

## 总抗氧化能力 (T-AOC)说明书 (FRAP 法) 试剂盒说明书

(货号: G0115F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

FRAP 法常用于血浆、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、或各种抗氧化物溶液的总抗氧化能力的检测。即在酸性环境下, 抗氧化物可以还原  $\text{Fe}^{3+}$ -三吡啶三吡嗪( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ)产生蓝色的  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, 随后在 590nm 测定蓝色的  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ 即可获得样品中的总抗氧化能力。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 4.5mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

### 三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、恒温水浴锅、低温离心机、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

### 四、总抗氧化能力测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取 0.1g 样本 (若是干样可取 0.02-0.05g), 加入 1mL 的 80%乙醇 (自备) 进行匀浆, 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次)。12000rpm, 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

##### ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80%乙醇 (自备) 进行匀浆; 匀浆后转入 2mL 离心管中; 于 60°C, 200-300W 条件下超声提取 30min (间隔 5min 振荡混匀一次); 12000rpm, 离心 10min, 取上清置冰上待测。

**【注】:** 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液 (mL) 为 1:1000~5000 比例进行提取。

##### ③ 液体样本: 水溶性样本可直接检测。若是油性样本, 可用 80%乙醇溶解后再取上清检测。

#### 2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长至 590nm, 蒸馏水调零。

② 显色液配置: 将试剂一、试剂二、试剂三按 10:1:1 的比例混合, 使用前 37°C 预温, 现配现用, 注意避光。

③ 不同样本抗氧化能力不一, 可先选取 2 个样本做检测, 若 A 测定超过 1.8, 需对样本用 80%乙醇稀释, 稀释倍数 D 代入公式计算。

④ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

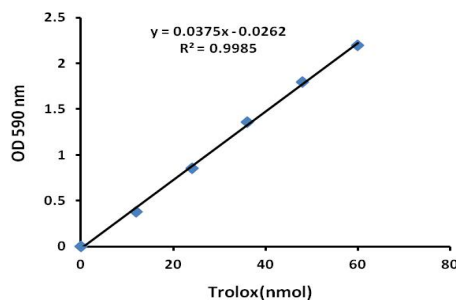
试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白管 (只做一次)
样本	75	0

蒸馏水	75	150
显色液	850	850
混匀后，室温 25°C，准确反应 10min，于 590nm 处读取吸光值 A； $\Delta A=A$ 测定-A 空白。		

【注】若 $\Delta A$  的值在零附近，可增加样本量 V1（如增至 15 $\mu$ L，则蒸馏水相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0375x - 0.0262$ ，x 是标准品 Trolox 摩尔质量（nmol），y 是 $\Delta A$ 。



2、定义：用从标准曲线上获得的抗氧化剂 Trolox 的量来表示样本的总抗氧化能力。

3、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375] \div (V1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.711 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

5、液体样本计算：

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div V1 \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---反应中样品体积，75 $\mu$ L=0.075 mL；

W---样品质量，g； Trolox 分子量---250.29；

D---稀释倍数，未稀释即为 1； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

### 【注意】：

1. 由于本方法是显蓝色测定吸光值，因此尽量避免使用在酸性条件下呈蓝色或接近蓝色的试剂，否则对本试剂盒的检测结果产生干扰。
2. 样本中不宜添加 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. 如果样品测定出来的吸光值在标准曲线范围以外，需把样品适当稀释或浓缩后再进行测定。
4. 如果样本中处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐，会干扰测定，不宜使用本测试方法。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（4 $\mu$ mol/mL=4nmol/ $\mu$ L）：临用前加 1mL 甲醇，充分溶解混匀。
- 2 把母液用提取液稀释成以下浓度梯度的标准品：0,0.16,0.32,0.48,0.64,0.8 nmol/ $\mu$ L。
- 3 按照测定管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线。