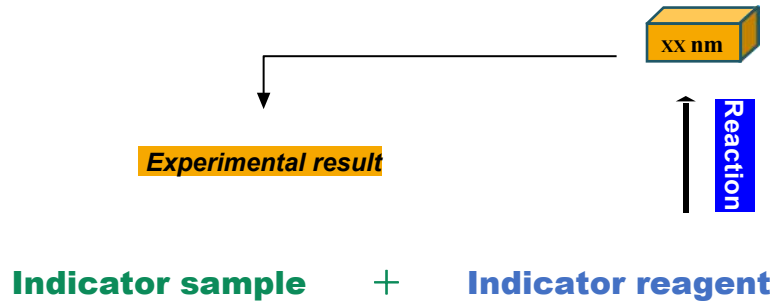
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0867　　规格：50管/24样

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	无水乙醇 60 mL×1 瓶	室温保存	自备
试剂二	粉剂×1 支（0.6 mL EP 管放于 8 mL 试剂瓶中	4℃保存	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；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，10 mg 维生素 C	4℃保存	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，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。

自备实验用品：

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、样品的制备

a. 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 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。

b. 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 10000 rpm 离心 10 min，取上清，置冰上待测。

c. 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；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。

3、操作表：在 1.5 mL 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	-	25	25	-
标准溶液	-	-	-	25
提取液	25	-	-	-
试剂一	-	-	975	-
工作液	975	975	-	975
混匀后室温避光静置 30 min，于 515 nm 处的吸光度。空白管、阳性对照管、对照管和测定管的吸光值分别记为 A 空白、A 阳性对照、A 对照和 A 测定。空白管只需测 1-2 次。				

三、计算公式

1、阳性对照的自由基清除率计算公式：

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

2、样本的自由基清除率计算公式：

DPPH 自由基清除率 D% =[[A 空白-(A 测定-A 对照)]÷A 空白]×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。