

盐酸羟胺自氧化测定超氧化物歧化酶活性

马秋风 王秀东 邹洪*

(首都师范大学化学系 北京 100037)

摘要 羟胺在碱性水溶液中发生自氧化反应产生的超氧阴离子自由基,同时其自身被氧化为亚硝酸根离子,在酸性介质中 SCN^- 催化亚硝酸根离子与二苯胺反应生成具有电活性的亚硝基化合物,在 -0.67V 处有一波形很好的二阶极谱峰。在一定条件下,极谱峰电流的大小与亚硝酸根离子的浓度呈线性关系。超氧化物歧化酶(SOD)可催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,体系中加入 SOD,使生成的亚硝酸根离子的量减小。由此建立通过检测亚硝酸根离子的生成量来测定 SOD 活性的电化学方法,测定酶活力曲线。当 SOD 浓度为 $0.227\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,SOD 对盐酸羟胺自氧化的抑制率可达 50%。并研究常见的黄酮类化合物对超氧阴离子自由基的清除作用。测定黄酮类化合物清除超氧阴离子自由基的 I_{50} 。

关键词 盐酸羟胺 超氧化物歧化酶 二苯胺 极谱法

活性氧自由基几乎和人类大部分常见的几种主要疾病都有关系,从人类死亡率最高的心脑血管疾病到癌症,以及近年来对人类威胁最大的艾滋病,无一不和氧自由基有关系。而超氧阴离子自由基是其中三种有代表性的自由基[超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\text{OH}\cdot$)、酯自由基($\text{ROO}\cdot$)]之一。除人体中的线粒体、内质网、胞浆、血红蛋白酶系统及非酶系统能产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基外,空气中紫外线、X 射线照射、高温以及空气中烟尘污染也能促使人体中产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基。清除人体中的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基可防止各种疾病的发生,超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的一种重要的清除剂,是生物体防御氧化损伤的重要酶,所以 SOD 酶活性的测定显得尤为重要。SOD 活性测定方法很多,其中流动注射-光度法¹、化学发光法² 和应用微电极进行的电化学测定³,本文根据盐酸羟胺在碱性水溶液中发生自氧化反应,可产生超氧阴离子自由基,自身被氧化为亚硝酸根离子,在酸性介质中 SCN^- 催化亚硝酸根离子与二苯胺反应生成具有电活性的亚硝基化合物。SOD 可催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,体系中加入 SOD,使生成的亚硝酸根离子的量减小。建立极谱法检测羟胺自氧化过程中生成的亚硝酸根离子,从而间接测定的 SOD 活性的方法,并研究常见的黄酮类化合物对超氧阴离子自由基的清除作用。此方法仪器便宜,操作简单,所需的各种试剂易得,且最终的产物比较稳定。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

MP-1 型溶出分析仪(山东电讯七厂);三电极系统:滴汞电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极。pH-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂)。

0.05mol/L 盐酸羟胺:准确称取 0.3225g 的盐酸羟胺,加水溶解,定容至 100mL , $4\times 10^{-2}\text{mol/L}$ 二苯胺:准确称取 0.6769g 的二苯胺,用无水乙醇溶解,并定容至 100mL , $5\times 10^{-2}\text{mol/L}$ NH_4SCN , 0.3mol/L HClO_4 , 0.2mol/L $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10.2$)。

SOD(Sigma 公司, $3730\text{units}/\text{mg}$),实验所用黄酮类化合物均购自北京生化试剂公司。黄酮类化合物均用 0.1mol/L NaHCO_3 溶解。其他试剂均为分析纯,试验用水为二次亚沸石英蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 亚硝酸根离子的产生 取 0.05mL (0.005mol/L) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 于 2.5mL 含 0.2mol/L $\text{NaHCO}_3 + 0.2\text{mol/L}$ NaCO_3 ($\text{pH} = 10.2$) 的比色管中,置于 37°C 恒温槽中, 30min 后取出。

1.2.2 亚硝酸根离子的测定 取上述溶液 0.1mL , 依次加入 0.8mL ($5\times 10^{-3}\text{mol/L}$) NH_4SCN , 0.1mL ($4\times 10^{-4}\text{mol/L}$) 二苯胺, 0.3mL (0.3mol/L) HClO_4 , 加二次蒸馏水定容至 10mL 。在示波极谱仪上,起始电压为 -0.40V ,在 -0.67V 处记录二阶导数还原峰电流。

1.2.3 SOD 活性测定 在加入 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 之前,先加入一定量的 SOD,总体积为 2.5mL ,使 $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液的浓度不变。按照下式计算 SOD 活性, SOD 百分抑制率(P) = $(i_0 - i) / i_0 \times 100\%$, i_0 是 SOD 不存在时的峰电流, i 为加入 SOD 时的峰电流,

设反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个单位, SOD 活性(U/mL) = $P \times$ 反应液总量(mL) \times 样品稀释倍数 / ($50\% \times$ 取液量)。

2 结果与讨论

2.1 反应产物的二阶导数极谱图

按实验方法绘制反应产物的二阶导数极谱图(见图 1), 亚硝基化合物在示波极谱仪上于 $-0.70V$ 处产生一灵敏的二阶导数极谱波。

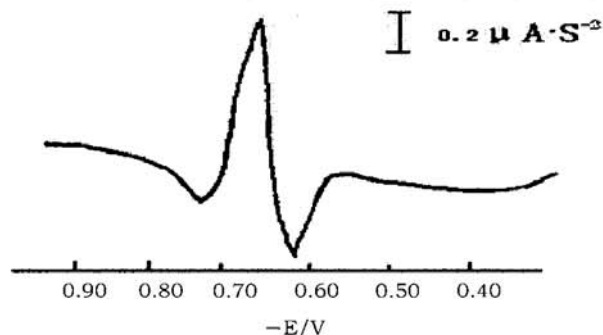


图 1 反应产物的二阶极谱波

2.2 实验条件的选择

2.2.1 酸度的影响 酸度对体系峰电流的影响(见图 2), 实验结果表明, 在 pH 大于 8 之后, 亚硝酸根离子的生成量迅速增加, 即羟胺自氧化的速度迅速增大。酸度对 SOD 的抑制率有所影响, 在其他条件相同的情况下, 相对于 pH 10.5, pH 9.6 时 SOD 对盐酸羟胺自氧化抑制的灵敏度比较大, 且反应体系比较稳定。本实验选择 pH 9.6。

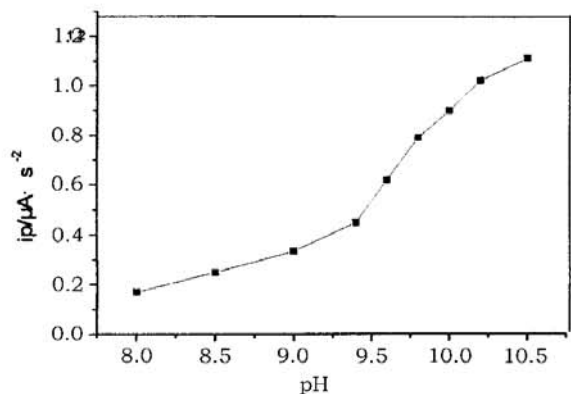


图 2 酸度对峰电流的影响

反应条件: $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L NH}_4\text{SCN} + 4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 二苯胺 + $9 \times 10^{-5} \text{ mol/L HClO}_4$ 37°C , 30 min。

2.2.2 温度及反应时间的影响 图 3 为温度和时间对体系峰电流的影响, 从图 3 中可知, 温度升高, 羟胺自氧化反应速度加快, 反应的时间越长, 生成的亚硝酸根离子越多, 但当反应时间大于 30 min 后, 电流变化渐趋平缓, 此时体系比较稳定, 所以实验选择在 37°C 中恒温 30 min。

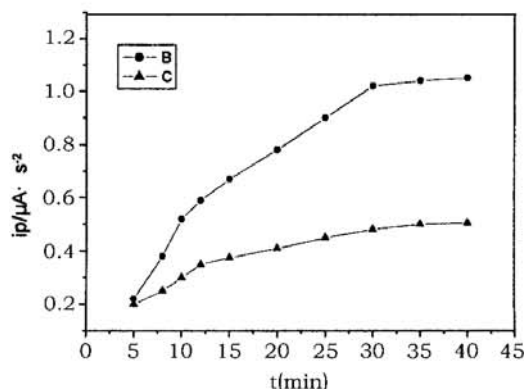


图 3 温度对峰电流的影响(B: 37°C ; C: 25°C)

反应条件: $4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 二苯胺 + $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L NH}_4\text{SCN} + 9 \times 10^{-5} \text{ mol/L HClO}_4$

测定条件: $0.2 \text{ mol/L NaHCO}_3 + \text{NaCO}_3$ (pH 9.6)

2.2.3 二苯胺用量的影响 当体系中二苯胺的浓度在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内时, 峰电流达到最大且稳定, 选择加入 $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的二苯胺溶液 0.1 mL 。

2.2.4 NH_4SCN 用量的影响 当 NH_4SCN 浓度在 $1.5 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时, 峰电流达到最大且基本稳定, 选择加入 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 NH_4SCN 溶液 0.8 mL 。

2.2.5 HClO_4 用量的影响 实验发现: 当体系中 HClO_4 的浓度在 $0.006 \sim 0.015 \text{ mol/L}$ 范围内时, 峰电流达到最大且基本稳定。实验选择加入 0.3 mL (0.3 mol/L) HClO_4 。

2.2.6 羟胺用量的选择 不同浓度的盐酸羟胺对自氧化速率也有影响。在一定范围内, 盐酸羟胺浓度增大, 自氧化反应速率增大, 但浓度太大, SOD 对盐酸羟胺自氧化反应的抑制的灵敏度降低, 浓度太小, 体系的稳定性不太好, 所以实验选择在 2.5 mL 缓冲溶液中加入 0.05 mL $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的盐酸羟胺, 在 37°C 恒温 30 min。

2.3 SOD 对盐酸羟胺自氧化反应的抑制作用

以 0.1 mL ($4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 二苯胺, 0.3 mL (0.3 mol/L) HClO_4 , 0.8 mL ($5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 的 NH_4SCN 溶液为底液, 按照 1.2.3 所述的方法测定 SOD 对盐酸羟胺自氧化的抑制百分率(见图 4), 当 SOD 浓度为 $0.227 \mu\text{g/mL}$ 时, SOD 对盐酸羟胺自氧化的抑制率可达 50%。

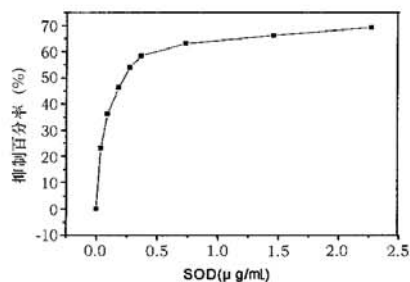


图 4 SOD 对盐酸羟胺自氧化的抑制(酶海力测定曲线)

反应条件同图 2; 测定条件同图 3

2.4 黄酮类化合物对盐酸羟胺自氧化的抑制作用

黄酮类化合物是我国许多常用中草药中的有效成分之一,是多羟基化合物,可以清除超氧阴离子自由基,在 1.2.1 体系中加入一定量的黄酮类化合物,按 1.2.2 的方法测定-0.67V 处的峰电流。计算清除率的公式为:清除率 = $(i_0 - i) / i_0 \times 100\%$, i_0 代表未加清除剂时的峰电流, i 代表清除剂存在时的峰电流,以清除率对清除剂浓度作图,得到清除剂的 IC₅₀(见表 1)。

表 1 黄酮类化合物对羟胺自氧化的抑制作用

黄酮类化合物	E ₀ (μ M)
黄芩甙	5.10
桑色素	6.54
芸香叶苷	31.5
槲皮素	—

注:—干扰羟胺自氧化。

参考文献

- 1 Choi H Y, Song J H, Park Y S et al. Flow injection-chemiluminescent assay for the determination of superoxide dismutase activity. *Can. J. Chem.*, 2001, 79:337~341
- 2 杜鸣,梁芳珍,唐波等.流动注射-光度法测定超氧阴离子自由基与超氧歧化酶活性的研究,高等学校化学学报,1999,20(3):369~373
- 3 Lisdat F, Ge B, Reszka R, Kozniowska E. An electrochemical method for quantification of the radical scavenging activity of SOD. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 365:494~498

Determination of superoxide dismutase enzyme activity by hydroxylammonium autoxidation

Ma Qiufeng Wang Xiudong Zou Hong

(Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract In an alkaline medium, Hydroxylammonium reacted with dioxygen to form superoxide radical and nitrite ion. At low pH with thioyanate as catalyst, nitrite ion reacted rapidly and quantitatively with diphenylamine to form nitrate complex with electrochemical activity, which gave a sensitive second-order derivative reduction wave with the peak potentials of -0.67V(SCE). Under the certain conditions the peak current was directly proportional to the concentration of nitrite ion. Superoxide dismutase(SOD) catalyze the dismutation of superoxide radical($O_2^{\cdot-}$) into H_2O_2 and O_2 . The system with SOD inhibited the formation of nitrite ion. The electrochemical method for determination of SOD activity which was based on the detection of the formation of nitrite ion during autoxidation of Hydroxylammoniumchloride was described and detected the curve of the SOD activity. The inhibition was reached to 50% as the concentration of SOD was 0.227 μ g/mL. The method has been applied into the research of scavenging activity of some flavonoids and determination of the I₅₀ of the flavonoids,

Key words Hydroxylammonium Superoxide dismutase Diphenylamine Polarography

(上接第 28 页)

Determination of iron and lead in aloe by microwave digestion - microwave plasma torch atomic emission spectrometry

Zhang Jinsheng Zhao Shuang Zhang Qikai Li Xiuping Li Lihua*

(Liaoning University of Petroleum & Chemical Technology, Fushun 113001, China)

Abstract Using microwave plasma torch(MPT) as excitation light source, argon as support gas, the sample solution was introduced into a pneumatic nebulization instem by the standard addition method. The determination of Iron and Lead in aloe by microwave plasma torch atomic emission spectrometry(MPT-AES) was studied. By observing the experimental conditions(including $HN O_3$ concentration in the sample solution, microwave forward power, carrier gas flow rate, support gas flow rate and oxygen shield gas flow rate), the effects of concomitant elements on determination of iron and lead emission signal were investigated in detail. Comparing with the conventional method, the microwave digestion is simple, rapid, accurate, and with less possibility to be contaminated by the environment, and of great applied value. The result shows that the determination of microwave digestion MPT-AES is effective method to study the trace elements in aloe.

Key words Microwave digestion Microwave plasma torch atomic emission spectrometry(MPT-AES) Aloe Iron Lead