

总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0215F 分光法 48 样）

一、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。

二、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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 a	液体 2.5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 b	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂 c	液体 5mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×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 0.024mL A 液至试剂瓶 B 中，再加 4.976mL 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 10mL 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）。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、研钵、冰、低温离心机、无水乙醇、可调式移液器和蒸馏水。

四、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 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 534nm, 蒸馏水调零。
- 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	300		
标准液		300	
提取液			300
试剂一	150	150	150
无水乙醇	150	150	150
试剂二 B 液	75	75	75
试剂三	150	150	150
试剂四	75	75	75
混匀, 于 30℃ 反应 60min 后, 立即取全部澄清液体 (若有沉淀需 8000rpm, 室温离心 5min, 取上清液) 至 1mL 玻璃比色皿中, 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 300μL 样本+200μL 试剂一+200μL 无水乙醇+100μL 试剂二 B 液+300μL 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 1.8, 可对样本进行稀释 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。

五、结果计算:

1、按样本质量计算

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

3、按液体体积计算

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

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1--- TAA 待检液体积, 0.3mL;

V 标准---加入标准液体积, 0.3mL;

C 标准---标准液浓度, 0.01mg/mL;

W---样品质量 (g);

D---稀释倍数, 若没有稀释即为 1。