

过氧亚硝基-鲁米诺化学发光体系的改进

范小兵* 沙大年 梁小凤 韩超 胡天喜

(上海交通大学昂立生物医药研究所, 上海 200030)

摘要 建立了一个测定过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-) 化学发光的改进体系, 测试了某些抗氧化剂清除 ONOO^- 的作用, 其体系的组成和启动发光的程序如下: 向 pH 10.5 碳酸缓冲液配的 0.01 mol/L 浓度 NaN_3 溶液通 O_3 30 s, 取其 800 μl 原位注入含有 100 μl 水配样品和 100 μl 的 0.001 mol/L 鲁米诺溶液中, 启动化学发光 (chemiluminescence, CL), 立即测定每 6 秒的脉冲数 (CP6S), 连续测定 10~30 次. 根据实际需要, 选其某一次的 CL 强度作为评判指标, 对比抗氧化剂的活性. 该发光体系灵敏、简便、且较稳定, 最低可检测限为 8.74 $\mu\text{mol/L}$ 的 ONOO^- 量, 线性范围为 8.74~74.04 $\mu\text{mol/L}$. 批内变异系数 3.35% ($n=10$), 批间变异系数 5.52% ($n=10$). 测得维生素 C (Vit. C)、茶多酚 (EGCG)、原花菁素、硫脲皆有抑制 CL, 即清除 ONOO^- 的作用.

关键词 化学发光, 过氧亚硝基阴离子, 抗氧化剂

学科分类号 Q63

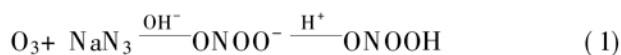
一氧化氮自由基 ($\text{NO}\cdot$) 有诸多的生理学作用, 它是内皮细胞松弛因子, 可以使平滑肌松弛, 防止血小板聚集; 它又是兴奋性神经原的神经递质, 在神经信号传递、学习和记忆的过程中起着重要的作用; 巨噬细胞免疫活化时产生大量的 $\text{NO}\cdot$, 作为杀伤微生物和肿瘤细胞的毒性分子. 尽管 $\text{NO}\cdot$ 有如此多的生理功能, 为人体所必需, 然而在某种病理条件下, 例如缺血再灌注、糖尿病等都会过量产生, 会对肌体产生毒害作用, 导致细胞凋亡和死亡, 甚至加速病变. 病理条件下, 体内既产生 $\text{NO}\cdot$, 也同时产生 $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{NO}\cdot$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 反应, 立即转化成过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-). 碱性条件下 ONOO^- 较为稳定, 半衰期较长 ($T_{1/2} < 5$ s), 可以由生成的部位扩散到较远的距离而达到靶位子, 导致范围较广的靶损伤; 生理和酸性 pH 时, ONOO^- 迅速质子化转化为过氧化亚硝酸 (ONOOH), 进而分解成 NO_2^- 和羟自由基 ($\text{OH}\cdot$). $\text{OH}\cdot$ 的寿命极短, 虽然也是强氧化剂, 但只能在原位损伤细胞和组织. 某种意义上说, 强氧化剂 ONOO^- 的危害性高于 $\text{OH}\cdot$, $\text{NO}\cdot$ 所致的损伤, 主要是 ONOO^- 所致的损伤^[1].

清除氧自由基的天然抗氧化剂已经研究得很多, 有大量的文献报道, 但是对近年来发现的氮自由基清除剂的研究, 却寥寥无几. 为了寻找清除 $\text{NO}\cdot$ 的物质, 必需有良好的实验模型. 大多数测 $\text{NO}\cdot$ 的方法是测其产物 NO_2 , 并用分光光度比色法^[2], 该方法灵敏度较差, 手续麻烦; 也有用

ESR 法^[3] 和化学发光法^[4] 直接测 $\text{NO}\cdot$ 的, 这些方法设备昂贵, 装置太复杂, 一般实验室难以实现. 近年来, 化学发光测定 ONOO^- 已有多篇报道, 赵保路等^[5] 用 NaNO_2 与 H_2O_2 反应, MnO_2 柱分离法制备 ONOO^- , 并用化学发光法测定了知母宁清除 ONOO^- 的作用; Radi 等^[6] 则用 $\text{O}_2\cdot^-$ 与 $\text{NO}\cdot$ 反应产生 ONOO^- , 尿酸、半胱氨酸等抑制 ONOO^- 诱发的鲁米诺化学发光; Pryor 等^[7] 首先用通 O_3 到碱性 NaN_3 溶液中形成 ONOO^- , 并用 302 nm 紫外分光光度计测量其形成和消失, 认为此法有克服以上体系离子强度高及 H_2O_2 干扰的优点. 最近 Kanski^[8] 报道用化学发光法检测 ONOO^- 诱导红细胞的氧化损伤, 作为离体检测, 有一定的价值, 但其使用了红细胞使体系复杂化. 我们参考了以上文献, 扬长避短, 根据国内仪器设备的现状, 摸索了各种条件, 建立了一个测量 ONOO^- 的化学发光改进体系, 并用来筛查某些清除 ONOO^- 的抗氧化剂, 结果令人满意.

1 原理

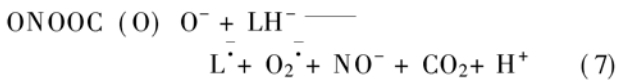
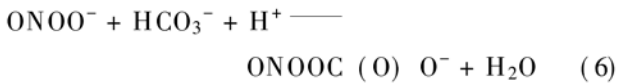
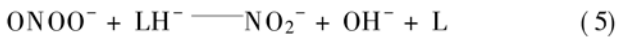
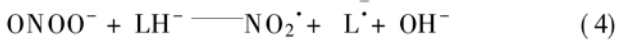
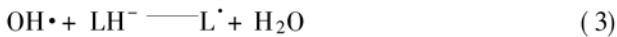
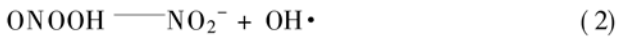
O_3 和 NaN_3 反应产生 ONOO^- , ONOO^- 氧化鲁米诺 (LH^-) 使 LH^- 激发, 后者在退激时发射 425 nm 的光, 其过程如下:



* 通讯联系人.

Tel: 021-52540177, E-mail: xbfan@mail.onlly.com.cn

收稿日期: 2000-04-11, 接受日期: 2000-06-07



2 材料和方法

2.1 试剂

NaN₃, 浙江城关化工厂产 (化学纯, 含量不少于 98%), 鲁米诺购自 Sigma 公司, O₃ 由臭氧多功能消毒机产生, 茶多酚 (EGCG) 上海智达科技有限公司赠 (纯度 98%), 维生素 C、硫脲、甘露醇、NaH₂CO₃、Na₂HCO₃、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄ 皆为分析纯, 购自上海化学试剂公司. 除鲁米诺用碱性溶液溶解后, 用双重蒸馏水配制外, 皆用双重蒸馏水配制.

2.2 仪器

SHG-C 型生物化学发光测量仪 (上海检测技术研究所上立仪器厂), 臭氧多功能消毒机 [宝生牌, 凯鑫轻工 (南京) 有限公司], 微量移液器 (北京青云仪器厂).

2.3 方法

配制不同 pH 的碳酸缓冲液 (CB)、磷酸缓冲液 (PB) 和碱性水 (pH 10.5). 用碳酸缓冲液配制不同浓度的 NaN₃ 溶液各 10 ml, 用尼龙布封玻璃管的头端, 将玻璃管的另一端插入臭氧发生器的出气口, 开动臭氧发生器, 待闻到有 O₃ 味时, 将出气管插入 NaN₃ 的溶液中鼓泡至所需的时间 (用秒表计时), 鼓泡结束取 800 μl ONOO⁻ 液原位注入事先装有样品 (对照用双蒸水) 100 μl 和鲁米诺 100 μl 的测量管中启动化学发光, 用 R 程序立即并连续测每 6 秒钟的脉冲数 (CP6S), 观察 CL 的动力学变化, 测量次数和取何次为标准视 CL 衰减状况和样品而定, 结果以每 6 秒钟的脉冲数 (CP6S) 表示.

臭氧和 NaN₃ 有毒, 注意通风和废液处理.

3 结果与讨论

3.1 体系中各组分对发光强度的影响

3.1.1 臭氧 (O₃) 对化学发光强度的影响: 固定

NaN₃ 为 0.01 mol/L, 鲁米诺为 0.001 mol/L, 通 O₃ 鼓泡不同的时间, 用化学发光法 (CL) 和 302 nm 下紫外分光光度法 (UV) 测其产生 ONOO⁻ 的量, 结果见表 1 和图 1. 图 1 可见, 不论用 CL 还是用 UV 测定, 1~15 s 通 O₃ 时间内 CL 值和 UV 的 A 值与 ONOO⁻ 的量基本上呈线性关系, 超过 15 s 渐趋向饱和 (图中未绘出). 从化学发光动力学曲线来看, 通 30 s 的 O₃, 3 min 之内 CL 下降约 10%~20%, 有一定的稳定时间.

通 O₃ 时间要控制准确, 一定要待闻到有 O₃ 味时才插入通气口启动计时, 否则会影响重现性.

Table 1 Effect of ventilating O₃ times on the chemiluminescent intensity

ventilating O ₃ time/s	ONOO ⁻ / μmol·L ⁻¹ *	CL intensity (CP6S) peak value	CL intensity (CP6S) after 90 s
1	8.74	82577	95501
2	10.99	82744	75933
4	15.50	88265	76457
6	20.00	120440	97111
8	24.50	131223	121200
10	29.01	138251	110943
12	33.51	135594	114353
14	38.01	147759	140966
15	40.26	146926	149108
30	74.04	159863	156843
60	141.59	159943	158410

* O₃ + NaN₃ $\xrightarrow{\text{OH}^-}$ ONOO⁻ $\xrightarrow{\text{H}^+}$ ONOOH, ONOOH $\xrightarrow{\quad}$ NO₂⁻ + OH[•], the amount of NO₂⁻ was measured by spectrophotometrically at 540 nm (by Griess reagent). ONOO⁻ and NO₂⁻ mol value is equal, so by this method, the amount of ONOO⁻ was determined indirectly by measuring NO₂⁻.

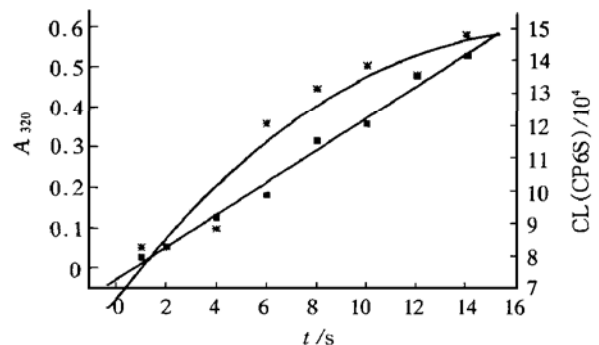


Fig. 1 Effect of ventilating O₃ times on the chemiluminescent intensity

* — * : CL; ■ — ■ : A.

以通 O_3 时间为横坐标, 发光强度 CL (峰值) 及吸光度 A 值为纵坐标作图 (图 1).

3.1.2 NaN_3 浓度对 CL 强度的影响: 固定通 O_3 30 s、luminol 0.001 mol/L, 随着 NaN_3 浓度升高, CL 也升高, $10^{-2} \sim 10^{-5}$ mol/L 间与 CL 强度呈线性关系. 值得注意的是, 在无 NaN_3 时 O_3 也会氧化 luminol 发光, 故本底较高 (表 2). 由于 O_3 很易分解, 故而发光强度衰减较快.

Table 2 Effect of NaN_3 concentration on the chemiluminescent intensity

c (NaN_3) / $mol \cdot L^{-1}$	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
CL intensity (CP6S)	74446	79191	117047	144652	158069

3.1.3 鲁米诺浓度对 CL 强度的影响: 固定通 O_3 15 s、 NaN_3 0.001 mol/L, 无鲁米诺时 CL 很低, 随着鲁米诺的加入 CL 立即增强, 并随鲁米诺浓度的升高而呈线性升高, 在 1 min 内各浓度的 CL 几乎不衰减, 相对较稳定 (表 3), 随着时间的延长, 形成的 $ONOO^-$ 衰变, 发光强度有所下降. 从本试验可见 $ONOO^-$ -luminol CL 对鲁米诺有浓度依赖的关系.

Table 3 Effect of luminol concentration on the chemiluminescent intensity

c (Luminol) / $mol \cdot L^{-1}$	0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
CL intensity (CP6S)	56	81339	91215	97824	155443
The trend in 60 s (CP6S)	56	78497	91981	129145	149596
The trend in 60 s (CP6S)	53	81339 → 79503	91215 → 93638	97824 → 96783	155443 → 157576

3.2 不同溶剂和不同 pH 值对 CL 的影响

3.2.1 不同溶剂对 CL 的影响: 碱性条件下, 以水为介质 $ONOO^-$ 诱导的 CL 较弱, 180 s 内下降相对较快; 以磷酸缓冲液 (PB) 和碳酸缓冲液 (CB) 为介质 CL 强度较强, 且两者相近, 但前者较后者衰减得快一些, 这可能是由于 $ONOO^-$ 也能氧化碳酸盐, 产生有活性的羰基有关 (表 4).

3.2.2 不同 pH 的碳酸缓冲液对 CL 的影响: pH 7.0 时的 CL 强度只及 pH 10.5 和 pH 4.0 时的 60%, 且衰变极快, 60 s 已接近于对照; pH 10.5 和 pH 4.0 的 CL 相近, 但 pH 4.0 时衰减很快, 可

能由于 $ONOO^-$ 经 $ONOOH$ 分解成 NO_2^- 和 $OH \cdot$, $OH \cdot$ 氧化鲁米诺发光衰变极快, 而 pH 10.5 时 60 s 内 CL 值几乎不变 (表 5).

Table 4 Effect of the solvents on $ONOO^-$ -luminol CL*

Solvents	H_2O	PB	CB
CL intensity (CP6S)	99451	146252	147617
The trend in 180s (CP6S)	77606 Slowly drop	137945 A little drop	146047 Stability

* The time of ventilating O_3 is 30 s. pH 10.5.

Table 5 Effect of CB buffer in different pH on $ONOO^-$ -luminol CL

pH value	10.5	7.0	4.0
CL intensity (CP6S)	146947	85142	145059
The trend in 60s (CP6S)	149781 Stability	936 Quickly decay	77565 Faster drop

3.3 一次通 O_3 后 $ONOO^-$ 诱导 L-CL 的动力学变化

一次性通 O_3 30 s 后, 间隔不同时间取样检测, 可见到 2 min 以内取样所测的 CL 值几乎不衰减, 但 3 min 时取样, CL 已降低 20% (表 6). 较长时间 CL 值不变, 对于减少 $ONOO^-$ 制备次数、进行自动化测量有利.

Table 6 After ventilating O_3 once time the CL dynamic induced by $ONOO^-$

t/s	6	60	120	180
CL intensity (CP6S)	150035	146926	143916	115796
	159863	143431	149014	118757
	142520	143943	142551	112875
$\bar{x} \pm s$	150806 ± 8697	144767 ± 1887	145160 ± 3406	115869 ± 2941
Variation coefficient CV%	5.77%	1.33%	2.35%	2.54%

3.4 抗氧化剂对 $ONOO^-$ 的清除作用

选用抗坏血酸 (Vit. C)、茶多酚 (EGCG)、原花青素、硫脲、甘露醇各 10^{-3} mol/L, 观察它们对 $ONOO^-$ 诱导的鲁米诺 CL 的影响, 结果发现除甘露醇外都是良好的 $ONOO^-$ 的清除剂, 但清除的能力不同, 其强弱次序为 Vit. C > EGCG > 原花青素 > 硫脲. 一开始 Vit. C 和 EGCG 就分别使 CL 下降 49.6% 和 35.8%, 1 min 内已达 90% 以上, 3 min 内几乎全部被抑制; 硫脲的清除能力相对小

一些,一开始清除 32.4%, 3 min 才清除 48.5% 左右; 原花菁素介于两者之间 (图 2). VitC、EGCG 与硫脲可能存在着不同的清除机理, 有待进一步探讨.

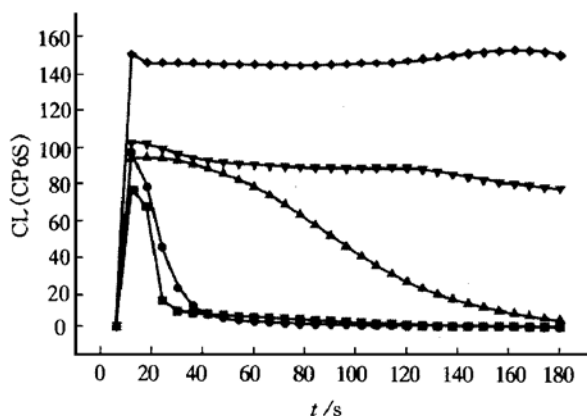


Fig.2 Scavenging effect of antioxidants on ONOO⁻
 ■—■: Vit.C; ●—●: Teapolyphenol; ▲—▲:
 Procyanidins; ▼—▼: Thiourea; ◆—◆: Control.

综上所述我们组成了一个由 pH 10.5 的碳酸缓冲液、0.01 mol/L NaN₃、0.001 mol/L 鲁米诺及通 30 s O₃, 总体积为 1 ml 的化学发光体系. 该体系最低检测限为 8.74 μmol/L 的 ONOO⁻ 量, 线性范围为 8.74~ 74.04 μmol/L. 该体系灵敏度很高, 重现性也好, 批内变异系数 3.35% (n=10), 批间变异系数 5.52% (n=10). 从初步检测抗氧化剂的试验来看, 该体系用于测量离体状态下的 ONOO⁻ 的天然抗氧化剂是可行的. 本方法有简便、灵敏、稳定的特点, 是一个测 NO· 及其中间产物 ONOO⁻ 的新改进的发光体系.

参 考 文 献

- Gross S S, Wolin M S. Nitric oxide: pathophysiology mechanisms. *Ann Rev Physiol*, 1995, **57**: 737~ 769
- 黄迪南, 候 敢, 夏绪光, 等. 心脑血管疾病患者血清中一氧化氮水平变化的研究. 见: 方允中, 郑荣梁, 沈文梅等编. 自由基生命科学进展. 第 4 辑. 北京: 原子能出版社, 1996, **4**: 123~ 126
Huang D N, Hou G, Xia X G, *et al.* Changes of NO levels in serum of patients with cerebro cardiovascular diseases. In: Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M eds. *Advances in Free Radical Life Sciences*. Beijing: Atomic Energy Press, 1996, **4**: 123~ 126
- 赵保路, 沈剑刚, 呼俊改, 等. NO 和氧自由基在心肌缺血再灌注损伤中的协同作用心肌缺血再灌注损伤产生的 NO 自由基的 ESR 研究. *中国科学 (C 辑)*, 1996, **26** (4): 331~ 338
Zhao B L, Shen J G, Hu J G, *et al.* *Science in China (Seris C)*, 1996, **26** (4): 331~ 338
- 王成彬, 田亚平, 沈文梅, 等. 鲁米诺化学发光测 NO. 见: 方允中, 郑荣梁, 沈文梅等编. 自由基生命科学进展. 第 3 辑. 北京: 原子能出版社, 1995. 159~ 163
Wang C B, Tian Y P, Shen W M, *et al.* Measurement of nitric oxide by luminol chemiluminescence. In: Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M eds. *Advances in Free Radical Life Sciences*. Beijing: Atomic Energy Press, 1995. 159~ 163
- Zhao B L, Shen J G, Li M, *et al.* Scavenging effect of chinonin on NO and oxygen free radicals and its protective effect on the myocardium from the injury of ischemia reperfusion. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1315**: 131~ 137
- Radi R, Cosgrove T P, Bekman J S. Peroxynitrite induced luminol chemiluminescence. *Biochem J*, 1993, **290**: 51~ 57
- Pryor M A, Cueto R, Jin X, *et al.* A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, **18** (1): 75~ 83
- Kanski J, Koppal T, Butterfield D A. Investigation of peroxynitrite induced oxidative stress in rad blood cell monitored by luminol dependent chemiluminescence. *Analytical Letters*, 1999, **32** (6): 1183~ 1192

An Improvement of Chemiluminescent System for Determination of Peroxynitrite Anion

FAN Xiao-Bing*, SHA Da-Nian, LIANG Xiao-Feng, HAN Chao, HU Tian-Xi

(ONLLY Biological and Medicine Research Institute, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract An improvement of chemiluminescent system for determination of peroxynitrite anion (ONOO⁻) has been made. In this system, the effect of some antioxidants for scavenging ONOO⁻ was tested. The constitute of this system and the program of starting were followed as: The ozone (O₃) was bubbled through a glass-frit into 10 ml 0.01 mol/L solution of sodium azide in CB (pH 10.5) to generate ONOO⁻. The 800 μl ozonized solution of azide was injected into a glass tube in situ which contains 100 μl sample and 100 μl luminol solutions to initiate

chemiluminescence (CL). The pluses / 6 seconds (CP6S) were determined immediately and continually for 10 ~ 30 times. A certain CL intensity (CP6S) was chosen as evaluation index to compare the activity of antioxidants. This chemiluminescent system is sensible, simple and stable. The determination limit was $8.74 \mu\text{mol/L ONOO}^-$. The linear rang was $8.74 \sim 74.04 \mu\text{mol/L ONOO}^-$. The intra batch and inter batch variation coefficient (CV%) of the analysis were 3.35% ($n = 10$) and 5.52% ($n = 10$) respectively. It was tested that Vit. C, teapolyphenol, procyanidin and thiourea all have effects on scavenging ONOO^- .

Key words chemiluminescence, peroxynitrite anion, antioxidants

* Corresponding author. Tel: 86-21-52540177, E-mail: xbfan@mail.onlly.com.cn

Received: April 11, 2000 Accepted: June 7, 2000