

新技术讲座

微弱发光分析技术应用实例 (三)
——药物抗氧化作用的测定

张仲伦

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 微弱发光分析技术用于测定药物的抗氧化作用方式和抗氧化能力有其独特的优点. 简要介绍应用BPCL型微弱发光仪测定了十几种药物的抗氧化性能的方法和初步结论. 说明了这种技术和仪器在应用领域的作用. 还谈到了BPCL微弱发光测量仪数据采集和分析的主要性能.

关键词 抗氧化剂, 药物抗氧化作用, 微弱发光分析技术

学科分类号 Q6-33

7 药物抗氧化作用的测定 ——微弱发光分析技术应用实例之 (三)

由于体内氧化代谢失衡和抗氧化能力下降与衰老、肿瘤及多种疾病的发生、发展密切相关, 因此抗氧化剂被广泛应用于疾病防治, 并取得重要进展. 抗氧化剂按其作用可分为预防型抗氧化剂和断链型抗氧化剂. 应用化学发光测量技术可以采用 CuSO_4 -邻啡罗啉 (phen)-Vit C- H_2O_2 -DNA 化学发光体系测定各种药物对 DNA 损伤发光的保护作用.

张健、马文建等^[1~3]比较系统地研究了多种药物的抗氧化作用方式和抗氧化能力, 他们所用的方法如下: 药物 (除五味子乙素) 都用三蒸水配制, 五味子乙素用乙醇配制成 1 g/L 原液, 用时稀释. 用 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 5.5) 配制 CuSO_4 -phen-Vit C-DNA-药物溶液, 使 Cu^{2+} 、phen、Vit C 终浓度分别为 5×10^{-5} mol/L、 3.5×10^{-4} mol/L、 3.5×10^{-4} mol/L, 根据需要加入一定

量的 DNA. 取该溶液 1 ml, 放入发光仪样品池中, 加入 200 μl 3% 的 H_2O_2 原液, 使其终浓度为 0.5%, 立即测量化学发光反应动力学曲线. 每组实验至少重复三次.

在他们的此项研究中发现不同抗氧化剂对 DNA 损伤产物发光动力学影响呈现不同的规律, 反映出它们的作用机制有所不同. 在上述体系中, 抗氧化剂的加入使发光动力学曲线发生明显变化, 表现为发光峰值的降低 (抑制效应) 及发光峰值的后移 (延迟效应). 对十几种药物的实验研究表明, 按其作用方式不同可分为三类, 其一是使 DNA 损伤产物发光峰后移, 以 Trolox 为代表, 其二是使 DNA 损伤产物发光峰降低, 以丹参酮 II-A 为代表, 其三是该发光峰既有明显下降又有明显后移, 即抑制并延迟了 DNA 的损伤, 以茶多酚为代表. 图 1 表明三种代表性药物在上述体系中用 BPCL 微弱发光测量仪测出的发光动力学曲线.

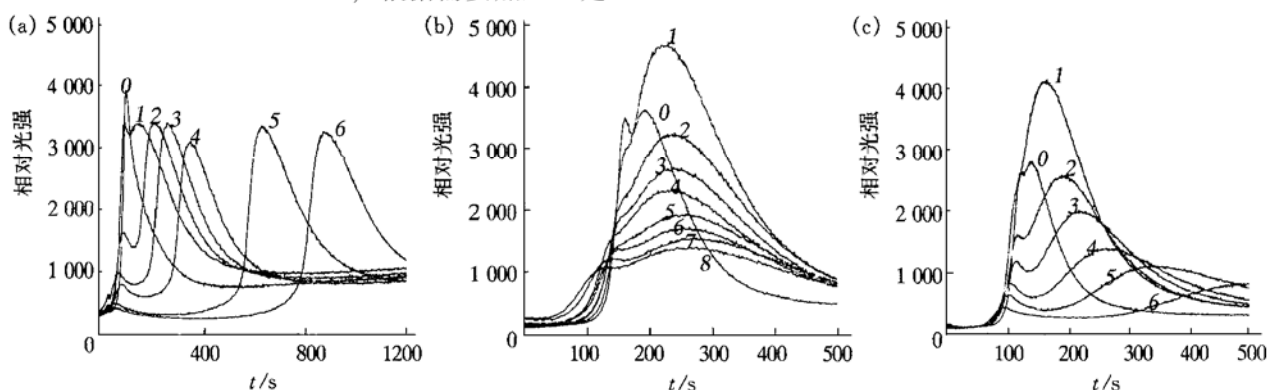


图 1 Trolox、丹参酮 II-A、茶多酚三种代表性药物发光动力学曲线
(a) Trolox; (b) 丹参酮 II-A; (c) 茶多酚. 曲线旁标注数字以区分不同的药物浓度.

研究结果还表明抑制作用随抗氧化剂浓度增加呈现一饱和曲线, 而延迟效应的抗氧化剂, 时间后移与所加药品浓度呈正比. 因此可根据两个指标来比较药物抗氧化能力的强弱. 抑制型: 以发光强度

降为 50% 时, 所需抗氧化剂浓度的倒数 ($1/C_{50}$); 延迟型: 以延迟时间与浓度的比值 (K) 来表示. 此二值越大, 表明抗氧化能力越强. 13 种药物抗氧化能力的比较见表 1.

表 1 13 种药物抗氧化能力的比较

抗氧化剂 (抑制)	阿魏酸	丹参素	芦丁	茶多酚	茜草素	PG	SOD	VE	丹参酮 II-A	丹皮酚	延胡素 乙素	五味子 乙素
$1/C_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	40	2.38	2.0	1.75	1.28	1.22	1.19	0.55	0.37	0.19	0.056	0.02
抗氧化剂 (延迟)	阿魏酸	茜草素	芦丁	PG	Trolox	茶多酚	丹参素	丹皮酚				
$K/S\cdot\text{L}\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	181.4	124.7	109.0	108.1	51.6	5.2						

8 BPCL 型微弱发光测量仪的数据采集与分析

8.1 数据采集

光电倍增管将光信号转换为电流信号, 经由电流-脉冲频率变换电路成为脉冲串, 送给 ISA 插槽上的专用接口, 数据经由总线传输给 CPU. 控制数据采集有两个时间参数, 其一是采样时间, 最长可以有 6 位数字. 其二是采样间隔, 最小间隔 0.01 s. 高压调节可以控制测量灵敏度, 系统最大计数率 30 kHz. 每一条动力学曲线保存在一个数据文件中, 再由软件对数据文件进行分析.

8.2 数据分析

进行数据曲线分析, 主要是确定动力学曲线的积分上下限, 而后进行一定时间间隔的积分, 得到总的发光强度积分值.

每一样品要测量本底和样品发光, 同一样品编号相同, 可重复测量多次. 软件将自动减除本底计算这一样品测量净计数平均值及其偏差.

一组实验数据包含多个样品, 以编号标记各样品, 软件可计算一组样品的平均值及其偏差.

处理组实验数据将与正常值 (对照) 组数据进行比较, 计算出偏离程度.

光谱测量中, 同一波长为一组, 不同波长间首先寻求极大值作为 100%, 计算其他波长的相对比例, 而得到光谱 (以百分数表示).

正常值、样品、光谱分析结果皆可用表格形式表示, 正常值和光谱分析结果还可用图形表示.

每一条数据曲线可单独观察, 在屏幕上读取各

数据点的测量值. 可以将其数据格式转换为 ASC II 码形式, 另存为 TXT 文件以供其他数据分析软件使用. 每一分析结果的表格和图形皆可输出打印.

参 考 文 献

- 1 张 健, 曹恩华, 秦静芬, 等 (Zhang J, Cao E H, Qin J F, *et al*). 抗氧化剂对 DNA 损伤的保护作用机制的研究. 生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica), 1997, 13 (1): 123~127
- 2 张 健, 曹恩华, 马文建, 等 (Zhang J, Cao E H, Ma W J, *et al*). 药物抗氧化作用对 DNA 发光动力学行为的影响. 感光科学与光化学 (Photographic Science and Photochemistry), 1997, 15 (2): 114~119
- 3 马文建, 曹恩华, 张 健, 等 (Ma W J, Cao E H, Zhang J, *et al*). 十几种天然抗氧化剂对 DNA 保护作用的结构分析与理论计算. 生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica), 1998, 14 (1): 155~160

Ultra-weak Chemiluminescence Analytical Technology Principle and Application. ZHANG Zhong-Lun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Ultra-weak chemiluminescence analytical technology have a particular excellence in that determine the types of antioxidant functions and the antioxidant activity of the drugs. The methods and results that to determine antioxidation of several drug using BPCL analyzer was introduced. It is approved that the technology and analyzer were useful in the practical fields. The principle performance of data acquisition and analysis by BPCL was described.

Key words antioxidant, antioxidation of drug, ultra-weak chemiluminescence analytical technology