

植物类胡萝卜素含量检测试剂盒说明书

微量法

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体×1 瓶 (自备)	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

提取液: 自备 80%丙酮, 将丙酮:蒸馏水 (V:V) =4:1 混合待用, 提供一个 125mL 空瓶。

产品简介:

类胡萝卜素(carotenoid)是一类重要的天然色素的总称, 普遍存在于动物、高等植物、真菌、藻类的黄色、橙红色或红色的色素之中。类胡萝卜素是体内维生素 A 的前体, 同时还具有抗氧化、免疫调节、抗癌、减轻心血管疾病及着色剂等作用。

植物的类胡萝卜素存在于各种黄色质体或有色质体内; 如黄叶, 黄色花卉, 黄色和红色的果实和黄色块根等组织, 样本通过溶剂萃取, 分离提取类胡萝卜素, 在 $440\pm 10\text{nm}$ 处有特殊吸收峰。

大部分高等植物和藻类微生物的叶绿体内也含有类胡萝卜素, 类胡萝卜素主要吸收蓝紫光, 而叶绿素 a 和叶绿素 b 既吸收红光又可吸收蓝紫光。所以针对含叶绿体的组织, 为排除叶绿素 a 和叶绿素 b 对类胡萝卜素的干扰, 根据经验公式先计算出叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量, 再进一步得出类胡萝卜素的含量; 针对不含叶绿素的组织可以直接根据类胡萝卜素的经验消光系数进行计算。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板 (非聚苯乙烯材质)、天平、可调式移液枪、研钵/匀浆器、10 mL 离心管/试管、蒸馏水和丙酮。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、新鲜植物叶片 (去掉中脉) 或其他组织用蒸馏水洗干净, 然后吸干表面水分, 称取约 0.1g, 剪碎放入研钵或匀浆器中。

2、加入 1mL 蒸馏水, 少量试剂一 (约 10mg), 在黑暗或弱光条件下充分研磨, 转入 10mL 离心管或试管中。

3、用提取液冲洗研钵或匀浆器, 将所有冲洗液转入 10mL 离心管或试管中, 用提取液定容至 10mL, 置于黑暗条件或者包上锡箔纸浸提 3h (期间可以颠倒混合 2 次), 观察底部组织残渣接近于白色则提取完全, 若组织残渣未完全变白, 继续浸提至组织残渣颜色接近于白色。

二、测定步骤

A、黄色或其他非绿色组织（不含叶绿体）类胡萝卜素含量测定步骤：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 440nm，分光光度计用提取液调零。
- 2、样本检测（微量玻璃比色皿检测不用测空白管，用 96 孔板检测空白管只需检测 1-2 次）

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管
样本		200
提取液	200	
用分光光度计检测：于微量玻璃比色皿快速测定 440nm 处测定管吸光值，记为 A_{440} 。 用酶标仪检测：于 96 孔板，快速测定 440nm 处吸光值，分别记为 A_{440} 空白管、 A_{440} 测定管， $\Delta A_{440} = A_{440}$ 测定管 - A_{440} 空白管。		

B、新鲜植物叶片或其他绿色组织（含叶绿体）类胡萝卜素含量测定步骤：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节多波长至 470nm、646nm 和 663nm，分光光度计用提取液调零。
- 2、样本检测（微量玻璃比色皿检测不用测空白管，用 96 孔板检测空白管只需检测 1-2 次）

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管
样本		200
提取液	200	
用分光光度计检测：于微量玻璃比色皿快速测定 470nm、646nm 和 663nm 处测定管吸光值，分别记为 A_{470} 、 A_{646} 和 A_{663} 。 用酶标仪检测：于 96 孔板，快速测定 470nm、646nm 和 663nm 处吸光值，分别记为 A_{470} 空白管、 A_{470} 测定管、 A_{646} 空白管、 A_{646} 测定管、 A_{663} 空白管、 A_{663} 测定管， $\Delta A_{470} = A_{470}$ 测定管 - A_{470} 空白管、 $\Delta A_{646} = A_{646}$ 测定管 - A_{646} 空白管、 $\Delta A_{663} = A_{663}$ 测定管 - A_{663} 空白管。		

注意：若上层浸提液有残渣，可吸取 1mL 上层浸提液置于 1.5mL 棕色 EP 管，常温下 4000r/min 离心 5min，再取上清液检测；若使用聚苯乙烯材质的 96 孔板，请在加样后 5min 内尽快测定完成。

三、类胡萝卜素含量的计算

A、黄色或其他非绿色组织（不含叶绿体）类胡萝卜素含量的计算公式：

- 1、按微量玻璃比色皿计算

$$\text{类胡萝卜素含量 (mg/g 质量)} = A_{440} \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 样总} \times 1000 \div W \times F = 0.04 \times A_{440} \times F \div W$$

V 样总：提取液总体积，0.01L；1000：单位换算系数，1g=1000mg； ϵ ：类胡萝卜素经验消光系数，250L/g/cm；d 比色皿光径，1cm；F：稀释倍数；W：样本质量，g。

- 2、按 96 孔板计算

$$\text{类胡萝卜素含量 (mg/g 质量)} = A_{440} \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 样总} \times 1000 \div W \times F = 0.067 \times A_{440} \times F \div W$$

V 样总：提取液总体积，0.01L；1000：单位换算系数，1g=1000mg； ϵ ：类胡萝卜素经验消光系数，250L/g/cm；d 96 孔板光径，0.6cm；F：稀释倍数；W：样本质量，g。

B、新鲜植物叶片或其他绿色组织（含叶绿体）类胡萝卜素含量的计算公式：

- 1、按微量玻璃比色皿计算

$$C_a \text{ (mg/L)} = 12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}$$

$$C_b \text{ (mg/L)} = 20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}$$

$$\text{类胡萝卜素浓度: } C_c \text{ (mg/L)} = (1000 \times A_{470} - 3.27 \times C_a - 104 \times C_b) \div 229 = 4.367 \times A_{470} - 0.014 \times C_a - 0.454 \times C_b$$

类胡萝卜素含量 (mg/g 质量) = $C_c \times V_{\text{提取}} \div F \div W = 0.01 \times C_c \times F \div W$

V 提取: 提取液体积, 0.01L; F: 稀释倍数; W: 样本质量, g。

2、按 96 孔板计算:

$$C_a \text{ (mg/L)} = (12.21 \times \Delta A_{663} - 2.81 \times \Delta A_{646}) \div 0.6 = 20.35 \times \Delta A_{663} - 4.83 \times \Delta A_{646}$$

$$C_b \text{ (mg/L)} = (20.13 \times \Delta A_{646} - 5.03 \times \Delta A_{663}) \div 0.6 = 33.55 \times \Delta A_{646} - 8.38 \times \Delta A_{663}$$

$$\text{类胡萝卜素浓度: } C_c \text{ (mg/L)} = (1000 \times \Delta A_{470} \div 0.6 - 3.27 \times C_a - 104 \times C_b) \div 229 = 7.278 \times \Delta A_{470} - 0.014 \times C_a - 0.454 \times C_b$$

$$\text{类胡萝卜素含量 (mg/g 质量)} = C_c \times V_{\text{提取}} \div F \div W = 0.01 \times C_c \times F \div W$$

V 提取: 提取液体积, 0.01L; F: 稀释倍数; W: 样本质量, g; 0.6: 光径比例, 0.6cm (96 孔板光径): 1cm (比色皿光径)。

注意事项:

1. 若不确定组织中是否有叶绿素影响, 可取样本提取液采用分光光度计在波长 400-700nm 下进行扫描, 看波长 640-670nm 之间有无波峰, 有波峰则为有叶绿素, 反之则无。
2. 若使用聚苯乙烯材质的 96 孔板, 请在加样后 5min 内尽快测定完成。
3. 当 A 超过 1 时, 建议将样本用提取液稀释后再进行测定, 计算公式中乘以稀释倍数 F。
4. 为了避免色素见光分解, 操作时应尽量避光, 研磨或匀浆时应尽量缩短时间。
5. 提取液易挥发, 操作时做好防护措施。

实验实例:

1. 取 0.1g 黄花加入 1mL 蒸馏水、少量试剂一 (约 10mg), 在黑暗或弱光条件下充分研磨, 转入 10mL 离心管, 提取液冲洗研钵或匀浆器, 用提取液定容至 10mL, 置于黑暗条件或者包上锡箔纸浸提 3h (期间可以颠倒混合 2 次), 按照操作步骤 A, 用 96 孔板测得 $A_{440} = 0.202$, 计算含量得:
类胡萝卜素含量 (mg/g 质量) = $0.067 \times A_{440} \div W = 0.1052 \text{ mg/g 质量}$ 。
2. 取 0.1g 绿萝加入 1mL 蒸馏水、少量试剂一 (约 10mg), 在黑暗或弱光条件下充分研磨, 转入 10 mL 离心管, 提取液冲洗研钵或匀浆器, 用提取液定容至 10 mL, 置于黑暗条件或者包上锡箔纸浸提 3 h (期间可以颠倒混合 2 次), 按照操作步骤 B, 用 96 孔板测得 $A_{470} = 0.415$, $A_{646} = 0.189$, $A_{663} = 0.379$ 。 $C_a \text{ (mg/L)} = 20.35 \times 0.379 - 4.83 \times 0.189 = 6.1825 \text{ mg/L}$; $C_b \text{ (mg/L)} = 33.55 \times 0.189 - 8.38 \times 0.379 = 2.0868 \text{ mg/L}$; $C_c \text{ (mg/L)} = 7.278 \times \Delta A_{470} - 0.014 \times C_a - 0.454 \times C_b = 1.6698 \text{ mg/L}$; 计算含量得:
类胡萝卜素含量 (mg/g 质量) = $C_c \times V_{\text{提取}} \div W = 0.01 \times C_c \div W = 0.167 \text{ mg/g 质量}$ 。