

T/GDNB

广东省农业标准化协会团体标准

T/GDNB XXXX—2022

植物缩合单宁的测定方法 盐酸-正丁醇法

Method for the determination of condensed tannins in plants—Hydrochloric
acid-n-butanol method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省农业标准化协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省农业标准化协会提出并归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院动物科学研究所、广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、扬州大学、肇庆市佰仕科生物科技有限公司、广州英赛特生物技术有限公司、广州汇生饲料有限公司、广东水答案农业科技有限公司。

本文件主要起草人：彭凯、曹俊明、陈冰、王国霞、赵亚荣、黄倩倩、徐有良、彭险峰、严浩。

植物缩合单宁的测定方法 盐酸-正丁醇法

1 范围

本文件规定了一种通用的植物缩合单宁的测定方法。
本文件仅适用于植物中缩合单宁含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

可提取缩合单宁 extractable condensed tannin

指能够被丙酮溶剂提取的游离状态的缩合单宁。

3.2

蛋白结合缩合单宁 protein bound condensed tannin

指与蛋白质结合形成单宁-蛋白质复合物的缩合单宁。

3.3

纤维结合缩合单宁 fiber bound condensed tannin

指与纤维素结合形成单宁-纤维素复合物的缩合单宁。

3.4

总缩合单宁 total condensed tannin

指可提取缩合单宁、蛋白结合缩合单宁、纤维结合缩合单宁的总和。

4 原理

缩合单宁与盐酸-正丁醇溶液在沸水浴中发生反应，显色后，以试剂为空白对照，用紫外分光光度计于550 nm处测定吸光度值，以植物缩合单宁纯品作为标准物质做标准曲线，测定植物缩合单宁的含量。

5 试剂和溶液

除非另有说明，本标准中所用试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682 三级用水规定。

5.1 70%丙酮溶液

量取700 mL丙酮，加入蒸馏水定容到1000 mL，混匀，即为1 L 70%丙酮溶液。

5.2 提取液A

称取1 g维生素C，溶于1 L 70%丙酮溶液中，混匀，即为1 L提取液A。

5.3 乙醚。

5.4 提取液 B

称取10 g十二烷基硫酸钠和50 g 2-巯基乙醇，溶于1 L水中，混匀，即为1 L提取液B。

5.5 盐酸-正丁醇溶液

量取5 mL浓盐酸（36%）和95 mL正丁醇，混匀，冷却，即为100 mL盐酸-正丁醇溶液。

5.6 缩合单宁纯品。

5.7 缩合单宁储备液

准确称取0.1 g缩合单宁纯品，溶于100 mL水中，混匀，即为100 mL缩合单宁储备液。

6 仪器和设备

6.1 紫外分光光度计（带10 mm比色皿，可在550 nm处测定）。

6.2 离心机（具备12000 × *g*离心力）。

6.3 涡旋式振荡器。

6.4 恒温水浴锅。

6.5 电子天平（精度0.01 g）。

6.6 粉碎机（粉碎样品至全部通过1 mm孔径的筛子）。

6.7 氮气吹扫仪。

7 试样制备

按照GB/T 14699.1采样，按照GB/T 20195制备试样，粉碎至全部通过1 mm孔筛，混匀，置于密闭容器中，避光低温保存备用。

8 分析步骤

8.1 标准曲线的绘制

准确量取0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mL的缩合单宁储备液，分别置于盛有2.0、1.75、1.5、1.0、0.5、0 mL水的2 mL容量瓶中，混匀，配制6个标准工作液，浓度分别为0、0.125、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL。准确量取0.4 mL标准工作液，置于15 mL离心管中，加入2.5 mL盐酸-正丁醇溶液，涡旋混匀，拧紧离心管盖子并置于盛有沸水浴的恒温水浴锅中煮沸75 min，取出离心管，置于碎冰中冷却，待离心管中溶液完全冷却后，转移至紫外分光光度计的比色皿中，在550 nm波长下测定溶液的吸光值，绘制标准曲线。

8.2 可提取缩合单宁的测定

准确称取0.2 g试样，置于15 mL离心管中，加入8 mL提取液A，涡旋混匀，室温下持续振荡20 min，4 °C下离心10 min（1000 × *g*），将上清液转移至50 mL离心管中。向沉淀中再次加入8 mL提取液A，反复振荡抽提，重复3次，收集上清液。将离心管底部剩余的沉淀保存于4 °C冰箱中，用于蛋白结合缩合单宁的测定。向收集到的上清液中加入等体积的乙醚，混匀，室温下静置20 min，移除上层有机相，将装有剩余水相的50 mL离心管置于氮气吹扫仪中（水浴温度40 °C），完全去除丙酮，向离心管中添加水，定容至50 mL，作为待测溶液。准确量取0.4 mL待测溶液，置于15 mL离心管中，加入2.5 mL盐酸-正丁醇溶液，涡旋混匀，拧紧离心管盖子并置于盛有沸水浴的恒温水浴锅中煮沸75 min，

取出离心管，置于碎冰中冷却，待离心管中溶液完全冷却后，转移至紫外分光光度计的比色皿中，在550 nm 波长下测定溶液的吸光值，根据标准曲线计算可提取缩合单宁的含量。

8.3 蛋白结合缩合单宁的测定

取8.2中装有剩余沉淀的15 mL离心管，加入4 mL提取液B，涡旋混匀，于室温下振荡20 min，拧紧离心管盖子并置于盛有沸水浴的恒温水浴锅中煮沸45 min，取出离心管，自然冷却至室温，离心10 min ($12000 \times g$)，将上清液转移至另一个15 mL离心管中，反复提取3次，收集上清液，用提取液 B定容到15mL，混匀，作为待测溶液。将离心管中剩余的沉淀置于4 °C冰箱中保存，用于纤维结合缩合单宁的测定。准确量取0.4 mL待测溶液，置于15 mL离心管中，加入2.5 mL盐酸-正丁醇溶液，涡旋混匀，拧紧离心管盖子并置于盛有沸水浴的恒温水浴锅中煮沸75 min，取出离心管，置于碎冰中冷却，待离心管中溶液完全冷却后，转移至紫外分光光度计的比色皿中，在550 nm波长下测定溶液的吸光值，根据标准曲线计算蛋白结合缩合单宁的含量。

8.4 纤维结合缩合单宁的测定

取8.3中装有剩余沉淀的15 mL离心管，加入10 mL盐酸-正丁醇溶液和1 mL提取液B，涡旋混匀，于室温下振荡10 min，离心10 min ($12000 \times g$)，将上清液转移至另一个15 mL离心管中，用提取液 B定容到15mL，混匀，作为待测溶液。准确量取0.4 mL待测溶液，置于15 mL离心管中，加入2.5 mL盐酸-正丁醇溶液，涡旋混匀，拧紧离心管盖子并置于盛有沸水浴的恒温水浴锅中煮沸75 min，取出离心管，置于碎冰中冷却，待离心管中溶液完全冷却后，转移至紫外分光光度计的比色皿中，在550 nm波长下测定溶液的吸光值，根据标准曲线计算纤维结合缩合单宁的含量。

9 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留到小数点后一位。

10 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的绝对值不得超过算术平均值的10%。