

ABTS 自由基清除能力检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10744

规格：100T/48S

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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 80 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存
试剂三	液体 20 μL×1 支	4℃保存
试剂四	液体 1.5 mL×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂可分装-20℃保存，-20℃可保存两周；
- 2、试剂三工作液的配制：液体置于棕色试剂瓶中 EP 管内，临用前根据样本量按试剂三（μL）：蒸馏水（mL）=1μL:12mL 的比例配成试剂三工作液，现用现配，用不完的试剂放于 4℃保存；
- 3、试剂四工作液的配制：可先将试剂四-20℃分装保存。临用前根据样本量按试剂四：试剂一（V:V）=1:9 的比例配成试剂四工作液，现配现用，用不完的试剂放于-20℃可保存两周。
- 4、试剂五：粉剂置于试剂瓶内 EP 管中，含有 5 mg 维生素 C，临用前加入 2.8 mL 提取液，充分振荡溶解；配成 10 mmol/L 维生素 C 溶液，用于阳性对照。4℃可保存一周。
- 5、ABTS 工作液的配制：临用前根据试验所需量按试剂一：试剂二：试剂三工作液（V:V:V）=76:5:4 的比例配成 ABTS 工作液，现用现配，室温避光保存，**务必在 30 分钟内使用。**

产品说明：

ABTS 法可用于亲水性和亲脂性物质抗氧化能力测定，是使用最广泛的间接检测方法。ABTS 经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子 ABTS 自由基，在 405 nm 或 734 nm 处有最大吸收峰。被测物质加入 ABTS 自由基溶液后，所含抗氧化成分能与 ABTS 自由基发生反应而使反应体系褪色，405 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，通过测定吸光度下降的程度来反映样本清除 ABTS 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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

恒温水浴锅、可见分光光度计、微量玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、研钵/粉碎机、烘干箱、30~50 目筛和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、植物组织样本的制备：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 提取液后置于 40℃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 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。

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 ABTS 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 405 nm，蒸馏水调零。
2. 阳性对照的准备：若需要线性关系，建议将 10 mmol/L 的维生素 C 溶液用提取液配制成 1、0.8、0.6、0.4、0.2、1 mmol/L 的维生素 C 溶液待用；若需要清除率约为 90% 的阳性对照，则建议将 10 mmol/L 维生素 C 溶液用提取液配制成大于 1 mmol/L 的维生素 C 溶液待用。
3. 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	
不同浓度的 VC 溶液				10
水	10			
试剂四工作液	20	20		20
ABTS 工作液	170	170		170
试剂一			190	

充分混匀后室温避光静置 6 min。测定 405 nm 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 空白、A 对照、A 阳性对照和 A 测定。空白管只需测 1-2 次。

三、ABTS 自由基清除率的计算

1. 标准曲线的建立：

阳性对照的自由基清除率计算公式：

$$\text{ABTS 自由基清除率 } D_{\text{VC}}\% = [(A \text{ 空白} - A \text{ 阳性对照}) \div A \text{ 空白}] \times 100\%$$

2. 样本的自由基清除率计算公式：

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

注意事项：

- 1、不同样本清除 ABTS 自由基的能力可能相差很大，如果要比较不同样品的 ABTS 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。

实验实例：

- 1、取 0.05 g 辣椒加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，离心取上清后按照测定步骤操作，计算清除率得：

$$D\% = [A \text{ 空白} - (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})] \div A \text{ 空白} \times 100\% = [1.111 - (0.365 - 0.061)] \div 1.111 \times 100\% = 72.637\%。$$