

化学反应法在活性氧测定中的应用及研究进展

邹轶 彭健*

(华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070)

摘要: 活性氧由于在人的衰老和疾病中扮演了重要的角色,在现代医学和分子生物学领域越来越受到人们的关注。体内活性氧水平作为机体遭受氧化损伤的重要指标,是区分生理和病理状态的关键问题。但活性氧由于反应活性高和半衰期短的特点,在体内和体外的准确测定仍然是一项难题。本文从活性氧化学反应法的测定原理和研究进展 2 个方面对分光光度法、化学发光法、荧光光度法和电子自旋共振法等 4 个化学反应方法进行综述,比较这几种方法在实际应用中的不同。

关键词: 活性氧;分光光度法;化学发光法;荧光光度法;电子自旋共振法

中图分类号: O653

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)09-1946-08

正常的生理环境下,由于线粒体内氧化还原链的作用,占体内总耗氧量 2% 的氧气转化成超氧化阴离子自由基($O_2^- \cdot$)和一氧化氮自由基($NO \cdot$)等活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[1],由于体内抗氧化系统的作用,机体产生的 ROS 可被及时地清除。ROS 在体内维持生成和降解的动态平衡,从而保证机体的正常生理功能^[2]。当机体遭受感染、应激、过度的运动、有害的环境污染物、紫外光照等时, $O_2^- \cdot$ 、 $NO \cdot$ 、羟自由基($\cdot OH$)、烷氧自由基($RO \cdot$)、氢过氧化物自由基($ROOH \cdot$)、单态氧(1O_2)、碳酸盐负离子自由基($CO_3^- \cdot$)和过氧化氢(H_2O_2)等 ROS 在体内所占比例大幅提升^[3]。当 ROS 在体内生成过多或清除过程受阻时,其数量快速增加,形成累积时高氧化活性的 ROS 会对体内生物大分子,如 DNA、碳水化合物、蛋白质和脂类发生氧化反应,对机体造成氧化损伤^[1]。由于 ROS 对机体的氧化损伤在疾病和衰老中扮演了重要的角色^[4],因此,ROS 在医学和分子生物学领域的研究越来越受到人们的

关注。对于直接影响机体的 ROS,由于 ROS 具有寿命短、反应活性高(表 1)的特点,对于 ROS 的准确测定仍然很困难^[5-6]。因此,简单、重复性好、敏感且经济有效的 ROS 测定方法在现代自由基分子生物学中具有重要的意义。根据 ROS 的理化特性,目前用于 ROS 测定的主要方法有化学反应法、捕捉法、酶联免疫吸附测定(ELISA)法、高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法、免疫印迹法、电洗脱法、等电聚焦法、伏安法等^[7-9]。其中,化学反应法由于其具有灵敏度高、廉价和操作简便的特点,越来越广泛的被用于生物反应中 ROS 的测定。化学反应法是指由于 ROS 具有较高的反应活性,能够与许多不同的化合物发生化学反应,产生各种不同的反应生成物。根据这些反应生成物或反应物的变化程度,通过不同的分析仪器进行检测,就可以对 ROS 进行定量或者定性分析^[10]。目前主要的化学反应法有分光光度法、化学发光法、荧光光度法和电子自旋共振(ESR)法。

收稿日期:2013-04-01

基金项目:国际合作项目“绿色猪肉可持续生产的关键技术与集成”(2013DFG32510);国家公益性行业(农业)科研专项“猪运输应激响应及抗应激营养调控技术”(201003036-02);湖北省农业科技创新中心创新岗位(2007-062);中央高校基本业务费(2011PY019)

作者简介:邹轶(1987—),男,湖北武穴人,硕士研究生,从事动物营养与饲料科学研究。E-mail:juicewater@126.com

* 通讯作者:彭健,教授,博士生导师,E-mail:pengjian@mail.hzau.edu.cn

表 1 主要活性氧的半衰期
Table 1 Half-life of major ROS

项目 Item	氢过氧化物 自由基 ROOH·	过氧化氢 H ₂ O ₂	超氧化阴离子 自由基 O ₂ ⁻ ·	单态氧 ¹ O ₂	烷氧自由基 RO·	羟自由基 ·OH
半衰期 Half-life (37 °C)	1 × 10 ⁻²	10	1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁹

1 分光光度法

分光光度法是通过测定 ROS 与显色剂发生反应,在特定波长处或一定波长范围内光的吸光度或发光强度的变化,对该 ROS 进行定性和定量分析的方法。由于分光光度法操作简单、价格便宜,在实验室中受到广泛的应用。目前,ROS 分光光度法测定中最常用的为细胞色素 C (cytochrome C) 还原法和硝基四氮唑蓝 (nitro blue tetrazolium, NBT) 还原法。

细胞色素 C 还原法指高铁细胞色素 C 能同氧自由基发生氧化还原反应,高铁细胞色素 C 被还原为亚铁细胞色素 C,在分光光度计 550 nm 处吸光度增加,由此确定待测样品中 ROS 的水平^[11]。细胞色素 C 还原法虽然是一种有效的 ROS 测定方法,但是易受到细胞内氧化酶和还原酶的影响^[12]。当测定 ROS 产生较低的血管平滑肌细胞和内皮细胞时,吸光度的测定、重量的称取以及加样量多少等误差的存在,均可以放大结果的差异性,造成测定结果准确性降低^[13]。此外,由于细胞色素 C 具有能被细胞内氧化酶氧化以及分子质量大不易于进入细胞的特点,也限制了细胞色素 C 还原法在细胞试验中的应用^[13]。

NBT 还原法是指 NBT 在 O₂⁻· 的作用下,还原生成深蓝色的不溶性沉淀二甲替 (diformazan),在 530 ~ 630 nm 处有最大吸收波长^[14]。此前,NBT 还原法已被运用于白细胞^[15]、精子和精液^[16]中 ROS 的检测。但是,由于二甲替不溶于水,长时间放置会出现沉淀现象,难以用于检测细胞或者水溶液体系中随时间推移 O₂⁻· 水平的变化。另外,NBT 能与体内多种氧化还原酶发生反应,产生 ROS,因此准确性较低^[17]。

2 化学发光法

化学发光法指在没有任何光、电、热的作用

下,基态分子吸收化学反应放出的化学能跃迁到激发态,处于激发态的分子以光辐射的形式返回基态,产生化学发光。ROS 是一类不稳定的化合物,且具有很高的氧化活性,能够与多种化合物发生氧化还原反应。当其同化学发光试剂反应时,发光试剂会迅速分解释放光子,可以根据由此产生的化学发光强度对 ROS 进行定量或者定性分析^[10]。化学发光法由于具有敏感、测定范围广泛、简单、廉价、安全和可控的特点,是目前运用最为广泛的 ROS 测定方法。在一定条件下,ROS 能和鲁米诺 (luminol; 5-amino-2, 3-dihydrophthalazine-1, 4-dione)、光泽精 (lueigenin; N, N'-dimethyl-9, 9'-diacridinum) 和肠腔素 {coelenterazine; 2-(4-hydroxybenzyl)-6-(4-hydroxyphenyl)-8-benzyl-3, 7-dihydroimi-dazo[1, 2-α]pyrazin-3-one} 及其类似物等化学发光试剂反应,产生不同强度、不同发射波长的化学发光辐射。下面将分别介绍不同发光剂在 ROS 定量和定性分析研究中的应用进展。

鲁米诺是化学发光研究中最常用的试剂之一,由于其具有灵敏、方便、操作简单的特点,对鲁米诺的研究与应用都很广泛。在碱性环境中,鲁米诺在催化剂(酶、过渡金属离子或金属络合物)的催化下可与·OH、O₂⁻·、¹O₂ 以及 H₂O₂ 等发生化学反应,迅速分解发光,其发光强度可由化学发光分析仪检测。因此,鲁米诺化学发光法可以应用于·OH、O₂⁻·、¹O₂ 和 H₂O₂ 等 ROS 的测定^[17]。利用鲁米诺化学发光法对 ROS 进行检测具有以下几个优势:1) 鲁米诺能够与体内多种 ROS 发生反应,没有选择特异性;2) 鲁米诺作为一种发光剂,可同时用于细胞内和细胞外 ROS 水平的检测;3) 由于体内多种关键自由基,如·OH、O₂⁻· 的半衰期非常短,而鲁米诺能够与其迅速反应^[18]。目前鲁米诺化学发光法已被用于精子与精清^[19]、血液与组织匀浆上清液^[20]、细胞^[21]等样品中 ROS 的检测。然而,由于·OH、O₂⁻·、¹O₂ 和

H_2O_2 这些 ROS 物质均能够氧化鲁米诺产生化学发光,很难用于其中单一 ROS 物质的直接测定^[22]。因此,在很多情况下,ROS 的鲁米诺化学发光法只能作为定量或者定性分析的辅助手段。

光泽精同鲁米诺一样,也是一种广泛使用的化学发光剂。1935 年,Glue 等^[23]最先报道了有关光泽精化学发光的文章。与鲁米诺相比,光泽精具有以下优点:1)光泽精的发光体 N-甲基吡啶酮比鲁米诺的发光体 3-氨基邻苯二甲酸发光更强、发光效率更高。2)光泽精的化学发光对某些还原剂非常敏感。3)含 α -羟羰基的化合物与光泽精会发生强烈的化学反应^[24]。4)光泽精化学发光法只对 $O_2^- \cdot$ 和 H_2O_2 敏感,特异性相对较高。而当只存在 $\cdot OH$ 时,其并不能够激发光泽精发光^[25]。但是光泽精自身能够与氧气(O_2)发生氧化还原反应,产生自由基 $O_2^- \cdot$,当生物体系统 $O_2^- \cdot$ 水平很低,而光泽精浓度较高时,由光泽精氧化还原反应产生 $O_2^- \cdot$ 的比例可能要大于生物所含有的 $O_2^- \cdot$,影响光泽精化学发光法测定 ROS 的准确度^[26-27]。此外,光泽精主要用于胞外自由基的检测^[28]。

由于鲁米诺和光泽精都不是特异性的化学发光剂,均能与多种 ROS 发生反应。而另一种亲脂性化学发光剂肠腔素及其类似物 CLA (2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2- α]-pyrazin-3-one) 和 MCLA { 2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,

7-dihydroimidazo [1, 2- α] pyrazin-3-one } 开始运用于 $O_2^- \cdot$ 的测定。肠腔素是从肠腔类水生动物体内分离出来的一种亲脂性发光基团,在 ROS 中,其对 $O_2^- \cdot$ 具有特异性^[29], $O_2^- \cdot$ 能够氧化肠腔素中的乙酰氨基吡啶阴离子,分解释放出光子^[30]。由于肠腔素发光体乙酰氨基吡啶比光泽精和鲁米诺的发光更强,并且不会同 O_2 发生氧化还原反应^[31],稳定性和准确性更高。因此,依赖于肠腔素的化学发光法已经被研究者运用于培养的细胞^[32]、嗜中性粒细胞^[33]、血管组织^[30]和线粒体^[34]中 $O_2^- \cdot$ 的测定。CLA 和 MCLA 作为肠腔素的类似物,具有相似的化学结构,同样对于 $O_2^- \cdot$ 具有特异性和敏感性,已经被用于不同样品中 $O_2^- \cdot$ 的测定,包括嗜中性粒细胞以及巨噬细胞^[35]、内皮细胞^[36]和血管组织^[37]等。值得注意的是,MCLA 作为一种化学发光试剂,在对肝脏^[38]、肠道^[39]、心脏^[40]、肺脏^[33]和血管组织^[41]等机体组织表面 ROS 水平的测定已有报道。虽然肠腔素对于 $O_2^- \cdot$ 具有特异性,但是过氧亚硝酸阴离子 ($ONOO^-$) 同样能够诱导肠腔素化学发光^[34]。因此,在特异性鉴定 $O_2^- \cdot$ 的时候,活性氮抑制剂的选择,如 $ONOO^-$ 清除剂的应用,可以减少由于 $ONOO^-$ 对总化学发光的影响所产生的误差,增加测定结果的准确性。不同化学发光剂的作用特点见表 2。

表 2 不同化学发光剂的作用特点

Table 2 Action characteristic of different chemiluminescence agents

化学发光剂 Chemiluminescence agents	检测种类 Detection species	应用 Application	特点 Characteristics
鲁米诺 Luminol	$O_2^- \cdot$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 ^[17]	检测血液、精液、组织和细胞中 ROS 水平 ^[19-21]	适用范围广泛,敏感性高,稳定性低,无特异性 ^[4]
光泽精 Lueigenin	$O_2^- \cdot$ 、 H_2O_2 ^[25]	检测细胞外 $O_2^- \cdot$ 水平 ^[26]	发光强度大,准确度受自氧化和底物中氧化剂的影响 ^[26]
肠腔素及其衍生物 Coelenterazine and its derivatives	$O_2^- \cdot$ 、 $ONOO^-$ ^[30]	检测细胞和组织表面 $O_2^- \cdot$ 水平 ^[32-40]	准确度受活性氮的影响,无自氧化作用,稳定性好,具有特异性 ^[4]

3 荧光光度法

荧光光度法是通过合适的荧光探针作用于细

胞,在与 ROS 发生反应后,探针的化学结构发生变化,生成具有强荧光的产物,通过检测反应产物的荧光强度可在一定程度上反映 ROS 水平。荧光光

度法由于其具有高细胞膜穿透性、高分辨率、高灵敏度、可提供细胞内靶分子时空信息的特点,在 ROS 的测定中得到广泛应用^[42-43]。不同的荧光探针,根据其作用特异性对象的不同和激发波长及发射波长的不同,可测定不同的 ROS 水平(图 3)。目前应用最广泛的荧光探针主要有二氯荧光素(2,7-dichlorodihydrofluorescein, DCFH)、二氢罗丹明 123(dihydrorhodamine 123, DHR)和氢化乙啡啉(hydroethidine, HE)等。

DCFH 能够氧化生成强荧光化合物二氯荧光黄(2,7-dichlorofluorescein, DCF),其双乙酸盐形式 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)是一种激发波长为 498 nm,发射波长为 522 nm 的荧光染料。由于 DCFH-DA 极易透过细胞膜进入细胞内^[44],在细胞内被酯酶水解为水溶性的 DCFH,该物质能够被 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ROOH}\cdot$ 、 $\text{O}_2^-\cdot$ 、 H_2O_2 和 $\text{NO}\cdot$ 等多种 ROS 所氧化,因此被广泛的运用于细胞内 ROS 的测定^[45-46]。虽然,DCFH 法能够准确、方便地测定总 ROS 的水平,但是其特异性较差。有研究者发现使用 DCFH 对细胞内 ROS 进行测定时,DCFH 有可能被机体内的高铁离子、细胞色素 C、腺嘌呤氧化酶所氧化,致使 DCF 的含量增加而影响试验结果的准确性^[47-48]。此外,高浓度的 DCFH 可产生细胞毒性,影响测定结果^[49]。

HE 作为一种特异性的荧光染料,能够被 $\text{O}_2^-\cdot$ 特异性氧化生成荧光产物胡米胺(ethidium, E^+),其激发波长为 520 nm,发射波长为 610 nm,被用于测定细胞内 $\text{O}_2^-\cdot$ 的水平^[50],且 E^+ 能够与细胞内 DNA 结合,增加发光强度^[51-52]。虽然 HE 不能被其他的 ROS 所氧化,具有很好的特异性,但是 HE 荧光染料在对 $\text{O}_2^-\cdot$ 定量的测定上受到多个因素的限制。第一,细胞内的细胞色素 C 能够氧化 HE,当细胞中含有大量的细胞色素 C 时,影响测定结果。第二,高浓度的 HE 致使细胞内不依赖于 $\text{O}_2^-\cdot$ 的荧光产物 E^+ 增加,其与细胞核 DNA 连接,导致荧光强度不断增加。第三,HE 具有增加 $\text{O}_2^-\cdot$ 转化为 H_2O_2 比例的作用,影响测定结果的准确性^[8,51]。

DHR 是一种非荧光分子,DHR 与 ROS 反应后生成具有荧光的脂溶性探针罗丹明 123,其激发波长为 505 nm,发射波长为 529 nm,由于 DHR 具有亲脂性,其极易扩散进入细胞膜^[53]。虽然 DHR 主要用于测定细胞内 H_2O_2 的水平,但是其特异性较低,能够被多种 ROS 和氧化物如 ONOO^- 、高铁离子、细胞色素 C、次氯酸(HClO)和腺嘌呤氧化酶所氧化^[45,48]。

不同荧光探针的作用特点见表 3。

表 3 不同荧光探针的作用特点

Table 3 Action characteristic of different fluorescence probes

荧光探针 Fluorescence probes	检测种类 Detection species	应用 Application	特点 Characteristics
二氯荧光素 DCFH	$\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ROOH}\cdot$ 、 H_2O_2 ^[45-46]	检测细胞的氧化状态 ^[42]	易发生自氧化作用,背景荧光高,准确性低,无特异性 ^[42]
氢化乙啡啉 HE	$\text{O}_2^-\cdot$ ^[50]	检测细胞内突发性氧化作用 ^[42]	高浓度时背景荧光高,准确度低,对 $\text{O}_2^-\cdot$ 具有特异性 ^[43]
二氢罗丹明 123 DHR	H_2O_2 ^[45]	检测细胞中 H_2O_2 、 HClO 、 ONOO^- 水平 ^[42]	易受胞内氧化还原酶的影响,对 H_2O_2 具有特异性 ^[53]

4 ESR 法

ESR 是指由于不同自由基结构具有特定的核自旋能量,其在稳定的磁场作用下,同电磁辐射能相互作用而产生的共振吸收现象。通过对共振谱线的研究可以获得对自由基未偶电子的状态及其周围环境方面的信息,从而得到有关物质结构和

化学键的信息,以此来鉴定不同自由基的种类和水平^[54]。ESR 法虽然是目前 ROS 测定的最直接和有效的方法,但是其应用依然受到几个方面的限制,其中最主要的限制因素是由于 ESR 每次扫描都需要几秒的时间,而主要的 ROS 如 $\text{O}_2^-\cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 等,由于其在生物体系中有浓度低且存活时间短的特点,因而不易被 ESR 法所测定^[27]。因

此,应用 ESR 法测定存活时间短的 ROS 时,可以通过电子自旋共振探针试剂与 ROS 的相互作用,捕捉 ROS,通过二级产物来间接测定^[55-56]。电子自旋共振试剂苯基-叔丁基硝酸(PBN)和 5,5-二甲基吡咯啉-N-氧化物(DMPO)能够同 ROS 发生反应,生成包含亚硝基或硝酮的稳定化合物,而引起信号的变化,以此来测定 ROS 的种类和水平^[57-58]。但是,电子顺磁共振谱仪是相当昂贵且对实验室环境要求严格的试验仪器,限制了 ESR 法在普通实验室的应用性。

5 小结

由于 ROS 在现代医学和分子生物学领域的重要性,根据特定的试验目的选择灵敏、准确、特异性高、稳定性好和操作简单的 ROS 测定方法,在现代自由基生物学研究中具有重要的意义。但是 ROS 由于其反应活性高、寿命短、积累水平低,加之种类较多的特点,很难被直接准确测定。化学反应法作为目前应用最为广泛的 ROS 检测方法,主要有化学发光法、分光光度法、荧光光度法和 ESR 法这 4 个体系。研究者针对不同的 ROS 和不同的样品时,都可以从化学反应法中选出适宜的方法进行测定。但化学反应法由于受化学反应物理化特性的影响,大多特异性较低、易受环境影响、稳定性较差。因此,在对 ROS 进行测定时,需通过对待测样品的性质、类型以及 ROS 的种类进行判断,选择适宜的测定方法,以利于得出准确的结果。此外,毒性低、稳定性好、特异性高的新型化合物的发现及合成也为未来化学发光法更广泛的应用和发展提供了基础和方向。

参考文献:

- [1] WINTERBOURN C C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species[J]. *Natural Chemical Biology*, 2008, 5: 278 - 286.
- [2] NORDBERG J, ARNÉR E S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011, 31(11): 1287 - 1312.
- [3] KUNWAR A, PRIYADARSINI K I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health[J]. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 2011, 1(2): 53 - 60.
- [4] BRANDES R P, JANISZEWSKI M. Direct detection of reactive oxygen species *ex vivo*[J]. *Kidney International*, 2005, 67: 1662 - 1664.
- [5] HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what the results mean? [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2004, 142: 231 - 255.
- [6] 林金明, 屈锋, 单孝全. 活性氧测定的基本原理与方法[J]. *分析化学*, 2002, 12(30): 1507 - 1514.
- [7] CAMERA E, PICARDO M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes [J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, 781(1/2): 181 - 206.
- [8] TARPEY M, WINK D, GRISHAM M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations[J]. *American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 286: 431 - 444.
- [9] PALMIERI B, SBLENDORIO V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Science*, 2007, 11(5): 309 - 342.
- [10] LU C, SONG G, LIN J. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25: 985 - 995.
- [11] MASSEY V. The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome C [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1959, 34: 255 - 256.
- [12] MARGARET M, TARPEY, IRWIN F. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite [J]. *Circulation Research*, 2001, 89: 224 - 236.
- [13] SERGEY D, KATHY K, DAVID G H. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies [J]. *Hypertension*, 2007, 49: 717 - 727.
- [14] THOMAS M, IGOR B A, ANDREI L K, et al. Detection of superoxide in vascular tissue [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 2002, 22: 1761 - 1768.
- [15] CHOI H S, KIM J W, CHA Y N, et al. A quantitative-nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxidenion production in phagocytic cells [J]. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 2006, 27: 31 - 44.
- [16] OZLEM T, JEREMY T, KELTON T. Development of

- the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress [J]. *International Journal of Andrology*, 2010, 33: 13–21.
- [17] BARTOSZ G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 368: 53–76.
- [18] ASHOK A. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species [J]. *Biology Medicine*, 2004, 9(4): 466–468.
- [19] ESFANDIARI N, SHARMA R K, SALEH R A, et al. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa [J]. *Journal of Andrology*, 2003, 24: 862–870.
- [20] 牡丹. 高糖日粮对小鼠消化系统自由基和抗氧化能力的影响 [D]. 博士学位论文. 无锡: 江南大学, 2008.
- [21] PALO A. Luminol-enhanced assay for superoxide anion ($O_2^- \cdot$) [M]. La Jolla, CA: Agilent Technologies, 2009.
- [22] KOBAYASHI H, GIL-GUZMAN E, M. MAHRAN A, et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay [J]. *Journal of Andrology*, 2001, 22: 568–574.
- [23] GLEU K, PETSCH W. Additional information how to cite [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1935, 48: 57–59.
- [24] 黄荣富. 活性氧化学发光分析特性研究 [D]. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学, 2007.
- [25] CASTRO M M, RIZZI E, RODRIGUES G J, et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 46: 1298–1307.
- [26] LIOCHEV S I, FRIDOVICH I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, 337: 115–120.
- [27] TARPEY M M, FRIDOVICH I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite [J]. *Circulation Research*, 2001, 89: 224–236.
- [28] MCKINNEY K A, LEWIS S E, THOMPSON W. Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probes [J]. *Archives of Andrology*, 1996, 36: 119–125.
- [29] NAKANO M. Determination of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analogs [J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 585–591.
- [30] HINK U, LI H, MOLLNAU H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circulation Research*, 2001, 88: 14–22.
- [31] TERANISHI K, SHIMOMURA O. Coelenterazine analogs as chemiluminescent probe for superoxide anion [J]. *Analytical Biochemistry*, 1997, 249: 37–43.
- [32] DUERRSCHMIDT N, WIPPICH N, GOETTSCHE W, et al. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269: 713–717.
- [33] LUCAS M, SOLANO F. Coelenterazine is a superoxide anion-sensitive chemiluminescent probe: its usefulness in the assay of respiratory burst neutrophils [J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, 206: 273–277.
- [34] RAHA S, MCEACHERN G E, MYINT A T, et al. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2000, 29: 170–180.
- [35] NAKANO M, SUGIOKA K, USHIJIMA Y. Chemiluminescence probe with *Cypridina luciferin* analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2- α]pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2^- [J]. *Analytical Biochemistry*, 1986, 159: 363–369.
- [36] ISHII M, SHIMIZU S, YAMAMOTO T. Acceleration of oxidative stress-induced endothelial cell death by nitric oxide synthase dysfunction accompanied with decrease in tetrahydrobiopterin content [J]. *Life Science*, 1997, 61: 739–747.
- [37] SKATCHKOV M P, SPERLING D, HINK U. Quantification of superoxide radical formation in intact vascular tissue using a cypridina luciferin analog as an alternative to lucigenin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 248: 382–386.
- [38] UEHARA K, MARUYAMA N, HUANG C K. The first application of a chemiluminescence probe, 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2- α]pyrazin-3-one (MCLA), for detecting O_2^- production, *in vitro*, from Kupffer cells stimulated by phorbol myristate acetate [J]. *FEBS Letters*, 1993, 335: 167–170.
- [39] SAITOH D, KADOTA T, OKADA Y. Direct evidence for the occurrence of superoxide radicals in the

- small intestine of the burned rat [J]. *American Journal Emergency Medicine*, 1995, 13: 37 - 40.
- [40] USHIRODA S, MARUYAMA Y, NAKANO M. Continuous detection of superoxide in situ during ischemia and reperfusion in the rabbit heart [J]. *Japanese Heart Journal*, 1997, 38: 91 - 105.
- [41] TARPEY M M, WHITE C R, SUAREZ E, et al. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue: lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation [J]. *Circulation Research*, 1999, 84: 1203 - 1211.
- [42] GOMES A, FERNANDES E, LIMA J L F C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species [J]. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, 2005, 65: 45 - 80.
- [43] NOBUAKI S. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386: 532 - 543.
- [44] KESTON A S, BRANDT R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide [J]. *Analytical Biochemistry*, 1965, 1: 1 - 5.
- [45] CROW J P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species [J]. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1997, 1(2): 145 - 157.
- [46] WANG H, JOSEPH J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 1999, 27: 612 - 617.
- [47] ZHU H, BANNENBERG G L, MOLDEUS P. Oxidation pathways for the intracellular probe 2V, 7V-dichlorofluorescein [J]. *Archives Toxicology*, 1994, 68: 582 - 587.
- [48] HEMPEL S L, BUETTNER G R, O' MALLEY Y Q. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants; comparison with 2V, 7V-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2V, 7V-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123 [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 1999, 27: 146 - 159.
- [49] WRONA M, PATEL K, WARDMAN P. Reactivity of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2005, 38(2): 262 - 270.
- [50] BINDOKAS V P, JORDAN J, LEE C C. Superoxide production in rat hippocampal neurons; selective imaging with hydroethidine [J]. *Neuroscience*, 1996, 16: 1324 - 1336.
- [51] BENOVA L, SZTEJNBERG L, FRIDOVICH I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical [J]. *Free Radical Biology Medicine*, 1998, 25: 826 - 831.
- [52] WALRAND S, VALEIX S, RODRIGUEZ C, et al. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 331: 103 - 110.
- [53] CARTER W O, NARAYANAN P K, ROBINSON J P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, 55: 253 - 258.
- [54] SARAN M, BORS W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals [J]. *Klinische Wochenschrift*, 1991, 69: 95 - 96.
- [55] DAMBROVA M, BAUMANE L, KALVINSH I, et al. Improved method for EPR detection of DEPMPO-superoxide radicals by liquid nitrogen freezing [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2000, 275: 895 - 898.
- [56] VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B, KENNEDY M C. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 14064 - 14069.
- [57] FREJAVILLE C, KAROUI H, TUCCIO B, et al. 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin trapping of oxygen-centered radicals [J]. *Medicinal Chemistry Research*, 1995, 38: 258 - 265.
- [58] JANZEN E G. Spin trapping and associated vocabulary [J]. *Free Radical Research Communications*, 1990, 9: 163 - 167.

Application and Research Progress of Chemical-Detection Methods for Detection of Reactive Oxygen Species

ZOU Yi PENG Jian*

(College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Reactive oxygen species play an important role in the aging and disease for human, so that it gains more and more attention in the field of medicine and molecular biology. As an important index for injury of oxidation *in vivo*, reactive oxygen species level is the key problem for distinguishing physiological and pathogenic. However, due to the high reactivity and short half-life characteristics, it is a problem for the accurate detection of reactive oxygen species *in vitro* and *in vivo*. The measurement principle and research progress of the present main chemical reaction methods, i. e spectrophotometric method, chemiluminescence method, fluorophotometric method and electron spin resonance method, were reviewed in this paper, and the different characteristics of those methods in actual application were discussed. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(9):1946-1953]

Key words: reactive oxygen species; spectrophotometric method; chemiluminescence method; fluorophotometric method; electron spin resonance method