

维生素 C（VC）/抗坏血酸（ASA）测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A009-1-1 比色法 50 管/48 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

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%酒精或无水乙醇 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。试剂四应用液配制：用时取 0.15mL 试剂四贮备液加水至 25mL 制备（现用现配）。
- 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。

- 600μg/mL Vc 标准品应用液配制：将 1 支标准品粉剂溶于 10mL 试剂一应用液中，制备。
- 6μg/mL Vc 标准品应用液配制：取 600μg/mL Vc 标准品应用液再用试剂一应用液 100 倍稀释备用，10 分钟内使用。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配标准，并在 10 分钟内进行检测。

二、所需仪器耗材及试剂：

含 536nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿（或酶标仪及 96 孔板）、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用，本公司有售）。

三、操作步骤：

1、样本前处理：

- ①、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，蛋白测定试剂盒本所有售）

- ②、血清（浆）等液体样本：直接使用。

- 2、上清液制备：取样本(或组织匀浆上清)0.15mL 加试剂一应用液 0.45mL，旋涡混匀，放置 15 分钟后离心，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，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℃ 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。

四、计算公式：

1、液体样本的计算：

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

C_{标准}:标准品浓度, 6μg/mL;
N: 样本测试前稀释倍数(包括前处理稀释倍数 4)。

2、组织的计算：

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

$$\text{组织VC含量} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g组织}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N_1 \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

C_{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);
Cpr:组织匀浆蛋白浓度, mgprot/mL（prot 指蛋白）;
N₁: 用试剂一应用液直接处理的样本在测试前的稀释倍数;
W: 样本质量, g;
V_{样总}: 样本用试剂一应用液直接匀浆时加入的试剂一应用液的总体积, mL。

五、测定原理：

本法用 Fe³⁺与还原型抗坏血酸迅速作用生成 Fe²⁺，后者再与吡罗啉显色反应，可以测定血浆中维生素 C 的含量。

六、测定意义：

维生素 C 在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，当维生素 C 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。

维生素 C 最明显的化学活性是作为还原剂，它可以将 Fe³⁺还原成 Fe²⁺，促使铁在肠道吸收，促进铁的贮存和利用。

抗坏血酸作为自由基清除剂，可以很快地与 O₂⁻、H₂O₂ 反应，更快地与 OH⁻反应生成抗坏血酸自由基，它也可以清除 O₂⁻，因此，抗坏血酸可以保护机体免受内源性氧自由基的损伤。

维生素 C 能与 α-生育酚自由基还原成维生素 E，间接地起着链阻断剂作用。

维生素 C 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。