

维生素 E(VE)测定试剂盒

(货号: BC153 比色法 50 管/48 样)

一、试剂组成及配制:

试剂一	试剂组成	包装规格	保存条件
试剂一	粉剂	粉剂×1 支	2~8℃避光
试剂一应用液的配制: 溶于 6.5mL 无水乙醇中, 避光保存, 此粉剂较难溶解, 需要提前 3~4 小时配制, 使用前一定要确定粉剂完全溶解。			
试剂二	粉剂	粉剂×1 支	2~8℃避光
试剂二贮备液配制: 溶于 25mL 无水乙醇配成贮备液避光保存。			
试剂二应用液配制: 取试剂二贮备液用无水乙醇 10 倍稀释, 应用液 2~8℃保存不可超过 2 天。			
试剂三	液体	5mL×1 瓶	2~8℃
试剂四	组成匀浆介质	100mL×1 瓶	2~8℃
试剂五	1mg/mL 标准贮备液	0.6mL×1 支	2~8℃
12μg/mL V _E 标准应用液配制: 取 1mg/mL 的 V _E 标准品贮备液 0.12mL 加无水乙醇定容至 10mL, 充分混匀即可。			

[注]: 2~8℃密封保存, 有效期 3 个月。

二、适用范围:

本试剂盒适用于检测动物血清(浆)、组织和植物等样本中 V_E 的含量。

三、需要自备的仪器或试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器, 离心机, 无水乙醇(分析纯)、正庚烷(分析纯)、蒸馏水。

四、操作步骤:

(一)、血清(浆)中维生素 E 的测定:

1、血清(浆)正庚烷维生素 E 的抽提:

	空白管	标准管	测定管
血清(浆) (mL)			0.1
蒸馏水 (mL)	0.4	0.3	0.3
12μg/mL V _E 标准品 (mL)		0.1	
无水乙醇 (mL)	0.6	0.6	0.6
漩涡混匀 20 秒(蛋白沉淀)			
正庚烷 (mL)	1.2	1.2	1.2
漩涡混匀(充分抽提) 1 分钟, 然后 4000 转/分, 离心 5~10 分钟, 取最上层 V _E 抽提液显色			

[注]: 观察试管内液分为三层, 最上层为正庚烷维生素 E 抽提液, 第二层为水及无水乙醇, 最下层为蛋白沉淀物。

2、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
V _E 正庚烷抽提液 (mL)	0.8	0.8	0.8
试剂一应用液 (mL)	0.1	0.1	0.1
试剂二应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05
混匀, 立即记录时间, 室温准确静置 5 分钟			
试剂三 (mL)	0.05	0.05	0.05
混匀 (10 秒左右)			
无水乙醇 (mL)	1	1	1
混匀, 静置 2 分钟后, 533nm 处, 1cm 光径比色皿, 无水乙醇调零, 测各管吸光度值			

3、计算公式及举例:

①、计算公式:
$$\text{VE含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

C_{标准}: 标准品浓度, 12μg/mL;

N: 样本测试前稀释倍数。

②、计算举例:

取血清 0.1mL, 按上述操作步骤进行检测。测得空白管吸光度为 0.016, 标准管吸光度 0.077, 测定管吸光度 0.061。则计算结果为:

$$\text{血清VE含量} (\mu\text{g/mL}) = \frac{0.061 - 0.016}{0.077 - 0.016} \times 12 \times 1 = 8.85 \mu\text{g/mL}$$

(二)、组织中维生素 E 的测定:

1、样本前处理:

10%组织匀浆的制备: 准确称取组织重量, 按重量 (g) : 体积 (mL) = 1: 9 的比例加入试剂四组织匀浆介质, 冰水浴条件下匀浆, 2500 转/分离心 10 分, 取上清待测。

2、组织匀浆中正庚烷维生素 E 的抽提:

	空白管	标准管	测定管
10%匀浆上清液 (mL)			0.4
蒸馏水 (mL)	0.7	0.6	0.3
12μg/mL V _E 标准品 (mL)		0.1	
无水乙醇 (mL)	0.6	0.6	0.6
漩涡混匀 20 秒 (蛋白沉淀)			
正庚烷 (mL)	1.2	1.2	1.2
漩涡混匀 (充分抽提) 1 分钟, 然后 3000 ~ 4000 转/分, 离心 5 ~ 10 分钟, 取最上层 V _E 抽提液显色			

[注]: 观察试管内液分为三层, 最上层为正庚烷维生素 E 抽提液, 第二层为水及无水乙醇, 最下层为蛋白沉淀物。

3、显色反应:

	空白管	标准管	测定管
V _E 正庚烷抽提液 (mL)	0.8	0.8	0.8
试剂一应用液 (mL)	0.1	0.1	0.1
试剂二应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05
混匀, 立即记录时间, 室温准确静置 5 分钟			
试剂三 (mL)	0.05	0.05	0.05
混匀 (10 秒左右)			

无水乙醇 (mL)	1	1	1
混匀, 静置 2 分钟后, 533nm 处, 1cm 光径比色皿, 无水乙醇调零, 测各管吸光度值			

4、计算公式及举例:

①、**计算公式:**
$$\text{组织VE含量} (\mu\text{g/g鲜重}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

C_{标准}: 标准品浓度, 3μg/mL (样本取样量为 0.4mL, 标准品取样量为 0.1mL, 相当于 4 倍稀释后取 0.4mL);

W: 组织鲜重, g;

V_{样总}: 加入的提取液总体积, mL。

②、计算举例:

取正常小鼠 10% 肝匀浆 0.4mL, 按操作步骤进行检测。测得空白管吸光度为 0.023, 标准管吸光度 0.080, 测定管吸光度 0.046。则计算结果:

$$\text{组织VE含量} (\mu\text{g/g鲜重}) = \frac{0.046 - 0.023}{0.080 - 0.023} \times 3 \div \frac{0.1}{0.9} = 10.894 \mu\text{g/g鲜重}$$

五、测定意义:

维生素 E (V_E) 是天然脂溶性抗氧化剂, 它存在细胞膜性结构中 (细胞膜、线粒体、微粒体) 以及脂肪细胞的脂滴和循环的脂蛋白中。

V_E 不但是单线态氧和超氧阴离子自由基的清除剂, 更重要的是脂质过氧化作用的阻断剂。从细胞水平的许多实验说明维生素 E 和 SoGSHPX 协同地保护细胞免受脂质过氧化损伤。V_E 尚能直接与蛋白硫自由基偶联, 使蛋白巯基恢复活性, V_E 也可通过清除 LOO 间接地防止蛋白巯基丧失。而蛋白巯基是维护细胞生存的重要环节, 因而 V_E 是机体抗氧化的第一道防线。当维生素 E 缺乏时, 机体易受到自由基的攻击而表现出各种病理状态。例如: 老年性白内障、早衰等。

六、测定原理:

V_E 在菲罗琳的存在下, 可使三价铁离子还原成二价铁离子, 后者在特定的环境下可与菲罗琳形成粉红色复合物, 通过比色, 在标准曲线上可查出 V_E 的含量, 或者通过公式可计算出 V_E 的含量。

七、注意事项:

- 1、试管要用肥皂粉或洗涤剂煮开刷洗, 再用自来水冲洗干净后蒸馏水冲洗一遍。
- 2、2 号试剂应用液最好当天配制, 需多少配多少。
- 3、显色时间 5 分钟, 要准确。
- 4、维生素 E 的抽提时间 1 分钟要充分。
- 5、因本法为微量测定, 故每换一次移液尖, 首次吸液要丢弃, 以后每次加样或加试剂均要垂直滴入, 切勿加在管壁上。
- 6、吸取正庚烷抽提液时, 一定要小心吸取, 不可将第二层 (即水与无水乙醇液相层) 混入, 否则会影响吸光值。
- 7、显色所用试管要干燥。
- 8、测定时注意密封, 特别是混匀抽提时, 要注意不要使液体溅出。
- 9、本试剂盒仅用于科研、实验室。