

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC4755

规格: 100T/48S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 80 mL×1 瓶	2-8°C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°C保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8°C保存

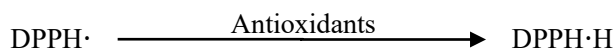
溶液的配制:

- 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 4.05 mL 试剂一振荡溶解, 用不完的试剂可于-20°C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°C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 的维生素 C 溶液, 2-8°C保存两周; 用于阳性对照。

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。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、无水乙醇、研钵/粉碎机、烘干箱、30~50 目筛和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本的制备 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

(1) 植物样本的制备: 将新鲜样本置于 60°C 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°C 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 10 μL 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：

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

2、样本的自由基清除率计算公式：

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

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。

实验实例：

1、 称取 0.05g 益母草叶片加入 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清后按测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 空白=1.229、A 对照=0.078、A 测定=0.300，根据计算公式得：

$$\text{DPPH 自由基清除率 } D\% = \frac{[A \text{ 空白} - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})]}{A \text{ 空白}} \times 100\% = 81.9\%。$$

2、 取 100 μ L 红酒加入 900 μ L 提取液进行样本处理，离心取上清后按测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 空白=1.229、A 对照=0.051、A 测定=0.898，根据计算公式得：

$$\text{DPPH 自由基清除率 } D\% = \frac{[A \text{ 空白} - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})]}{A \text{ 空白}} \times 100\% = 31.1\%。$$

相关系列产品：

BC1310/BC1315 总抗氧能力（T-AOC）检测试剂盒

BC1320/BC1325 羟自由基清除能力检测试剂盒

