

## 单宁含量试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前取2-3个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

单宁是一类广泛存在于植物体内的多元酚化合物，又称植物多酚。具有独特的化学性质和多种生理活性，如能与蛋白质、生物碱、多糖结合；能与多种金属离子发生络合或静电作用；具有止血、抑制微生物、抗过敏、抗突变、抗肿瘤、抗衰老等生理活性。

### 测定原理：

单宁在碱性环境下与磷钼酸反应，生成蓝色化合物，在760nm处有最大吸收峰。

### 自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体4mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体3mL×1瓶，4℃保存；

单宁的提取：

按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL蒸馏水），充分匀浆后转移到EP管中，80℃水浴提取30min，8000 g，25℃离心10 min，取上清液待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至760nm处，蒸馏水调零；试剂一和试剂二37℃预热10min以上；

2、操作表：

试剂名称（ $\mu$ L）	对照管	测定管
样本		5
蒸馏水	135	130
试剂一	35	35

混匀，室温静置5min

试剂二	30	30
-----	----	----

单宁含量试剂盒说明书混匀，室温静置30min，760nm处读取吸光值A， $\Delta A=A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}}$ ，对照管只要做一管。

单宁含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.6418x + 0.0134$ ；x为标准品浓度（mg/mL），y为 $\Delta A(A_{\text{测定}}-A_{\text{对照}})$ 。

2、按样本鲜重计算：

单宁含量 (mg /g鲜重) =  $[(\Delta A - 0.0134) \div 1.6418 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 0.609 \times (\Delta A - 0.0134) \div W$ 。

3、按样本蛋白浓度计算：

单宁含量(mg/mg prot) =  $[(\Delta A - 0.0134) \div 1.6418 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 0.609 \times (\Delta A - 0.0134) \div Cpr$ 。

V1：加入样本体积，0.005mL； V2：加入提取液体积，1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本鲜重，g。

b.用96孔板测定的计算公式如下：

1、标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.8209x + 0.0134$ ； x为标准品浓度 (mg/mL) ， y为 $\Delta A$ (A测定-A对照)。

2、按样本鲜重计算：

单宁含量(mg/g鲜重) =  $[(\Delta A - 0.0134) \div 0.8209 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 1.218 \times (\Delta A - 0.0134) \div W$ 。

3、按样本蛋白浓度计算：

单宁含量(mg/mg prot) =  $[(\Delta A - 0.0134) \div 0.8209 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 1.218 \times (\Delta A - 0.0134) \div Cpr$ 。

V1：加入样本体积，0.005mL； V2：加入提取液体积，1mL； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本鲜重，g。

**注意：**

1、  $\Delta A$ 控制在0.02-0.5范围内，若 $\Delta A$ 大于0.5，将样本提取上清液用蒸馏水稀释10倍后检测，计算公式中乘以相应稀释倍数。

2、标准曲线线性范围为：0.025mg/mL-0.5mg/mL。