



总抗坏血酸(TAA)含量测定(红菲咯啉法)

微板法

货号: R45172-96S

产品简介:

总抗坏血酸(TAA) 包括还原型和脱氢型抗坏血酸, 其中脱氢抗坏血酸被还原为还原型抗坏血酸, 接着还原型抗坏血酸把三价铁离子还原成二价铁离子, 二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络合物, 在534nm 处有特征吸收峰, 颜色深浅与还原型抗坏血酸含量成正比, 继而计算得出总抗坏血酸的含量。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体100mL×1瓶	4℃保存	
试剂a	液体5mL×1瓶	4℃保存	
试剂b	液体40mL×1瓶	4℃保存	
试剂c	液体10mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	A:液体×1支 试剂瓶B(空瓶)	4℃保存	试剂二B液配制: 临用前取出 0.047mLA液至试剂瓶B中, 再加9.953mL无水乙醇, 混匀备用。
试剂三	粉体mg×1瓶	4℃保存	用前甩几下使粉体落入底部, 再加13mL无水乙醇混匀溶解(该试剂难溶, 可超声溶解)。
试剂四	液体5mL×1瓶	4℃保存	溶液为淡黄色。
标准品	粉剂×2支	4℃保存	临用前: 每支用前甩几下标准品管, 使粉剂落入底部, 再加入1mL试剂一混匀溶解, 即得 5mg/mL,再用试剂一稀释500倍(1:499)为0.01mg/mL溶液即为标准液(现配现用)。

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、研钵、冰、低温离心机、无水乙醇、可调式移液器和蒸馏水。



总抗坏血酸 (TAA) 含量测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

①组织样本:

称取约0.1g 组织(水分充足的果实样本取约0.5g 组织或更多),加入1mL 预先预冷的提取液, 进行冰浴匀浆, 室温静提10min后, 12000rpm,4℃ 离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取

②液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

①酶标仪预热30 min, 调节波长到534nm。

②取 0.1mL上清液至新 EP 管中, 加入0.05mL试剂a混匀, 接着加入0.4mL 试剂b混匀, (此时整体液体为中性: PH 为7 - 8),室温(25℃)下反应10min, 之后再加0.1mL试剂

c 混匀(此时整体液体为酸性: PH 为1 - 2),此混合液为TAA 待检液。

③依次在EP管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	标准管(仅做一次)	空白管(仅做一次)
TAA待检液	200		
标准液		200	
提取液			200
试剂一	100	100	100
无水乙醇	100	100	100
试剂二B液	50	50	50
试剂三	100	100	100
试剂四	50	50	50
混匀, 于30℃反应60min后, 立即取出200μL澄清液体(若有沉淀需8000rpm,室温离心5min,取上清液)至96孔板中, 立即于534nm处读取各管吸光值A。			



【注】1.若提取完的样本上清液有较强的背景色(如粉色, 红色等),需增设一个样本自身对照: 即对照管为200 μ L 样本+100 μ L 试剂一+100 μ L 无水乙醇+50 μ L 试剂二B液+150 μ L 无水乙醇, 30℃反应60min 后, 剩余步骤同测定管, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

2.若测定管大于1.5,可对样本用试剂一进行稀释D, 或降低样本量则试剂一相应增加。则稀释倍数D 或改变后的样本体积V1 需代入公式重新计算。

3.若A 测定-A 空白的差值小于0.01,可增加样本加样量V1 (如增至0.3mL, 则试剂一减至0mL; 或增至0.4mL, 则试剂一和无水乙醇均减至0mL), 或增加样本取样质量W(如由 0.1g 增至0.2g 或更多)。则改变后的V1 和 W需代入公式重新计算。

结果计算:

1、按样本质量计算:

TAA(mg/g 鲜重)

$$\begin{aligned} &= [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div (W \times V1 \div V) \times 6.5 \times D \\ &= 0.01 \times 6.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{TAA(mg/mL)} &= [(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \div V1 \times 6.5 \times D \\ &= 0.01 \times 6.5 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V 标准---加入标准液体积, 0.2mL;

W--- 样品质量 (g);

D--- 稀释倍数, 若没有稀释即为1。