

原花青素 (Proantho Cyanidins, PC) 试剂盒说明书

(微板法 48 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。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×100mL (自备)	4℃保存	乙醇 (mL) : 水 (mL) =60:40
试剂一	30%硫酸×15mL (自备)	4℃保存	甲醇(mL) : 硫酸(mL) =10.5:4.5 (先加甲醇, 后缓缓加入硫酸)
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	用前加 6mL 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：

酶标仪、96 孔板、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】：若增加样本量，可按照组织质量 (g) : 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min，调节波长至 500nm。

② 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

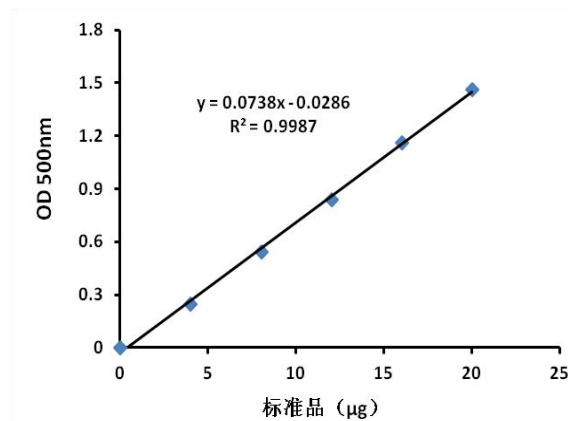
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	100	100
甲醇		100
试剂二	100	
混匀，放在 30℃ 恒温培养箱孵育 20min 后，在 500nm 处测定， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】 1. 96 孔板盖上盖子或者缠上保鲜膜或者锡纸（防止水份散失）。

2. 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 160μL, 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： $y = 0.0738x - 0.0286$ ，x 是标准品质量： μg ，y 是 ΔA 。



2、原花青素含量(mg/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0286) \div 0.0738$] $\div (V1 \div V \times W) \times 10^{-3} \times D$
 $= 1.36 \times (\Delta A + 0.0286) \div W \times D$

V---加入提取液体积，2mL；

V1---反应中样品体积，0.02mL；

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, 0.2, 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 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。