

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10739

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系吉至工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 60 mL×1 瓶 (自备)	常温保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制:

1、试剂一: 无水乙醇自备;

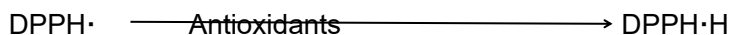
2、试剂五: 粉剂置于瓶内 EP 管中, 临用前加入 6.08 mL 试剂一振荡溶解, 用不完的试剂可于-20℃ 保存一月, 建议分装保存, 避免反复冻融; 临用前根据试验所需量按照试剂二: 试剂一 (V:V) = 4: 21 的比例配制成工作液, 现配现用, 用不完的工作液可于 4℃ 保存一周;

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 维生素 C 溶液, 4℃ 可保存两周, 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。



产品仅供科研!



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、恒温水浴锅、1 mL 玻璃比色皿、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、样本处理（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℃ 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，40℃ 水浴浸提 30 min。室温 10000 rpm 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

（2）红酒、果汁等液体样本：吸取 100 μ L 样本溶液加入 900 μ L 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、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 515 nm，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/L)	试剂三体积 (μ L)	提取液体积 (μ L)	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：实验中每个标准管需 25 μ L 试剂三

3、操作表：在 1.5 mL EP 管中分别加入下列试剂

试剂名称(μ L)	空白管	测定管	对照管	阳性对照管
上清液	-	25	25	-
试剂三	-	-	-	25
提取液	25	-	-	-
试剂一	-	-	975	-
工作液	975	975	-	975

旋涡混匀，室温避光静置 30 min，于 515 nm 处的吸光值分别记为 A 空白、A 测定、A 对照和 A 阳性对照。每个测定管需设一个对照管，空白管和阳性对照管只需测 1-2 次。

三、计算公式

1、阳性对照的自由基清除率计算公式：

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

2、样本的自由基清除率计算公式：

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

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，测得 A 空白=1.037、A 对照=0.088、A 测定=0.228，根据计算公式得：



DPPH 自由基清除率 $D\% = \frac{[A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})]}{A_{\text{空白}}} \times 100\% = 86.5\%$ 。

2、取 100 μL 红酒加入 900 μL 提取液进行样本处理，离心取上清后按测定步骤操作，测得 A 空白 = 1.037、A 对照 = 0.012、A 测定 = 0.760，根据计算公式得：

DPPH 自由基清除率 $D\% = \frac{[A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})]}{A_{\text{空白}}} \times 100\% = 27.9\%$ 。

3、称取 0.05g 枸杞加入 1mL 提取液进行样本处理，离心取上清稀释 20 倍后按测定步骤操作，测得 A 空白 = 1.037、A 对照 = 0.005、A 测定 = 0.829，根据计算公式得：

DPPH 自由基清除率 $D\% = \frac{[A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})]}{A_{\text{空白}}} \times 100\% = 20.5\%$ 。

