

## 脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉微板法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

### 产品简介：

维生素 C(VitaminC)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，以酶标仪 534nm 处检测吸光度，在一定浓度范围(样品浓度控制在 10~250  $\mu\text{g/ml}$ )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	规格	保存条件
脱氢抗坏血酸(DHA)检测试剂盒(菲咯啉微板法)	100T	4℃
试剂(A):抗坏血酸标准(250 $\mu\text{g/ml}$ )	2ml	4℃避光
试剂(B):组织匀浆液(5×)	500ml	RT 避光
试剂(C):DHA 还原液	200ml	-20℃
试剂(D):NaOH 溶液	100ml	RT
试剂(E):酸性缓冲液	3ml	RT
试剂(F):AsAAssaybuffe	6ml	RT 避光
试剂(G):菲咯啉显色液		4℃避光
使用说明书	1 份	
有效期	6 个月	

### 自备材料：

- 1、蒸馏水、无水乙醇
- 2、研钵或匀浆器
- 3、离心机、离心管或试管
- 4、pH 试纸或 pH 计
- 5、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×)：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 4mlAsA 提取液，加入 2mlDHA 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：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(250 μg/ml)	2	4	8	12	16	20
1×组织匀浆液	48	46	42	38	34	30
相当于 VitaminC 含量(μg)	0.5	1	2	3	4	5

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
AsAAssaybuffer	25	25	25	25
菲咯啉显色液	50	50	50	50

6、DHA 测定: 立即混匀, 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(5、10、20、30、40、50  $\mu$ 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。

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

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

$V_T$ =待测液的总体积(ml)

$m_1$ =样品质量(g)

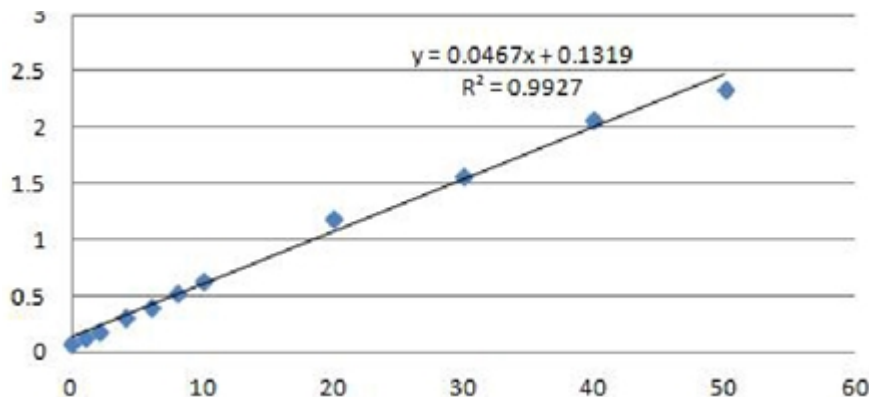
$V_S$ =测定时取样体积(ml)

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、待测样品如不能及时测定, 应置于  $2\sim 8^\circ\text{C}$  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。

**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、2、4、6、8、10、20、30、40、50  $\mu$ g)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, 根据测

定经验显示 Vc 标准在  $0.5 \mu\text{g}$  以下， $60 \mu\text{g}$  以上，标准曲线会有偏差。