

## 总抗坏血酸（TAA）含量测定试剂盒说明书

（货号：G0215W 微板法 96 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 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<br>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 <b>标准液</b> （现配现用）。 |

## 三、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。

## 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<br>（仅做一次） | 空白管<br>（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。

## 五、结果计算：

### 1、按样本质量计算：

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

### 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。