

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0972.2009.03.034

番红褪色法检测羟自由基清除效果研究

祁红兵^{1*}, 陆萍², 陈钧³

(1. 信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000; 2 励才实验学校, 江苏 姜堰 225300;
3 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要:根据 Fenton 反应原理, 利用番红作为显色剂检测由 EDTAN_{a2}-Fe()-H₂O₂ 体系产生的 ·OH。番红褪色光度法测定清除羟自由基的最佳反应条件为: 往 10 mL 具塞试管中, 依次加入 pH7.4 的磷酸缓冲液 1.0 mL, 番红溶液 (520 mg/L) 0.2 mL, EDTAN_{a2}-Fe() (0.0038 mol/L) 1.0 mL, 不同浓度的样品溶液 0.1 mL, 最后加入 0.25% H₂O₂ 0.5 mL, 双蒸水稀释至刻度后于 40 °C 保温 30 min, 紫外-可见分光光度法 519 nm 处测吸光度 A。

关键词:羟自由基; 清除作用; 分光光度法

中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-0972(2009)03-0448-03

The Method of Detecting Hydroxyl Radical Scavenged by Faded Safranin

QI Hong-bing^{1*}, LU Ping², CHEN Jun³

(1. College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China;

2. School of Licai Pilot, Jiangyan 225300, China;

3. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Based on the principle of Fenton reaction, the ·OH produced by the EDTAN_{a2}-Fe()-H₂O₂ system can be detected by using safranin as developer. The optimal experimental conditions is evaluated: 1.0 mL pH7.4 phosphate buffer, safranin (520 mg/L) 0.2 mL, EDTAN_{a2}-Fe() (0.0038 mol/L) 1.0 mL, and 0.25% H₂O₂ 0.5 mL. All these agent must be added one by one into the 10 mL capped test tube. Redistilled water was diluted to graduation line, then incubated at 40 °C. The amount of hydroxyl radical produced in the system can be indirectly assayed through absorbance change at a wavelength of 519 nm (A₅₁₉) by means of UV-VIS spectrophotometer.

Key words: hydroxyl radical; scavenging activity; spectrophotometry

自由基是带有未成对电子的分子或离子, 具有很高的反应活性, 它们一旦产生将很快与周围分子发生反应, 导致各种破坏作用。自由基氧化及其中间产物严重伤害生物膜、酶、维生素、蛋白质及活细胞功能, 其中一些还是公认的致癌物^[1], 现已明确许多疾病, 如: 肿瘤、炎症、心脑血管缺血、动脉粥样硬化等等, 都与自由基有关。而自由基在食品和化工产品氧化中的作用更是众所周知, 因此有关抗氧化剂清除自由基的研究得到普遍关注^[2-4]。其中饮食中的抗氧化剂长期以来都是学者研究的热点^[5]。目前抗氧化测定常用的方法主要基于两

类^[5]: 通过测定样品抑制脂类物质氧化的能力来评定被测物的抗氧化能力; 用样品对人工生成的自由基的清除能力来反映待测物的抗氧化活性。本实验是用样品对人工生成的羟自由基 (·OH) 的清除能力来反映待测物的抗氧化活性。

研究发现, 在羟自由基的作用下, 显色剂番红可被氧化, 从而其吸光度发生变化, 其大小可表征羟自由基的攻击效果; 羟自由基产生得越多, 则 A 越大, 可以间接表示羟自由基的产生量, 从而测得样品的抗氧化性。

收稿日期: 2008-11-11; 修订日期: 2009-03-16; *, 通讯联系人, E-mail: qhbing2006@mail2.xytc.edu.cn

基金项目: 信阳师院青年骨干教师资助计划

作者简介: 祁红兵 (1971-), 男, 河南潢川人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物研究与开发工作。

1 材料与仪器

1.1 药品试剂

番红花红 O, 过氧化氢, EDTANa₂, FeSO₄ · 7H₂O, Na₂HPO₄ · 12H₂O, KH₂PO₄, 苯甲酸, 甘露醇, 均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器:

UV-2120 PCS型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

HH-S数显恒温水浴锅, 中国江苏金坛市医疗器械厂。

2 实验方法

实验条件的确定^[6]: ·OH 由 EDTANa₂-Fe()-H₂O₂体系产生, 由于 ·OH 可特异地使番红褪色, 根据褪色程度用比色法来衡量 ·OH 的含量。反应体系大致为: 在 10 mL 具塞试管中, 依次加入 1.0 mL pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.2 mL 番红溶液 (520 mg/L), 1.0 mL 0.003 8 mol/L EDTANa₂-Fe() 溶液, 再加入不同浓度的样品溶液, 最后加入 0.5 mL 0.25% H₂O₂ 溶液, 双蒸水补足至 10 mL, 混合均匀后于 40 °C 水浴保温一定时间, 在 519 nm 波长处测吸光度 (A) 值。空白组以等体积的双蒸水代替样品溶液; 对照组以等体积的双蒸水代替样品溶

液和 EDTA-Na₂-Fe() 溶液。实验结果以清除率 IC 表示:

$$IC = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}),$$

其中 IC₅₀ 表示清除率为 50% 时的样品浓度。每组数据均为 3 个重复的平均值。

采用羟自由基清除剂苯甲酸和甘露醇检测清除自由基的效果, 以验证该方法有效性。

3 实验结果

3.1 吸收光谱曲线测定

在紫外分光光度计上对番红试剂进行扫描, 获得吸收光谱曲线, 图 1 表明最大吸收波长在 519 nm, 故选择 519 nm 为测定吸收波长。

3.2 H₂O₂ 量的确定

加入不同体积的 0.25% 过氧化氢溶液, 反应后测其吸光度差 A₅₁₉。如图 2 表明, 过氧化氢用量在 0.4 ~ 0.8 mL, 吸光度差 A₅₁₉ 变化缓慢, 故本实验过氧化氢的用量选用 0.5 mL。

3.3 Fe²⁺ 加入量的确定

由图 3 可以看出, 随着 0.003 8 mol/L Fe²⁺ 加入量的增加, 吸光度差 A₅₁₉ 逐渐增大。在加入量少于 1.0 mL 时, 吸光度差 A₅₁₉ 增加明显, 此后变得平稳, 因此 Fe²⁺ 加入量选择在 1.0 mL 为宜。

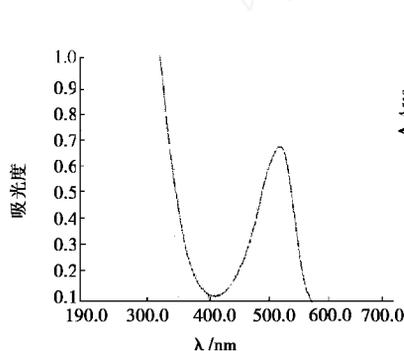


图 1 吸收光谱曲线

Fig 1 Curves of UV absorption spectrum

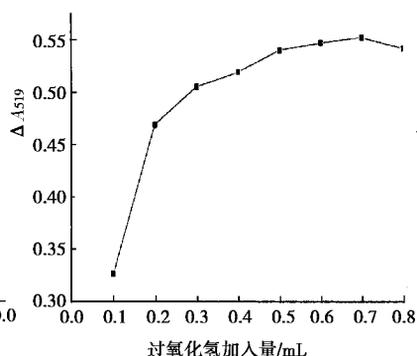


图 2 过氧化氢加入量对吸光度变化影响

Fig 2 Effect of amounts of H₂O₂

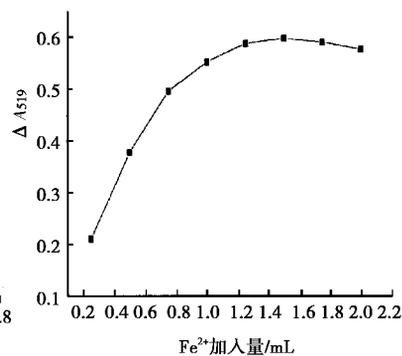


图 3 Fe²⁺ 加入量对吸光度变化的影响

Fig 3 Effect of amounts of Fe²⁺

3.4 反应时间的确定

由图 4 可以看出, 随着反应时间的增加, 吸光度差 A₅₁₉ 逐渐增大。反应时间在 30 min 以前, 吸光度差 A₅₁₉ 增加明显, 此后逐渐平稳, 因此反应时间选择在 30 min 为宜。

3.5 缓冲液 pH 的确定

由图 5 可知, 不同 pH 条件下, 吸光度差有明

显变化, 当 pH 在 7.4 时, 吸光度差值 A₅₁₉ 最大, 因此, 本实验选择 pH7.4 为最适反应条件。

3.6 缓冲液加入量的确定

由图 6 可以看出, 缓冲液加入量在 0.4 ~ 1.8 mL 之间时, 吸光度差 A 变化缓慢, 所以, 本实验选取 1.0 mL 作为加入量。

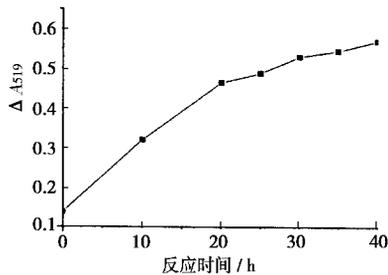


图 4 反应时间对吸光度变化的影响

Fig 4 Effect of reaction time

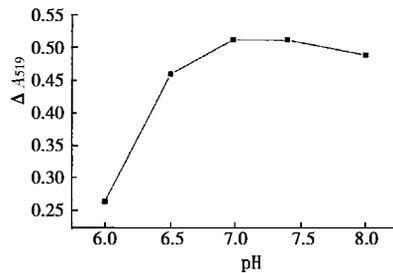


图 5 pH 值对吸光度变化的影响

Fig 5 Effect of the buffer of pH

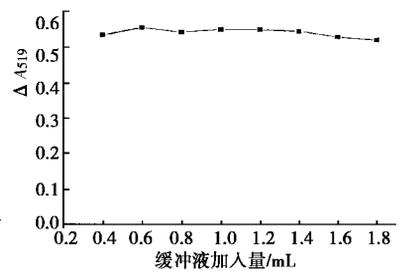


图 6 缓冲液加入量对吸光度变化的影响

Fig 6 Effect of amounts of buffer solution

3.7 显色稳定性实验结果

40 下反应结束后,室温下吸光度差 A_{519} 下降缓慢(表 1),可见此法具有较好的稳定性。

表 1 显色稳定性实验结果

Tab 1 Stability of the colour reaction system

放置时间 /min	A_{519}
0	0.484
15	0.482
30	0.481
60	0.478
90	0.477

3.8 抗氧化剂的羟自由基清除曲线

苯甲酸和甘露醇为羟自由基清除剂,检测其清除自由基的效果,以验证该方法有效性。使用优化的实验方法:在 10 mL 具塞试管中,依次加入 pH 7.4 的磷酸缓冲液 1.0 mL,番红溶液(520 mg/L) 0.2 mL,0.003 8 mol/L EDTAN_a-Fe() 溶液 1.0 mL,再加入不同体积的 0.1 mol·L⁻¹ 的苯甲酸和甘露醇溶液,最后加入 0.075% H₂O₂ 溶液 0.5 mL,双蒸水补足至 10 mL,混合均匀后于 40 °C 水浴保温 30 min,在 519 nm 波长处测吸光度(A) 值,绘制出羟自由基清除曲线。实验结果如图 7 所示,以番红-EDTAN_a-Fe()-H₂O₂ 体系检测,苯甲酸和甘露醇的羟自由基清除率呈现明显的量效关系。

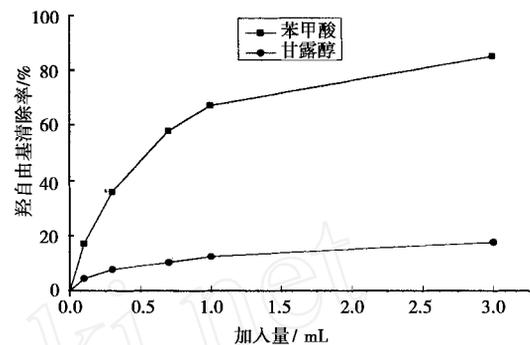


图 7 抗氧化剂与清除率的量效关系

Fig 7 Dose-effect relationship between antioxidant and clearance rate

4 结论

Fenton 反应是机体产生羟自由基的重要机理,羟自由基是造成组织脂过氧化、蛋白质解聚、聚合、核酸断裂、多糖解聚的重要活性氧。羟自由基清除率是反应药物抗氧化作用的重要指标。番红褪色方法简便实用,稳定可靠,易为一般实验室采用。而离体测羟自由基方法如电子自旋共振法、化学发光法、细胞色素 C 氧化法、无机荧光法等,或者仪器特殊,或者试剂昂贵,使之应用受到限制。因此,该方法对离体大面积筛选清除自由基的天然抗氧化剂,研究清除羟自由基的机理有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science (S0036-8075), 1987, 235 (4788): 529-531.
- [2] Scott G. Antioxidants [J]. Bull Chem Soc Jpn (S0009-2673), 1998, 61: 165-170.
- [3] Graf E. Antioxidant potential of fentic acid [J]. Free Radical Biology & Medicine (S1082-0132), 1992 (13): 435-448.
- [4] 曹国锋,翁新楚. 鱼油氧化稳定性的研究 () [J]. 中国油脂, 1995, 20 (5): 44-46.
- [5] 张丽平,童华荣. 抗氧化能力测定方法的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2004 (3): 108-113.
- [6] 章立伟,王金山,江崇球. 超临界流体 CO₂ 萃取中药有效成分的抗氧化成分的分光光度法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24 (9): 103-105.

责任编辑:任长江