

罗丹明 6G 缔合微粒光度法检测羟自由基及其在 离体筛选抗氧化剂中的应用

梁爱惠¹, 蒋治良^{1*}, 周苏梅², 周玉婵², 梁月园², 陈丽玉²

1 桂林工学院材料与化学工程系, 广西 桂林 541004

2 广西师范大学资源与环境学院, 广西 桂林 541004

摘要 在 HCl-NaAc 缓冲溶液中, Fenton 反应产生的羟自由基被过量的 KI 捕获; 生成的 I_3^- 分别与罗丹明 B ($\lambda_{\max} = 554 \text{ nm}$)、罗丹明 6G ($\lambda_{\max} = 526 \text{ nm}$)、罗丹明 S ($\lambda_{\max} = 526 \text{ nm}$) 和丁基罗丹明 B ($\lambda_{\max} = 556 \text{ nm}$) 形成缔合微粒, 导致其吸收峰降低。羟自由基浓度 (以 H_2O_2 浓度计) 分别在 $0.136 \sim 0.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与罗丹明 B、罗丹明 6G、罗丹明 S 和丁基罗丹明 B 体系的吸光度降低值成正比。据此建立了一种测定抗氧化剂对羟自由基的清除率的新方法。测试了抗坏血酸等 4 种抗氧化剂以及 6 种茶叶提取液的抗氧化活性, 所得到的结果较为满意。

主题词 罗丹明染料; 羟自由基; Fenton 反应; 分光光度法; 抗氧化剂; 清除率

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)11-2113-03

引言

羟自由基是一种氧化性很强的自由基, 能发生电子转移、夺取氢原子和羟基化等反应, 使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸及脂类等发生氧化而损伤和破坏; 它还与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关^[1]。对机体适当补充外源性抗氧化剂或服用能使机体内源性抗氧化物质恢复到一定水平的药物, 可以改善这些状况。由于长期使用化学合成的抗氧化剂对人体有一定的副作用, 所以, 寻找天然、安全和无毒的抗氧化剂就越来受到人们的重视^[2]。同时, 利用抗氧化类药剂对羟自由基发生的抑制效应, 是离体筛选抗氧化药物的一个重要手段。因此, 研究快速、灵敏和实用的羟自由基的检测方法具有重要意义。目前, 测定羟自由基的方法主要有光度法、荧光法、电子自旋法、气相色谱法、高效液相色谱法、电化学法以及化学发光法等^[2-6]。光度法具有简便快速等特点, 但灵敏度欠佳。其余仪器分析法灵敏度虽高, 但 these 方法或仪器特殊, 或试剂昂贵, 使其应用受到限制。罗丹明染料是一种常用的稳定的分析试剂, 近来研究发现它的缔合微粒存在变色效应、荧光猝灭效应和共振散射效应^[7], 并得到较好的应用。本研究用无毒易得的碘化钾来捕获 Fenton 反应的羟自由基, 生成的 I_3^- 和罗丹明染料反应形成缔合微粒, 使体系的吸光度降低。据此建立了羟自由基的

罗丹明染料缔合微粒光度法及筛选测定抗氧化剂的新方法。该法具有简便、快速、灵敏和适用范围广等特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司出产); 722S 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

$1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液; HCl-NaAc 缓冲溶液; $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KI}$; $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$; $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 B (RhB); $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 S (RhS); $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗丹明 6G (Rh6G); $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁基罗丹明 B (b-RhB); $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸; $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇; $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲; $2.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素。

茶叶提取液的制备: 在烧杯中加入蒸馏水煮沸后, 称取适量的茶叶放入, 用慢火煮 30 min, 所得提取液待冷却后过滤、移入 100 mL 容量瓶中, 即得储备液; 用时稀释即可。茶叶提取液浓度分别为 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 彝族火把茶; $15.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金银花茶; $15.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茉莉花茶; $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦丁茶; $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茗茶; $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 观音王茶。

收稿日期: 2005-08-26, 修订日期: 2005-11-16

基金项目: 广西高校百名中青年学科带头人计划资助项目

作者简介: 梁爱惠, 女, 1965 年生, 桂林工学院材料与化学工程系高级工程师 * 通讯联系人

1.2 实验方法

1.2.1 羟自由基的测定

在一系列 10 mL 带盖比色管中分别加入 HCl+NaAc 缓冲溶液、Fe(II) 溶液 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、KI 溶液 ($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 H_2O_2 溶液 ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、罗丹明染料溶液, 用蒸馏水稀释到 5 mL 并摇匀, 用 1 cm 比色皿测定其吸光度值 A_0 , 计算其与空白 A 之差 $\Delta A (= A - A_0)$ 。

1.2.2 抗氧化剂清除羟自由基的测定

在 1.2.1 体系中, 加入一定量的抗氧化剂后, 测定体系的吸光度 A_s ; 未加抗氧化剂的体系其吸光度 A_0 ; 未加 Fenton 试剂及抗氧化剂的体系其吸光度 A , 则清除率 D 按以下公式计算

$$D = (A_s - A_0) / (A - A_0) \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

RhB, Rh6G, RhS, b-RhB 的最强吸收峰分别位于 554, 526, 526, 556 nm 处。加入 Fenton 试剂后, 体系的吸收峰值明显下降但峰位不变(见图 1)。由此说明体系吸光度的下降是由于 Fenton 试剂产生的羟自由基与碘化钾反应及 I_3^- 与罗丹明染料形成缔合微粒的结果。

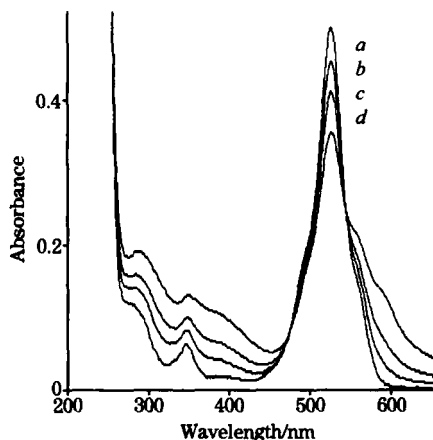


Fig 1 Absorption spectra of Rh6G

a: Blank; b: $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$;

c: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$; d: $12.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$

2.2 反应条件的选择

分别测定了各体系在 pH 1.42~5.20 范围内的 ΔA 值。RhB 体系在 pH 4.19 时 ΔA 值最大, RhS 体系在 pH 4.58 时 ΔA 值最大, Rh6G 体系在 pH 5.20 时 ΔA 值最大, b-RhB 体系在 pH 4.76 时 ΔA 值最大。该缓冲溶液用量选择 1.0 mL。Fe²⁺ 浓度对各个体系的 ΔA 值的影响表明, RhB, RhS, Rh6G, b-RhB 体系 Fe²⁺ 浓度分别为 0.2×10^{-4} , 0.4×10^{-4} , 0.2×10^{-4} , $0.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ΔA 值最大。KI 溶液浓度对 4 个体系的 ΔA 值的影响结果表明, RhB 体系 KI 浓度为 $2.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ΔA 值最大, RhS 体系 KI

浓度为 $2.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ΔA 值最大, Rh6G 体系 KI 浓度为 $2.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ΔA 值最大, b-RhB 体系 KI 浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ΔA 值最大。所以, 分别选用以上各个 KI 浓度值作为各相应体系的测定条件。分别研究罗丹明染料浓度对 ΔA 值的影响。RhB 浓度为 $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, RhS 为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 罗丹明 6G 为 $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丁基罗丹明 B 为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其 ΔA 值最大。反应时间对 ΔA 值的影响结果表明, 各反应体系的 ΔA 值在 20 min 后基本保持稳定。所以本方法选择反应 30 min 进行测定。

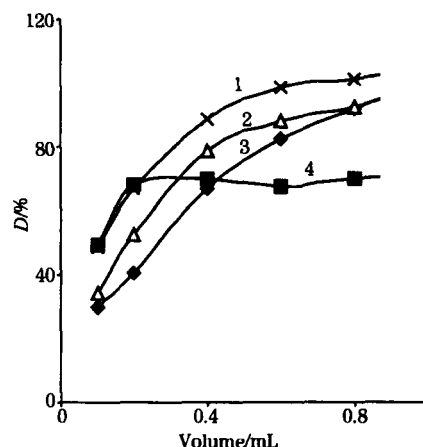


Fig 2 Relationship between the volume of antioxidant and the scavenging percentage

1: 槲皮素; 2: 硫脲; 3: 抗坏血酸; 4: 甘露醇

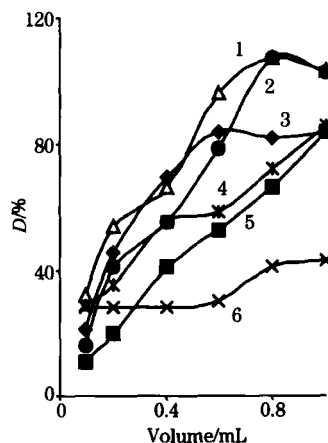


Fig 3 Relationship between the volume of tea extract and the scavenging percentage

1: 茉莉花茶; 2: 观音王茶; 3: 彝族火把茶;
4: 茗茶; 5: 金银花茶; 6: 苦丁茶

2.3 H_2O_2 浓度与 ΔA 值的关系

由反应原理知, 羟基自由基的浓度与过氧化氢浓度成正比, 为研究比较方便, 可用过氧化氢浓度 c 代替羟基自由基的浓度。Rh6G, RhB, RhS, b-RhB 体系的线性范围分别为 $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.136 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.064 \sim 0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$,

其回归方程分别为 $\Delta A = 1.276c + 0.0023$, $\Delta A = 0.723c - 0.024$, $\Delta A = 0.4760c - 0.0055$, $\Delta A = 0.785c - 0.0153$, 相关系数分别为 0.9977, 0.9933, 0.9935, 0.9945。本文选用罗丹明 6G 体系。

2.4 共存物质的影响

按实验方法,考察了共存物质对测定 $0.102 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ H_2O_2 的影响。当相对误差在 $\pm 5\%$ 之间时, 100 倍 H_2PO_4^- ; 4700 倍 Ca^{2+} ; 2600 倍 Ba^{2+} ; 140 倍 Mg^{2+} ; 300 倍 Cd^{2+} ; 20 倍 Ag^+ , Al^{3+} ; 70 倍 Mn^{2+} ; 12 倍 Pb^{2+} ; 1 倍

Ni^{2+} 等不干扰测定。

2.5 抗氧化剂清除羟自由基作用的测定

测定了 4 种抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率及其与它们用量之间的关系(如图 2)。结果表明,槲皮素、硫脲、抗坏血酸的抗氧化活性较好;甘露醇的抗氧化活性较差。由此可见,可用本法离体筛选抗氧化药物。

6 种茶叶提取液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率如图 3。茉莉花茶和观音王茶提取液的抗氧化活性很好;彝族火把茶、茗茶和金银花茶次之;苦丁茶较差。

参 考 文 献

- [1] WU Nan, REN Feng-lian, TANG Zheng, et al(吴南,任凤莲,唐征,等). Appl. Chem. Indust.(应用化工), 2000, 29(4): 30.
- [2] ZHANG Ai-mei, ZANG Yun-bo(张爱梅,臧云波). Chin. J. Anal. Chem.(分析化学), 2004, 32: 1337.
- [3] Jiang J, Bank J F, Scholes C P. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 4742.
- [4] Koppenol W H. Free Radical Bio. Med., 1993, 15: 645.
- [5] QU Peng, LI Guan-liang, XU Mao-tian(瞿鹏,李贯良,徐茂田). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 407.
- [6] ZHANG Li-wei, WANG Jin-shan, JIANG Chong-qiu(张立伟,王金山,江崇球). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(9): 1103.
- [7] Liang A H, Jiang Z L, et al. Anal. Chim. Acta, 2005, 530: 131.

Rhodamine 6G Association Particle Based Spectrophotometric Determination of Hydroxy Free Radical and Its Application to the Selection of Antioxidant

LIANG Ai-hui¹, JIANG Zhi-liang^{1*}, ZHOU Su-mei², ZHOU Yu-chan², LIANG Yue-yuan², CHEN Li-yu²

1. Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China

2. Department of Resource and Environmental Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Abstract In HCl-NaAc buffer solution, the hydroxy free radical from the Fenton reaction is captured by excess KI and releases I_3^- . The I_3^- combines with Rhodamine B(RhB, $\lambda_{\text{max}} = 554 \text{ nm}$), Rhodamine 6G(Rh6G, $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$), Rhodamine S(RhS, $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$), and butyl Rhodamine B(b-RhB, $\lambda_{\text{max}} = 556 \text{ nm}$) to form association particles, so the absorbance at max wavelength decreases. The concentration of hydroxy free radical (calculated by the concentration of hydrogen peroxide) is proportional to the decreased absorbance of the systems of RhB, Rh6G, RhS, b-RhB in the range of $0.136\text{--}0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.034\text{--}0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.034\text{--}0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.034\text{--}0.680 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Based on this fact, a new method for the determination of scavenging percentage of hydroxy free radical with antioxidant was developed. The resistance to oxidation of four substances and six kinds of tea extract were measured with satisfactory results.

Keywords Rhodamine dyes; Hydroxy free radical; Fenton reaction; Spectrophotography; Antioxidant; Scavenging percentage

(Received Aug. 26, 2005; accepted Nov. 16, 2005)

* Corresponding author