

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。

Yuanye 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 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	R30291 50T	Storage
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	100ml	-20 $^{\circ}$ C 避光
试剂(D): NaOH 溶液	50ml	RT
试剂(E): 酸性缓冲液	15ml	RT
试剂(F): AsA Assay buffer	15ml	RT
试剂(G): 菲咯啉显色液	30ml	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、分光光度计、比色杯

操作步骤(仅供参考):

- 1、稀释组织匀浆液: 按组织匀浆液(5 $\times$): 蒸馏水=1: 4 的比例稀释, 获得 1 $\times$ 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 50ml 离心管，补充 1×组织匀浆液至 45ml，充分混匀后，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(50μg/ml)	0.01	0.04	0.07	0.1	0.2	0.4
1×组织匀浆液	0.49	0.46	0.43	0.4	0.3	0.1
抗坏血酸浓度(50μg/ml)	1	4	7	10	20	40

- 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，30℃条件下反应 60min，以空白调零，比色光径 1cm，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浓度(1、4、7、10、20、40μg/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。

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

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_5 = 测定时取样体积(ml)

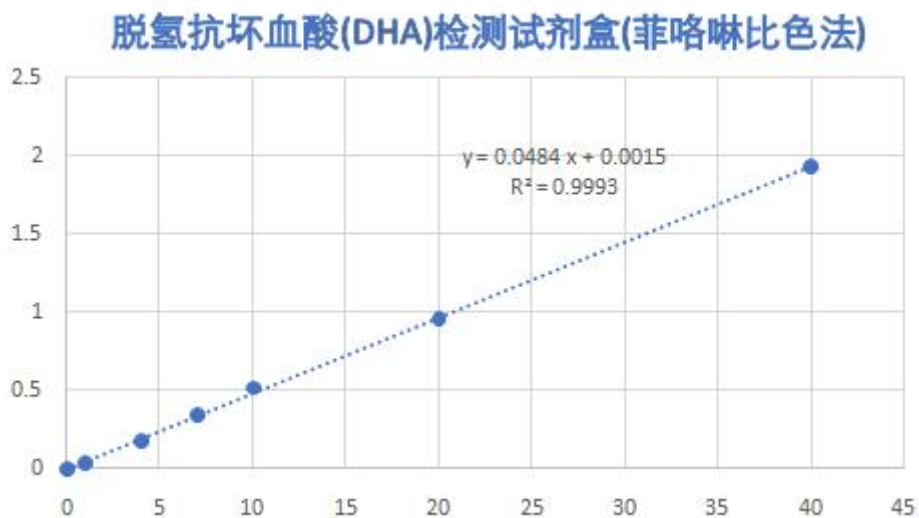
100 = 100g

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×)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℃ 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。
- 5、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 个月有效。低温运输，按要求保存。

附录: 标准曲线制作: Yuanye 在室温条件下按说明书操作，用分光光度计 534nm 对系列标准(0、1、4、7、10、20、40 μ g/ml)进行吸光度的测定，其标准曲线如下(仅供参考):



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 Yuanye 测定经验显示 Vc 标准在 0.5 μ g/ml 以下，40 μ g/ml 以上，标准曲线会有偏差。