

## 还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚比色法)说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

### 产品简介：

维生素 C(VitaminC)是一种具有抗氧化性质的有机化合物，又称抗坏血酸，是高等灵长类动物与其他少数生物的必需营养素，在生物体内，维生素 C 是一种抗氧化剂，同时也是一种辅酶，为酸性己糖衍生物，是烯醇式己糖酸内酯，可保护身体免于自由基的威胁，其广泛的食物来源为新鲜的蔬菜和水果，Vc 有 L-抗坏血酸和 D-抗坏血酸，而且两种都具有强还原性，但只有 L-抗坏血酸对人体具有生物活性。L-抗坏血酸有还原型抗坏血酸和氧化型抗坏血酸两种，前者含量较高，在一般蔬菜和水果中占 90%以上，L-还原型抗坏血酸极易被氧化为 L-脱氢抗坏血酸 L-脱氢抗坏血酸亦可被还原为 L-还原型抗坏血酸，通常也称作氧化型抗坏血酸。

还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚比色法)检测原理是向一定提取液中加入过量的 2,6-二氯酚靛酚染料溶液，与还原型抗坏血酸作用后，2,6-二氯酚靛酚被还原，多余的 2,6-二氯酚靛酚可用二甲苯萃取比色，待测液中抗坏血酸的含量与二甲苯萃取的颜色呈线性负相关，即待测液中抗坏血酸含量越高，未被还原的染料就越少，二甲苯萃取的颜色就越浅，由于水溶性的花青素不溶于二甲苯，因此不影响测定结果，常用于蔬菜、水果中还原型维生素 C 含量的测定，特别适用于花青素含量高的蔬菜类样品。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成：

| 名称                       | 规格    | 保存条件  |
|--------------------------|-------|-------|
| 还原型维生素 C 检测试剂盒(二氯酚靛酚比色法) | 50T   | 4℃    |
| 试剂(A):VitaminC 标准        | 10ml  | RT    |
| 试剂(B):组织匀浆液(12×)         | 250ml | RT    |
| 试剂(C):二氯酚靛酚              | 20ml  | 4℃避光  |
| 试剂(D):二氯酚靛酚稀释液           | 20ml  | RT    |
| 试剂(E):硫酸锌溶液              | 25ml  | RT    |
| 试剂(F):亚铁盐溶液              | 25ml  | RT 避光 |
| 使用说明书                    | 1 份   |       |
| 有效期                      | 6 个月  |       |

#### 自备材料:

- 1、新鲜蔬菜或水果等样品
- 2、组织捣碎器、匀浆器
- 3、滤纸、漏斗
- 4、容量瓶(10ml/50ml)
- 5、蒸馏水、二甲苯
- 6、分光光度计、比色杯

#### 操作步骤(仅供参考):

- 1、配制 1×组织匀浆液: 按组织匀浆液(12×): 蒸馏水=1: 11 的比例稀释, 即得。
- 2、配制 2×组织匀浆液: 按组织匀浆液(12×): 蒸馏水=1: 5 的比例稀释, 即得。
- 3、制备样品提取液: 清洗干净新鲜蔬菜或水果, 用布或吸水纸吸干表面水分或自然晾干。称取 1g, 加入 1.5ml 的 2×组织匀浆液, 置于组织捣碎器中打成浆状, 滤液倒入 50ml 容量瓶内, 滤渣可用 1×组织匀浆液重复匀浆 1~2 次, 合并滤液倒入容量瓶内, 加入 0.5ml 硫酸锌溶液, 摇动容量瓶, 再加入 0.5ml 亚铁盐溶液, 晃动以除去脂溶性色素, 再用 1×组织匀浆液定容至刻度, 摇匀后过滤至干净小烧杯中备用。
- 4、配制 VitaminC 标准液: 取少量 1×组织匀浆液加入 10mg VitaminC 标准中, 充分混匀, 然后完全转移至 10ml 容量瓶, 用 1×组织匀浆液稀释至刻度, 即为 VitaminC 标准储备液(1mg/ml); 再取 0.5ml 标准储备液加入 10ml 容量瓶中, 用 1×组织匀浆液稀释至刻度, 即为 VitaminC 标准液(0.05mg/ml); 注意: Vc 标准液最好临用前配制。
- 5、配制二氯酚靛酚溶液: 取少量二氯酚靛酚稀释液加入 10mg 二氯酚靛酚中, 充分混匀, 然后完全转移至二氯酚靛酚稀释液中, 即得二氯酚靛酚储备液(如有必要, 可加热助溶)。临用前, 按二氯酚靛酚储备液: 蒸馏水=1: 4 的比例稀释, 即得二氯酚靛酚溶液, 此溶液每毫升约相当于含有 0.1mg 的维生素 C。
- 6、配置 Vc 梯度标准: 按下边分别吸取 VitaminC 标准液和 1×组织匀浆液, (单位: ml)

| 管号           | 0   | 1   | 2   | 3    | 4   | 5   |
|--------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| VitaminC 标准液 | 0   | 0.3 | 0.6 | 0.75 | 0.9 | 1.2 |
| 1×组织匀浆液      | 1.2 | 0.9 | 0.6 | 0.45 | 0.3 | 0   |
| Vc 含量/ug     | 0   | 15  | 30  | 37.5 | 45  | 60  |

- 7、维生素 C 加样: 按照下表设置标准管、测定管, 溶液应按照顺序依次加入; 如果样品中的 Vc 浓度过高, 可减少样品用量, 可补加 1×组织匀浆液后再进行测定, 样品的检测最好能设置平行管。

| 加入物(ml)          | 标准管 | 测定管 |
|------------------|-----|-----|
| 1×组织匀浆液          | —   | —   |
| 系列 Vc 标准液(0~5 号) | 1.2 | —   |
| 样品提取液            | —   | 1.2 |
| 二氯酚靛酚溶液          | 0.6 | 0.6 |

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 二甲苯 | 1.5 | 1.5 |
|-----|-----|-----|

8、维生素 C 测定：迅速摇动约 30s，静置后二甲苯与水层分离，吸取各管上层二甲苯层萃取溶液倒入 1cm 比色皿中，以二甲苯做空白调零，分光光度计测定各管 500nm 吸光度(即为 A 标准、A 测定)。

**计算：**以系列维生素 C 含量(0、15、30、37.5、45、60ug)为横坐标，对应吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，求得回归方程；A 测定代入回归方程求得待测样品中维生素 C 含量。

100g 样品中维生素 C 的质量(mg/100g)= $m_0 \times VT / (1000 \times V_s \times m) \times 100 \times N$  式中： $m_0=1.2\text{ml}$  提取液中维生素 C 含量(ug)

VT=样品提取液总体积(ml)

$V_s$ =测定用样品提取液体积(ml)=1.2

m=样品鲜质量(g)

N=样本稀释倍数

1000=ug 与 mg 的比例换算

**注意事项：**

- 1、组织匀浆液(12×)久置或低温保存，容易产生乳白色浑浊；如果白色浑浊不明显，可以直接使用，不影响效果；如果白色浑浊较多，应弃用。
- 2、配好的 VitaminC 标准液 4℃ 避光保存，4 周有效(最好临用前配制)，也可 -20℃ 保存。
- 3、配制好的二氯酚靛酚储液 4℃ 避光保存，配好的二氯酚靛酚溶液 4℃ 避光保存，1 周有效；如有条件可称取二氯酚靛酚 10mg，加入 10ml 二氯酚靛酚稀释液充分溶解，可避免浪费试剂。
- 4、该试剂盒提供的组织匀浆液可用于大部分的蔬菜和水果等样品，可抑制抗坏血酸氧化酶活性。
- 5、样品提取液要避免日光直射，否则会加速抗坏血酸的氧化。
- 6、测定溶液中含有二甲苯等有机溶剂，不能用塑料比色皿测定。