

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-M48	组织及血液DPPH 自由基清除能力试剂盒	48T	微量法

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 80 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 30 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 提取液后置于40℃水浴锅中浸提30 min；10000 rpm 室温离心 10 min，取上清，置于冰上待测。

(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、分光光度计或酶标仪预热30 min 以上，调节波长至515 nm，分光光度计用**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 10μL 试剂三。

3、操作表：在 96 孔板或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	-	10	10	-
试剂三	-	-	-	10
提取液	10	-	-	-
试剂一	-	-	190	-
工作液	190	190	-	190

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。