

联用技术在自由基清除物筛选中的应用

王 璐, 孙莉琼, 苏 航, 戚 进, 余伯阳*

中国药科大学 中药复方研究室, 江苏 南京 211198

摘 要: 越来越多的研究表明自由基与人类的生命活动和疾病发生有着密切的联系, 自由基清除物筛选技术逐渐成为了医药领域中研究的热点问题之一, 尤其是基于在线联用筛选技术的研究得到了迅速发展。采用联用技术筛选自由基清除物, 主要是指将具有分离功能的色谱技术同各种自由基的直接或间接检测技术相结合, 形成各种集化学分离与自由基清除活性检测为一体的快速分析方法, 从而克服了传统研究方法先分离化学物质再进行活性评价的费时、费力的缺点。相对于离线检测方法, 在线检测技术操作简便、检测速度快、自动化程度高、方法稳定规范、易于推广。主要对化学发光体系、HPLC-DPPH 体系、HPLC-ABTS 体系等常用于联用技术的自由基清除体系进行原理及应用的综述, 并对联用技术在自由基清除物筛选中的应用进行了展望。

关键词: 联用技术; 自由基; 化学发光; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH); 2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二盐(ABTS)
中图分类号: R285.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-1032-05

Application of multiple techniques in free radical scavenging material screening

WANG Lu, SUN Li-qiong, SU Hang, QI Jin, YU Bo-yang

Department of Chinese Materia Medica Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Key words: multiple techniques; free radical; chemiluminescence; 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS)

自由基是指游离存在的, 至少含有一个不成对电子的分子、离子、原子或原子团。自由基作为机体的正常代谢物, 平衡状态下对细胞分化、发展、生长抑制、凋亡^[1]、免疫^[2]等生化过程起调节和信号传递作用。但是一旦平衡被打破, 如机体受到疾病或者某些外源性毒物的侵害时, 自由基便会大量增加, 对机体产生强大的伤害作用, 造成 DNA 的氧化损伤, 引起酶、氨基酸、蛋白质的氧化破坏, 对多种器官功能和免疫系统产生严重影响, 从而引起疾病或死亡。生物体系中较常见的是氧自由基, 如超氧阴离子自由基、羟自由基、有机过氧基和脂过氧基, 此外还包括过氧化氢和单线态氧等。这些自由基和相关含氧分子通称活性氧。氧自由基是人体许多生理病理过程中的重要生理指标之一, 越来越受到医药界的关注。随着现代科学研究的日益深入, 人们对自由基清除物的检测和筛选技术根据实验的目的和要求有了新的发展。本文主要针对几种

常用的自由基清除体系的在线联用技术进行综述, 并对其原理及优势进行简要的归纳与总结。

1 化学发光体系

化学发光(chemiluminescence, CL)是指在某些特殊的化学反应中产生了可见光的现象, 其发光的原理是反应体系中的某些物质吸收了反应释放的能量, 由基态跃迁到了激发态, 而又从激发态返回基态时将能量以光辐射的形式释放出来, 产生发光现象。化学发光分析法就是依据某一时刻化学发光强度或化学发光总量来确定反应中相应组分量的一种微量及痕量分析法^[3-4]。该方法常与流动注射、高效液相色谱等方法联用, 进行自由基清除物的在线检测, 具有选择性好、灵敏快速、价格低廉的特点。

丁晓萍等^[5-7]采用邻苯三酚超氧阴离子自由基生成体系和过氧化氢自由基直接生成体系, 自行设计并构建了 HPLC-DAD-CL 联用系统, 对系统的各个条件进行考察, 建立了稳定的检测 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 清

收稿日期: 2011-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973965); 教育部博士点新教师基金(20090096120008); 国家基础科学人才培养基金(J0630858); 国家级大学生实践创新训练计划项目; 中国药科大学大学生实践创新训练项目

作者简介: 王 璐(1990—), 女, 山东莱芜人, 中国药科大学 2008 级学生。Tel: 15261471552 E-mail: magicbolice@126.com

*通讯作者 余伯阳 Tel: (025)86185157 E-mail: boyangyu59@163.com

除活性的在线分析平台；并利用 HPLC-DAD-CL 在线联用技术建立了银杏叶、山楂叶、鬼箭羽药材的色谱指纹图谱和清除不同自由基能力的活性指纹谱，从不同角度评价了药材的质量。常艳旭等^[8-10]在 HPLC-DAD-CL 联用技术的基础上，建立了丹参注射液 H_2O_2 清除活性指纹谱，用于丹参注射液的评价与检测，并成功地评价了不同产地、不同品种、不同栽培方式的丹参药材质量。吴雷等^[11]将麦冬提取物分为乙醚及正丁醇两个萃取部位，以化学发光强度的降低为检测指标，利用 HPLC-DAD-CL 技术在线检测了麦冬中主要活性成分对邻苯三酚-鲁米诺-碳酸体系产生的超氧阴离子的清除能力。Ogawa 等^[12]运用类似方法检测绿茶提取物中的抗氧化成分，从获得的图谱中得出表儿茶酸 (epicatechin) 为绿茶提取物中主要的抗氧化成分；即使提取物稀释 2 000 倍该成分仍能被检出，证明该检测方法的灵敏性远高于紫外检测。

在自由基清除物的活性检测方面，除了与高效液相色谱仪的联用得到较多应用之外，化学发光体系也常常结合流动注射进样方式形成流动注射化学发光分析法 (flow-injection chemiluminescence analysis, FI-CLA)。该方法分析速度快，一般可获得 120~150 次/h 的分析结果，而且封闭式系统利于环境保护，节省试剂和样品，重现性好，流动注射分析的 RSD 一般小于 1%^[13]。该法已经从农业、医药、环境检测等方面扩展到工业在线分析、生化反应等领域。Magalhaes 等^[14]运用流动注射-化学发光分析法在线考察了抗氧化剂对次氯酸自由基的体外清除能力。实验中，次氯酸自由基先与清除剂在生理 pH 值下进行反应，剩余的次氯酸再在碱性条件下与鲁米诺反应。两种反应进行 3 s 左右完毕，与以往的方法相比，在时间上可以更接近体内次氯酸自由基的产生与代谢，便于检测次氯酸自由基与抗氧化剂的快速反应，大大提高了次氯酸自由基与鲁米诺的化学反应速率。

Nalewajko-Sieliwoniuk 等^[15]根据酚类化合物对碱性介质中碘离子与鲁米诺反应而产生的化学发光有强烈的抑制作用的特性，运用 FIA-CL 系统检测了飞蓬 *Erigeron acris* L. 提取物中的咖啡酸和 6'-caffeoylerigeroside，大大提高了这两种物质的检测灵敏度，使之更接近于痕量分析。

此外，还有研究报道将 HPLC 联用 Cu (II) 催化的过氧化氢-鲁米诺化学发光体系^[16]、luminol-

H_2O_2 -Co (II) /EDTA 化学发光体系^[17]，毛细管电泳-化学发光体系^[18]等运用于自由基清除物的检测，均获得了很好的检测限与回收率。

2 HPLC-DPPH 体系

DPPH 为 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 的英文缩写，DPPH· 是一种很稳定的以氮为中心的自由基，其结构及还原产物见图 1。一般认为，被测物若能清除 DPPH· 即可证明其具有清除羟自由基、过氧化氢等氧自由基的能力和阻断脂质过氧化链反应的作用。该自由基的乙醇溶液呈深紫色，在 516 nm 处有强吸收。当有自由基清除剂存在时，由于与 DPPH· 中的单电子配对而使其吸收逐渐消失，其褪色程度与接受的电子数成定量关系。因此可以通过在 516 nm 处测定待测物吸光度减少的情况来反映该物质清除 DPPH· 自由基的能力，即抗氧化能力^[19]，最终实现自由基清除物的在线筛选。该联用技术是基于分光光度法来测定样品的抗氧化活性，与其他抗氧化活性测定方法相比，操作简单、快速，在国内外有着广泛的应用^[20-28]。

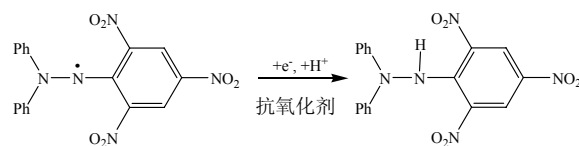


图 1 DPPH 自由基及其还原产物结构

Fig. 1 Structures of DPPH free radical and its reduction product

Bartasiute 等^[29]采用 HPLC-DPPH 系统，改进了原甲醇介质为在生理 pH 值范围内的缓冲溶液，在线检测了体内抗氧化成分对自由基的清除能力，并根据结果研究了其成分的结构与活性的关系。Dapkeviciusa 等^[30]采用 HPLC-DPPH 系统在线检测待测物中可清除自由基的活性成分，通过调节试剂的组成和体积流量、固定了脉冲阻尼器及附带钨灯的检测器，并在测定前用氦气冲洗 DPPH 液，改善了检测方法的灵敏度，使得检测限大大提高。该方法在快速检测复杂体系中各成分清除自由基活性的潜力很大。Bandoniene 等^[31]将该方法应用于苹果提取物中酚类成分抗氧化活性的检测，不同品种的苹果用甲醇-水 (80:20) 提取，经高效液相分离后与 DPPH 反应，在 515 nm 处检测峰形并获取提取物抗氧化活性的相关信息，最终可计算出苹果

中的总抗氧化成分的量。

除了单纯的 HPLC-DPPH 联用, 还有相关研究在该系统中连入质谱仪, 进一步优化该检测系统。Nuengchamnong 等^[32]使用 LC-ESI-MS/MS-DPPH 系统通过与对照品的保留时间和质谱数据比较, 在线鉴别了桃金娘科植物果酒中的抗氧化活性成分, 并测定了活性成分对自由基的清除能力, 达到了集化学物质分析、结构解析、活性分析一体化的检测效果。利用此系统还进行了鱼腥草水提取物中抗氧化成分的鉴定与检测^[33], 根据所得大量图谱与碎片信息, 确定其抗氧化成分为奎宁酸类衍生物、咖啡酸类衍生物、原花青素 B、绿原酸、儿茶酚和槲皮素等, 并通过追踪系统中的多种反应, 定量分析得知绿原酸为鱼腥草中的主要抗氧化成分。

HPLC-DPPH 联用技术被广泛应用于自由基清除物的活性检测与筛选, 无论是植物药、果酒还是食品中的抗氧化成分, 均可考虑采用该体系。

3 HPLC-ABTS 体系

与 DPPH 体系相同, HPLC-ABTS 体系也是基于分光光度法来测定样品的抗氧化活性, 但具有更高的灵敏性^[34], 近年来应用较多。ABTS 为 2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二盐 [2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)] 的英文缩写, 是一种过氧化氢酶的底物^[35]。其氧化后会生成相对稳定的蓝绿色的 ABTS 水溶性自由基, 具有一定的吸光度, ABTS 及其自由基结构见图 2。

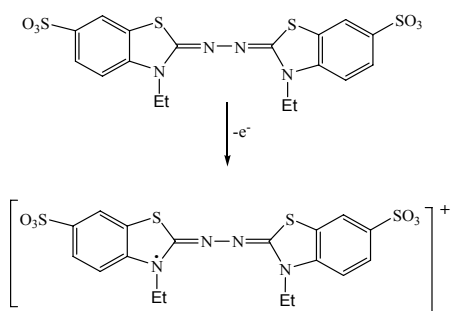


图 2 ABTS 及其自由基结构

Fig. 2 Structures of ABTS and its free radical

抗氧化剂与 ABTS 自由基反应后, 会使溶液褪色, 特征吸光度值降低。在该反应体系中, 溶液褪色越明显则表明所检测物质的总抗氧化能力越强^[36]。

HPLC-ABTS 联用技术灵敏度高、选择性好、快速简便^[34]、与抗氧化剂的生物活性相关性强^[37], 也可用于定量分析, 在植物提取物的活性分析中应

用较多。

Koleva 等^[34]对该体系进行了全面的研究, 进行了 ABTS⁺的稳定性测定、在线装置的优化、最低检出浓度 (minimum detectable concentration, MDC) 和最低检出量 (minimum detectable amounts, MDA) 的测定等。实验结果表明, ABTS 溶液需现用现配且其 PBS 缓冲液中的甲醇量低于 10% 才可提高溶液的稳定性, 该定量检测方法也完全符合线性关系。

He 等^[38]运用此法从椗子中成功地检测出具有清除自由基活性的化学成分, 其中 3, 5-二咖啡酰奎宁酸为最主要的抗氧化成分。Borges 等^[39]运用 HPLC-PDA-MS 和 HPLC-PDA-ABTS 技术在线对黑加仑、蓝莓等水果中具有抗氧化活性的酚类和黄酮类成分进行了测定。将过硫酸钾溶液加到 ABTS 中制备得到 ABTS 原液, 该液可与高效液相色谱洗脱液中的抗氧化成分发生反应, 在 720 nm 处检测到负峰, 从而确定出各种待测物中抗氧化成分, 并进行定量。

4 其他体系

除上述常用联用体系外, 还有少数其他体系应用于自由基清除物活性检测研究中, 如气质联用法测定气相羟自由基、毛细管电泳-电化学检测联用技术检测自由基, 由于自身使用特点及用途较为局限应用较少。

5 结语与展望

各种联用技术的出现, 使自由基清除活性在线检测成为了可能, 克服了以往离线检测的耗时耗力、工作繁琐、工作量大、影响因素多等弊端^[40]。尤其 HPLC-CL 与 HPLC-DPPH 体系的广泛应用, 已成为当今在线检测清除自由基能力的主流方法, 其在食品、生物和医学领域具有广阔的应用前景。在分析检测技术日益发展的今天, 各种联用技术的在线检测方法将是今后活性检测与筛选技术发展的主要趋势之一。

参考文献

- [1] Ghosh J, Myers C E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(22): 13182-13187.
- [2] 尹光耀, 尹玉芬, 何雪芬, 等. 驻春丸对肾虚老年人免疫与内分泌功能的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, 15(10): 601-603.
- [3] 邵晓东, 李 瑛. 鲁米诺化学发光分析法研究进展

- [J]. 化学研究, 2010, 21(1): 102-112.
- [4] Anderson D J, Guo B, Xu Y. Clinical chemistry [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(12): 165-230.
- [5] Ding X P, Qi J, Chang Y X, *et al.* Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2204-2210.
- [6] Ding X P, Wang X T, Chen L L, *et al.* Quality and antioxidant activity detection of *Crataegus* leaves using on-line high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to chemiluminescence detection [J]. *Food Chem*, 2010, 120(3): 929-933.
- [7] 丁晓萍, 余伯阳. 基于抗氧化活性的生物活性和化学相关指纹的构建及其在中药质量评价研究中的应用 [D]. 南京: 中国药科大学, 2009.
- [8] Chang Y X, Ding X P, Qi J, *et al.* Determination of phenolic acids in Danshen preparations by LC with chemiluminescence detection [J]. *Chromatographia*, 2009, 69(3/4): 319-323.
- [9] Chang Y X, Ding X P, Qi J, *et al.* The antioxidant-activity-integrated fingerprint: an advantageous tool for the evaluation of quality of herbal medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1208(1): 76-82.
- [10] Chang Y X, Yan D M, Chen L L, *et al.* Potency fingerprint of herbal products Danshen injection for their quality evaluation [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(6): 586-590.
- [11] 吴雷, 余伯阳, 朱丹妮. 高效液相色谱-DAD-化学发光法在线检测麦冬清除超氧阴离子活性 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 141-145.
- [12] Ogawa A, Arai H, Tanizawa H, *et al.* On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 383(3): 221-230.
- [13] 田进军, 薛艳. 流动注射化学发光分析法应用研究进展 [J]. 化工中间体, 2010(8): 6-9.
- [14] Magalhaes L M, Segundo M A, Reis S, *et al.* Automatic *in vitro* determination of hypochlorous acid scavenging capacity exploiting multisyringe flow injection analysis and chemiluminescence [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(10): 3933-3939.
- [15] Nalewajko-Sieliwoniuk E, Nazaruk J, Antypiuk E, *et al.* Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3): 579-586.
- [16] Serrano J M, Silva M. Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid-chromatography with chemiluminescence detection [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 843(1): 20-24.
- [17] Giokas D L, Vlessidis A G, Evmiridis N P. On-line selective detection of antioxidants free-radical scavenging activity based on Co (II) / EDTA-induced luminol chemiluminescence by flow injection analysis [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 589(1): 59-65.
- [18] 夏之宁, 庞媛, 郑国灿. 基于毛细管电泳的黄芪抗氧化生物指纹图谱研究 [J]. 中国分析化学杂志, 2008, 36(12): 1646-1650.
- [19] 王和才, 胡秋辉. DPPH 法测定紫红薯提取物清除自由基的能力 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1): 132-134.
- [20] Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, *et al.* Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(8): 2016-2021.
- [21] Takako Y, Dong E B, Takako N, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(6): 2143-2150.
- [22] 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]. 生物化学和生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.
- [23] Larrauri J A, Chanchez-Moeno C, Saura-Calixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(7): 2694-2697.
- [24] Mellors T. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol [J]. *J Biol Chem*, 1966, 241(19): 4553-4560.
- [25] Cotellet N, Bernier J L, Catteau J P, *et al.* Antioxidant properties of hydroxyl flavones [J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 20(1): 35-41.
- [26] 许申鸿, 杭瑚. 溶剂及 pH 值对 1, 1-二苯基-2-苦肟基自由基分析法的影响 [J]. 分析测试学报, 2000, 19(3): 50-55.
- [27] 王宏侠, 唐有志, 刘在群. 含羟基取代基的 Schiff 碱捕获自由基性能 [J]. 应用化学, 2007, 24(10): 1105-1108.
- [28] 王笑晴. 基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 360-363.
- [29] Bartasiute A, Westerink B H C, Verpoorte E, *et al.* Improving the *in vivo* predictability of an on-line HPLC stable free radical decoloration assay for antioxidant activity in methanol-buffer medium [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(3): 413-423.
- [30] Dapkevicius A, van-Beek T A, Niederlander H A G.

- Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912(1): 73-82.
- [31] Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9): 2482-2487.
- [32] Nuengchamnong N, Ingkaninan K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2009, 42(1): 297-302.
- [33] Nuengchamnong N, Krittasilp K, Ingkaninan K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay [J]. *Food Chem*, 2009, 117(4): 750-756.
- [34] Koleva I I, Niederlander H A G, van-Beek T A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(146): 3373-3381.
- [35] 马 军, 杨晶晶, 赵 吉. ABTS 显色分光光度法测定水中微量高锰酸钾 [J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3): 668-672.
- [36] 张逸波, 郑文杰, 黄 峙, 等. 硒杂环化合物 SPO 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(7): 1866-1871.
- [37] Berg R V, Guido R M, Haenen M. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures [J]. *Food Chem*, 1999, 66(4): 511-517.
- [38] He W, Liu X, Xu H, *et al.* On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts [J]. *Food Chem*, 2010, 123(2): 521-528.
- [39] Borges G, Degeneve A, Mullen W, *et al.* Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries [J]. *Food Chem*, 2010, 58(7): 3901-3909.
- [40] 戚 进, 余伯阳. 中药质量评价新模式——“谱效整合指纹谱”研究进展 [J]. *中国天然药物*, 2010, 8(3): 171-176.