一种测定·OH 产生与清除的新化学发光体系*

许申鸿

(青岛大学 化学系, 山东 青岛 266071)

摘　要: 报道一种产生和检测·OH 的新化学发光体系。该体系由 50 μL 2.0 mmol/L CuCl, 50 μL 1% (φ) H_2O_2, 50 μL 1.5 mmol/L 邻菲啉, 0.05 mol/L Na_2CO_3- $NaHCO_3$ 缓冲液(pH 9.60)组成, 反应液总体积为 1.0 mL。该体系简便、稳定、灵敏、特异性强, 值得推广。

关键词: 化学发光; 体系; 羟基; 自由基

中图分类号: O644　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-4957(2000)02-0011-03

·OH 是一种对机体具有强大破坏作用、氧化能力很强的自由基, 研究·OH 的产生及检测体系具有实际意义。近年来国内外已有文献报道测定·OH 自由基产生体系的方法, 如气相色谱法、电子自旋共振法、化学发光法[1, 2]、比色法[3]等, 其中气相色谱法、电子自旋共振法虽然准确度高, 但所用仪器昂贵、操作复杂, 不能广泛应用。化学发光法所用仪器简单, 其测定的准确性、灵敏度及操作的简便性等均优于比色法而得到广泛应用。国内曾有报道产生·OH 的化学发光体系[1, 2]。文献[1]采用"Vc- $CuSO_4$- H_2O_2- 酵母- 磷酸钠缓冲液"作·OH 产生体系, 其中酵母处理麻烦, 同时酵母的活性及清洗程度不同等均会引起较大的误差。文献[2]采用"Vc- $CuSO_4$- H_2O_2- 邻菲啉- 硼砂- 硼酸缓冲液"作·OH 产生体系, 但其剂量配比不适用于本文所用的日本产 OX- 7 型化学发光分析仪, 该体系在本仪器中的发光强度几乎为仪器本底, 可能由于仪器的高压及光电倍增管功率不同所至。本文在文献[1]、[2]研究基础上, 改进了体系的组分、操作条件等, 采用"CuCl- H_2O_2- 邻菲啉- 碳酸盐缓冲液"作·OH 产生体系, 实验表明, 该体系更为简便灵敏, 适用范围更广, 它对于研究·OH 的产生及筛选清除·OH 的药物具有一定的应用价值。

1　实验部分

1.1　仪器和试剂

OX- 7 型化学发光分析仪(Tohoku Electronic Industrial Co. Ltd., Japan), pHS- 2 型数字酸度计(上海第二分析仪器厂)。邻菲啉、CuCl、H_2O_2、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、硫脲均为国产分析纯试剂, 试剂的配制均用二次蒸馏水。

1.2　实验方法

向 h 12 mm, d 44 mm 的不锈钢样品池(仪器配带)中依次加入 1.5 mmol/L 邻菲啉(加热溶解)、2.0 mmol/L CuCl(用极少量 HCl 溶解后再定容)、1% (φ) H_2O_2 各 50 μL, 0.05 mol/L pH 9.60 Na_2CO_3- $NaHCO_3$ 缓冲液 0.8 mL, 15 μmol/L 硫脲 50 μL(·OH 抑制实验, 空白对照时用二次蒸馏水代替), 总体积为 1.0 mL。上述试剂加样时分别置于样品池的不同部位, 彼此间不接触, 测前快速混匀, 立即上机测定, 快门 1 s, 温度 30 ℃, 测定数据由仪器所带计算机自动记录处理, 发光强度以计数每秒表示, 每个样品平行测 6 次, 取峰值平均值进行定量: 清除率= {[(空白峰值- 本底)- (样品抑制峰发光强度- 本底)]/(空白峰值- 本底)}100%。

2　结果与讨论

2.1　发光动力学曲线

本体系的发光动力学曲线如图 1, 约 60 s 时发光达最大值, 此强度约持续 40 s, 以后随时间而缓慢减弱。

* 基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y98D02050)

收稿日期: 1999- 08- 03　　作者简介: 许申鸿(1959-), 女, 上海人, 副教授.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 Cu^+ 浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

Cu^+ 浓度对本测定体系影响很大。固定体系的其它测定条件不变，仅改变 CuCl 浓度进行实验，结果(表 1) 表明，曲线的动力学特性、发光峰值及等量硫脲对 •OH 的清除率等均与 Cu^+ 浓度密切相关。Cu^+ 在本体系中起催化剂的作用，它启动发光反应的进行。当 $c(Cu^+) = 0$ 时，体系的发光值几乎为仪器本底，随 Cu^+ 加入量的增加，发光强度增大，发光曲线变陡，达到峰值的时间变短，这表明 •OH 生成量增多。当 $c(Cu^+) = 2.0$ mmol/L 时，发光最强，此时体系的测定灵敏度也最高。本测定体系中，只需加入微量的 Cu^+ 即可，过量的 Cu^+ 反而不利于本测定体系。

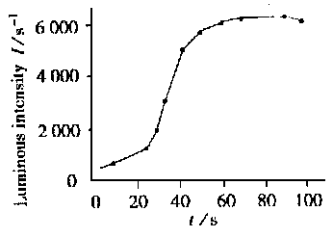

图 1 发光动力学曲线

Fig. 1 Luminous dynamic curve

表 1 CuCl 浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

Table 1 Influence of CuCl concentration on luminous intensity and sensitivity

c(CuCl) /(mmol • L^{-1})	0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.5
Luminous peak value I_p/s^{-1}	126±10 (本底65±5)	362±30 (150 s时)	946±50 (150 s时)	6 148±100	5 958±100	5 675±100
Time reaching peak value t/s	无峰，呈水平波浪型	150 s内无峰，发光强度缓慢增加	150 s内无峰，发光强度缓慢增加	80±5	40±5	20±5
•OH inhibition rate R/%		62±2	72±2	73±2	42±3	37±3

2.3 H_2O_2 含量对发光强度及测定灵敏度的影响

仅改变 H_2O_2 含量而体系其它测定条件不变时的实验结果(表 2) 表明，H_2O_2 为本体系产生 •OH 的底物。无 H_2O_2 时，体系的发光强度为仪器之本底，H_2O_2 加入后体系才发生反应。H_2O_2 含量愈高，发光强度愈高，表明 •OH 的生成量愈多。当 H_2O_2 含量 $\varphi \leqslant 1\%$ 时，体系的测定灵敏度均较高，但当其含量高于 1% 时，测定灵敏度下降。H_2O_2 含量变化对达到峰值时间影响不大。

表 2 H_2O_2 含量对发光强度及测定灵敏度的影响

Table 2 Effect of H_2O_2 content on luminous intensity and sensitivity

$\varphi(H_2O_2)$ /%	0	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
Luminous peak value I_P/s^{-1}	67±5	1 767±100	3 733±100	6 148±100	7 667±100	9 950±100
Time reaching peak value t/s	无峰，呈水平波浪形	65±5	75±5	80±5	100±5	110±5
•OH inhibition rate R/%		72±2	72±2	73±2	64±2	53±2

2.4 邻菲啉浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

固定体系的其它测定条件不变，仅改变邻菲啉浓度进行实验，结果 (表 3) 表明，邻菲啉的加入可有效地扩增本体系的发光值。不加邻菲啉时，Cu^+ 还原 H_2O_2 产生 •OH 的反应只伴随产生较弱的发光，而邻菲啉的加入使发光峰值有效增大，当邻菲啉浓度为 1.5 mmol/L 时发光最强，过多的邻菲啉反而使发光减弱。反应达到发光峰值的时间随邻菲啉浓度的增加而延长。邻菲啉的浓度变化对 •OH 清除率无显著影响。

表 3 邻菲啉浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

Table 3 Effect of o_phenanthroline concentration on luminous intensity and sensitivity

c(o_phenanthroline) /(mmol • L^{-1})	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Luminous peak value I_p/s^{-1}	405±50	1 865±100	3 933±100	6 148±100	2 017±100	610±100
Time reaching peak value t/s	0	25±5	30±5	80±5	150 s内无峰，线性升高	
•OH inhibition rate R/%		68±2	70±2	73±2	69±2	66±2

2.5 碳酸盐缓冲液浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

碳酸盐缓冲液浓度的变化对本测定体系的影响也很大。实验表明(表 4)，碳酸盐缓冲液浓度愈高，化学发光强度愈低，发光达到峰值的时间愈长。当碳酸盐缓冲液浓度为 0.05 mol/L 时，体系的测定灵敏度最高。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 4　碳酸盐缓冲液浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

Table 4　Effect of carbonate buffer concentration on luminous intensity and sensitivity

c(carbonate buffer)/(mol·L^{-1})	0.025	0.050	0.075
Luminous peak value I_p/s^{-1}	7 132±100	6 148±100	2 533±100
Time reaching peak value t/s	40±5	80±5	100±5
·OH inhibition rate R/%	42±2	73±2	43±2

2.6　pH 值对发光强度及测定灵敏度的影响

pH 值是个较重要的影响因素。仅改变体系 pH 值的实验结果(表 5)表明, 随体系 pH 的升高, 发光强度增高, 达到发光峰值的时间变短。当 pH≤9.60 时, 体系的测定灵敏度均较高, 但当 pH> 9.60 时, 体系的测定灵敏度显著降低。综合考虑 pH 值对发光强度及测定灵敏度的影响, pH 最佳值为 9.60。

表 5　pH 值对发光强度及测定灵敏度的影响

Table 5　Effect of pH on luminous intensity and sensitivity

pH	9.00	9.50	9.60	9.70	10.00
Luminous peak value I_p/s^{-1}	467±10	4 120±100	6 148±100	6 509±200	7 320±200
Time reaching peak value t/s	150 s内无峰, 线性升高	75±5	80±5	60±5	50±5
·OH inhibition rate R/%	70±2	73±2	73±2	31±3	23±3

2.7　产生·OH 的特异性

向本测定体系分别加入·OH 清除剂硫脲、$O_2^{\cdot-}$ 清除剂超氧化物歧化酶(SOD)及单线态氧($^1O_2$)清除剂 β-胡萝卜素进行实验, 结果(表 6)表明, 硫脲能有效抑制发光(图 2), 而 SOD 及 β-胡萝卜素均不抑制本体系的发光。这表明本体系不产生 $O_2^{\cdot-}$ 和 $^1O_2$, 而只产生·OH。据硫脲清除·OH曲线知, 本体系的 IC_{50}(清除 50%·OH所需试剂量)为 10 μmol/L。

表 6　产生·OH 的特异性

Table 6　Characters of the production of ·OH

Reagent	Content	Inhibition rate R/%
Thiourea	10 μmol/L	50
SOD	1 mg/L	0.5
β_Carotene	0.01 mmol/L	-2.3

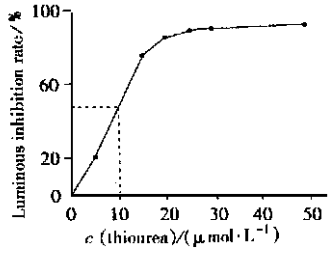

图 2　硫脲清除·OH 曲线

Fig. 2　Scavenging effects of thiourea on ·OH

2.8　体系的测定原理及方法的可靠性

根据上述实验事实推测本体系的测定原理为: 在 Cu^+ 还原 H_2O_2 的过程中产生·OH 并伴有弱的发光, ·OH 氧化邻菲啉, 使其激发, 当它退激时产生较强的发光。

本体系所用试剂制备方便, 体系特异性强, 反应体系较稳定, 批内相对标准偏差为 1.8% (n= 6), 批间相对标准偏差为 2.1% (n= 6)。

参考文献:

[1]　陈季武, 胡天喜. 测定·OH 产生与清除的化学发光体系[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 136.
[2]　范小兵, 李慈娟, 沙大年, 等. 邻菲啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(6): 68.
[3]　王成莲, 刘莉. 比色法测定抗坏血酸体系产生的·OH 自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6): 473.

A New Chemiluminescence System for Measuring ·OH Radical

XU Shen_hong

(Department of Chemistry, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: A new chemiluminescence system for measuring ·OH radical is reported. It is composed of 2.0 mmol/L CuCl solution 50 μL, 1% (φ) H_2O_2 solution 50 μL, 1.5 mmol/L o_phenanthroline solution 50 μL and 0.05 mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$ buffer with pH 9.60. The volume of reaction is 1.0 mL. This system is very simple, steady, sensitive and characteristic, it is worthy to be popularized.

Keywords: Chemiluminescence; System; Hydroxy group; Free radical

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net