试剂二 25°C (室温) 预热 10min 以上;

测定操作:

- 1、在 96 孔板中依次操作

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	20	20
试剂一	180	-
试剂二	-	180
40°C避光放置 20min, 分别测定 530nm 和 700nm 处的吸光值, 记为 A1 和 A2。ΔA=测定管(A1-A2)-对照管(A1-A2)		

注意: (20uL 上清液+180uL) 相当于稀释 10 倍;

- 1、如果 $A1 > 1$, 可以适当加大稀释倍数, 保证总体积 200μL 不变, 如 10μL 上清液和 190μL 试剂一 (相当于稀释 20 倍);
- 2、如果 $A1 < 0.1$, 可以适当缩小稀释倍数, 保证总体积 200μL 不变, 如 100μL 上清液和 100μL 试剂一 (相当于稀释 2 倍),
- 3、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。

结果计算：

(1) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{花色苷含量 } (\mu\text{g/g 鲜重}) &= [\Delta A \times V \div (\epsilon \times d) \times M \times F \times 10^6] \div W \\ &= 33.4 \times \Delta A \times F \div W\end{aligned}$$

(2) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{花色苷含量 } (\mu\text{g/mL}) &= [\Delta A \times V \div (\epsilon \times d) \times M \times F \times 10^6] \\ &= 33.4 \times \Delta A \times F\end{aligned}$$

V: 提取液体积, 1×10^{-3} L;

10^6 : $1\text{g} = 10^6 \mu\text{g}$;

d: 96 孔板光径, 0.5cm;

W: 样本重量: g。

F: 稀释倍数;

M: 花色苷的相对分子质量: 449.2g/mol;

ϵ : 花色苷的摩尔消光系数, $2.69 \times 10^4 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

注意: ΔA 线性范围为 0.005-0.5。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。