

偶氮胭脂红 B 光度法测定 Fenton 反应产生的羟自由基及其应用

杨明惠^{1,2}, 王颖臻^{1,3}, 曹秋娥¹, 丁中涛¹

(1.教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南大学化学科学与工程学院, 云南 昆明 650091; 2.大理学院生命科学与化学学院, 云南 大理 671000; 3.昆明师范专科学校生化系, 云南 昆明 650091)

摘 要: 基于 Fenton 反应所产生的羟自由基($\cdot\text{OH}$)与偶氮胭脂红 B 作用后使其吸光度降低, 利用吸光度值的变化, 建立一种以偶氮胭脂红 B 作指示剂的分光光度法测定的羟自由基的新方法。在研究反应条件对测定影响的基础上, 确定了体系的最佳测定条件, 同时利用所建立的新方法对一些抗氧化剂清除羟自由基的能力进行了测定。结果证明该体系可作为筛选抗氧化剂的方法。

关键词: 分光光度法; 偶氮胭脂红 B; 羟自由基; Fenton 反应

中图分类号: O657.3 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2007)08-0150-03

Determination of Hydroxyl Radical in Fenton Reaction by Azocarmine B Spectrophotometry & Its Application

YANG Ming-hui^{1,2}, WANG Ying-zhen^{1,3}, CAO Qiu-e¹ and DING Zhong-tao¹

(1.Key Lab of Medicinal Chemistry for Natural Resource of Ministry of Education, Department of Chemistry, Yun'nan University, Kunming Yun'nan 650091; 2.School of Bio-Science and Chemistry, Dali College, Dali, Yun'nan 671000; 3. Department of Biochemistry, Kunming Normal College, Kunming, Yun'nan 650091, China)

Abstract: A new spectrophotometric method was developed for the determination of the hydroxyl radical in Fenton reaction by using azocarmine B as color reagent based on the theory that the reaction of azocarmine B with $\cdot\text{OH}$ would decrease the absorbance of azocarmine B. Besides, the optimum determination conditions were determined. And the removal capability of some antioxidants on hydroxyl radical was also investigated by such method. The results proved that such method could be used to select proper antioxidants.

Key words: spectrophotometry; azocarmine B; hydroxyl radical; Fenton reaction

人体内由于铁及代谢产物过氧化氢和超氧阴离子自由基的存在, 它们之间的循环作用就会产生羟自由基。已有研究证明^[1-2], 羟自由基是造成组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解的活性氧, 与机体的衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关。因此, 对 $\cdot\text{OH}$ 的研究, 包括测定方法和清除 $\cdot\text{OH}$ 的研究显得特别重要。抗氧化物质是指能与氧或氧自由基等氧化性化合物反应的物质。天然抗氧化物质通过阻止氧自由基的初始反应或干扰其链式反应来防止氧化反应的发生。因此, 人体内的抗氧化物质可以清除体内氧自由基, 起到预防和保健的作用。茶、醋、葡萄酒、啤酒等饮料都含有抗氧化物

质, 但是, 啤酒中的抗氧化物质更利于人体消化吸收。已有研究表明^[3], 啤酒中的阿魏酸比蔬菜中的阿魏酸更有利于人体吸收, 适量饮用啤酒可明显提高人体的抗氧化能力。

由于 $\cdot\text{OH}$ 的活性大, 寿命短, 存在浓度低, 所以, 自由基的存在的证实, 要靠自由基的捕获方法完成。目前, 基于羟自由基所具有的顺磁性和高反应活性, 国内外文献报道的离体检测羟自由基的方法主要有: 电子自旋共振法^[4]、液相色谱法^[5]、荧光光谱法^[6]、化学发光法及光度法^[7]等。吴南^[8]等利用溴邻苯三酚红氧化法检测 Co^{2+} - H_2O_2 体系产生的羟自由基时, 发现溴邻苯三酚红的吸光

基金项目: 云南省人才培养基金(2004PY01-4)及昆明师专校基金资助项目(2006E004)。

收稿日期: 2007-06-04

作者简介: 杨明惠(1964-), 女, 在读博士, 副教授。

通讯联系人: 丁中涛, E-mail: ztding@ynu.edu.cn。

度与羟自由基的含量呈良好的线性关系。

Fenton 试剂是一种氧化性能很强的氧化剂。它之所以具有很强的氧化能力, 是因为体系中的 H_2O_2 经 Fe^{2+} 催化所产生的羟自由基·OH 所起的作用, 其反应机理如下:



Fenton 反应可认为是能模拟人体内产生羟自由基的过程, 而偶氮胭脂红 B 与羟自由基发生反应后, 其吸光度 A_{510} 发生变化, 当抗氧化剂加入到含·OH 的溶液中时, 可以和·OH 结合, 从而将其清除, 这样吸光度 A_{510} 的变化减少。本文根据上述·OH 对偶氮胭脂红 B 的氧化褪色反应, 建立了一个测定 Fenton 体系中产生的羟自由基的光度法, 并以维生素 C、甘露醇等抗氧化剂对方法的可靠性进行了检验。结果表明, 该方法简单、快速、灵敏度高, 可用于中药活性成分的抗羟自由基能力的研究。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

722 型分光光度计: 带 1 cm 玻璃比色池, 山东高密分析仪器厂; 酸度计: pH-S-2C 型精密酸度计, 上海精科雷磁; 501 型恒温器: 江苏实验仪器厂。

4.0 mmol/L Fe^{2+} 标准溶液: 准确称取 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1120 g, 溶于适量蒸馏水中, 加入 0.1 mL 浓 H_2SO_4 (以防止 Fe^{2+} 水解), 稀释并定容至 100 mL 得 0.04 mol/L Fe^{2+} 标准溶液; 使用时再准确移取该溶液 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 以蒸馏水稀释至刻度得 4.0 mmol/L Fe^{2+} 工作溶液, 工作溶液每隔 2 d 配制 1 次。

0.1 % 的偶氮胭脂红 B 溶液: 直接由蒸馏水配制; 0.04 % H_2O_2 溶液每天配制; pH6.0 的磷酸缓冲溶液由 0.1 mol/L 的 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 在 pH 计上调节得到。

抗氧化剂溶液为: 抗坏血酸 1 mmol/L; 甘露醇 1 mmol/L; 咖啡酸 2.5×10^{-5} mol/L; 绿原酸 2.5×10^{-5} mol/L; 阿魏酸 2.5×10^{-5} mol/L; 香豆素 5.0×10^{-5} mol/L。

所用试剂均为分析纯, 实验用水为蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 羟自由基的产生测定

在 2 支 25 mL 具塞比色管中, 依次加入 1.0 mL 的 0.1 % 偶氮胭脂红 B 溶液及 2.0 mL pH6.0 的 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲溶液, 向其中一支加入 3.0 mL 4 mmol/L 的 Fe^{2+} 溶液, 2.0 mL 0.04 % 的 H_2O_2 溶液, 另一支不加。用蒸馏水将 2 支试管稀释至刻度后, 室温放置 30 min, 以蒸馏水作参比, 用 1 cm 比色皿在 510 nm 处测定体系的吸光度。设不加 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 时体系的吸光度为 A_0 ; 加入 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 后的体系的吸光度为 A_b , 则羟自由基产生量可

用 $\Delta A = A_0 - A_b$ 表示。

1.2.2 测定羟自由基氧化率

按 1.2.1 的实验方法, 但在加 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 之前先加入一定量的抗氧化剂, 测定其吸光度 A_s , 则抗氧化剂的表观抗羟自由基氧化率 s 可以按下式计算:

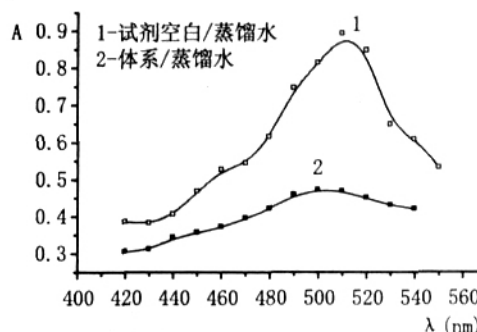
$$s(\%) = \frac{A_s - A_b}{A_0 - A_b} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 实验条件的选择

2.1.1 吸收光谱波长的影响

图 1 是按实验方法绘制的吸收曲线, 可见在 pH6.0 的 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲溶液中, 偶氮胭脂红 B 空白体系的吸收曲线与偶氮胭脂红 B- Fe^{2+} - H_2O_2 3 组分体系的吸收曲线相比存在明显区别, 在偶氮胭脂红 B 的最大吸收波长 510 nm 处, 3 组分体系的吸光度大幅下降。说明在 Fe^{2+} 与 H_2O_2 共存时, 因发生 Fenton 反应而产生的大量的·OH 可以使偶氮胭脂红 B 氧化褪色。因此偶氮胭脂红 B 可以作为 Fenton 反应产生的·OH 的光度监测试剂。在偶氮胭脂红 B 的最大吸收波长 510 nm 处, $\Delta A = A_0 - A_b$ 达最大值, 可得到·OH 检测的最大灵敏度, 因此选择检测波长为 510 nm。



1-试剂空白/蒸馏水; 2-体系/蒸馏水

图 1 吸收光谱

2.1.2 缓冲溶液 pH 值的影响

考虑到·OH 的检测一般在生理 pH 值附近, 因此用 KH_2PO_4 溶液和 Na_2HPO_4 溶液在 pH6.0 ~ 9.0 范围内配制了系列缓冲溶液, 研究了溶液 pH 对测定的影响。实验结果表明, 随 pH 的增加, 空白和体系的吸光度均下降, 在 pH6.0 的时候, A 最大。所以本实验采用 pH6.0 的缓冲溶液。

2.1.3 偶氮胭脂红用量的影响

按实验方法加入不同体积的 0.1 % 的偶氮胭脂红溶液, 试验偶氮胭脂红浓度对·OH 检测的影响。结果发现, 随偶氮胭脂红用量的增加, 空白的吸光度(A_0)、体系的吸光度(A_b)和空白与体系的吸光度差值(ΔA)均增加。考虑到吸光度读数误差, 本实验选用 1.0 mL 的偶氮胭

脂红溶液。

2.1.4 H₂O₂ 用量的影响

0.04 %的 H₂O₂ 的加入量在 1.5 mL 以下时, 随着其用量的增加体系的吸光度下降, A 增加; 当其用量大于 1.5 mL 时, 体系的吸光度不再变化, A 基本恒定, 所以本实验采用 2.0 mL 的 H₂O₂ 溶液。

2.1.5 Fe²⁺ 溶液用量的影响

按实验方法, 加入不同体积的 4 mmol/L 的 Fe²⁺ 溶液, 测量其 A₀、A_b, 并计算出其 A, 研究 Fe²⁺ 的浓度对测定的影响。实验结果表明, 4 mmol/L Fe²⁺ 溶液用量小于 2.0 mL 时随其用量的增加而下降, 然后基本稳定, 因此 A 在 Fe²⁺ 的用量大于 2.0 mL 以上达到最大并保持恒定, 所以本实验加入 3.0 mL 的 Fe²⁺ 溶液。

2.1.6 反应时间的影响

试剂空白的吸光度(A₀) 几乎不随反应时间而改变, 但体系的吸光度(A_b) 却随室温下放置时间的延长而下降, 直至反应时间达到 25 min 后保持恒定, A 在室温下放置 25 min 以上时达到最大值, 并至少在 1 h 内保持基本不变, 说明本方法稳定性较好。实验选用 30 min 为保温时间。

2.2 抗氧化剂样品抗氧化性能分析

按 1.2.2 部分实验方法, 对 Vc(抗坏血酸)、甘露醇等 6 种抗氧化剂样品的抗羟自由基氧化性能进行了分析, 并计算了其相应的表现抗羟自由基氧化率 s(%), 结果见图 2。

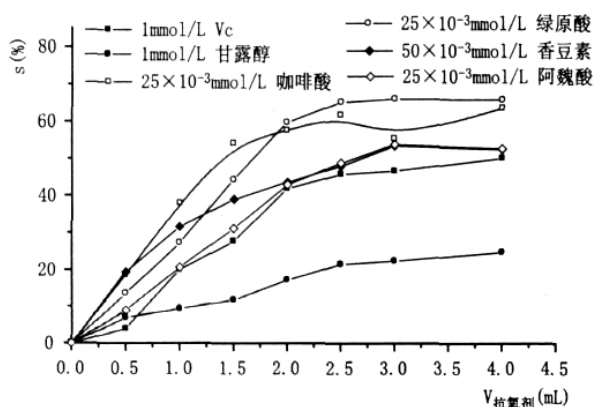


图2 抗氧化剂用量与氧化率的量效关系

由图 2 可知, 抗氧化剂对 H₂O₂/Fe²⁺ 体系中产生的羟自由基对 Fe²⁺ 的氧化作用的抑制效果均与抗氧化剂浓度呈量效关系。抗氧化剂浓度越大, 表现出抗羟自由基

氧化率 s(%) 也增大; 但抗氧化剂浓度增大到一定程度之后, 表现抗羟自由基氧化率 s(%) 的增长减慢直至饱和, 即: 再增大抗氧剂浓度, 表现抗羟自由基氧化率基本不发生变化。

按上述实验结果, 计算得氧化剂的 IC₅₀(羟自由基的清除率达到 50 % 时所需要的抗氧化剂浓度) 列于表 1。结果表明, 抗坏血酸的抗羟自由基氧化能力大于甘露醇, 这与已有的报道是相符的, 说明本方法具有一定的实用价值。

表 1 抗氧化剂羟自由基清除率结果

抗氧化剂	IC ₅₀ (mmol/L)	抗氧化剂	IC ₅₀ (mmol/L)
Vc	0.1592	绿原酸	0.00168
甘露醇	-----	香豆素	0.00544
咖啡酸	0.00140	阿魏酸	0.00258

3 结论

基于 Fenton 反应所产生的羟自由基(·OH) 与偶氮胭脂红作用后使其吸光度降低, 建立一种以偶氮胭脂红作指示剂的分光光度法测定羟自由基的新方法。利用所建立的新方法对一些抗氧化剂清除羟自由基的能力进行了测定, 通过与文献报道的结果进行比较, 证明该体系可作为筛选抗氧化剂的方法。

参考文献:

- [1] 孙存晋, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999.
- [2] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] 季晓东, 楚晓琨, 武干钧. 啤酒的抗氧化功能与健康[J]. 酿酒科技, 2001, (6): 66-67.
- [4] Shao-An Cheng, Wai-Kit Fung, Kwong-Yu Chan, P.K. Shen.. Optimizing electron spin resonance detection of hydroxyl radical in water[J]. Chemosphere, 2003, (52): 1797.
- [5] Shen Y, Sangiah S, Ye M Y. Determination of hydroxyl radicals formation in the testes of cadmium-treated mice by high-performance liquid chromatography[J]. Liq Chromatogr, 1995, 18 (11): 2217.
- [6] 任凤莲, 吴南, 司士辉. 水杨基荧光法测定钴 - 过氧化氢体系产生的羟自由基[J]. 分析化学, 2001, 29 (1): 60.
- [7] 严敏, 李崎, 顾国贤. 一个评价啤酒老化程度的新指标——DPPH 清除率[J]. 食品科技, 2006, (3): 91-94.
- [8] 吴南, 任凤莲, 吴心传. H₂O₂-Co²⁺ 产生的羟自由基的溴邻苯三酚红氧化法检测[J]. 分析测试学报, 2001, 20 (2): 52.

《酿酒科技》中国科技核心期刊