

单宁含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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。

需自备的仪器和用品：

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（ μL ） | 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 |
|-----|----|----|

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 ΔA (A 测定-A 对照)。

2、按样本鲜重计算：

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

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 ΔA (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、 ΔA 控制在 0.02-0.5 范围内，若 ΔA 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。