

总黄酮含量测试试剂盒

(C002-96T 酶标板法)

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 2.5mL ×1 瓶

试剂二：无色液体 2.5mL ×1 瓶

试剂三：显色液 10mL ×1 瓶

试剂四：200 μ g/mL 芦丁标准溶液 1mL×1 瓶

三、储存条件及有效期

试剂一、试剂二、试剂三 4 $^{\circ}$ C 保存，试剂四-20 $^{\circ}$ C 保存，可保存 3 个月。

四、试剂的配制

试剂四应用液：

移取 500 μ L 试剂四，加入 500 μ L 双蒸水，充分混匀，得到 1000 μ L 浓度为 100 μ g/mL 的芦丁标准液，分别移取 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ L 于酶标板中，加入 100, 80, 60, 40, 20, 0 μ L 双蒸水，得到 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL 芦丁标准液（试剂四应用液）。

五、操作步骤

	标准孔 ¹	测定孔	空白孔 ²
试剂一 (μ L)	25	25	
样品溶液 (μ L)		100	100
试剂四应用液 (μ L)	100		

充分混匀，室温静置 6min。

试剂二 (μ L)	25	25	
双蒸水 (μ L)			50

充分混匀，室温静置 6min。

试剂三 (μ L) ³	100	100	100
-----------------------------	-----	-----	-----

充分混匀，室温静置 15min，酶标仪 510nm 处测吸光值。

¹必须做标准孔，以绘制标准曲线；

²一般样品建议做空白孔，以消除误差；

³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，以酶标仪测得的吸光值差（测试-空白）为纵坐标，在坐标纸上或利用 EXCEL 绘制标准曲线，通过 EXCEL 计算的可得到一个一元一次方程。

2. 计算样品浓度

以样品对于采用 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 mg/g 。

七、注意事项

1. 试剂可能会有沉淀，请放置至室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热后摇匀使用；
2. 酶标板不易摇匀，建议在漩涡振摇仪上充分震荡（以不溅出为宜）。

八、应用举例

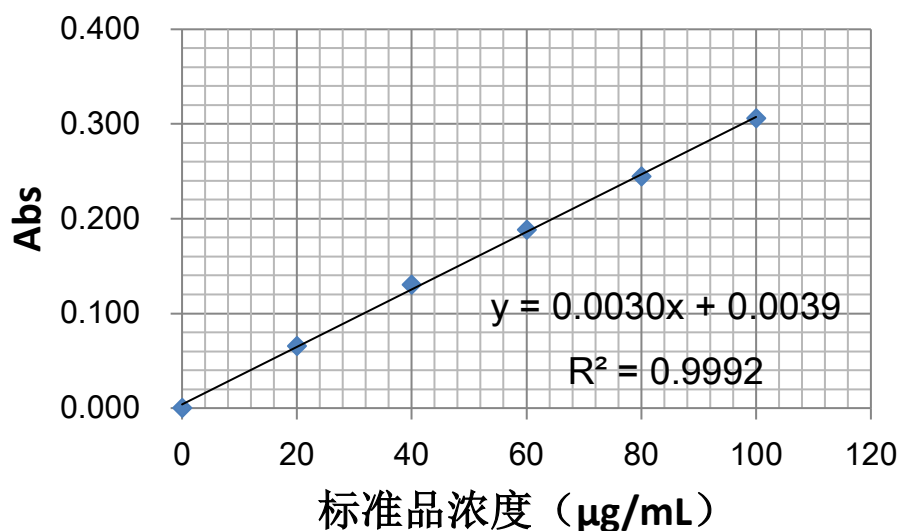
小明提取得到了一种中草药的粗提物，并将其冻干得到粉末，配制成 5 mg/mL 的溶液，分析其总黄酮含量。

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黄酮含量的测试，测试结果如下：

样品名称	样品浓度	吸光值			
		测试 1	测试 2	空白	重复-空白
标准品	0	0.0320	0.0320	0.0320	0.0000
	20	0.0960	0.0970	0.0310	0.0660
	40	0.1630	0.1610	0.0320	0.1300
	60	0.2170	0.2230	0.0320	0.1880
	80	0.2780	0.2730	0.0310	0.2450
	100	0.3390	0.3370	0.0320	0.3060

样品 3		0.0530	0.0560	0.040	0.015
样品 2		0.0630	0.0630	0.042	0.021
样品 1		0.2760	0.2780	0.050	0.227

小明根据标准品测试结果，采用 EXCEL 作图，得到标准曲线如下：

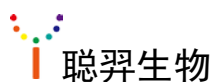


计算出的相关系数 > 0.999 ，小明认为该标准曲线可用。于是小明利用该标准曲线计算自己样品的黄酮浓度，得到结果如下：

样品 3: $3.7000\mu\text{g/mL}$; 样品 2: $5.7000\mu\text{g/mL}$; 样品 1: $74.3667\mu\text{g/mL}$

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 3 数值过小而 CV 偏大，不可信。样品 1、2 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 1 的数据计算样品的总黄酮的含量。

即： $500\mu\text{g/mL}$ 中草药粗提物样品中，黄酮含量为 $74.3667\mu\text{g/mL}$ 等价芦丁，经换算，小明得知，该中草药粗提物冻干样中黄酮含量为： $74.3667 \div 500 \times 1000\text{mg/g} = 148.73\text{ mg/g}$ 。



上海琮益科技有限公司

官方网站：www.congyibio.com

技术支持：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。