

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC4755

规格: 100T/48S、200T/96S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
提取液	液体 80 mL×1 瓶	液体 80 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	自备试剂	自备试剂	-
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃保存

100T 溶液配制:

- 1、试剂一: 自备无水乙醇, 大约需要 25mL, 常温保存; 试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶, 仅做分装使用, 请自行标注试剂名称。
- 2、试剂二: 粉剂置于瓶内玻璃瓶中。临用前加入 4.05 mL 试剂一振荡溶解, 用不完的试剂可于-20℃保存 1 个月, 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 2-8℃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 的维生素 C 溶液, 2-8℃保存两周; 用于阳性对照的测定。

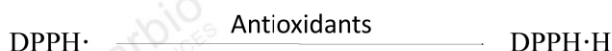
200T 溶液配制:

- 4、试剂一: 自备无水乙醇, 大约需要 40mL, 常温保存; 试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶, 仅做分装使用, 请自行标注试剂名称。
- 5、试剂二: 粉剂置于瓶内玻璃瓶中。临用前加入 8.1 mL 试剂一振荡溶解, 用不完的试剂可于-20℃保存 1 个月, 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 2-8℃保存一周。
- 6、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 的维生素 C 溶液, 2-8℃保存两周; 用于阳性对照管的测定。

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。



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。

需自备的仪器和用品:





可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、台式离心机、无水乙醇 (>98%, AR)、研钵/粉碎机、烘干箱、30~50 目筛和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本的制备 (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°C 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 提取液后置于 40°C 水浴锅中浸提 30 min; 10000 rpm 室温离心 10 min, 取上清, 置于冰上待测。
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. 分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 515 nm, 分光光度计用无水乙醇调零。
2. 阳性对照的准备: 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/mL)	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: 下述实验中每个阳性对照管需 10 μ L 试剂三 (维生素 C 溶液) (注意不要在此步骤直接检测吸光度)。

3、操作表: 在 96 孔板或 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	-	10	10	-
试剂三 (维生素 C 溶液)	-	-	-	10
提取液	10	-	-	-
试剂一	-	-	190	-
工作液	190	190	-	190

涡旋混匀, 常温避光静置 30 min, 于 515 nm 处的吸光度。分别记为 A 空白、A 测定、A 对照、A 阳性对照。每个测定管需设一个对照管。阳性对照管和空白管只需测 1-2 次。

注: 维生素 C 浓度-A 阳性对照作图得到的是一条 S 曲线。



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，用 96 孔板测得 A 空白=1.229、A 对照=0.078、A 测定=0.300，根据计算公式得：
$$\text{DPPH 自由基清除率 } D\% = [(A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})) \div A_{\text{空白}}] \times 100\% = 81.9\%。$$
2. 取 100μL 红酒加入 900μL 提取液进行样本处理，离心取上清后按测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 空白=1.229、A 对照=0.051、A 测定=0.898，根据计算公式得：
$$\text{DPPH 自由基清除率 } D\% = [(A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})) \div A_{\text{空白}}] \times 100\% = 31.1\%。$$

相关发表文献：

- [1] Wu X, Zhu H, Song C, Tan Q, Zhao Y, Shang L. Breadmaking-Inspired Antioxidant Porous Yeast Microcarriers for Stem Cell Delivery in Diabetic Wound Treatment. *Adv Mater.* 2024 Jan;36(2):e2309719. doi: 10.1002/adma.202309719. Epub 2023 Nov 27. PMID: 37985138.
- [2] Xu L, Luo Y, Du Q, Zhang W, Hu L, Fang N, Wang J, Liu J, Zhou J, Zhong Y, Liu Y, Ran H, Guo D, Xu J. Magnetic Response Combined with Bioactive Ion Therapy: A RONS-Scavenging Theranostic Nanoplatfor for Thrombolysis and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *ACS Nano.* 2023 Mar 28;17(6):5695-5712. doi: 10.1021/acsnano.2c12091. Epub 2023 Mar 17. PMID: 36930590.
- [3] Feng C, Xiong Z, Sun X, Zhou H, Wang T, Wang Y, Bai HX, Lei P, Liao W. Beyond antioxidation: Harnessing the CeO₂ nanoparticles as a renoprotective contrast agent for in vivo spectral CT angiography. *Biomaterials.* 2023 Aug;299:122164. doi: 10.1016/j.biomaterials.2023.122164. Epub 2023 May 16. PMID: 37229807.
- [4] Xue SJ, Li XC, Huang X, Liu J, Li Y, Zhang XT, Zhang JY. Diversity investigation of cultivable yeasts associated with honeycombs and identification of a novel *Rhodotorula toruloides* strain with the robust concomitant production of lipid and carotenoid. *Bioresour Technol.* 2023 Feb;370:128573. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128573. Epub 2023 Jan 2. PMID: 36603754.
- [5] Wu Y, Zhou Z, Zhang M, Li S, Sun M, Song Z. Hollow manganese dioxide-chitosan hydrogel for the treatment of atopic dermatitis through inflammation-suppression and ROS scavenging. *J Nanobiotechnology.* 2023 Nov 17;21(1):432. doi: 10.1186/s12951-023-02174-w. PMID: 37978544; PMCID: PMC10655375.





相关系列产品:

- BC1310/BC1315 总抗氧能力 (T-AOC) 检测试剂盒
- BC1320/BC1325 羟自由基清除能力检测试剂盒
- BC4770/BC4775 ABTS 自由基清除能力检测试剂盒
- BC1410/BC1415 超氧阴离子清除能力检测试剂盒
- BC5150/BC5155 水溶性物质羟自由基清除能力检测试剂盒

