

T/AHFIA

安徽省食品行业协会团体标准

T/AHFIA XXX -2021

白酒及配制酒中自由基清除能力的测定 酶 标仪法

Determination of Free Radical Scavenging Capacity in Liquor and Mixed Liquor
Microplate reader

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

安徽省食品行业协会

发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由安徽古井贡酒股份有限公司提出。

本文件由安徽省食品行业协会归口。

本文件起草单位：安徽古井贡酒股份有限公司、安徽瑞思威尔科技有限公司、安瑞安信科检测科技有限公司、安徽明光酒业股份有限公司等。

本文件主要起草人：

白酒及配制酒中自由基清除能力的测定 酶标仪法

1 范围

本标准规定了白酒及配制酒中自由基清除能力的测定 酶标仪法。

本标准适用于白酒及配制酒中自由基清除能力的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

自由基 Free Radicals

是指化合物的分子在光热等外界条件下，共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团。

3.2

自由基清除能力

用自由基清除率表示，即试验样品清除自由基的百分比。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 DPPH: 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)。

4.2 OD 值: 利用酶标仪在 517nm 处测得的样品吸光度。

5 方法原理

DPPH是一种暗紫色棱柱状结晶，在无水乙醇溶液中呈深紫色，DPPH·自由基在可见光区517nm处具有较强吸收峰。本方法中DPPH提供的1个稳定DPPH·自由基与酒样中的成分提供的1个电子配对结合，使DPPH·自由基的特征性紫色减弱甚至消失，溶液颜色变为浅紫色或无色，DPPH溶液褪色程度与其接受的

电子数呈线性相关，即在一定浓度范围内，吸光度与自由基的含量成正比，符合朗伯-比尔定律，所以根据颜色变化的程度判断自由的清除能力。由此可评价试验样品的自由基清除能力。

6 试剂与材料

6.1 试剂

- 6.1.1 无水乙醇：分析纯。
- 6.1.2 DPPH（Sigma 公司）。

6.2 试剂配制

- 6.2.1 DPPH 储备液：精确称取 5 mg DPPH，适量无水乙醇溶解，然后用无水乙醇定容至 50 mL，该溶液应现配现用。
- 6.2.2 DPPH 工作液：量取 DPPH 储备液（5.2.1）15mL 于 25mL 容量瓶中，加无水乙醇至刻度，摇匀，避光静置 10min。

7 仪器与设备

本标准中的“仪器”，为分析中所必需的仪器，一般实验室仪器不再列入。

- 7.1 酶标仪：波长范围 400nm-800nm，配 96 孔板（Corning）。
- 7.2 分析天平：感量 0.01 mg。
- 7.3 可调节移液枪：1mL 和 20 μ L。

8 试验步骤

8.1 样品制备

准备充足均匀的待测酒样、无水乙醇和DPPH溶液，按照表1的加样对象和体积制备样品。

表1 样品加液要求

	溶剂本底孔	DPPH溶液孔	样品试验孔	样品本底孔
样品溶液（μL）			20	20
无水乙醇（μL）	220	20		200
DPPH溶液（μL）		200	200	
平行次数	3/样	3/样	3/样	3/样

8.2 测定

- 8.2.1 准备好 96 孔板，各孔中样品加液要求参照表 1 加样结束后，室温下避光反应 30min，在 517nm 处测定，所有孔的加样体积必须一致。
- 8.2.2 溶剂本底孔：向溶剂本底孔中加入 200 μ L 无水乙醇，再加入无水乙醇 20 μ L，每个溶剂本底做 3 个重复孔；
- 8.2.3 DPPH 溶液孔：向 DPPH 溶液孔中加入 200 μ L 的 DPPH 溶液，然后加入 20 μ L 无水乙醇，每个试验样做 3 个重复孔；

8.2.4 样品试验孔：向样品孔中加入 200 μL 的 DPPH 溶液，然后加入 20 μL 试验样品，每个试验样做 3 个重复孔；

8.2.5 样品本底孔：向样品本底孔中加入 200 μL 无水乙醇，再加入 20 μL 试验样品，每个溶剂本底做 3 个重复孔。

9 结果计算

按式（1）计算试样DPPH的自由基清除率：

$$X(\text{清除率}\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_0}{D_i - D_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

X ——样品自由基清除率；

A_i ——样品孔吸光度，即样品与DPPH反应后溶液的吸光度；

A₀ ——样品本底吸光度，即无DPPH时样品的吸光度；

D_i ——DPPH孔吸光度，即未加样品时DPPH溶液的吸光度；

D₀ ——溶剂本底吸光度，即无DPPH时溶剂的吸光度。

所得结果应表示至小数点后一位。

10 结果报告

10.1 试验样品的 DPPH 自由基清除率应包含重复测定值间的标准差，即表示为清除率平均值±标准差（SD）。

10.2 对于自由基清除能力较强而不适用于本方法的试验样可适当稀释，表述试验样的自由基清除能力时应包含稀释倍数。

11 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。