

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0865

Size: 100T/48S

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

DPPH 自由基有单电子，其醇溶液呈紫色，在 515nm 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，515nm 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。

三、需自备的仪器和用品：

恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	无水乙醇 30mL×1 瓶	室温保存	自备
试剂二	粉剂×1 支(1.5 mL EP管放于8mL 试剂瓶中)	4℃保存	临用前加入4.05mL 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；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；
试剂三	粉剂×1 支, 10mg 维生素 C	4℃避光保存	临用前加入 1mL 提取液，充分振荡溶解；配成 10mg/mL 的维生素 C 溶液，用于阳性对照。

五、操作步骤：

● 样品的制备：

(1) 植物样本的制备：将新鲜样品置于 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 1mL 提取液后置于 40℃水浴锅中浸提 30min；10000rpm 室温离心 10min，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 10000rpm 离心 10min，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 5mg/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）。

● 测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 515nm，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；若需要清除率约为 100% 的阳性对照, 则建议将 10mg/mL 维生素 C 溶液用提取液配制成大于 0.3mg/mL 的维生素 C 溶液待用。

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	—
标准溶液	—	—	—	10
提取液	10	—	—	—
试剂一	—	—	190	—
工作液	190	190	—	190

混匀后室温避光静置 30min。测定 515nm 处的吸光度。空白管、对照管、标准管和测定管的吸光值分别记为 A 空、A 对、A 阳性对照管和 A 测。空白管只需测 1-2 次。

六、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：

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

七、注意事项：

1、不同样本清除 DPPH 自由基的能力可能相差很大，如果要比较不同样品的 DPPH 自由基清除能力，建议对于同一批样品加入等量的样品，红酒、组织匀浆、果汁等液体样品加入同样体积，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、样品建议当天提取当天检测。