

# 应用鲁米诺化学发光法测定脂质过氧化

梁小凤 胡天喜 范小兵

(上海交大昂立公司生物医药研究所 上海 200030)

**摘要** 建立了一个测定脂质过氧化 (Lipid peroxidation, LPO) 的化学发光体系, 测试某些抗氧化剂清除脂自由基的活性。取含有不饱和脂肪酸的脂质加入到测量管中, 再加入鲁米诺及双重蒸馏水, 放入恒温箱中 37℃ 预温育 0.5h, 取出并加入启动剂 AAPH {2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride}, 立即放入预先温度设定至 38—39℃ 的生化发光测量仪中, 用 T-2 程序测定每 6s 的脉冲数 (CP6s), 连续测定, 观察化学发光 (chemiluminescence, CL) 的动力学变化和是否产生脂质过氧化, 随后加入各类抗氧化剂, 根据实际需要, 选其某一次的 CL 强度作为评判指标。建立了一个应用鲁米诺化学发光法测定脂质过氧化的体系并对比了多种抗氧化剂的活性。结果发现, Vit.C、茶多酚 (EGCG)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 皆有抑制 CL, 即抗脂质过氧化的作用。该方法是一种快速、灵敏、简便的测定脂质过氧化及筛选抗氧化剂的新方法。

**关键词** 化学发光, 脂质过氧化, 抗氧化剂

**中图分类号** Q63

脂质过氧化物(Lipid peroxidation, LPO)在自由基性疾病的发病机理中起着极重要的作用。生物体中含有大量的脂质, 尤其是生物膜(细胞膜、线粒体膜、核膜等)富有不饱和脂肪酸。体内过量的羟基自由基、单线态氧极易从不饱和脂肪酸  $\alpha$ -甲烯碳中抽取氢原子, 使不饱和脂肪酸转化为脂自由基 ( $R^{\cdot}$ ), 脂自由基极不稳定, 经历共轭化和氧化形成共轭二烯及脂过氧自由基( $ROO^{\cdot}$ ),  $R^{\cdot}$ 和  $ROO^{\cdot}$ 进一步启动未被氧化的脂质, 如此循环反复, 故称为脂质过氧化。中间产物脂氢过氧化物, 类似于过氧化氢, 也是极不稳定, 易分解形成丙二醛(MDA), 己烷、戊烷等毒性物质<sup>[1]</sup>。

脂质过氧化中间产物的检测, 作为脂质过氧化的指示器, 有 223nm 紫外检测共轭二烯, 比色法或 HPLC 柱分离与化学发光检测相结合的方法测  $ROOH$ , 气相色谱法测呼吸气体中的己烷、戊烷及硫代巴比妥酸与 MDA 反应用比色法或荧光法测 MDA (TBA-MDA 法)、自旋捕捉 ESR 法测脂质自由基等。其中, TBA-MDA 的比色和荧光法检测最为普及<sup>[1,2,6]</sup>。各种方法都各有优点和缺点: ESR 法、HPLC 法、气相色谱法定量明确, 特异性好, 但设备要求过高; TBA-MDA 法价廉, 设备要求低, 但专一性不好, 灵敏度差, 已受到挑战<sup>[3]</sup>。为了寻找简便、价廉、专一性好、易于普及的测量 LPO 的技术, 用作离体条件下筛选抗氧化剂之用, 参阅了前人的技术并改进了化学发光法<sup>[4-7]</sup>。本工作使用了偶氮化合物 AAPH {2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride} 热分

解产生脂质自由基, 启动不饱和油脂的脂质过氧化, 产生更多脂自由基与鲁米诺反应产生化学发光, 以化学发光强度和发光恢复到原强度 10% 所需时间为指示终点, 判断脂质过氧化程度和筛查脂质过氧化的抑制剂。

## 1 原理

AAPH 热分解产生脂自由基 ( $R^{\cdot}$ ) 及脂过氧自由基 ( $ROO^{\cdot}$ ),  $R^{\cdot}$  和  $ROO^{\cdot}$  进一步启动并扩增不饱和油脂的脂质过氧化, 形成更多的  $R^{\cdot}$  和  $ROO^{\cdot}$ <sup>[8]</sup>, 体系中存在鲁米诺时, 脂自由基的能量转移给鲁米诺, 使鲁米诺激发, 后者在退激时发射 425nm 的光。一些抗氧化剂和自由基清除剂, 消除了  $R^{\cdot}$ 、 $ROO^{\cdot}$ , 使鲁米诺的化学发光下降, 通过发光下降值可以判断抗氧化剂的抗脂质过氧化能力。



## 2 材料和方法

### 2.1 试剂

鲁米诺、枯烯过氧化氢 (CumeH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 购自 Sigma

第一作者: 梁小凤, 女, 1966 年 7 月出生, 1988 年毕业于上海工业大学化学化工系, 工程师  
收稿日期: 初稿 2002-01-16, 修回 2002-03-11

公司, 月见草油、多烯康出自上海延安制药厂, 深海鱼油源自澳洲 SUNSONG TRADING 公司, 卵磷脂购自联合食品添加剂公司, 麻油购自食品店, 偶氮化合物 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride 即 AAPH 购自日本 Wako 公司, 茶多酚 (EGCG) 上海智达科技有限公司馈赠 (纯度 98%), 维生素 C、还原型谷胱甘肽 (GSH)、NaOH、CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 等其它试剂皆为分析纯, 购自上海化学试剂公司。除鲁米诺先用微量碱性溶液溶解、CuCl<sub>2</sub> 和 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 先用极微量酸性溶液溶解外, 皆直接用双重蒸馏水配制。

## 2.2 仪器

SHG-C 型生物化学发光测量仪及预恒温箱 (上海检测技术研究所上立仪器厂产), 微量移液器 (北京青云仪器厂产)。

## 2.3 方法

取 100 $\mu$ L 含有不饱和脂肪酸的脂质加入到测量管中, 再加入 0.001 mol·L<sup>-1</sup> 鲁米诺 100 $\mu$ L 及双重蒸馏水 600 $\mu$ L, 放入预恒温箱中 37 $^{\circ}$ C 预温育 30min, 取出测量管加入 5mg/mL 的 AAPH100 $\mu$ L, 立即放入预先温度设至 39 $^{\circ}$ C 的生化发光测量仪中, 用 T-2 程序测定各管每 6s 的脉冲数 (CP6s), 连续测定, 观察 CL 的动

力学变化和脂质过氧化强度, 待发光强度进入峰位后相对较稳定时, 原位注射法加入各类抗氧化剂 100 $\mu$ L, 具体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 CP6s 表示。

## 3 结果和讨论

### 3.1 脂质对化学发光强度的影响

固定鲁米诺 0.001 mol·L<sup>-1</sup>、AAPH 0.5mg/L 的浓度, 用含有不同不饱和脂肪酸的油脂原料做脂质过氧化试验, 用 T-2 程序测 CL 值的变化, 结果见表 1。由表 1 可见, 选用的脂质原料不同, 其 CL 值也不同, 月见草油 (含  $\gamma$  亚麻酸, 3 个不饱和键)、多烯康和深海鱼油 (含 EPA、DHA, 有 5 个和 6 个不饱和键), 随着脂质的不饱和键增加, 其 CL 值相应增高, 都极大地超过对照 (AAPH) 自身的脂质自由基的发光, 可以看到 AAPH 的脂自由基启动了上述不饱和脂质的脂质过氧化, 扩增了脂质自由基的量。从选用的脂质来看, 多烯康、月见草油、深海鱼油均为良好的脂质原料。其中, 月见草油、多烯康来源容易, 价廉, 启动脂质过氧化过程清晰, 有较强的发光, 是可选用的较理想的脂质。

Tab.1 Effect of different lipid on CL intensity

Times of measuring	Lipid species					
	Evening primrose oil	Deep sea fish oil	Duo Xi-kang	Eggphospholid	Sesame oil	Control (Without oil)
Blank	27	19	26	21	31	33
First time	26644	36735	21556	203	559	2204
Fifth time	32817	53115	66309	243	533	3449
Tenth time	31945	56269	68063	253	486	3215
Fifteen time	30160	57413	67269	255	422	3119
Thirtieth time	25581	52626	63914	264	369	2993

CL\*: Chemiluminescence (The interval of per time is 100s)

对照 (AAPH) 自身热分解产生脂质自由基, 已有较高的发光水平。卵磷脂和麻油可能纯度不够或已加有抗氧化剂, 似有抑制 AAPH 产生的脂质自由基的作用, 原因待查。

### 3.2 不同启动剂对脂质过氧化发光强度的影响

固定鲁米诺  $1 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>, 脂质取月见草油,

用不同的启动剂启动脂质过氧化, 化学发光法测得 CL 值结果如下 (见表 2)。

可见, AAPH 作为脂质过氧化的启动剂启动效果最好, 其启动因子是 AAPH 热分解产生 R $\cdot$ 、RO $\cdot$ 、ROO $\cdot$  等脂自由基, 这类自由基促使月见草油的脂质过氧化。其它启动剂所致 LPO 的 CL 值则低得多, 甚至启动不了, 很明显, Fe<sup>2+</sup>-EDTA 没能启动月见草油的脂质过氧化。

Tab.2 Effect of different initiator on CL intensity

	The time after add initiator /s	Initiator				
		AAPH (0.5mg·mL <sup>-1</sup> )	Cu <sup>+</sup> -EDTA (10 <sup>-3</sup> mol·L <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> -EDTA (10 <sup>-3</sup> mol·L <sup>-1</sup> )	CumeH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Dilute 10 times)	Control (Without initiator)
CL Intensity (CP6s)	0	24	23	25	28	31
	106	21541	392	292	881	228
	530	27427	434	274	852	250
	1060	39154	441	272	941	246
	1590	36495	493	264	935	249
	2650	31919	577	241	796	220

### 3.3 温度对脂质过氧化发光强度的影响

温度对启动脂质过氧化非常重要。固定鲁米诺  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , AAPH 0.5mg/mL 的浓度, 脂质取月见草油, 实验中发现脂质原料预温育 30min 左右后加入启动剂, 再放入发光仪中, T-2 程序测定, 当发光仪测量室温度比原预温育温度高 1—2℃ 左右时有利于脂质过氧化的启动。从测量温度 25℃、34℃、39℃ 3 次试验结果看, 温度越高, LPO 化学发光值也越高 (见表 3)。

### 3.4 鲁米诺浓度对脂质过氧化发光强度的影响

固定 AAPH 0.5mg/mL 的浓度, 脂质为月见草油, 温育温度 37℃, 分别取不同的鲁米诺浓度进行脂质过氧化试验, 用化学发光法 T-2 程序测 CL 值的变化, 结果见图 1。图 1 的 CL 值均以第 5 次发光强度为准。

可见, 有无鲁米诺对 CL 值影响较大, 鲁米诺在  $10^{-7}$ — $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内 CL 值与之成正比关系, 鲁米诺浓度越高, CL 值越大; 鲁米诺浓度  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 发光强度衰减较快, 发光值相对偏低。

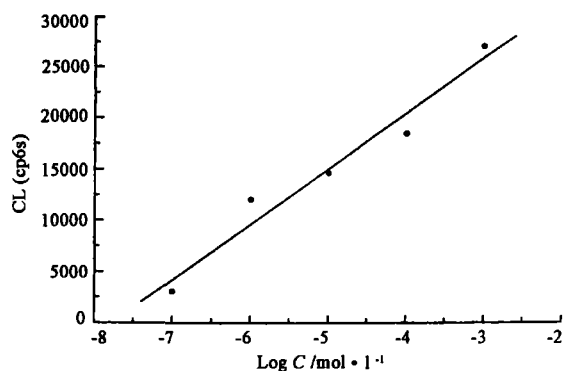


Fig.1 Effect of the luminol concentration on CL intensity.

Tab.3 Effect of the temperature on CL intensity

Times of measuring	Temperature		
	25℃	34℃	39℃
First time	1598	2451	11208
Fifth time	1603	6454	27241
Tenth time	1527	6140	28128
Twentieth time	1568	5850	27501
Thirtieth time	1509	6992	25183

### 3.5 pH 值对脂质过氧化发光强度的影响

固定鲁米诺  $0.001\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、AAPH $0.5\text{mg/mL}$  的浓度，脂质为月见草油，分别取不同 pH 值的双蒸水稀释定容，温育温度  $37^\circ\text{C}$ ，进行脂质过氧化试验，用化学发光法 T-2 程序测 CL 值的变化，结果见表 4。从表 4 中可以看出，脂质过氧化体系 pH 条件中性为好，发光强度适中，发光动力学曲线较平稳，较适于生物物质（抗氧化剂）的存在；碱性条件下 CL 值由高到低，峰值不明显，不利于抗氧化剂筛选，而且其对照 CL 值往往偏高，不利于脂质过氧化体系的建立；酸性条件下则不能启动脂质过氧化。

### 3.6 抗氧化剂对脂质过氧化的抑制作用

选用抗坏血酸（Vit.C）、茶多酚（EGCG）、还原型谷胱甘肽（GSH）各  $10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ — $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，观察它们对脂质过氧化发光强度的影响和发光值抑制后恢复 10%所需的时间（ $t$  值）。结果发现，它们都是良好的脂质过氧化的抑制剂，抑制率很高（ $10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上皆超过 98%），不仅抑制了油脂过氧化所产生的

脂自由基，同时也清除了 AAPH 热分解产生的脂质自由基。一定浓度下，抗氧化剂之间的抑制能力有所不同，其中 GSH 和 Vit.C 浓度在  $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ — $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，抑制后会反弹，而 EGCG 则只在  $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时才会反弹，且反弹时间较后。浓度  $10^{-6}$ — $10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的抗氧化剂，总体评价其抑制脂质过氧化强弱次序为 EGCG>Vit.C>GSH（见表 5 和图 2）。

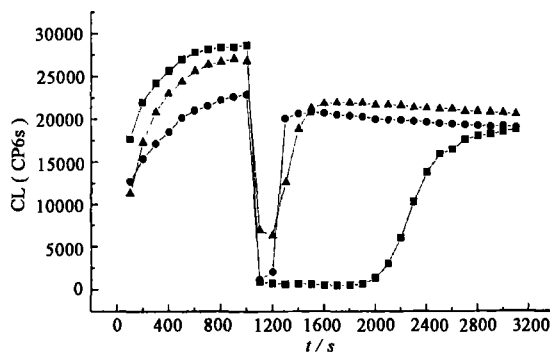


Fig.2 Inhibit effect of different antioxidant (concentration  $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on CL intensity. ■ EGCG, ● Vit. C, ▲ GSH.

Tab.4 Effect of pH on CL intensity

Times of measuring	pH		
	3.0	7.0	12.0
CL Intensity (CP6s)			
First time	768	15812	49538
Fifth time	768	25599	45260
Tenth time	771	27838	44503
Twentieth	701	27418	36730
Thirty fifth	639	24308	33021

Tab.5 Inhibit effect of antioxidants on CL intensity

Name	Antioxidants Concentration/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CL intensity/CP6s		Inhibition Rate/%	Recover time of 10% CL Intensity/sec
		Primary value	Primary value		
EGCG	$1\times 10^{-6}$	28571	499	98.25%	1011
	$1\times 10^{-5}$	27405	319	98.84%	—
	$1\times 10^{-4}$	29444	229	99.22%	—
	$1\times 10^{-3}$	24747	195	99.21%	—
Vit.C	$1\times 10^{-6}$	22882	1145	95.00%	108
	$1\times 10^{-5}$	29851	527	98.23%	306
	$1\times 10^{-4}$	32750	267	99.18%	—
	$1\times 10^{-3}$	23320	180	99.23%	—
GSH	$1\times 10^{-6}$	26716	6228	76.69%	133
	$1\times 10^{-5}$	23189	1141	95.08%	668
	$1\times 10^{-4}$	28168	315	98.88%	—
	$1\times 10^{-3}$	26791	199	99.26%	—

综上所述我们组成了一个脂质为月见草油、发光剂为  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鲁米诺、启动剂为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  AAPH、pH7.0、总体积为 1.0mL 及温育温度  $37^\circ\text{C}$ ，测量温度为  $39^\circ\text{C}$  的脂质过氧化化学发光体系。该离体脂质过氧化模式体系，其发光强度不仅与脂质的性质、鲁米诺的浓度有关，而且有 pH、温度的依赖性，在筛查各因素的基础上建立了一个最佳的体系。以抗氧化剂 GSH、EGCG、Vit.C 及其它一些天然抗氧化剂(另文发表)作消除脂质自由基的试验，证明该体系是可行的。

GSH 是知名的脂质过氧化的阻断剂，Vit.C、EGCG 皆有较低的氧化还原电位，试验证明它们不仅是氧自由基、氮自由基的清除剂，而且也是良好的、优于 GSH 的脂质过氧化的阻断剂。本研究确定的 AAPH-不饱和脂质-鲁米诺的脂质过氧化模式体系，所用的油脂方便易得，AAPH 是热分解产生  $\text{R}^\bullet$ 、 $\text{ROO}^\bullet$  特异的脂质过氧化启动剂，鲁米诺化学发光灵敏度极高，体现了该体系简便、特异、灵敏、价廉的特点，颇有应用前景。

试验中发现，月见草油未经充分乳化处理，与水相很难混溶，本体系的发光主要来自油水界面的发光，由于受油水混溶过程中油的分散度和管壁粘附的影响，界面发光的变异系数较大，以后拟作预处理，使油水形成微囊(微团)或选用脂质体红细胞影泡为脂

质材料，扩大油水界面发光，以完善发光体系。

## 参考文献

- 1 汤丽霞, 沈恂. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(2):108-112  
TANG L X, SHEN X. Progr Biochem Biophys, 1995, 22(2):108-112
- 2 莫简主编. 医用自由基生物学导论. 北京:人民卫生出版社, 1989, 214-232  
Mo Jianed. Introduction of Free Radical Biology on Medicine. Beijing: The People's Health Press, 1989, 214-232
- 3 Zamburlini A, Maiorino M, Barbera P *et al.* Analytical Biochemistry, 1995, 232(1):107-113
- 4 Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C *et al.* Free Radical Biology Medicine, 1995, 18(2):153-158
- 5 Slavikova H, Lojek A, Hamar J *et al.* Free Radical Biology Medicine, 1998, 25(1):9-18
- 6 Guo Q, Zhao B L, Xin W J. Biochim Biophys Acta, 1999, 1427(1):13-23
- 7 Seya K, Ohkohchi N, Shibuya H *et al.* J Pharm Biomed Anal, 2000, 23(2-3):515-520
- 8 NiKi E, Saito M, Yoskikuwa *et al.* Bull Chem Soc Jpn, 1986, 59(2):471-479

## A CHEMILUMINESCENT METHOD FOR DETERMINATION OF LIPID PEROXIDATION

LIANG Xiaofeng HU Tianxi FAN Xiaobing

(Biological and Medicine Research Institute of ONLLY CO., LTD, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030)

**ABSTRACT** We established a chemiluminescent system for determination of lipid peroxidation and screening antioxidants. The lipid containing unsaturated fatty acids was injected into a glass tube. Luminol solution and the deionized water were added into it too. The glass tube was put into a preincubation box to incubate it for 0.5h at  $37^\circ\text{C}$ . AAPH solution was injected into the tube for immediate measurement in a biochemiluminometer at  $38-39^\circ\text{C}$ . The pulses / 6s (CP6s) were determined with T-2 program. Chemiluminescent dynamic and lipid peroxidation changes were observed continuously. Once the CL intensity of lipid peroxidation got peak, the antioxidant which has different concentration was added immediately in situ. A certain CL intensity (CP6s) was chosen as evaluation index to compare the activity of antioxidants. A luminol chemiluminescent system for determination of lipid peroxidation has been made. It was found that Vit.C, teapolyphenol, and glutathione have effects on scavenging lipid free radicals. The new method is quick, sensitive, and simple for determination of lipid peroxidation and screening antioxidants.

**KEYWORDS** Chemiluminescence, Lipid peroxidation, Antioxidants

CLC Q63