

综述

体内和体外抗氧化活性检测方法

李希尤, 顾笑远, 毛江浩, 梅傲宇, 王皎, 李维熙*

(云南中医药大学中药学院, 昆明 650500)

摘要: 抗氧化活性的精确测定在对氧化应激的研究中发挥着重要作用。鉴于此, 研究者们已经开发了一系列体内和体外抗氧化活性检测方法, 以准确评估抗氧化剂的活性和揭示生物体内的氧化应激状态。本文综述了当前广泛应用的体内和体外抗氧化检测方法, 旨在为医学、生物学和食品科学领域中的抗氧化研究提供全面且实用的参考, 加深对抗氧化活性多维度评估的理解, 促进抗氧化研究的科学进展。

关键词: 抗氧化活性; 检测方法; 体内抗氧化检测法; 体外抗氧化检测法

In vivo and in vitro antioxidant activity detection methods

LI Xiyu, GU Xiaoyuan, MAO Jianghao, MEI Aoyu, WANG Jiao, LI Weixi*

(College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: The accurate determination of antioxidant activity is crucial for the study of oxidative stress. To accurately assess the activity of antioxidants and understand the state of oxidative stress in biological systems, various *in vitro* and *in vivo* methods for studying antioxidant activities have been established. This paper reviews the currently used *in vitro* and *in vivo* methods for detecting antioxidant activity, aiming to provide valuable references for research in the fields of modern medicine, biology, and food science.

Key Words: antioxidant activity; detection method; *in vitro* antioxidant testing methods; *in vivo* antioxidant testing methods

自由基也称为“游离基”, 过量的自由基与多种疾病的发生密切相关, 如动脉粥样硬化、肿瘤、衰老、肝病、肾病等。近年来, 关于自由基的研究主要集中在活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)。ROS是体内氧的单电子还原产物, 包括氧自由基和非自由基氧化剂, ROS主要由线粒体内膜呼吸链的电子泄露产生。RNS包括一氧化氮自由基、二氧化氮自由基以及非自由基, 如亚硝酸和四氧化二氮^[1]。

正常情况下, 体内产生的自由基可被体内抗氧化

防御系统如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)及非酶还原性物质谷胱甘肽(glutathione reduced, GSH)、维生素E和维生素C等中和。此外, 氧化应激也被认为是衰老的一个重要因素。近年来, 与氧化应激密切相关的铁死亡引起了广泛关注。铁死亡是由铁依赖性脂质过氧化引起的调节性细胞死亡。在铁死亡过程中, 铁沉积通过芬顿反应(Fenton reaction)生成高活性羟自由基($\cdot\text{OH}$), $\cdot\text{OH}$ 攻击多不饱和脂

收稿日期: 2023-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960780); 云南省基础研究中医学联合专项[2019FF002(-007)]; 云南省教育厅科学研究基金项目(2023J0543)

第一作者: E-mail: 18468295405@163.com

*通信作者: E-mail: liweixi1001@163.com

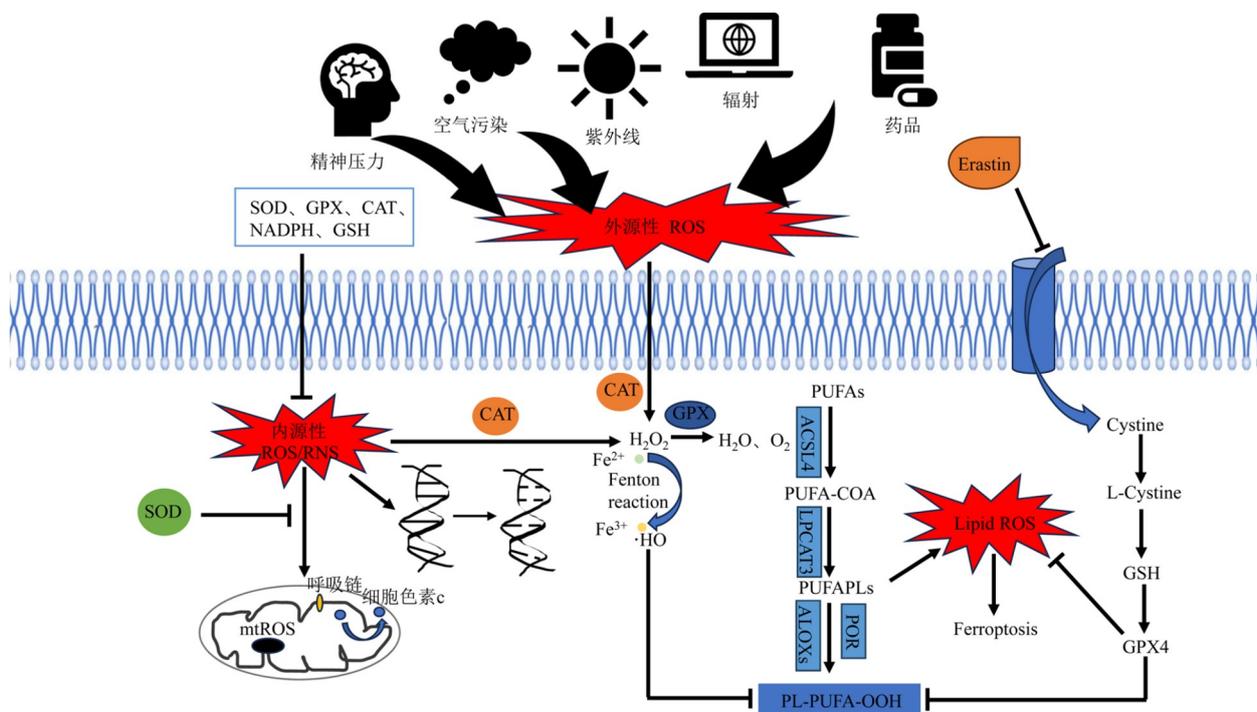
肪酸，从而触发脂质过氧化反应。与此同时，酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶3(lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3)介导的细胞膜磷脂重塑促进不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)与磷脂的结合，形成磷脂化多不饱和脂肪酸(phospholipidated polyunsaturated fatty acids, PUFAPLs)。多不饱和脂肪酸极易被花生油酸脂氧合酶(arachidonic acid lipoxigenases, ALOXs)和细胞色素P450氧化还原酶(cytochrome P450 reductase, POR)氧化形成磷脂氢过氧化物(phospholipid hydrogen peroxide, PL-PUFA-OOH)，破坏细胞膜的功能和完整性。图1展示了细胞内自由基的产生和清除过程，以及体内脂质ROS与铁死亡之间的相互联系。

抗氧化作用的概念最初源于化学领域，随后在医学、生物学和食品科学等领域得到广泛应用。抗氧化作用指通过中和自由基或抑制自由基生成来减少氧化应激，以维持生物体内的氧化还原平衡。因此，快速准确地测定潜在的抗氧化能力对

于防止氧化损伤、预防有害变化以及维持食品的营养价值至关重要。在已发表的研究中，有学者将抗氧化活性检测方法划分为酶法和非酶法^[2]。本文将重点阐述包括自由基清除法、2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate, ABTS)法、氧自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)法、巴比妥酸(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)法、铁离子还原/抗氧化能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)法等在内的体外抗氧化检测方法和包括对抗氧化防御体系的检测、大分子物质氧化产物的检测以及线粒体损伤测定等在内的体内抗氧化检测方法，以及它们的优缺点、局限性和实用性。分析这些体外和体内抗氧化检测方法将为食品、药品、营养品和膳食补充剂等行业的抗氧化检测提供重要的基础和参考。

1 体外抗氧化活性检测法

虽然体内抗氧化活性测定法可以较好地反映生物体内的抗氧化能力，但这一过程通常较为繁琐



PUFAs: 多不饱和脂肪酸; Erastin: 铁死亡诱导剂; Cystine: 胱氨酸; L-Cystine: L-半胱氨酸; GPX4: 谷胱甘肽过氧化酶4; NADPH: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

图1 自由基的产生和清除示意图

并受多种因素影响。相比之下, 体外抗氧化测定法更为简便, 受影响因素少, 非常适于快速筛选具有抗氧化活性的样品。

1.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)法

DPPH·是一种稳定的自由基, 在有机溶剂中可稳定存在。DPPH醇溶液呈紫色, 需低温避光储藏, 在517 nm波长处有最大吸收。当DPPH醇溶液与供质子底物混合时会发生还原反应, 使溶液颜色改变。溶液颜色的变化可通过DPPH·清除率、有效浓度、抗自由基能力、抑制率等指标量化。近年来, DPPH法被广泛用于定量测定生物试样、化合物、提取物的体外抗氧化能力测定及评价食品、化妆品、药品等的抗氧化能力。

DPPH法在体外检测有一定局限性, 如DPPH的亲脂性使其只能溶于有机溶剂, 无法检测水溶性的样品。此外, DPPH本身的颜色可能对样品检测结果产生干扰。但是DPPH法具有快速、简单、成本低廉等特点, 目前仍然是体外抗氧化检测的首选方法, 可结合其他检测手段以保证结果的准确性。

1.2 超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)清除法

超氧自由基即 $\cdot\text{O}_2^-$, 作为氧的单电子还原产物, 广泛存在于生物体内外。在体内, $\cdot\text{O}_2^-$ 不仅在线粒体呼吸链和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化中发挥重要作用, 而且与多种生理和病理过程都有紧密联系。例如, 心肌梗塞发生时, 过量的 $\cdot\text{O}_2^-$ 会引发心肌细胞的损伤, 并触发心肌纤维化, 及时的抗氧化干预能显著减轻这些损伤^[3]。

检测 $\cdot\text{O}_2^-$ 的常用方法有硝基四氮唑蓝还原法和细胞色素c还原法。在硝基四氮唑蓝还原法中, 硝基四氮唑蓝在 $\cdot\text{O}_2^-$ 作用下还原成二甲替。若在560 nm波长处有吸收, 则表明抗氧化剂消耗了溶液中的 $\cdot\text{O}_2^-$ 。由于灵敏度良好, 这一方法成为评估抗氧化剂活性的标准手段之一, 尤其是在筛选可能具有心脑血管保护作用的药物候选物时。细胞色素c还原法的原理和硝基四氮唑蓝法类似, 细胞色素c在550 nm波长处有吸收, 当细胞色素c被 $\cdot\text{O}_2^-$ 还原后, 550 nm波长处的吸光度下降。吸光度的变化程度可用来反映抗氧化剂清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的能力。细胞色素C还原法被广泛用于评价食品、食品添加

剂、营养补充剂和化妆品的抗氧化能力。利用该法检测发现, 红肉火龙果抗氧化效果优于白肉火龙果, 推测这是因为红肉火龙果中的甜菜色素具有中和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的活性。由于细胞色素c存在于细胞线粒体内膜, 该法也被广泛应用于基础研究和药物筛选中, 检测和评估氧化应激状态评估及抗氧化治疗的效果。在糖尿病并发症的研究中, 该方法被用于评价抗氧化治疗如何通过降低心肌血管中的 $\cdot\text{O}_2^-$ 来减轻氧化应激和炎症^[4]。

此外, 水母体内生物发光法提供了一个全新的视角, 在 $\cdot\text{O}_2^-$ 的氧化作用下, 水母体内辅酶素浓度下降导致光信号衰减, 通过监测生物体内的光信号强度变化可测定 $\cdot\text{O}_2^-$ 的水平从而评估抗氧化剂的活力^[5]。这一技术不仅可用于抗氧化剂的筛选和评价, 在环境毒理学和生态毒理学中的应用也越来越受到重视, 特别是在评估重金属污染对海洋生物造成的氧化压力方面。

1.3 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除法

羟自由基即 $\cdot\text{OH}$, 是一种具有高度活性的自由基, 它容易氧化各种生物大分子, 导致组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解等。检测 $\cdot\text{OH}$ 有多种方法, 如高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法、电子自旋共振法、化学发光法、比色法和荧光法等。其中, 邻二氮菲-亚铁离子氧化法和水杨酸比色法是检测抗氧化剂清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的两种常用方法。邻二氮菲-亚铁离子氧化法的原理是 $\cdot\text{OH}$ 将邻二氮菲-亚铁离子氧化成邻二氮菲-三价铁离子, 并在536 nm波长处有最大吸收。水杨酸比色法指 $\cdot\text{OH}$ 与水杨酸分子上的苯环反应, 产物在510 nm波长处有最大吸收。如果存在抗氧化剂, 溶液颜色逐渐变浅, 吸光值下降。因此, 可以通过溶液颜色的褪色程度和吸光值的下降程度来评估待测物清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力。该方法在食品科学研究中的应用尤为突出。在评价食品添加剂对延长油脂类食品保存期限的效果时, 经常采用水杨酸比色法来量化 $\cdot\text{OH}$ 清除活性。

近年来, $\cdot\text{OH}$ 清除法广泛用于药物、食品等的抗氧化活性检测。如用邻二氮菲法测定棉酚的抗氧化能力, 结果表明棉酚具有较强的抗氧化作用^[6]; 用水杨酸比色法测定银耳多糖与木耳多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用, 结果表明银耳多糖与木耳多糖

对·OH均有清除作用且黑木耳多糖的清除率更高，为食用菌的保健功能提供了科学依据^[7]，木耳多糖的抗氧化活性可能对改善心血管健康和延缓衰老有积极作用。·OH清除法操作简单、效率高，反应速率快。然而，需要注意的是，·OH具有较短的寿命，可能对实验结果的准确性造成影响。

1.4 ABTS法

ABTS法是一种用于测定抗氧化能力的常用方法。在该方法中，过硫酸钾将ABTS(无色)氧化成稳定的ABTS⁺(蓝绿色)，并在波长734 nm处有最大吸收。当抗氧化剂存在时，ABTS⁺被还原为ABTS和游离自由基，吸光度下降。抗氧化活性以样品的吸光度变化值和抗氧化剂标准品维生素E的水溶性类似物6-羟基-2,5,7,8-四甲基色氨酸-2-羧酸的吸光度比值来表示。ABTS法的灵敏度和快速性使其成为检测生物样品(如血浆和血清)中的总抗氧化能力以及厌氧菌产生自由基的常用方法^[8]。同时也广泛用于化学试剂和药效成分及食品添加剂的抗氧化活性检测。查尔酮和查尔酮类似物因具有潜在的抗炎和抗癌活性而备受关注，利用ABTS法人们评价了这类化合物的抗氧化活性^[9]，为解释化合物作用机制和构效关系打下了基础。此外，ABTS法与其他抗氧化方法的联合应用，在小叶榕的研究中不仅增加了检测结果的准确性，也加速了活性成分的筛选过程，这为天然产品中新型抗氧化剂的发现提供了强有力的技术支持^[10]。

然而，ABTS法的应用也需注意其局限性。抗氧化剂与ABTS⁺反应的特异性不如氢电子转移反应的检测灵敏，可能导致某些具有特定反应机制的抗氧化剂在ABTS法中的活性被低估。

1.5 ORAC法

ORAC法利用2,2-偶氮-2-氨基丙烷二盐酸盐产生的自由基破坏荧光探针，导致荧光强度减弱的原理进行检测。通过测量在激发光波长为485 nm、发射光波长为520 nm处的荧光强度来评估样品的氧自由基清除活性；并通过比较水溶性维生素E类似物Trolox与样品荧光衰减曲线下的面积评价样品的氧自由基吸收能力。有研究用有抗氧化剂的荧光衰减曲线下的面积与没有抗氧化剂的荧光衰减曲线下的面积之差来评价抗氧化剂的抗氧

化能力^[11]，测定结果用ORAC值表示^[12]，计算公式为：

$$\text{ORAC值} = \frac{(\text{AUC}_{\text{样品}} - \text{AUC}_{\text{空白}})}{(\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{空白}})} * \text{C}_{\text{Trolox}} / \text{C}_{\text{样品}}$$

ORAC法被广泛应用于生物样品、植物提取物、食品和药品等不同领域的抗氧化活性评价。例如，通过ORAC法测定紫花苜蓿提取物和分离化合物的抗氧化活性^[13]，不仅证实了其良好的药用价值也为其作为功能性饲料提供了科学依据。在食品科学领域，功能性小肽是近年来的研究热点，ORAC法也在测定动物肽和植物肽的抗氧化能力方面被广泛应用。如用ORAC法测定乌鸡肽、酪蛋白肽、鱼皮肽和牛韧带肽等食源性动物蛋白肽以及玉米肽、大米肽、小麦肽、大豆肽和核桃肽等食源性植物蛋白肽的总抗氧化能力^[14]，不仅揭示了这些天然成分的健康益处，也推动了功能性食品的开发和创新。

尽管ORAC法在抗氧化能力评估方面具有显著的优点，如高灵敏度、操作简便和适用性广泛，但它也存在一定的局限性。例如，荧光探针的pH敏感性可能影响测试结果的稳定性，尤其是在pH值低于7的样品体系中。此外，由于反应时间相对较长，荧光探针对环境变化(如温度波动)较为敏感，这要求在实验过程中严格控制实验条件。

因此，在使用ORAC法进行抗氧化能力评估时，应优化实验设计，如通过缩短反应时间或在恒定的环境条件下进行测试，可以进一步提高实验结果的准确性和重复性。

1.6 TBARS法

TBARS法是测定脂质过氧化的常用方法之一，其原理是丙二醛(malondialdehyde, MDA)在酸性高温条件下与硫代巴比妥酸生成粉红色络合物。络合物在530 nm波长处有最大吸收，而其他的醛、烷醇、烯醇等与显色底物生成的有色物在450 nm处有最大吸收。因此，可通过检测MDA相对含量变化了解生物膜脂质过氧化的情况。TBARS法因其简便性被广泛应用于食品安全、天然产物研究以及抗氧化药物开发中，如通过测定真空包装牛肉的TBARS值来评估脂质氧化对肉品质影响。此外，研究发现姜黄叶提取物具有显著的抗氧化作用，能有效降低大豆油的TBARS

值, 表明其具有在食品保鲜和延长保质期方面的潜力。

虽然TBARS法利用生物相关底物可用于检测与体内抗氧化反应相关的研究, 但由于灵敏性低、易受多种物质干扰和重现性较差等, 使其在体内研究中受到很大的限制。

1.7 FRAP法

FRAP法的检测原理是在酸性条件下抗氧化物将三价铁离子-三吡啶三吡嗪还原为蓝紫色的亚铁离子-三吡啶三吡嗪, 并在593 nm波长处有最大吸收。可根据吸光度值的大小评价抗氧化能力, 吸光度值与抗氧化能力成正比。通过测定吸光度变化, 可以直观地评估样品的抗氧化能力, 其中吸光度增加与样品的还原能力及抗氧化活性成正比。FRAP法不仅被应用于血浆中的抗氧化成分分析, 而且在植物抗氧化性能的评价中也显示出其广泛的适用性。通过FRAP法研究不同光质对青钱柳不同基因型抗氧化活性的影响, 揭示了在培育过程中光照条件及植物基因型对其抗氧化能力的重要影响, 突显了环境因素和遗传背景在植物抗氧化性能表达中的作用^[15]。

尽管FRAP法以其操作简便、快速和高重现性而受到青睐, 但该方法主要评估的是样品的还原能力而非直接的清除自由基能力, 因此在某些情况下可能无法全面反映抗氧化剂的所有抗氧化机制。此外, 由于FRAP法主要基于水溶性抗氧化剂的检测, 对于脂溶性抗氧化剂的活性评估可能不够全面。

除了以上提到的体外抗氧化方法外, 还有 β -胡萝卜素漂白法、铜离子还原力测定法、过氧化氢(H_2O_2)清除法、单线态氧淬灭法、总酚估计法、硫氰酸铁法、一氧化氮自由基清除法等方法。值得注意的是, 虽然体外抗氧化检测方法具有快速、简便、稳定的特点, 但这些方法均存在一定的局限性。为此, 研究人员常结合使用不同的自由基清除法来获得更全面的评估, 如将邻二氮菲法与ABTS法或ORAC法结合, 以衡量不同类型抗氧化剂的综合抗氧化能力。此外, 为了克服单一方法的局限性, 现代研究越来越侧重于多参数测定, 利用生物信息学和系统生物学工具来整合多种数据, 从而对抗氧化剂的综合效能给出更准确的描

述。此外, 在体外测定抗氧化剂的活性时, 还应确保待测物的浓度在实际应用范围内, 否则测定的抗氧化能力可能缺乏说服力, 没有实际意义。

2 体内抗氧化活性测定法

体内抗氧化活性测定法能更准确地反映生物体内的抗氧化能力和氧化应激状态。

2.1 抗氧化酶活性及抗氧化物水平的检测

抗氧化酶活性及抗氧化物水平的检测能帮助我们评估生物体内的氧化应激状态和抗氧化能力。SOD、GPX和CAT是抗氧化防御系统的重要组成部分, 在抵御氧化应激中起着关键作用。SOD是一种以共价键与金属辅基结合的酸性蛋白酶分子, 依据活性中心的金属离子不同, 可分为铜锌SOD(Cu、Zn-SOD)、锰SOD(Mn-SOD)和铁SOD(Fe-SOD)三种。常用的测定SOD活性方法有氰化三苯基四氮唑法、酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法、FRAP法、ROS消除法和电化学法。氰化三苯基四氮唑法的原理是 $\cdot O_2$ 与三苯基四氮唑反应, SOD将 $\cdot O_2$ 歧化抑制产物的生成。ELISA法的原理是抗体特异性地结合SOD, 加入带有标记物的二抗。最后通过测量标记的量来间接测定SOD的浓度和活性。FRAP法的底物含 $\cdot O_2$ 源, 在酸性条件下SOD将无色的三价铁离子——三吡啶三吡嗪复合物还原为蓝色的亚铁离子-三吡啶三吡嗪复合物, 亚铁离子-三吡啶三吡嗪在593 nm波长处的吸光度可以评估SOD的活性。ROS消除法的原理是SOD能有效转化ROS中的超氧化物, 将其分解为 H_2O_2 和水。即使SOD分解出的 H_2O_2 属于ROS, 但同时也存在CAT及过氧化物酶。这两种酶可将 H_2O_2 分解为氧气和氢气, 能有效清除ROS。电化学法的原理基于电化学信号与SOD活性之间的关系, 通过测定电流、电位等信号的变化来测定SOD活性。SOD活性的测定方法还有免疫学法、原位法等。

常用的GPX酶活性测定方法有ELISA法、FRAP法和荧光法。ELISA法原理是往预先包被微生物GPX捕获抗体的包被微孔中依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体, 再经过温育、洗涤, 底物显色。底物在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜

色的深浅和样品中微生物的GPX酶活性呈正相关。FRAP法同样可以用来测定GPX的活力，与测定SOD活力实验不同的是，反应体系中底物包含H₂O₂底物。荧光法的原理是GPX催化GSH，将H₂O₂或有机过氧化物转化为水或相应的醇，该过程中GSH被氧化为氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)。使用荧光探针检测GSH的消耗或GSSG的生成，荧光强度的变化与GPX的活性成正比，从而可以用来定量分析GPX活性。CAT属于血红蛋白酶，能催化H₂O₂分解为水和氧气，可根据H₂O₂的消耗或氧气的生成测定该酶的活力大小。H₂O₂在240 nm波长处有强烈吸收，反应液的吸光度随反应时间而下降，根据测量吸光率的变化速度检测CAT的活性。CAT的活力还可采用ABTS法和荧光法进行测定。除了测定这些抗氧化酶的活力，还可以检测它们的基因表达水平来反映生物样本内的氧化应激水平^[16]。

抗氧化物主要包括GSH、维生素E和维生素C等。GSH常用比色法进行测定，该法原理是GSH和5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)定量生成2-硝基-5-巯基苯甲酸和GSSG。2-硝基-5-巯基苯甲酸在波长412 nm处具有最大吸收，吸光度与GSH含量成正比。

维生素E是一类重要的脂溶性抗氧化剂，能够清除自由基、阻断自由基链式反应，对维持细胞膜的功能和完整性非常重要。维生素E还与谷胱甘肽和维生素C协同发挥抗氧化作用。目前常用的体内维生素E测定方法有HPLC法、紫外可见分光光度法、荧光法和ELISA法等。HPLC法和荧光法的精密度和特异性较好，是体内维生素E水平测定的常用方法。HPLC法是利用液相色谱对生物样本中的维生素E进行分离和分析，通过联用紫外、荧光或质谱检测器，对不同形式的维生素E进行定量。荧光法的测定原理是维生素E与荧光探针结合生成荧光衍生物，再通过测定产物的荧光强度定量分析样品中维生素E的水平。

维生素C具有很强的还原性，极易被氧化成可还原的脱氢维生素C。脱氢维生素C极易被氧化，很大程度上消耗了氧化物质，在体内向各种酶促或非酶促反应提供电子充当抗氧化剂。同时，维生素C还能将被氧化的维生素E等还原性物质还

原，使其恢复活性。测定体内维生素C的常用方法有HPLC法、紫外可见分光光度法、荧光法和电化学法等。HPLC法准确性和可靠性高，在临床和研究中被广泛使用。但对于灵敏度和特异性要求更高的研究，荧光法和电化学法可能更加合适。荧光法的测定原理是维生素C在特定条件下与特异性荧光探针结合生成有荧光的衍生物，通过测定衍生物的荧光强度来分析维生素C的水平。常用的荧光探针有邻苯二酚和氟酮类化合物。电化学法基于维生素C在电极上的还原性进行测定，利用电化学传感器测定维生素C的还原电流，该法具有快速、灵敏度高的特点。

2.2 生物标志物检测

2.2.1 脂质过氧化物水平的检测

脂质过氧化是衡量氧化应激的一个关键指标，其中MDA和4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)是脂质过氧化过程中生成的两个主要标志物。MDA是细胞膜脂质过氧化作用的重要产物，其浓度的增加通常被视为细胞膜损伤和氧化应激状态的直接证据。MDA常用比色法进行检测，该法原理是在高温、酸性条件下，MDA与硫代巴比妥酸发生反应形成红棕色的三甲基复合物，该复合物在532 nm波长处有最大吸收，可以对MDA进行定量分析^[17]。另一方面，4-HNE作为另一种脂质过氧化的关键标志物，由于其与多种病理状态相关联，包括神经退行性疾病、心血管疾病等，检测4-HNE同样具有重要意义。4-HNE的测定方法包括HPLC法和ELISA法等。HPLC法通过色谱分离技术能够测定复杂生物样本中的4-HNE。ELISA法检测时，特异性4-HNE抗体首先被用于微孔板的包被，依次加入待测的4-HNE样本及HRP标记的4-HNE抗体，通过形成的抗体-抗原-酶标抗体复合物，加入显色底物后，在酶的催化作用下产生颜色变化，该颜色变化经酸化后在450 nm波长下进行吸光度测定，从而实现对4-HNE含量的定量分析。

2.2.2 蛋白质氧化损伤检测

蛋白质氧化损伤是由ROS和RNS与细胞内蛋白质快速反应引发的损伤。其中，蛋白质羰基是蛋白质氧化损伤的主要标志物之一。羰基水平的变化可以反映蛋白质氧化损伤的程度。因此，测定

蛋白质中羰基水平是检测蛋白质氧化损伤的主要方法之一。蛋白质羰基水平的检测可用二硝基苯肼中的肼基与羰基缩合形成二硝基苯肼衍生物, 该衍生物可通过免疫印迹或ELISA法进行定量分析。此外, 研究开发的基于二硝基苯肼反应的电化学传感器, 可通过监测二硝基苯肼的肼基氧化峰值的变化定量分析ROS氧化蛋白质^[18]。高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)是另一种用于识别和分析氧化后氨基酸残基的方法, 特别适合于分离复杂样本中的氧化蛋白质。其中, 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法展示了在精密度、准确度和效率方面的优势^[19]。除此之外, 荧光蛋白法也被广泛应用于蛋白质氧化损伤的研究中, 这一技术依赖于荧光蛋白在特定波长下的激发和发射特定荧光信号的能力, 通过捕捉这些信号并将其转化为数字信号, 可以获取关于生物分子状态的详细信息。有研究表明, 长期暴露于粉尘的小鼠肺组织显示出明显的氧化损伤迹象, 如水肿、点状出血和结节状阴影; 荧光法测定结果表明, 肺组织蛋白质氧化水平升高, 揭示了环境污染对生物组织蛋白质氧化损伤的潜在风险^[20]。

2.2.3 DNA氧化损伤检测

DNA氧化损伤作为自由基和其他氧化剂作用的直接后果, 涵盖了双链断裂、单链断裂及特定氧化产物的形成等现象。其中, 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)和彗星实验法是评估DNA氧化损伤程度的两种主要技术手段。当细胞处于氧化应激环境时, DNA中的鸟嘌呤会被氧化剂氧化生成8-OHdG, 每 10^6 个鸟嘌呤中的8-OHdG数量可用来衡量DNA损伤程度。8-OHdG可通过毛细管气相色谱-质谱分析法和HPLC-电化学检测器法进行定量分析。彗星实验法又称单细胞凝胶电泳法, 其原理是将包埋于琼脂糖中的细胞裂解, 再将DNA解旋, 通过观察DNA在电场作用下的迁移模式来评估DNA的断裂情况, 其形成的彗星样图像大小和形状为DNA损伤提供了直观的定量和半定量信息。若DNA断裂成碎片, 则荧光染色后在显微镜下呈彗星样结构。彗星尾部越长、越大, 荧光强度越高, 表明DNA的断裂损伤越严重。随着技术的进步, 酶修饰的彗星实验法的开发增加了对不同类型DNA损伤的检测能力,

从而深化了我们对基因毒素作用机制的理解, 并提升了这些方法在临床诊断和环境监测中的应用价值^[21,22]。

DNA氧化损伤与肿瘤^[23]、脓毒症^[24]、癌症^[25]等发生发展密切相关。通过对肝细胞癌患者进行的研究发现, 与非癌性肝组织相比, 肿瘤组织中的ROS水平显著增加, 从而促进了核因子红细胞2相关因子的活化和8-OHdG的积累^[26]。这一发现不仅揭示了DNA氧化损伤在癌症发生中的重要作用, 也为开发新型抗氧化剂提供了理论基础, 这些抗氧化剂有潜力在减轻DNA氧化损伤和调控氧化应激过程中发挥治疗作用。

2.3 线粒体氧化损伤检测法

线粒体在细胞的能量代谢、细胞死亡调控以及多种疾病的发生发展中扮演着重要角色。其氧化损伤的检测对于理解生物的氧化应激状态具有重要意义。检测线粒体氧化损伤的主要方法包括线粒体膜电位的测量、线粒体呼吸链酶活性的评估以及线粒体DNA损伤的检测。

2.3.1 线粒体膜电位检测

线粒体膜电位是线粒体功能的重要指标, 氧化应激导致的线粒体膜电位降低通常预示着线粒体功能障碍和细胞面临死亡。荧光探针如JC-1、四甲基罗丹明乙酯和四甲基罗丹明甲酯等可在健康的线粒体中积累产生特定的荧光信号, 而在受损的线粒体中则无法积累, 其荧光强度的变化可反映线粒体膜电位的改变。特别是JC-1可基于线粒体跨膜电位的改变而展现出不同的荧光特性, 在线粒体膜电位高的健康细胞中; JC-1呈J-聚集复合体, 发出红色/橙色荧光, 在线粒体膜电位低的细胞中JC-1呈单体, 发出绿色荧光, 为研究线粒体功能提供了一个直观且灵敏的工具。

2.3.2 线粒体呼吸链酶活性

线粒体呼吸链酶的活性直接关系到细胞的能量代谢和氧化应激状态。通过生物化学法测量线粒体复合体I、II、III和IV等酶的活性, 可以判断线粒体功能是否受损。线粒体呼吸链酶活性的下降会减少线粒体内能量的产生, 从而影响细胞的代谢和能量供应。该法操作简单、灵敏、准确。在对党参水提物抗衰老的研究中, 通过分光光度法测定肝、肾线粒体呼吸链复合体I、IV酶活

性,证实高剂量党参水提物能有效提高小鼠肝、肾线粒体呼吸链复合体 I、IV 酶活性^[27],进而改善线粒体功能并减缓衰老过程。

2.3.3 线粒体DNA损伤检测

线粒体DNA损伤的检测,为理解线粒体在细胞损伤和疾病中的作用提供了重要视角。线粒体DNA损伤的增加与多种疾病状态密切相关,包括衰老、癌症和心血管疾病等。线粒体DNA损伤可利用DNA测序技术、ASO探针杂交、DNA芯片技术、单核苷酸多态性、实时荧光定量聚合酶链反应技术、限制性片段长度多态性分析及高效液相色谱技术等进行检测。

此外,线粒体膜磷脂发生脂质过氧化水平以及线粒体通透性转换孔检测都能反映线粒体损伤程度。线粒体氧化损伤的检测技术不仅对于揭示细胞内氧化应激的机制具有重要意义,也为开发新的抗氧化治疗提供了科学基础。随着研究的深入,这些检测方法在揭示疾病机制、评估干预措施效果以及开发新药中的应用将越来越广泛。

2.4 总抗氧化能力评估

总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)指体内各种抗氧化物质和抗氧化酶构成的总抗氧化水平可以保护机体不受氧化应激损伤的能力。TAC常使用ORAC、FRAP、ABTS、DPPH等方法进行测定,此外,化学发光法和电化学法也可用于TAC的测量。TAC化学发光法主要基于化学分析和化学发光原理,利用特定的荧光试剂和自由基或氧化剂反应,通过测量发光强度来定量分析TAC。该方法灵敏度好、特异性高、操作简便,但成本较高。有研究用化学发光法构建抗氧化体系来测定凤头仔姜和老姜醇溶黄酮的抗氧化能力,发现凤头仔姜醇溶黄酮的抗氧化能力显著强于老姜^[28],进一步强调了不同植物抗氧化物在食品和医药领域的潜在价值。TAC电化学法是一种基于电子转移反应原理的检测方法,将阳极中的自由基或氧化剂加入待测样品中,通过测量样品中还原剂或电势信号来定量分析TAC。尽管电化学法检测成本高,但该方法灵敏度和准确度高、精密度好,在抗氧化剂的快速筛选和评估方面有很大的潜力。用石墨烯修饰电极的电化学DNA传感器的开发,展示了电化学法在探测微量抗氧化剂中的高

灵敏度和广泛应用前景^[29]。

由于不同测定方法的原理不同,不同TAC测定方法获得的结果很难具有可比性,为反映生物体内抗氧化水平的整体情况,通常采用多个试剂同时应用来综合考虑各种抗氧化物质的协同作用。

3 细胞模型抗氧化活性检测

ROS的测定一般是利用荧光探针2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA或H₂DCFDA)检测,DCFH-DA本身没有荧光且可自由穿过细胞膜,待进入细胞后被细胞酯酶水解成2',7'-二氯二氢荧光素。2',7'-二氯二氢荧光素不可以穿过细胞膜与细胞中的ROS结合生成有荧光的二氯荧光素,其荧光强度与细胞内的ROS水平成正比。因此,可以通过检测二氯荧光素的荧光对细胞抗氧化活性进行评价。测定细胞中的脂质过氧化通常用硼-二吡咯亚甲基荧光探针,这是一种亲脂性荧光探针,能标记细胞中的中性脂质内容物。硼-二吡咯亚甲基荧光探针定位在活细胞和固定细胞的脂滴上,对脂滴有特异性染色^[30]。

上述荧光技术较其他抗氧化检测方法的优点是能与生物体内分析物感应和可视化,并且只有与目标物结合时才会发出荧光,即可提高成像的信噪比^[31,32]。有研究利用H₂DCFDA荧光探针的可视化和量化研究人肝癌细胞中H₂DCFDA的体外特性,判断缺氧/富氧的人肝癌细胞中的氧化应激^[33]。还有研究者设计并合成的两种新型硼-二吡咯亚甲基荧光探针已成功应用于检测活细胞中的内半胱氨酸和同型半胱氨酸荧光成像^[34]。动物实验结果虽可以真实反映体内的抗氧化程度,但费用较高、实验周期也较长,可以通过细胞模型进行抗氧化活性评价。

4 总结与展望

抗氧化活性测定方法多样,测定原理涵盖了样品对自由基的清除能力、样品的还原能力、样品抑制脂类物质氧化的能力等。由于氧化过程涉及较多的诱导和调控机制,导致体内氧化应激还牵涉到多种信号通路和代谢途径参与,使抗氧化的研究方法和策略具有多样性(表1)。不同方法对结

表1 一些抗氧化活性方法总结

方法	反应机理	反应机制	应用范围
DPPH	$\text{DPPH}\cdot + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{DPPH}_2(517 \text{ nm})$		二氢查尔酮、黄烷酮, 常被用做底物评估抗氧化剂的活性等
ABTS	$\text{ABTS}\cdot(\text{蓝/绿色}) + \text{抗氧化剂} \rightarrow \text{ABTS}(\text{无色}) + \text{自由基}(734 \text{ nm})$	电子转移	羟基化的芳香族化合物等
FRAP	$[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}(\text{无色}) + \text{抗氧化剂} \rightarrow [\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}(\text{蓝色})(\text{酸性}, 593 \text{ nm})$		食品提取物、饮料、生物液体、香料、蔬菜、水果、精油等
FC	$\text{Mo}^{6+}(\text{黄色}) + e^- \rightarrow \text{Mo}^{5+}(\text{蓝色});$ $\text{Mo}^{+5} + e^- \rightarrow \text{Mo}^{4+}(\text{蓝色})(\text{碱性}, 765 \text{ nm})$		检测化合物中总酚含量(食品、饮料等)
ORAC	$\text{R}\cdot\text{N}=\text{N}\cdot\text{R} \rightarrow 2\text{R}\cdot + \text{N}_2; \text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}\cdot;$ $\text{ROO}\cdot + \text{探针} \rightarrow \text{ROOH} + \text{氧化探针}$ (激发波长: 485 nm; 发射波长: 520 nm)		生物系统和食品中的脂质氧化等
TBARS	$2\text{TBA} + \text{MDA} \rightarrow (\text{TBA})_2\text{-MDA}$ (酸性、高温, 激发波长: 530 nm; 发射波长: 550 nm)	氢原子转移	脂质过氧化(醛类、共轭二烯)、测量抗氧化剂的电子交换能力等
FTC	$\text{Fe}^{2+} \text{氧化剂} \rightarrow \text{Fe}^{3+}; \text{Fe}^{3+} + 3\text{SCN}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{SCN})_3(\text{红色})(500 \text{ nm})$		水果、蔬菜等
$\cdot\text{O}_2^-$	$\text{O}_2\text{e}^- \rightarrow \text{O}^{2-} + e^- \rightarrow \text{O}_2^{2-}(560 \text{ nm})$	自由基清除法	SOD及各种抗氧化剂
$\cdot\text{OH}$	$\text{H}_2\text{O}_2(\text{紫外照射}) \rightarrow 2\cdot\text{OH}(560 \text{ nm})$		水果、蔬菜等
金属离子螯合法	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$	金属离子螯合	—
SOD	$2\text{O}_2^- + \text{SOD} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	酶法	小批量样本检测
GPX	$2\text{GSH} + \text{R}\cdot\text{OOH} + \text{GPX} \rightarrow \text{GSSG} + \text{R}\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$		

果的解释各异, 导致单一方法可能无法全面反映某一抗氧化剂的活性, 而不同方法得到的分析结果之间也缺乏可比性。因此, 采用多种抗氧化检测方法可以更全面地了解某种化合物或产品的抗氧化能力, 从而更准确地反映化合物和产品的抗氧化水平。例如, 可以用ORAC和FRAP法评估酿酒原料和技术对抗氧化剂活性的影响^[35]; 通过DPPH、ABTS、FRAP、TBARS和磷钼酸法等多种方法对两种突尼斯小枣种子提取物Arechti和Korkobbi的化学成分的抗氧化性能进行评估^[36]; 通过ABTS、DPPH、FRAP法研究冬虫夏草和细脚棒束孢水提取物的抗氧化潜力, 发现它们具有较强的抗氧化活性^[37]。多种方法的综合评价能为研究提供更加深入的洞见, 为产品的开发提供更为全面的依据。

当前, 抗氧化研究领域也存在一些挑战。不同抗氧化活性测定方法之间缺乏统一标准, 导致结果难以比较和复现。抗氧化剂的具体作用机制尚不完全清楚, 尤其是它们如何与生物体内的多种信号通路和代谢途径相互作用。在未来, 抗氧化活性检测方法应朝更加精准和灵敏的检测技术开发方向倾斜, 以便更准确地评估抗氧化剂的活性和作用机制。此外, 抗氧化剂在生物体内的利用

度和稳定性也是亟待解决的问题之一。未来在加强抗氧化剂在临床治疗和疾病预防中的研究时, 也可增加改善抗氧化剂递送效率和生物利用度的研究。

随着技术的不断发展和研究人员对抗氧化活性检测方法的深入探索, 现有的测定方法必将不断得到改良, 还会有更多准确、简便的检测方法被开发运用, 帮助研究者更好地阐明药物抗氧化的调控机制及其在治疗疾病中的作用。

参考文献

- [1] 乔莞宁, 陈虹印, 张扬. 氧化应激与动脉粥样硬化. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(4): 312-321
- [2] 邓琦, 郑丹丹, 赵忠熙. 非酶法和酶法抗氧化活性检测方法. 生命的化学, 2021, 41(9): 2042-2051
- [3] 张庆勇, 陈燕萍, 刘芬, 等. 人参皂苷Rg1对大鼠急性心肌缺血抗氧化损伤指标及超微结构的影响. 中国循环杂志, 2015, 30(2): 164-167
- [4] 许笑雯, 储全根, 储俊, 等. 痰瘀同治法对糖尿病大鼠心肌微血管病变AGEs/RAGE轴及氧化应激的影响. 南方医科大学学报, 2021, 41(10): 1527-1533
- [5] Rahmani H, Ghavamipour F, Sajedi RH. Bioluminescence detection of superoxide anion using aequorin. *Anal Chem*, 2019, 91(20): 12768-12774
- [6] 荣梦杰. 棉酚的亚临界提取及抗氧化活性研究[D]. 北

- 京: 中国农业科学院, 2020
- [7] 张磊, 徐皓, 孟超, 银耳, 木耳多糖清除羟自由基的比较实验. 泰山医学院学报, 2019, 40(7): 493-496
- [8] Kędziora A, Lesiów MK, Krupa K, et al. Protocol of proceedings with *Fusobacterium nucleatum* and optimization of ABTS method for detection of reactive oxygen species. *Future Microbiol*, 2020, 15(4): 259-271
- [9] Bale TA, Ali F, Khan MK, et al. Chalcones and bis-chalcones analogs as DPPH and ABTS radical scavengers. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2021, 18(3): 249-257
- [10] 李华, 沈千汇, 黄琦. 小叶榕中抗氧化成分的在线提取 HPLC-ABTS联用分析. 时珍国医国药, 2021, 18(3): 249-257
- [11] Cao GH, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*, 1999, 299: 50-62
- [12] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(10): 4619-4626
- [13] Quek A, Mohd Zaini H, Kassim NK, et al. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) and antibacterial properties of *Melicope glabra* bark extracts and isolated compounds. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0251534
- [14] 况秀平, 黄蓉萍, 韩绍聪. ORAC法比较几种动物蛋白肽的抗氧化活性. 广东化工, 2022, 49(7): 14-15, 52
- [15] 陈培, 周明明, 方升佐, 等. 光质对不同家系青钱柳叶酚类物质积累及抗氧化活性的影响. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(2): 17-25
- [16] 朱星晔, 韩育梅. 过氧化氢酶的检测方法及其在大米贮藏中的应用. 农产品加工(学刊), 2010, (8): 103-105
- [17] 莫简. 医用自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 214-228
- [18] Enache TA, Matei E, Diculescu VC. Electrochemical sensor for carbonyl groups in oxidized proteins. *Anal Chem*, 2019, 91(3): 1920-1927
- [19] 陶弥锋. SPE-UPLC-MS/MS分析运动饮料中氨基酸组分的研究. 中国食品添加剂, 2017(11): 100-106
- [20] Zhang ZQ, Cai YQ, Lin L, et al. Effect of silica dust on protein oxidative injury in lung tissue of mice. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2017, 35(9): 709-711
- [21] Muruzabal D, Collins A, Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: past, present and future. *Food Chem Toxicol*, 2021, 147: 111865
- [22] Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 2018, 33(1): 1-7
- [23] 杨柳春, 王克义. DNA氧化损伤标志物8-羟基脱氧鸟苷与相关肿瘤关系的研究进展. 浙江医学, 2021, 43(23): 5
- [24] 陈潇荣, 蒋丹蔚, 唐亚慧. 血清8-羟基脱氧鸟苷对脓毒症患者病情进展及预后的预测价值. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(3): 8
- [25] Nurhidayat I, Budiawan I. Synergistic effect of trichloroethylene and Cu(II) on DNA-adduct 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) formation as a biomarker of cancer risk. *J Phys Conf Ser*, 2021, 1918(3): 032011
- [26] Ma-on C, Sanpavat A, Whongsiri P, et al. Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol*, 2017, 34(4): 57
- [27] 耿广琴, 杨雅丽, 李扬. 党参水提物对D-半乳糖致衰老模型小鼠肝、肾线粒体呼吸链复合体 I、IV酶活性及线粒体结构的影. 中医研究, 2015, 28(1): 67-70
- [28] 燕品睿, 寇德正, 周贵华. 基于化学发光法的凤头姜仔姜与老姜醇溶黄酮的抗氧化能力比较. 中国调味品, 2023, 48(6): 53-58
- [29] 张合敬. 基于石墨烯及其复合材料的电化学传感器研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2013
- [30] Li G, Li J, Otsuka Y, et al. A BODIPY-based fluorogenic probe for specific imaging of lipid droplets. *Materials*, 2020, 13(3): 677
- [31] Su D, Teoh CL, Wang L, et al. Motion-induced change in emission (MICE) for developing fluorescent probes. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(16): 4833-4844
- [32] Klymchenko AS. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc Chem Res*, 2017, 50(2): 366-375
- [33] Reiniers MJ, de Haan LR, Reeskamp LF, et al. Optimal use of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate in cultured hepatocytes. *Methods Mol Biol*, 2022, 2451: 721-747
- [34] Gao J, Tao Y, Wang N, et al. BODIPY-based turn-on fluorescent probes for cysteine and homocysteine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 203: 77-84
- [35] Wannemacher J, Cotterchio C, Schlumberger M, et al. Technological influence on sensory stability and antioxidant activity of beers measured by ORAC and FRAP. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(14): 6628-6637
- [36] Dunlap CA, Bowman MJ, Zeigler DR. Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 1-12
- [37] Prommaban A, Sriyab S, Marsup P, et al. Comparison of chemical profiles, antioxidation, inhibition of skin extracellular matrix degradation, and anti-tyrosinase activity between mycelium and fruiting body of *Cordyceps militaris* and *Isaria tenuipes*. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 225-234