

同步荧光光谱比率法检测过氧亚硝酸根及其清除剂的研究

杜俊鸥, 郭祥群*

厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室,
化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要 利用同步荧光光谱建立了一种新的荧光比率法检测过氧亚硝酸根(ONOO^-)及评价其清除剂的方法。酪氨酸自身有荧光, 在 pH 8.5 的磷酸缓冲溶液中, 酪氨酸与 CO_2 和 ONOO^- 反应生成强荧光的酪氨酸二聚体, 利用同步荧光光谱技术, 在荧光发射光谱中能同时获得酪氨酸单体($\lambda_m = 364 \text{ nm}$)与二聚体的荧光峰($\lambda_m = 406 \text{ nm}$), 且两峰的荧光强度的比值与 ONOO^- 的浓度呈计量相关。结果表明荧光强度的比值不受实验参数改变的影响, 与传统的荧光法相比, 有利于扩大检测的线性范围, 提高灵敏度。荧光强度的比值与 ONOO^- 的浓度在 $1.60 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 6.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系, 线性相关系数为 0.999, 检测限为 $1.84 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对浓度为 $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- 平行测定 8 次, 其相对标准偏差为 2.4%。利用该法测得抗癌药米托蒽醌的 IC_{50} 为 $0.065 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。方法简便易行, 试剂廉价易得, 体系稳定, 可作为一种检测 ONOO^- 及筛选其清除剂的方法。

关键词 同步荧光; 比率法; 过氧亚硝酸根

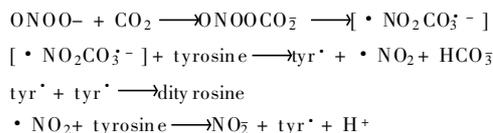
中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)08-1875-04

引言

活性氧是生命活动中不可缺少的活性物质。近年来有关活性氧的检测方法及其清除剂的研究受到了人们的极大关注^[1, 2]。过氧亚硝酸根(ONOO^-)是活性氧的一种, 它能氧化核酸、巯基、脂质等^[3-5], 最终导致细胞的严重损伤, 从而导致许多疾病如发炎过程^[6], 缺血再灌注损伤^[7]和动脉硬化症^[8]等的发生。 ONOO^- 的清除率是评价药物抗氧化作用的重要指标。因此研究 ONOO^- 的测定方法对于研究抗氧化药物的病理作用和药物的药理作用等具有重要意义。

表征 ONOO^- 及其与生物分子反应活性的方法主要有荧光法^[9]、化学发光法^[10]、电子自旋共振法^[11]、自旋标记荧光探针法^[12]和电化学法^[13]等。其中荧光表征技术表征参数多、操作简单、灵敏度高, 在此基础上建立的荧光比率法能更好地提高方法的灵敏度, 且受光源及其他外部环境的干扰较小。荧光比率法的设计原理有荧光共振能量转移、分子内电荷转移、光诱导电子转移、参比法等^[14-17]。本文采用酪氨酸作为探针分子, 在弱碱性介质中及 CO_2 存在下, ONOO^- 氧化酪氨酸生成强荧光的二聚酪氨酸分子, 反应机理见 Scheme 1^[18, 19]。利用同步荧光扫描能同时得到酪氨酸自身

及二聚体的荧光峰, 用比率法检测 ONOO^- , 并应用于 ONOO^- 清除剂对 ONOO^- 清除率的测定。结果表明本法操作简便、不受荧光仪狭缝改变的影响, 灵敏度高, 便于广泛使用。



Scheme 1 Tyrosine dimerization reaction mechanism

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 RF 5301 型荧光光谱仪; Mettler Toledo 320 S pH 计。 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-酪氨酸; $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二乙三胺五乙酸(DTPA, 防止可能存在的微量过渡金属离子的干扰); 米托蒽醌(mitoxantrone, MXT): 取适量的试剂直接溶于二次去离子水中, 配成 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 避光保存于 $\sim 3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

ONOO^- 的制备参照文献^[20]。其浓度以 302 nm 处的吸光度来确定($\epsilon_{302 \text{ nm}} = 1.670 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[21]。将所得溶

收稿日期: 2007-05-10, 修订日期: 2007-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20375032)资助

作者简介: 杜俊鸥, 女, 1982年生, 厦门大学化学化工学院化学系硕士研究生 * 通讯联系人 e-mail: xqguo@xmu.edu.cn

液冷冻于冰箱中保存(-18℃),每次使用前进行浓度校正。

1.2 实验方法

1.2.1 ONOO⁻ 的测定方法

在 10 mL 的比色管中依次加入 0.10 mol·L⁻¹ pH 8.5 的磷酸盐缓冲液, DTPA 1.0 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹, NaHCO₃ 0.015 mol·L⁻¹, L-tyrosine 5.0 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ (以上均为最终浓度)混合 3 min, 加入不同浓度的 ONOO⁻, 定容, 摇匀后进行荧光光谱扫描, Δλ=93 nm。

1.2.2 ONOO⁻ 清除率的测定

按照 1.2.1 步骤操作, 在加入 L-tyrosine 混合后加入 ONOO⁻ 清除剂, 再加入已知浓度的 ONOO⁻, 定容摇匀, 进行荧光光谱测定。

2 结果与讨论

2.1 ONOO⁻ 的测定

2.1.1 反应体系的荧光光谱特性

L-酪氨酸为具有荧光活性的氨基酸(λ_{ex}/λ_{em} = 280 nm/303 nm, 图 1), 在 CO₂ 作用下, 与 ONOO⁻ 作用后生成二聚酪氨酸(λ_{ex}/λ_{em} = 313 nm/406 nm, 图 2)。在高浓度酪氨酸存在下, 其单体荧光强度处于饱和状态。当其与微量 ONOO⁻ 反应后, 单体荧光峰保持不变, 二聚体荧光峰则随 ONOO⁻ 浓度的变化而变化。采用同步荧光光谱扫描, 能同时获得二聚酪氨酸和单体的荧光峰(λ_{em}(二聚体)/λ_{em}(单体) = 406 nm/364 nm)(图 3), 以单体发射为内参比, 两峰强度之比可对 ONOO⁻ 进行定量表征。

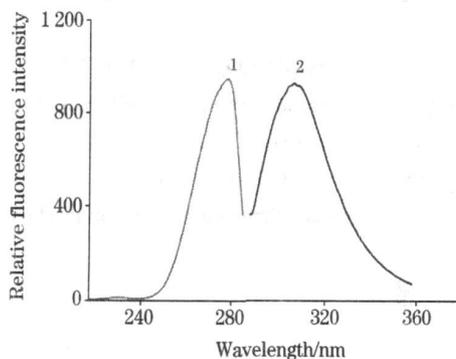


Fig. 1 Excitation (1) and emission (2) spectra of L-tyrosine

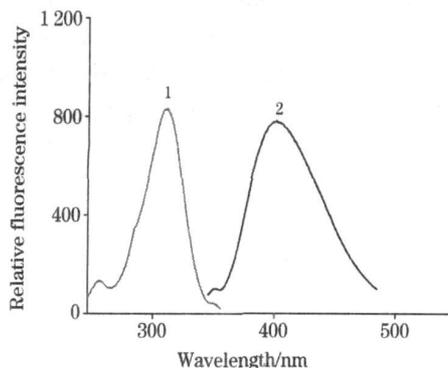


Fig. 2 Excitation (1) and emission (2) spectra of dityrosine

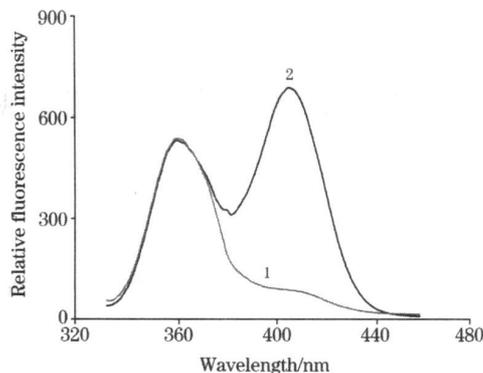


Fig. 3 Synchronous fluorescence spectra of the reaction system

PBS, 0.10 mol·L⁻¹; pH 8.5; Δλ=93 nm. (1): L-tyrosine+ DTPA+ NaHCO₃; (2): L-tyrosine+ DTPA+ NaHCO₃+ ONOO⁻

2.1.2 Δλ 的选择

在可能条件下, 选择等于 Stokes 位移的 Δλ 值是有利的^[21]。为了对产物二聚酪氨酸有最大响应, 选择二聚酪氨酸的最大激发和发射的波长差为所选 Δλ, 即 Δλ=93 nm。

2.1.3 反应时间对体系荧光强度的影响

实验发现, 酪氨酸自身的荧光强度基本保持不变, 而产物二聚酪氨酸的荧光强度在 ONOO⁻ 加入后 50 s 内即达到稳定。

2.1.4 溶液酸度对反应体系荧光强度的影响

按照实验方法, 研究了 pH 6.8~9.1 范围内的磷酸缓冲溶液对二聚酪氨酸与其单体的荧光强度的比值的影响。发现在 pH 8.5~9.1 时, 二者荧光强度的比值比较大且稳定, 故本实验选择 pH 8.5 的磷酸缓冲溶液作为反应介质。

2.1.5 总碳酸盐浓度对体系荧光强度的影响

其他条件不变, 改变 NaHCO₃ 的浓度, 发现其浓度在 0.01~0.02 mol·L⁻¹ 范围内时, 酪氨酸二聚体与单体的荧光强度比值最大且比较稳定, 所以本实验选用 NaHCO₃ 的浓度为 0.015 mol·L⁻¹。

2.1.6 L-酪氨酸的浓度对体系荧光强度的影响

为了使 L-酪氨酸对 ONOO⁻ 与 CO₂ 反应后形成的溶剂笼[·NO₂CO₃⁻] 完全捕获, 选用酪氨酸的浓度远大于 ONOO⁻ 的浓度。当酪氨酸的浓度逐渐增大时, 二聚体与单体的荧光强度的比值逐渐减小。当酪氨酸的浓度大于 4.0 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 时, 荧光强度的比值基本不变, 因此后续研究选用了 L-酪氨酸的浓度为 5.0 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹。

2.1.7 狭缝对荧光强度比值的影响

为了考察同步扫描比率测量的优越性, 考察了仪器测试参数改变(狭缝改变)对比率法的测定结果影响。对于不同浓度的 ONOO⁻, 在狭缝为 5/5 nm 和狭缝为 5/3 nm 时分别用 1.2.1 节中的方法进行分析, 每种浓度平行测定 3 次, 采用线性回归直线作图法, 将狭缝为 5/5 nm 时得到的分析结果作为横轴, 将狭缝为 5/3 nm 时得到的结果作为纵轴, 取相同的坐标标度, 得到 3 条曲线。取置信度为 95%, 对 3 条曲线的斜率和截距根据 *t* 分布进行统计处理, 计算得到斜率和截距的置信区间分别为 (0.929 9, 1.078) 和 (-0.073 75,

0.064 55), 包含了斜率为 1 和截距为 0 的情况, 因此可以认为采用不同的狭缝对荧光强度的比值没有显著影响。

2.1.8 线性范围, 检测限和精密性

在 ONOO⁻ 浓度较低时, 采用 5/5 nm 狭缝, 当 ONOO⁻ 的浓度逐渐增加时, 荧光强度超出了仪器的响应范围, 此时选用较小的狭缝(图 4)。F_{406 nm}/F_{364 nm} 与 ONOO⁻ 的浓度在 1.60×10⁻⁷ mol·L⁻¹~6.00×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 范围内呈线性关系, 线性相关系数为 0.999(n=9), 以 3 倍空白标准偏差计算的检测限为 1.84×10⁻⁸ mol·L⁻¹。对 1.00×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 ONOO⁻ 标准溶液平行测定 8 次, 相对标准偏差为 2.4%。

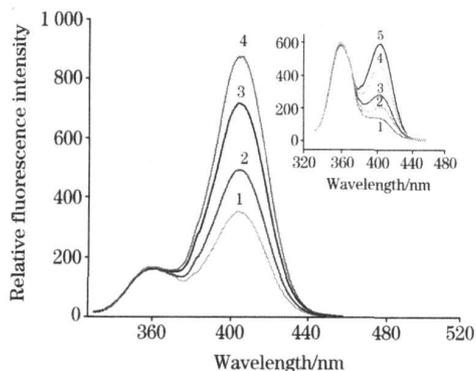


Fig 4 Synchronous fluorescence spectra of the system at different ONOO⁻ concentration

c_{ONOO⁻}/(mol·L⁻¹): 1, 2.40×10⁻⁶; 2, 3.60×10⁻⁶; 3, 4.80×10⁻⁶; 4, 6.00×10⁻⁶; Ex citation and emission band passes of 5 and 3 nm, respectively. c_{ONOO⁻}/(mol·L⁻¹) (Inset): 1, 1.60×10⁻⁷; 2, 2.40×10⁻⁷; 3, 4.80×10⁻⁷; 4, 7.20×10⁻⁷; 5, 1.20×10⁻⁶; Ex citation and emission band passes of both 5 nm

2.1.9 与常规荧光光谱检测结果的比较

在同样的条件下, 以常规荧光检测 ONOO⁻, ΔF_{406 nm} 与 ONOO⁻ 的浓度在 4.80×10⁻⁷ mol·L⁻¹~2.10×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 范围内呈线性关系, 线性相关系数为 0.998(n=5), 以 3 倍空白标准偏差计算的检测限为 6.47×10⁻⁸ mol·L⁻¹。对浓度为 1.40×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 ONOO⁻ 平行测定 8 次, 其相对标准偏差为 1.9%。比较可以看出, 采用荧光比率法测

Table 1 Tolerance limit of some foreign substances on the determination of peroxynitrite

Substance	Molar ratio to peroxynitrite	Substance	Molar ratio to peroxynitrite
Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	1 000	Fe ³⁺	6
NO ₃ ⁻	30	Ca ²⁺	40
NO ₂ ⁻	80	L-tryptophan	0.5
H ₂ O ₂	600	Ascorbic acid	0.3

c/(mol·L⁻¹): L-tyrosine, 5.0×10⁻⁴; NaHCO₃, 0.015; DTPA, 1.0×10⁻⁴; ONOO⁻, 3.00×10⁻⁶; PBS, 0.10; pH 8.5

量时能扩大线性范围, 降低检测限。

2.1.10 干扰的考察

在最佳实验条件下考察了在制备 ONOO⁻ 过程中可能存在物质以及其他常见氨基酸的干扰情况, 当影响小于 5% 时, 认为该物质不干扰 ONOO⁻ 的测定, 其结果见表 1。

2.2 ONOO⁻ 清除剂效果的研究

ONOO⁻ 是一种强效细胞毒性试剂, 能导致癌症的发生。研究能减少 ONOO⁻ 氧化损伤的物质即 ONOO⁻ 清除剂具有十分重要的意义。MXT 是一种具有电活性的新抗癌药物, 广泛应用于乳腺癌和白血病的治疗。研究发现随着 MXT 的加入, 406 nm 处的荧光峰强度逐渐减弱, 而 364 nm 处的荧光峰强度基本不变。说明 MXT 能与 ONOO⁻/CO₂ 反应的产物作用, 使二聚酪氨酸的生成量减少。参照文献[23]的公式

$$\lg(R_0/R-1) = \lg[c] + \lg[K] \quad (K \text{ 为常数})$$

来拟合 MXT 的清除作用数据, 其中 R₀ 和 R 分别为加入 MXT 前后 406 与 364 nm 荧光强度之比值。c(μg·mL⁻¹) 为 MXT 的浓度。在酪氨酸浓度保持恒定时, lg(R₀/R-1) 与 lg[c] 呈线性关系(图 5)。从二者关系求出 MXT 的 IC₅₀ (即使体系的荧光强度下降到初始信号一半所需的抗氧化剂的量) 为 0.065 μg·mL⁻¹ 即 0.133 μmol·L⁻¹。Fernandes^[24] 等研究了血管舒张药心得乐对 ONOO⁻ 及其在 CO₂ 存在下的清除作用, 得到其 IC₅₀ = 17 μmol·L⁻¹, 比较说明 MTX 的清除作用更强。同时利用该方法考察了常用的羟基自由基的清除剂 DMSO 在 CO₂ 存在时对 ONOO⁻ 的清除能力, 发现体系的荧光强度基本不变, 说明 DMSO 在该条件下对 ONOO⁻ 基本无清除能力。

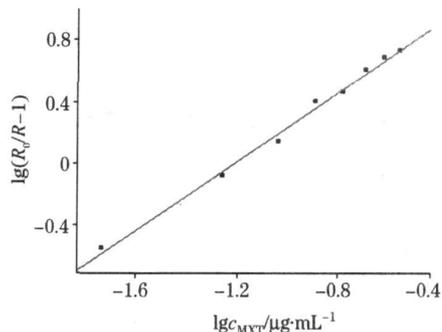


Fig 5 Calibration curve of lg(R₀/R-1) against lg c_{MXT}(μg·mL⁻¹)

3 结 论

建立了以酪氨酸为荧光探针的同步荧光比率法检测 ONOO⁻ 的新方法, 并利用此法研究了抗癌药米托蒽醌和 DMSO 对 ONOO⁻ 的清除作用。方法简便实用, 稳定性好, 操作简单, 测定快速, 易为一般实验室所采用。同时该法不受仪器参数改变的影响。该体系可以作为一种简便测定 ONOO⁻ 及筛选 ONOO⁻ 清除剂的方法。

参 考 文 献

- [1] TIAN Yr ling, CHEN Guar hua, CUI T ong(田益玲, 陈冠华, 崔 同). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 617.
- [2] QU Peng, LI Guar liang, XU Maotian(瞿 鹏, 李贯良, 徐茂田). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1407.
- [3] Ara J, Przedborski S, Naini A B, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, 95: 7659.
- [4] Coddington J W, Hurst J K, Lyman S V. J. Am. Chem. Soc., 1999, 121: 2438.
- [5] Squadrito G L, Pryor W A. Free Radical Biol. Med., 1998, 25: 392.
- [6] Wiseman H, Halliwell B. Biochem. J., 1996, 313: 17.
- [7] Kossenjans W, Eis A, Sahay R, et al. Am. J. Physiology: Heart and Circulatory Physiol., 2000, 278: 1311.
- [8] White C R, Brock T A, Chang L, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91: 1044.
- [9] Wang H, Joseph J A. Free Radic. Biol. Med., 1999, 27: 612.
- [10] Daiber A, Oelze M, August M, et al. Free Radical Research., 2004, 38: 259.
- [11] Dikalov S, Grigorev I A, Voinov M, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 248: 211.
- [12] Li Bei bei, Gutierrez P L, Blough N V. Anal. Chem., 1997, 69: 4295.
- [13] Xue J, Ying X Y, Chen J S, et al. Anal. Chem., 2000, 72: 5313.
- [14] Valeur B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications; Wiley VCH: Weinheim, 2002.
- [15] Singh Y, Gulyani A, Bhattacharya S. FEBS Letters, 2003, 541: 132.
- [16] Stromberg N, Hulth S. Sensors and Actuators B Chemical., 2003, 90: 308.
- [17] Van Arman S A, Sisk T M, Zawrotny D A. Letters in Organic Chemistry, 2005, 2(1): 54.
- [18] Lyman S V, Jiang Q, Hurst J K. Biochemistry, 1996, 35: 7855.
- [19] ZHANG Hou wen, Squadrito G L, Pryor W A. Nitric Oxide, 1997, 1: 301.
- [20] Thomson L, Trujillo M, Telleri R, et al. Arch. Biochem. Biophys., 1995, 319: 491.
- [21] Hughes M N, Nicklin H G. J. Chem. Soc. A, 1968, (2): 450.
- [22] CHEN Guo zhen, HUANG Xian zhi, ZHENG Zhu zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). The Method of Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990.
- [23] YANG Xiao feng, GUO Xiang qun. Analyst, 2001, 126: 928.
- [24] Fernandes E, Gomes A, Costa D, Lima José L F C. Life Sciences, 2005, 77: 1983.

Study on Ratiometric Determination of Peroxynitrite and Its Scavenger Based on Synchronous Fluorescence Spectroscopy

DU Jun ou, GUO Xiang qun*

Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory of Analytical Sciences of the Ministry of Education, Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract A ratiometric fluorimetry is proposed for the determination of peroxynitrite (ONOO^-) and the evaluation of its scavenger based on synchronous fluorescence spectroscopy. L-tyrosine, an intrinsic fluorescent amino acid, reacts with peroxynitrite and carbon dioxide, yielding a highly fluorescent dimer of tyrosine in pH 8.5 PBS buffer solution. By synchronous fluorescence scanning, both monomer and dimer emission bands of L-tyrosine appeared at 364 and 406 nm, respectively. The ratio of F_{406}/F_{364} is quantitatively related to the concentration of peroxynitrite, where F_{406} represents the intensity of synchronous emission band of dimer and F_{364} represents that of monomer. The method has been showing merit of being insensitive to the changes in experimental parameters and offers a higher sensitivity and a broader responding linear range of the analyte concentration, compared to fluorimetric method, giving a LOD of $1.84 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and a linear range of $1.60 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $6.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for ONOO^- , respectively, with a deviation of 2.4% for $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ONOO^- ($n=8$). A IC_{50} of $0.065 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for mitoxantrone, an antioxidant and anticancer drug, was also obtained. This method has proved to be simple and speedy. It would be easily used in the determination of ONOO^- and its scavenger.

Keywords Synchronous fluorescence spectrum; Ratiometric assay; Peroxynitrite

* Corresponding author

(Received May 10, 2007; accepted Aug. 20, 2007)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>