

总抗氧化能力（T-AOC）（FRAP 法）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-KY005-48 分光法 48 样）

有效期：6 个月

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 Fe^{3+} -三吡啶三吡啶 (Fe³⁺-TPTZ) 产生蓝色的 Fe²⁺-TPTZ，随后在 590nm 测定蓝色的 Fe²⁺-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℃保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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℃，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℃，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（10⁴个）：提取液（mL）为 1000~5000:1 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℃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。

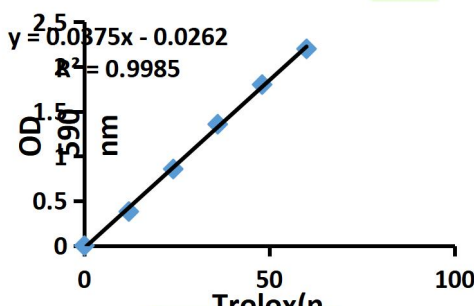
④ 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入：

试剂名称 (μL)	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; $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】 若 ΔA 的值在零附近, 可增加样本量 V_1 (如增至 15μL, 则蒸馏水相应减少), 则改变后的 V_1 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 ΔA 。



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:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\text{nmol Trolox}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.711 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

5、液体样本计算:

$$\begin{aligned} \text{总抗氧化能力}(\mu\text{mol Trolox/ mL}) &= [(\Delta A + 0.0262) \div 0.0375 \times 10^{-3}] \div V_1 \times D \\ &= 0.36 \times (\Delta A + 0.0262) \times D \end{aligned}$$

V ---加入提取液体积, 1 mL; V_1 ---反应中样品体积, 75μL=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。

【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. 若样本处理过程中施加了较高浓度的铁盐或亚铁盐会干扰测定, 不宜用本测试方法。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (4μmol/mL=4nmol/μL): 称取 2mg 标准品即 Trolox 至一新 EP 管, 再加 2mL 乙醇溶解充分溶解, 即 4μmol/mL 标准品, 备用。
- 2 把母液用乙醇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/μL 即 μmol/mL。
- 3 按照测定管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。