总花青素(总花色苷)含量试剂盒说明书

(分光法48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(一般选择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50mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、 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1mL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可见分光光度计预热30min 以上，用蒸馏水调零。

②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)。

③在EP管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液	200	200
试剂一	600	
试剂二		600
室温避光平衡60min,分别取全部澄清液体(若浑浊可12000rpm室温离心5min)至1mL玻璃比色皿(光径1cm)中，于530nm和700nm处读值。测定管记作A测定=A530-A700;对照管记作A对照=A530-A700;△A=A测定一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)=(△A÷(ε×d)×V2×10³×Mr)÷(W×V1÷V)×D

=0.0668×△A÷W×D

2、 按照样本浓度计算：

总花青素浓度(mg/mL)=(△A÷(e×d)×V2×10³×Mr)÷V1×D

=0.0668×△A×D

E--- 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，1cm; 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，200μL=0.2mL;

V2--- 检测总体积，800μL=8×10^{-4}L;