

## 羟自由基清除能力测定试剂盒说明书

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。

### 测定意义：

羟自由基作用于体内蛋白质、核酸、脂类等生物分子，造成细胞结构和功能受损，进而导致体内代谢紊乱引起疾病。羟自由基清除能力是样品抗氧化能力的重要指标之一，在抗氧化类保健品和药品研究中得到广泛应用。

### 测定原理：

$H_2O_2/Fe^{2+}$  通过 Fenton 反应产生羟自由基，将邻二氮菲- $Fe^{2+}$  水溶液中  $Fe^{2+}$  氧化为  $Fe^{3+}$ ，导致 536nm 吸光度下降，样品对 536nm 吸光度下降速率的抑制程度，反映了样品清除羟自由基的能力。

### 自备实验用品：

可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 16mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂二：液体 8 mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：液体 16mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 9mL×1 瓶，4℃ 保存。

### 样品的制备：

1. 组织：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。
2. 血清、果汁等液体样品可直接测定。
3. 提取物（或者药物）可配制成一定浓度，如 5 mg/mL。

### 操作步骤：

- 1、分光光度计预热 30min，调节波长至 536nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液配制：使用之前按照每管试剂一：试剂二：试剂三=300:150:300 (μL) 的比例配制，用多少配多少，混匀。
- 3、在 EP 管中加入如下试剂

	空白管	对照管	测定管
工作液 (μL)	750	750	750
混匀，防止局部颜色过浓			
样品 (μL)			150
试剂四 (μL)		150	150
H <sub>2</sub> O (μL)	300	150	
混匀、37℃ 保温 60min，8000g 25℃ 离心 5min，吸取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中测定 536nm 处吸光值，空白管、对照管和测定管的吸光值分别记为 A 空、A 对和 A 测。			

**注意：**空白管和对照管只需测定一次。

**计算公式：**

羟自由基清除率  $D\% = (A_{\text{测}} - A_{\text{对}}) \div (A_{\text{空}} - A_{\text{对}}) \times 100\%$

A 空、A 对、A 测：空白管、对照管和测定管的吸光值。

**注意事项：**

为了比较不同样品羟自由基清除能力，对于同一批样品必须加入等量的样品，血清、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。