

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: A153-1-1 比色法 48T)

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、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、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂名称	规格	保存
试剂一	工作液粉剂×1 瓶	4℃避光
	用前甩几下使粉剂落入底部,再加入 40mL 无水乙醇充分溶解后配成工作液(可提前一天配制);用不完的试剂 4℃避光保存(注意:粉剂量较少,溶解时注意观察工作液颜色(应为深紫色),若是颜色较浅则可能粉剂未完全溶解)	
试剂二	标准品粉剂×1 支	4℃
	制作标准曲线时用	

三、所需仪器和用品:

可见分光光度计及 1mL 比色皿(光径 1cm)、离心机、移液器、80% 甲醇水溶液、无水乙醇、蒸馏水。

四、实验步骤:

操作前请仔细阅读第六点《注意事项》,了解相关注意点。

1、样本前处理:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,剪碎,加入 1mL 的 80% 甲醇溶液【或按样本重量(g): 80% 甲醇溶液体积(mL)为 1:10 或 1:5 的比例加】,冰水浴匀浆,12000 转/分钟,离心 10 分钟,取上清置冰上待测。

② 液体样本:直接检测,若浑浊,离心后取上清测定。

2、操作步骤: (EP 管中操作)

	对照管	测定管	空白管
样本(μL)	400	400	
80% 甲醇(μL)			400
工作液(μL)		600	600
无水乙醇(μL)	600		

混匀,室温(18-25℃)避光静置 30min,4000 转/分钟,离心 5 分钟,波长 517nm,吸取 800μL 上清至比色皿中,用 80% 甲醇调零,分光光度计测定各管吸光度值 A。

(注:做预试时若 A 测定-A 对照小于 0.1,则需对样本进行稀释后再检测,稀释倍数代入公式计算;若样本较多,建议分批次测定;空白管只需做 1-2 个)

五、结果计算:

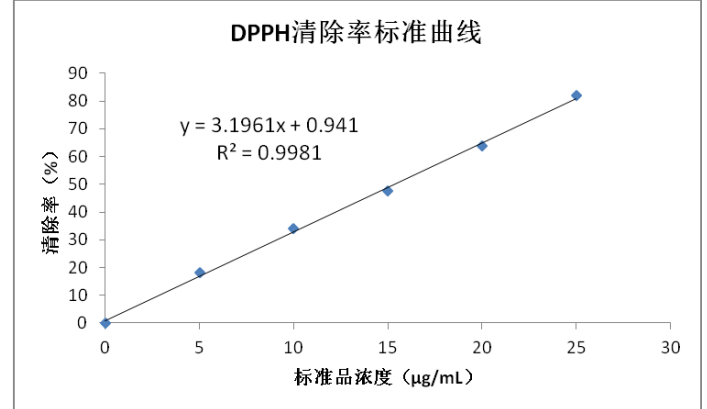
1、标准曲线制作:

(将标准品粉剂一支加 80% 甲醇 2mL 溶解,即为 500μg/mL (Trolox) 标准应用液,再取 500μg/mL 标准液 0.5mL 加 80% 甲醇 4.5mL 稀释成 50μg/mL 后参照下表进行操作)

标准液浓度(μg/mL)	0	5	10	15	20	25
80% 甲醇(μL)	400	360	320	280	240	200
50μg/mL 标准液(μL)	0	40	80	120	160	200
工作液(μL)	600	600	600	600	600	600

混匀,室温 25℃避光静置 30min,波长 517nm,1cm 光径,80% 甲醇调零,分光光度计测定各管吸光度 A。

标准液浓度	0μg/mL	5μg/mL	10μg/mL	15μg/mL	20μg/mL	25μg/mL
吸光值	1.171	0.957	0.773	0.615	0.425	0.212
清除率(%)	0	18.27	33.99	47.48	63.71	81.90



2、清除率的计算

$$\text{样本 DPPH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%$$

$$\text{标准品 DPPH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A(S)}{A(S_0)}\right) \times 100\%$$

(式中 S 为各浓度标准管, S₀ 为标准浓度为 0 的一管)

3、定义: 用从标准曲线算得的相当于抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的 DPPH 自由基清除能力。

4、计算公式:

先将样本测得吸光度值代入清除率计算公式,再将所得清除率代入标准曲线得到相当于 Trolox 的浓度,最后再代入以下公式中计算:

$$\text{组织中 DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{\text{代入标准曲线得 Trolox 的浓度}(\mu\text{g Trolox/mL}) \times \text{提取液总体积}(\text{mL})}{\text{样本鲜重}(\text{g}) \times \text{稀释倍数}}$$

$$\text{液体样本 DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = \frac{\text{代入标准曲线得 Trolox 的浓度}(\mu\text{g Trolox/mL}) \times \text{稀释倍数}}$$

六、注意事项:

- 样本测试前一定要进行预试,一方面了解本批样品情况,摸索样本所需稀释倍数,否则如果清除率太大(≥90),计算结果偏低甚至可能无显著性差异;另一方面也可熟悉实验流程,避免样本与试剂的浪费;
- 标准曲线也可根据需要来调整标准浓度,上限不大于 25μg/mL;
- 因甲醇、乙醇易挥发,所以不建议用酶标仪来读数;
- 操作时应在一个通风条件良好的环境中进行,以免吸入过量甲醇中毒;
- 若是只需计算清除率(%),则不同试剂盒间试剂一的浓度须控制好(可通过空白管 OD 值判定,将较高的一批试剂一继续加无水乙醇稀释到和其它试剂一同一水平),否则会有较大的误差。
- 本试剂盒仅用于科研。