一种新的产生和检测过氧亚硝基的化学发光体系

陈季武　胡 斌　苏 裕　秦海燕　曹嘉琪
（华东师范大学生命科学学院　上海 200062）

摘要　研究产生和消除过氧亚硝基（Peroxynitrite anion，ONOO⁻）是自由基生物学和医学的一项紧迫任务。为此，建立了一种新的产生和检测 ONOO⁻的化学发光体系，并评估了检测的最佳条件。该方法为：10 mmol / L 羟胺与 0.5 mol / L NaOH、1 mmol / L、乙二胺四乙酸二钠（Disodium ethylenediamine tetraacetate, EDTA）反应产生 ONOO⁻，随后用 MnO_2 粉末过滤反应液以除去 H_2O_2，然后在测量管内加入 100 μL 抗氧化剂和 860 μL 0.1 mol / L 的碳酸盐缓冲液（pH10），再加入 40 μL 过滤后的 ONOO⁻反应液、混匀、延迟 10 s，测 10 s 化学发光强度。以抗氧化剂茶多酚、抗坏血酸、芦丁和黄芩苷作清除 ONOO⁻的实验。结果表明，本体系是一种灵敏价廉、可靠易行的筛选 ONOO⁻清除剂的新方法。

关键词　过氧亚硝基，化学发光，抗氧化剂
中图分类号　Q63，Q632，Q505

过氧亚硝基（Peroxynitrite anion，ONOO⁻）是一氧化氮（Nitric oxide，NO·）与超氧阴离子（Superoxide anion，O_2^-·）相互反应的产物[1,2]。在病理条件下，体内既产生 NO·，同时又产生 O_2^-·，两者以弥散速度反应生成 ONOO⁻。在碱性条件下 ONOO⁻较为稳定，可以由生成部位扩散较远距离而到达靶位，造成较大范围的损伤[3,4]，是导致细胞和组织损伤的强力氧化剂。研究表明，ONOO⁻与一系列疾病如炎症、缺血重灌损伤、败血症休克和神经退行性紊乱的发病机理密切相关[1,3,4]。因此筛选 ONOO⁻清除剂具有重要意义。但是迄今为止，关于 ONOO⁻清除剂的研究报道甚少[5,6]。

目前，已有几种检测 ONOO⁻的方法报道[5]，有分光光度法，但其不够灵敏；也有 NaN_3 与 O_3 反应产生 ONOO⁻方法，但 NaN_3 和 O_3 有毒性；还有 SIN−1 产生 ONOO⁻方法，但 SIN−1 价贵且国内无货源[6]。本工作在参考文献的基础上，建立了羟胺自氧化产生 ONOO⁻的化学发光体系，用以检测和筛选 ONOO⁻清除剂的研究。实验表明，该法灵敏、价廉，可靠易行。

1　材料和方法

1.1　试剂

羟胺、NaOH 和乙二胺四乙酸二钠（Disodium ethylenediamine tetraacetate, EDTA）等试剂均系国产分析纯。所有试剂均由超纯水配置。

1.2　抗氧化剂

茶多酚（Tea polyphenol，TP）系浙江大学茶学系产品，纯度为 95 %，抗坏血酸购自上海化学试剂公司，纯度为 99 %，芦丁由中科院上海药物所朱大元教授惠赠，纯度为 98 %；黄芩苷由上海中药一厂提供，纯度为 97 %。

1.3　仪器

SHG−1 型生物化学发光测量仪（上海技术监督局实验工厂）；磁力搅拌器（上海曹行无线电元件厂）。

1.4　方法

1.4.1　合成 ONOO⁻　通过羟胺在碱性介质中自氧化来合成 ONOO⁻[2]：在有氧条件下激烈搅拌含 0.01 mol / L 羟胺、0.5 mol / L NaOH 和 0.001 mol / L EDTA 的混合液约 3 h，然后用 MnO_2 粉末过滤混合液除去 H_2O_2，过滤后的混合液可立即用于实验，也可于−18 ℃下贮存。在紫外可见分光光度计 302 nm 处检测 ONOO⁻浓度。

1.4.2　检测　在测量管中加入 100 μL 不同浓度的待测样品（对照组以碳酸盐缓冲液代替）及 860 μL 0.1mol / L 碳酸盐缓冲液（pH 10），再加入 40 μL ONOO⁻反应液，延迟 10 s，连续测其 10 s 发光强度，取发光峰值，计算发光抑制率。

1.4.3　检测原理　羟胺在碱性介质中自氧化产生

第一作者：陈季武，男，1956 年 12 月出生，2003 年于华东师范大学获博士学位，硕士生导师，副教授

收稿日期：初稿 2005-04-13，修回 2005-08-16

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

$ONOO^-$[2]，$ONOO^-$单电子氧化碳酸盐产生重碳酸盐自由基（$HCO_3\cdot$），$HCO_3\cdot$复合（Recombination）直接产生2分子激发三线态CO_2 [$(CO_2)^*_2$]，$(CO_2)^*_2$回到基态时发射最大峰为443 nm的光[7]。所以清除$ONOO^-$越多，发光越弱，即$ONOO^-$量与发光成比例。因此，观察发光强度便可判定抗氧化剂清除ONOO·的能力。

$$NH_2O^- + O_2 \rightarrow H_2O_2 + NO^- \quad (1)$$

$$NO^- + O_2 \rightarrow ONOO^- \quad (2)$$

$$ONOO^- + HCO_3^- + H^+ \rightarrow HCO_3\bullet + NO_2\bullet + OH^- \quad (3)$$

$$2\,HCO_3\bullet \rightarrow (CO_2)^*_2 + H_2O_2 \quad (4)$$

$$(CO_2)^*_2 \rightarrow CO_2 + h\nu \quad (\lambda_{max} = 443\,nm) \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 羟胺与 NaOH 对产生 $ONOO^-$ 的影响

2.1.1 羟胺的影响 固定NaOH为0.5 mol/L和EDTA为1 mmol/L，加不同浓度羟胺，反应3 h，用紫外分光光度计对其进行光谱扫描表明其发光峰位于302 nm处，于302 nm处测其产生$ONOO^-$的量。结果表明，随着羟胺浓度增大，$ONOO^-$增多，10 mmol/L时达到高峰，再加大羟胺浓度，$ONOO^-$反而减少（见表1）。

Table 1 Effect of the hydroxylamine on $ONOO^-$ (n=3)

Hydroxylamine / mmol L^{-1}	6	8	10	12	14
O.D. value	1.7678±0.0453	1.8301±0.0312	2.1467±0.0471	1.5398±0.0460	1.4182±0.0358

2.1.2 NaOH的影响 固定羟胺为10 mmol/L和EDTA为1 mmol/L，加不同浓度NaOH，反应3 h，用紫外分光光度计于302 nm处测其产生$ONOO^-$的量。结果表明，NaOH浓度为0.5 mol/L时，$ONOO^-$最多，升高或降低NaOH浓度后，$ONOO^-$均减少（见表2）。

Table 2 Effect of the NaOH on $ONOO^-$ (n=3)

NaOH / m mol L^{-1}	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
O.D. value	0.2623±0.0094	1.1943±0.0287	2.1401±0.0443	0.4802±0.0135	0.4017±0.0140

2.1.3 不同反应时间的影响 固定羟胺为10 mmol/L、NaOH浓度为0.5 mol/L和EDTA为1 mmol/L，在15℃下反应不同时间，结果3 h时$ONOO^-$最多（见表3）。

Table 3 Effect of the different reaction time on $ONOO^-$ (n=3)

Reaction time / h	2	2.5	3	3.5	4
O.D. value	1.6125±0.0658	1.8693±0.0729	2.1537±0.0603	2.1344±0.0791	2.1287±0.0671

2.2 不同反应成分对本体系化学发光强度的影响

2.2.1 不同缓冲液对化学发光强度的影响 在测量管中分别加入960 μL，0.1 mol/L的不同缓冲液(pH 10)，再加入40 μL，$ONOO^-$反应液启动发光。结果显示，碳酸盐缓冲液化学发光强且发光强度衰减慢（见表4）。

Table 4 Effect of different buffers on CL intensity (n=3)

	Times of measuring	Carbonate buffer	Phosphate buffer	Tris buffer
CL intensity (Counts of per 10 seconds)	First time	471518±5187	360897±12991	8751±472
	Second time	459013±14239	228043±11146	5992±372
	Third time	425197±17858	181981±11283	4559±239

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.2　不同 pH 的碳酸盐缓冲液对化学发光强度的影响　在测量管中分别加入 960 μL 不同 pH 的 0.1 mol / L 的碳酸盐缓冲液，再加入 40 μL $ONOO^-$ 反应液启动发光。结果显示，pH 10 的碳酸盐缓冲液化学发光强度最强（见表 5）。

Table 5　Effect of different pH of carbonate buffer on CL intensity　(*n*=3)

pH value	9	9.5	10	10.5	11
CL intensity (Counts of per10 seconds)	227340±4273	356859±8495	471098±5694	21557± 883	3549±149

2.2.3　$ONOO^-$ 反应液对化学发光强度的影响　在测量管中加入一定体积的 0.1 mol / L 的碳酸盐缓冲液（pH 10），再分别加入不同体积的 $ONOO^-$ 反应液启动发光，使终体积均为 1 mL。结果显示，加入 40 μL，$ONOO^-$ 反应液时化学发光强度最强（见表 6）。

Table 6　Effect of the different concentration　of $ONOO^-$　(*n*=3)

$ONOO^-$ solution / μL	0	20	30	40	45	50
CL intensity (Counts of per 10 seconds)	90341±2168	245216±6804	455802±9804	470910±5180	449312±8082	414312±7982

2.2.4　温度对化学发光强度的影响　在不同的测量温度下，在测量管中分别加入 960 μL，0.1 mol / L 的碳酸盐缓冲液（pH 10），再加入 40 μL，$ONOO^-$ 反应液启动发光。结果显示，温度对化学发光的强度有着明显的影响，25 ℃时化学发光强度最强（见表 7）。

Table 7　Effect of the temperature on CL intensity　(*n*=3)

Temperature / ℃	0	10	20	25	30	37	40
CL intensity (Counts of per10 seconds)	299393±7485	313163±7203	380161±7223	473298±7099	434995±8265	390912±10163	329182±8874

2.3　重现性

检测对照管的化学发光强度，批内变异系数 (Coefficient of variability，CV) CV%= 2.7%（*n*=10），批间变异系数 CV%= 4.9%　（*n*=5），重现性好。

2.4　抗氧化剂清除 $ONOO^-$ 的作用

用本化学发光体系检测了茶多酚、抗坏血酸、芦丁和黄芩苷等抗氧化剂对 $ONOO^-$ 的清除作用，结果见表 8。

Table 8　Effect of antioxidants scavenging $ONOO^-$　(*n*=3)

Antioxidants	Concentration / mol L^{-1}	CL intensity(Counts of per10 seconds)	Intensity rate / %
Control	0	472983±4259	0
Tea polyphenol	5×10^{-6}	100745±2116	78.7
	2×10^{-5}	12298±235	97.4
	5×10^{-5}	237±10	99.9
Ascorbic acid	5×10^{-6}	472510±5671	0
	2×10^{-5}	186828±5044	60.5
	5×10^{-5}	2365±83	99.5
Rutin	5×10^{-6}	93178±2329	80.3
	2×10^{-5}	4731±128	99.0
	5×10^{-5}	473±18	99.9
Baicalin	5×10^{-6}	428996±12440	9.3
	2×10^{-5}	182571±5942	61.4
	5×10^{-5}	48717±2095	89.7

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由表 8 可见，4 种抗氧化剂都能有效地清除 $ONOO^-$，并呈量效关系，但清除的能力不同，其中，芦丁和茶多酚作用相当，清除能力最强，抗坏血酸和黄芩苷的清除作用相对弱一些。

综上实验表明，产生 $ONOO^-$的最佳反应条件为：羟胺为 10 mmol/L、NaOH 浓度为 0.5 mol/L 和 EDTA 为 1 mmol/L 时，反应产生 $ONOO^-$，然后 MnO_2 粉末过滤反应液以除去 H_2O_2，过滤后的 $ONOO^-$反应液置于冰中。本化学发光体系的最佳反应条件为：测量管内先加 100 L 清除剂和 860 μL 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液（pH 10），然后加 40 μL $ONOO^-$反应液，混匀，延迟 10 s，测 10 s 发光积分强度。以抗氧化剂茶多酚、抗坏血酸、芦丁和黄芩苷作清除 $ONOO^-$的实验，证明本体系是切实可行的。而且，本体系纯属化学反应体系，所涉及的试剂均价廉且易得，体系又灵敏，颇有应用价值。

参考文献

1 Szabo C. Toxicol Lett, 2003, **140-141**(Complete): 105-112

2 YANG X F, GUO X Q, ZHAO Y B. Talanta, 2002, **57**(5): 883-890

3 Peter C, Dedona, Steven R, *et al*. Arch Biochem Biophys. 2004, **423**(1): 12-22

4 Patel R P, Mcandrew J, Sellak H, *et al*. Biochem Biophys Acta, 1999, **1411**(2-3): 385-400

5 范小兵, 沙大军, 梁小凤, 等. 生物化学与生物物理学进展, 2001, **28**(2): 251-255
FAN Xiaobing, SHA Ddjun, LIANG Xiaofeng, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2001, **28**(2): 251-255

6 梁小凤, 胡天喜, 赵亚平, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(3): 207-209.
LIANG Xiaofeng, HU Tianxi, ZHAO Yaping, *et al*. J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(3): 207-209

7 LU C, LIN J M. Catal Today, 2004, **90**(3-4): 343–347

A novel chemiluminescence system for producing and measuring peroxynitrite anions

CHEN Jiwu HU Bin SU Yu QIN Haiyan CAO Jiaqi

(School of Life Science, East China Normal University Shanghai 200062)

ABSTRACT The study for generating and scavenging peroxynitrite anions ($ONOO^-$) is an urgent task in free radical biology and medicine. Therefore, a novel chemiluminescence system for producing and measuring $ONOO^-$ has been established. The optimal conditions for detecting $ONOO^-$ were evaluated. The method can be described as follows. A mixture solution containing 10 mmo l/L hydroxylamine, 0. 5 mo l/L NaOH and 1mmo l/L EDTA was stirred vigorously in aerobic conditions for about 3 h to form $ONOO^-$. Certain amount of MnO_2 powder was added to the mixture solution to eliminate H_2O_2 generated in the reaction. Then 10 0 μL antioxidant and 860μL 0.1mo l/L carbonate buffer (pH10) were added into a test tube. By adding 40μL filtrated $ONOO^-$ solution into the tube, chemiluminescence (CL) reaction was initiated. Ten seconds after the solution was uniformly mixed, CL intensity of the reaction solution could be determined in a measurement of 10 seconds. The method was tested with tea polyphenol, ascorbic acid, rutin and baicalin, whish are known to have effects of scavenging $ONOO^-$. The tests show that the system is sensitive, low−cost, credible and easy method for screening $ONOO^-$.

KEYWORDS Peroxynitrite anion, Chemiluminescence, Antioxidants

CTC Q63, Q632, Q505

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net