

# 总黄酮含量测试试剂盒

(C002-96T 分光光度计法)

## 一、测定原理

黄酮中处于相邻位的羰基、羟基可以共同络合金属而显色。在中性或弱碱性及亚硝酸钠存在条件下，黄酮类化合物与铝盐生成螯合物，加入碱溶液后显红橙色，在 510nm 处有最大吸收峰。芦丁是公认的黄酮类化合物，常被用作标准品。

## 二、试剂组成

试剂一：无色液体 50mL ×1 瓶

试剂二：无色液体 50mL ×1 瓶

试剂三：显色液 200mL ×1 瓶

试剂四：200 $\mu$ g/mL 芦丁标准溶液 15mL×1 瓶

## 三、储存条件及有效期

-20 $^{\circ}$ C 保存，可保存 6 个月。

## 四、试剂的配制

试剂四应用液：

取 10mL 试剂四，加入 10mL 双蒸水，稀释至 20mL，得到 100 $\mu$ g/mL 的芦丁标准液，分别采用移液管移取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 试剂四于空试管中，加入 4.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0mL 双蒸水，得到 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g/mL 芦丁标准液。

## 五、操作步骤

	标准管 <sup>1</sup>	测定管	空白管 <sup>2</sup>
试剂一应用液 (mL)	0.5	0.5	
样品溶液 (mL)		2	2
试剂四应用液 (mL)	2		

充分混匀，室温静置 6min。

试剂二 (mL)	0.5	0.5	
双蒸水 (mL)			1

充分混匀，室温静置 6min。

试剂三 (mL) <sup>3</sup>	2	2	2
-----------------------	---	---	---

充分混匀，室温静置 15min，以试剂空白调零，分光光度计 510nm 处测吸光值。

<sup>1</sup>必须做标准管，以绘制标准曲线；

<sup>2</sup>一般样品建议做空白管，以消除误差；

<sup>3</sup>试剂三有腐蚀性，请务必戴手套操作，如不慎接触皮肤，参照碱烧伤的方法用流水冲洗，如有条件可用硼酸处理。

## 六、计算方法

### 1. 绘制标准曲线

以芦丁应用液浓度 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  为横坐标，以分光光度计测得的吸光值为纵坐标，在坐标纸上或利用 EXCEL 绘制标准曲线。

### 2. 计算样品浓度

对于坐标纸上绘制的标准曲线，请直接根据坐标求得样品浓度。

对于采用 EXCEL 计算的，根据方程求得样品浓度。

样品浓度表示为  $\mu\text{g}/\text{mL}$  总黄酮，也可根据测试溶液浓度计算出样品粉末中含量，表示为  $\text{mg}/\text{g}$ 。

## 七、注意事项

1. 试剂可能会有沉淀，请放置至室温或 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴后摇匀使用；
2. 试剂四（芦丁）溶解度随温度变化较大，如有沉淀，请 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴一段时间后使用。

## 八、应用举例

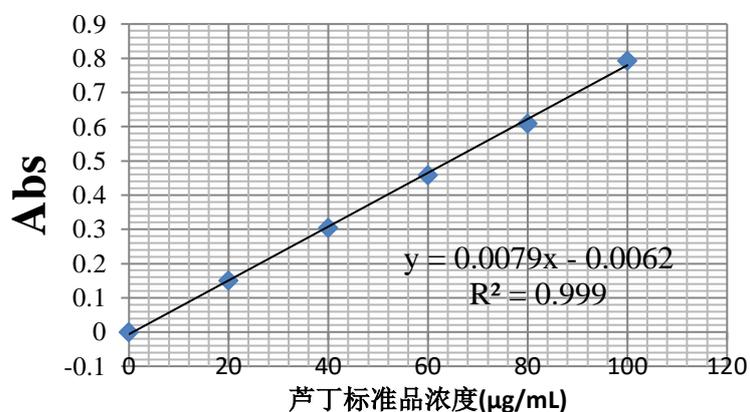
小明提取得到了一种中草药的粗提物，并将其冻干得到粉末，配制成 5 $\text{mg}/\text{mL}$  的溶液，分析其总黄酮含量。

小明预估自己的样品中黄酮含量较高，于是将样品 10 $\times$ ，100 $\times$ ，500 $\times$  稀释，分别得到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样品，并标记为 1, 2, 3 号样品。然后小明按照说明书提示进行总多酚含量的测试，测试结果如下：

样品名称	样品浓度	吸光值			
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值
标准品	0	0	0	0	0
	20	0.155	0.158	0.161	0.158
	40	0.311	0.312	0.311	0.311
	60	0.465	0.464	0.468	0.466
	80	0.619	0.616	0.616	0.617
	100	0.798	0.800	0.803	0.800
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值

样品 3		0.007	0.013	0.010	0.010
样品 2		0.022	0.024	0.026	0.024
样品 1		0.286	0.285	0.283	0.285

小明根据标准品测试结果，采用 EXCEL 作图，得到标准曲线如下：



计算出的相关系数  $> 0.999$ ，小明认为该标准曲线可用。于是小明利用该标准曲线计算自己样品的多酚浓度，得到结果如下：

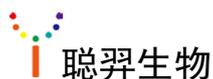
样品 3: 2.051 µg/mL

样品 2: 3.823 µg/mL

样品 1: 36.861 µg/mL

样品 1、2、3 的平均吸光值均在标准曲线线性范围内，但样品 1 吸光值趋近于 0，数值过小而 CV 偏大，不可信。样品 2、3 的浓度差异约为 10 倍，认为其浓度是可信的，但相比较而言，样品 2 的吸光值偏小，误差相对较大，因此小明决定采用样品 3 的数据计算样品的总黄酮的含量。

即：500 µg/mL 中草药粗提物样品中，黄酮含量为 36.861 µg/mL 等价没食子酸，经换算，小明得知，该中草药粗提物冻干样中总黄酮含量为： $36.861 \div 500 \times 1000 \text{ mg/g} = 73.722 \text{ mg/g}$ 。



上海琮益科技有限公司

官方网站: [www.congyibio.com](http://www.congyibio.com)

技术支持: [info@congyi-tech.com](mailto:info@congyi-tech.com)



图形及“聪羿生物®”均为上海琮益科技有限公司注册商标。