

文章编号:1673-1689(2008)04-0006-06

抗氧化检测方法的相关性研究

李 华, 李佩洪, 王晓宇, 李 勇

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:通过对大量文献中不同抗氧化检测方法测定值的分析,统计出目前最常用的 10 种抗氧化检测方法之间的相关性。研究发现:基于 HAT 机制的方法(TBARS、FTC、ORAC)与生理相关自由基清除法(超氧自由基、羟自由基)的相关性高于其与 SET 机制方法(DPPH、ABTS、FRAP、FC)的相关性。相反,基于 SET 机制的各种方法之间的相关性高于它们与其他方法之间的相关性。测定金属离子螯合能力的方法与其他各种方法之间的相关性都很差。另外,由于待测物的不同,不同抗氧化检测方法之间的相关性变化差异很大, R^2 的变化范围为 0.00X~0.9XX。因此,在目前状况下,测定抗氧化能力时,应该根据实验室条件以及待测物,选用不同机制的多种方法。

关键词: 抗氧化方法; 相关性; 不同机制

中图分类号: TS 20; O 212.1

文献标识码: A

Relativity about Ten Antioxidant Methods

LI Hua, LI Pei-hong, WANG Xiao-yu, LI Yong

(College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: This work analyses the relativity about the most common ten methods for measure antioxidant activity by studying many literatures. It was found that: the method(TBARS, FTC, ORAC) which based on HAT mechanism has much relativity with the method($\text{HO}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) can clear up free radical and relative physiology than the method(DPPH, ABTS, FRAP, FC) based on SET mechanism. However, the methods which based on SET have much relativity in their selves than other methods. There is little relativity between the method which can measure metal chelating activity and other methods. Furthermore, there is much change of relativity in different methods for different materials, R^2 changes in 0.00X~0.9XX. Therefore, at the present time, we should choose several methods based on different mechanism considering the materials and laboratory conditions.

Key words: antioxidant method; relativity; different mechanism

人体正常新陈代谢过程中产生了活性氧(ROS)和活性氮(RNS),包括超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、过氧自由基($\text{ROO}^\cdot$)、羟自由基($\text{HO}^\cdot$)、单线态氧($^1\text{O}_2$)和过氧化氮自由基

收稿日期:2007-09-21.

基金项目:科技部“科技成果重点推广项目计划”项目(2004EC000317).

作者简介:李华(1959-),男,重庆人,工学博士,教授,博士生导师.主要从事葡萄与葡萄酒的研究.

Email: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

(ONOO⁻)等。这些活性物质将会对机体造成伤害,引发炎症和分子降解等类型的疾病,例如动脉粥样硬化、癌症、神经性疾病等^[1]。除人体内自身的抵抗系统(抗氧化酶系统、蛋白质等大分子、维生素等小分子、激素)外,许多外源的小分子如抗坏血酸、维生素E、 β -胡萝卜素,以及各种多酚物质等,作为抗氧化剂可以抵抗活性氧造成的危害^[2-3]。各种食品、药品、天然动植物中富含这些抗氧化物质,它们的摄入将有利于机体的抵抗能力。因此对这些物质进行正确的抗氧化功能评价,将有利于指导消费者的选择。

1 抗氧化检测方法概述

抗氧化活性主要表现在抑制脂质的氧化降解、清除自由基、抑制促氧化剂(如螯合过渡金属)和还原能力等几方面。抗氧化检测方法主要包括:(1)以脂质的氧化降解为基础的方法(过氧化值法、硫氰酸铁法、共轭二烯法等);(2)以清除自由基为基础的方法(生物体中存在的自由基和人工自由基);(3)螯合过渡金属防止产生自由基的方法(金属离子的螯合能力);(4)测定待测物的还原能力的方法(有铁离子还原能力、铜离子还原能力、循环伏安法等)。根据抗氧化物质的作用机理又可将这些分为两类:基于H原子转移的方法(HAT)和基于电子转移的方法(SET)^[4]。

虽然测定抗氧化能力的方法很多,但还没有一种抗氧化方法可以完全地评价抗氧化物质的抗氧化能力。主要原因是由于:(1)生物体中有多个抗氧化系统,这些存在于体内的抗氧化系统的工作原理、相互之间的关系还没有搞清楚,所以很难对抗氧化物质进行综合评价。(2)在系统中存在多种自由基和抗氧化剂资源,他们各自都有不同的化学和物理特征。某一抗氧化剂可能在单一系统中同时有多重机制,或者在不同系统中表现出不同的机制。此外对于不同的自由基,抗氧化剂的清除机制也不相同。(3)现在采用的抗氧化方法大多为体外抗氧化测定,无法真实模拟生理环境,且各方法都仅测定了抗氧化能力中的某一方面,故无法模拟生理条件下的多条抗氧化途径。(4)测定的样品大多为混合物如食品等,其成分非常复杂,各抗氧化物质的抗氧化作用无法用单一的机制解释^[5-6]。因此目前测定抗氧化物质的抗氧化能力不能只用一种方法,应该选用不同类型的方法。面对数10种方法,而且每种方法都各有利弊,选择的确非常困难。

2 统计分析

通过对目前最常用的10种方法进行相关性研究,统计分析了在实际应用中各方法之间的关系,以期寻找快速、准确的方法来检测抗氧化物质的抗氧化能力。

2.1 样本

选择296篇来自SCI的文章,45篇来自CNKI核心期刊(由于篇幅有限,未将文献列出)。文献检索使用ISI web of knowledge,全文获得于SDOL、ACS和Springerlink全文数据库。方法之间的相关性数据收集:(1)文中作者已经统计,直接采用;(2)文中作者未统计,根据有关的数据自行统计。

2.2 统计方法

采用DPS7.5软件进行统计分析。

3 结果与讨论

3.1 最常使用的抗氧化测定方法

从ISI检索系统中对2000—2007年所使用的抗氧化检测方法进行统计,选出了频率最高的10种抗氧化测定方法:DPPH自由基清除能力、羟自由基(HO[•])清除能力、超氧自由基(O₂^{•-})清除能力、ABTS自由基清除能力、铁离子还原能力(FRAP)、氧自由基吸收能力(ORAC)、总酚估计法(FC)、硫代巴比妥酸反应物法(TBARS)、硫酸氰铁法(FTC)、螯合金属离子法。将这些方法分为4类:(1)活性氧自由基清除能力,包括羟自由基和超氧自由基;(2)基于氢原子转移(HAT)的方法,包括ORAC、TBARS、FTC;(3)基于电子转移(SET)的方法,包括DPPH、ABTS、FRAP、总酚估计法;(4)金属离子螯合能力法。一般认为基于HAT机制的方法与经典的脂质过氧化的方法类似,最接近生理环境真实氧化过程,而活性氧自由基也为生理环境中存在,因此认为这些与生理环境相关的测定方法,可以检测抗氧化物质的抗氧化能力。基于SET机制的方法,以测定氧化还原潜力为基础的方法,大多操作简单,便于实验室大规模日常操作,在很多时候与HAT机制的方法有很高的相关性。

3.2 不同文献中抗氧化检测方法相关性的数值区间分布

从SCI文章和中文核心期刊中筛选出350篇文献(这些文献中至少使用了以上10种方法中的2种)。表1为各方法间相关性分布状况,将相关性值分为 $R^2 > 0.8$, $0.8 \sim 0.5$, $0.5 \sim 0.3$, < 0.3 四个区段。

表 1 10 种抗氧化检测方法相关性(R^2)在实际应用中的数值分布
Tab.1 The R^2 of the ten antioxidant methods in the practically using

方法	统计 样本	R^2 最大值	R^2 最小值	$R^2>0.8$ 分布/%	$0.5<R^2<0.8$ 分布/%	$0.3<R^2<0.5$ 分布/%	$R^2<0.3$ 分布/%
羟/超	48	0.992 0	0.047 2	38	29	8	25
羟/DPPH	46	0.981 3	0.000 2	26	30	11	33
羟/FRAP	31	0.990 8	0.008 7	23	32	13	32
羟/TBARS	20	0.999 8	0.177 4	40	20	25	15
羟/FC	40	0.994 0	0.002 5	15	32	23	30
羟/ABTS	12	0.974 4	0.006 9	25	8	25	42
羟/螯合力	14	0.973 8	0.000 1	14	21	21	44
超/TBARS	25	0.983 5	0.045 9	48	16	12	24
超/ORAC	11	0.997 2	0.005 8	46	27	—	27
超/DPPH	56	0.997 2	0.000 1	37	20	11	32
超/FTC	13	0.999 8	0.061 8	31	15	23	31
超/ABTS	20	0.982 1	0.001 1	30	15	15	40
超/FC	41	0.940 9	0.002 1	32	20	17	31
超/FRAP	10	0.971 8	0.003 8	20	20	30	30
超/螯合力	12	0.951 0	0.001 5	17	17	—	66
ORAC/FC	80	0.996 4	0.001 0	58	29	4	9
ORAC/ABTS	24	0.990 0	0.025 0	37	17	17	29
ORAC/DPPH	25	0.987 2	0.004 4	40	20	8	32
ORAC/FRAP	24	0.980 1	0.004 0	21	37	13	29
TBARS/FRAP	15	0.995 6	0.086 1	54	—	13	33
TBARS/ABTS	13	0.977 7	0.119 0	23	46	8	23
TBARS/FC	20	0.993 0	0.010 2	30	25	20	25
TBARS/DPPH	37	0.996 4	0.001 6	16	27	14	43
FTC/FRAP	10	0.987 4	0.000 1	10	30	40	20
FTC/FC	12	0.992 8	0.001 0	33	8	17	42
FTC/DPPH	23	0.966 3	0.000 1	17	13	13	57
DPPH/ABTS	57	0.999 8	0.003 5	53	23	5	19
DPPH/FRAP	58	0.999 8	0.002 0	43	24	9	24
DPPH/FC	120	0.999 8	0.000 1	42	28	8	22
DPPH/螯合力	30	0.967 9	0.000 1	17	17	13	53
ABTS/FC	68	0.999 8	0.106 9	60	24	9	7
ABTS/FRAP	32	0.999 8	0.003 5	53	25	3	19
ABTS/螯合力	17	0.949 7	0.001 6	24	18	12	46
FRAP/FC	75	0.999 8	0.038 9	59	25	8	8
FC/螯合力	21	0.953 6	0.004 6	19	19	5	57

由表 1 可知,在统计数据中,不论是哪两种方法之间的相关性其数值变化范围基本为 $0.00X\sim 0.9XX$,数据的变化差异非常大。不同方法间相关性值的区段分布均不一致。 $R^2>0.8$ 区段:方法相

关性的分布为 14%~60%,ABTS/总酚为最高,羟基/螯合力为最低;0.8~0.5 区段:方法相关性的分布为 0~46%,ABTS/TBARS 为最高,FRAP/TBARS 为最低;0.5~0.3 区段:方法相关性的分布为 0~40%,FRAP/FTC 为最高;<0.3 区段:方法相关性的分布为 7%~66%,超氧自由基/螯合力为最高,ABTS/总酚为最低。相关系数的分布区间在 $R^2>0.8$ 和 0.8~0.5 间较高的方法相关性高,反之则低。然而对于相关性高的方法之间也有一些研究结果较低。造成这一差异的原因除了不同研究者、不同实验室的实验误差外,主要是由于测定样品的不同所致。作者统计的样品包括:化学物质、果酒、水果、蔬菜、农作物、草药等。由于测定样品的不同,测定方法间的相关性明显不一致,例如:Ou 等人在测定不同蔬菜的抗氧化能力时 ORAC 法和 FRAP 法的相关系数为 0.005 5、0.96、0.13、0.78、0.15、0.64、0.65、0.59、0.87、0.78、0.57 和 0.43^[7]。

3.3 不同抗氧化检测方法之间的相关性

由表 2 可知,各抗氧化检测方法之间的相关性系数均值,最高为 ABTS/总酚(0.776 5),最低为 DPPH/FTC(0.329 5)。将各方法相关性分别排序为:羟自由基清除(简称“羟”)与各方法相关性,羟/TBARS>羟/超>羟/DPPH>羟/FRAP>羟/FC>羟/ABTS>羟/螯合力;超氧自由基清除(简称“超”)与各方法相关性,超/TBARS>超/ORAC>超/羟>超/DPPH>超/FTC>超/ABTS>超/FC>超/FRAP>超/螯合力;ORAC 法与各方法相关性,ORAC/FC>ORAC/超>ORAC/ABTS>ORAC/DPPH>ORAC/FRAP;TBARS 法与各方法相关性,TBARS/超>TBARS/羟>TBARS/FRAP>TBARS/ABTS>TBARS/FC>TBARS/DPPH;FTC 法与各方法相关性,FTC/超>FTC/FRAP>FTC/FC>FTC/DPPH。由以上各方法的相关性可以看出,基于 HAT 机制的方法以及以清除生理相关自由基为基础的方法,这些方法之间的相关性要高于他们与 SET 机制方法的相关性。

表 2 10 种抗氧化检测方法之间的相关系数(R^2)
Tab. 2 The R^2 of the ten antioxidant methods

	HO·	O ₂ ⁻	DPPH	ABTS	FRAP	ORAC	TBARS	硫氰酸铁	螯合力
HO·									
O ₂ ⁻	0.604 7								
DPPH	0.503 3	0.544 9							
ABTS	0.454 8	0.504 5	0.666 3						
FRAP	0.492 7	0.462 7	0.631 0	0.677 5					
ORAC		0.634 8	0.557 2	0.562 4	0.528 7				
TBARS	0.645 5	0.650 4	0.437 2	0.597 0	0.635 7				
硫氰酸铁		0.538 9	0.329 5		0.482 4				
螯合力	0.394 2	0.305 0	0.3544	0.429 2	0.415 5				
总酚	0.475 5	0.494 1	0.6264	0.776 5	0.745 2	0.770 1	0.562 5	0.469 0	0.387 9

基于 SET 机制的方法与其他方法的相关性: DPPH/ABTS>DPPH/FRAP>DPPH/FC>DPPH/ORAC>DPPH/超>DPPH/羟>DPPH/TBARS>DPPH/螯合力>DPPH/FTC;ABTS/FC>ABTS/FRAP>ABTS/DPPH>ABTS/TBARS>ABTS/ORAC>ABTS/超>ABTS/羟>ABTS/螯合力;FRAP/FC>FRAP/ABTS>FRAP/TBARS>FRAP/DPPH>FRAP/ORAC>FRAP/羟>FRAP/FTC>FRAP/超>FRAP/螯合力;FC/ABTS>FC/ORAC>FC/FRAP>FC/DPPH>

FC/TBARS>FC/超>FC/羟>FC/FTC>FC/螯合力。由以上各方法的相关性可以看出,基于 SET 机制的方法,这些方法之间的相关性要高于它们与 HAT 机制方法的相关性。另外,不论 HAT 机制的方法还是 SET 机制的方法,众方法与金属离子螯合能力相关性均较差。

3.4 选择抗氧化检测方法关键指标的比较

表 3 为 10 种抗氧化检测方法基于多方面标准考虑的综合比较。

表 3 抗氧化检测方法关键标准的比较
Tab.3 Methods for assessing antioxidant capacity compared by key criteria

方法	难易程度	仪器	生物相关	机理	溶解性	参考文献
羟自由基	+	++	+	ROS	--	[8-11]
超氧自由基	+	++	+	ROS	--	[11-14]
ORAC	+++	--	+++	HAT	+++	[15-16]
TBARS	-	+++	+++	HAT	--	[5,17]
FTC	-	+++	++	HAT	--	[5,17]
DPPH	+	+	-	SET	-	[18-19]
ABTS	+	+	-	SET	+++	[20-22]
FRAP	+++	+++	--	SET	---	[23]
FC	+++	+++	--	SET	---	[24]
螯合力	+	+++	---		--	

注：+，++，+++表示优的等级。-，--，--- 表示差的等级。

这些体外的抗氧化检测方法各有利弊,但许多研究者认为 HAT 机制的方法生物最相关,因此认为这些方法是测定抗氧化能力的最佳方法。Prior 等认为 ORAC 是其中最好的一种方法^[4]。ORAC 法采用延长时间 30 min 的反应,抗氧化剂的保护性影响采用荧光衰减的下面积表示,避免了选择终点所带来的误差。此法测得的是总的抗氧化活性,而且可自动化、标准化。但该方法需要使用荧光光度计,自动化则需要荧光酶标仪(普通实验室没有),测定所需时间稍长。基于 SET 机理的方法,大多方便简单,测定速度快,适于大规模测定,但生理相关性差。

因此,在目前状况下没有一种方法可以代替全部的方法而作为标准方法,因此在具体应用时还需要使用不同方法来说明抗氧化剂的不同方面。在选择方法的时候要考虑不同机理的方法(HAT 和 SET)和不同自由基清除的方法,对于一些具体的抗氧化物质,可将抗氧化剂先归类后再进行抗氧化方法的筛选。

参考文献(References):

[1] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] Sanchez Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems [J]. *Food Science and Technology International*, 2002, 8(3): 121-137.

[3] Roginsky V, Lissi E A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food[J]. *Food Chemistry*, 2005, 92: 235-254.

[4] Prior R L, Wu L, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements[J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53(10): 4290-4302.

[5] 王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(一)[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32: 92-98.
Wang Hui, Guo Li, Xie Wen-lei. Methods for determining antioxidive activity of antioxidants(I) [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32: 92-98. (in Chinese)

[6] 王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(二)[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32: 98-102.
Wang Hui, Guo Li, Xie Wen-lei. Methods for determining antioxidive activity of antioxidants(II) [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32: 98-102. (in Chinese)

[7] Ou B, Huang D, Hampsch Woodill M, et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays; a comparative study[J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(11): 3122-3128.

[8] Zhu B Z, Kitrosky N, Chevion M. Evidence of production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hy-

- drogen peroxide. A metal-independent organic Fenton reaction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270(3): 942—946.
- [9] Halliwell B, Gutteridge J M, Aruoma O I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals[J]. *Anal Biochem*, 1987, 165(1): 215—219.
- [10] Ou B, Hampsch Woodhill M, Flanagan J, et al. Novel fluoremetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe[J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50: 2772—2777.
- [11] 王炳娟. 氧自由基的分析研究进展[J]. 北京教育学院学报: 自然科学版, 2007(2): 3—7.
Wang Bing-juan. Advances in the analysis of oxygen free radical[J]. *Journal of Beijing Institute of Education: Natural Science*, 2007(2): 3—7. (in Chinese)
- [12] Quick K L, Hardt J I, Dugan L L. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency[J]. *Neurosci Methods*, 2000, 97(2): 138—144.
- [13] Ewing J F, Janero D R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232: 243—248.
- [14] Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide[J]. *Free Radical Biol Med*, 2003, 34: 1359—1368.
- [15] Cao G, Prior R L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples[J]. *Methods in enzymology*, 1999, 299: 50—62.
- [16] Ou B X, Hampsch W M, Prior R L. 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.
- [17] 张丽萍, 童华荣. 抗氧化能力测定方法的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2004(3): 108—113.
Zhang Li-ping, Tong Hua-rong. Advanced studies on the methods for antioxidants screening[J]. *China Food Additives*, 2004(3): 108—113. (in Chinese)
- [18] Da Porto C, Calligaris S, Celotti E, et al. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test[J]. *Agric Food Chem*, 2000, 48: 4241—4245.
- [19] Standley L, Winterton P, Marnewick J L, et al. Influence of processing stages on the antimutagenic and antioxidant potential of Rooibos tea[J]. *Agric Food Chem*, 2001, 49: 114—117.
- [20] Miller N J, Rice Evans C, Davies M J, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. *Clin Sci*, 1993, 84: 407—412.
- [21] Labrinea E P, Georgiou G A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 526: 63—68.
- [22] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26: 1231—1237.
- [23] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. *Anal Biochem*, 1996, 239: 70—76.
- [24] Vinson J A, Su X H, Zubik L, et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits[J]. *Agric Food Chem*, 2001, 49: 5315—5321.

(责任编辑: 秦和平, 杨萌)