

## 原花青素（Proantho Cyanidins, PC）试剂盒说明书

### (分光法 24 样)

#### 一、产品简介：

原花青素（Proantho Cyanidins, PC）广泛存在于植物的果实、种子、花和皮中的一种黄酮类化合物，具有极强的抗氧化性、清除自由基能力。最简单的原花青素是儿茶素、或表儿茶素、或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体本。本试剂盒提供一种灵敏度更高的检测方法：硫酸-香草醛法；即在硫酸提供的酸性条件下，植物原花青素 A 环上的间苯二酚和间苯三酚与香草醛发生缩合反应，产生有色化合物，在 500nm 处有特征吸收峰，测定 500nm 光吸收值可计算原花青素的含量。

#### 二、试剂盒组分与配制：

| 试剂名称 | 规格             | 保存要求 | 备注  |
|------|----------------|------|---|
| 提取液  | 60%乙醇×60mL（自备） | 4℃保存 | 乙醇（mL）：水（mL）=36:24                        |
| 试剂一  | 30%硫酸×25mL（自备） | 4℃保存 | 甲醇(mL)：硫酸(mL)= 17.5:7.5<br>(先加甲醇，后缓缓加入硫酸) |
| 试剂二  | 粉剂×1 瓶         | 4℃保存 | 用前加 12mL 甲醇溶解                             |
| 标准品  | 粉剂×1 支         | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂                             |

#### 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）、天平、离心机、蒸馏水、无水乙醇、硫酸和甲醇。

#### 四、植物原花青素含量测定：

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：

称约 0.1g 样本（水分充足的样本可取 0.5g），加入 2mL 提取液，冰浴匀浆，用超声提取法进行提取，超声功率 300W，提取 30min，12000rpm，25℃离心 10min，取上清，用提取液定容至 2mL 待测。

【注】：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

##### 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 500nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

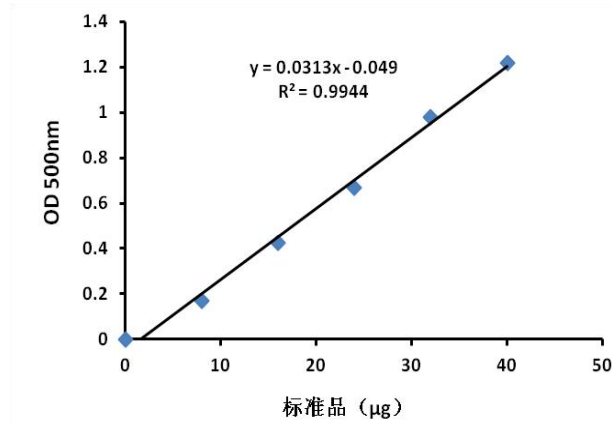
| 试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）   | 测定管 | 对照管 |
|---|-----|-----|
| 样本  | 80  | 80  |
| 试剂一   | 400 | 400 |
| 甲醇  |     | 400 |
| 试剂二   | 400 |     |
| 混匀，放在 30℃ 恒温培养箱孵育 20min 后，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 500nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

【注】1. A 值正常范围在 0.01-0.6 之间。否则加大样品取样质量 W 或增加 V1（如增至 160 $\mu\text{L}$ ，则试剂一相应减少，保持总体积不变）或用提取液

稀释样品，则改变后的 W、V1 和稀释倍数 D 代入公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：  $y = 0.0313x - 0.049$ ； x 是标准品质量：  $\mu\text{g}$ ， y 是  $\Delta A$ 。



2、原花青素含量(mg/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.049) \div 0.0313] \div (V1 \div V \times W) \times 10^{-3} \times D$   
 $= 0.799 \times (\Delta A + 0.049) \div W \times D$

V---加入提取液体积，2mL；      V1---反应中样品体积，0.08mL；  
 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）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 提取液（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。