

货号：JC0106-S

规格：50T/48S

版本号：07/2021 (V1.0)



单宁含量试剂盒说明书

分光光度法

产品组份

产 品 编 号	数 量	体 积	保 存 条 件
试剂一	1 瓶	15 mL	4 ℃
试剂二	1 瓶	12 mL	4 ℃
标准品	单宁酸粉剂 1 支	10 mg	4 ℃
说明书	1 份	-	-

储存时间

本产品 4 ℃可保存 3 个月。

产品简介

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。

单宁在碱性环境下与磷钼酸反应，生成蓝色化合物，在 760 nm 处有最大吸收峰。

准备事项

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵和蒸馏水。

标曲的配制

- 1、10 mg/ml 单宁酸标准溶液：临用前向标准品中加入 1 mL 蒸馏水，配制成 10 mg/mL 的单宁酸标准溶液。
- 2、1 mg/ml 单宁酸标准溶液：精确吸取 10 mg/mL 单宁酸标准溶液 0.5 ml 加入 10 ml 离心管中，再加入 4.5 ml 的蒸馏水，混匀，配制成 1 mg/mL 的单宁酸标准溶液。
- 3、标准曲线的制作：

在各离心管中按下表分别加入 1mg/mL 单宁酸标准溶液和蒸馏水，混匀：

试剂	管号					
	1	2	3	4	5	6
1 mg/mL 单宁酸(mL)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
蒸馏水(mL)	0.975	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6
单宁酸浓度(mg/mL)	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4

实验步骤

一、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 0.1 g 组织，加入 1 mL 蒸馏水），充分匀浆后转移到 EP 管中，封口膜封口防止液体溅出，80℃水浴提取 30 min，8000 g，25℃离心 10 min，取上清液待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 760 nm，蒸馏水调零；试剂一和试剂二 37℃预热 10 min 以上。

2、操作表：

试剂名称（μL）	空白管	测定管	标准管
样本		25	
标准液			25

蒸馏水	675	650	650
试剂一	175	175	175

混匀，室温静置 5 min

试剂二	150	150	150
-----	-----	-----	-----

混匀，室温静置 30 min，760 nm 处读取吸光值 A，计算 $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ ，
 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ 。（空白管只需做 1-2 次）

单宁含量计算

- 1. 标准曲线的绘制：以不同浓度的单宁酸标准溶液为 x 轴， $\Delta A_{标准}$ 标准为 y 轴，绘制标准曲线 $y = kx + b$ 。
- 2. 单宁含量的计算：

将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到 x 值 (mg/mL)。

(1) 按样本鲜重计算：

$$\text{单宁含量(mg/g 鲜重)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{单宁含量(mg/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times Cpr) = x \div Cpr$$

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

实验实例：

1、取 0.1079 g 叶片鲜样加入 1 mL 蒸馏水，进行样本处理，稀释 10 倍后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白} = 0.147$ ，带入标曲 $y = 1.5944x + 0.0217$ ， $R^2 = 0.9936$ ，得出 $x = 0.0786$ ，按样本鲜重计算含量得：单宁含量(mg/g 鲜重) = $x \times V_{\text{提取}} \div W \times \text{稀释倍数}$ = $0.0786 \times 1 \div 0.1079 \times 10 = 7.28 \text{ mg/g 鲜重}$ 。

注意事项：

- 1、正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

2、 ΔA 控制在 0.05 - 0.7 范围内，若 ΔA 大于 0.7，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。

3、标准曲线线性范围为：0.025 mg/mL - 0.4 mg/mL。

