

氯化硝基四氮唑蓝显色检测超氧阴离子自由基的研究

刘瑞恒, 付时雨, 詹怀宇

(华南理工大学 制浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 将超氧化钾 (KO_2) 溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 和十八冠醚混合溶剂中可以制备稳定的超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的溶液, 在该溶液体系中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与氯化硝基四氮唑蓝 (nitroblue tetrazolium, NBT) 可以定量反应生成蓝色的单甲腓 (monofomazan), 用分光光度法进行检测。研究证实: 单甲腓在 DMSO 溶液中的最大吸收波长为 680 nm; 反应时间和反应温度对测定结果有一定的影响。NBT 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应 5 min 较为适宜; 由于低温条件下 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 较为稳定, 故测定温度维持在 20 左右。反应后体系吸光度与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 量之间的线性方程为: $A_{680} = (-0.071 \pm 0.015) + (2.607 \pm 0.037)X$, $r=0.9998$, 其中 X 为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的量, 标准偏差为 1.4%。抗坏血酸对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除效果的验证实验表明, 该方法可应用于实验室抗氧化剂的筛选与研究。

关键词: 超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$); 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT); 超氧化钾 (KO_2); 二甲基亚砜 (DMSO); 比色法

中图分类号: O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2008)04-0355-05

Spectrophotometric Determination of Superoxide Anion Radical with Nitroblue Tetrazolium

L U Rui-heng, FU Shi-yu, ZHAN Huai-yu

(State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Highly stable superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) solution prepared by dissolving KO_2 in dimethyl sulfoxide (DMSO) and 18-crown-6 ether could react with nitroblue tetrazolium to form a blue compound with a maximum absorbance wavelength at 680 nm. Spectrophotometric results showed that the optimum time and temperature for the reaction of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and NBT was 5 min and 20, respectively, and that the relationship between monofomazan absorbance and $\text{O}_2^{\cdot-}$ concentration was linear with a correlation coefficient of 0.9998. The standard deviation was 1.4%. It was found that ascorbic acid could eliminate $\text{O}_2^{\cdot-}$ effectively, thus the proposed method can also be used for the screening of antioxidants in the laboratory.

Key words: superoxide anion radical; nitroblue tetrazolium; superoxide potassium; DMSO; colorimetric analysis

超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 是分子氧的单电子还原产物, 具有高的反应活性, 在化学、医学、生物、食品等领域受到广泛关注。因 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 极不稳定, 很容易衰变为其它活性氧单元, 其表征和检测有一定难度。通常电子自旋共振 (ESR)^[1]、化学发光法 (CL)^[2]、电化学法^[3]、分光光度法等可以用来检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 其中分光光度法具有设备简单、操作简便的特点, 用于检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 更实用。目前有关分光光度法检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的技术主要有: 过硫酸铵 /N,N,N,N 四甲基乙二胺 (AP-TEMED) 羟胺氧化法^[4]、邻苯三酚自氧化法^[5]、氯化硝基四氮唑蓝 (nitroblue tetrazolium, NBT) 光化学还原法^[6]等。羟胺氧化法线性相关性较差 ($r=0.9653$); 光化学还原法中 NBT 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应的生成物甲腓不溶于水, 在水溶液中很容易形成沉淀, 影响测定结果; 邻苯三酚自氧化过程中的产物复杂, 反应受外界环境的影响较大 (如温度、

收稿日期: 2007-05-10; 修回日期: 2007-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20477046); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 重点项目 (2007AA100704)

第一作者: 刘瑞恒 (1980-), 女, 宁夏平罗人, 硕士研究生

通讯作者: 付时雨, Tel: 020-87113940-1002, E-mail: shyfu@scut.edu.cn

pH 值、浓度等)。另外, 以上方法均采用水作为溶剂, 而在水溶液中 $O_2^{\cdot-}$ 很不稳定 ($O_2^{\cdot-}$ 在水溶液中的寿命很短, 接受电子后迅速歧化为 H_2O_2 和 O_2 , 在 pH 5 时, 歧化速率常数约为 $10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 方法的准确度受到影响。因此, 研究稳定可靠的 $O_2^{\cdot-}$ 检测方法很有必要。

NBT 是生化领域通常采用的 $O_2^{\cdot-}$ 检测剂, 其与 $O_2^{\cdot-}$ 反应, 生成蓝色不溶于水的物质甲臌 (formazan)。反应示意图如下所示。



其中, MF 代表单甲臌 (monofomazan), DF 代表二甲臌 (difomazan)。当 NBT 过量时, 发生反应 (1), 体系中只生成单甲臌; 当 $O_2^{\cdot-}$ 过量时, 依次发生反应 (1) 和 (2), NBT 先被还原生成单甲臌, 单甲臌继续被还原生成二甲臌。单甲臌和二甲臌结构上的区别在于后者结构中 2 个四氮唑环均被还原而前者只有 1 个被还原。在碱性水溶液中, 单甲臌的 $\epsilon_{530} = 25\,400 \pm 1\,200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[18]。当 NBT 过量时, 单甲臌的生成量与 $O_2^{\cdot-}$ 量有良好的对应关系。

文献报道, KO_2 溶解在二甲基亚砷 (DMSO) 中可以形成很稳定的 $O_2^{\cdot-}$, 在除氧冷冻的条件下, $O_2^{\cdot-}$ 在 1 个月内都能维持稳定的浓度^[9]。本研究将 KO_2 溶解于 DMSO 溶液产生稳定的 $O_2^{\cdot-}$, 利用 NBT 作检测剂, DMSO 作为反应介质及甲臌溶剂, 提出了 DMSO 体系中 $O_2^{\cdot-}$ 的分光光度检测法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

紫外分光光度计, Hitachi 公司 U-3010 型。

KO_2 , NBT 为 Sigma - Aldrich 公司产品; 十八冠醚为 Alfa Aesar 公司产品; DMSO 为国产分析纯, 分子筛为 3A 型。

1.2 实验过程

量取 100 mL 经过精馏并经活化分子筛干燥的 DMSO 溶液加入到具塞锥形瓶中, 然后称取约 0.04 g KO_2 和 0.3 g 十八冠醚一并加入其中 (冠醚与 KO_2 的摩尔比为 2 : 1 左右)。放入磁力搅拌转子, 盖好锥形瓶塞, 用石蜡密封, 磁力搅拌溶解。待 KO_2 全部溶解, 通氮气除氧后放入冰箱中冷藏, 使用时取出待温度慢慢升至测定温度, 用 DMSO 稀释 50 倍。NBT 与抗坏血酸溶液均采用干燥的 DMSO 溶液配制。

在波长、时间、温度、线性关系及结果一致性的验证实验中, 将 $O_2^{\cdot-}$ 溶液加入到 NBT 溶液中, 反应一段时间后, 加入 DMSO 稀释, 测定溶液的吸光度。在抗坏血酸清除 $O_2^{\cdot-}$ 的实验中, 先加入抗坏血酸溶液, 再加入 $O_2^{\cdot-}$ 溶液, 反应 5 min 后, 加入 NBT 再反应 5 min, 最后加入 DMSO 稀释测定吸光度。除温度实验外, 其它实验均在 19~20 ℃ 下进行。

2 结果与讨论

2.1 超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 溶液的制备

本研究致力于建立染料显色的光谱测定方法, 首先考虑 $O_2^{\cdot-}$ 来源要有足够量 (不小于 1 mmol/L) 且浓度要稳定; 二是 $O_2^{\cdot-}$ 的产生简便, 易于实现, 无需昂贵、复杂的设备; 三是 $O_2^{\cdot-}$ 的产生体系与检测试剂之间不应有相互作用, 以免影响测定结果^[10]。产生 $O_2^{\cdot-}$ 方法的文献报道有很多, 如辐射分解法^[11]、光照核黄素法^[5]、酶促反应^[12]、二甲亚砷碱性水溶液法^[13-14]、碱性连二亚硫酸钠法^[15]等。但是, 与 KO_2 - DMSO 体系相比较而言, 这些产生体系复杂且 $O_2^{\cdot-}$ 不够稳定。

KO_2 在 DMSO 中的溶解度较小, 为加强 KO_2 在 DMSO 中的溶解, 通常加入十八冠醚。十八冠醚可以将 K^+ “包” 起来, 从而增强 KO_2 在 DMSO 中的溶解^[16-17]。这一体系中产生的 $O_2^{\cdot-}$ 初始量与加入的 KO_2 的量相近。James^[6] 通过电子自旋共振技术 (ESR) 研究了 KO_2 - DMSO - 十八冠醚体系在 77 K 低温下的 ESR 谱图。结果证实, 在此体系中产生的自由基的 g 值 ($g = 2.01, 2.11$) 与电化学体系中产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的 g 值很接近, 说明 KO_2 溶解在 DMSO - 冠醚体系中产生的自由基为 $O_2^{\cdot-}$ 。细胞色素 C、NBT

的还原实验以及超氧化物歧化酶对 $O_2^- \cdot$ 的清除实验也证实了这一点^[18]。 KO_2 溶解在 DMSO 中制备 $O_2^- \cdot$ 的优点在于体系中 $O_2^- \cdot$ 的稳定性远远高于水溶液体系。稳定的 $O_2^- \cdot$ 源为后续实验提供了良好的保证。

KO_2 溶解在 DMSO - 十八冠醚溶液中可以制备稳定的 $O_2^- \cdot$ 溶液, 为本实验提供了稳定 $O_2^- \cdot$ 的来源。文献 [7] 直接用分光光度法在 250 nm 处测定 KO_2 - DMSO - 十八冠醚溶液的吸光度来估计 $O_2^- \cdot$, 但是此方法的灵敏度低 ($\epsilon = 2\ 686 \pm 29\ L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), 测定 $O_2^- \cdot$ 的浓度在 $10 \sim 100\ mmol \cdot L^{-1}$ 之间, 本研究将选用 NBT 与 $O_2^- \cdot$ 的反应, 通过显色来测定 $O_2^- \cdot$, 灵敏度较高。

2.2 检测波长的确定

如前所述, 当变化 NBT 与 $O_2^- \cdot$ 的量时, 反应体系中可能生成单甲腓也可能生成双甲腓。当 NBT 的量一定时 (即 4 mL 反应比色皿中加入 0.6 mL 0.01 mmol/L NBT), 逐渐增加 $O_2^- \cdot$ 的量, 生成产物的紫外吸收谱图如图 1 所示。可以看出, 当 $O_2^- \cdot$ 的量较小时 (小于 0.20 mL, 即 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的摩尔比小于 1), 生成产物的最大吸收峰出现在 680 nm 左右, 且在此范围内, 随着 $O_2^- \cdot$ 量的增加, 吸光度增加而最大吸收波长保持不变。继续增加 $O_2^- \cdot$ 的量 ($O_2^- \cdot$ 与 NBT 的摩尔比大于 2), 产物的紫外吸收光谱发生变化: 最大吸收峰向长波方向移动, 并且在 640 nm 和 730 nm 出现 2 个波峰。当 $O_2^- \cdot$ 的量增加到 0.60 mL 时 (即 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的摩尔比超过 4), 继续增加 $O_2^- \cdot$ 的量, 吸收曲线不再发生变化, 最大吸收波长固定在 730 nm 左右, 最大吸光度值保持不变。从波谱的吸收峰来看, 无论是形成单甲腓, 还是双甲腓, 产生较大吸收的波长在 600 ~ 800 nm 之间, 文献 [8] 采用 530 nm 波长测定, 但灵敏度不够; 不加显色物质直接在 250 nm 左右测定 $O_2^- \cdot$ - DMSO 溶液, 虽然可以测到一定的吸光值, 但是吸光系数较小^[7], 测定灵敏度不高, 所以不能测定浓度较低的 $O_2^- \cdot$ 。

由以上分析可知: 当反应体系中 NBT 过量时, 只生成单甲腓, 其最大吸收峰出现在 680 nm; 当 $O_2^- \cdot$ 过量时, 体系中有双甲腓生成, 其最大吸收波长为 730 nm。本实验中利用单甲腓的生成量来表示 $O_2^- \cdot$ 的量, 因此, 在实验中采用过量 NBT, 检测波长定为 680 nm。

2.3 线性关系与方法准确度的验证

当 NBT 过量时, 生成产物单甲腓的吸光度与 $O_2^- \cdot$ 的量之间呈现很好的线性关系。线性方程为 $A_{680} = (-0.071 \pm 0.015) + (2.607 \pm 0.037) X$, $r = 0.999\ 8$ 其中 X 为 $O_2^- \cdot$ 溶液的体积 (mL), 相对偏差为 1.4%。

对 8 份 $O_2^- \cdot$ 溶液用 NBT 显色测定, 实验条件同上。将测定值与线性方程计算值相比较, 回收率范围在 97% ~ 102%, 平均回收率为 99.9%, 相对偏差为 1.4%。结果如表 1 所示。

表 1 实验方法回收率
Table 1 The recovery of the determinations

	Volume of $O_2^- \cdot$ solution V/mL							
	0.22	0.26	0.30	0.34	0.38	0.42	0.46	0.50
Calculated value A	0.502	0.607	0.711	0.815	0.920	1.024	1.128	1.232
Measured value A	0.504	0.596	0.710	0.831	0.928	0.996	1.131	1.234
Recovery R/%	100	98	100	102	101	97	100	100

2.4 反应时间对结果的影响

Bielski^[8] 的研究证实, 在碱性条件下, $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的平均反应速率常数为 $(5.88 \pm 0.12) \times 10^4$ ($mol \cdot L^{-1}$) $\cdot s^{-1}$ 。这一结果说明, $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的反应很快, 短时间内就可以达到平衡。但在实验过程中发现, 若 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 反应后立刻加入 DMSO 稀释, 吸光度数值波动较大, 可能的原因是此时 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的反应尚未达到平衡, 测定结果的稳定性受到影响。为此, 本实验研究了 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 的

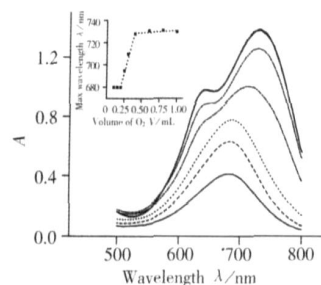


图 1 甲腓在 DMSO 中的紫外吸收谱图

Fig. 1 UV spectra of monoformazan in dimethyl sulfoxide (DMSO). $O_2^- \cdot$ concentration was controlled through adjusting the volume of $O_2^- \cdot$ solution from bottom to top 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL respectively; 0.01 mmol/L NBT; 0.6 mL, reaction time: 5 min, diluted DMSO: 4.0 mL, DMSO was used as reference solution

反应时间对测定结果的影响, 结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, 在不同的 O_2^- 浓度下, 反应时间对测定结果的影响趋势基本一致。当 O_2^- 与 NBT 的反应时间低于 4 min 时, 时间对吸光度值的影响较大; 当反应时间大于 4 min 时, 继续延长反应时间, 吸光度值的变化在 5% 以内, 且吸光度值与时间呈现较好的线性关系。因此, 为了使测定结果稳定可靠, 本研究中 O_2^- 与 NBT 的反应时间定为 5 min。

2.5 温度对结果的影响

温度对 O_2^- 的稳定性有很大的影响。低温时, O_2^- 可以在一定时间内保持一定的浓度; 温度升高, O_2^- 的歧化速率加快。本文研究了 O_2^- 溶液的温度对实验结果的影响, 如图 3 所示。

当温度较低时, O_2^- 较为稳定, 参与反应的 O_2^- 的量较大, 反应生成较多甲腈, 溶液吸光度较大; 升高温度, 结果刚好相反。纯 DMSO 的冰点为 18.45 °C, 图 3 显示当 O_2^- 的 DMSO 溶液温度接近冰点时, O_2^- 的浓度较为稳定, 对测定结果的影响较小。当温度超过 24 °C, O_2^- 的浓度下降很快, 对测定结果的影响不容忽视。

2.6 抗氧化剂对 O_2^- 的清除作用

抗坏血酸是一种有效清除 O_2^- 的抗氧化剂^[19], 本文研究了其在 DMSO 溶液中对 O_2^- 的清除率, 结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出, 在 DMSO 溶液中, 抗坏血酸显示了很好的 O_2^- 清除作用。当 O_2^- 的量一定时, 清除率与抗坏血酸用量基本呈线性关系。这一结果说明, 当其它条件一定时, 该体系可以用于抗氧化剂的筛选。因此, DMSO - KO_2 - NBT 检测体系的建立, 也为抗氧化剂的筛选提供了一条新的思路。

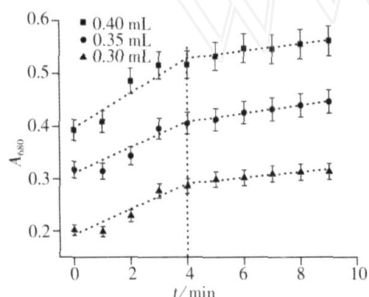


图 2 反应时间对测定结果的影响
Fig. 2 Effect of reaction time on results the volumes of O_2^- solution in three experiments were 0.30, 0.35 and 0.40 mL respectively; 0.5 mmol/L NBT; 0.5 mL, DMSO dilution; 4.0 mL, DMSO was used as reference solution

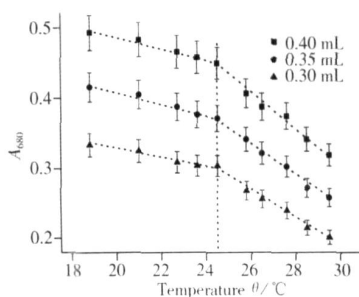


图 3 温度对 O_2^- 稳定性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the stability of O_2^- the volumes of O_2^- solution in three experiments were 0.30, 0.35 and 0.40 mL respectively; 0.5 mmol/L NBT; 0.5 mL, reaction time; 5 min DMSO dilution; 4.0 mL, DMSO was used as reference solution

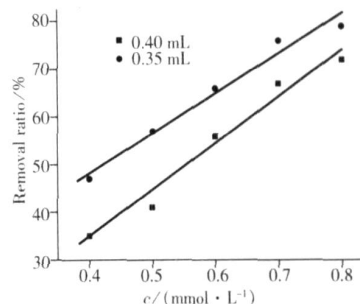


图 4 抗坏血酸对 O_2^- 的清除效果
Fig. 4 Elimination effect of ascorbic acid on O_2^- NBT volume; 0.5 mL, ascorbic acid; 0.2 mL, reaction time; 5 min, O_2^- solution; 0.40, 0.35 mL, respectively; DMSO dilution; 4.0 mL, DMSO was used as reference solution

参考文献:

- [1] NIE Zhou, TIAN Qiu, LU Yangping, et al. Superoxide anion radical generation in the NaOH/H₂O₂/Fe() system: a spin trapping ESR study[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2006, 44: 38 - 44.
- [2] 储海虹, 吴莹, 狄俊伟, 等. 电化学发光淬灭法测定 SOD[J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 125 - 126.
- [3] 卫应亮, 王亚珍, 胡胜水. 超氧自由基电化学发生体系的研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(1): 148 - 150.
- [4] 萧华山, 何文锦, 傅文庆. 一种用分光光度计检测氧自由基的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 180 - 182.
- [5] 马庆一, 张侠, 熊卫东. 连苯三酚条件的优化及其在红薯梗活性评价中的应用[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 132 - 135.
- [6] BEACHEMP C, FRDOV CHET I. Improved assays and an assay applicable to acrylamid gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44: 276 - 287.
- [7] KM S, ROBERT D, JOSEPH S F. Spectrometric and chemical characterization of superoxide[J]. Anal Chem, 1979, 51(6): 679 - 681.
- [8] BIELSKIB H J, SHLUE G G, BAJUK S. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂ and O₂ radicals[J]. Journal of

- Physical Chemistry, 1980, 84: 830 - 833.
- [9] HAN Y K, JIN M Y, CHO I S K Polymerization of acrylonitrile initiated by KO_2 - nitrobenzene[J]. Journal of Polymer Science: Polym Chem Edit, 1983, 21: 73 - 81.
- [10] JAMES A F, PETER G H. On the development of a well-defined source of superoxide ion for studies with biological systems[J]. FEBS Letters, 1974, 39: 79 - 82.
- [11] KOVÁCS A, WOJNAROVITS L, BARANYA IM, et al Radiolytic reaction of nitro blue tetrazolium under oxidative and reduction conditions: a pulse radiolysis study[J]. Radiation Physics and Chemistry, 1999, 55: 795 - 798.
- [12] 李益新, 方允中. 超氧化物歧化酶活力测定的新方法—化学发光法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1983, (2): 59 - 62.
- [13] HYLAND K, AUCLAIR C. The formation of superoxide radical anions by a reaction between O_2 , OH^- and dimethyl sulfoxide[J]. Biochemistry and Biophysical Research Communication, 1981, 102: 531 - 537.
- [14] 陈士明, 陆亚蒙, 严小敏, 等. 超氧阴离子自由基的产生及其与天然药物的作用 [J]. 复旦学报: 自然科学版 1991, 80(1): 31 - 35.
- [15] 翁元凯, 黄山, 翁念宇. 用碱性连二亚硫酸钠水溶液产生超氧阴离子自由基 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(3): 209.
- [16] VIALLY P S, NADEZHDA N S, OLEG A R. Solvent effects on crown ether complexations[J]. Journal of Organic Chemistry, 1996, 61: 5221 - 5226.
- [17] VOICESCUM, VASLESCUM, CONSTABTNESCU T. On the luminescence of luminal in DMSO in the presence of potassium superoxide-18-crown-6-ether and fluorescent[J]. Journal of Luminescence, 2002, 97: 60 - 67.
- [18] VALENTINO J S, CURTIS A B. Convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper() complex[J]. Journal of American Society, 1975, 97: 224 - 225.
- [19] 田益玲, 陈冠华, 崔同. 动力学分光光度法测定中药对超氧阴离子自由基的清除率 [J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(4): 617 - 619.

(上接第 354页)

- [11] RODRIGUEZ V, ALONSO A M, TASCÓN J M D. Studies on pyrolysis of nomex polyaramid fibers[J]. J Analyt Appl Pyroly, 2001, 58/59: 105 - 115.
- [12] RNRN RZIB, LAURA G, MALNCONICO M, et al Thermogravimetric studies of rigid rod-like polymers: Influence of solid phase structure and crystallinity on the degradation behaviour[J]. Makromol Chem: Rapid Commun, 1991, 12: 563 - 570.