

抗氧化能力指数测定法的研究与应用进展

翁康生, 王文静, 仲伟鉴

摘要: 随着深入了解氧化压力对各种疾病发生、发展的影响, 抗氧化物质及其抗氧化功能越来越受到关注。现有多测定评价抗氧化能力的方法, 抗氧化能力指数 (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 测定是其中常用的一种体外抗氧化能力评价方法。本文综述报道 ORAC 法的原理、方法学研究及应用进展。

关键词: 抗氧化能力指数; 抗氧化物质; 竞争反应

Advance in Studies and Applications of Oxygen Radical Absorbance Capacity WENG Kang-sheng, WANG Wen-jing, ZHONG Wei-jian (Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). Address correspondence to ZHONG Wei-jian, E-mail: wjzhong@scdc.sh.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: With increasing understanding on the relationship between oxidative stress and the development of various diseases, antioxidants and their antioxidant capacities have received more and more attention in the last two decades. Among the varied methods developed to assess antioxidant capacity, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) is one of the widely used methods for *in vitro* assessment. The principles and advances in analysis methods and applications of ORAC were summarized in this article.

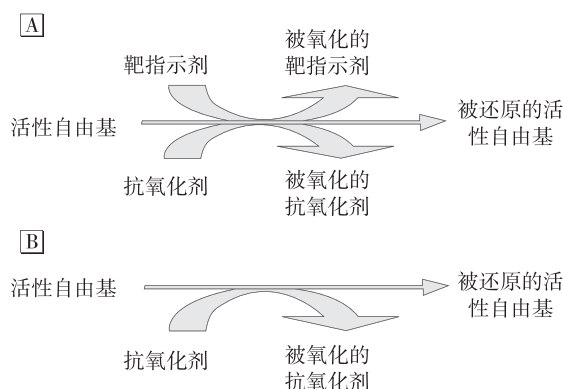
Key Words: oxygen radical absorbance capacity; antioxidant; competitive reaction

据近 20 年来的研究表明, 人类的衰老^[1]、慢性病和退行性疾病, 如癌症^[2]、心脏病^[3]、帕金森病^[4]等疾病的发生、发展过程与活性氧 (ROS) 有关。抗氧化剂在维护人类健康、预防及治疗疾病中的作用受到人们的关注。由于生命组织中多种内源性抗氧化物质的协同作用, 食物等各种样品含性质各异的多种抗氧化物质, 因此建立发展了多种检测评价方法^[5-7], 以检测评价生命组织、营养品、食物等各种样品中所含天然抗氧化物质及相关化合物的综合抗氧化能力。其中, 有一类方法是用于评价各种样品的相对总抗氧化能力 (TAC) 或总清除自由基抗氧化能力 (TRAC), 抗氧化能力指数 (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) 测定法, 就是该类方法中广泛应用的方法。本文综述报道该方法的研究和应用进展。

1 ORAC 测定法竞争反应测定原理

通常认为自由基介导诱发的氧化反应包括链引发、链反应、链增长、链终止等多个步骤。抗氧化剂在活性自由基攻击生物分子前, 通过电子转移 (反应 1) 或提供、转移氢原子 (反应 2), 淬灭活性自由基, 产生稳定的化合物, 从而起到清除活性自由基, 保护生物分子的作用。大多数抗氧化剂通过第二种反应起作用^[8], 故 ORAC 法测定评价的对象就是以第二种反应起作用的抗氧化物质。

ORAC 测定法反应体系主要包括: 自由基产生源、被自由基攻击起氧化反应的靶指示剂、抗氧化物质 (标准品或被测样品)、反应介质。自由基产生源通常是一类偶氮化合物, 如水溶性化合物 2, 2'-偶氮 (2-甲基丙基脒)-二盐酸盐 (2, 2'-azobis-2-amidinopropane-dihydrochloride, AAPH)、脂溶性化合物 2, 2'-偶氮 (2, 4-二甲基戊腈) [2, 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile, AMVN)] 与氧反应, 产生过氧自由基, 后者攻击靶指示剂。随着靶指示剂被攻击, 发生氧化反应, 靶指示剂的指示信号发生变化。如果反应体系中加入抗氧化物质, 由于其与靶指示剂竞争性地与自由基作用, 减弱、延缓了靶指示剂的氧化过程, 对靶指示剂起到了保护作用 (图 1)。通过监测靶指示剂信号的变化, 可记录这一过程。这一竞争性反应被认为是最可能接近体内抗氧化物质的作用形式^[9]。



[注] A: 竞争性反应; B: 非竞争性反应。

图 1 体外抗氧化能力指数测定示意图

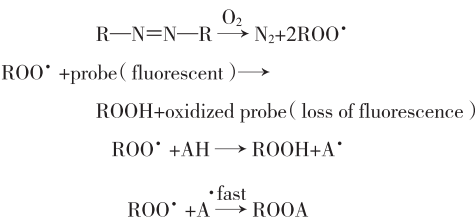
[作者简介] 翁康生 (1953—), 男, 学士, 主任技师; 研究方向: 分子生物学检测与研究; E-mail: ksweng@scdc.sh.cn

[通信作者] 仲伟鉴主任医师, E-mail: wjzhong@scdc.sh.cn

[作者单位] 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

2 荧光 ORAC 测定法

20 世纪 80 年代末, GLAZER 等^[10]基于从紫球藻(*Porphyridium cruentum*)中分离的β-藻红蛋白(β-phycoerythrin; β-PE), 在自由基攻击下荧光消失的现象, 建立了一种亲水性物质抗氧化能力的测定方法。CAO 等^[11]采用β-PE 为靶指示剂, 以 AAPH 为自由基产生源, 在自由基作用下, 靶指示剂逐渐被氧化, 记录逐渐消失的荧光信号, 获得靶指示剂荧光衰退曲线。当上述反应起始前, 同时加入抗氧化剂(AH)、靶指示剂、抗氧化剂与自由基竞争反应(图 2), 记录这一过程的荧光衰退曲线。计算荧光衰退曲线下面积(AUC)和两条荧光曲线下的面积差(NetAUC), NetAUC(净面积)=AUC_{sample}(样品面积)-AUC_{blank}(空白面积), 作为衡量抗氧化剂的抗氧化能力指标(图 3)^[12]。以维生素 E 水溶性类似物 6-羟基-2, 5, 7, 8-四甲基色满-2-羧酸(6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic, 商品名 Trolox)作为抗氧化剂标准, 将可得到同样抗氧化能力的抗氧化物, 作为检测数据表达。并将该方法命名为 oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 即抗氧化能力指数。



[注] ROO[•]: 过氧自由基; probe: 靶指示剂; AH: 抗氧化剂化合物。

图 2 抗氧化能力指数测定竞争性化学反应通式

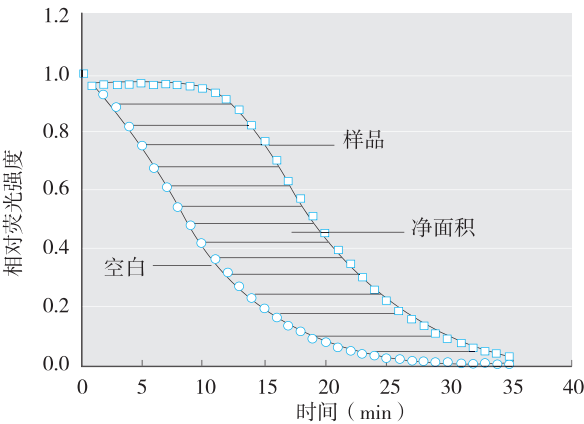


图 3 荧光衰减曲线示意图

3 ORAC 测定法的指示剂

早期用于 ORAC 测定法的氧化反应指示剂β-PE 是分离纯化的蛋白质分子, 批次之间β-PE 与过氧自由基的反应活性及荧光强度不尽相同。当其暴露于激发光下时, 荧光快速自行衰退。同时又可与多酚类抗氧化物质非特异结合, 这些负面特性, 难以保证检测结果的准确性与可比性, 以后被更稳定、更经济、更易获得的荧光化合物取代。

合成荧光素 fluorescein(3, 6-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3H], 9[9H]-xanthen]-3-one, FL), 是水溶性荧光化合物。OU 等^[13]用 FL 作靶指示剂, 用水溶性 AAPH 做过氧自由基产生源, 以 Trolox 做抗氧化剂标准物, 建立了改良的 ORAC_{FL} 测定法, 这也成为被广泛应用的 ORAC 测定法。其检测反应中, 过氧自由基产生的 FL 氧化物, 经过液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析鉴定, 确认 FL 氧化后生成 FL₁、FL₂、FL₃、及 FL₄ 共 4 个产物。通过对 4 个产物的结构推断, 确认出 FL 与过氧自由基化学反应的方式: (1) FL 的酚羟基向过氧自由基提供一个氢原子而自身形成一个稳定的 FL 自由基(FLO[•]); (2) 两分子自由基形成二聚物, 即 m/z 661 的 FL₁。FLO[•] 也可攻击反应体系中痕量的 CO₂, 产生 FL₂(m/z 375); (3) FL₂ 的不稳定共轭双键被过氧自由基加成后产生自由基重排, 并与过氧自由基作用形成过氧化中间产物, 进一步分解后生成 FL₃(m/z 349.0)。FL₃ 进一步氧化得到不具有 495/515 nm 荧光吸收的氧化产物 FL₄。由此证明 ORAC 法反应是经典的氢原子转移的氧化过程。近年来陆续报道了多种氧化反应指示剂(表 1)。

荧光化合物 FL 对介质的酸碱度(pH)敏感, pH 低于 7, FL 荧光强度降低, 因此要求合适的反应缓冲体系, 以保证正确读取反应的荧光指示信号^[13]。氟硼染料(BODIPY)等暴露激发光下, 会产生荧光衰退^[19], 这也限制了其在定量检测中的应用。

另一些化合物在被自由基氧化过程中, 其特定可见光波长下的吸收峰值会同步降低, 产生所谓的“漂白”作用。用这类化合物作指示剂, 用普通实验室分光光度计就可进行 ORAC 法测定, 使此方法更便于推广应用。但也需要注意这类化合物与自由基的反应活性, 及由于它们和抗氧化剂竞争性地与自由基反应的动力学特点, 合理设计实验方案, 正确解读实验数据。同时也要注意避免被测样品的光吸收特性对指示剂信号的干扰^[20-21]。

甲基亚油酸盐(methyl linoleate, ML)是一种 18 碳二烯酸盐, 它的化学性质类同于多不饱和脂肪酸。IMAI 等^[22]将甲基亚油酸盐作为氧化底物, 研究油(水)乳液液微粒大小对 ML 氧化的影响。通过氧传感器检测密闭容器中 ML 氧化时, 容器气

表 1 ORAC 测定的氧化反应指示剂

种类	名称	信号类型	检测信号	参考文献
蛋白质	β-藻红蛋白(β-PE)	荧光衰减	λ _{ex} 493 nm λ _{em} 515 nm	[13]
荧光化合物	合成荧光素(FL)		λ _{ex} 493 nm λ _{em} 515 nm	[13]
	氟硼染料(BODIPY)		λ _{ex} 485 nm λ _{em} 535 nm	[14]
	2'7'-二氢氯荧光素(DCFH)		λ _{ex} 485 nm λ _{em} 535 nm	[14]
	硫酸奈尔蓝(Nile blue)		λ _{ex} 620 nm λ _{em} 680 nm	[15]
有色化合物	邻苯三酚红(PGR)	可见光吸收	540 nm	[16]
	8-羟基芘-1, 3, 6-三磺酸钠盐(Pyranine)		460 nm	[17]
脂肪酸	甲基亚油酸盐(ML)	氧分压	PO ₂	[18]

相中氧分压的变化,证明氧的消耗量与被氧化的 ML 量相关。SIM 等^[18]以甲基亚油酸盐作为氧化指示剂,以其在被氧化过程中消耗的氧作指示信号,用配有生物氧传感器的 96 孔微孔板荧光检测仪和连接氧电极的生物检测器分别检测以 AAPH 为自由基产生源,ML 为氧化指示剂,及再另加抗氧化标准物 Trolox 的反应体系中耗氧量与反应时间的关系。其 AUC 计算公式为: $AUC = [O_2]_0 + [O_2]_2 + \dots + [O_2]_i + \dots + [O_2]_{120}$, $[O_2]_0 = 0$ min 时的氧浓度, $[O_2]_i = i$ min 时的氧浓度, $[O_2]_{120} = 120$ min 时的氧浓度,并将该方法称之为 ORAC_E 测定法。

4 ORAC 测定法的反应介质

最初的荧光 ORAC 测定法反应体系只适合于检测水溶性抗氧化物质,限制了脂溶性抗氧化物质的检测。但抗氧化物质如 β -胡萝卜素、维生素 E 等都是脂溶性物质,同时脂质的氧化与抗氧化也是生命组织中重要的生化反应,测定脂溶性抗氧化物质,研究脂质环境中可能存在的自由基引发诱导的氧化及抗氧化反应很有必要。HUANG 等^[19]利用甲基化- β -环糊精 (randomly methylated β -cyclodextrin, RMCD) 分子结构中的疏水空腔和亲水性表面的环状结构,可将脂溶性分子的疏水部分纳入空腔,亲水性部分留于腔外,对 β -胡萝卜素等脂溶性抗氧化物质起到增溶作用,在介质中加入 RMCD,建立了改良的 ORAC_{FL} 测定法反应体系。其反应介质为 50% 丙酮, 50% 水 (V/V), 含 7% 甲基化- β -环糊精,由此反应体系组成的 ORAC_{FL} 测定法,即适用于检测水溶性抗氧化物,也适用于脂溶性抗氧化物的检测,扩大了 ORAC 测定法的应用范围。其检测结果的线性、定量限、精密度和准确度及重复性依然良好。

生命组织或天然环境中,脂溶性抗氧化物质很可能通过呈半透明的微乳胶液而分散、传输到水相中。可设想在水相与油相间的界面区域,微乳胶状的脂溶性物质更易氧化。为更多地了解研究非均一相介质中脂溶性和水溶性抗氧化物质各自及相互作用,建立了多个模拟介质系统,其中 SIM 等^[18]用 12% 甲基亚油酸盐 (methyl linoleate) 或苯乙烯 (styrene), 29% 表面活性剂 Tween-20, 15% n-丁醇 (n-butanol), 44% 75 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4), 制备成颗粒直径分别为 19.3 nm 和 63 nm 的微乳胶液。两种微乳胶液物理性能稳定,可在 37℃ 放置 2 个月。以此为介质,建立了检测微乳胶液中抗氧化物质的 ORAC_E 测定法。

ORAC 测定法的反应介质中金属离子对 ORAC 测定值的影响也应引起注意。多酚类和抗坏血酸等抗氧化物是极具还原性的化合物。由于它们对空气敏感,可能自氧化产生过氧化氢,而过氧化氢是非常活跃的羟自由基 (hydroxyl radical)。这一反应过程可能由痕量金属离子诱导^[23]。由此,多酚类和抗坏血酸等的自氧化可能减损某些抗氧化物质的 ORAC 测定值。NKHILI 等^[24]在 ORAC 反应介质中,加入金属螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA)。由于 EDTA 的金属螯合作用,防止了在自由基诱导的氧化作用前,由样品、磷酸缓冲液或其它试剂中痕量金属离子激发的抗氧化物质快速自氧化,保护了抗氧化物质,使检测信号更能真实反映自由基对抗氧化物质和氧化指示剂的作用。研究检测槲精 (quercetin)、V_c、脱氢抗坏血酸等纯化合

物及猕猴桃、橙、西红柿、红葡萄、苹果等榨汁液,结果表明与原反应介质相比,用加入 EDTA 的反应介质进行测定,所得 ORAC 测定值明显升高。由此提供一个途径:在反应介质中加入金属螯合物 EDTA,克服可能因金属离子造成的干扰,使 ORAC 测定值更真实、更稳定、更具可比性。

5 ORAC 检测法高通量自动化检测

ORAC 检测法反应体系中,自由基产生源 AAPH 等对温度敏感,而且整个检测反应时间较长 (≥ 30 min),所以检测过程中温度控制、加样时间、测定信号数值读取节点掌握等,都可能影响测定结果质量。早期用 β -PE 作荧光指示剂,ORAC 测定法费时费力,后来采用 COBAS FAR II 荧光分析仪^[25],但由于仍采用 β -PE 作氧化反应指示剂,受干扰因素多,实验常需重复,加之仪器检测通量小,满足不了大样本检测之需。虽然 FL 取代 β -PE 后,情况有所改善,但因 COBAS FAR II 荧光分析仪停产,而只有少数实验室装备此分析仪,影响了 ORAC_{FL} 测定法的实验室应用范围。HUANG 等^[26]应用微孔板荧光检测仪及在线多通道加液操作系统,进行 ORAC_{FL} 法测定。由于仪器可放入 96 孔微孔板,具备保温、自动在线加样、加试剂、定时采集荧光数值,使 ORAC_{FL} 测定法向自动化、高通量迈出了一大步。

近 10 年来,不仅使用微孔板荧光检测仪进行高通量 ORAC_{FL} 测定法研究应用^[27-29],用适配不同氧化反应指示剂检测信号的微孔板紫外可见分光光度检测仪、微孔板生物氧传感检测仪等进行高通量 ORAC 测定法研究应用也屡见报道^[18,30]。最近国内也报道了用国产多功能荧光仪进行 ORAC_{FL} 测定法实验^[31]。报道表明,用国产仪器和 ORAC_{FL} 法测定的 Trolox 标准品在 0.001 04~0.007 32 mmol/L 范围内,能与 AUC 呈良好的线性关系 ($r=0.9984$),样品空白实验变异系数为 1.92%;批内空白和加抗氧化剂变异系数分别为 4.7% 和 2.6%,样品测定批间变异系数为 7.7%。

6 ORAC 测定法的应用

ORAC 测定法在方法学上不断改良完善的同时,也得到了越来越多的实际应用。其中以食品、各种植物提取物的抗氧化能力数据信息居多。2007 年美国农业部科学家,以数据库形式公布了用 ORAC_{FL} 法测定的 277 种食物 (主要是植物类) 的抗氧化能力信息。2010 年公布了第二版数据^[32],新增了 49 种食物,共公布了 326 种食物的抗氧化能力信息。

近年来 ORAC 的应用从单纯测定、提供样品抗氧化能力数据信息外,逐步扩展应用范围,如将 ORAC 测定值作为主要评价指标,从“抗氧化能力”角度出发,分析不同食物混合物的协同、叠加、拮抗等作用对膳食的总抗氧化能力的影响,研究、指导食物的营养搭配^[33]。ORAC 测定法应用于抗氧化物质如多酚类代谢物抗氧化性质的体外研究^[29]。ORAC 法研究应用于中草药生产的标准参数,作为监测加工、储存过程对中草药影响的指标^[34]。与高效液相色谱法 (HPLC) 相结合,将 ORAC 检测分析应用于中药有效成分的分析研究^[35]等等。

有观点认为,目前现阶段要确切证明抗氧化剂在预防和治

疗疾病上的作用还是困难的,需要更多研究来证明抗氧化剂在体内的作用及抗氧化能力与相关生理学作用的关系^[6]。但有理由相信,随着抗氧化功能评价方法的标准化进程,ORAC测定法将有更广泛的用途。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] PANDEY KB, RIZVI SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in human[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(1): 2-12.
- [2] FIASC T, CHIARUGI P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison[J]. *Int J Cell Biol*, 2012: 762-825.
- [3] ELAHI MM, KONG YX, MATATA BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(5): 259-269.
- [4] PIMENTEL C, BATISTA-NASCIMENTO L, RODRIGUES-POUSADA C, et al. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012: 132-146.
- [5] SANCHEZ-MORENO C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems[J]. *Food Sci Technol Int*, 2002, 8(3): 121-137.
- [6] NIKI E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(4): 503-515.
- [7] TAKASHIMA M, HORIE M, SHICHIRI M, et al. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals *in vitro*: a rational basis and practical application[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(7): 1242-1252.
- [8] BARCLAY LR, VINQVIST MR, MUKAI K, et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity[J]. *Org Lett*, 2000, 2(18): 2841-2843.
- [9] MAGALHÃES LM, SEGUNDO MA, REIS S, et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 613(1): 1-19.
- [10] GLAZER AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 161-168.
- [11] CAO G, ALESSIO HM, CUTLER RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants[J]. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14(3): 303-311.
- [12] PRIOR RL, WU X, SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(10): 4290-4302.
- [13] 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]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(10): 4619-4626.
- [14] LI L, CHEN CY, CHUN HK, et al. A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plant foods[J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(3): 219-226.
- [15] GODOY-NAVAJAS J, AGUILAR CABALLOS MP, GÓMEZ-HENS A. Long-wave length fluorimetric determination of food antioxidant capacity using Nile blue as reagent[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(6): 2235-2240.
- [16] LÓPEZ-ALARCÓN C, LISSI E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals[J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(9): 979-985.
- [17] PINO E, CAMPOS AM, LISSI E. 8-Hydroxy-1, 3, 6-pyrene trisulfonic acid(pyranine)bleaching by 2, 2'-azobis(2-amidinopropane)derived peroxy radicals[J]. *Int J Chem Kinetics*, 2003, 35(10): 525-531.
- [18] SIM WL, HAN MY, HUANG D. Quantification of antioxidant capacity in a microemulsion system: synergistic effects of chlorogenic acid with α -tocopherol[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3409-3414.
- [19] HUANG D, OU B, HAMPSCH-WOODILL M, et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 1815-1821.
- [20] OMATA Y, SAITO Y, YOSHIDA Y, et al. Simple assessment of radical scavenging capacity of beverages[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(9): 3386-3390.
- [21] TORRES P, GALLEGUILLOS P, LISSI E, et al. Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(20): 9171-9175.
- [22] IMAI H, MAEDA T, SHIMA M, et al. Oxidation of methyl linoleate in oil-in-water micro- and nanoemulsion system[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2008, 85(9): 809-815.
- [23] EL HAJJI H, NKHILI E, TOMAO V, et al. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation[J]. *Free Rad Res*, 2006, 40(3): 303-320.
- [24] NKHILI E, BRAT P. Reexamination of the ORAC assay: effect of metal ions[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(5): 1451-1458.
- [25] CAO G, VERDON CP, WU AH. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II[J]. *Clin Chem*, 1995, 41(12): 1738-1744.
- [26] HUANG D, OU B, HAMPSCH-WOODILL M, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity(ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(16): 4437-4444.
- [27] PRIOR RL, HOANG H, GU L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity(oxygen radical absorbance capacity(ORACFL)) of plasma and other biological and food samples[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(11): 3273-3279.
- [28] WATANABE J, OKI T, TAKEBAYASHI J, et al. Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant