

## 总黄酮 (Flavonoid) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-KY007-96 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

总黄酮, 即黄酮类化合物; 是植物重要的一类次生代谢产物, 具有有较强的抗氧化活性, 可捕捉活性氧自由基, 降低氧化伤害, 在果实中影响其色泽和风味; 对植物的抗逆性和抗病虫害方面有重要作用。

本试剂盒采用  $\text{NaNO}_2$  -  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  -  $\text{NaOH}$  显色法测定黄酮总含量, 即在碱性亚硝酸盐溶液中, 黄酮类化合物与铝离子形成在 510nm 处有特征吸收峰的红色络合物, 测定反应产物在 510nm 处的吸光值, 即可计算样品中总黄酮含量。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 1.6mL×1 支	4°C保存	
试剂二	液体 3mL×1 支	4°C保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、粉碎仪、筛子、60%乙醇、离心机、蒸馏水。

### 四、总黄酮测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 新鲜样本(若水分充足, 可增加样本取样质量); 或者称取约 0.03g 烘干样本(将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40-60 目筛, 得到烘干样本), 加入 1.5mL 的 60%乙醇(若鲜样需研磨均质), 60°C 振荡提取 2h(若蒸发用 60%乙醇定容至 1.5mL), 25°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清待测。

**【注】:** 若样本量较少, 可同比例缩减样本量, 如取 0.02g 干样, 加入 1mL 60%乙醇, 60°C 振荡提取 2h, 25°C×12000rpm, 离心 10min, 取上清, 用 60%乙醇定容至 1mL 待测。

② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min, 调节波长至 510nm。

② 可先选取两个样本进行预测定, 若 A 测定值超过 1.5, 可对上清液或液体样本用 60%乙醇进行稀释, 确定适合本批样本的稀释倍数 D, 相应的稀释倍数 D 需代入公式计算。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
样本	50	
蒸馏水		50
试剂一	15	15
混匀, 25°C 静置 6min		
试剂二	30	30

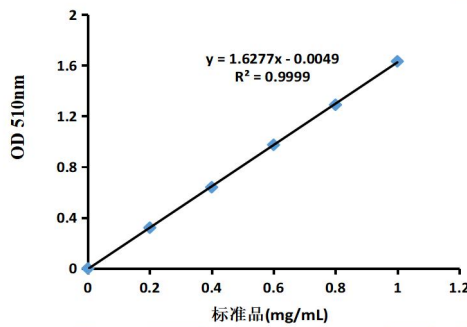
混匀，25°C后静置 6min		
试剂三	105	105
混匀，25°C 静置 15 min，测定 510nm 处吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$		

【注】：1. 若待检测样本有强背景色（如粉色，红色等），需做一个样本自身对照：即试剂二用 30 $\mu$ L 蒸馏水替换，其他步骤同测定管， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

2. 若 $\Delta A$  在零附近，可通过增加样本取样质量 W，则改变后的 W 代入公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.6277x - 0.0049$ ，x 是标准品浓度（mg/mL），y 是 $\Delta A$ 。



2、按照样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{总黄酮含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0049) \div 1.6277 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.6 \times (\Delta A + 0.0049) \div W \times V \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{总黄酮含量(mg/mL)} &= [(\Delta A + 0.0049) \div 1.6277 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.6 \times (\Delta A + 0.0049) \times D \end{aligned}$$

V---提取液体积，1.5mL；

V1---反应中样品体积，50 $\mu$ L=0.05ml；

W---样品质量，g。

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：称取 2mg 标准品至一新 EP 管，再加 2mL 的 60%乙醇提取液混匀溶解，即 1mg/mL 标准品，备用。
- 2 把母液用 60%乙醇稀释成五个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。