

## 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性的电化学研究\*

王炳娟 李玲霞 邹洪

(首都师范大学化学系 北京 100037)

**摘要** 邻苯三酚在 Tris-HCl (pH8.30) 缓冲溶液中, 可以发生自氧化反应产生超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ), 其自氧化产物在  $-0.96V$  和  $-1.44V$  (SCE) 有两个还原波。铜锌超氧阴离子歧化酶 (SOD) 可催化  $O_2^{\cdot-}$  的歧化反应, 使邻苯三酚自氧化反应的速率降低。通过测定加入不同量 SOD 时邻苯三酚自氧化反应速率的变化来测定 SOD 活性, 建立一种简单、灵敏的测定 SOD 活性的电化学方法, 结果表明: 在  $-0.96V$  处测定 SOD 活性的灵敏度略高于  $-1.44V$  处的灵敏度。

**关键词** 邻苯三酚 SOD 活性 超氧阴离子自由基 极谱法

有关邻苯三酚自氧化测定 SOD 活性的光度法的报道比较多, 包括经典的邻苯三酚法、改进的邻苯三酚<sup>[1]</sup> 以及终止剂法等, 由于邻苯三酚在 Tris-HCl (pH8.30) 缓冲溶液中, 可以发生自氧化反应产生超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ), 其自氧化产物在  $-0.96V$  和  $-1.44V$  (SCE) 有两个还原波, 本文建立邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性的电化学方法, 并研究黄酮类化合物对邻苯三酚自氧化产生的  $O_2^{\cdot-}$  的清除作用。此方法所用仪器便宜, 操作简便, 试剂易得, 对于抗氧化剂的筛选具有一定的应用价值。

## 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)。

邻苯三酚 (使用前升华提纯) 标准液:  $5 \times 10^{-3}$  mol/L, pH7.10 ~ 9.20 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-HCl 缓冲溶液 (使用前均被空气饱和), SOD (Sigma 公司) 3730units/mg solid, 实验所用黄酮类化合物均购自北京生化试剂公司; 黄酮类化合物在测定前用 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 邻苯三酚的自氧化** 取 5.0mL 100mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液, 0.4L 0.05mol/L 的 EDTA, 加入一定量的二次蒸馏水, 在 25℃ 恒温槽中恒温 25min, 加入一定体积的邻苯三酚, 使总体积为 10mL, 迅速混匀后, 倒入电解池中, 记录  $-0.96V$  和  $-1.44V$

处极谱峰高随时间的变化, 即每隔 1min 读取峰电流一次。

**1.2.2 SOD 活性测定** 采用 1.2.1 的方法, 在加入邻苯三酚之前, 先加入一定量的 SOD, 使总体积为 10mL, 迅速混匀后, 倒入电解池中, 记录  $-0.96V$  和  $-1.44V$  处极谱峰高随时间的变化, 即每隔 1min 读取峰电流一次。按照下式计算 SOD 活性, SOD 百分抑制率 ( $P$ ) =  $(i_0 - i) / i_0 \times 100\%$ ,  $i_0$  为未加 SOD 时邻苯三酚自氧化峰电流随时间的变化,  $i$  为加入 SOD 后峰电流随时间的变化。设反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个活性单位, 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 邻苯三酚自氧化反应的二阶导数极谱图

在 pH8.30 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 邻苯三酚发生自氧化反应,  $-0.96V$  和  $-1.44V$  处的二阶导数波随时间延长而增高 (见图 1)。如果加入亚硫酸钠或通氮气除氧, 则无上述现象发生。 $-0.96V$  和  $-1.44V$  处的峰与溶液中的溶解氧有关。

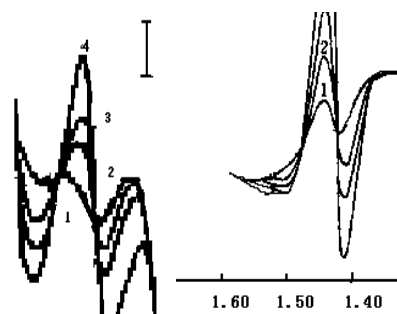


图1 邻苯三酚自氧化反应的二阶导数极谱图  
横坐标  $-E/V$ , 单位  $\mu A/s^2$ 。

\* 基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划面上项目 (KM200510028006)

## 2.2 底液的选择

固定邻苯三酚的浓度, 试验发现邻苯三酚在 0.1mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub>、0.2mol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.05mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaHPO<sub>4</sub> (pH8.30) 和 Tris-HCl (pH8.30) 缓冲溶液中均可发生自氧化反应, 其中在 50mmol/L Tris-HCl (pH8.30) 的缓冲溶液中邻苯三酚的自氧化产物的还原信号最强, 且 SOD 抑制邻苯三酚自氧化的灵敏度最高, 因此实验选择 50mmol/L Tris-HCl (pH8.30) 的缓冲溶液作为底液。

## 2.3 EDTA 的影响

由于 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 等金属离子可明显的催化邻苯三酚的自氧化, 如果加入 EDTA 可消除此影响。实验发现 EDTA 存在下, 邻苯三酚自氧化速率与 EDTA 的浓度无关, 且消除金属离子对邻苯三酚自氧化的影响, 试验了在邻苯三酚自氧化体系中 0.05mol/L EDTA 在 0.05 至 0.4mL 之间对金属离子的抑制作用, 发现加入 0.1mL EDTA 时可以抑制金属离子的影响, 故本文选择向溶液中加入 0.2mL 0.05mol/L 的 EDTA 消除金属离子的干扰。

## 2.4 温度的影响

实验结果表明, 温度对邻苯三酚自氧化速率的影响远比 pH 小得多, 在 23.5 ~ 27.5℃ 范围内, 邻苯三酚的自氧化速率基本不变, 这点给测定带来方便。实验选择在 25℃ 恒温 25min。

## 2.5 不同邻苯三酚浓度时 SOD 对其自氧化抑制情况

不同的邻苯三酚浓度对自氧化速率有影响, 但邻苯三酚浓度对其自氧化速率的影响小于 pH 的影响。随着邻苯三酚浓度的增大, 其自氧化速率增大。邻苯三酚自氧化速率与其浓度在 0 ~ 0.3 mmol/L 范围内成一定的线性关系 (见图 2), 由于浓度太小, 邻苯三酚自氧化线性速率变小, 浓度太大, SOD 对邻苯三酚自氧化抑制的灵敏度降低。所以, 测试体系中邻苯三酚浓度为 0.2mmol/mL。

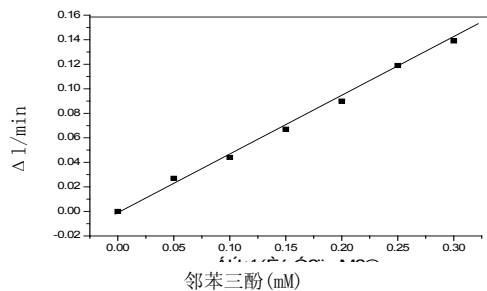


图2 邻苯三酚浓度与自氧化速率关系 (对于-1.44V 的还原峰)

Tris-HCl(pH 8.3) 缓冲溶液, 1.00mmol/L EDTA, peak: -1.44V。

## 2.6 SOD 对邻苯三酚自氧化反应的抑制作用

以 0.2mmol/L 邻苯三酚, 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.30) 缓冲溶液, 1.00mmol/L EDTA 为测定体系, 加入一定量的 SOD, 总体积为 10mL。按 2.2.2 所述方法测定 SOD 对邻苯三酚自氧化的抑制情况, 即 SOD 活力曲线 (见图 3), 从图中可知: -0.96V 处测 SOD 对邻苯三酚的抑制的灵敏度高于 -1.44V 处, 对于 -0.96V 处来说, I<sub>50</sub> 为 0.082 μg/mL, 对于 -1.44V 处, I<sub>50</sub> 为 0.102 μg/mL。

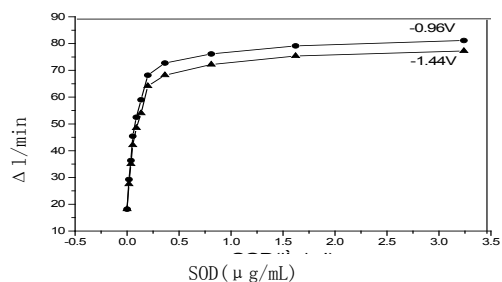


图3 SOD对邻苯三酚自氧化的抑制  
0.2mmol/L 邻苯三酚, Tris-HCl 缓冲液 (8.30),  
1.00mmol/L EDTA

## 2.7 黄酮类化合物对邻苯三酚自氧化的抑制作用

由于黄酮类化合物具有清除氧自由基的性质, 本文测定七种常见黄酮类化合物桑色素、槲皮素、芦丁、橙皮甙、柚皮甙、黄芩甙、芦荟甙对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除作用, 计算清除率的公式为: 清除率 = (i<sub>0</sub> - i) / i<sub>0</sub> × 100%, i<sub>0</sub> 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 IC<sub>50</sub> (见表 1)。7 种黄酮类化合物对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的清除活性为槲皮素 > 芦丁 > 桑色素 > 柚皮甙 > 黄芩甙 > 芦荟甙 > 橙皮甙, 从取代基方面看, 槲皮素分子苯环上总的羟基取代基最多, 而橙皮甙分子苯环上的羟基取代基最少, 羟基是给电子取代基, 在苯环上的羟基取代基越多, 离域度就越大, 反应中间体越稳定。

表 1 黄酮类化合物的 IC<sub>50</sub>

黄酮类化合物	IC <sub>50</sub> (μM)			邻苯三酚法
	黄嘌呤氧化酶-四唑氮蓝 <sup>[2]</sup>	吩嗪甲基硫酸盐-NA DH-四唑氮蓝 <sup>[3]</sup>		
槲皮素	42.3 ± 1.8	12.5 ± 0.9	20 ± 15.9	15.5
芦丁	42.7 ± 1.4	15.4 ± 0.6	56 ± 3.5	25.2
桑色素			192 ± 6.7	27.4

## 参考文献

- 1 邹洪, 袁倬斌. 分析试验室, 1997, 16(4): 36
- 2 Robak J and Gryglewski R J. Biochemical Pharmacology 1988,37(5):837
- 3 Chen Y T, Zheng R L. Free radical and medicine. 1990,9:19
- 4 刘艳, 许荣福, 邹洪. 现代仪器, 2006, (6): 26

(下转第 38 页)

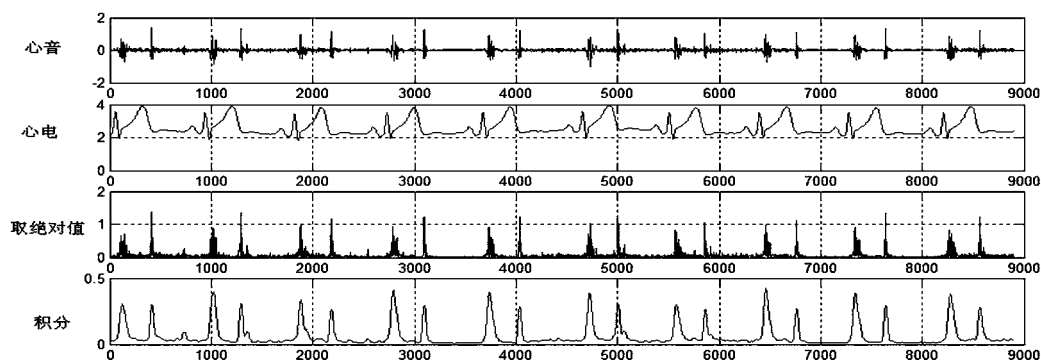


图6 心音的数字信号处理

音包络,从而实现低负荷心冲击信号提取,该技术已经成功运用到我们的低负荷生理参数提取的研究项目中,初步的数字信号处理技术验证硬件检测技术的可靠性。在后续研究中,我们将通过高速AD采集心音信号,对其进行时域和频域的分析,时频分析方法(WVD、CWD、CKD)对心音这种非平稳信号,有较高的时频分辨率,对于揭示心音产生的生理机制有着积极的作用,在理论研究和临床诊断中有一定的实用价值。心音图结合心电图,能够大大提高心血管疾病的鉴别和诊断水平,对于了解心血管功能,选择治疗,判断病理以及研究某些疾病的机理都提供很有价值的资料。

### 参考文献

- 1 于云之, 聂邦畿. 心音的临床意义及研究现状 [J], 现代医学仪器与应用, 1997, 9 (3): 9~12
- 2 肖仪华, 裴驭力. 基于笔记本计算机的心音分析仪 [J], 北京生物医学工程, 1999 (1): 34~38
- 3 杨乐平, 李海涛, 赵勇, 等. LabVIEW 高级程序设计 [M], 北京: 清华大学出版社, 2002
- 4 元秀华, 谢定. 心音信号测量中的噪声干扰分析与滤除方法 [J], 中国现代医学杂志, 1999, 9 (6): 67
- 5 吴延军, 徐泾平, 赵艳. 心音的产生与传导机制 [J], 生物医学工程学杂志, 1996, 13 (3): 280~288
- 6 王衍文, 王海滨, 程敬之. 心音信号的时频分析 [J], 生物医学工程学杂志, 1998, 15 (1): 41~46

## The development of detecting heart vibration signal non-intrusively

Guo Juntao<sup>1</sup> Lin Sencai<sup>2</sup> Tian Xiaodong<sup>1</sup> Chen Jiming<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Engineering, General Hospital of Air Force, Beijing 100036)

(2. Department of Medical Engineering, No.2 Hospital of PLA Gneural Hospital, Beijing 100091)

**Abstract Objective:** To detect the heart vibration signal non-intrusively. **Method:** A solid vibration sensor was used to detect the heart sound, then the heart sound envelope was formed with two way hardware rectification and low frequency passed filter. **Result:** It is an effective method to detect the heart vibration signal compared with simultaneous ECG recording. **Conclusion:** Heart vibration signal could be detected with the solid vibration sensor and it is an effective way to detect heart vibration signal non-intrusively.

**Key words** Heart sound ECG Vibration sensor Rectification Envelope

(上接第 30 页)

## Determination the activity of superoxide dismutase enzyme by electrochemical method based on the reaction of pyrogallol autoxidation

Wang Bingjuan Li Lingxia Zou Hong

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

**Abstract** In Tris-HCl (pH8.30) buffer solution, pyrogallol reacted with oxygen to form superoxide radical and several intermediate products which gave two waves and the peak potentials were  $-0.96\text{V}$  and  $-1.44\text{V}$  (SCE). Superoxide dismutase enzyme can catalyzed the dismutation reaction of superoxide radical so that decreased the ratio of pyrogallol autoxidation, which could determinate superoxide dismutase enzyme activity by detect the chang of the ratio of the pyrogallol autoxidation with different SOD. A simple and sensitive electrochemical method was discribed. The method has been applied into the research of scavenging activity of some flavonoids. The results indicated that the sensitivity of determination of SOD activity in  $-0.96\text{V}$  was better than in  $-1.44\text{V}$ . The results of four methods were summarized.

**Key words** Pyrogallol Superoxide dismutase activity Superoxide anion radical Polarography