DPPH 自由基清除率检测试剂盒(比色法)

产品简介：

在生命活动的代谢过程中不断产生各种自由基，而自由基的积累会使机体产生氧化损伤而引起衰老、肿瘤、 中风、心肌炎和糖尿病等慢性疾病，在众多自由基中 2，2-二苯基-1-苦基苯肼(DPPH)是一种较稳定的自由基，当有自由基清除剂存在时颜色由紫色向黄色转变，吸光度随之变小。

DPPH 自由基清除率检测试剂盒(比色法)又称氮自由基清除能力检测试剂盒 或氮自由基清除率检测试剂盒，其检测原理是 DPPH 自由基是一种较稳定的含氮自由基， 含一个单电子，溶于乙醇后溶液呈紫色，在 517nm 下有强吸收，如果有其他物质提供一个 电子与此单电子配对，溶液会褪色，褪色程度与接受电子的量呈正比，通过吸光度下降的程 度来反应样品的氮自由基清除能力，主要用于检测血清、植物组织、抗氧化类食品、保健品及药品等样本。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成：

编号 / 名称	GCTO1143 50T	GCTO1143 100T	Storage
试剂(A): 氮自由基提取液	50ml	100ml	RT
试剂(B): DPPH 溶液	50ml	100ml	4℃ 避光
试剂(C): 维生素 C	10mg	10mg	4℃
使用说明书	1 份		

自备材料：

1、 蒸馏水、无水乙醇

2、 实验材料： 植物组织(芹菜、绿豆、玉米等叶片)、血液、组织样本等

3、 研钵或匀浆器或粉碎机或超声破碎机

4、 离心机、离心管

5、 恒温水浴锅、恒温干燥箱

6、 电子天平、 30~50 目筛

7、 分光光度计、 比色皿

操作步骤(仅供参考)：

1、 准备样品：

①植物样品： 取新鲜植物样本，清洗干净，研钵研碎(粉碎)，干燥箱烘干后过筛，称取

0.05g 样品，加入 0.8ml 氮自由基提取液，40℃水浴浸提 30~60min，10000rpm 离心 10min，上清液待用，4℃保存备用(亦可参考相关资料提取方法提取)。

②血浆、血清和尿液样品：血浆(用肝素或枸橼酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝) 4 ℃ 5000rpm 离心 10min，取上清液待用；血清或尿液样品可直接测定。

③细胞样品：按每 5× 10^6 个细胞加入 0.8ml 氮自由基提取液，超声破碎(功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，10000rpm 离心 10min，取上清液待用。

④果汁、葡萄酒等样品：按样品：氮自由基提取液=1：9 的比例震荡混匀，10000rpm 离心 10min，上清液待用，4℃保存备用。

⑤高活性样品：如果样品中有效浓度较高，可用提取液进行恰当的稀释。

2、 配制维生素 C 溶液：将一支 10mg 维生素 C 充分溶解于 1ml 氮自由基提取液中，即成 10mg/ml 维生素 C 溶液；可分成 0.1ml 的小份，-20℃保存。

3、 配制 Vc 标准工作液：如需测线性关系，建议用氮自由基提取液将 10mg/ml 维生素 C 溶液稀释至 20、15、10、8、6、4、2 μg/ml 的 Vc 标准工作液；如需清除率约为 100%的阳性对照，建议选用大于 30μg/ml 的 Vc 标准工作液。

4、 分光光度计开机预热 30min，调节波长 517nm(500~530nm 亦可)，无水乙醇调零。

5、 DPPH 加样：按照下表设置空白管、样本测定管、样本对照管、阳性对照管，溶液应按照顺序依次加入，混匀，室温避光静置 30min。

加入物(ml)	空白管	样本测定管	样本对照管	阳性对照管(标准管)
氮自由基提取液	0.2	_	_	_
上清液	_	0.2	0.2	_
Vc 标准工作液	_	_	_	0.2
无水乙醇	0.9	0.9	1.8	0.9
DPPH 溶液	0.9	0.9	_	0.9

6、 OD 值测定：将各管溶液依次加入到比色皿中，用分光光度计检测各管吸光度值，依次记为 A_0、A_1、A_2、A_3。

计算：

阳性对照· DPPH 清除率(%)= (A_0 - A_3)/A_0 × 100%

待测样本· DPPH 清除率(%)=[A_0-(A_1 - A_2)]/A_0 × 100%

备注： A_0 =空白管的吸光度值

A_1 =样本测定管的吸光度值

A_2 =样本对照管的吸光度值

A_3 =阳性对照管的吸光度值

注意事项：

1、 正式测定之前建议选择 2~3 个预期差异较大的样本做预实验。

2、 实验材料应尽量新鲜， 当天提取当天测定。

3、 不同样本清除 DPPH 自由基的能力差异很大。

4、 如样本 DPPH 清除率大于 90%， 应用提取液稀释； 如样本 DPPH 清除率小于 5%， 应提高样本用量以提高有效成分浓度。

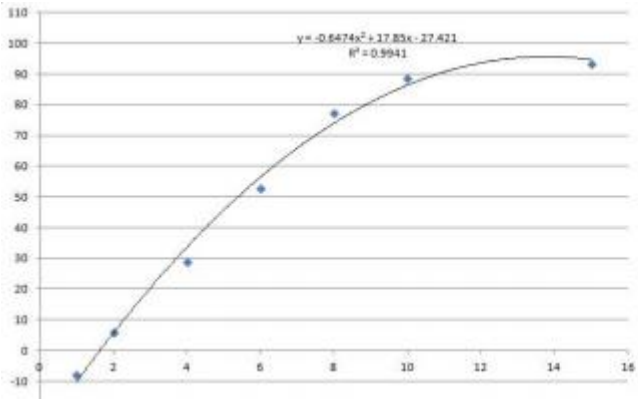
5、 样品中不宜添加 Triton、 DTT 等可能影响氧化还原反应的成分。

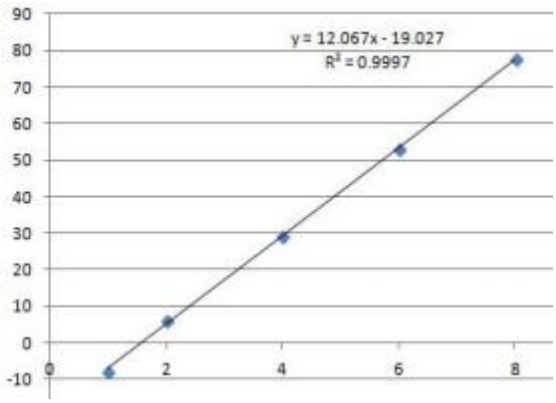
6、 为了您的安全和健康， 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期： 6 个月有效； 4℃运输， 4℃保存。

附录： 标准曲线制作： 在室温条件下按说明书操作， 对系列 Vc 标准工作液(20、15、10、8、 6、4、2、 1 μg/ml) 进行吸光度的测定， 其数值及标准曲线如下(仅供参考)：

	初始吸光度值	调零吸光度值	· DPPH 清除率
无水乙醇	0.032		
空白管	0.71	0.678	
Vc 标准 20μg/ml	0.075	0.043	93.65782
Vc 标准 15μg/ml	0.077	0.045	93.36283
Vc 标准 10μg/ml	0.108	0.076	88.79056
Vc 标准 8μg/ml	0.184	0.152	77.58112
Vc 标准 6μg/ml	0.35	0.318	53.09735
Vc 标准 4μg/ml	0.512	0.48	29.20354
Vc 标准 2μg/ml	0.669	0.637	6.047198
Vc 标准 1μg/ml	0.762	0.73	-7.66962





由上图可知： Vc 标准工作液在 2~8 μg/ml 时线性关系良好， ·DPPH 清除率与 Vc 浓度呈正相关， 当 Vc 浓度大于 10 即开始有偏差， Vc 浓度大于 12 时， · DPPH 清除率大于 90%。