

## 总抗氧化能力(DPPH 法)试剂盒

分光光度法 50 管/48 样

**注 意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

### 研究意义：

测定对象中各种抗氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平。在生物学、医学和药学研究中常常检测血浆、血清、唾液、尿液等各种体液，细胞或组织等裂解液、植物或中草药抽提液及各种抗氧化物(antioxidant)溶液的总抗氧化能力。

### 测定原理：

DPPH 为稳定的自由基，溶于甲醇、乙醇等极性溶剂中，在 515nm 处有最大吸收。向 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时，会发生脱色反应，因此可用吸光度的变化并以 Trolox 作为对照体系量化抗氧化物质的抗氧化能力。

### 自备实验用品：

恒温水浴锅、低温离心机、分光光度计、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，使用前预冷。

试剂一：液体 60mL×1 瓶，避光保存。

### 样品的制备：

(1) 血清、血浆、唾液或尿液等液体样品血浆（制备时可以使用肝素或柠檬酸钠抗凝，不宜使用 EDTA 抗凝）4℃，5000rpm 离心 10min，取上清待测。血清、唾液或尿液样品直接用于测定，也可以-80℃冻存（不宜超过 30d）后再测定。

### (2) 组织样品

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

### (3)细胞样品

按照细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 操作步骤：

1、 分光光度计预热 30min，调节波长至 515nm。

2、操作表（在 EP 管中反应）

	测定管	对照管
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）		50
样品（ $\mu\text{L}$ ）	50	
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	950	950
充分混匀，室温避光反应 20min，于 1mL 玻璃比色皿测定 515nm 吸光值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 测定注意：空白管		

只需测定一次，若 A 测定小于 0.2，需用提取液稀释后检测。

**总抗氧化能力计算公式：**

**1、以自由基清除率表示：**

DPPH 自由基清除率（%）=  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}) \div A_{\text{空白}} \times 100\%$

**2、以标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量表示：**

标准曲线： $y = 1.4144x - 0.0081$   $R^2 = 0.9977$  x: Trolox 浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

y: 吸光值差值 A

单位定义: 用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的  $\Delta\text{DPPH}$  自由基清除能力。

**(1) 按样本质量计算**

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  鲜重) =  $(A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W)$   
 $(A + 0.0081) \div W$

**(2) 按样本蛋白浓度计算**  $= 0.707 \times \Delta A$

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox/mg prot}$ ) =  $(A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{Cpr})$

$= 0.707 \times (A + 0.0081) \div \text{Cpr}$

**(3) 按细胞计算**  $\Delta A$

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox}/10^4\text{cell}$ ) =  $(A + 0.0081) \div 1.4144 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)})$

$\Delta A$

**(4) 按液体体积计算**  $= 0.707 \times (\Delta A + 0.0081) \div \text{细胞数量 (万个)}$

总抗氧化能力 ( $\mu\text{mol Trolox/mL}$ ) =  $(\Delta A + 0.0081) \div 1.4144 = 0.707 \times (A + 0.0081)$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; V 样: 反应中样品体积, 50  $\mu\text{L}$ ; W: 样品质量, g; Cpr:

样本蛋白浓度, mg/mL

**注意事项：**

1. 尽量避免使用在酸性条件下呈红色或接近红色的试剂，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
2. 样品中不宜添加 Tween、Triton 和 NP-40 等去垢剂和 DTT、巯基乙醇等影响氧化还原反应的还原剂。
3. 若液体样本为碱性，需要用提取液稀释至酸性后再检测。