

# DPPH 自由基清除能力试剂盒说明书

( 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×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 1 支棕色空瓶中，再向 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 EP 管 2 次），最后再加 10.5mL 无水乙醇至该棕瓶中混匀做为 <b>工作液</b> 待用（总体积为 12.5mL）；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：

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 1mL80%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<sup>4</sup>)：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。

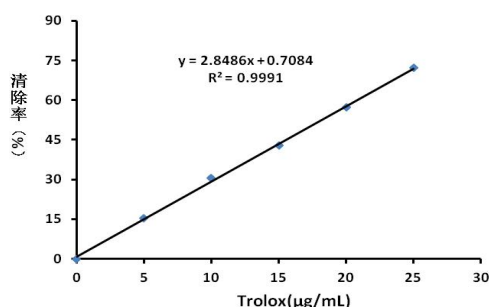
③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管 (仅做一次)
样本	150	150	
80%甲醇		150	150
工作液	150		150
混匀, 室温 (25°C) 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:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ = 0.351 \times (清除率 - 0.7084) \div W \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D$$

5、按细菌/细胞计算:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox}/10^4 \text{ cell}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ = 0.0007 \times (清除率 - 0.7084) \div 500 \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/g 鲜重}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

6、液体样本:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/mL}) = [(清除率 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div V1 \times D \\ = 0.351 \times (清除率 - 0.7084) \times D$$

举例: 若清除率是 70%, 则用 70 代入公式计算, 即:

$$\text{DPPH 自由基清除能力} (\mu\text{g Trolox/mL}) = [(70 - 0.7084) \div 2.8486 \times V1] \div V1 \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---反应中样品体积, 150μL=0.15 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。