

紫外分光光度法测定抗氧化精华液自由基清除率

UV-098

摘要：3-氧代-2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧 (PTIO·) 自由基具有测量简单且直接、干扰小、无立体选择性等优点，已经成为 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH[·]) 的取代测试方法。使用 PTIO 模拟体内形成的自由基，建立体外抗氧化精华清除自由基效率模型，对抗氧化精华的功效性进行评价。

关键词：PTIO· 氧自由基 抗氧化 紫外分光光度法

技术特点：

- ❖ 使用 PTIO 作为氧自由基生成剂代替 DPPH，更贴近自然真实情况。
- ❖ 使用分光光度法对化妆品抗氧化净化液的抗氧化性能进行快速评价，简单方便。

皮肤是人体的最大器官，坚韧柔软覆盖全身，使机体各个器官免收机械性、物理性、化学性和生物因素的侵扰。当外在环境发生变化，例如光辐射、热辐射、化学侵蚀等因素，一些化合物的共价键发生断裂，进而形成不成对电子的基团，即皮肤自由基。在皮肤自由基的作用下，胶原蛋白会发生反应，导致皮肤无法得到足够的营养供给，导致皮肤组织活力下降，失去弹性，产生皱纹，引起皮肤老化和肤色暗沉等情况。随着年龄增长皮肤自由基增多，自由基腐蚀体内蛋白细胞和脂肪细胞的程度也会逐渐加深，导致黑色素积累增加，进而导致色斑的缓慢形成。

皮肤中的自由基存在两类，即氧自由基和脂类自

由基。皮肤上常见的氧自由基有羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、单线态氧；常见脂类自由基如脂氧基 ($\text{RO}\cdot$) 和脂过氧基 ($\text{ROO}\cdot$)。但不论是哪一种皆为氧类自由基，而此前通常作为皮肤中自由基的模拟试剂使用的 DPPH[·] 和 ABTS^{·+} 皆为 N 自由基试剂，因此存在一定差异。

PTIO· 自由基是以氧为中心的自由基模型，具有测量简单且直接、干扰小、无立体选择性等优点，已经成为 DPPH[·] 的取代测试方法。本文选择 PTIO· 作为氧自由基生成模拟试剂，对市售的抗氧化精华进行功效性评价，该方法简单方便，可广泛应用于抵抗氧自由基类产品的性能评价。

■ 实验部分

1.1 仪器

UV-2700i

1.2 测试条件

波长范围：200 nm~800 nm

检测波长：557 nm

测定模式：吸光度

狭缝宽：2 nm

采样间隔：1.0 nm

1.3 试剂及样品

3-氧代-2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧 (PTIO)、纯净水、市售抗氧化精华液

1.4 PTIO· 测试液

取 PTIO 固体 180 mg，溶于 1200 mL 蒸馏水中，超声 5 min，混合均匀，得 PTIO 测试液。

1.5 样品液

取市售抗氧化精华液，以蒸馏水做溶剂，配制成 1 mg/mL 浓度的溶液，超声直至完全溶解。

1.6 预实验

取 1.4 项下 PTIO 测试液 800 μL ，向其中加入少量 1.5 项下样品液，少量多次，观察溶液褪色情况，不能立即褪色的样本进行 37°C 水浴 2 小时后再继续观测。当溶液颜色基本退去时，记录样本的加样量。

1.7 吸光度测定

1.7.1 初始值测定

取 PTIO 测试液 9.5 mL 于试管中，加入 2.5 mL 蒸馏水，在 557 nm 处测定吸光度，即得初始值 A_0 ， A_0 确保在 0.2~0.6 之间，以免 PTIO 测试液浓度过高或过低导致清除率变化不明显。若吸光度不在此区间，可适当调整稀释比例。

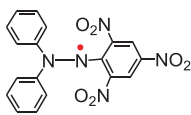
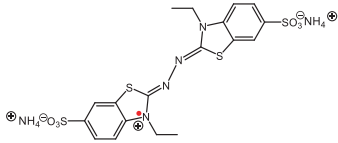
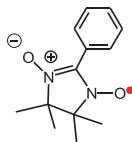
1.7.2 测试值测定

根据 1.6 项下所测试结果，协调各个样本将所得体积按照等差数列分成 5 组，分别加入测试液中，并使用蒸馏水补足相差体积，于 37°C 下水浴 30 分钟或更久，冷却至常温后，测定各个样本 557 nm 处吸光度值，每样本平行测试 3 次。

■ 结果与讨论

2.1 PTIO 测试液紫外可见光谱

3- 氧代 -2- 苯基 -4,4,5,5- 四甲基咪唑啉 -1- 氧 (PTIO) 所形成的自由基为氧自由基，水溶液为蓝紫色。当自由基被清除时，557 nm 处吸光度下降。

	DPPH· 自由基	ABTS·+ 自由基	PTIO· 自由基
结构式			
表达式	DPPH·	ABTS·+	PTIO·
分子式	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$
带电情况	中性自由基	阳离子自由基	中性自由基
种类	氮自由基 (成单电子在 N 原子上)	氮自由基 (成单电子在 N 原子上)	氧自由基 (成单电子在 O 原子上)
外观	紫黑色粉末	没有纯的 ABTS·+ 溶于有机溶剂	紫褐色粉末
溶解性	溶于有机溶剂 (如甲醇、乙醇)	(如甲醇、乙醇)、水以及水性的缓冲液	溶于水以及水性的缓冲液
溶液颜色	溶液呈紫色 浓度越高，颜色越深	溶液呈墨绿色 浓度越高，颜色越深	溶液呈蓝紫色 浓度越高，颜色越深

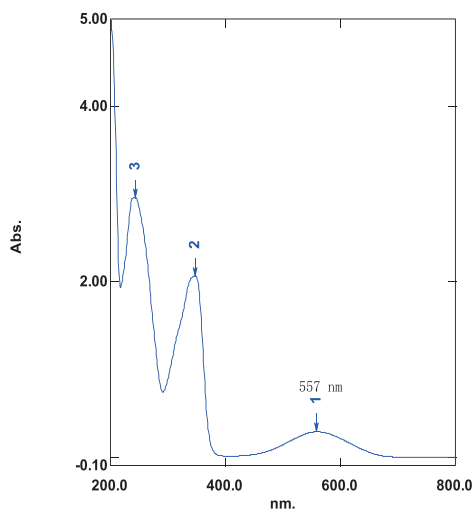


图 1 PTIO· 测试液紫外可见光谱

2.2 样本各测试液组成

根据 1.7 项下所述，以表 1 进行各样本配制，配置后进行水浴处理。

表 1 各溶液取样体积 (mL)

序号	样品溶液体积	蒸馏水体积	PTIO·测试液体积	总体积
1	1.0	4.0	15.0	20.0
2	2.0	3.0	15.0	20.0
3	3.0	2.0	15.0	20.0
4	4.0	1.0	15.0	20.0
5	5.0	0.0	15.0	20.0

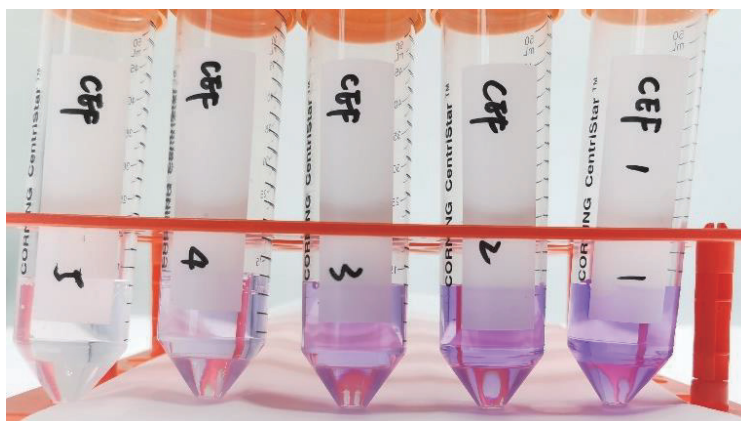


图 2 CEF 清除自由基测试图

2.3 PTIO 清除率 (抑制率) 的计算

选用 4 款市售精华液，进行上述实验，并按照下述公式进行清除率计算

$$\text{清除率}\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

其中，

A_0 ——不加样品时测试液的吸光度，即 1.7.1 项下测试值

A ——加入样品后的测试值，即 1.7.2 项下测试值

表 2 精华液自由基清除率

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	CEF		CF		SCF		OBG	
	吸光度	清除率	吸光度	清除率	吸光度	清除率	吸光度	清除率
0	0.333	0.00%	0.333	0.00%	0.333	0.00%	0.333	0.00%
50	0.269	19.22%	0.293	12.01%	0.276	17.12%	0.284	14.71%
100	0.207	37.84%	0.261	21.62%	0.221	33.63%	0.235	29.43%
150	0.142	57.36%	0.227	31.83%	0.166	50.15%	0.184	44.74%
200	0.082	75.38%	0.199	40.24%	0.111	66.67%	0.137	58.86%
250	0.022	93.39%	0.167	49.85%	0.056	83.18%	0.089	73.27%

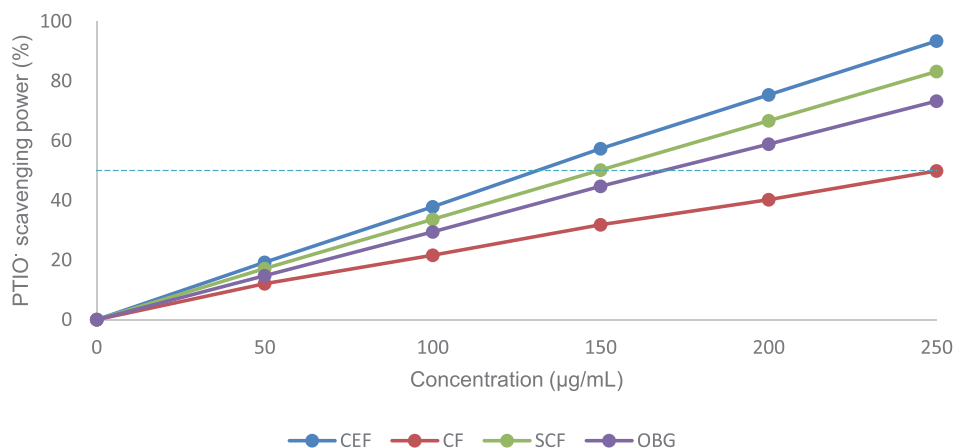


图3 抗氧化精华清除 PTIO·自由基的浓度曲线图

2.4 讨论

由于各抗氧化产品配方不同，所针对的肤质以及皮肤问题不同，因此虽然均为抗氧化类产品，但抗氧化效果也存在差异。并且抗氧化成分不是由单一物质组成，因此自由基清除率不一定随浓度增加呈现良好线性，尤其是多位点抗氧化物质，如多酚类物质。

由于常温状态下，PTIO·测试液与抗氧化物质反应较慢，需要 2 小时甚至更久完成，因此需要进行水浴加热来促进完成反应。由于所形成的物质较为稳定，并且 PTIO·测试液为过量添加，因此不存在终止反应的情况。

成年人面部皮肤约为 15 cm²，精华使用量约 0.8~1.0 g/次，其局部浓度要远高于实验测试浓度。如果配方中有较好的促渗体系，可较好地将抗氧化物质从角质层导入其内，即可更好的清除体内形成的皮肤自由基，从而改善皱纹产生，色素沉着等问题。

■ 结论

本文选择 PTIO·作为氧自由基生成模拟试剂代替常用的 N 自由基试剂 DPPH 和 ABTS，并对市售的抗氧化精华进行功效性评价，该方法简单方便，可广泛应用于抵抗氧自由基类产品的性能评价。

岛津应用云

