

组织及血液DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA8-C24	组织及血液DPPH 自由基清除能力试剂盒	24T	常量法

产品说明:

DPPH 自由基一种很稳定的氮中心的自由基,是样本抗氧化能力的重要指标之一,广泛应用于抗氧化类食品、保健品及药品的研究中。

DPPH 自由基有单电子,其醇溶液呈紫色,在515 nm 处有强吸收。当有抗氧化剂存在时,DPPH 自由基被清除,其溶液颜色变浅,515 nm 的吸光度下降,在一定范围内其吸光度的变化与自由基被清除的程度成正比。本试剂盒中,通过吸光度下降的程度来反映样本清除DPPH 自由基的能力。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 60 mL×1 瓶 (自备)	常温保存
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×1支	2-8℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一:无水乙醇自备;
- 2、试剂二:粉剂置于瓶内 EP 管中。临用前加入 6.08 mL 试剂一振荡溶解,用不完的试剂可于-20℃保存 1 个月,建议分装保存,避免反复冻融;临用前根据试验所需量按照试剂二:试剂一 (V:V) = 4 : 21 的比例配制成工作液,现配现用,用不完的工作液可于2-8℃保存一周;
- 3、试剂三:10 mg 维生素C。临用前加入 1 mL 提取液,充分振荡溶解,配成 10 mg/mL 维生素C 溶液,2-8℃ 保存两周;用于阳性对照。

操作步骤:

一、样本处理

(1) 植物样本的制备:将新鲜样本置于 60℃烘箱烘干至恒重,研钵研碎(或粉碎机粉碎),过 30~50 目筛。称取约 0.05 g 样本,加入 1 mL 提取液,40℃水浴浸提 30 min。室温 10000 rpm 离心 10 min,取上清,置冰上待测。

(2) 红酒、果汁等液体样本:吸取 100 μL 样本溶液加入 900 μL 提取液,旋涡振荡混匀,室温 10000 rpm 离心 10 min,取上清,置冰上待测。

(3) 提取物或者药物:可用提取液配制成一定浓度,如 5 mg/mL。

注意：不同样本清除DPPH 自由基的能力可能相差很大，为保证实验结果的准确性，样本要根据预实验结果 进行适当调整（如清除率大于90%，建议将提取的样本用提取液进行稀释；清除率小于5%，建议加大烘干样本 质量或液体样本体积进行提取）。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30 min 以上，调节波长至515 nm，无水乙醇调零。

2、阳性对照的准备：若需要线性关系，建议将 10 mg/mL 的维生素C 溶液用提取液配制成0.3、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mg/mL 的维生素C 溶液待用，稀释可参考下表；若需要清除率约为 100%的阳性对照， 则建议将 10 mg/mL 维生素C 溶液用提取液配制成大于0.3 mg/mL 的维生素C 溶液待用。

序号	稀释前浓度 (mg/mL)	试剂三体积 (μL)	提取液体积 (μL)	稀释后浓度 (mg/mL)
1	10	100	900	1
2	1	300	700	0.3
3	0.3	500	100	0.25
4	0.25	300	300	0.125
5	0.125	300	300	0.0625
6	0.0625	300	300	0.03125
7	0.03125	300	300	0.015625

备注：实验中每个阳性对照管需 25μL 试剂三。

3、操作表：在 1.5 mL EP 管中分别加入下列试剂

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	对照管	阳性对照管
上清液	-	25	25	-
试剂三	-	-	-	25
提取液	25	-	-	-
试剂一	-	-	975	-
工作液	975	975	-	975

涡旋混匀，室温避光静置30 min，于 515 nm 处的吸光度。分别记为A 空白、A 测定、A 对照、A 阳性对照。每个测定管需设一个对照管。阳性对照管和空白管只需测 1-2 次。

三、计算公式

1、阳性对照的自由基清除率计算公式：

$$\text{DPPH 自由基清除率 } D_{vc}\% = [(A \text{ 空白} - A \text{ 阳性对照}) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$$

2、样本的自由基清除率计算公式：

$$\text{DPPH 自由基清除率 } D\% = [(A \text{ 空白} - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$$

注意事项：

1、不同样本清除DPPH 自由基的能力可能相差很大，如果要比较不同样本的DPPH 自由基清除能力，建议对于同一批样本加入等量的样本，红酒、组织匀浆、果汁等液体样本加入同样体积，提取物（或者药物）配制成同样浓度。在比较时，将样本根据预实验结果进行适当调整，比较同样浓度（相同稀释倍数）的清除率大小。

2、样本建议当天提取当天检测。