



DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书(精简版)

(货号: A153-1-1 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、试剂组成与配置: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂名称	规格	保存	备注
试剂一	工作液粉剂×1 瓶	4°C 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备用(提前半小时配制); 用不完的试剂 4°C 避光保存
试剂二	标准品粉剂×1 支	4°C	制作标准曲线用

三、所需仪器和用品:

可见光分光光度计、1mL 比色皿(光径 1cm)、离心机、移液器、无水甲醇、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》,了解相关注意事项。

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)	600		400
工作液 (μL)		600	600

混匀, 室温 25°C 避光静置 30min, 4000 转/分钟离心 5 分钟, 波长 517nm, 吸取 800μL 至比色皿中, 用 80% 甲醇调零, 测定各管吸光度值。

(注: 做预试时若 A 测定 - A 对照接近或小于 0.05, 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)

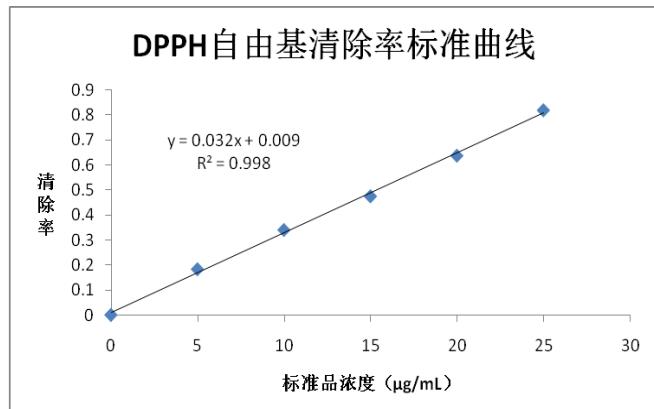
五、结果计算:

1、标准曲线制作:

(将标准品粉剂一支加 80% 甲醇 2mL 溶解, 即为 0.5mg/mL (Trolox) 标准应用液, 再用 80% 甲醇分别稀释成 5μg /mL、10μg /mL、15μg /mL、20μg /mL、25μg /mL 参照下表进行操作)

标准液浓度(μg /mL)	0	5	10	15	20	25
80% 甲醇	400					
标准液 (μL)		400	400	400	400	400
工作液 (μL)	600	600	600	600	600	600

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



2、样本 DPPH 自由基清除率 (%) = $(1 - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})) / A_{\text{对照}} \times 100\%$;

标曲 DPPH 自由基清除率 (%) = $(1 - (A_{(S)} - A_{(S_0)})) / A_{(S_0)} \times 100\%$
(式中 S 为各浓度标准管, S_0 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:

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

液体样本 DPPH 自由基清除能力 = $\frac{\text{代入标注曲线得相当于 Trolox 的浓度}}{\text{稀释倍数 (μg Trolox /mL)}} \times \text{稀释倍数 (mL)}$

六、注意事项:

1、样本测试前一定要进行预试, 一方面了解本批样品情况(或所需稀释倍数), 否则如果清除率太大($\geq 90\%$), 计算结果偏低; 另一方面也可熟悉实验流程, 避免样本与试剂的浪费;

2、标准曲线也可根据需要来调整标准浓度, 上限不大于 25μg /mL;

3、因乙醇易挥发, 所以不建议用酶标仪来读数;

4、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;

5、本试剂盒仅用于科研。