

通过检测小鼠体内羟自由基含量评价 保健食品的抗氧化功能

文 镜, 张 西, 常 平

(北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 建立一种评价保健食品在体内抗氧化功能的检测方法。通过研究羟自由基捕获剂的给药方式、捕获时间、小鼠的敏感组织、组织样品的前处理方法及色谱分离检测条件, 优化得到一种检测方法: 即采用 10 月龄以上的老龄健康小鼠, 设保健食品剂量组和对照组, 每组 10~15 只, 经口给予受试物 50d 后, 尾静脉注射水杨酸钠捕获体内羟自由基, 反应 60min 后处死动物, 取肝组织经高效液相色谱仪和紫外检测器分离、检测由水杨酸捕获羟自由基后产生的 2, 3-二羟基苯甲酸或 2, 5-二羟基苯甲酸。采用方差分析对实验组及对照组的检测结果进行比较, 由此判定该保健食品是否具有清除体内羟自由基的功能。通过口服 VC 的实验, 证实了本方法的可行性。

关键词: 抗氧化保健食品; 功能评价方法; 羟自由基; 水杨酸捕获法

Antioxidant Ability Evaluation of Functional Food by Detecting Hydroxyl Free Radical Level in Mice

WEN Jing, ZHANG Xi, CHANG Ping

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: An optimum detecting method *in vivo* was constructed for evaluating antioxidant ability of functional food. A proper condition was selected by investigating several factors as follows: given modes of hydroxyl radicals trapping agent (salicylic acid), measurement of trapping time period, sensitive drug responded tissue, extraction method of a variety tissue samples, and HPLC separation condition. The experiment was carried out in healthy mice age > 10 months. The mice were divided randomly into 2 groups, 10~15 mice for each group. Fed one group with functional food, and the other as control. After 50 days of oral administration for functional food, salicylic acid was injected into the mice tail vein. 60 minutes later, animals were decapitated and liver was rapidly dissected. Hydroxyl free radical level was quantified by measuring the hydroxylation products. 2, 3- and 2, 5-dihydroxybenzoic acids (DHBA) formed as a result of the reaction between $\cdot\text{OH}$ and salicylate. Then, DHBA and salicylate concentrations were determined using RP-HPLC with UV detection. Compared data from the 2 groups, to determine the antioxidant ability of the functional food. In addition, experiment of oral administration of vitamin C in mice proved the feasibility of this method.

Key words antioxidant functional food evaluation method for function food hydroxyl radicals salicylic acid trapping
中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2008)01-0286-06

自由基在生命体内的作用是具有双重性的。一方面, 自由基生成的合理性在于其是机体免疫系统中针对免疫原的不可缺的防御手段。另一方面, 自由基清除能力下降、或过量产生可促进机体衰老, 引起诱发突变, 它所造成的机体氧化性损伤会直接或间接引起多种疾病^[1-4]。鉴于自由基这种双刃剑作用, 深入研究“自由基与衰老”、“自由基的调控与平衡”等机理, 显然对于防止氧化损伤, 改善人体免疫系统功能、延缓衰老, 具有重要的意义。

当机体的抗氧化功能衰减, 或体内细胞损伤时, 就会生成过多的自由基, 在各种活性氧自由基中, 羟自由基的反映活性最强(10⁷~10¹⁰M⁻¹S⁻¹), 对机体的危害最大, 因为羟自由基($\cdot\text{OH}$)是仅次于 F⁻的强氧化剂, 几乎可以和所有的细胞组分反应, 故检测体内外羟自由基方法学的建立具有重要意义, 其不仅有助于深入研究自由基损伤的致病机理, 还可用于筛选、评价具有清除羟自由基能力的保健食品。

自由基检测技术的成熟带动了与其相关的科研工作

收稿日期: 2007-10-25

作者简介: 文镜(1952-), 男, 教授, 主要从事保健食品功能机理评价和方法学研究。E-mail: wenjing@ygi.edu.cn

的深入开展和发展。从二十世纪80、90年代开始兴起的羟自由基($\cdot\text{OH}$)检测法^[5-14],逐渐加深了我们从生理学、病理学的角度对 $\cdot\text{OH}$ 的认识,以多种检测方法为模型,应用于分析评价、筛选具有清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的天然抗氧化物质的工作正在逐渐开展起来,然而大量工作仍集中在评价抗氧化能力的体外研究上。

由于生物体内环境复杂, $\cdot\text{OH}$ 在生物体内寿命短且含量低,难以直接对其检测。通过定量分析 $\cdot\text{OH}$ 与捕获剂生成相对稳定的产物或复合物,可间接推知 $\cdot\text{OH}$ 含量。近年来发展了捕获 $\cdot\text{OH}$ 后用LC-UV/ED/MS检测的方法,即检测体内 $\cdot\text{OH}$ 含量的方法^[5-9]。其中定量分析体内 $\cdot\text{OH}$ 最为有效的技术是:用水杨酸捕获 $\cdot\text{OH}$,生成在体内稳定、不易被代谢、不经由内源性途径产生的羟化衍生物——二羟基苯甲酸(DHBAs),其生成的2,3-DHBA和2,5-DHBA经HPLC-ED分离、定量分析,间接推知体内待测组织中的 $\cdot\text{OH}$ 的含量,若与微透析等技术联用,还可得到待测组织中 $\cdot\text{OH}$ 生成的动态变化^[5-9]。

本研究建立了用水杨酸捕获小鼠体内 $\cdot\text{OH}$,用HPLC-UV检测器分离检测 $\cdot\text{OH}$ 与水杨酸特异反应的产物2,3-DHBA和2,5-DHBA的含量的方法,从而评价保健食品抗氧化功能的检测方法。探索了捕获剂的给药方式、小鼠的敏感组织、组织样品的前处理方法及色谱分离检测条件。并对由此得出的通过检测小鼠体内 $\cdot\text{OH}$ 含量评价抗氧化保健食品的检测方法的可行性进行了实验验证。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

6月龄(体重30~50g)和11月龄昆明种雌性小鼠购自军事科学院动物所。所有实验动物均在SPF级动物房喂养。

2,3-二羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸 Sigma公司;甲醇为国产色谱纯;水杨酸钠;高氯酸;乙酸乙酯;VC为国产分析纯;实验用水为去离子超纯水。

HPLC系统(配有110B溶液输送系统、166紫外检测器、406数据交换器和Gold软件系统) 贝克曼公司;AE-100型电子天平 梅特勒-托利多仪器公司;KQ-100型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;低温冰箱;UV-2450分光光度计 SHIMADZU;微量注射器;滤膜(0.22 μm)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250mm \times 4.6mm 5 μm);流动相: 30mmol/L醋酸钠:30mmol/L柠檬酸:甲醇(2:2:1, V/V/V); pH3.6;柱温: 室温;流速: 1ml/min; UV

检测器: 305nm;进样量: 20 μl 。

1.2.2 标准溶液配制

精确称取2,3-二羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸各3mg,分别定容至50ml,用流动相溶解,各配成60 $\mu\text{g/ml}$ (0.06mg/ml)的标准品,置-20℃冰箱避光保存。

1.2.3 小鼠肝组织样品的制备和DHBA定量分析

6月龄小鼠随机分成5组(n=8),以小鼠体重的0.5%作为水杨酸钠(60mg/ml, i.p.)注射量进行尾静脉注射,分别于5、15、35、60、90min颈椎脱臼处死小鼠,从而确定水杨酸在体内捕获 $\cdot\text{OH}$ 含量与捕获时间的关系。迅速将处死小鼠置于冰盘上,取出同一部位肝脏0.3g,于0.1mol/L, 3ml高氯酸中匀浆(冰水浴)。4℃, 10000 \times g离心10min。取上清液,0.22 μm 滤膜过滤,置-20℃冰箱避光保存。分析样品前,先进样20 μl 标准2,3-DHBA和2,5-DHBA,确定2,3-DHBA和2,5-DHBA的出峰时间。根据色谱结果用GOLD软件对样品出峰时间和峰面积进行分析,用Excel软件进行统计检验。

1.2.4 水杨酸钠给药方式的选择

6月龄小鼠10只,随机分为两组(n=8)。以小鼠体重的0.5%作为水杨酸钠(60mg/ml, i.p.)注射量进行注射:一组用腹腔注射法给药,一组用尾静脉注射法给药。注射60min后处死小鼠,取肝组织,后续步骤同1.2.3。

1.2.5 实验动物不同组织的选择

6月龄小鼠30只,随机分为3组(n=10)。以小鼠体重的0.5%作为水杨酸钠(60mg/ml, i.p.)注射量进行尾静脉注射,反应60min后用颈椎脱臼法处死小鼠,迅速置于冰盘上取出组织,根据分组不同,分别取出肝脏,脑和心脏三种组织。后续步骤同1.2.3。

1.2.6 方法的回收率

6月龄小鼠10只,随机分为两组(n=8)。处理组的小鼠注射水杨酸钠,空白组的小鼠不注射水杨酸钠,平行操作,60min后颈椎脱臼处死。注射水杨酸钠的处理组小鼠取0.6g肝脏,加6ml高氯酸匀浆,肝匀浆液分成两份,其中一份加0.3ml标准DHBAs,即加标处理组;另一份匀浆液加入0.3ml去离子水,即为加水处理组,继续匀浆,后续操作同1.2.3;不注射水杨酸钠的空白组取0.3g肝脏,加3ml高氯酸、0.3ml标准DHBAs,即为加标空白组,继续匀浆,后续操作同1.2.3。

$$\text{本实验方法的回收率} = \frac{\text{加标处理组的色谱峰面积} - \text{加水处理组色谱峰面积}}{\text{加标空白组色谱峰面积}} \times 100\%$$

1.2.7 方法可行性的检测

采用上述实验探索的最佳实验条件,用VC溶液为

受试物, 检验方法的可行性。

1.2.7.1 动物分组及喂养

11月龄小鼠24只, 随机分为两组($n=12$)。一组灌胃VC作为受试物(简称VC组), 一组灌胃白水作对照(简称白水组)。每日灌胃量为: $0.2\text{ml}/10\text{g}$ 鼠重。VC组灌胃 $6\text{mg}/\text{ml}$ 的VC, 白水组灌胃蒸馏水。所有动物在 SPF 级动物房中喂养 50d。

1.2.7.2 实验方法

动物实验同 1.2.3。用 GOLD 系统计算 2,3-/2,5-DHBA 和水杨酸的峰面积, 最后用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 DHBA 最佳检测波长的选择

紫外分光光度计对 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 标样扫描, 扫描波长为 $200\sim 500\text{nm}$ (图 1)。由此可知, 2,3-DHBA 的最大吸收波长为 305nm 。目前认为 2,3-DHBA 的含量能较特异地反应体内 $\cdot\text{OH}$ 的含量^[15], 与 Tmoya 等用的 315nm 相比^[16], 305nm 检测 2,3-DHBA 的灵敏度更高, 利于定量分析待测样本中含量非常少的 2,3-DHBA。实验表明(图 2), 305nm 虽然不是 2,5-DHBA 和水杨酸的最大吸收波长, 但由于待检样本中 2,5-DHBA 和水杨酸的含量较高, 该波长下 2,5-DHBA 和水杨酸的检出量远大于 2,3-DHBA, 即使不是这两种样本的最大吸收波长, 检出的峰面积所受影响不大, 故本实验选用 305nm 作为 DHBA 的最佳检测波长。经实验检验, 305nm 成功的定量分析了 Tmoya 等用 315nm 未量化出的 2,3-DHBA。在所选的流动相条件下, 2,5-DHBA、2,3-DHBA 先后于 $8\sim 12\text{min}$ 之间出峰, 没有重叠现象。

2.2 测定 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的标准曲线和最低检

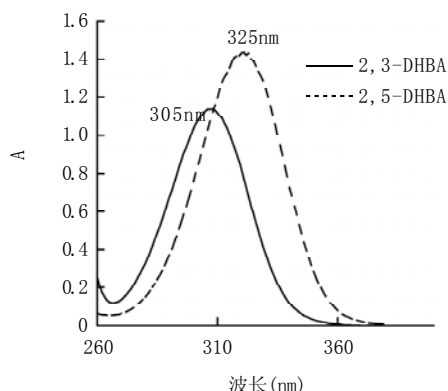


图1 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 标准品 DAD 全波段扫描
Fig.1 DAD whole wavelength scan of standard solution of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA

测定

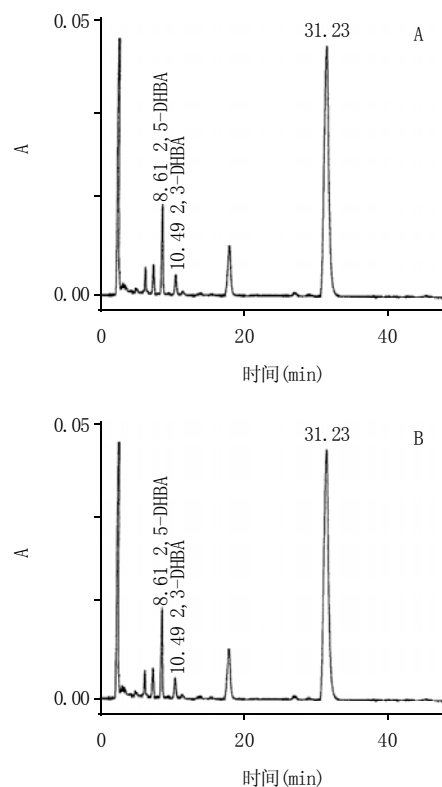


图2 305nm 检测 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 标准品和水杨酸标准品的色谱图(A)和 305nm 检测小鼠肝脏匀浆液中 2,3-/2,5-DHBA 和水杨酸的色谱图(B)

Fig.2 Chromatogram of standard solution of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA and salicylic acid(A) and detect 2,3-DHBA and 2,5-DHBA and salicylic acid in homogenized mouse liver at 305nm wavelength

先测定 HPLC 系统噪声。连续进样流动相 10 次, 在色谱图 $5\sim 15\text{min}$ 区间内找到最大峰高即为仪器系统造成的噪声值。用 HPLC 实测 $0.00001\text{mg}/\text{ml}$ DHBA 标准溶液进样 $20\mu\text{l}$ 峰高值略高于两倍噪声数值, 在本实验条件下, 测定 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的最低检测浓度为 $10\text{ng}/\text{ml}$ 。最低检测量为 2pg 。

以流动相为溶剂配制浓度为 0.003 、 0.0015 、 0.001 、 0.0003 、 0.00015 、 $0.00006\text{mg}/\text{ml}$ 的 2,3-/2,5DHBA 标准溶液, 进样 $20\mu\text{l}$, 并重复五次, 取平均值, 以检测浓度为横坐标, DHBA 峰面积为纵坐标绘制标准曲线(图 3)。

2,3-DHBA 标准曲线: $y=3969.2x+0.0237$ ($R^2=0.9999$);

2,5-DHBA 标准曲线: $y=4990.5x+0.112$ ($R^2=0.9995$)。

2.3 测定 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的准确度与精密度

分别取浓度为 $0.3 \times 10^{-5}\text{g}/\text{L}$ 的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 标准品进样 $20\mu\text{l}$, 连续进样测定, 用 Excel 软件计算变异系数。

$20\mu\text{l}$ $0.3 \times 10^{-5}\text{g}/\text{L}$ (600ng) 的 2,3-DHBA 进样后峰面积: 1.2066 ± 0.01325 ($n=5$), 变异系数 2.20%; $20\mu\text{l}$ $0.3 \times 10^{-5}\text{g}/\text{L}$ (600ng) 的 2,5-DHBA 进样后峰面积: 1.2176

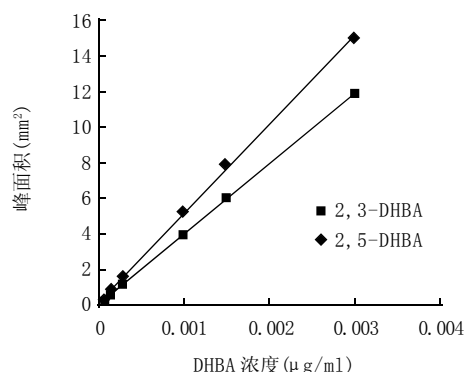


图3 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 标准品浓度范围在 0.003~0.00006mg/ml 之间的标准曲线

Fig.3 Standard curve of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA in concentration range from 0.003 to 0.00006 mg/ml

表1 测定 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的准确度与精密度
Table 1 Detecting accuracy and precision of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA

测定次数	2, 3-DHBA 峰面积 (0.3×10^{-5} g/L)	2, 5-DHBA 峰面积 (0.3×10^{-5} g/L)
1	1.216	1.200
2	1.190	1.218
3	1.169	1.224
4	1.195	1.222
5	1.264	1.224

± 0.00352 (n=5), 变异系数 0.60%。

2.4 水杨酸捕获体内·OH 时间的比较

本实验中采用比例 Q ($Q = \text{DHBA s} / \text{水杨酸}$) 表示体内·OH 的含量。Hall 等研究表示^[17], 体内 2,3-DHBA 或 2,5-DHBA 的生成量随水杨酸剂量的增加而增加。由于个体差异, 水杨酸的分布和浓度可能会在不同组织间有所差异, 从而造成组织间 DHBA s 的绝对生成量差异较大, 因此, 用 DHBA s / 水杨酸的比值表示体内·OH 的含量比用 DHBA s 的绝对生成量更准确。

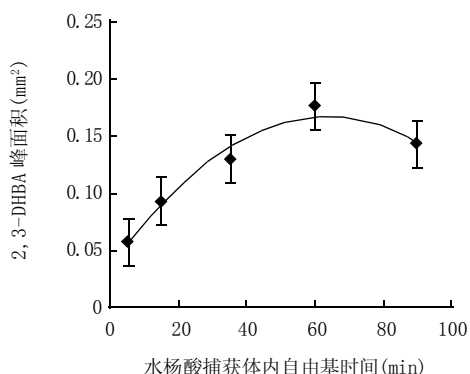


图4 水杨酸捕获小鼠体内·OH 的量与捕获时间的关系

Fig.4 Correlation curve of SA capturing ·OH ability VS capturing time in vivo

从图4可见, 水杨酸捕获的体内羟自由基从 0~

60min 不断增加, 从 60min 开始, 对体内羟自由基的捕获达到平台期。因此, 在评价保健食品抗氧化功能的体内研究中, 宜选择注射水杨酸后 60min 作为处死小鼠取组织的时间点。

2.5 水杨酸给药方式的选择

在相同的注射剂量, 相同的处死时间, 平行操作的条件下, 比较两种注射方法, 从色谱结果来看, 尾静脉注射组小鼠肝脏中检测到的 Q 值较大, 这可能是因为药进入到肝组织途径不同, 造成到达肝脏的速度不同, 水杨酸通过尾静脉注射经由血液循环可快速到达肝脏。因此, 实验选取尾静脉注射作为小鼠给药方式。

2.6 实验用动物组织的选择

设 $Q1 = 2,3\text{-DHBA} / \text{水杨酸}$; $Q2 = 2,5\text{-DHBA} / \text{水杨酸}$ 。

选取小鼠肝脏, 脑和心脏三个组织作为研究对象, 经同步操作后得出: 三种组织中 Q1 和 Q2 最高的皆为肝组织。这可能是因为肝脏是机体代谢集中的场所, 比其他组织更易储积代谢产物。为保证实验的灵敏性和显著性, 本次实验选取肝脏作为实验用动物组织。

值得注意的是, 以 2,3-DHBA 作为标示物时, 肝组织和脑组织中的 Q1 差异不大, 但以 2,5-DHBA 作为标示物时, 肝组织和脑组织中的 Q2 差异很大, Halliwell 等^[18]报道, 2,5-DHBA 除来自于水杨酸羟化反应外, 还可由肝脏微粒体的氧化酶 P450 系统 (microsomal cytochrome P450 oxidation) 产生, 即 2,5-DHBA 的生成途径并不专一, 不能特异地代表·OH 在体内的含量, 所以在一些研究自由基损伤的工作中为慎重起见, 仅以 2,3-DHBA 的含量作为结论的唯一指标。另有研究表明^[19], 氧化酶 P450 对脑组织中 2,5-DHBA 的含量影响很小, 可用 2,5-DHBA 评价脑组织·OH 含量。

表2 各组织中 DHBA/水杨酸的比值
Table 2 Ratio of DHBA/SA in different tissues

实验组织	例数(n)	Q1=2,3-DHBA/SA ($\bar{X} \pm SD$)	Q2=2,5-DHBA/SA ($\bar{X} \pm SD$)
肝脏	10	2.34 ± 0.458	10.272 ± 0.967
脑	10	2.06 ± 0.337	6.967 ± 0.594
心脏	10	0.97 ± 0.280	7.823 ± 0.834

2.7 回收率实验

经八次重复测定, 本实验中 2,3-DHBA 平均回收率为 $0.95\% \pm 0.02\%$, 2,5-DHBA 平均回收率为 $0.92\% \pm 0.02\%$ 。

2.8 方法可行性验证

通过上述各项实验结果可以总结出通过检测小鼠体内·OH 含量评价保健食品抗氧化功能的实验方法: 采用 10 月龄以上的老龄健康小鼠, 设保健食品剂量组 and 对照组, 每组 10~15 只, 经口给予受试物 50d 后, 尾静脉注射水杨酸钠捕获体内羟自由基, 反应 60min 后处死动物, 取肝组织经高效液相色谱仪和紫外检测器分离、

检测由水杨酸捕获羟自由基后产生的 2, 3-二羟基苯甲酸或 2, 5-二羟基苯甲酸。用方差分析的方法对实验组及对照组的检测结果进行比较, 由此判定该保健食品是否具有清除体内羟自由基的功能。

VC 作为天然的自由基清除剂, 可以猝灭体内自由基^[20-21], 因此择其对实验中建立的方法进行可行性验证, 实验结果如表 3 所示。

表 3 VC 对小鼠体内肝组织中羟自由基的影响

Table 3 Effects of vitamin C on hydroxyl radicals in mouse liver tissue

动物分组	例数(n)	2, 5-DHBA/ 水杨酸 ($\bar{X} \pm SD$)	2, 3-DHBA/ 水杨酸 ($\bar{X} \pm SD$)
白水	10	0.0792 \pm 0.0162	0.00234 \pm 0.00046
VC	10	0.0595 \pm 0.0070*	0.00162 \pm 0.00043**

注: *VC 组和白水组有显著性差异 ($p < 0.05$); **VC 组和白水组有特别显著性差异 ($p < 0.01$)。

由表 3 中的结果可以看出, 在本检测方法的条件下, 能够将 VC 在小鼠体内清除羟自由基的情况客观地反映出来。证明用本方法评价评价保健食品清除体内羟自由基作用是行之有效的。

3 讨论

1984 年, Floyd 等^[7]首次用 HPLC-ED 定量定性分析了水杨酸捕获的 $\cdot OH$, 检出限小于 1 pmol 。自此, HPLC-ED 法成为了最重要的一种检测 $\cdot OH$ 量的方法。1996 年, Ste-Marie 等^[13]用 HPLC-ED 检测尾静脉注射 4-HBA (4-羟基苯甲酸) 的大鼠纹状体的 $\cdot OH$, 检出限为 20 fmol 。1997 年 McCabe 等^[14]用双电极电化学检测器与 HPLC 联用检测尾静脉注射水杨酸盐捕获大鼠的脑、肝、肾中的 $\cdot OH$, 检出限为 1 pg , 由于单一电极检测 2, 3-DHBA 和 2, 5-DHBA 时, 无法在相等电极条件下同步检测出水杨酸, 该法的应用使得对体内 $\cdot OH$ 的定量分析更加可信, 减少了操作误差。2000 年 Caudray 等^[15]用 HPLC-ED 法检测服用乙酰水杨酸(阿司匹林)的人体血浆样本中的 $\cdot OH$, 检出限小于 1 pmol 。上述实验中均使用电化学检测器。尽管电化学检测器比紫外检测器灵敏度高, 但在国内其普及率低, 除了具有对实验条件要求苛刻, 调试设备时间长等不足, 还存在难以同步分析多种待测物的局限性, 如 DHBA 和水杨酸的在定量分析过程中, 由于浓度差异过大, 不得不分成两步完成检测^[14], 这就增大了误差, 影响实验结果。当然, 双电极电化学检测法可以克服此缺点, 但设备十分昂贵。而紫外检测器在国内普及率高, 操作简单、省时, 尽管灵敏度不如电化学检测器, 但在保健食品的抗氧化功能评价中, 采用动物组织为检测样品, 通过优化检测条件, 完全可以对样品中的 $\cdot OH$ 进行定量

分析。本研究所介绍的实验方法本着简化操作、省时高效、节约成本的设计理念, 对 Tmoya 等的方法加以改造, 用 UV 检测法代替电化学检测法, 成功地完成了保健食品清除羟自由基的体内检测。

在研究生物的自由基损伤时, 要求待测的 $\cdot OH$ 来源于形成氧化损伤的局部组织, 这就需要尽可能的避免其他非特异性途径产生的 DHBA 的干扰, 以保证结果更加真实可信, 因为 2, 5-DHBA 不仅仅通过 $\cdot OH$ 攻击形成, 还可经由肝组织中的 P450 酶催化水杨酸生成, 所以很多研究中仅参考特异的 2, 3-DHBA 的生成量, 而不采用非特异 2, 5-DHBA。但是, 在评价抗氧化保健食品清除体内 $\cdot OH$ 效果的研究中, 检测目的是观察受试物的动物模型组与对照组之间体内 $\cdot OH$ 含量的差异, 是一种相对比较的方法, 在这样的条件下, 受试组与对照组的动物体内生成 2, 5-DHBA 的差异主要来源于这两组体内 $\cdot OH$ 生成量的变化, P450 酶催化生成的 2, 5-DHBA 的量相当于背景浓度, 在比较差异时可以忽略。因此, 在评价抗氧化保健食品的体内实验中, 2, 5-DHBA 也可以作为标示物, 分析体内 $\cdot OH$ 含量, 比较动物体内生成 $\cdot OH$ 的差异, 达到评价抗氧化物质清除体内 $\cdot OH$ 效果的目的。另外值得注意的是, 当样品中 2, 3-DHBA 浓度很低时可以采用浓缩法, 即增加待测样本浓度后再测定。

参考文献:

- [1] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Free radicals biology and medicine[M]. 2ed. Oxford: Clarendon Press, 1989: 30-55.
- [2] GUTTERIDGE J M C. Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence[J]. Free Rad Res Commun, 1993, 19: 141-58.
- [3] HONDA K, CASADESUS G, PETERSEN R B, et al. Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer's disease[J]. Ann NY Acad Sci, 2004, 1012: 179-182.
- [4] WICKENS P A. Ageing and the free radical theory[J]. Resp Phys, 2001, 128: 379-391.
- [5] SLOOT W N, GRAMSBERGEN J B P. Detection of salicylate and its hydroxylated adducts 2, 3- and 2, 5-dihydroxybenzoic acids as possible inducers for *in vivo* hydroxyl radical formation in combination with catechol and indoleamines and their metabolites in cerebrospinal fluid and brain tissue[J]. J Neurosci Meth, 1995, 60: 141-149.
- [6] FLOYD R A, HENDERSON R, WATSON J J, et al. Use of salicylate with high pressure liquid chromatography and electrochemical detection (LCED) as a sensitive measure of hydroxyl free radicals in adriamycin treated rats[J]. Free Radic Biol Med, 1986(2): 13-18.
- [7] FLOYD R A, WATSON J J, WONG P K. Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high-pressure liquid chromatography and electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products

- [J]. J Biochem Biophys Meth, 1984(10): 221-235.
- [8] GROOTVELD M, HALLIWELL B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation *in vivo*[J]. J Biochem, 1986, 237: 499-504.
- [9] ZINI I, TOMASI A, GRIMALDI R. Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis[J]. Neurosci Lett, 1992, 138: 279-282.
- [10] HOLLEY A E, CHEESEMAN K H. Measuring free radical reactions *in vivo*[J]. Br Med Bull, 1993, 49(3): 494-505.
- [11] TAKEMURA G, ONODERA T, ASHRAF M. Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after graded ischemia in rat hearts[J]. Circ Res, 1992, 71(1): 96-105.
- [12] POU S, COHEN S M, BRITIGAN B E, et al. Spin-trapping and human neutrophils: limits of detection of hydroxyl radical[J]. J Biol Chem, 1989, 264(21): 12299-12302.
- [13] STE-MARIE L, MONTGOMERY J. Evaluation of sodium 4-hydroxybenzoate as an hydroxyl radical trap using gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Anal Biochem, 1996, 241(1): 67-74.
- [14] MCCABE D R, MAHER T J, ACWORTH I N. Improved method for the estimation of hydroxyl free radical levels *in vivo* based on liquid chromatograph with electrochemical detection[J]. J Chromatogr B, 1997, 691: 23-32.
- [15] COUDRAY C, FAVIER A. Determination of salicylate hydroxylation products as an *in vivo* oxidative stress marker[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(11): 1064-1070.
- [16] ONODERA T, ASHRAF M. Detection of hydroxyl radicals in the post-ischemic reperfused heart using salicylate as a trapping agent[J]. J Mol Cell Cardiol, 1991, 23: 365-370.
- [17] HALL E D, ANDRUS P K, ALTHAUS J S, et al. Hydroxyl radical production and lipid peroxidation parallels selective post-ischemic vulnerability in gerbil brain[J]. J Neurosci Res, 1993, 34: 107-112.
- [18] HALLIWELL B, KAUR H, INQELMAN-SUNDBERQ M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note[J]. Free Radic Biol Med, 1991, 10: 439-441.
- [19] WARNER M, STROMSTEDT M, WYSS A, et al. Regulation of cytochrome P450 in the central nervous system[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993, 47(1-6): 191-194.
- [20] AMES B N, GOLD L S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer[J]. Mutation Res, 1991, 250: 3-16.
- [21] ANDREW P O. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action[J]. Mutation Research, 1997, 386: 39-67.