

脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉比色法)

产品简介:

维生素 C(Vitamin C) 又称 L-抗坏血酸(AsA)，是高等灵长类动物与其他少数生物的必需营养素，在生物体内维生素 C 是一种抗氧化剂，为酸性己糖衍生物，是稀醇式己糖酸内酯，保护身体免于自由基的威胁，同时也是一种辅酶，其广泛的食物来源为各类新鲜蔬果。Vc 有 L-型和 D-型两种异构体，只有 L-型的才具有生理功能，还原型和氧化型都有生理活性。

Yuan ye 脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉比色法)检测原理是利用还原剂将脱氢抗坏血酸还原成还原型抗坏血酸，在酸性条件下维生素 C(抗坏血酸)把三价铁离子还原成亚铁离子，后者与菲咯啉形成稳定的红色螯合物，以分光光度计 534nm 处检测吸光度，在一定浓度范围(样品浓度控制在 $10 \sim 250 \mu\text{g/ml}$)吸光度与抗坏血酸含量呈线性关系，获得抗坏血酸含量。该试剂盒主要用于植物组织中的维生素 C(抗坏血酸)的检测，计算出总抗坏血酸含量，从中减去样品中原有的还原型抗坏血酸含量，即得脱氢抗坏血酸含量，其优点是：1、反应稳定，不易褪色；2、操作简便；3、还原糖及其他常见的还原物质对实验没有干扰，因此专一性好；4、灵敏度高。本试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	编号	Storage
	50T	
试剂(A): 抗坏血酸标准($250 \mu\text{g/ml}$)	2 ml	4℃ 避光
试剂(B): 组织匀浆液(5×)	500 ml	RT 避光
试剂(C): DHA 还原液	100 ml	-20℃
试剂(D): NaOH 溶液	50 ml	RT
试剂(E): 酸性缓冲液	15 ml	RT
试剂(F): AsA Assay buffer	15 ml	RT 避光
试剂(G): 菲咯啉显色液	30 ml	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水
- 2、无水乙醇
- 3、研钵或匀浆器
- 4、离心管或试管
- 5、离心机
- 6、pH 试纸或 pH 计

7、比色杯

8、分光光度计

操作步骤(仅供参考):

- 1、稀释组织匀浆液: 按组织匀浆液(5×): 蒸馏水=1: 4 的比例稀释, 获得 1×组织匀浆液, 待用。
- 2、制备 AsA 提取液: 取待测材料如青菜、水果、松针等, 清洗擦干, 准确称量 5g, 加入研磨器内, 再加入少量 1×组织匀浆液, 研磨碎, 留取上清, 再次用 1×组织匀浆液研磨, 最后一并倒入 50 ml 离心管, 补充 1×组织匀浆液至 45 ml, 充分混匀后, 4000g 离心 5 min, 留取上清液即为 AsA 提取液。
- 3、制备 DHA 待测液: 取 4ml AsA 提取液, 加入 2 ml DHA 还原液, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 7~8, 室温下静置 10 min, 使脱氢抗坏血酸还原成抗坏血酸, 再加入 1.6 ml 组织匀浆液(5×)和 0.4 ml 蒸馏水即为 DHA 待测液。
- 4、配制系列抗坏血酸标准: 取干净离心管或试管, 按下表进行操作, 依次稀释。

加入物(ml)	1	2	3	4	5	6
抗坏血酸(250 μg/ml)	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
蒸馏水	0.48	0.46	0.42	0.38	0.34	0.3
相当于抗坏血酸含量(μg)	5	10	20	30	40	50

- 5、DHA 加样: 按照下表设置空白管、标准管、AsA 测定管、DHA 测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的抗坏血酸含量过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。

加入物(ml)	空白管	标准管	AsA 测定管	DHA测定管
1×组织匀浆液	1.0	0.5	0.5	—
系列抗坏血酸(1~6 号)	—	0.5	—	—
上清液	—	—	0.5	—
DHA 待测液	—	—	—	1.0
无水乙醇	0.5	0.5	0.5	0.5
酸性缓冲液	0.25	0.25	0.25	0.25
AsA Assay buffer	0.25	0.25	0.25	0.25
菲咯啉显色液	0.5	0.5	0.5	0.5

- 6、DHA 测定: 立即混匀, 以空白调零, 比色光径 1 cm, 以分光光度计测定 534nm 处系列标准管、AsA 测定管、DHA 测定管的吸光度。

计算：以系列标准抗坏血酸(5、10、20、30、40、50 μ g)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程。以 AsA 测定管吸光度代入回归方程求得 AsA 提取液中 AsA 含量；以 DHA 测定管吸光度代入回归方程求得 DHA 待测液中总 AsA 含量；总 AsA 含量与 AsA 提取液中 AsA 含量的差值即为脱氢抗坏血酸(DHA)含量。

$$\text{DHA 含量}(\text{mg}/100\text{g}) = (m_0 \times V_T \times 100) / (m_1 \times V_S \times 1000)$$

式中： m_0 =总 AsA 含量与 AsA 提取液中 AsA 含量的差值(μ g)

V_T =待测液的总体积(ml)

m_1 =样品质量(g)

V_S =测定时取样体积(ml)

100=100g

注意事项：

- 1、上述低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。
- 2、组织匀浆液(5 \times)久置或低温保存，容易产生乳白色浑浊。如果白色浑浊不明显，可以直接使用，不影响效果；如果白色浑浊较多，应弃用。
- 3、待测样本如不能及时测定，应置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，3 天内稳定。
- 4、如果样品浓度过高，应用蒸馏水稀释后重测，结果乘以稀释倍数。

有效期： 6 个月有效。