

总抗坏血酸(TAA)含量测定(红菲咯啉法)

(微板法 96 样)

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	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加入 15ml 的 25%硫酸, 混匀, 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 1mg/mL,再用试剂一稀释 100 倍为 0.01mg/mL 溶液即为标准液(现配现用)。

所需仪器和用品:

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,置冰上待检。

【注】: 若增加样本,可按照组织质量(g):试剂一体积(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 200μL 样本+100μL 试剂一+100μL 无水乙醇+50μL 试剂二 B 液+150μL 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。

结果计算:

1、按样本质量计算:

$$\text{TAA (mg/g 鲜重)} = [(A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times (C \text{ 标准} \times V \text{ 标准}) \div (W \times V1 \div V) \times 6.5 \times D = 0.01 \times 6.5 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times D$$

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, 1 mL; V1---TAA 待检液体积, 0.2mL;

V 标准---加入标准液体积, 0.2mL; C 标准---标准液浓度, 0.01mg/mL;

W---样品质量 (g); 6.5---样本上清液的稀释倍数;

D---稀释倍数, 若没有稀释即为 1。