

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 单宁含量检测试剂盒说明书

### 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体100mL×2瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1瓶	常温保存	
标准品	粉剂×1支	4℃保存	10mg单宁酸，临用前加入1.175mL提取液溶解为5000nmol/mL的标准液。

产品说明：

单宁又称植物多酚，是一类广泛存在于植物体内的多元酚化合物。单宁可作为潜在的生物标记物；与蛋白质结合的能力又称为收敛性或涩性。其收敛性是多种生理活性的基础，如止血、抗肿瘤、抗衰老等生理活性，也是影响产品口感的因素之一。

根据光谱特性，单宁在275nm下有较强的紫外吸收，通过利用活性炭能够特异吸附单宁的性质来检测单宁含量。

自备实验用品及仪器：

紫外分光光度计/酶标仪、离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔UV板和蒸馏水。

测定操作：

#### 1、样本处理：

将样本烘干至恒重，粉碎，过40目筛之后，称取约0.05g，加入1mL提取液，封口膜封口防止液体溅出，于70℃水浴提取30min，期间可摇晃数次。12000rpm，25℃，离心10min，取上清，用提取液定容至1mL，待测。

#### 2、操作步骤：

(1) 紫外分光光度计/酶标仪预热30min，波长调至275nm。蒸馏水调零。

(2) 将5000nmol/mL标准液用提取液稀释为6.25、3.125、1.5625、0.78625、0.4、0.2nmol/mL标准溶液。

(3) 加样表:

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂一	大约5-7mg	-	-	大约5-7mg
蒸馏水	-	-	-	0.5mL
标准溶液	-	-	0.5mL	-
样品	0.5mL	0.5mL	-	-

充分混匀震荡5min, 13000g 离心20min。取200 $\mu$ L上清液测定275nm下的吸光度, 分别记为A测定管、A对照管、A标准管、A空白管, 计算 $\Delta A_{测定} = A_{对照管} - A_{测定管}$ ,  $A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

单宁含量计算:

1、标准曲线的绘制:

以标准溶液的浓度为x轴, 以A标准为y轴, 绘制标准曲线, 得到方程 $y = kx + b$ , 将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程中得到x (nmol/mL)

2、单宁含量计算:

1 按蛋白浓度计算:

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

2 按样本鲜重计算:

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

$C_{\text{pr}}$ : 样品蛋白浓度, mg/mL (蛋白浓度需重新用PBS提取测定);  $W$ : 样品质量, g;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积, 1mL。

注意事项:

1、当 $\Delta A$ 大于1.5时, 建议将样品上清液用提取液稀释更大倍数后测量;  $\Delta A$ 过小时, 建议减少稀释倍数或增加样品质量来测定。