

## 二、有助于抗氧化检验方法

### 1 动物实验

#### 1.1 实验动物

选用 10 月龄以上老龄大鼠或 8 月龄以上老龄小鼠，也可用氧化损伤模型鼠。单一性别，小鼠每组 10—15 只，大鼠 8—12 只。

#### 1.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个溶剂对照组，以人体推荐量的 10 倍（小鼠）或 5 倍（大鼠）为其中的一个剂量组，另设两个剂量组，高剂量一般不超过 30 倍，必要时设阳性对照组、空白对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 老龄动物

选用 10 月龄以上大鼠或 8 月龄以上小鼠，按血中 MDA 水平分组，随机分为 1 个溶剂对照组和 3 个受试样品剂量组。3 个剂量组给予不同浓度受试样品，对照组给予同体积溶剂，实验结束时处死动物测脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

##### 1.3.2 D-半乳糖氧化损伤模型

###### 1.3.2.1 原理

D-半乳糖供给过量，超常产生活性氧，打破了受控于遗传模式的活性氧产生与消除的平衡状态，引起过氧化效应。

###### 1.3.2.2 造模方法

选 25—30g 健康成年小鼠，除空白对照组外，其余动物用 D-半乳糖 40mg—1.2g/kg BW 颈背部皮下注射或腹腔注射造模，注射量为 0.1mL/10g，每日 1 次，连续造模 6 周，取血测 MDA，按 MDA 水平分组。随机分为 1 个模型对照组和 3 个受试样品剂量组，3 个剂量组经口给予不同浓度受试样品，模型对照组给予同体积溶剂，在给受试样品的同时，模型对照组和各剂量组继续给予相同剂量 D-半乳糖颈背部皮下或腹腔注射，实验结束处死动物测脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

##### 1.3.3 乙醇氧化损伤模型

###### 1.3.3.1 原理

乙醇大量摄入，激活氧分子产生自由基，导致组织细胞过氧化效应及体内还原型谷胱甘肽的耗竭。

###### 1.3.3.2 造模方法

选 25—30g 健康成年小鼠（180—220g 大鼠），随机分为 4 个组，1 个模型对照组和 3 个受试样品剂量组，必要时可增设 1 个空白对照组。3 个剂量组给予不同浓度受试样品，模型对照组给予同体积溶剂，连续灌胃 30 天，末次灌胃后，模型组对照组和 3 个剂量组禁食 16 小时（过夜），然后 1 次性灌胃给予 50%乙醇 12mL/kg

BW, 6 小时后取材 (空白对照组不作处理, 不禁食取材), 测血清或肝组织脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

### 1.3.4 脂质氧化产物测定

#### 1.3.4.1 血中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量测定

血中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量可采用荧光法和比色法测定, 方法任选其一。

##### 1.3.4.1.1 荧光法

###### 1.3.4.1.1.1 荧光法原理

MDA (malondialdehyde) 是细胞膜脂质过氧化的终产物之一, 测其含量可间接估计脂质过氧化的程度。1 个丙二醛 (MDA) 分子与 2 个硫代巴比妥酸 (TBA) 分子在酸性条件下共热, 形成粉红色复合物。以波长 536nm 为激发光, 在 550nm 有最强荧光强度。可用荧光法进行微量测定。

###### 1.3.4.1.1.2 仪器与试剂

仪器: 荧光分光光度计、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管

试剂:

10mmol/L 四乙氧基丙烷 (贮备液, 棕色瓶 4℃ 保存 12 个月), 临用前用纯水稀释成 1nmol/mL

29mmol/L 硫代巴比妥酸工作液

硫代巴比妥酸 0.209g

EDTA·2H<sub>2</sub>O 25mg

谷胱甘肽 (还原型) 1mg

用 0.02mol/L NaOH 50mL 溶解 (微温助溶, 棕色瓶 4℃ 保存 2 周)

酸水解液

0.1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 125mL

0.1mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 125mL

加水 150mL 用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调 pH 1.5, 加水稀释至 500mL

正丁醇

以上所用玻璃器皿均需经 50%硝酸浸泡 24h 后, 再经蒸馏水、双蒸水淋洗干燥, 试剂 (选 AR 级) 最好用双蒸水配制。

###### 1.3.4.1.1.3 实验步骤

###### 1.3.4.1.1.3.1 样品制备

全血上清液: 取血 50μL 加入 0.5mL 生理盐水, 2000r/min 离心 10min, 取上清液待测。

血清样品: 取血 0.5mL 室温静置 10min, 2000r/min 离心 10min, 取上清液待测。

###### 1.3.4.1.1.3.2 标准曲线制作

将 10nmol/mL 四乙氧基丙烷, 用双蒸水稀释成 0.0、0.25、0.5、1.0、1.5、2、3、5、10nmol/mL 分别取 0.1mL 加入酸水解液 2mL、TBA 工作液 0.5mL→混匀, 避光、沸水浴 60min→流水冷却至室温→3mL 正丁醇振荡抽提 1min→3000r/min 离心 5min→取上清液 (正丁醇层) 测荧光强度 (入射狭缝 1.5nm, 出射狭缝 5nm, 激发波长 536nm, 发射波长 550nm)

以四乙氧基丙烷浓度为横坐标，荧光强度为纵坐标作图。

#### 1.3.4.1.1.3.3 样品测定

试剂	空白管	样本管	标准管
10mL 具塞离心管	0.1mL 蒸馏水	0.1mL 血清*	0.1mL 标准 <sup>#</sup>
酸水解液	2mL	2mL	2mL
TBA 工作液	0.5mL	0.5mL	0.5mL
混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却			
正丁醇	3mL	3mL	3mL
振荡抽提 1min，3000r/min 离心 5min			

\*全血上清液 0.5mL（空白管加蒸馏水 0.5mL，标准管加标准 0.1mL、蒸馏水 0.4mL）

<sup>#</sup> 1nmol/mL 四乙氧基丙烷（标准）

血清 0.1mL（或全血上清液 0.5mL）→加入酸水解液 2mL、TBA 工作液 0.5mL→混匀，避光、沸水浴 60min →流水冷却至室温→3mL 正丁醇振荡抽提 1min→3000r/min 离心 5min→取上清液（正丁醇层）测荧光强度（入射狭缝 1.5nm，出射狭缝 5nm，激发波长 536nm，发射波长 550nm）

#### 1.3.4.1.1.3.4 计算公式：

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血清)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 1 \times 1$$

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血液)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 1 \times \frac{1}{0.05}$$

A: 空白管荧光度

B: 样品荧光度

F: 四乙氧基丙烷荧光度

C: 四乙氧基丙烷浓度（1nmol/mL）

K: 稀释倍数

#### 1.3.4.1.2 比色法

##### 1.3.4.1.2.1 比色法原理

MDA（malondialdehyde）是细胞膜脂质过氧化的终产物之一，测其含量可间接估计脂质过氧化的程度。1个丙二醛（MDA）分子与2个硫代巴比妥酸（TBA）分子在酸性条件下共热，形成粉红色复合物。该物质在波长 532nm 有极大吸收峰。可用分光光度法进行测定。

##### 1.3.4.1.2.2 仪器与试剂

仪器：可见分光光度计、酶标仪、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管。

试剂：0.2M 乙酸盐缓冲液 pH3.5

0.2M 乙酸溶液 185mL

0.2M 乙酸钠溶液 15mL

1mmol/L 四乙氧基丙烷（贮备液，4℃保存3个月），临用前用水稀释成40nmol/mL

8.1%十二烷基硫酸钠 SDS

0.8%硫代巴比妥酸 TBA

0.2M 磷酸盐缓冲液 pH7.4

0.2M 磷酸氢二钠 1920mL

0.2M 磷酸二氢钾 480mL

#### 1.3.4.1.2.3 实验步骤

##### 1.3.4.1.2.3.1 样品制备

溶血液样品：取血 20μL 加入 0.98mL 蒸馏水制成 2%溶血液。

##### 1.3.4.1.2.3.2 样品测定

试剂	空白管	样品管	标准管
2%溶血液*		0.2mL	
40nmol/mL 四乙氧基丙烷			0.2mL
8.1%SDS	0.2mL	0.2mL	0.2mL
0.2M 乙酸盐缓冲液	1.5mL	1.5mL	1.5mL
0.8%TBA	1.5mL	1.5mL	1.5mL
H <sub>2</sub> O	0.8mL	0.6mL	0.6mL

混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却，于 532nm 比色

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

\*若用血清，样品管 0.15mL，标准管 0.15mL。

##### 1.3.4.1.2.3.3 计算

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 2\%溶血液)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 40 \times 1$$

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mL 血清)} = \frac{B-A}{F-A} \times C \times K = \frac{B-A}{F-A} \times 40 \times 1$$

A: 空白管吸光度

B: 样品吸光度

F: 四乙氧基丙烷吸光度

C: 四乙氧基丙烷浓度 (40nmol/mL)

K: 稀释倍数

#### 1.3.4.2 组织中过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 含量测定

##### 1.3.4.2.1 原理

见 1.3.4.1.2.1

#### 1.3.4.2.2 仪器与试剂

仪器：可见分光光度计、酶标仪、微量加样器、恒温水浴锅、普通离心机、混旋器、具塞离心管、组织匀浆器

试剂：见 1.3.4.1.2.2

#### 1.3.4.2.3 实验步骤

##### 1.3.4.2.3.1 样品制备

组织匀浆样品：取一定量的所需脏器，生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎，置匀浆器中，加入 0.2M 磷酸盐缓冲液，以 2000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复进行 3 次，制成 10%组织匀浆（W/V），3000r/min 离心 5—10min，取上清液待测。

##### 1.3.4.2.3.2 样品测定

试剂	空白管	样品管	标准管
10%组织匀浆		0.2mL	
40nmol/mL 四乙氧基丙烷			0.2mL
8.1%SDS	0.2mL	0.2mL	0.2mL
0.2M 乙酸盐缓冲液	1.5mL	1.5mL	1.5mL
0.8%TBA	1.5mL	1.5mL	1.5mL
H <sub>2</sub> O	0.8mL	0.7mL	0.7mL

混匀，避光沸水浴 60min，流水冷却，于 532nm 比色

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行

##### 1.3.4.2.3.3 计算

$$\text{过氧化脂质含量 (nmol/mg 组织)} = \frac{B - A}{F - A} \times C \times K = \frac{B - A}{F - A} \times 40 \times \frac{1}{0.2 \times 10\% \times 1000}$$

A：空白管吸光度

B：样品管吸光度

F：四乙氧基丙烷吸光度

C：四乙氧基丙烷浓度（40nmol/mL）

K：稀释倍数

#### 1.3.4.3 血清中 8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）测定

##### 1.3.4.3.1 原理

8-表氢氧-异前列腺素（8-Isoprostane）是体内脂质氧化应激反应稳定而具有特异性的标志物，其含量能间接反应因机体内自由基的产生而导致组织细胞的脂质过氧化程度。

##### 1.3.4.3.2 仪器与试剂

仪器：酶标仪、生化培养箱、微量振荡器、微量加样器、洗板机

试剂：8-Isoprostane KIA Kit (酶联免疫试剂盒)

8-Isoprostane EIA 抗体血清、8-Isoprostane AChE 示踪物、8-Isoprostane EIA 标准品、EIA 缓冲液、

洗涤缓冲液、吐温 20、鼠抗-兔 IgG 抗体、EIA 示踪染色剂、EIA 抗体血清染色剂、Ellman's 试剂

### 1.3.4.3.3 实验步骤

#### 1.3.4.3.3.1 样品制备

小鼠眼内眦静脉丛取血，3000r/min 离心 10min。取上清液，用 EIA 缓冲液稀释 15 倍备用。

#### 1.3.4.3.3.2 样品测定

按试剂盒说明操作。

8-表氢氧-异前列腺素标准孔浓度分别为：500 pg/mL、200 pg/mL、80 pg/mL、32 pg/mL、12.8 pg/mL、5.1 pg/mL、2.0 pg/mL、0.8pg/mL

步骤	试剂	空白	TA	NSB	B <sub>0</sub>	标准/样品
1.加试剂	EIA 缓冲液	-	-	100μL	50μL	-
	标准/样品	-	-	-	-	50μL
	AChE 示踪物	-	-	50μL	50μL	50μL
	抗体血清	-	-	-	50μL	50μL
2.培养	用封板膜盖好酶标板，并在 4℃ 避光条件下培养 18 小时					
3.清洗	清洗所有反应孔五次					
4.加试剂	AChE 示踪物	-	5μL	-	-	-
	Ellman's	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL
5.培养	用封板膜盖好酶标板，并在常温避光条件下培养 45-90 分钟					
6.读数	在波长 412nm 处测量各孔吸光度 (B <sub>0</sub> 在 0.3-1.0 A.U 范围)					

$$\%B/B_0 = \frac{\text{标准或样品孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}}{\text{B}_0 \text{孔吸光度} - \text{NSB 孔吸光度}} \times 100$$

以标准物的浓度的对数 (log) 为横坐标，%B/B<sub>0</sub> 为纵坐标绘制标准曲线，亦可将数据转换成 logit(B/B<sub>0</sub>) 或 ln[B/B<sub>0</sub>/(1-B/B<sub>0</sub>)] 做为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。将样品的 %B/B<sub>0</sub> 值，代入方程式，计算出样品的浓度，再乘以稀释倍数，即为样品中的 8-表氢氧-异前列腺素浓度。

### 1.3.5 蛋白质氧化产物测定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 自由基对蛋白质氨基酸侧链的氧化可导致羰基产物的积累。羟自由基也可直接作用于肽链，使肽链断裂，引起蛋白质一级结构的破坏，在断裂处产生羰基。羰基化蛋白极易相互交联、聚集为大分子从而降低或失去原有蛋白质的功能，蛋白质羰基含量可直接反映蛋白质损伤的程度。蛋白质羰基形成是多种氨基酸在蛋白质的氧化修饰过程中的早期标志，它随着年龄的增长而增加。

#### 1.3.5.1 血清中蛋白质羰基测定

##### 1.3.5.1.1 原理

被氧化后的蛋白质羰基含量增多，羰基可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙，2,4-二硝基苯腙为红棕色的沉淀，将沉淀用盐酸胍溶解后即可在分光光度计上读取 370 nm 下的吸光度值，从而测定蛋白质的羰基含量。

### 1.3.5.1.2 仪器与试剂

仪器：紫外分光光度计、酶标仪、微量加样器、生化培养箱、恒温水浴锅、低温高速离心机、混旋器、2mL 离心管。

试剂：10 mmol/L 2,4-二硝基苯肼(DNPH)

99 mg 2, 4-二硝基苯肼用50ml 2 mol/L HCL 溶解，4℃避光保存。

2 mol/L HCL

200 g/L 三氯乙酸 (TCA)

6 mol/L 盐酸胍

无水乙醇乙酸乙酯混合应用液

将无水乙醇和乙酸乙酯按照体积比1：1的比例配置成混合溶液，现用现配。

### 1.3.5.1.3 操作步骤

试剂	测定管	对照管
血清（血浆）	0.1mL	0.1mL
10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼	0.4mL	
2 mol/L HCL		0.4mL
涡旋混匀1分钟，37℃准确避光反应30分钟		
200 g/L 三氯乙酸	0.5mL	0.5mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
6 mol/L 盐酸胍	1.25mL	1.25mL
混匀后，37℃准确水浴15分钟		

涡旋混匀，将全部沉淀溶解，以12000r/min离心15min，取上清液在370nm处比色，6 mol/L盐酸胍试剂调零，测定OD值。用双缩脲法测定血清（或血浆）蛋白质含量。

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

### 1.3.5.1.4 计算公式

$$\text{蛋白质羰基含量} = \frac{\text{测定管OD} - \text{对照管OD}}{22 \times \text{比色光径 (cm)} \times \text{样本蛋白浓度 (mg/L)}} \times 125 \times 10^5 \text{ (nmol/mgprot)}$$

### 1.3.5.2 组织中蛋白质羰基测定

#### 1.3.5.2.1 原理

见1.3.5.1.1

### 1.3.5.2.2 仪器与试剂

仪器：紫外分光光度计、酶标仪、微量加样器、生化培养箱、恒温水浴锅、天平、匀浆器、低温高速离心机、混旋器、2mL 离心管。

试剂：

10 mmol/L HEPES缓冲液 pH7.4

2.38 g N-2-羟乙基哌嗪-2'-乙磺酸 (HEPES) 溶于1000mL双蒸馏水，用1N NaOH 调pH至7.4，4℃保存。

100 g/L 硫酸链霉素

1g硫酸链霉素，溶于10mL双蒸馏水，4℃避光保存。

10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼(DNPH)

99 mg 2, 4-二硝基苯肼用50mL 2 mol/L HCL 溶解，4℃避光保存。

2 mol/L HCL

200 g/L 三氯乙酸 (TCA)

6 mol/L 盐酸胍

无水乙醇乙酸乙酯混合应用液

将无水乙醇和乙酸乙酯按照体积比 1: 1 的比例配置成混合溶液，现用现配。

### 1.3.5.2.3 实验步骤

#### 1.3.5.2.3.1 样品处理

取 0.1g 组织，在冰的生理盐水中漂洗，以去掉表面的血迹。加入 0.9mL 的冰的 10 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH7.4)，制成 10%的匀浆。将匀浆液以 3000r/min 的转速，离心 10 min，保留上清。取 100g/L 的硫酸链霉素溶液 50μL，加入上清液 450μL (v/v,1:9)，室温放置 10 min 后，以 11000r/min 的转速，离心 10 min，取上清液待测。

#### 1.3.5.2.3.2 操作步骤

试剂	测定管	对照管
组织匀浆上清液	0.1mL	0.1mL
10 mmol/L 2, 4-二硝基苯肼	0.4mL	
2 mol/L HCL		0.4mL
涡旋混匀1分钟，37℃准确避光反应30分钟		
200 g/L 三氯乙酸	0.5mL	0.5mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL
涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
无水乙醇乙酸乙酯混合应用液	1.0mL	1.0mL

涡旋混匀1分钟，以4℃下，以12000r/min离心10min，弃上清，留沉淀		
6 mol/L 盐酸胍	1.25mL	1.25mL
混匀后，37℃准确水浴15分钟		

涡旋混匀，将全部沉淀溶解，以12000r/min离心15min，取上清液在370nm处比色，6 mol/L盐酸胍试剂调零，测定OD值。用双缩脲法测定匀浆上清液蛋白质含量。

注：如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

#### 1.3.5.2.3.3计算公式

$$\text{蛋白质羰基含量 (nmol/mgprot)} = \frac{\text{测定管OD}-\text{对照管OD}}{22 \times \text{比色光径 (cm)} \times \text{样本蛋白浓度 (mg/L)}} \times 125 \times 10^5$$

#### 1.3.5.3 注意事项

1.3.5.3.1 加入硫酸链霉素：在匀浆上清液中加入硫酸链霉素溶液的作用是沉淀核酸。核酸中的一些碱基如鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶等也含有羰基，如不除去核酸，这些碱基就会与DNPH结合，并反应生成有色物质，这些物质会增加最后溶液的吸光度，使结果偏大。

1.3.5.3.2 DHPH的溶解：DNPH不溶于水，只能溶于稀酸和稀碱等溶液，因此，用2 mol/L HCl来溶解DNPH。设对照管是为了避免HCl与反应液中一些物质反应生成对比色有影响的物质。

1.3.5.3.3 反应体系应避免光：当蛋白质溶液中加入DNPH进行反应时，反应体系需置于黑暗中，因为DNPH不稳定，见光会分解。如果反应体系遇到光，DNPH分解，体系中会有剩余的没有变成蛋白质腓衍生物，对反应比色有影响。

1.3.5.3.4 去除未与蛋白质结合的DNPH：由于DNPH在370nm左右有强烈的光吸收，因而用乙醇和乙酸乙酯混合物反复洗涤沉淀，去掉未与蛋白质结合的DNPH，否则，会增加吸光值。

### 1.3.6 抗氧化酶活力测定

SOD催化超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )生成 $H_2O_2$ ，再由其它抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶作用生成水，这样可以清除 $O_2^{\cdot-}$ 对细胞的毒害作用。SOD、GSH-Px在动物某些器官和人体血红细胞中的含量均有明显的增龄变化，酶活性与生物年龄的增长成反比。消除自由基的能力与酶活性成正比。

#### 1.3.6.1 血或组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力测定

##### 1.3.6.1.1 原理

$O_2^{\cdot-}$ 氧化羟胺的最终产物为亚硝酸盐，后者在对氨基苯磺酸及甲萘胺作用下呈现紫红色，在波长530nm处有极大吸收峰，可用分光光度法进行测定，当SOD消除 $O_2^{\cdot-}$ 后形成的亚硝酸盐减少。

##### 1.3.6.1.2 仪器与试剂

仪器 可见光分光光度计、酶标仪、离心机、恒温水浴、匀浆器

试剂 65mM 磷酸盐缓冲液(PBS) pH7.8

10mmol/L 盐酸羟胺

盐酸羟胺 6.95mg，加 PBS 至 10mL

7.5mmol/L 黄嘌呤

黄嘌呤 11.41mg，加 0.1M NaOH 2.5mL 溶解，加 PBS 至 10mL

0.2g/L 黄嘌呤氧化酶

取 10g/L 黄嘌呤氧化酶 0.2mL 加冰冷 PBS 9.8mL 至 10mL

0.1%甲萘胺

取 0.2g  $\alpha$ -甲萘胺溶于 40mL 沸蒸馏水，凉至室温加 50mL 冰醋酸，再加 110mL 凉蒸馏水至 200mL

0.33%对氨基苯磺酸

取 0.66g 对氨基苯磺酸溶于 150mL 温蒸馏水，加 50mL 冰醋酸至 200mL

SOD 标准品

三氯甲烷

95%乙醇 (v/v)

0.9%生理盐水

### 1.3.6.1.3 实验步骤

红细胞抽提液制备：10 $\mu$ L 全血冲入 0.5mL 生理盐水，2000r/min 离心 3min，弃上清，加冰冷的双蒸水 0.2mL 混匀，加入 95%乙醇 0.1mL，振荡 30s，加入三氯甲烷 0.1mL，置快速混合器抽提 1min，4000r/min 离心 3min，分层，上层为 SOD 抽提液，中层为血红蛋白沉淀物，下层为三氯甲烷，记录上清液体积待测。

组织匀浆的制备：剪取一定量的所需脏器，生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎，至玻璃匀浆器中加入冷生理盐水 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复进行三次，制成 1%组织匀浆，(最好用超声波发生器处理 30s)，使线粒体振破，以中性红-詹纳氏绿 B 染色证明线粒体已振碎。以 4000r/min 离心 5min，取上清液 20 $\mu$ L 待测。

SOD 标准抑制曲线 将 SOD 标准品用磷酸盐缓冲液配制成 750U/mL 的溶液，再稀释到 50 倍，即 SOD 量为 15U/mL (1.5 $\mu$ g/mL)，用本法测定不同量的 SOD 标准液的百分抑制率，以百分抑制率为纵坐标，以 SOD 活力单位 U/mL 为横坐标绘制标准曲线。

$$\text{SOD 百分抑制率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$$

计算每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个单位。

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{(\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}) \times 100\%}{50\% \times \frac{\text{反应液总量 (6mL)}}{\text{取液量}}} \times \text{样品稀释倍数}$$

也可用酶比活法即以每管样品的百分抑制率从 SOD 标准曲线查出相应的 SOD U/mL，乘以稀释倍数 (1mL/取样量)。

若样品为组织匀浆液，根据匀浆浓度或组织蛋白质含量，将单位换算为 U/g 组织或 U/mg 蛋白。若样品为红细胞抽提液，根据血红蛋白含量，可换算为 U/g Hb。

样品测定步骤：

试剂	测定管	对照管
1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.8 (mL)	1.0	1.0
样品	A*	

10mmol/L 盐酸羟胺 (mL)	0.1	0.1
7.5mmol/L 黄嘌呤 (mL)	0.2	0.2
0.2mg/mL 黄嘌呤氧化酶 (mL)	0.2	0.2
双蒸水 (mL)	0.49	0.49
混匀, 37°C 恒温水浴 30min		
0.33%对氨基苯磺酸 (mL)	2.0	2.0
0.1%甲萘胺 (mL)	2.0	2.0

混匀 15min 后, 倒入 1cm 光径比色杯, 以蒸馏水调零, 530nm 处比色测定 OD 值。

\* A 所用样品的量

红细胞抽提液	10 $\mu$ L
血清 (或血浆)	20—30 $\mu$ L (溶血样品剔除)
1%组织匀浆	10—40 $\mu$ L

注: 如用试剂盒, 可按试剂盒的操作要求进行。

### 1.3.6.2 血或组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定

#### 1.3.6.2.1 原理

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 是体内存在的一种含硒清除自由基和抑制自由基反应的系统。对防止体内自由基引起膜脂质过氧化特别重要, 其活力以催化 GSH 氧化的反应速度, 及单位时间内 GSH 减少的量来表示, GSH 和 5,5'-二硫对硝基苯甲酸 (DTNB) 反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子, 于 423nm 波长有最大吸收峰, 测定该离子浓度, 即可计算出 GSH 减少的量, 由于 GSH 能进行非酶反应氧化, 所以最后计算酶活力时, 必须扣除非酶反应所引起的 GSH 减少。

#### 1.3.6.2.2 试剂和仪器

仪器: 可见分光光度计、酶标仪、低温高速离心机、匀浆器、恒温水浴锅、微量加样器

试剂: 叠氮钠磷酸缓冲液 pH7.0

NaN <sub>3</sub>	16.25mg	终浓度 2.5mmol/L
EDTA-Na <sub>2</sub>	7.44mg	终浓度 0.2mmol/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.732g	终浓度 0.2mol/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.076g	终浓度 0.2mol/L

加蒸馏水至 100mL, 用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0, 4°C 保存。

1mmol/L 谷胱甘肽 (还原型 GSH) 溶液

GSH 30.7mg 加叠氮钠磷酸缓冲液至 100mL, 临用前配制, 冰冻保存 1—2 日。

1.25—1.5mmol/LH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液

取 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15—0.17mL, 用双蒸水稀释至 100mL, 作为贮备液, 4°C 避光保存, 临用前将贮备液用双蒸水稀释 10 倍即可。

偏磷酸沉淀液

HPO <sub>3</sub>	16.7g (先用蒸馏水溶解)
EDTA	0.5g

NaCl 280g

加蒸馏水至 1000mL，用普通滤纸过滤，室温保存。

0.32mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 22.7g 加蒸馏水至 500mL，室温保存。

DTNB 显色液

DTNB 40mg

柠檬酸三钠 1.0g

加蒸馏水至 100mL，4℃避光保存 1 个月。

0.2M 磷酸缓冲液 pH7.4

0.9%生理盐水

### 1.3.6.2.3 实验步骤

#### 1.3.6.2.3.1 样品制备

溶血液：取鼠血 10μL 加入到 1mL 双蒸水中，充分振摇，使之全部溶血 1:100 待测，4h 内测定酶活力。若当天来不及测定，将肝素抗凝全血置-20℃冻存，3d 内测定，若 4℃存放，28h 内必须测完。测前取出样品室温自然解冻。

组织上清液：动物禁食过夜，处死后，立即取出所需脏器，放入冷生理盐水中洗去浮血，剔除脂肪及结缔组织，滤纸吸干后，在冰浴上剪成碎块，称取适量组织，加冷 0.2M 磷酸缓冲液，以 20000r/min 匀浆 10s，间歇 30s，反复 3 次制成 5%组织匀浆，操作在冰浴中进行，匀浆以 12500×g 离心 10min（低温高速离心机），以沉淀为破碎的细胞、细胞碎片、核及线粒体，上清液用以测胞液中的酶活力，最好当天测，否则加 20% (v/v) 甘油分装于塑料管，放置-20—-80℃，可保存数周，而酶活力不减。

#### 1.3.6.2.3.2 GSH 标准曲线的制作：

取 1.0mmol/L GSH 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL，分别置于 10mL 小容器瓶中，各加入偏磷酸沉淀剂 8mL，用双蒸水稀释至 10mL 刻度，即得到浓度为 0、20、40、60、80、100μmol/L 的 GSH 标准液。

取上述不同浓度标准液各 2mL，放入试管中，加入 0.32mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5mL，比色前加入 DTNB 显色液 0.5mL 用光径 1cm 杯，5min 内在可见光 423nm 波长测 OD 值，以双蒸水调零点。

以 GSH 含量 (μmol/L) 为横坐标，OD<sub>423</sub> 值为纵坐标，绘制标准曲线。

#### 1.3.6.2.3.3 测定步骤：

试剂	样品管 (mL)	非酶管 (mL)	空白管 (mL)
1.0mmol/L GSH	0.4	0.4	
样品**	0.4		
双蒸水*		0.4	
37℃水浴预温 5min			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37℃预热)	0.2	0.2	
37℃水浴准确反应 3min (严格控制时间)			
偏磷酸沉淀液	4	4	
3000r/min 离心 10min			

离心上清液	2	2	
双蒸水			0.4
偏磷酸沉淀液			1.6
0.32mol/LNa <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	2.5	2.5
DTNB 显色液	0.5	0.5	0.5

显色反应 1min 后于 423nm 波长 (1cm 光径), 读 OD 值, 5min 之内读数准确。

\* 样品为组织上清液时, 非酶管改为加热使酶失活的组织上清液。

\*\*溶血液 0.1—0.4mL

组织上清液 1:20 稀释, 取稀释液 0.4mL

注: 如用试剂盒, 可按试剂盒的操作要求进行。

#### 1.3.6.2.3.4 计算

鼠全血 GSH-Px 活力单位 规定每 1mL 全血, 每分钟, 扣除非酶反应的 log[GSH]降低后, 使 log[GSH]降低 1 为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{鼠全血 GSH-Px 活力单位 (U/mL 全血)} &= \frac{\text{非酶管 log[GSH]} - \text{样品管 log[GSH]}}{3\text{min} \times 0.004\text{mL}} \\ &= \frac{\log[\text{非酶管 OD} - \text{空白管 OD}] - \log[\text{样品管 OD} - \text{空白管 OD}]}{3\text{min} \times 0.004\text{mL}} \end{aligned}$$

组织 GSH-Px 比活力单位 规定每毫克蛋白质, 每分钟, 扣除非酶反应, 使 GSH 浓度降低 1 $\mu$ mol/L 为一个酶活力单位。

$$\text{组织 GSH-Px 比活力单位 (U/mg 蛋白)} = \frac{(\text{非酶管 OD} - \text{样品管 OD}) \times A^{**} \times 5}{3\text{min} \times \text{样品蛋白质的 mg 数}^*}$$

\* Folin 法或双缩脲法测样品蛋白质含量

标准 GSH 浓度 ( $\mu$ mol/L)

\*\* A =  $\frac{\text{标准 GSH 浓度} (\mu\text{mol/L})}{\text{标准 GSH 光密度 (OD)}}$  即标准曲线斜率。

标准 GSH 光密度 (OD)

#### 1.3.6.2.4 注意事项

1.3.6.2.4.1 由于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 易分解导致浓度改变, 临用时取贮备液用分光光度计测其浓度, 取贮备液 3mL, 测定 1cm 光径的 240nm 处 OD 值。

$$\text{浓度 (mmol/L)} = \frac{\text{OD}}{0.036 (\text{消光系数})}$$

若 OD 值为 0.45, 则表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 12.5mmol/L。

1.3.6.2.4.2 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子的显色不仅与整个反应体系中氢离子浓度有关, 还受反应时间限制。加入显色剂后, 反应体系 pH 为 6.5 时, 11min 开始显色, 此时比色 5min 内读数准确。

### 1.3.7 抗氧化物质还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定

谷胱甘肽是一种低分子清除剂，它可清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、LOOH。谷胱甘肽是谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种三肽，是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物，是 GSH-Px 和 GST 两种酶类的底物，为这两种酶分解氢过氧化物所必需，它能稳定含巯基的酶，和防止血红蛋白及其它辅助因子受氧化损伤，缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用，GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。

### 1.3.7.1 血或组织中还原型谷胱甘肽（GSH）测定方法

#### 1.3.7.1.1 原理

GSH 和 5,5'-二硫对硝基甲酸（DTNB）反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基甲酸阴离子，于 420nm 波长有最吸收峰，测定该离子浓度，即可计算 GSH 的含量。

#### 1.3.7.1.2 仪器和试剂

仪器：可见光分光光度计、酶标仪、低温高速离心机、匀浆器、恒温水浴锅、微量加样器

试剂：0.9%生理盐水

4%磺基水杨酸溶液

0.1mol/L PBS 溶液（pH=8.0）：

称取 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.452g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.722g，加蒸馏水至 1000mL。

0.004%DTNB 溶液：

称取 DTNB 40mg 溶于 1000mL 的 0.1mol/L PBS 溶液（pH=8.0）中。

叠氮钠缓冲液：

NaN<sub>3</sub> 16.25 mg

EDTA-Na<sub>2</sub> 7.44 mg

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.732 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.076 g

加蒸馏水至 1000mL，用少量 HCl、NaOH 调 pH7.0，4℃ 保存。

标准溶液：称取还原型 GSH 15.4mg，加叠氮钠缓冲液至 50mL，终浓度为 1mmol/L，临用前配制。

#### 1.3.7.1.3 实验步骤

##### 1.3.7.1.3.1 样品制备：

溶血液上清液：取 0.1mL 抗凝全血加双蒸水 0.9mL（1：9 溶血液），充分混匀，直至透亮为止。取溶血液 0.5mL 加 4%磺基水杨酸 0.5mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

血清上清液：取 0.1mL 血清加 4%磺基水杨酸 0.1mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

组织上清液：取组织 0.5g 加生理盐水 4.5mL 充分研磨成细浆（10%肝匀浆），混匀后取浆液 0.5mL 加 4%磺基水杨酸 0.5mL 混匀，室温下 3500rpm 离心 10 分钟，取上清液备用。

##### 1.3.7.1.3.2 样品测定：

溶血液或组织样品测定：

	测定管	空白管
上清液	0.5mL	—
4%磺基水杨酸	—	0.5mL
DTNB	4.5mL	4.5mL

混匀，室温放置 10 分钟后，420nm 处测定吸光度。

血清样品测定：

	测定管	空白管
上清液	0.1mL	—
4%磺基水杨酸	—	0.1mL
DTNB	0.9mL	0.9mL

混匀，室温放置 10 分钟后，420nm 处测定吸光度。

注：该指标检测，需新鲜样品取材后当天完成。用双缩脲法测定血清（或溶血液）、组织匀浆蛋白质含量。如用试剂盒，可按试剂盒的操作要求进行。

#### 1.3.7.1.3.3 标准曲线

取 1mmol/L GSH 标准溶液 0、10、20、50、100、150、200 $\mu$ L，分别加入生理盐水至 0.5mL，即得到 0、20、40、100、200、300、400 $\mu$ mol/L 的 GSH 标准液系列，各管加入 DTNB4.5mL，混匀，室温放置 10 分钟后，空白管调零，420nm 处测定吸光度。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，做标准曲线。

	1	2	3	4	5	6	7
1mmol/L GSH (mL)	0	0.01	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
生理盐水 (mL)	0.50	0.49	0.48	0.45	0.40	0.35	0.30
DTNB (mL)	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
GSH 量 ( $\mu$ mol/L)	0	20	40	100	200	300	400

#### 1.3.7.1.3.4 计算

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times$  溶血液稀释倍数  $\times$  上清液稀释倍数  
 ( $\mu$ mol/L 全血) = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times 10 \times 2$

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times$  上清液稀释倍数  
 ( $\mu$ mol/L 血清) = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times 2$

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times$  上清液稀释倍数  $\div$  上清液组织含量  
 ( $\mu$ mol/g 组织) = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times 2 \div 100g$  组织/L

样品 GSH 含量 = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times$  上清液稀释倍数  $\div$  上清液蛋白含量  
 ( $\mu$ mol/gprot) = 对应曲线浓度值 ( $\mu$ mol/L)  $\times 2 \div$  匀浆 gprot/L

## 1.4 数据处理与结果判定

### 1.4.1 数据处理

一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算  $F$  值， $F$  值  $< F_{0.05}$ ，结论：

各组均数间差异无显著性； $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

## 1.4.2 指标判定

### 1.4.2.1 脂质氧化产物

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，过氧化脂质（丙二醛或 8-表氢氧-异前列腺素）含量降低有统计学意义，判定该受试样品有降低脂质过氧化作用，该项指标结果阳性。

### 1.4.2.2 蛋白质氧化产物

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，蛋白质羰基含量降低有统计学意义，判定该受试样品有降低蛋白质过氧化作用，该项指标结果阳性。

### 1.4.2.3 抗氧化酶活力

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，抗氧化酶（SOD 或 GSH-Px）活力升高有统计学意义，判定该受试样品有升高抗氧化酶活力作用，该项指标结果阳性。

### 1.4.2.4 抗氧化物质 GSH

受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，GSH 含量升高有统计学意义，判定该受试样品有升高抗氧化物质 GSH 作用，该项指标结果阳性。

## 1.4.3 结果判定

过氧化脂质含量、蛋白质羰基、抗氧化酶活性、还原型谷胱甘肽四项指标中三项指标阳性，可判定该受试样品有助于抗氧化动物实验结果阳性。

## 2 人体试食试验

### 2.1 受试者纳入标准

选年龄在 18—65 岁，身体健康状况良好，无明显脑、心、肝、肺、肾、血液疾患，无长期服药史，志愿受试保证配合的人群。

### 2.2 排除受试者标准

2.2.1 妊娠或哺乳期妇女，对保健食品过敏者。

2.2.2 合并有心、肝、肾和造血系统等严重疾病患者。

2.2.3 短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断者。

2.2.4 不符合纳入标准，未按规定食用受试样品，无法判定功效或资料不全影响功效或安全性判断者。

### 2.3 受试者分组

对受试者按 MDA、SOD、GSH-Px 水平随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、生活饮食习惯等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

### 2.4 试验方法