

抗氧化能力的快速检测方法

随着自由基的发展，环境指数的日趋重要以及人们对健康及食品质量要求的不断提高。检测部门迫切需要一种快速、精确的测定抗氧化系统的分析方法。本文介绍一种采用光化学发光(PCL)法测定抗氧化剂和自由基的方法，成功快速的测定了维生素片剂的水溶性抗氧化能力(ACW)。这样一种非常快速而经济有效的分析方法可以推广到包括食品安全、化学化工、农业、制药直至生化、医疗等各个领域的研究和常规分析。

张海蓉 赵泰
德国耶拿分析仪器公司

高 反应性基团——自由基普遍存在于生物体和自然界中，其特征为原子外壳带有非配对电子，极易争夺电子而引发连锁反应。抗氧化剂这种还原性物质可以“捕捉”自由基，形成抗氧化剂与自由基的动态平衡。

对于人体而言，抗氧化能力是人体防疫能力的一个重要体现。而食品

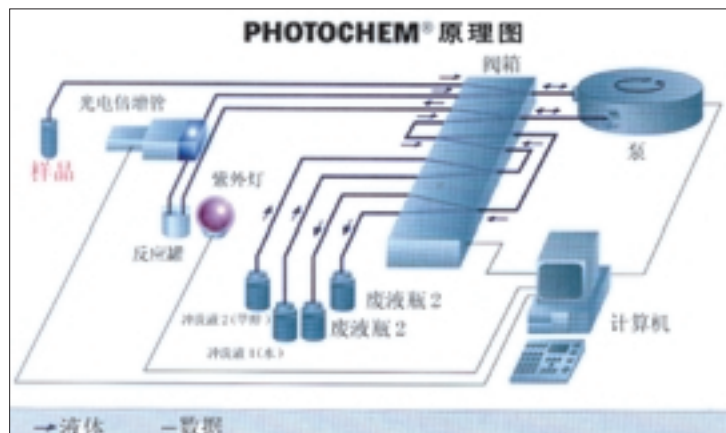
中，抗氧化剂和自由基的含量关系到食品本身的营养价值、抗腐蚀能力和保质期控制等。在食品工业领域，对抗氧化能力的快速分析方法在如下方面具有重要的价值：

- 食品加工过程的技术分析，如啤酒、葡萄酒、咖啡、茶等抗氧化成分的检测，保存期的控制；

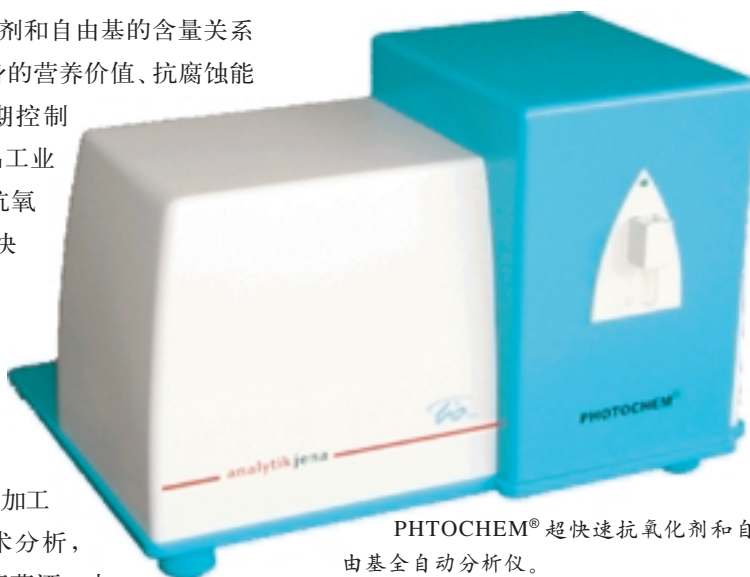
- 用于食品添加剂中植物提取物的抗氧化效力检测；

- 现代营养学中对于能够增强人体免疫力的营养品研究。

除了在食品工业中的应用之外，抗氧化剂和自由基的分析在化工行业、医学研究、农业研究、化妆品行业等诸多领域都有重要意义，在制药行业中对于新药的抗氧化性能测量以及药品质量控制方面也能得到很好的应用。



PHOTOCHEM® 仪器工作流程图。



PHOTOCHEM® 超快速抗氧化剂和自由基全自动分析仪。

的。PCL方法的要点有二：一是由光化学法生成自由基，这是一种简单、快捷、可靠方法，原理是使用具有光化学激发作用的光敏剂(photosensitizer, 发光氨)激发反应分子，使之在紫外灯的作用下以比正常条件下快1000倍的速度发生氧化反应，迅速生成自由基。二是，化学发光法检测自由基，并保证了极高的灵敏度。发光氨(luminol)是一种光致化学发光物质，测量反应所生成的光强度即可测量出来自由基的瞬间含量(光强与自由基含量成正比)。

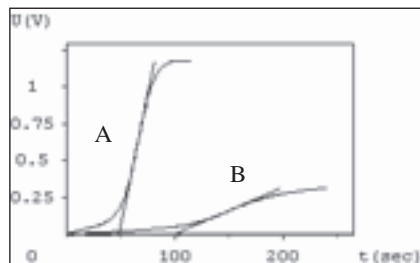
下面，以PCL方法测量维生素片剂中的抗氧化能力的实验为例，具体说明此方法的实际操作方式和实验结果。

测量原理

用光敏化学的方法激发产生自由基，同时让自由基与样品中的抗氧化剂发生反应，用发光法检测剩余的自由基。并得到维生素片剂中的水溶性

PCL法能够快速、准确、直接、全面的测定基质中综合抗氧化能力，这是以往任何一种方法都难以实现

抗氧化性能测定曲线 (如下)。



电压 (与反应发出的光强成正比) 为测量时间的函数, 与空白[A]相比, 维生素片[B]中的抗氧化剂使测得自由基反应的滞后时间延长。

测量曲线设定原理:

- 找到曲线的第一个变形处;
- 确定拐点;
- 通过拐点计算斜率;
- 斜率直线与 x 轴的交点即可确定滞后时间 (滞后时间间距);

■ 抗氧化能力的参数即为空白和样品滞留时间的差值 (滞差), 据此可测得校正曲线;

■ 根据校正曲线, 计算出被测物中相当于标准物质的测量值。

仪器设备

采用德国耶拿分析仪器股份公司生产的 PHTOCHEM® 超快速抗氧化剂和自由基全自动分析仪。

PHTOCHEM 超快速抗氧化剂和自由基自动分析仪, 采用光化学发光 (PCL - photochemi-luminescence) 法的原理, 可以快速全自动的测定大多数各种物质混合物中的整体抗氧化能力。与传统的抗氧化剂分析仪器与方法相比, PHTOCHEM 不需要复杂的样品制备过程, 所需分析时间极短, 一般测量时间在 1~3min 即可。在实验操作方面, PHTOCHEM 由电脑软件控制, 具有现成的分析试剂包和标准的操作步骤, 真正实现了自动化, 同时还可选配自动进样器。在准确度方面, 标准的操作和自动化的进样, 大大降低了人为误差, 而且与传统的仪器与方法不同, PHTOCHEM 在测

量时不受温度和 pH 值得影响, 从而使测量的准确度大为提高, 灵敏度在纳摩尔浓度水平。该设备既可以测定水溶性抗氧化能力, 又可以测定脂溶性的抗氧化能力。不需要昂贵的化学试剂或酶试剂, 只需要 1~10μl 样, 节省了分析成本。另外, PHTOCHEM 将很多临床、生化、免疫学领域都非常重要的参数都在结果中给出, 并提供生物体抗氧化性能的实用性定量描述。该设备结合标准试剂包也可测定某种抗氧化剂及超氧化物歧化酶 SOD 的综合抗氧化能力。

样品制备

■ 将药片研磨成粉溶于 10ml 蒸馏水中;

■ 600g 下离心分离 10min, 提取上清液测定, 浮层物质;

■ 按 1:1000 的比例稀释;

■ 离心分离 5 min;

■ 使用量: 10~50 μl。

方法参数

测量时间[s]: 100-500;

校正及测量参数: 时间滞差(lag-lag0);

平滑因子: 40;

调零功能: 开;

清洗: 1x 每测量一次。

校正及测量步骤

ACW 标准试剂包成分:

试剂 1: 稀释液 (可直接用)

试剂 2: 缓冲液 (可直接用)

试剂 3: 光敏剂 (用 750μl 试剂 1 稀释)

试剂 4: 抗坏血酸维生素 C (冻干) 作为标准试剂

ACW 校正

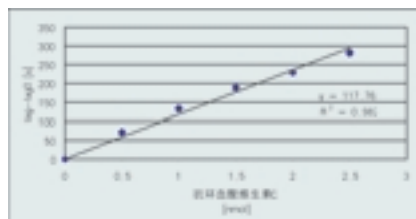
标准: 坏血酸维生素 C, 冷冻干燥 (ACW 分析包中的试剂 4)

储备液的制备(10 mmol/l): 将标准试剂溶于 500 μl 试剂 1 中

样品溶液的制备(0.1 mmol/l): 将储备液按 1:100 (10μl + 990μl) 溶于试剂 1 中, 静置约 2h。

校正曲线的制定:

使用下列浓度的抗坏血酸维生素 C 溶液: 0.5 / 1.0 / 1.5 / 2.0 和 2.5nmol (5~25 μl)。



抗坏血酸维生素 C 校正曲线范例 (线性回归)。

取样表 (体积单位: μl):

试剂 Reagent	R1	R2	R3	R4	样品
空白	1,500	1,000	25	0	0
校正曲线	1,500 - x	1,000	25	x	0
测量	1,500 - y	1,000	25	0	y

按照列表取液到样品管中, 进行短暂的混合 (旋转)。

实验结果

维生素片剂里的水溶性抗氧化能力:

对应于抗坏血酸维生素 C 的 ACW: 0.5~1.5 mmol/g。

背景资料

德国耶拿分析仪器股份公司 (Analytik Jena AG, 简称 AJ 公司) 成立于 1990 年, 前身为卡尔·蔡司 (Carl Zeiss Jena GmbH) 公司的分析仪器部。公司总部设在世界光学精密仪器制造中心的德国耶拿市。目前 AJ 在全球 80 多个国家设有分支机构。

公司目前的主要产品是, 总有机碳 (TOC) / 总氮 (TN) 分析仪, 有机卤素化合物 (AOX) 分析仪, 元素 (C、S、N、Cl) 分析仪; 原子吸收光谱仪 (AAS) 和紫外/可见 (UV/VIS) 分光光度计和生化分析仪器等。另外, AJ 还提供实验室的一体化解决方案。

反馈服务编码 P2083