

DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

(分光法 48 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×2 支 空瓶×2 瓶 | 4℃保存 | 用前甩几下 EP 管使试剂落入底部，向一支 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇溶解后全部转移至一个棕色空瓶中，再向该 EP 管中加入 0.5mL 无水乙醇涮洗后全部转移至该棕色瓶中（可分别再用 0.5mL 无水乙醇涮洗该 EP 管 2 次），最后再加 17mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀做为 工作液 待用（总体积为 19mL）；用不完的试剂 4℃避光保存（配制好的工作液最好一个月内用完）。 |
| 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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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（10⁴）：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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 517nm，无水乙醇调零。

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。

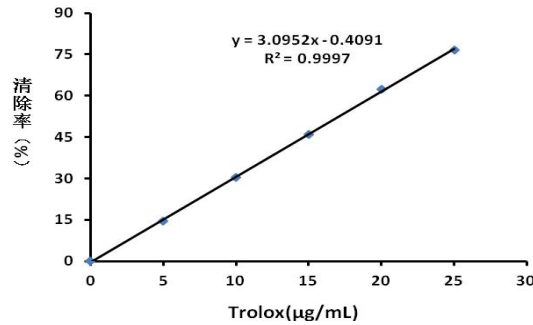
③ 在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 空白管 (仅做一次) |
|---|-----|-----|------------|
| 样本 | 400 | 400 | |
| 80%甲醇 | | 600 | 400 |
| 工作液 | 600 | | 600 |
| 混匀, 室温(25°C)避光静置 30min, 12000rpm, 室温离心 5min, 取 800μL 至玻璃比色皿中, 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: $y = 3.0952x - 0.4091$; 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 测定-A 对照)÷A 空白)×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:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{(\text{清除率} + 0.4091) \div 3.0952 \times V_1}{(V_1 \div V \times W) \times D} = 0.323 \times (\text{清除率} + 0.4091) \div W \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = \frac{(70 + 0.4091) \div 3.0952 \times V_1}{(V_1 \div V \times W) \times D}$$

5、按细菌/细胞计算:

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

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

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

6、液体样本:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = \frac{(\text{清除率} + 0.4091) \div 3.0952 \times V_1}{V_1 \times D} = 0.323 \times (\text{清除率} + 0.4091) \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\mu\text{g Trolox/mL}) = \frac{(70 + 0.4091) \div 3.0952 \times V_1}{V_1 \times D}$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 400μL=0.4 mL;

W---样品质量, g;

500---细胞数量, 万;

Trolox 分子量---250.29;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL): 称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管, 再加 2mL 甲醇充分溶解, 即 1mg/mL 标准品, 备用。
- 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, 25μg/mL。
- 3 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。