

脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉微板法)

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。

脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉微板法)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, 在酸性条件下还原型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, 以酶标仪 534nm 处检测吸光度, 在一定浓度范围(样品浓度控制在1~40 μ 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。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	ADS138TC0	Storage
	100T	
试剂(A): Vitamin C 标准	20mg	RT 避光
试剂(B): 组织匀浆液(5 \times)	500ml	RT 避光
试剂(C): DHA 还原液	200ml	-20 $^{\circ}$ C 避光
试剂(D): NaOH 溶液	100ml	RT
试剂(E): 酸性缓冲液	3ml	RT
试剂(F): AsA Assay buffer	3ml	RT
试剂(G): 菲咯啉显色液	6ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料

- 1、蒸馏水、无水乙醇
- 2、研钵或匀浆器、离心机、离心管或试管、pH 试纸或 pH 计、酶标仪、酶标条

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 2.5g，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 50ml 离心管，补充 1×组织匀浆液至 22.5ml，充分混匀，4000g 离心 5min，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 2ml DHA 还原液，用 NaOH 溶液调节 pH 至 7~8，室温下静置 10min，使脱氢抗坏血酸还原成抗坏血酸，再加入 1.6ml 组织匀浆液(5×)和 0.4ml 蒸馏水即为 DHA 待测液。
- 4、配制系列抗坏血酸标准：将 Vitamin C 标准 20mg 用 2ml 1×组织匀浆液溶解，再稀释至 50μg/ml，取干净的 96 孔板，按下表进行操作，依次稀释。

加入物(μl)	1	2	3	4	5	6
抗坏血酸(50μg/ml)	1	4	7	10	20	40
1×组织匀浆液	49	46	43	40	30	10
抗坏血酸浓度(μg/ml)	1	4	7	10	20	40

- 5、DHA 加样：按照下表设置空白孔、标准孔、AsA 测定孔、DHA 测定孔，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 平行孔，求平均值。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	AsA 测定孔	DHA 测定孔
1×组织匀浆液	100	50	50	—
系列抗坏血酸(1-6 号)	—	50	—	—
上清液	—	—	50	—
DHA 待测液	—	—	—	100
无水乙醇	50	50	50	50
酸性缓冲液	25	25	25	25
AsA Assay buffer	25	25	25	25
菲咯啉显色液	50	50	50	50

- 6、DHA 测定：立即混匀，30°C 条件下反应 60min，以空白调零，酶标仪测定 534nm 处系列标准孔、AsA 测定孔、DHA 测定孔的吸光度。

计算：以系列标准抗坏血酸浓度(1、4、7、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)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 测定孔吸光度代入回归方程求得 AsA 提取液中 AsA 含量；以 DHA 测定孔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(μg)

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

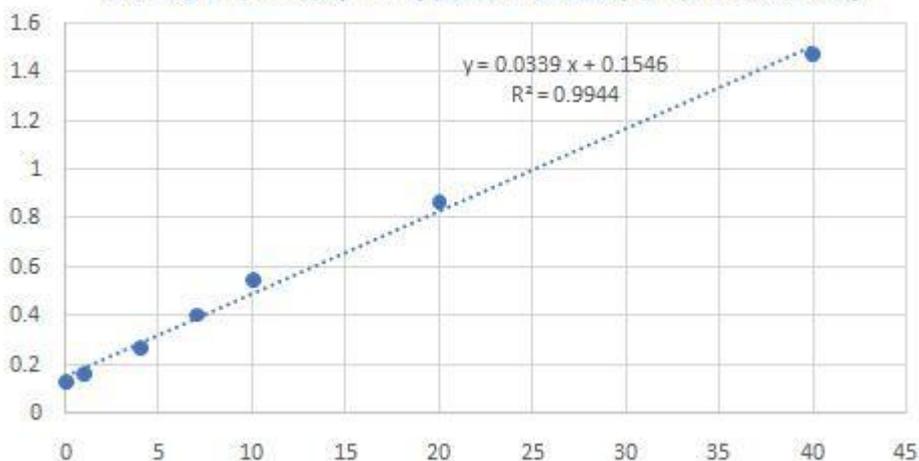
注意事项

- 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、组织匀浆液(5 \times)有腐蚀性，请小心操作。
- 4、待测样品如不能及时测定，应置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，3 天内稳定。
- 5、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。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月。低温运输，按要求保存。

附录：标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，用酶标仪 540nm 对系列标准(0、1、4、7、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)进行吸光度的测定，其标准曲线如下(仅供参考)：

脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉微板法)



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，标准曲线会有差异，该值仅供参考，根据测定经验显示 Vc 标准在 $0.5\mu\text{g/ml}$ 以下， $40\mu\text{g/ml}$ 以上，标准曲线会有偏差。

