

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°C保存	
试剂 a	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加入 15ml 的 25%硫酸, 混匀, 4°C保存。
试剂 b	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂 c	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	A: 液体×1 支 试剂瓶 B(空瓶)	4°C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°C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：

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

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。