

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(货号: G0128W 微板法 96 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×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 19mL 无水乙醇充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃ 避光保存;
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、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℃ 下杀青 3min, 然后 60℃ 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℃, 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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 517nm。

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。

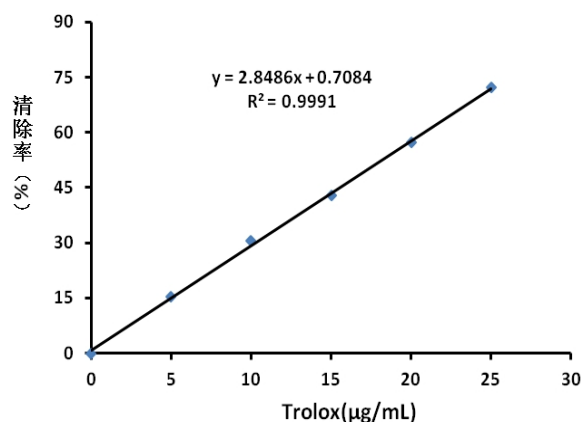
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管
样本	150	150	
80% 甲醇		150	150
工作液	150		150
混匀, 室温 (25℃) 避光静置 30min; 12000rpm, 室温离心 5min, 取 200μL 至 96 孔板中, 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： $y = 2.8486x + 0.7084$ ； x 是标准品 Trolox 浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）， y 是清除率（%）。



2、DPPH 自由基清除率 (%) = $[(1 - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div A_{\text{空白}}) \times 100]$ %

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：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ = 0.351 \times (清除率 - 0.7084) \div W \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D$$

5、按细菌/细胞计算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ = 0.0007 \times (清除率 - 0.7084) \div W \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D$$

6、液体样本：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox/mL}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div V_1 \times D \\ = 0.351 \times (清除率 - 0.7084) \times D$$

举例：若清除率是 70%，则用 70 代入公式计算，即：

$$\text{DPPH 自由基清除能力 } (\mu\text{g Trolox/mL}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V_1] \div V_1 \times D$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----反应中样品体积，150 μL =0.15 mL；

W----样品质量，g；

Trolox 分子量----250.29

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（0.5mg/mL）：临用前加 2mL 甲醇，充分溶解混匀。
- 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 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。