

## 维生素 C (VC) /抗坏血酸 (ASA) 测定试剂盒

(货号: BC106 比色法 50 管/48 样)

### 一、试剂盒组成及配制: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一: 贮备液** 5mL×1 瓶, 4℃保存。**试剂一应用液配制:** 用时按照**试剂一贮备液: 蒸馏水**=1: 14 稀释, 混匀制备。

**试剂二:** 粉剂×1 支, 4℃保存。**试剂二应用液配制:** 用时 1 支粉剂加 0.36mL 的冰醋酸再加水至 40mL, 溶解, 4℃保存。

**试剂三:** 白色结晶体的粉剂×1 支, 4℃保存。**试剂三应用液配制:** 因较难溶解, 用前 2~4 小时加 95%或无水乙醇 60mL 充分溶解制备, 4℃保存。

**试剂四:** 黄色贮备液 0.2mL×1 瓶, 冰箱 4~8℃避光保存。临用时取 0.15mL **试剂四贮备液**加蒸馏水至 25mL 配成**试剂四应用液** (或按比例用多少配多少)。

**试剂五:** 液体 6mL×1 瓶, 4℃保存。

**试剂六: Vc 标准品:** 粉剂 6mg×3 支, 每瓶内含维生素 C, 4℃避光保存。临用时将 1 支标准品粉剂溶于 10mL **试剂一应用液**中制备 **600μg/mL Vc 标准品应用液**,4℃可保存 1-2 周; 再取 600μg/mL Vc 标准品应用液用**试剂一应用液** 100 倍稀释成 **6μg/mL Vc 标准品应用液**备用。注: 维生素 C 标准品易氧化, 因此, 最好在样本上清液制备好后再配, 并在配好后 10 分钟内与试剂进行反应。

### 二、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及比色皿 (或酶标仪 (536±10nm) 及 96 孔板), 离心机, 涡旋混匀器,37℃ 水浴或气浴箱, 蒸馏水, 无水乙醇 (分析纯), 冰醋酸少许 (0.5mL 即可, 分析纯), 蛋白测定试剂 (动物组织样本用, 本公司有售)。

### 三、操作步骤:

#### 1、样本前处理:

①、**动植物组织样本:** 准确称取待测组织的重量, 按重量 (g) :体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质 (推荐 0.1mol/L 且 pH 值为 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液或 0.9% 的生理盐水), 冰水浴条件机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 (10% 匀浆上清) 待测。(注: 动物组织匀浆上清需测定其蛋白浓度 (植物组织不用测, 计算时用组织计算第二条公式), 蛋白测定试剂盒本公司有售)

②、**血清 (浆) 等液体样本:** 直接使用。

2、**上清液制备:** 取上述样本(或组织匀浆上清)0.15mL 加**试剂一应用液** 0.45mL, 旋涡混匀, 室温静置 15 分钟后, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 上层清亮液体为上清液。(注: 组织样本也可以直接用**试剂一应用液**作匀浆介质匀浆制备上清液直接使用, 计算时参考组织计算第二条公式)

#### 3、上清液中 Vc 的测定:

	空白管	标准管	测定管
试剂一应用液 (mL)	0.4		
6μg/mL Vc 标准品应用液 (mL)		0.4	
上清液 (mL)			0.4
试剂二应用液 (mL)	0.5	0.5	0.5
试剂三应用液 (mL)	1	1	1
试剂四应用液 (mL)	0.25	0.25	0.25

充分混匀，37°C 水浴 30 分钟			
试剂五 (mL)	0.1	0.1	0.1
充分混匀，静置 10 分钟，波长 536nm，光径 1cm (或 0.5cm)，蒸馏水调零，测各管吸光度值 (或是每管吸取 200μL 反应液，加入 96 孔板中，酶标仪 536nm 处读数)。			

#### 四、计算公式：

##### 1、液体样本的计算与举例：

###### ①、计算公式：

$$\text{VC含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

$C_{\text{标准}}$ :标准品浓度, 6μg/mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数(包括前处理稀释倍数 4)。

###### ②、计算举例：

**例 1:**取血清 0.15mL, 按操作表操作, 测得空白管 OD 为 0.031, 标准管 OD 为 0.184, 测定管 OD 为 0.144, 则计算结果为:

$$\text{VC含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{0.144 - 0.031}{0.184 - 0.031} \times 6 \times 4 = 17.73\mu\text{g/mL}$$

##### 2、组织的计算与举例：

###### ①、计算公式：

$$\text{组织VC含量} (\mu\text{g/mgprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{组织VC含量} (\mu\text{g/g组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

$C_{\text{标准}}$ :标准品浓度, 6μg/mL;

$N$ : 样本测试前稀释倍数(第一条公式中还包括了加试剂一应用液作前处理时的稀释倍数 4);

$C_{\text{pr}}$ :组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

$W$ : 样本质量, g;

$V_{\text{样总}}$ : 样本匀浆时加入的匀浆介质的总体积, mL。

###### ②、计算举例：

**例 1:**取 10%大鼠肝匀浆 0.15mL, 按操作表操作, 测得空白管 OD 为 0.032, 标准管 OD 为 0.184, 测定管 OD 为 0.146, 同时测得 10%大鼠肝匀浆蛋白浓度为 8.5mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{大鼠肝VC含量} (\mu\text{g/mgprot}) &= \frac{0.146 - 0.032}{0.184 - 0.032} \times 6 \times 4 \div 8.5 \\ &= 2.12 \mu\text{g/mgprot} \end{aligned}$$

**例 2:**取 20%轮虫匀浆 0.15mL, 按操作表操作, 测得空白管 OD 为 0.031, 标准管 OD 为 0.186, 测定管 OD 为 0.177, 同时测得 20%轮虫匀浆蛋白浓度为 0.854mgprot/mL。则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{轮虫VC含量} (\mu\text{g/mgprot}) &= \frac{0.177 - 0.031}{0.186 - 0.031} \times 6 \times 4 \div 0.854 \\ &= 26.48 \mu\text{g/mgprot} \end{aligned}$$

#### 五、测定原理：

本法用  $\text{Fe}^{3+}$  与还原型抗坏血酸迅速作用生成  $\text{Fe}^{2+}$ , 后者再与啡罗琳显色反应, 可以测定血浆中维生素 C 的含量。

#### 六、测定意义：



ELK Biotechnology

Tel:+86-027-59760950 Website: [www.elkbiotech.cn](http://www.elkbiotech.cn)

Vc 在生物体内参与胶原物质合成，是脯氨酸羟化酶和赖氨酸羟化酶的辅因子，是催化多巴胺转变成去甲肾上腺素的铜酶多巴β羟化酶所必需，当 Vc 缺乏时，合成的胶原得不到充分的羟化，不能很好的形成纤维。Vc 最明显的化学活性是作为还原剂，它可以将  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$ ，促使铁在肠道吸收，促进铁的贮存和利用。作为自由基清除剂，抗坏血酸可以很快地与  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  反应，更快地与  $OH^-$  反应生成抗坏血酸自由基，它也可以清除  $O_2^-$ ，因此，可以保护机体免受内源性氧自由基的损伤。Vc 能与  $\alpha$ -生育酚自由基还原成维生素 E，间接地起着链阻断剂作用。Vc 是血浆中最有效的抗氧化剂，是细胞外液抗氧化防御系统的第一道防线，Vc 对血浆中正在进行着的脂质过氧化作用也有阻断作用。