

比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基及其应用*

徐向荣 王文华 李华斌

(中国科学院生态环境研究中心, 国家重点环境水化学实验室, 北京 100085)

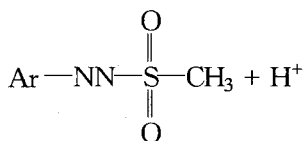
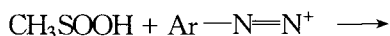
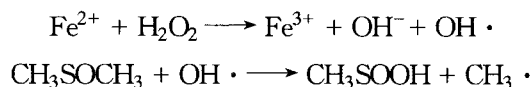
摘要 Fenton 反应产生的羟自由基与二甲亚砷反应, 生成甲基亚磺酸, 再与坚牢蓝 BB 盐反应生成偶氮砷, 比色法测定其含量可间接测定 $\text{OH}\cdot$ 的生成量. 通过对测定条件的研究, 得到最佳实验方案. 抗氧化剂药物硫脲和抗坏血酸与羟自由基清除率具有明显的量效关系. 测定了核桃、黑芝麻等几种天然食物的水提取物清除羟自由基的功能. 此法可用于羟自由基清除剂的筛选.

关键词 羟自由基, Fenton 反应, 比色法, 甲基亚磺酸

学科分类号 Q503

在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基, 其中羟自由基 $\text{OH}\cdot$ 是体内最活泼的活性氧, 可介导许多病理变化, 如引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 并损伤膜结构及功能, 因此羟自由基的检测对于自由基的生物作用研究具有重要意义.

羟自由基的测定方法有电子顺磁共振法^[1]、高效液相色谱法^[2]和化学发光法等^[3]. 这些方法大多需要较昂贵的仪器, 操作也较复杂, 一般实验室难以应用. 近年来国外文献报道了用二甲亚砷作为水相中 $\text{OH}\cdot$ 产生的分子探针, 定量测定 $\text{OH}\cdot$ 的产率^[4~6]. 该法的测定原理为:



本文根据该原理, 用比色法测定了 Fenton 反应中产生的 $\text{OH}\cdot$, 通过对测定条件的研究, 得到最佳的实验方案, 并成功地用于羟自由基清除剂的筛选. 实验结果表明, 抗氧化剂药物硫脲和抗坏血酸与羟自由基清除率具有明显的量效关系. 核桃、黑芝麻的水提取物具有很强的清除羟自由基的功能.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

UV-120-02 紫外可见分光光度计 (日本 Shimadzu 公司), 硫酸亚铁、过氧化氢、正丁醇、甲

苯、吡啶、二甲亚砷、坚牢蓝 BB、硫酸. 所用试剂均为分析纯. 试剂用去离子水配制.

1.2 方法

1.2.1 羟自由基的产生: 在 10 ml 刻度具塞试管中, 加入 2 ml 200 mmol/L 二甲亚砷, 1 ml 0.1 mol/L HCl, 2.5 ml 18 mmol/L FeSO_4 , 再加入 3 ml 80 mmol/L H_2O_2 启动反应. 加去离子水补充至刻度, 混匀.

1.2.2 羟自由基的测定: 取 1 ml 上述混合液, 加入 2 ml 15 mmol/L 坚牢蓝 BB 盐. 在室温黑暗中反应 10 min. 再加 1 ml 吡啶使颜色稳定, 然后加 3 ml 甲苯:正丁醇 (3:1) 混合液, 充分混合, 静置分层. 下层相中含有未反应的偶氮盐, 用吸管移走弃掉. 甲苯/正丁醇相用 5 ml 经正丁醇饱和的水冲洗, 移去未反应的偶氮盐, 将上清液移到比色皿中, 于 420 nm 测定吸光度 A_0 .

1.2.3 羟自由基清除率的测定: 在 1.2.1 的体系中加入一定量的清除剂, 按 1.2.2 的方法测定吸光度 A_s , 按下式计算: 清除率 = $(A_0 - A_s)/A_0 \times 100\%$

1.2.4 天然食物水提取物清除 $\text{OH}\cdot$ 能力的测定: 准确称取天然食物各 1 g, 用粉碎机磨碎后, 加入去离子水 10 ml, 浸泡 4 h 后, 以 3 000 g 离心 30 min, 取上清液 1 ml 进行实验.

2 结果与讨论

2.1 FeSO_4 浓度的影响

取不同体积 18 mmol/L FeSO_4 , 测得吸光度见图 1.

* 国家自然科学基金资助项目 (29637010).

收稿日期: 1997-09-04, 修回日期: 1998-01-07

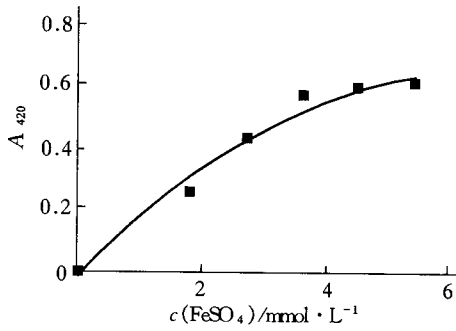


图1 FeSO₄ 浓度对吸光度的影响

从图1可以看出,当FeSO₄的浓度为零时,吸光度为零,即没有偶氮砷生成.这表明没有痕量Fe²⁺存在,就不能启动Fenton反应来产生OH·.随着FeSO₄浓度增大,吸光度增大.当FeSO₄的浓度达到4.5 mmol/L后,吸光度值几乎不再变化.

2.2 H₂O₂ 浓度的影响

取不同体积80 mmol/L H₂O₂,反应后测得吸光度见图2.

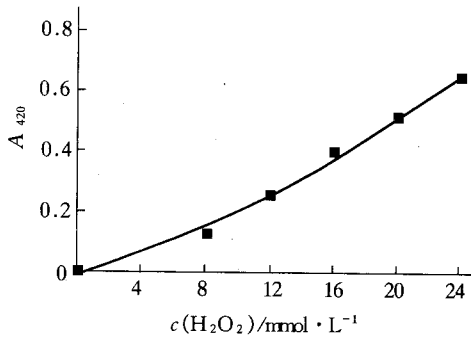


图2 H₂O₂ 浓度对吸光度的影响

从图2可以看出,吸光度随着H₂O₂浓度的增大而增大,这表明H₂O₂的量和OH·的产率成正比.

2.3 二甲亚砷浓度的影响

加入不同体积200 mmol/L的二甲亚砷,测得吸光度见图3.

从图3可以看出,当二甲亚砷不存在时,体系不产生偶氮砷,吸光度为零.这说明反应的最终产

物是二甲亚砷与羟自由基反应生成甲基亚磺酸,其再进一步与偶氮盐反应生成亮黄色的偶氮砷.

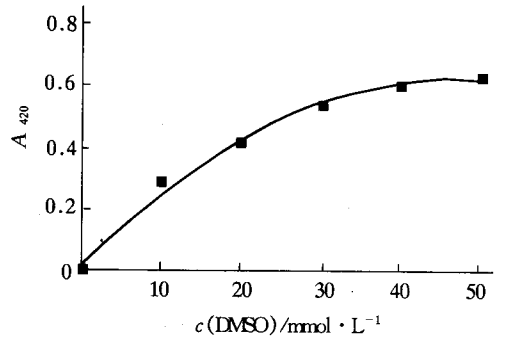


图3 DMSO 浓度对吸光度的影响

2.4 方法的重现性

选用硫脲作为OH·的清除剂,进行该方法的重现性实验,结果见表1.

本方法的相对标准偏差为2.46%,这说明本方法具有较好的重现性.

2.5 羟自由基清除剂的作用

2.5.1 药物的抗氧化作用抗坏血酸与硫脲均为羟自由基清除剂,检验这两种药物清除羟自由基的效应,以证明此方法的可行性.结果见图4.图4表明,它们清除羟自由基均有明显的量效关系.

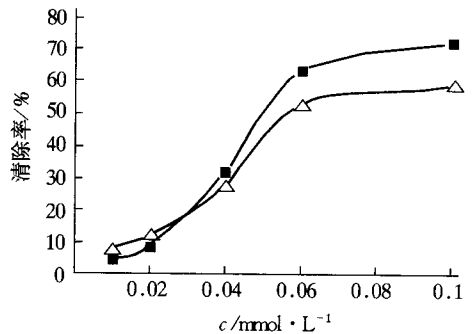


图4 抗氧化剂与清除率的关系

■—■: 抗坏血酸, △—△: 硫脲.

2.5.2 天然食物的抗氧化作用:几种天然食物水提取物对OH·的清除率,结果见表2.

表1 方法的重现性

次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	RS	RSD/%
吸光度	0.276	0.272	0.279	0.287	0.278	0.283	0.265	0.278	0.282	0.268	0.681	2.46

表2 几种食物水提取物清除OH·的功能比较

食物	核桃	黄豆	花生	姜	辣椒	蒜	黑芝麻	南瓜子
清除率/%	71.7	9.0	22.6	35.9	16.7	39.5	60.1	19.8

从表 2 可以看出, 在所选的几种食物中, 核桃、黑芝麻的水提取物具有很强的清除 $\text{OH}\cdot$ 的功能.

2.6 注意事项

a. 在 1.2.2 部分的偶氮反应应在黑暗中进行, 反应结束后应及时加入吡啶, 使颜色稳定; b. 在萃取过程中, 混匀即可, 不用剧烈振荡, 以免发生乳化. 若出现轻微乳化现象, 可用离心法去除.

以上实验表明, 该法能用来研究羟自由基的产生与清除. 该法准确可靠, 易为一般实验室采用. 硫脲和抗坏血酸与羟自由基清除率具有明显的量效关系. 天然食物中的核桃与黑芝麻具有较强的清除羟自由基的功能. 该方法可用于羟自由基清除剂的筛选, 对于研究清除羟自由基的机理具有一定的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Stokes N J, Tabner B J, Hewitt C N. Determination of hydroxyl radical concentration in environmental chambers using electron spin resonance. *Chemosphere*, 1994, **28** (5): 999~ 1008
- 2 Kaur H, Halliwell B. Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 1994, **220** (1): 11 ~ 15
- 3 陈季武, 胡天喜 (Chen J W, Hu T X). 测定 $\text{OH}\cdot$ 产生与清除的化学发光体系. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1992, **19** (2): 136~ 140
- 4 Steiner M G, Babbs C F. Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **278** (2): 478~ 481
- 5 Gamoh K, Sakamoto M. Indirect liquid chromatographic determi-

nation of hydroxyl radicals based on formation of methane sulfinic acid. *Bunseki Kagaku*, 1994, **43** (9): 691~ 696

- 6 Fukui S, Hanasaki Y, Ogawa S. HPLC determination of methane sulphinic acid as a method for the determination of $\text{OH}\cdot$. *J Chromatogr*, 1993, **630** (1~ 2): 187~ 193

Determination of Hydroxyl Radicals in Fenton Reaction by Colorimetric Assay and Its Application.

XU Xiang-Rong, WANG Wen-Hua, LI Hua-Bin
(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China).

Abstract Hydroxyl radicals produced in Fenton reaction can react with dimethyl sulfoxide to produce methane sulfinic acid which can further react with Fast Blue BB salt to form light yellow diazosulfone. According to the principle, hydroxyl radicals can be indirectly assayed by colorimetry. The determination condition was studied to obtain a best experimental program. The results showed that the hydroxyl radical-scavenging effect were dose dependent upon thiourea and ascorbic acid. The walnut and black sesame were proved to be natural antioxidant foods. The method can be applied to sieve the hydroxyl radical scavenger.

Key words hydroxyl radical, Fenton reaction, colorimetry, methane sulfinic acid

人 SCF 非融合蛋白的纯化及生物活性*

赖春宁 朱元晓 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

洪海燕

(哈尔滨农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

摘要 将构建的可溶性 SCF 表达质粒 PBV-SCF 转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行非融合蛋白表达, 经克隆筛选出高效表达菌株表达量在 20% 左右, 大量扩增后经包涵体提取、液相层析技术纯化, 得到纯度为 90% 以上的 rh-SCF 制品, 对其等电点和 N 端氨基酸进行分析, 证实具有天然 SCF 特性, 生物活性检测表明该表达产物比活性为 6.6×10^5 U/mg, 同时可以协同 GM-CSF 促进人骨髓中 CFU-GM 增殖. 重组人可溶性 SCF 的获得对于实验室研究和临床应用具有一定价值.

关键词 rhSCF, 纯化, 生物活性

学科分类号 Q78

* 国家 863 青年基金资助项目 (7306127). 收稿日期: 1997-09-15, 修回日期: 1998-03-24