总花青素（总花色苷）含量试剂盒说明书

（货号：G0126W 微板法 96 样 ）

一、产品简介：

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。它是植物细胞中可见的植物水溶性色素，存在于几乎所有的陆地植物的根、茎、叶、花及果实中；且还具有较强的抗氧化活性，能够清除自由基。

本试剂盒采用 PH 示差法，花色苷的颜色随 PH 值的改变而发生变化，而干扰物质的特征光谱不随 PH 的改变而变化。pH 为 1 时，花色苷以红色的 2-苯基苯并吡喃的形式存在。pH 为 4.5 时，花色苷以无色的甲醇假碱形式存在，通过确定两个对花色苷吸光度差别最大，但是对花色苷稳定的 pH 值(一般选 pH 值为 1.0 和 4.5)，花色苷溶液的吸光度差值与花色苷的含量成比例，进而计算得出花色苷总量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、总花青素含量的测定：

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：**

称约 0.05g 样品(水分充足的样本，可取样 0.5g)，加入 1mL 提取液研磨匀浆，75℃震荡提取 25min，若提取过程中提取液有损失，最后可用提取液定容至 1mL 后，室温 12000rpm，离心 10 min，上清液待测。

【注】：若是固体干样本，先磨碎并过 40 目筛后，取 0.02g 的过筛后干样，加入 1 mL 提取液，其他步骤同上。最后离心得到的上清液待测。

② **液体样本：**

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。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上，对于含量较高的样本，可先选取 2 个样本做预测定，找出适合本次检测样本的稀释倍数 D（用提取液进行稀释即可）。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂一	300	
试剂二		300
室温避光平衡 60min，分别取 200μL 澄清液体（若浑浊可 12000rpm 室温离心 5min）至 96 孔板中，于 530nm 和 700nm 处读值。测定管记作 $A_{测定}=A_{530}-A_{700}$；对照管记作 $A_{对照}=A_{530}-A_{700}$；$\triangle A=A_{测定}-A_{对照}$(每个样本需做一个自身对照)。		

【注】：1.若A测定管于530nm处的值大于1.5，则上清液可用提取液进行稀释，稀释后的上清液

再按照上述加样表操作。稀释倍数D需代入计算公式计算。

2.若△A值小于0.01，可增加样本取样质量W,则改变后的W需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、 按照样本质量计算：

总花青素含量(mg/g)=(ΔA÷(ε×d)×V2×10^3×Mr)÷(W×V1÷V)×D

=0.1336×ΔA÷W×D

2、 按照样本浓度计算：

总花青素浓度(mg/mL)=(ΔA÷(ε×d)×V2×10^3×Mr)÷V1×D

=0.1336×ΔA×D

ε---为矢车菊-3-葡萄糖苷消光系数，26900 L/mol/cm；

Mr---为矢车菊素-3-葡萄糖苷分子量，449.2；

d---光程，0.5 cm；　　D---稀释倍数，未稀释即为 1；

V---样本提取液，1mL；　　W---样本重量，g；

V1---检测操作表里上清液加样体积，100μL=0.1mL；

V2---检测总体积，400μL=4×10^{-4}L；