

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: ADS-F-DP001 分光法 48 样)

一、产品简介:

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) 即 1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基。广泛用于定量测定生物试样和食品的抗氧化能力。

此法是根据 DPPH 自由基有单电子, 在 517nm 处有一强吸收, 其醇溶液呈紫色的特性。当有自由基清除剂存在时, 由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失, 呈现的颜色越浅, 即 A 值越低, 进而对样本中 DPPH 清除能力进行定量分析。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
工作液	粉剂 2 支 空瓶 2 瓶	4°C 保存	用前甩几下 EP 管使试剂落入底部, 向一支 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇溶解后全部转移至一个棕色空瓶中, 再向该 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇涮洗后全部转移至该棕色瓶中 (可分别再用 0.5mL 无水乙醇涮洗该 EP 管 2 次), 最后再加 17mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀做为 工作液 待用 (总体积为 19mL); 用不完的试剂 4°C 避光保存 (配制好的工作液最好一个月内用完)。
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、离心机、可调式移液器、研钵、冰、甲醇、无水乙醇和蒸馏水。

四、DPPH 自由基清除能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 新鲜组织或者称取约 0.05g 烘干样本 (将样本在 105°C 下杀青 3min, 然后 60°C 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛, 得到烘干样本), 加入 1mL 的 80% 甲醇提取液 (若鲜样需研磨均质), 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次), 若有损失需用 80% 甲醇定容至 1mL。12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 80% 甲醇提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 室温离心 10min, 取上清测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 517nm, 无水乙醇调零。
- ② 不同样本清除能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定-A 对照接近零, 需对样本进行稀释 (用 80% 甲醇提取液稀释) 后再检测, 稀释倍数 D 代入公式计算。

③ 在 EP 管中依次加入：

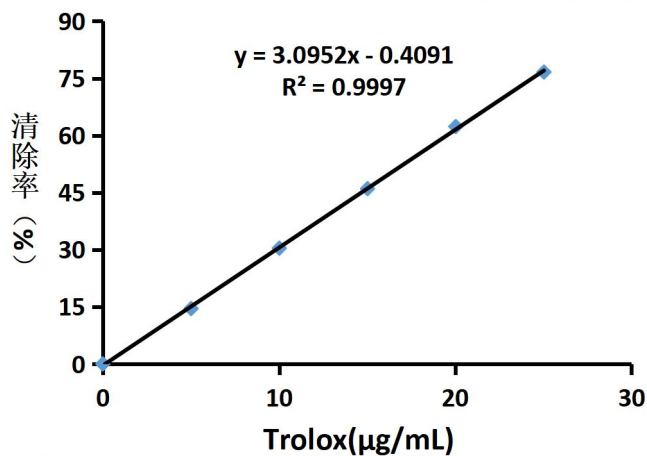
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	400	400	
80%甲醇		600	400
工作液	600		600

混匀，室温(25°C)避光静置 30min，12000rpm，室温离心 5min，取 800μL 至玻璃比色皿中，于 517nm 处读取吸光值 A。

【注】若一次性样本较多，可用排枪或者分批检测，以使测定管的反应时间（避光静置 30min）保持一致。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 3.0952x - 0.4091$ ； x 是标准品 Trolox 浓度 (μg/mL)， y 是清除率 (%)。



2、DPPH 自由基清除率(%)=[(1-(A 测定-A 对照)÷A 空白)×100]%

3、定义： 用从标准曲线上获得的抗氧化剂Trolox的量来表示样本的DPPH自由基清除能力。

4、按样本质量计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重})=[(\text{清除率}+0.4091)\div 3.0952\times V1]\div(V1\div V\times W)\times D$$

$$=0.323\times(\text{清除率}+0.4091)\div W\times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重})=[(70+0.4091)\div 3.0952\times V1]\div(V1\div V\times W)\times D$$

5、按细菌/细胞计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell})=[(\text{清除率}-0.7084)\div 2.8486\times V1]\div(V1\div V\times 500)\times D$$

$$=0.0007\times(\text{清除率}-0.7084)\div 500\times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重})=[(70-0.7084)\div 2.8486\times V1]\div(V1\div V\times 500)\times D$$

6、液体样本：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL})=[(\text{清除率}+0.4091)\div 3.0952\times V1]\div V1\times D$$

$$=0.323\times(\text{清除率}+0.4091)\times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL})=[(70+0.4091)\div 3.0952\times V1]\div V1\times D$$

V---加入提取液体积， 1 mL；

V1---反应中样品体积， 400μL=0.4 mL；

W---样品质量， g；

500---细胞数量， 万；

Trolox 分子量---250.29；

D---稀释倍数， 未稀释即为 1；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管，再加 2mL 甲醇充分溶解，即 1mg/mL 标准品，备用。
- 2 把母液用甲醇稀释成以下浓度梯度的标准品：0,5,10,15,20, 25 μ g/mL。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。

