

Fenton-亚甲基蓝化学发光体系测定保健品 对羟自由基的清除率^①

蔡卓^② 张娴 李园 江彩英 卢登峰 莫丽君

(广西大学化学化工学院 南宁市大学东路 100 号 530004)

摘要 建立了 $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ -亚甲基蓝化学发光新体系并用于测定保健品对羟自由基的清除率。实验发现,在酸性条件下, Fe^{2+} 和 H_2O_2 在线生成的羟自由基($\cdot\text{OH}$)能与亚甲基蓝产生极强的化学发光,加入保健品溶液后可部分清除体系产生的羟自由基,降低化学发光强度。据此,结合流动注射技术,建立了一种简单、快速、高效测定保健品对羟自由基清除率测定的化学发光新方法。对 $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ -亚甲基蓝反应体系进行平行测定($n=11$),测得该法的相对标准偏差为 0.39%。将该法用于市售保健品清除羟自由基的测评,获得满意结果。

关键词 化学发光;羟自由基;流动注射;亚甲基蓝

中图分类号: O657.39 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-8138(2011)02-0583-04

1 引言

自由基与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬等有很大关系,其中羟自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基^[1],它能够很容易地氧化各种有机物和无机物,是造成组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解的主要因素之一,其作用与机体的衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关。对此,在生物医学领域内,有关于羟自由基的研究非常活跃。本文所用保健品为市售常见保健品,其有效成分大多为中草药和植物的提取液,具有较强的抗氧化能力,然而有关这类保健品对自由基的清除作用的研究尚未见报道。

目前,羟自由基清除率的测定方法主要有电子自旋共振法(ESR)^[2]、荧光光谱法^[3]和高效液相色谱法^[4]等。这些方法存在仪器昂贵、操作复杂、灵敏度低等缺点。化学发光法具有仪器简单、灵敏度高、测定快速等优点,近年来已被用于抗自由基活性药物的研究和筛选^[5]。亚甲基蓝是一种荧光试剂,已被应用于光度和荧光分析中,但用作化学发光试剂报道甚少。Fenton 反应是产生 $\cdot\text{OH}$ 的经典反应,被认为是可模拟人体内产生 $\cdot\text{OH}$ 过程。实验发现,在无增敏剂的情况下,Fenton 试剂中 Fe^{2+} 和 H_2O_2 在线生成的 $\cdot\text{OH}$ 能与亚甲基蓝反应产生极强且稳定的化学发光信号,据此结合流动注射技术建立了一种测定羟自由基清除率的化学发光新方法。将该法用于保健品清除 $\cdot\text{OH}$ 作用的研究,结果满意。

① 广西自然科学基金资助项目(2010GXNSFA013001)

② 联系人,电话:(0771)6196022; E-mail:zhuocai@gxu.edu.cn

作者简介:蔡卓(1959—),男,广东省台山市人,博士,副教授,主要从事分析化学的教学与科研工作。

2 实验部分

2.1 主要仪器与试剂

IFFM- Ξ 流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈分析仪器有限公司)。

硫酸溶液($0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$):准确移取 4.2mL 浓 H_2SO_4 于盛有少量水的烧杯中,冷却后转移至 100mL 容量瓶中,用水定容;亚甲基蓝溶液($2.0\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$):准确称取亚甲基蓝 0.1870g,用少量水溶解,再转移至 250mL 容量瓶中,用水定容; Fe^{2+} 溶液($1\times 10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$):准确称取六水合硫酸铁(II) 铵 0.1961g,加入 0.8mL $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸将其溶解,然后转移至 100mL 容量瓶中,用水定容(Fe^{2+} 易水解,用时现配);0.48% H_2O_2 (体积比):准确移取 H_2O_2 标准液 0.48mL 至 100mL 棕色容量瓶中,以水定容,摇匀。所用试剂均为分析纯。实验用水为去离子水。

2.2 实验方法

实验流程如图 1 所示。管路为内径 0.8mm 的聚四氟乙烯管(PTFE),采样环体积为 $75\mu\text{L}$ 。以峰高定量,以去离子水为空白测出信号 I_0 ,以样品溶液测出信号 I_s ,光强差 $\Delta I = I_0 - I_s$,每种保健品对羟自由基的清除率 S 可用公式(1)来计算:

$$S = [(I_0 - I_s) / I_0] \times 100\% \quad (1)$$

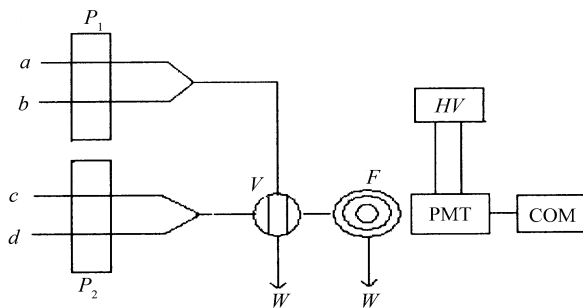


图 1 流动注射化学发光分析流路图

a ——六水合硫酸铁(II) 铵溶液($2\times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); b ——样品溶液或水; c ——亚甲基蓝溶液($9.6\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); d —— H_2O_2 (0.48%); P_1 ——主蠕动泵; P_2 ——副蠕动泵; V ——三通阀; F ——流通池; W ——废液; HV ——负高压; PMT——光电倍增管; COM——计算机。

3 结果与讨论

3.1 化学发光动力学曲线

$\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ -亚甲基蓝反应体系产生的化学发光,在溶液混合后约 3.5s 光强达最大值,约 6.0s 发光强度衰减至基线(见图 2a),加入保健品后,发光强度明显减弱(见图 2b)。

3.2 条件优化实验

3.2.1 流路参数选择

(1) 流路的选择:考察了不同流路对化学发光强度的影响。结果表明,采用图 1 所示的流路,化学发光强度最大且稳定,因此选择图 1 流路。

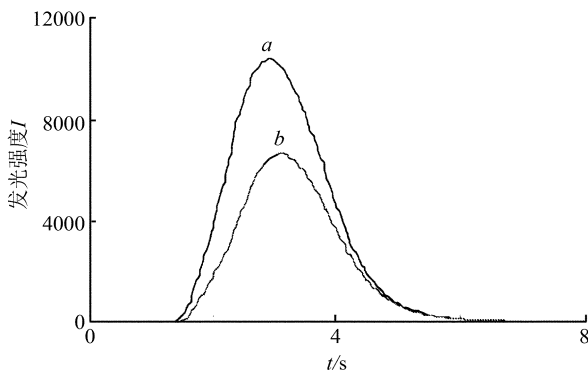


图 2 化学发光动力学曲线

a —— $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 +$ 亚甲基蓝; b —— $a +$ 保健品。

35—70 r · min⁻¹ 区间, 发光强度随着副泵泵速的增加而增大, 在 70 r · min⁻¹ 处达到最大值, 之后趋于平缓。综合考虑发光强度及试剂的用量, 本实验采用主泵泵速为 40 r · min⁻¹, 副泵泵速为 70 r · min⁻¹。

(3) 负高压的影响: 实验发现, 发光强度随着负高压增加而增大, 考虑到仪器承受电压及灵敏度, 本实验选择负高压为 750V, 增益为 1。

3.2.2 反应介质及浓度的影响

考察了 H₂SO₄ 浓度对体系发光强度的影响, 结果表明, 当 H₂SO₄ 浓度为 8.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ 时体系能达到最强发光, 因此选用 H₂SO₄ 浓度为 8.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹。

3.2.3 亚甲基蓝浓度的影响

考察了亚甲基蓝浓度对体系发光强度的影响。结果表明, 在浓度为 9.60 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 时, 发光强度达到最大, 且发光信号稳定。因此选用的亚甲基蓝溶液的浓度为 9.60 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹。

3.2.4 Fe²⁺ 溶液的影响

考察了 Fe²⁺ 溶液在 1.0 × 10⁻³—2.6 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 浓度范围内对体系发光强度的影响。结果表明, Fe²⁺ 溶液浓度对化学发光强度的影响很大, 且两者几乎呈线性关系, 考虑到试剂用量和发光强度, 选择 2.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 为 Fe²⁺ 溶液的最佳浓度。

3.2.5 H₂O₂ 的影响

实验考察了 H₂O₂ 浓度对体系发光强度的影响, 结果表明, 在体积分数为 0.48% (即浓度为 0.045 mol · L⁻¹) 时发光强度达到最大, 因此, 选用 H₂O₂ 浓度为 0.045 mol · L⁻¹。

3.3 体系的稳定性及方法的精密度

在最佳条件下, 按实验方法在 0、2、4、6、8h 测定体系的化学发光强度, 结果表明, 化学发光强度在 4h 之内基本不变, 表明该化学发光体系稳定性较好。按实验方法对 11 份 Fe²⁺-H₂O₂-亚甲基蓝反应体系进行测定, 其化学发光强度的相对标准偏差为 0.39%。

3.4 6 种保健品抗氧化活性的比较

在最佳实验条件下, 测定同一浓度的各类保健品对羟自由基的清除率, 按公式(1) 计算各种保健品的羟自由基清除率(如表 1)。结果表明, 在 6 种保健品中蜂蜜的抗氧化活性最强。

表 1 相同浓度保健品对羟自由基的清除率

(n = 3)

	相对发光强度 ΔI	S(%)
蜂蜜	8686	79.4
百年乐	6606	60.4
脑心舒	6260	57.2
生脉饮	4937	45.1
黄芪精	3281	30.0
金钱龟精	3088	28.3

参考文献

- [1] Knight J A · Diseases Related to Oxygen-Derived Free Radicals[J]. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1995, **25**(2): 111—121.
- [2] Espinoza M, Azara C O, Speisky H *et al.* Determination of Reactions Between Free Radicals and Selected Chilean Wines and Transition Metals by ESR and UV-Vis Technique[J]. *Spectrochimica Acta*, 2009, **71**(5): 1638—1643.
- [3] Gomes A, Fernandes E, Lima J L F C. Fluorescence Probes Used for Detection of Reactive Oxygen Species[J]. *Biochem. Biophys. Methods*, 2005, **65**(2/3): 45—80.

- [4] 周建政,董华进,肖文彬等. 用高效液相色谱-电化学检测器法检测 Fenton 反应中的羟自由基[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(4): 299—302.
- [5] 宋爱新,李明静,刘绣华. 化学发光法测定几种怀山药的抗自由基活性[J]. 化学研究, 2000, 11(4): 17—18.

Determination of Hydroxyl Radical Scavenging Rate of Health Products by Fenton–Methylene Blue Chemiluminescence System

CAI Zhuo ZHANG Xian LI Yuan JIANG Cai-Ying LU Deng-Feng MO Li-Jun

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, P. R. China)

Abstract A novel and effective chemiluminescence method for determination of hydroxyl radical scavenging rate was established based on $\text{Fe}^{2+}-\text{H}_2\text{O}_2$ -methylene blue chemiluminescence system. In an acid media, a strong chemiluminescence signal occurred when methylene blue solution mixed with Fenton reagent, then the signal decreased after the health products was added to the system due to hydroxyl radicals produced from Fenton reagent were scavenged partially in the solution. This phenomenon was the basis of determining hydroxyl radical scavenging rate. The relative standard deviation for 11 measurements of each sample was 0.39%. This method was successfully used to evaluate the antioxidant activity of commercially available health products and good results were obtained.

Key words Chemiluminescence; Hydroxyl Radical; Flow Injection; Methylene Blue

17 种科技期刊单篇论文的平均售价

刊名	刊期	开本	每期页码	单价(元)	论文篇数	单篇论文的平均售价(元)	单篇论文平均售价高低的排序 ^①
福建分析测试	双月	大 16	64	5	18	0.27	1
理化检验(化学分册)	月	大 16	144	15	48	0.31	2
分析科学学报	双月	大 16	124	10	30	0.33	3
分析化学	月	大 16	160	15	40	0.38	4
岩矿测试	双月	大 16	100	10	25	0.40	5
分析测试学报	月	大 16	124	12	28	0.42	6
光谱实验室	双月	16	496	60	115	0.56	7
分析试验室	月	大 16	124	18	30	0.60	8
中国激光	月	大 16	320	35	58	0.60	8
高等学校化学学报	月	大 16	188	30	40	0.75	9
冶金分析	月	大 16	80	15	19	0.79	10
质谱学报	双月	大 16	64	15	17	0.88	11
光学学报	月	大 16	216	40	40	1.00	12
化学通报	月	大 16	96	20	18	1.11	13
化学学报	半月	大 16	120	20	18	1.11	13
量子电子学报	双月	大 16	128	30	25	1.20	14
钢铁研究学报	月	大 16	64	20	15	1.33	15

2011 年《光谱实验室》 征订启事

《光谱实验室》, 双月刊, 16 开, 每册 496 页, 发表论文约 115 篇, 单月 25 日出版。单价: 60 元/册; 年价: 360 元/卷。单篇论文平均售价(单价与发表论文篇数之比)的排序, 在 17 种科技期刊中为 7(右表), 居中。

欲订阅的读者请到当地国家邮电局(所)办理订阅手续, 邮发代号为 82-863。错过时间者, 可通过电子邮件(发到 gpsys@periodicals.net.cn)与本编辑部联系直接订阅。

《光谱实验室》编辑部