

总黄酮（Flavonoid）试剂盒说明书

(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 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - 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℃保存	
试剂二	液体 3mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×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：

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℃下杀青 3min，然后 60℃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℃振荡提取 2h（若蒸发用 60%乙醇定容至 1.5mL），25℃×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 1mL60%乙醇，60℃振荡提取 2h。25℃×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：

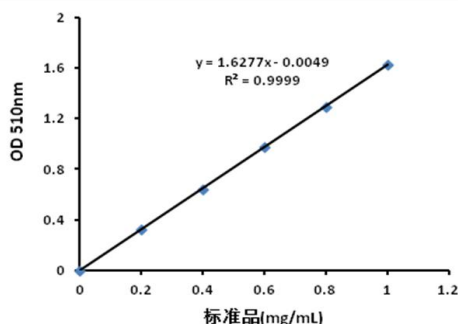
试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（只做一次）
样本	50	
蒸馏水		50
试剂一	15	15
混匀，25℃静置 6min		

试剂二	30	30
混匀，25℃后静置 6min		
试剂三	105	105
混匀，25℃ 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 μ 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 ΔA 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 ΔA 。



- 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 μ 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。