

抗氧化剂的抗氧化活性测定方法研究进展[△]

曹玉娜^{1*}, 宋志前², 魏征¹, 曾林燕², 张琳琳², 刘振丽^{2#} (1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

中图分类号 R914.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0086-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.31

摘要 目的:为客观和准确地测定抗氧化剂的抗氧化活性提供参考。方法:查阅文献,对常用的8种体外测定方法包括二苯基苦基苯肼法、邻苯三酚自氧化法等,以及3种体内测定法包括DNA、线粒体、蛋白质氧化损伤检测法的基本原理及其应用进行归纳和总结。结果与结论:体内外测定方法的原理是基于在特定条件下,样品对检测体系中脂类物质的氧化抑制能力、自由基的清除能力和样品的还原能力可反映被测物的抗氧化活性;体外方法具有快速、简便、稳定的特点,但该方法是在非生理条件下进行的,单用缺乏说服力。要全面科学地评价抗氧化剂的抗氧化活性,往往需要多种方法相结合以验证其活性的高低。

关键词 抗氧化剂;抗氧化活性;测定方法;体外;体内

自由基在生物体中无处不在,是生命所必需的物质。在机体新陈代谢过程中,自由基发挥着“利”和“害”双重作用。一方面,其能有效防止感染,对某些基因开启和关闭起调控作用等;另一方面,其又可攻击和氧化细胞及组织,引发机体衰老,增加心脏疾病、中风、癌症等疾病的可能性。抗氧化剂具有显著抑制氧化修饰和自由基攻击的作用,可清除机体内过量的自由基,使机体维持在正常的生理水平上^[1]。因此,抗氧化剂的应用研究目前受到了广泛的关注。

抗氧化活性是评价物质抗氧化能力的重要指标,目前对抗氧化活性测定方法的研究取得了较好的进展。如将现有的二苯基苦基苯肼(DPPH)法和铁离子还原/抗氧化能力测定(FRAP)法微型化,可加速评价抗氧化剂的抗氧化能力,并具有较好的灵敏度和专属性^[2]。本文从体外、体内抗氧化活性测定方法两大方面对各方法原理及应用进行总结,以期科学合理地评价物质抗氧化活性提供参考。

1 体外抗氧化活性测定方法

1.1 二苯基苦基苯肼(DPPH)法

DPPH·(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基)是一种稳定的有机自由基,能与有供氢能力的化合物反应,其溶液呈深紫色,在517 nm波长处有最大吸收。当有抗氧化剂存在时,抗氧化剂与DPPH·反应使其吸光度值减小甚至消失,此变化与抗氧化剂的抗氧化能力及其数量呈定量关系。样品的抗氧化活性可通过清除DPPH·的量来确定^[3]。如,采用此种方法研究表明,蓼芙木水溶性生物碱具有抗氧化活性^[4]。

1.2 邻苯三酚自氧化(Pyrogallol autoxidation)法

在弱碱性环境下,邻苯三酚发生自氧化反应,不断生成O₂⁻(超氧阴离子自由基)及有色中间产物。抗氧化剂将O₂⁻歧化分解为H₂O₂和O₂,从而抑制了邻苯三酚的自氧化反应。

中间产物累积浓度与时间呈线性关系,因此特定波长下测定吸光度值的变化,可得到加抗氧化剂后邻苯三酚的自氧化速率,进而间接求得清除O₂⁻的能力^[5]。本法测定表明,蜂胶、蜂花粉、蜂王浆、蜂蜜均能清除人体内过多的O₂⁻,其中蜂胶和蜂花粉清除效果最好,是很好的抗氧化食品^[6]。

1.3 β-胡萝卜素漂白(β-carotene bleaching assay)法

本法主要适合测定抗氧化剂在乳化脂质体系中的抗氧化能力。根据乳状液中亚油酸自动氧化生成的自由基与β-胡萝卜素反应,引起β-胡萝卜素褪色,在470 nm波长处测定吸光度,随反应时间的增加吸光度越来越小。有抗氧化剂存在时,β-胡萝卜素的褪色速率减缓,且减缓程度与抗氧化活性大小相关。通常采用反应体系中处理时间的起止点时在470 nm波长处吸光度的差值与空白时的吸光度差值之比的百分率来表示该物质的抗氧化率^[7-8]。此法研究发现,海边月见草果壳提取物对β-胡萝卜素漂白有较强的抑制作用,在质量浓度为50 μg/ml时,对β-胡萝卜素漂白的抑制率达87.8%,与同质量浓度BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)的抑制率(90.1%)相当^[8]。

1.4 羟基自由基清除能力法

产生·OH(羟基自由基)的方法主要有Fenton反应、Haber-Weiss反应、Vc-Cu²⁺-H₂O₂酵母多糖体系反应及Vc-Cu-SO₄-Cytc法等。邻二氮菲-Fe²⁺氧化法和水杨酸比色法是检测抗氧化剂清除·OH能力的常用方法。邻二氮菲-Fe²⁺氧化法原理是邻二氮菲-Fe²⁺溶液(橙红色)被反应生成的·OH氧化成邻二氮菲-Fe³⁺,在536 nm波长处最大吸收峰消失(也有文献报道其最大吸收峰在509 nm波长处),因此邻二氮菲-Fe²⁺的褪色程度可用来衡量·OH的清除量^[9-10]。水杨酸比色法是反应生成的·OH进攻水杨酸分子上的苯环,生成有色产物,在510 nm波长处有较强吸收,反应体系中若加入具有清除·OH作用的物质可降低该吸光度。因此通过测定其含量来描述·OH的量及待测物质清除·OH的能力^[11]。邻二氮菲-Fe²⁺法及其他抗氧化测定法研究表明,杨桃根多糖具有明显的抗氧化作用^[10]。水杨酸比色法研究发现,灰兜巴提取物对·OH具有清除活性,可开

△ 基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(No.81073050)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量标准。电话:010-64014411-2503。E-mail:caoyunazi@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中药质量标准。电话:010-64014411-2503。E-mail:zhenli_liu@sina.com.cn

发为天然抗氧化剂^[12]。

1.5 化学发光(Chemiluminescence)法

发光物质在一定条件下被自由基攻击使其氧化而发光,启动化学发光后立即用记录仪对每秒发光强度积分,记录化学发光动力学曲线,当有抗氧化剂存在时,发光强度下降,通过计算抗氧化剂抑制发光的强度来评价其抗氧化能力。该法中常以鲁米诺为发光剂和自由基检测剂^[13]。陈山等^[14]用 Fe^{2+} - H_2O_2 -鲁米诺发光体系、邻苯三酚-鲁米诺发光体系分别检测了瑶山甜茶干叶浸提液的分子量分布范围不同的5种水溶性组分对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除能力,结果显示其水溶性抗氧化活性片断的分子质量在5~10 kD范围内。

1.6 氧自由基吸收能力(Oxygen radical absorbance capacity, ORAC)法

此法原理是通过抑制氢的转移反应来终止自由基链式反应,以偶氮类化合物AAPH[2,2'-偶氮二(2-脞基丙烷)二盐酸盐]为过氧自由基来源,FL(荧光素)为荧光指示剂,Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸)为定量标准,每隔2 min测定1次荧光强度,直到荧光衰减呈基线后为止,以AUG(荧光衰退曲线下面积)为定量手段,并通过改变自由基和反应体系的溶剂来测定脂溶性和水溶性物质的抗氧化活性^[15]。有研究发现,薏苡仁等16味中药炮制前后抗氧化活性发生变化,其中薏苡仁等10味炮制品的ORAC值低于生品,生姜等6味炮制品的ORAC值高于生品^[16]。

1.7 ABTS(ABTS assay)法

ABTS[2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)]是一种化学性自由基引发剂,被氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $\text{ABTS}\cdot^+$ 。ABTS \cdot^+ 与抗氧化剂反应时,生成无色的ABTS,据此检测734 nm波长处最大吸收峰吸光度的变化来评价抗氧化活性,并与Trolox标准对照体系比较就能换算出被测物质总的抗氧化能力(TEAC值)。影响TEAC值的因素主要有底物及其相互作用、干扰物质、pH、反应时间、自由基产生体系等^[17]。用本法研究江南星蕨的乙醇、丙酮和乙酸乙酯提取物的抗氧化能力,结果发现3种提取物对ABTS \cdot^+ 自由基的清除率均超过80%,其中乙醇提取物的清除率高达96.11%^[18]。

1.8 铁离子还原/抗氧化能力测定(Ferric reducing antioxidant power, FRAP)法

pH值3.6、37℃下,抗氧化剂将 Fe^{3+} -TPTZ还原为 Fe^{2+} -TPTZ,呈深蓝色,并在593 nm波长处有最大吸收,再根据吸光度大小计算抗氧化剂的抗氧化活性能力,即以 FeSO_4 为标准,抗氧化剂达到同样吸光度值所需的 FeSO_4 的量^[19]。采用该法测定枸杞多糖的分子量为30~100 kD的样品抗氧化活性最强^[20]。

2 体内抗氧化活性测定

2.1 DNA氧化损伤检测方法

目前对DNA氧化损伤的检测方法主要有单细胞凝胶电泳(Single-cell gel electrophoresis, SCGE)法和测定8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)法等。

2.1.1 SCGE法。SCGE法是一种广泛用于检测和分析个体细胞DNA损伤的技术。此法基于核DNA有较大分子量,以超螺

旋结构附着在核基质上。当细胞经裂解、DNA解旋等过程后,如果细胞未受损伤,在电泳条件下,DNA仍停留在核基质上,经荧光染色后呈现圆形的荧光团,无拖尾现象;如果DNA链断裂,在电泳时,DNA断片从核中溢出,向阳极方向移动,经荧光染色后产生一个尾状带,形成彗星状。彗星尾越长,越大,荧光强度越高,表明DNA的断裂损伤越严重^[21]。该法考察柳蒿芽黄酮对细胞内DNA氧化损伤的修复作用,结果证明其具有较好的抑制由活性氧造成的细胞DNA氧化损伤的能力^[22]。

2.1.2 8-OHdG法。当细胞核DNA和线粒体DNA中有氧化剂存在时,DNA氧化损伤生成8-OHdG,但在DNA修复过程中,8-OHdG经肾脏随尿排出。在稳态下,排泄出的8-OHdG量等于氧化损伤新生成的8-OHdG量,等同于DNA氧化损伤率,因此尿中8-OHdG的排泄量可反映整个机体的平均氧化损伤率;同时通过分析其在组织细胞核DNA及线粒体DNA中的含量,以反映体内特定部位DNA氧化损伤和机体正常的修复情况。8-OHdG法主要有酶联免疫吸附(ELISA)、高效液相色谱-电化学(HPLC-ECD)、气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)法等^[23]。有研究通过检测大鼠尿中8-OHdG的含量,发现大剂量芹菜素对 δ 大鼠DNA无氧化损伤作用^[24]。

2.2 线粒体氧化损伤检测方法

氧自由基可攻击线粒体膜磷脂引起脂质过氧化作用,并形成脂氢过氧化物。脂氢过氧化物在有氧条件下是不稳定的,能分解成包括新的氧自由基在内的一系列产物。这些产物中的一部分能引起细胞代谢和功能障碍,甚至死亡^[25]。目前针对线粒体氧化损伤检测方法主要为脂质过氧化检测方法。有研究发现,加味泽泻汤能明显纠正高脂血症大鼠脂质代谢紊乱,具有抗脂质过氧化作用^[26]。

2.3 蛋白质氧化损伤检测方法

几乎所有的蛋白质都可被自由基氧化损伤,导致其氧化损伤的因素主要有活性氧自由基、活性氮自由基、紫外线、脂质过氧化物、氧化还原酶等。蛋白质的氧化类型可分为断裂肽键和侧链修饰的氧化反应,根据氧化产物的不同又可将后者分为特殊和普通的氧化反应。特殊的氧化反应是由氨基酸残基的多样性导致氧化产物的多样性;普通的氧化反应则是生成羰基。蛋白质的羰基化水平是评价蛋白质总的氧化程度的常用方法,研究蛋白质的特殊氧化反应可更全面地评价其氧化程度^[27-28]。有报道报道蚝菇提取物能够增强老龄大鼠肝肾组织内抗氧化酶基因的表达并减少自由基引起的蛋白质氧化,对于自由基引起的年龄相关性疾病可能有保护作用^[29]。

3 讨论

上述测定方法主要基于以下机制:(1)在特定条件下,样品对检测体系中抑制脂类物质氧化的能力以反映被测物的抗氧化活性;(2)在特定条件下,样品对检测体系中自由基的清除能力以反映被测物的抗氧化活性;(3)在特定条件下,测定样品的还原能力以反映被测物的抗氧化活性^[30]。这些方法虽能在不同的条件下反映抗氧化剂的活性,但也有其局限性,不能仅用1种方法全面反映某一抗氧化剂的抗氧化活性。而且,不同的分析方法对结果的解释依据不同,因此不同方法得到的分析结果之间无可比性。

体外方法具有快速、简便、稳定的特点。在体外试验中,必须把待测物的质量浓度有效控制于实际应用的范围内。如某被测物在体内浓度很低,而其体外抗氧化浓度却高很多,由此测得的抗氧化能力可能无实际意义,因为只有当其在体内的某些部位能累积到足够高的浓度,才能发挥抗氧化作用。因此,体外抗氧化活性测定方法是在非生理条件下进行的,如果仅用体外试验结果去评价抗氧化活性是缺乏说服力的。

要全面、科学地评价抗氧化剂的抗氧化活性,往往需要多种方法相结合以验证其活性的高低。随着自由基化学、生物化学、病理学和现代检测分析技术的发展,简便、快速、准确、高效的抗氧化活性测定方法已成为抗氧化剂开发、研究、发展的关键。相信现有的测定方法会不断得到改良,还会有更好的测定方法不断问世以满足需要。

参考文献

[1] 刘海.试述自由基及抗自由基中药[J].实用中医药杂志,2007,23(5):327.

[2] 高月红,郑建普,朱春赟,等.抗氧化能力检测方法评估及微型化[J].中国药理学杂志,2008,43(24):1863.

[3] 李小飞.喜碱鳶尾根抗氧化活性成分的分离[D].乌鲁木齐:新疆大学,2007.

[4] 刘平怀,刘洋洋,时杰.DPPH·体外清除试验研究罗芙木水溶性生物碱抗氧化活性[J].时珍国医国药,2010,21(3):607.

[5] 马森.西柑橘皮和陈皮类黄酮体外抗氧化作用[J].畜牧兽医学杂志,2010,29(3):9.

[6] 玄红专,桑青,麻建军.邻苯三酚自氧化法测定不同蜂产品抗氧化活性的研究[J].食品科技,2008,33(4):137.

[7] Nsimba RY, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2):760.

[8] 陈炳华,李均,姜君花,等.海边月见草果壳提取物抗氧化活性的体外评价[J].福建师范大学学报:自然科学版,2009,25(1):85.

[9] 周冉,李淑芬,张大成.鹿茸提取物体外抗氧化活性分析[J].食品科学,2009,30(9):33.

[10] 罗旭艳,黄建春,杨欣,等.杨桃根多糖体外抗氧化作用的研究[J].中国试验方剂学杂志,2011,17(4):111.

[11] 周萍,王丽萍,邓励,等.西归黄酮体外抗氧化活性的研究[J].安徽农业科学,2011,39(3):1359.

[12] 彭亮,李知敏,徐玲.灰兜巴提取物体外清除自由基活性的研究[J].安徽农业科学,2010,38(14):7343.

[13] 文镜,刘璇,赵建.荧光法及化学发光法在保健食品抗氧化体外试验中的应用[J].中国酿造,2009(11):130.

[14] 陈山,刘丽娅,韩忠,等.瑶山甜茶提取物抗氧化性能的化

学发光检测[J].食品与发酵工业,2007,33(10):160.

[15] 杨涛,吴辉辉,徐青,等.抗氧化性能评价ORAC法及最新研究进展[J].食品工业科技,2009,30(7):352.

[16] 廖晖,王孝敏, Banbury LK, 等.16味中药炮制前后抗氧化活性的比较研究[J].中国药房,2010,21(47):4436.

[17] 付陈梅,焦必宁,阚建全.果蔬总抗氧化能力间接测定法及其影响因素[J].食品科学,2008,29(1):457.

[18] 李培源,霍丽妮,苏炜,等.总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS)法测定江南星蕨的抗氧化活性[J].中国试验方剂学杂志,2011,17(1):162.

[19] Borneo R, León AE, Aguirre A, et al. Antioxidant capacity of medicinal plants from the province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system[J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(3):664.

[20] 姚瑞祺,刘海英,牛鹏飞,等.不同分子量枸杞多糖的超滤法分离及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2008,29(5):89.

[21] 董菊,王明艳,詹臻.单细胞凝胶电泳技术在中医药研究中的应用[J].医药导报,2010,29(12):1614.

[22] 刘荣,董强,王向宏.柳蒿芽黄酮抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,2010,31(12):318.

[23] 高玉楠,杨靖,宋沁馨,等.8-羟基脱氧鸟苷作为DNA氧化损伤标志物在疾病诊断中的应用[J].药理学与临床研究,2012,20(3):223.

[24] 隋海霞,徐海滨,荫士安.大剂量芹菜素对大鼠抗氧化酶活性及DNA损伤影响的研究[J].卫生研究,2009,38(1):36.

[25] 邵婧,王国兴,金明,等.中药912液对脓毒症大鼠心肌细胞线粒体抗氧化防御体系酶的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(3):163.

[26] 谭峰.加味泽泻汤对试验性高脂血症大鼠血脂代谢及脂质过氧化影响的研究[D].福州:福建中医学院,2008.

[27] 陈刚领,刘俊,卞卡.蛋白质特殊氧化与疾病关系的研究进展[J].中国药理学通报,2009,25(5):561.

[28] 陈刚领,唐宁,薛永亮,等.蛋白质羰基化与疾病关系的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(7):58.

[29] Jayakumar T, Thomas PA, Isai M, et al. An extract of the oyster mushroom, *pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during aging in rats[J]. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2010,8(8):774.

[30] 刘志东,郭本恒,王荫榆.抗氧化活性检测方法的研究进展[J].天然产物研究与开发,2008,20(3):563.

(收稿日期:2012-04-23 修回日期:2012-09-18)

《中国药房》杂志——《哥白尼索引》(IC)收录期刊,欢迎投稿、订阅