

技术与方法

2.5 次微分伏安法对生物样品中丙二醛的测定

李东方¹⁾ 陈晓乐 汪乃兴

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 以 0.1 mol/L NH_4Cl 溶液为介质, 用 2.5 次微分伏安法测定了丙二醛, 线性范围为 1.0×10^{-6} 至 1.0×10^{-3} mol/L, 检测限达 1.0×10^{-7} mol/L. 并测定了细胞培养液介质中新生 SD 大鼠心室肌细胞样品中的丙二醛.

关键词 丙二醛, 微分伏安法, 测定, 心肌细胞

丙二醛 (malondialdehyde 或 malonaldehyde, MDA 或 MLD) 是生物体内花生四烯酸的过氧化产物, 常被认为是体内脂质过氧化作用的标志产物, 其水平亦常被用来反映体内自由基损伤的程度. 目前检测 MDA 的方法主要是利用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 与 MDA 显色的分光光度法^[1,2], 但存在控制条件复杂, 干扰因素较多的缺点. Bond 等^[3]曾用差分脉冲极谱法在 HCl 介质中测定了 MDA, 虽然干扰少, 但对实际生物样品测定灵敏度尚嫌不足.

2.5 次微分伏安法是在单扫描极谱法的基础上, 记录极谱电流的 2.5 次微分值 (e'') 与电极电位 (E) 的关系, 可得到比差分脉冲极谱更高的灵敏度和分辨率, 并可在极低支持电解质浓度下进行测定^[4]. 本文采用 2.5 次微分伏安法测定, 线性范围较宽, 干扰因素小, 方法简便快速, 应用于实际生物样品中分析测定效果良好.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

XJP-821 (B) 型新极谱仪 (江苏电分析仪器厂), JM-01 型悬汞电极.

1.0×10^{-3} mol/L MDA 标准溶液: 0.024 ml (1.0×10^{-4} mol) 四乙氧基丙烷

(Sigma 产品) 加入 1 ml 0.1 mol/L HCl, 50 ml H_2O , 50 °C 恒温水解 1 h, 冷却后定容至 100 ml. 4 °C 冷藏保存.

DMEM 培养液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCOBRL 产品), 胎牛血清 (上海生物化学研究所).

1.2 测定方法

取 10 ml 0.1 mol/L NH_4Cl 溶液为底液, 以悬汞电极、Pt 对极和 Ag/AgCl 参比电极组成三电极体系, 通氮气 3 min 后, 以 80 mV/s 速度自 -0.5 至 -1.6 V 扫描 e'' - E 波. 用微量加样器将一定量的 MDA 溶液加入, 观察峰高对样品浓度的线性变化.

2 结果与讨论

2.1 介质条件选择

分别用 HCl、HAc-NaAc、 NH_4Cl 、NaCl、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 、 NH_3 - NH_4Cl 、 H_3BO_3 - Na_3BO_3 、KOH 八种不同介质为底液, 试验了 MDA 还原所产生的 e'' - E 波. 其中以在 NH_4Cl 介质中所表现的灵敏度和线性最佳, 在 -1.02 V 和 -1.48 V 可分别得到两个还原峰 (图 1). 在 pH 值过低介质中, H_2 还原波干扰

¹⁾第二军医大学化学教研室, 上海 200433.

收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1996-10-03

较大, 而介质 pH 值过高则灵敏度较低, 最终选择的介质为 0.1 mol/L 的 NH_4Cl 溶液.

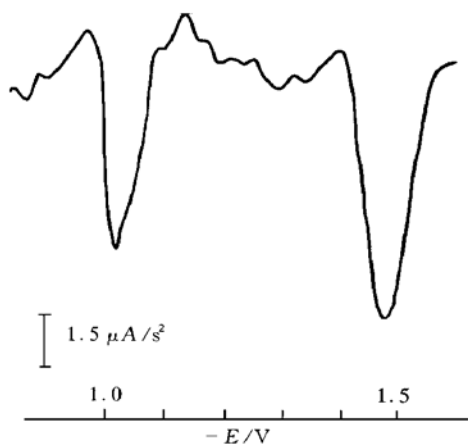


图1 0.1 mol/L NH_4Cl 溶液中以 80 mV/s 扫速所得 1.5×10^{-5} mol/L MDA 的 $e''-E$ 还原峰

2.2 扫描速度影响

MDA 在 0.1 mol/L 的 NH_4Cl 介质中, 以 20 至 200 mV/s 扫速, 均可得 -1.48 V 还原峰, 且峰高随扫速升高而递增, 但 100 mV/s 以上分辨率较差, 背景干扰大, 为兼顾灵敏度与选择性, 实测时选用 80 mV/s.

2.3 工作曲线和检测限

在上述选定的实验条件下, 试验了 MDA 峰高与浓度的关系.

在低于 1.5×10^{-5} mol/L 浓度下, 在 -1.02 V 与 -1.48 V 两个还原波峰高与 MDA 浓度均有良好的线性, 但 1.5×10^{-5} mol/L 以上, -1.02 V 峰高降低并保持为定值不再升高, 可认为是 MDA 在较稀浓度下两个醛基先后在 -1.02 V 和 -1.48 V 被还原, 而较浓时趋于两个醛基同时在 -1.48 V 被还原. 因 -1.48 V 还原峰线性范围较宽, 且干扰因素较少, 测定时宜选用.

结果表明, 1.0×10^{-6} 至 1.0×10^{-3} mol/L 的 MDA 在 -1.48 V 有良好的线性响应. 而本方法的检测限为 1×10^{-7} mol/L (在 -1.02 V 峰高可达 $0.43 \mu\text{A}/\text{s}^2$).

2.4 干扰因素试验

考虑心肌细胞培养基 DMEM 中的成分及处理过程中可能的干扰因素, 试验了 100 倍于 MDA 的 Vit C、乙醇、正丁醇、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、葡萄糖、丙酮酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、缬氨酸存在下 MDA 的 $e''-E$ 响应, 由于上述物质的干扰峰与 -1.48 V 的 MDA 响应峰可明显分辨, 故对测定不影响. 图 2 为在 85% DMEM+15% 胎牛血清介质中标准加入 MDA 并经去蛋白处理后在 80 mV/s 扫速下的 $e''-E$ 响应.

等量的甲醛或乙醛使 MDA 峰变宽并降低.

胎牛血清蛋白对灵敏度影响较大, 在测定生物样品时, 须预作去蛋白处理.

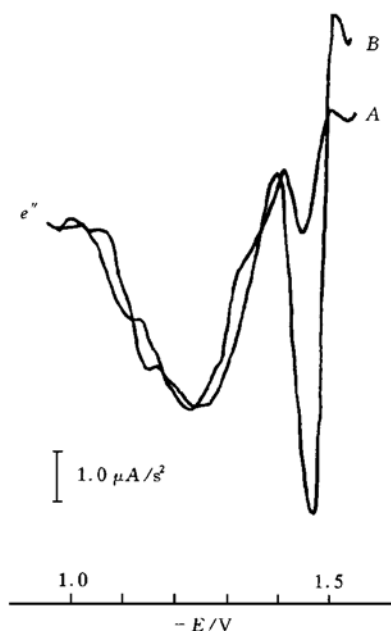


图2 在 85% DMEM+15% 胎牛血清介质中标准加入 MDA 并经去蛋白处理后在 80 mV/s 扫速下的 $e''-E$ 响应
MDA 浓度为 A: 5.0×10^{-6} mol/L; B: 1.5×10^{-5} mol/L.

2.5 生物样品测定实例及与光度法对照

取出出生后 24~48 h 的健康 SD 大鼠, 参照 Laarse 法^[5], 在无菌条件下取心室肌, 0.08% 胰蛋白酶消化, 机械震荡, 分离心室肌细胞,

置 100 ml 培养瓶中, 37℃ CO₂ 孵育箱中预培养 30 min, 去除贴壁成纤维细胞, 细胞悬液分成 A、B、C 三组, A 组加入佛波醇酯处理后与 B 组平行缺氧处理后氧气复灌, 与未处理的对照组 C 以 85% DMEM+ 15% 胎牛血清为培养基平行培养, 每 24 h 更换培养基. 贴壁生长 4~ 5 d 待测.

分别取样 1.0 ml, 加入 0.1 mol/L NH₄Cl 溶液, 80℃ 恒温水解 10 min, 加正丁醇处理并离心, 取清液通氮气 3 min 后, 自 - 1.0 至 - 1.6 V 扫描 e'' -E 峰.

平行取样, 参照 Ohkawa 法^[1], TBA 显色处理, 冷却后在 532 nm 用分光光度法测定, 与伏安法结果对照见表 1.

表 1 各组 SD 大鼠每 10⁵ 个心室肌细胞中 MDA 含量

	伏安法测定结果 / nmol	光度法测定结果 / nmol
A 组	0.24 ± 0.08	0.19 ± 0.05
B 组	0.50 ± 0.18	0.45 ± 0.20
C 组	0.48 ± 0.24	0.38 ± 0.07

由表 1 数据可见, 伏安法结果与同组分光光度法结果基本相符, 且含量普遍增大 1.11 ~ 1.26 倍, 我们认为伏安法避免了光度法测定前复杂的预处理所造成的样品损耗, 测定时所受的干扰因素少, 故灵敏度有所提高, 结果更接近于实际含量.

参 考 文 献

1 Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of yellow,

orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal Biochem*, 1987, **165** (2): 456 ~ 464

2 Lente F V. Free radicals. *Anal Chem*, 1991, **63** (12): 199R~ 200R

3 Bond A M, Deprez P P, Jones R D *et al.* Polarographic method for the determination of propanedial (malonaldehyde). *Anal Chem*, 1980, **52** (13): 2211~ 2213

4 朱果逸, 汪尔康. 新极谱法. *分析化学*, 1981, **9** (4): 486~ 496

5 Laarse A, Hollaar L, Valk L J M. Release of alpha hydroxybutyrate from neonatal rat heart cell cultures exposed to anoxia and reoxygenation: comparison with impairment of structure and function of damaged cardiac cells. *Cardiovas Res*, 1979, **13** (6): 345~ 353

Determination of Malondialdehyde in Biological Samples by 2.5th Order Differential Voltammetry. LI Dongfang, CHEN Xiaole, WANG Naixing (*Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract The reduction of malondialdehyde (MDA) on hanging mercury drop electrode was studied by 2.5th order differential voltammetry. The linear response range of current (e'') against the concentration of MDA was given from 1.0×10^{-6} to 1.0×10^{-3} mol/L in the condition of a base solution of 0.1 mol/L NH₄Cl at scanning rate of 80 mV/s. The detection limit was 1.0×10^{-7} mol/L. The method provides succesfully a rapid and simple way to determine the concentration of MDA in the sample of cardiac myocytes.

Key words malondialdehyde, differential voltammetry, determination, cardiac myocytes

用荧光分光光度法测定组织和血液中一氧化氮

王景华 杨世杰¹⁾ 杨贵贞
(白求恩医科大学免疫教研室, 长春 130021)

摘要 利用NO₂⁻对4-羟基香豆素的荧光增强效应, 建立了生物样本中NO荧光分光光度测定法, 其检

¹⁾ 白求恩医科大学分子生物中心, 长春 130021. 收稿日期: 1996-06-13, 修回日期: 1997-09-20