文章编号:1000-5404(2008)06-0517-04

论著

植物总抗氧化能力的微孔板定量测定及评价

唐 勇[1],赵 靖[1],徐 静[2],张 婷[1],张彦奇[3],糜漫天[1] (第三军医大学:[1]预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038;[2]新桥医院内分泌科, 400037;[3]预防医学院统计学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 结合动力学曲线分析评价植物中常见的天然抗氧化物对2,2-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·)的清除能力和反应动力学特点。**方法** 光谱扫描分析DPPH·的吸收特性;采用96微孔板结合酶标仪的微孔板定量法(microplate quantification, MQ)分析测定维生素C、绿原酸、药食两用木瓜、橙子、芒果和樱桃对DPPH·的清除能力和动力学曲线,以单位质量(g)或体积(ml)的样品清除DPPH·的量(μg)为总抗氧化能力值(total antioxidative capability,TAC)表示。**结果** DPPH·在酶标仪的490 nm检定波长上有显著吸收峰;维生素C和绿原酸纯品验证了MQ对复合抗氧化物清除DPPH·效能的加合性;根据各动力学曲线特征确定了不同果汁在清除DPPH·反应达到稳定态时的最大TAC(μg DPPH·/ml):木瓜汁87.23($P<0.05$),芒果汁62.556($P<0.05$),甜橙汁58.778($P<0.05$),樱桃汁49.072($P<0.05$)。**结论** 采用MQ测定方法,比传统经典方法试剂耗量小、批次处理量大,以及能同时分析评价多样品之间清除DPPH·的差异特性,为评价比较不同植物的总抗氧化能力提供了更快捷的方法。

关键词: 微孔板定量测定;TAC;DPPH·;多酚;维生素C
中图法分类号: R151.2;TS201.2 **文献标识码:** A

Evaluation and quantification of total antioxidative capability of fruit by microassay

TANG Yong[1], ZHAO Jing[1], XU Jing[2], ZHANG Ting[1], ZHANG Yan-qi[3], MI Man-tian[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safty, [3]Department of Statistics, College of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the different kinetics and capability of natural antioxidants scavenging free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·). **Methods** Spectrum scanning was used to analyze the characteristic absorbance of DPPH. Microplate quantification of DPPH· was used to quantify total antioxidative capability (TAC) of vitamin C, chlorogenic acid, *Chaenomeles*, citrus, mango and cherry. TAC represents the amount (μg) of DPPH· scavenged by each gram or each milliliter of the samples. **Results** The highest absorbance of DPPH· was shown on microplate reader at wavelength of 490 nm. Vitamin C and chlorogenic acid verified good correlation between antioxidants concentration and amount of scavenging DPPH· by microplate quantification assay. The TAC of the fruit juices was as follows: *Chaenomeles* 87.23 ($P<0.05$), mango 62.556 ($P<0.05$), citrus 58.778 ($P<0.05$) and cherry 49.072 ($P<0.05$). **Conclusion** Microplate quantification assay reveals the characteristics of nature scavengers to complex compounds. It has the advantages of less reagents used, high throughput, easy accessibility to kinetic curve and minimized experimental error.

Key words: microplate quantification assay; TAC; DPPH·; polyphenol; vitamin C

自从果蔬抗氧化活性对于预防癌症、心血管疾病以及抗衰老等方面有很重要的生理功能被提出以后,研究果蔬抗氧化活性已成为热门课题[1],已发现具有显著抗氧化功效的果蔬有上百种,所含抗氧化活性成分十余大类。2,2-二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·)是一种稳定的脂质自由基模拟物,它被广泛地用于评价植物的抗氧化能力,所涉及的对象从常见的果蔬农作物到药食两用植物的提取物等[2-4]。

但作为能清除DPPH·的各类抗氧化物组分,在清除动力学特性方面存在差异,如二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene, BHT)与DPPH·反应达到稳定状态需要5 h,而丁香酚与DPPH·反应达到稳定状态只需要2 h[5];中国科学院华南植物研究所研究

基金项目:重庆市攻关项目(2005AC1023)
Supported by the Sci & Tech Project of Chongqing (2005AC1023)
作者简介:唐 勇,男,四川省成都市,硕士,讲师,主要从事营养食品开发方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752291
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com
收稿日期:2007-07-17;修回日期:2007-10-20

发现了不同抗氧化剂清除 DPPH · 能力差异明显[6]；Villano[7]对红酒中不同结构的多酚物质进行 DPPH · 清除实验，也发现不同单体的多酚在清除 DPPH · 的速率上明显存在差异。因此对于组分复杂的天然植物及其提取物的抗氧化能力进行定量（即 DPPH · 的清除能力定量），首先需要测定其动力学曲线，找出其达到稳定态时所需的反应时间（稳定时相点），然后才会测得该体系充分清除 DPPH · 的最大抗氧化能力值。而目前一些新植物抗氧化能力测定的研究由于受到传统测定技术的限制，少有动力学稳定性分析的步骤，通常直接参照其他文献非同类物质的反应测定时间，因而可能出现无法获知其真实的最大抗氧化能力值的情况。

本研究旨在对传统方法上进行改良，使用微孔板与酶标仪相结合作为 DPPH · 光密度检测手段，即微孔板定量测定法（microplate quantification, MQ），对植物中最常见的清除 DPPH · 抗氧化物标准品进行实验方法加合性验证，并选用常见市售水果品种进行 MQ 抗氧化能力综合评价分析研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

JJ-2 组织捣碎匀浆机（常州国华电器厂）；DL6 大容量冷冻离心机（湖南仪器仪表总厂）；TU-1810 紫外可见分光光度仪（北京普析通用仪器有限公司）；HITACHI F-2500 荧光分光光度仪（日本日立公司）；Bio-Rad M680 酶标仪（美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司）；96 孔酶标板（美国 Costar 公司）。

主要试剂：2,2-Diphenyl-1-picrylhy-drazyl（美国 Sigma 试剂公司）；Folin-Ciocalteu 试剂（第三军医大学生化教研室试剂中心）；绿原酸标准品（中国药品生物制品检定所）；其余试剂为分析纯；各种果实为市场鲜购。

1.2 实验方法

1.2.1 光谱扫描 采用紫外可见光全波长扫描，对反应加入的 DPPH · 储备液进行吸收峰特性测定。

1.2.2 微孔板定量法测定 DPPH · 清除率的抗氧化能力实验 样品处理及测定：移取样品液 50、100、200、400 μl 于 24 孔板加无水乙醇稀定容于 1 ml，作为反应样液；准确称取 25 mg DPPH，用无水乙醇溶解并定容于 50 ml，制成浓度为 0.5 mg/ml 的 DPPH · 溶液，定量移取反应样液的各梯度稀释液与一定量的 DPPH · 溶液在 96 孔酶标板中进行反应，采用酶标仪于 490 nm 处分别测定 5、10、20、30、40 min 时相点的吸光值（Ai），同时以 0.2 ml 无水乙醇代替待测液做空白对照，测定吸光值（Af），根据以下公式计算清除率。

$$DPPH\cdot(\%) = (1 - Ai/Af) \times 100\% \quad (1)$$

Ai 为加入待测液时 DPPH · 溶液的吸光值；Af 为未加入待测液时 DPPH · 溶液的吸光值；IC_{50} 的测定：IC_{50} 定义为 DPPH · 清除率为 50% 时所需抗氧化剂浓度。其测定值根据不同浓度抗氧化剂的清除率作曲线得出 IC_{50}。

总抗氧化能力值（total antioxidative capacity, TAC）：利用回归方程求得清除率为 50% 时所需样品浓度为 IC_{50}，及此时对应清除的 DPPH · 量（DPPH · 浓度 × 加入体积 × 50%），TAC 计算公式如下。

$$TAC(\text{每 ml 样品液清除 ugDPPH}\cdot\text{量}) = IC_{50}\text{对应清除的 DPPH}\cdot\text{量}/(IC_{50} \times \text{定容体积}) \quad (2)$$

1.2.3 维生素 C、绿原酸和联合组的微孔板定量法测定 配制 0.2 mg/ml 维生素 C，0.2 mg/ml 绿原酸标准液；将两种抗氧化物溶液 1∶1 混合均匀，为“联合组”。三组样品按照公式（2）计算 5,10,20,30,40 min 时相点的 TAC 值，绘制动力学曲线。

1.2.4 果实中维生素 C 和总酚的测定 市售果实洗净、去皮掏核、果肉切成小块。各种果汁制备操作如表 1。

表 1 果实制作果汁方案

项目	綦江木瓜	樱桃	橙子	芒果
原料量（g）	100	100	100	100
打浆加入水量（ml）	200	0	0	50

打浆液冷冻离心（-5 ℃，5 000 r/min，20 min），得上清液备用。

1.2.4.1 多酚的测定 采用 Folin-Ciocalteu 法[8]并稍做改动。精密称取没食子酸 30 mg，溶于 100 ml 无水乙醇中，制成 0.3 mg/ml 的没食子酸标准溶液。分别吸取此溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml（相当于没食子酸 0、30、60、120、180、240、300 μg），果汁 0.1 ml 于 45 ml 带塞离心管中，蒸馏水定容至 10 ml 处，加入 0.5 ml 的 Folin-Ciocalteu 试剂，以 7.5% 无水碳酸钠溶液定容至 20 ml，放置 30 min，于 765 nm 处测定光吸收值。

1.2.4.2 维生素 C 测定 采用荧光测定法，利用邻苯二胺（OPDA）反应生成具有荧光的喹喔啉（quinoxaline），其荧光强度与脱氢抗坏血酸的浓度在一定条件下成正比，以此测定木瓜中抗坏血酸和脱氢抗坏血酸的总量。精确称取维生素 C 标准品 100 mg，用偏磷酸-乙酸溶解并定容至 100 ml；30 ml 果汁加入偏磷酸-乙酸，定容 100 ml，活性碳 2 g 氧化过滤，滤液 5 ml 由 50% 乙酸定容于 50 ml，空白用硼酸-乙酸钠定容 50 ml，吸取维生素 C 处理液 0.5,1.0,1.5,2.0 定容 2 ml，果汁处理液 2 ml，各与 5 ml OPDA 在暗室中反应 35 min，在 338 nm 激发波长和 420 nm 发射波长下荧光测定，根据标准曲线测定样品中维生素 C 含量。

1.2.5 各种水果的总抗氧化能力测定及化学动力学稳定曲线绘制 果实的预处理参见表 1，冷冻离心上清液按照 1.2.2 方法制备梯度反应样液，不同品种水果制备样液及对应加入 DPPH · 储备液于微孔板中的量依据实测时调整，即保证样品梯度稀释反应所产生的清除率在 50% 左右；按照公式（2）计算 5、10、20、30、40 min 时相点的 TAC 值，绘制动力学曲线。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 本实验条件下 DPPH · 的吸收峰特性

通过全波长扫描结果图 1 可见，本实验条件下 DPPH · 的

较大吸收峰在 485 ~510 nm,本实验选用的酶标仪为固定波长选用型,依据光谱吸收图反映的吸收峰特征,酶标仪 490 nm 检测波长也是 DPPH · 的主要吸收峰所在波长,可以作为其光密度的检定波长。

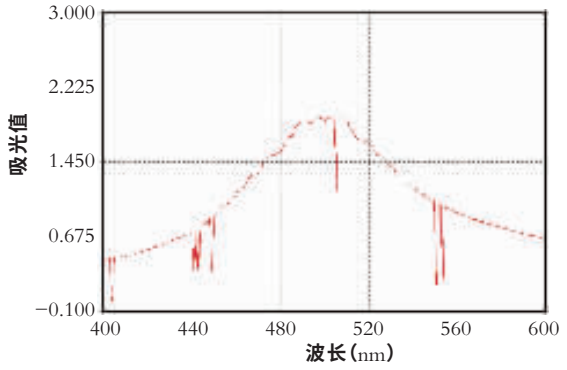


图 1　DPPH · 储备反应液的全波长扫描图谱

2.2　维生素 C 和绿原酸清除 DPPH · 的特性及加合性验证

采用微孔板定量测定法对每组样品在每个时相点同时测定(n = 5),维生素 C 组、绿原酸组、联合组各时相点的 TAC,以及维生素 C 组、绿原酸组各时相点的 TAC 求算术平均值(推导值)作图,结果见图 2。维生素 C 最大 TAC 是在 5 min 时测算得 50.53 μg DPPH · /ml,绿原酸最大 TAC 在第 20 分钟测算得 36.52 μg DPPH · /ml,其对脂质自由基 DPPH · 清除的特性存在差异。联合组的 TAC 动力曲线与推导值绘制曲线在 30 min 时重合性最好,其 TAC 实测得 38.5 μg DPPH · /ml。

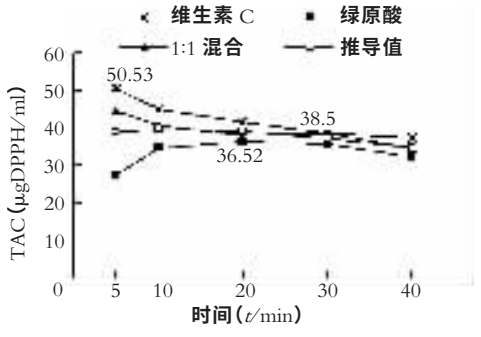


图 2　维生素 C、绿原酸、联合组的动力学曲线与推导值 TAC 比较

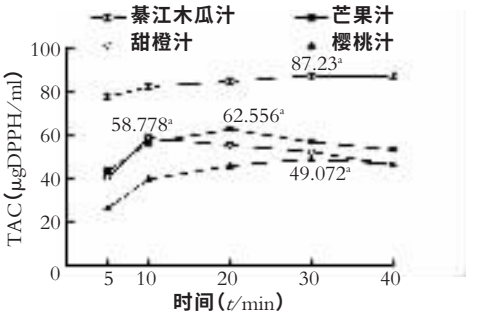
2.3　各种果汁的 TAC 及动力学曲线

通过反复测定各品种水果制备样液与 DPPH · 储备液加入剂量比例,以确保 IC_{50} 的回归求取要求,最终添加配比组成如表 2。

表 2　各种果汁与 DPPH · 溶液在微孔板的加入量

项目	綦江木瓜汁	芒果汁	甜橙汁	樱桃汁
各梯度样液(μl)	40	80	100	120
DPPH · (μl)	100	50	60	50

采用 96 微孔板对每组样品在每个时相点同时测定(n = 5),果汁各时相点的 TAC 作图,结果见图 3。对各组各时相点之间进行多重比较(P <0.05),四种果汁的最大 TAC 分别为木瓜汁 87.23,芒果汁 62.556,甜橙汁 58.778,樱桃汁 49.072,其反应达到最大 TAC 时相点存在差异,即达到反应的速度不同。依据 1.2.4 的果实制备果汁处理方式,将实测的果汁维生素 C 与多酚含量换算为果肉中维生素 C 和多酚的组成量,结果见表 3。维生素 C 与多酚的比例在不同果实原料中存在显著差异,随着维生素 C 所占比例减小,其达到最大 TAC 的时相点值越大,甜橙(0.414)为 10 min、芒果(0.183)为 20 min、綦江木瓜(0.08)和樱桃汁(0.088)为 30 min;达到最大 TAC 的时相点是间接反映该抗氧化物体系与 DPPH · 充分反应完全所需要的时间,即最大 TAC 时相点值越大,反应速度越慢。这种现象与 2.2 中采用标准品获得结果一致。



a: P <0.05,与前一个时相点比较

图 3　各种果汁的最大 TAC 及动力学曲线

表 3　各种果实中维生素 C 和多酚的组成含量

项目	綦江木瓜	樱桃	甜橙	芒果
维生素 C(mg/g)	0.55	0.08	0.29	0.23
多酚(mg/g)	6.88	0.91	0.7	1.26
维生素 C: 多酚	0.080	0.088	0.414	0.183

3　讨论

动力学曲线是反映各物质浓度随时间的变化曲线,有了动力学曲线才能找出反应达到平衡时所需的时间,从而获得测定充分反应的参考时间。加合性是指在某一波长下,体系的吸光度等于各吸光组分单独存在时的吸光度之和,它的数值与体系中的物质的数量有关。通过 MQ 法完成了对单一组分动力学曲线的绘制以及多组分加合性的验证。图 2 显示,维生素 C 的最大 TAC 出现在加入反应的 DPPH · 后第一时相点,然后是呈下降趋势,这种现象的产生不是维生素 C 清除能力的下降,而是因为 DPPH · 存在自衰减,后期的“下降”是作为被减数的参照 DPPH · 量减少造成运算结果的 TAC 偏低;绿原酸组的 TAC 则经历了逐渐上升的趋势,然后缓慢下降,其转折点就是该抗氧化物与 DPPH · 反应充分后达到平衡时的最大 TAC。不同种类的抗氧化物在对 DPPH · 清除速率和反应达到平衡的时间上存在差异。联合组中的维生素 C 与绿原酸含量分别是维生素 C 组和绿原酸组的一半,其 TAC 变化趋势呈现与推导值曲线重合的趋势,在 30 min 时基本重合,即与维生素 C 和绿原酸算术平均值一致,说明 MQ 法对多组分复合物的抗氧化能力(DPPH · 清

除能力)具有良好的加合性,不改变混合体系中各物质清除DPPH·的能力。DPPH·与维生素C及多酚有非常好的线性相关性也在DPPH·经典测定法实验中曾有报道[3]。

植物抗氧化体系通常是个复合体系,而且不同物种之间其抗氧化组分存在差异,因此对于植物原料以DPPH·清除率来表征抗氧化能力,应充分考虑其反应的动力学特点,图3显示,不同的天然果实由于抗氧化物组成存在差异(本实验中对维生素C与多酚的组成进行比较),其动力学曲线存在差异,即各种果汁达到最大清除DPPH·能力所需要的反应时间有所不同。采用MQ法能同时测绘出被检测对象的动力学曲线及找出体系的最大抗氧化能力值。

微孔板定量测定法由于采用250 μl孔为反应测定池,较传统经典法[9]采用的2~3 ml比色皿反应测定池更节约试剂用量;同时MQ测定所采用的酶标仪同时最多可测定96个样品,而传统方法多采用的分光光度计只有4~8个样品池,MQ对于一次性同时测定多个受试物的连续时相点DPPH·光度值具有很强的可操作,从而减少反复操作造成的各种误差。本研究运用数学方法将传统用于比较抗氧化强弱的IC_{50}衍化为了单位质量(g)或体积(ml)的样品清除DPPH·量(μg)的指标(total antioxidative capability),使植物抗氧化能力强弱与DPPH·清除实验计量值大小呈正相关性,表述更清晰直观。

参考文献:

[1] Silva C G, Herdeiro R S, Mathias C J, *et al*. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(3): 229-233.

[2] 何云核, 胡丰林, 陆瑞利, 等. 中国亚热带常见园林植物清除DPPH自由基活性研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 563-567.

[3] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, *et al*. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. J Food Compost Anal, 2006, 19(6-7): 669-675.

[4] Wettasinghe M, Shahidi F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals [J]. Food Chem, 2000, 70(1): 17-26.

[5] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1997, 30(6): 609-615.

[6] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等. 用清除有机自由基DPPH法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.

[7] Villano D, Fernandez-Pachon M S, Moya M L, *et al*. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical[J]. Talanta, 2007, 71(1): 230-235.

[8] Dastmalchi K, Damien D H, Kosar M, *et al*. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extract[J]. LWT - Food Science and Technology, 2007, 40(2): 239-248.

[9] 张 婷, 糜漫天, 唐 勇, 等. 光皮木瓜多酚类的提取和清除DPPH的抗氧化活性[J]. 营养学报, 2007, 29(5): 485-489.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)06-0520-01

左侧腋动脉分支变异1例

张廷才,司道文,张志勇,张宇新 (华北煤炭医学院基础部人体解剖学教研室,河北 唐山 063000)

腋动脉是位于腋窝内的上肢动脉主干,其分支类型和数目变异较大。国内外专著多以6支型作为腋动脉分支的代表类型[1,2]。自腋动脉第1段发出胸最上动脉,第2段发出胸肩峰动脉和胸外侧动脉,第3段发出肩胛下动脉和旋肱前、后动脉。我们在标本解剖过程中发现1例左侧腋动脉分支变异,为积累解剖学资料并为临床工作提供形态学依据,现报告如下。

1 资料

尸体为男性,60岁左右,身高约165 cm。左侧腋动脉(横径为0.55 cm)在胸小肌上缘处发出胸肩峰动脉穿锁胸筋膜后,分布于三角肌、胸大、小肌和肩关节。在胸小肌后方发出胸外侧动脉和一支异常粗大的变异动脉干。进一步追踪清理显示,该动脉干长4.5 cm,起端外径0.65 cm,比同高度腋动脉主干略粗大,并被正中神经的两个根夹持。近胸小肌下缘处,该动脉干发出共干的旋肱后动脉和旋肱前动脉(此两支均较细小)、较粗的肩胛下动脉(横径为0.42 cm),肩胛下动脉又分为胸背动脉和旋肩胛动脉。变异动脉主干继续下行,距起点9.6 cm处在背阔肌前缘处发出肱深动脉伴桡神经下行进入肱骨肌管。变异动脉主干终支(横径为0.35 cm)绕背阔肌进入三角肌中下部和臂前群肌,分支营养三角肌和臂前群肌。再沿腋动脉主干及肱动脉主干向上、下追踪,未发现腋动脉的其他分支,肱动脉也未发出肱深动脉图。见图1。

(下转524页)

作者简介:张廷才,男,河北省唐山市人,硕士,副教授,主要从事人体解剖学和生物力学方面的研究。电话:(0315)3725753,13102620174,E-mail: sidaowen@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-12-12;修回日期:2008-01-23