

ABTS 法体外测定果蔬类总抗氧化能力的研究进展*

朱玉昌¹ 焦必宁²

1(西南农业大学食品学院,重庆,400716) 2(中国农业科学院柑橘研究所,重庆,400712)

摘 要 ABTS 法作为一种用于体外测定物质总抗氧化能力的新方法,在国内报道甚少,文中就该方法在国外的应用、在果蔬中的应用以及存在的问题进行了概述和分析,为该方法在国内的应用提供理论依据。

关键词 ABTS 法,总抗氧化能力,TEAC

水果和蔬菜是人们日常饮食中的主要物质,不仅能提供维生素、矿物质等一些重要的营养成分,同时还因含有类黄酮、花色苷等多酚类物质而具有抗氧化、抗变异、防癌、提高免疫力等功能,所以近几年来研究果蔬的抗氧化活性成为热门课题。

目前用于体外测定物质抗氧化能力的方法有比色法,化学发光法,荧光法,电子自旋共振(ESR)法等,但大多数是针对物质清除某一种自由基而言,并不能反映出其总的抗氧化能力,因为物质总的抗氧化能力是物质清除不同的自由基或者是物质的不同活性成分、清除不同的自由基的有效和,鉴于物质在肌体内起作用的正是其总的抗氧化能力,因此用总的抗氧化能力(total antioxidant activity, TAA)来评价物质的抗氧化能力是很有必要的。国外现在较普遍用于体外测定物质总抗氧化能力的方法有 FRAP(ferric reducing-antioxidant power)法, TRAP(total radical-trapping antioxidant parameter)法, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)法和 ABTS 法,前 3 种在国内已有报道,而 ABTS 法的报道甚少,本文就 ABTS 法及其在测定果蔬类总抗氧化能力中的应用作一定的综述。

1 ABTS 法的原理及特点

ABTS 法最先由 Miller 等人开创,用于测定生物样品的抗氧化能力^[1]。该方法是以 ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid),即 2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)],结构式如图 1 所示。这种水溶性的自由基引发剂为显色剂。ABTS 经活性氧氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS^{•+},向其中加入被测物质,如果该物质中存在

抗氧化成分,则该物质会与 ABTS^{•+} 发生反应而使反应体系褪色,然后在 ABTS^{•+} 这种自由基的最大吸光波长下(一般选择 734nm)检测吸光度的变化,与含 Trolox [(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,即 6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸),一种类似于 V_E 的水溶性物质(其结构式如图 2 所示)]的对照标准体系比较,换算出被测物质总的抗氧化能力,结果多表示为达到一定浓度测试物质相当的抗氧化能力所需要的 Trolox 的浓度,所以也把该方法称为 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity)法^[2],也有研究者提出用抗坏血酸作为对照标准,将该方法称为 VCEAC 或者 AEAC 法^[3]。

相对于抗氧化能力测定的体内方法(主要是动物实验和流行病学调查),ABTS 法这种体外测定方法花费的时间短,经费少,所需仪器设备简单。与其他几种总抗氧化能力体外测定法相比,ABTS 法快速、简便、与抗氧化剂的生物活性相关性强^[4],因而较为广泛地应用于包括血清在内的生物样品、果蔬类和一些纯物质的抗氧化能力的测定。

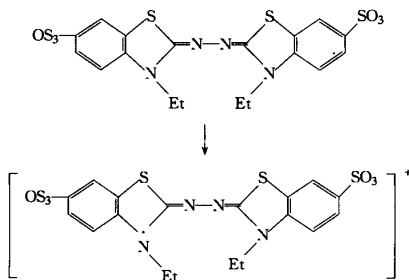


图 1 ABTS 及其自由基结构

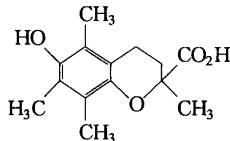


图 2 Trolox 的结构

第一作者:硕士研究生(焦必宁为通讯作者,Email: bljiao@tom.com)。

* 农业部结构调整重大技术研究项目柑橘贮藏加工关键技术研究(No.04-09-02B)·科技部科研院所公益基金柑橘产品质量检测关键技术与标准研究(No.2004DIB4J147)

收稿日期:2005-04-15

2 ABTS 法在测定果蔬类总抗氧化能力中的应用

表 1 为用 ABTS 法测定果蔬中 TAA。ABTS 法和 DPPH 法测定果汁抗氧化能力的比较见表 2。

表 1 ABTS 法在测定果蔬类 TAA 中的应用

自由基产生体系	测定物质	参考文献
亚铁肌红蛋白/ABTS/H ₂ O ₂	苹果汁和黑加仑饮料中的抗坏血酸和酚类抗氧化物质	7
	红卷心菜、黑莓醋栗、黑花楸果和山药中的花色苷类物质	8
	香蕉、菠萝、荔枝、芒果等	9
MnO ₂ /ABTS	胡萝卜素和叶黄素	10
	番茄中的水不溶性成分	11,12
	葡萄籽中的 3-黄烷酮类物质	13
ABAP/ABTS	血橙中的 V _C	14
	橙汁、葡萄柚汁	15,16
HRP/ABTS/ H ₂ O ₂	蔬菜汤汁中的亲水亲脂成分	17
	柑橘叶提取物	18
	石榴	19
K ₂ S ₂ O ₈ /ABTS	富含类胡萝卜素的水果提取物	21
	胡桃多酚	22
	刺梨、龙眼、芒果	22,23
AAPH/ABTS	李子	24
H ₂ O ₂ /ABTS/醋酸缓冲液	果汁	25

表 2 ABTS 法和 DPPH 法测几种果汁抗氧化能力的比较

方 法	果 汁			
	柑 橘	柠 檬	白 柚	橘 子
ABTS 法	86.36	67.22	63.86	59.78
DPPH 法	81.12	62.54	61.37	55.28

表 2 表明,ABTS 法测定的结果与 DPPH 法基本一致^[26],那些含有较多类黄酮、多酚、花青素等的水果和蔬菜具有较高的 TEAC 值,抗氧化能力相对较强。

3 ABTS 法存在的缺陷和发展前景

在产生 ABTS^{•+} 自由基的不同体系中,亚铁肌红蛋白/ABTS/ H₂O₂ 最先作为一种阻断法用于测定生物样品,在该体系中具有抗氧化能力的物质在自由基产生之前加入,因这些物质可能与反应试剂相互作用而导致测定结果偏高,Arnao 等人^[27]发展了反应后加入法,即先由反应体系产生 ABTS^{•+} 再加入抗氧化物质,这种方法的优点是产生 ABTS^{•+} 的温度无需太高,即使使用过氧化物酶也无需事先纯化,在检测波长处又可以避免其他物质的干扰,这样不仅大大简化了操作程序,节约了时间,并且提高了准确度。随后 Re 等人^[28]在此基础上用 K₂S₂O₈ 与 ABTS 直接生成稳定的 ABTS^{•+},进一步简便了操作步骤。Campos 等人^[29]提出事先加热 ABTS²⁻ 和不耐热的含氮物质 ABAP 产生 ABTS^{•-} 再加入测试物质,可避免中间产

物的干扰。Cano 等人^[30]建立使用 HRP/ABTS/ H₂O₂ 体系,为避免外来物质的干扰,选择在 400 ~ 750 nm 间的一个波长来检测。最近 Ozcan^[25]提出用 H₂O₂/ABTS/醋酸缓冲液体系,其测定结果与 FRAP 法具有很好的相关性($r = 0.863, P < 0.000 1$)。这些改进方案均在一定程度上促进了 ABTS 法的广泛应用。

ABTS 法本质上是一种间接方法,是用来检测物质清除 ABTS^{•+} 这种自由基的能力,与真实的氧化分解没有关系,它只是用 TEAC 值来表征测试样品与经氧化得到的 ABTS^{•+} 反应的能力而非阻断该氧化过程,因此 TEAC 值在概念上类似于阻断系数,并不是直接反应被检物质的活力,所以要想较全面的判断一种物质的抗氧化能力还要结合其他的方法,如 DPPH 法。

另一方面,在应用中不同的试验人员使用了不同的稀释度和检测时间来测定反应后的吸光度,给分析和比较数据造成了一定的难度。对于不同的研究者对同一物质报道的不同 TEAC 值,De Beer 等人^[31]提出 2 个主要的影响因素:一是上面提到的产生 ABTS^{•+} 自由基的不同体系,二则是测定前的不同显色时间。应用中发现,对照物 trolox 与含 ABTS^{•+} 自由基的体系发生反应到达稳定吸光度所需要的时间极短,只需 10 s 左右,而被测物质的反应时间则长短不一,实际操作中多在加入被测物质 6 min 后检测吸

光度,但在这个时刻有些物质并没有完全反应,因此有研究者提出在加入被测物质之间用一定浓度的缓冲液(磷酸盐缓冲液)将反应体系的吸光度调整至 0.7 ± 0.02 的方法来减小误差。另外,在用酶法产生 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基后添加含有酚类的测试物质,试样在清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的同时也会抑制产生 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的酶的活性,Mariken 等人^[32] 在应用时还发现,反应过程生

成的中间产物会限制该方法在一些领域中的应用,这些问题的解决还有待进一步的研究。

随着对检测技术高效、快速、简便、准确的要求,对于 ABTS 法的发展各研究者纷纷看好该方法与其他高新技术的连用,已有学者提出其与 HPLC 技术连用后用于物质抗氧化能力的在线检测的思路,其技术设备见图 3。

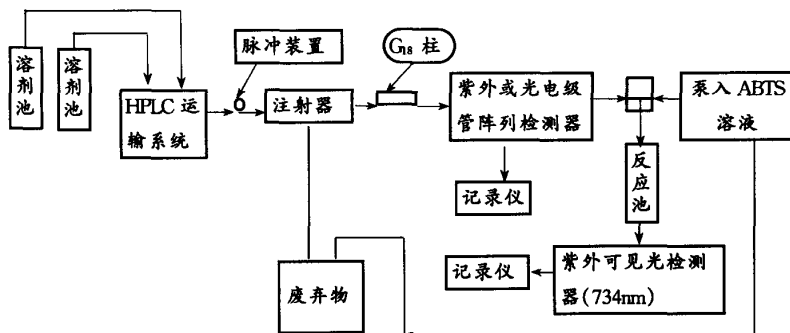


图3 在线检测物质清除自由基能力的 HPLC- $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 技术设备

物质抗氧化能力测定的根本标准和目的就是最高限度地、客观地反映被测物质的抗氧化作用,测定方法在抗氧化物质的抗氧化能力研究中有 3 个要素:(1)是以什么作为基质体系来测定,(2)是以什么方式来加速,(3)是用什么来指示反应终点^[33],这 3 要素中的任何一要素改变都会使测定结果发生变化,要针对不同用途和目的的抗氧化剂,选择相适应的测定方法,在对抗氧化剂的抗氧化活性下结论时,要限定其应用范围。ABTS 法作为近几年兴起的一种相对简便的用于体外测定物质总抗氧化能力的方法就上述 3 点而言已有了一定的基础,关键还在于建立一个相对完善的标准,尽可能地与一些相对成熟的新技术连用,以求该方法更为广阔、灵活的应用。

参 考 文 献

- 1 Miller N J, Rice-Evans C A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. *Clinical Science*, 1993, 84: 407~412
- 2 Mariken J T J Arts. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures[J]. *Food Chemistry*, 2003, 80: 409~414
- 3 Dae-Ok Kim. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81: 321~326
- 4 Robin van den Berg, Guido R M M Haenen. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures[J]. *Food Chemistry*, 1999, 66: 511~517
- 5 Arena E, Fallico B. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage[J]. *Food Chemistry*, 2001, 74: 423~427
- 6 Nicholas J M, Catherine A R E. The relative contribution of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink [J]. *Food Chemistry*, 1997, 60(3): 331~337
- 7 Miller N J, Rice-Evans C A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink [J]. *Food Chemistry*, 1997b, 60: 331~337
- 8 Degenhardt A, Knapp H, Winterhalter P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 338~343
- 9 Amitabye Luximon-Ramma. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits [J]. *J Sci Food Agric*, 2003, 83: 496~502
- 10 Miller N J, Sampson J, Candeias L P, et al. Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls[J]. *FEBS Letters*, 1996, 384: 240~242
- 11 Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, et al. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 723~727
- 12 Scalfi L, Fogliano V, Pentangelo A, et al. Antioxidant ac-

- tivity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 1 363~1 366
- 13 Zielinski H, Kozłowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 2 008~2 016
 - 14 E. Arena B F. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage[J]. Food Chemistry, 2001, 74: 423~427
 - 15 Arnao M B. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 236: 255~261
 - 16 Cano A. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material[J]. Phytochemical analysis, 1998, 9: 196~202
 - 17 Arnao M B, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2001, 73: 239~244
 - 18 Arnao M B, Cano A, Alcolea J F, et al. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigments extracts[J]. Phytochemical analysis, 2001, 12: 138~143
 - 19 Gil M I. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 4 581~4 589
 - 20 Pellegrini N Y. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay[J]. Methods Enzymol, 1999, 299: 379~389
 - 21 Anderson K J, Teuber S S, Gobeille A, et al. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation[J]. Journal of Nutrition, 2001, 131: 2 837~2 842
 - 22 Daniela Butera. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (opuntia ficus indica) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 6 895~6 901
 - 23 Yeanyean Soong. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds[J]. Food Chemistry, 2004, 88: 411~417
 - 24 Daek Kim. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums[J]. Food Chemistry, 2003, 81: 321~326
 - 25 Ozcan Erel. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation[J]. Clinical Biochemistry, 2004, 37: 277~285
 - 26 Marino B A. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case[J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11: 419~421
 - 27 Arnao M B, Cano A. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 236: 255~261
 - 28 Re R, Pellegrini R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Rad Biol Med, 1999, 26: 1 231~1 237
 - 29 Campos M D A M, Lissi E A. Total antioxidant potential of Chilean wines[J]. Nutrition Research, 1996, 3: 385~389
 - 30 Arnao M B, Cano A. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 236: 255~261
 - 31 De Beer, Jubert E. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 79: 750~754
 - 32 Mariken J T J Arts. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 45~49
 - 33 翁建新, 吴 侯. 抗氧化剂的抗氧化活性的测定方法及其评价[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 119~122

Research Progress on ABTS Assay in Determination of TAA in Fruits and Vegetables *in Vitro*

Zhu Yuchang¹ Jiao Bining²

1(College of Food Science, Southwest Agriculture University, Chongqing, 400716, China)

2(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing, 400712, China)

ABSTRACT As a novel method to assess total antioxidant activity(TAA) of matters *in vitro*, ABTS method has really few reported in domestic. In order to provide theoretical reference for its application in domestic, the development, application and existing problems of the assay abroad were generally introduced and analyzed.

Key words ABTS assay, total antioxidant capacity(TAA), TEAC