

### The Development of Data-Processing System of Double Wavelength/Double Beam Spectrometer.

ZHOU Hong-Wei, LIN Bo-Hai, WU Wei, ZHANG You-Ling, WANG Li-Hua (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*); MIN Xiao-Shan (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

**Abstract** The data-processing ability of double wavelength/double beam spectrophotometer has been greatly enhanced by connecting it to a computer and designing new software. Formerly, the instrument relied on an old recorder to plot curve on a special-designed recording paper and had poor data-processing ability: user had to determine manually the abscissa

and ordinate for any data point in the curve with a ruler, which limited its use in biological studies, especially in kinetic analysis. Currently a computer and a software packet designed are applied to it, which leads to the following several distinct advantages over the old type: sampling and storing data by computer, showing more than one curve simultaneously on the screen, showing the value of data points, determining the positions of peaks automatically, smoothing curves, zooming in or zooming out graph, printing graph with a HP Laser Jet. The structure of the new system is introduced here, based on which the effect of phosphatidylethanolamine content on the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is studied.

**Key words** double wavelength, double beam, data procession, spectrophotometer, phosphatidylethanolamine

## 邻苯三酚-碳酸盐缓冲液化学发光体系的研究\*

许申鸿 杭 瑚

(青岛大学化学系, 青岛 266071)

**摘要** 用化学发光法研究了邻苯三酚碱性自氧化产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的发光行为. 通过对测定条件的研究, 得出最佳测定方案. 改进后的方法不需使用发光剂 Luminol, 所用试剂价廉易得, 且方法稳定, 重现性好. 此法灵敏度远高于邻苯三酚自氧化的其他文献报道法.

**关键词** 化学发光, 邻苯三酚自氧化, 超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD)

学科分类号 O657

人们早就知道邻苯三酚在碱性条件下可迅速自氧化产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ <sup>[1]</sup>. 因此, 该体系广泛用于 SOD 活性的测定及一些物质抗氧化性质的研究. 邻苯三酚自氧化研究方法有多种, 如化学发光法、比色法、电化学法等<sup>[2~4]</sup>. 其中化学发光法专一性强, 灵敏度高, 已被广泛应用<sup>[5~9]</sup>. 目前, 国内报道的邻苯三酚自氧化化学发光分析法采用的均为邻苯三酚-Luminol (3-氨基邻苯二甲酰肼) 发光体系模式<sup>[2, 5~9]</sup>. 本文在对该法的研究中发现, 当将原法中的发光剂 Luminol 去掉时, 同一条件下其发光强度及灵敏度均比加入 Luminol 时要高. 因此, 本文放弃使用价格较贵的发光剂 Luminol, 仅用邻苯三酚与  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液组成发光体系, 并对改进后体系的测定条件进行反复实验, 得出最佳测

定方案. 本研究中发现, 在该体系的重要影响因素中, 除了有已报道的邻苯三酚浓度及溶液 pH 值的影响外, 还有一个十分重要的影响因素——碱溶液浓度的影响, 在该体系中对此影响因素的研究, 至今未见报道.

### 1 原 理

Luminol 是常用的发光剂之一. 早在 1928 年 Albrecht 便证明了它在碱性介质中具有发光作用. 然而, 邻苯三酚也是一种很好的发光剂. 因此, 在本研究体系中不另外添加 Luminol, 仅依据邻苯三酚自身在自氧化过程中所产生的化学发光便可进行

\* 山东省自然科学基金资助课题 (Y98D02050).

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1999-01-05

定量分析. 故推测本改进体系的测定原理可能是: 首先邻苯三酚在碱性条件下自氧化, 产生高能活性氧  $O_2^{\cdot -}$ .  $O_2^{\cdot -}$  作为单电子氧化剂迅速与邻苯三酚作用, 使其进一步氧化, 生成一系列复杂的激发态氧化产物, 当它们退激返回基态时, 发出化学冷光. SOD 是专以  $O_2^{\cdot -}$  为底物的金属酶, 当体系中有 SOD 存在时, 由于 SOD 能使  $O_2^{\cdot -}$  发生酶促歧化反应, 从而消除  $O_2^{\cdot -}$  而抑制发光. SOD 活力愈强, 抑制发光的百分数就愈高. 据此可测定酶的活力. 测定原理见图 1.

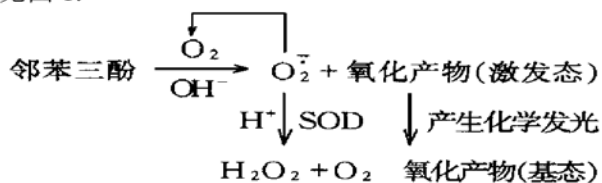


图 1 邻苯三酚-碳酸盐缓冲液化学发光体系的测定原理

## 2 材料与方 法

### 2.1 试剂

邻苯三酚, A. R 级, 贵州遵义市第二化工厂产品. 以 10 mmol/L HCl 配成 0.01 mol/L 储液, 于冰箱存放, 使用前用重蒸水稀释浓度至  $2.5 \times 10^{-4}$  mol/L. 0.01 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液 (A. R 级), 用前新鲜配制. pH 值用酸度计准确调至 9.95. SOD, 上海丽珠东风生物技术有限公

司产牛血 SOD. 用 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.8, 内含 0.1 mmol/L EDTA) 配制成  $10^5 \mu\text{g/L}$  的储液, 于冰箱存放, 用前逐级稀释. 实验所用水为自制二次蒸馏水.

### 2.2 主要仪器

pHS-3C 型数字酸度计 (国营杭州万达仪器厂), OX-7 型化学发光分析仪 (Tohoku Electronic Industrial Co. Ltd., Japan).

### 2.3 方法

**2.3.1 邻苯三酚-碳酸盐缓冲液发光体系及其测定:** 向  $\text{H}12 \times \varnothing 44$  mm 的不锈钢样品池中分别注入 10  $\mu\text{l}$  0.05 mol/L PBS 缓冲液、50  $\mu\text{l}$   $2.5 \times 10^{-4}$  mol/L 邻苯三酚、940  $\mu\text{l}$  0.01 mol/L pH 9.95 的碳酸盐缓冲液, 总体积为 1 ml. 上述三种试剂加样时分别置于样品池中的不同部位, 彼此间互不接触, 测前快速混匀后, 立即上机测定. 快门 10 s, 温度 30  $^{\circ}\text{C}$ . 测定数据由仪器所带计算机自动记录处理. 每个样品平行测三次, 取峰值平均值进行定量. 发光强度以计数 (counts) 表示.

**2.3.2 SOD 活力测定及抑制率计算:** 按 2.3.1 步骤操作, 以 10  $\mu\text{l}$  一定浓度的 SOD 溶液代替 PBS 进行实验. 以空白对照的发光强度值为 100%, 可计算出加入 SOD 后抑制发光的程度.

$$\text{抑制率 \%} = \frac{(\text{空白发光峰值} - \text{本底}) - (\text{加 SOD 的发光峰值} - \text{本底})}{(\text{空白发光峰值} - \text{本底})} \times 100\%$$

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同邻苯三酚体系化学发光测定结果比较

图 2 为三种邻苯三酚体系之发光曲线. 其中曲线 a 为本文省去 Luminol 后改进体系的发光曲线, 曲线 b 为在本改进体系中加入 Luminol (1 mmol/L, 0.31 ml, 碳酸盐缓冲液加入量相应减少 0.31 ml) 的发光曲线, 曲线 c 为现常用的邻苯三酚-Luminol 体系的发光曲线 (操作参见文献 [2, 5~7]). 由图 2 可看出, 在相同条件下, 本改进体系的发光强度高于加 Luminol 者, 且本文体系有峰值出现, 便于以峰值准确定量. 而曲线 b 基本无峰值. 曲线 c 的峰值大大高于本改进体系, 那是因为它所用的邻苯三酚浓度 ( $6.25 \times 10^{-4}$  mol/L)、碳酸盐缓冲液浓度 (0.05 mol/L) 及 pH (10.2) 均高于本改进体系所致. 虽然曲线

c 体系的发光峰值很高, 但其测定灵敏度却大大低于本改进方法, 见图 3. 图 3 为同一 SOD 在不同邻苯三酚体系中抑制  $O_2^{\cdot -}$  的实验结

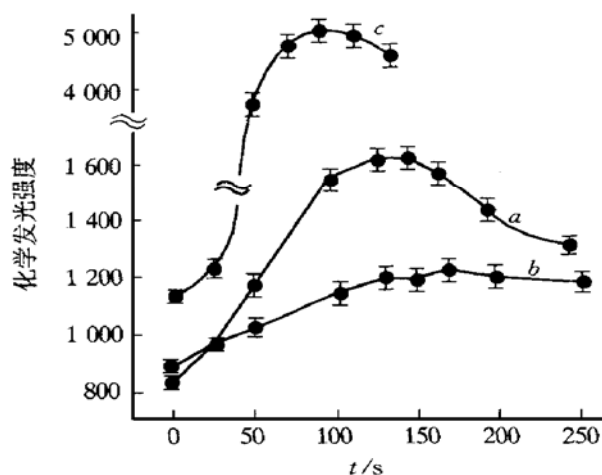


图 2 邻苯三酚体系发光曲线

果. 其中曲线 *a* 和 *c* 所在体系同图 2, 曲线 *d* 为邻苯三酚分光测定法 (Marklund 法, 操作参见文献 [1, 3]). 图 3 呈典型的酶活力测定曲线, 与文献 [1, 2, 6] 报道相吻合. 从图 3 中可求出抑制发光 50% 时 SOD 浓度 ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/L}$ ). 本改进体系  $IC_{50}$  为  $10 \mu\text{g/L}$ , 远高于现常用的邻苯三酚-Luminol 化学发光体系 ( $IC_{50}$  为  $270 \mu\text{g/L}$ ) 及邻苯三酚分光测定法 ( $IC_{50}$  为  $300 \mu\text{g/L}$ ).

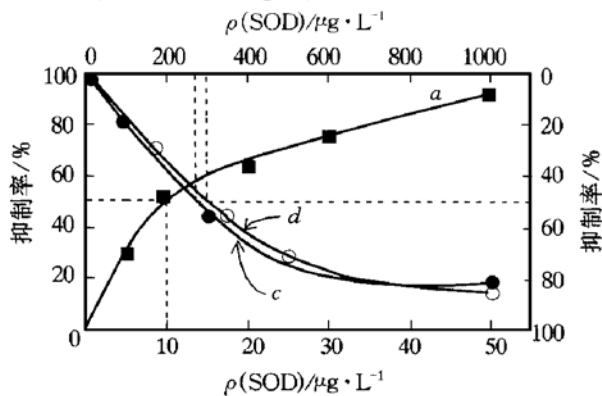


图 3 SOD 抑制发光曲线

### 3.2 邻苯三酚浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

固定碳酸盐缓冲液 (pH 9.95) 浓度及加入量, 抑制实验中 SOD 用量也固定, 仅改变邻苯三酚浓度 (加入量不变), 实验结果如图 4. 化学发光强度随邻苯三酚浓度增加而线性增加, 但 SOD 抑制率却迅速下降. 邻苯三酚浓度愈高, 自氧化所产生的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  就愈多, 所需抑制剂 SOD 的用量自然也就愈多, 从而导致测定灵敏度降低. 当邻苯三酚浓度很低时, 体系的发光强度值也很低, 已基本无峰值, 不便于准确读数. 故综合考虑空白发光峰值及 SOD 抑制率两方面因素, 本文选邻苯三酚浓度为  $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  进行实验.

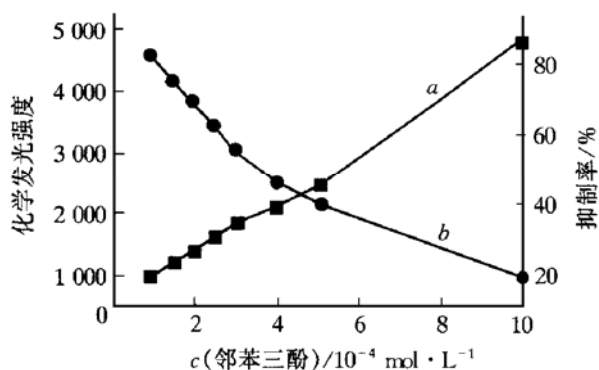


图 4 邻苯三酚浓度对发光强度及 SOD 抑制率的影响  
a: 邻苯三酚浓度与化学发光强度之关系; b: 邻苯三酚浓度与抑制率之关系.

### 3.3 碳酸盐浓度对发光强度及测定灵敏度的影响

固定邻苯三酚浓度及加入量, 同时固定抑制实验中 SOD 用量, 仅改变碳酸盐缓冲液 (pH = 9.95) 浓度进行实验, 结果见图 5. 可以看出, 碳酸盐缓冲液浓度对体系的影响甚大. 其浓度增大时, 化学发光强度增强, SOD 抑制率下降. 由于浓度愈低, 碳酸盐缓冲液 pH 值的稳定性愈差, 本文选碳酸盐缓冲液浓度  $0.01 \text{ mol/L}$  为适宜的测定条件.

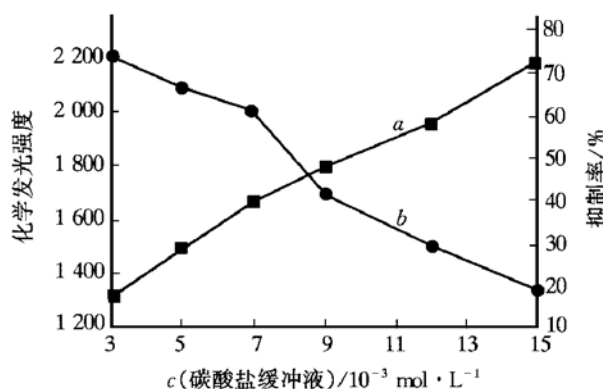


图 5 碳酸盐缓冲液浓度对发光强度及 SOD 抑制率的影响  
a: 碳酸盐缓冲液浓度对发光强度的影响; b: 碳酸盐缓冲液浓度对抑制率的影响.

### 3.4 pH 对发光强度及测定灵敏度的影响

在本测定体系中, 其他条件不变, 并固定抑制实验中 SOD 用量, 仅改变碳酸盐缓冲液的 pH 值, 实验结果见图 6. 体系碱性愈强, 邻苯三酚自氧化

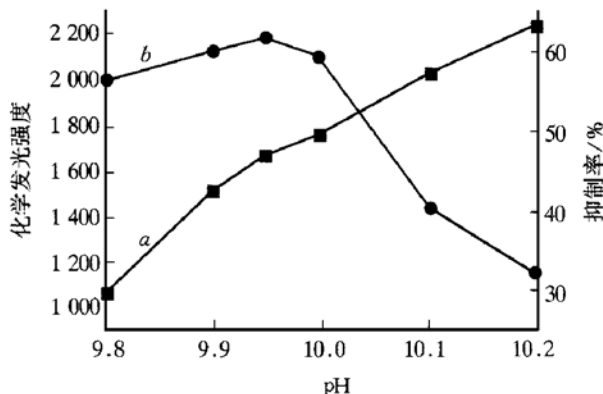


图 6 pH 对发光强度及测定灵敏度的影响  
a: pH 对发光强度的影响; b: pH 对 SOD 抑制率的影响.

速率愈高, 化学发光强度愈高. 另外, pH 也同样影响 SOD 的抑制率. 当  $\text{pH} > 10$  时, SOD 抑制率迅速下降. 这可能是因为过高的 pH 降低了酶的活性之故. 当  $\text{pH} 9.80 \sim 10.00$  时, SOD 抑制率较高且变化不大. 在  $\text{pH} 9.80$  时, 虽然 SOD 抑制率仍比

较高, 但体系发光强度值太低, 已没有明显的峰值, 不便于准确读数. 故本实验选 pH 9.95 为适宜的测定条件.

### 3.5 本测定体系的光谱特性

按2.3.1步骤进行空白实验, 再在样品池上方加盖不同波长的滤光片, 测定其发光的透光率, 结果见图 7. 420 nm 处透光率最高, 故本实验条件下, 本改进发光体系所发出光的波长为 420 nm 左右.

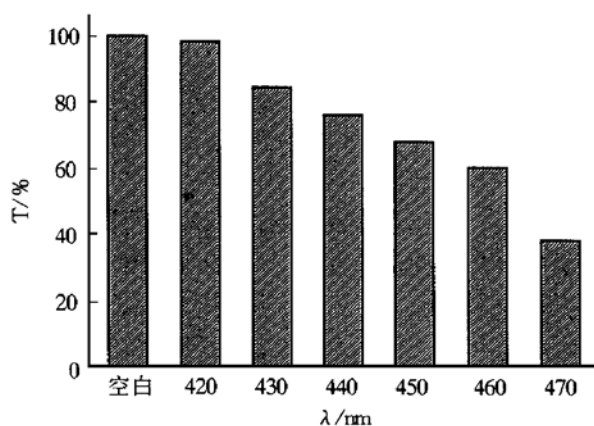


图 7 波长与透光率之关系

### 3.6 实验方法的可靠性

本体系测定结果较稳定, 空白实验结果批内变异系数 (CV%) 为 1.9% ( $n=8$ ), 批间变异系数为 3.5% ( $n=6$ ). 表明本改进方法较可靠.

**致谢** 本校化学系九八届毕业生王宏生参加大部分实验. 本文后期工作得到胡天喜教授热情指导. 在此一并深表谢意.

### 参 考 文 献

- 1 Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, **47**: 469~ 474
- 2 郭嵩光, 王振镒 (Guo A G, Wang Z Y). 邻苯三酚自氧化-化学发光法测定 SOD 活性. *植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications)*, 1989, (3): 54~ 57
- 3 袁勤生, 陈浩, 周刚宏等 (Yuan Q S, Chen H, Zhou G H,

*et al*). 超氧化物歧化酶测定方法的比较. *中国药理学杂志 (Chin Pharm J)*, 1994, **29** (11): 679~ 681

- 4 陈执中 (Chen Z Z). 超氧化物歧化酶和自由基的测定及其在医药科学研究中的应用进展. *中国药理学杂志 (Chin Pharm J)*, 1998, **24** (10): 582~ 584
- 5 张尔贤, 罗伊淳, 俞丽君, 等. 油柑清除活性氧作用研究 I ——化学发光评价. 见: 方允中, 郑荣梁, 沈文梅主编. 自由基生命科学进展, 第 1 集. 北京: 原子能出版社 (Zhang E X, Luo Y C, Yu L J, *et al*. In: Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M eds. *Advances in Free Radical Life Sciences*, **Vol 1**. Beijing: Atomic Energy Press), 1993. 118~ 125
- 6 张尔贤, 俞丽君, 肖湘, 等. 生物分子组成的小分子单体与活性氧相互作用的研究. 见: 方允中, 郑荣梁, 沈文梅主编. 自由基生命科学进展, 第 4 集. 北京: 原子能出版社 (Zhang E X, Yu L J, Xiao X, *et al*. In: Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M eds. *Advances in Free Radical Life Sciences*, **Vol 4**. Beijing: Atomic Energy Press), 1996. 75~ 79
- 7 胡天喜. 测量活性氧、自由基及脂质过氧化物的化学发光技术. 见: 郑荣梁主编. 自由基生命科学进展, 第 5 集. 北京: 原子能出版社 (Hu T X. In: Zheng R L eds. *Advances in Free Radical Life Sciences*, **Vol 5**. Beijing: Atomic Energy Press), 1997. 65~ 73
- 8 张尔贤, 俞丽君, 肖湘 (Zhang E X, Yu L J, Xiao X). 鼠尾藻多糖清除氧自由基作用的研究. *中国海洋药物杂志 (Chin Marine Pharm J)*, 1995, **1**: 1~ 4
- 9 李雪华, 龙盛京, 朱春玲, 等 (Li X H, Long C J, Zhu C L, *et al*). 三种根茎类食物抗氧自由基的比较研究. *食品科学 (Food Science)*, 1998, **19** (2): 12~ 14

**Study On Chemiluminescence System of Pyrogallol-Carbonate Buffer Solution.** XU Shen-Hong, HANG Hu ( *Department of Chemistry, Qingdao University, Qingdao 266071, China*).

**Abstract** The chemiluminescence behaviour of pyrogallol alkali autoxidation produced  $O_2^{\cdot-}$  was studied. The optimum conditions were investigated by examining the influence of various factors. The improved method needn't to use the luminous agent —— luminol, the reagents used are cheap, both the stability and reproducibility are good, and the sensitivity is far higher than the report of other method of pyrogallol autoxidation.

**Key words** chemiluminescence, pyrogallol autoxidation, superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutase (SOD)