

硫辛酸清除自由基的反应动力学研究

宋西玉^{1,2} 张鹏^{1,2} 李海霞^{1,2} 王文锋¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

² (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 利用脉冲辐解和激光光解瞬态吸收光谱装置,研究了硫辛酸清除活性氧自由基(ROS)的反应机理,获得涉及反应的瞬态吸收光谱和反应速率常数,测得硫辛酸清除 $\cdot\text{OH}$, e_{aq}^- , $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\text{SO}_4^{\cdot-}$, $\text{Br}_2^{\cdot-}$ 的反应速率常数分别为 7.4×10^9 、 1.3×10^{10} 、 9.8×10^8 、 2.3×10^9 、 $2.0 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,并对可能的反应机理进行了探讨。结果表明,硫辛酸能有效地清除活性氧自由基,是个高效的抗氧化剂。

关键词 脉冲辐解, 硫辛酸, 抗氧化剂, 活性氧自由基

中图分类号 O644.12, O621.25, O623.81

生物体的正常新陈代谢以及外界环境因素等都能够产生自由基,一定水平的自由基在细胞的新陈代谢过程、细胞信号转导和抑制细菌侵入中发挥着重要作用,但是过多的自由基会损伤DNA、蛋白质和脂类等生物大分子,引发生物体畸变、衰老等。生物体可以通过自身的酶系统和从外界摄取的抗氧化剂来控制体内自由基的平衡,防止自由基造成机体的损伤或修复受氧化损伤的生物大分子。

硫辛酸(α -lipoic acid, LA)具有双硫五元环结构,属于硫醇类化合物,具有显著的亲电性和与自由基反应能力,可以清除活性氧自由基(ROS),在多种代谢过程中起重要作用,以维持细胞健康的氧化还原平衡。硫辛酸兼具脂溶性和水溶性,可以深入到细胞中的各个部位,是人体内不可缺少的抗氧化剂^[1]。它可高效地清除过氧化物自由基和次氯酸^[2,3]、单线态氧($^1\text{O}_2$)^[4],它的还原产物二氢硫辛酸不仅能清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$),并且还可通过还原反应再生 V_C 、谷胱甘肽(GSH)等抗氧化剂,间接还原再生 V_E ,被称为“抗氧化剂的保护剂”^[5]。作为医疗药物,硫辛酸具有提高胰岛素的灵敏度,降低血糖含量^[6,7]功能,同时在防止白内障形成、艾滋病病毒活化、放射损伤、神经退行性病变、高血压等方面也有重要作用^[8,9],在临床上已经作为一种药物用于治疗糖尿病综合症、老年记忆力衰退以及

肝脏疾病^[10-12]。德国的Wolfram Sander小组研究了硫辛酸清除丙酮三重激发态和核黄素激发态的机理,得出硫辛酸是通过电子转移反应清除丙酮^[13]和核黄素($^3\text{RF}^*$)^[14]的三重激发态。

作为一种重要的天然抗氧化剂,硫辛酸已经被广泛研究,但是主要集中在稳态反应和生物功能的研究中,具体的化学反应机理与动力学方面的研究还不多。本工作利用脉冲辐解和激光光解装置,研究了硫辛酸清除几种自由基的速率和机理,为更深入地了解其在生物体内的抗氧化作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

实验中使用的硫辛酸、磷酸二氢钠、溴化钾、过硫酸钾均为分析纯,购买于Acros公司;分析纯特丁醇、硫氰酸钾购买于Sigma-Aldrich公司;分析纯磷酸一氢钠购买于Fluka公司;分析纯碳酸氢钠购买于上海虹光化工厂;氮气和氧化亚氮的纯度均为99.9%。所有试剂均未经进一步纯化而直接使用,溶液使用Millipore纯水新鲜配制,试验体系采用 $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.3的磷酸盐缓冲液,或者使用pH 11的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲液。实验溶液在使用前均通氮气或氧化亚氮20 min,实验在约20℃的室温下进行。

国家自然科学基金(10675158)资助

第一作者:宋西玉,男,1984年10月出生,2006年在曲阜师范大学获学士学位,无机化学专业,现为中国科学院上海应用物理研究所2006级硕士研究生

通讯联系人:王文锋

收稿日期:初稿 2009-03-13,修回 2009-04-01

1.2 实验装置与检测方法

脉冲辐解所用电子加速器能产生能量为 10 MeV、脉冲宽度为 8 ns 的电子束脉冲，单脉冲剂量约为 10 Gy。时间分辨吸收光谱系统采用 300 W 氙灯为分析光源，分析光在检测时可瞬间加亮约 100 倍以提高检测灵敏度，分析光与电子束成垂直方向透过 2 cm 石英样品池，并经单色仪分光后使用 R955 光电倍增管检测，电信号经反馈补偿后由 LeCroy WM8600A 数字示波器转换成数字信号，并记录储存于计算机中，以自编软件进行动力学数据处理。

激光光解采用波长为 1064 nm 的晶体激光器 (J1 K1 Lasers System 2000 Neodymium/ YAG)，经四倍频后激发波长为 266 nm，激光脉冲宽度为 3~6 ns，单脉冲能量为 60 mJ。以 300 W 氙灯为分析光源，检测时加亮约 100 倍，分析光与激光垂直透过 1 cm 样品池。分析光经单色仪分光、光电倍增管检测并转变为电信号，然后由 HP54510B 瞬态记录仪以数字信号记录并存储于计算机中，用本室自己编制的软件进行数据处理。

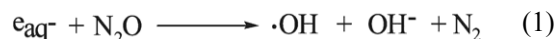
2 结果与讨论

2.1 硫辛酸与羟基自由基的反应

羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 是化学性质最活泼的活性

氧物种，过多的 $\cdot\text{OH}$ 能损伤生物体内几乎所有物质，如糖、蛋白质、DNA 及其碱基^[15]、磷脂^[16]和有机酸等。我们首先研究 LA 清除 $\cdot\text{OH}$ 的反应，由于羟基自由基的吸收处于 260 nm 左右，再加上其摩尔消光系数较低，较难直接检测，本实验通过跟踪其与硫辛酸反应所生成的自由基来进行研究。

在中性条件下，脉冲辐解中溶剂水吸收了电子束的能量，产生的初级活性粒子主要是水合电子 e_{aq}^- 、羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 等。使用 N_2O 可以将 e_{aq}^- 有效地转换为 $\cdot\text{OH}$ (见方程 1)。



$1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LA 的磷酸盐缓冲液溶液通 N_2O 饱和 20 min，经脉冲辐解后 0.5、3、10 μs 的瞬态吸收谱如图 1(a)所示。可以观察到电子束脉冲结束后在 420 nm 处有一个瞬态吸收峰生成，随着体系中硫辛酸浓度的增加，该瞬态自由基的生成速率明显加快 (见图 1(b))，可以将其归结为硫辛酸阳离子自由基特征吸收峰。将硫辛酸阳离子自由基的生成速率对硫辛酸的浓度作图 (见图(1b)插图) 可得到硫辛酸清除 $\cdot\text{OH}$ 速率常数为 $7.4 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。 $\cdot\text{OH}$ 可能与硫辛酸发生氧化反应或者抽氢反应，硫辛酸双硫键电子被羟基夺取，形成阳离子自由基，反应机理如 (2) 式所示：

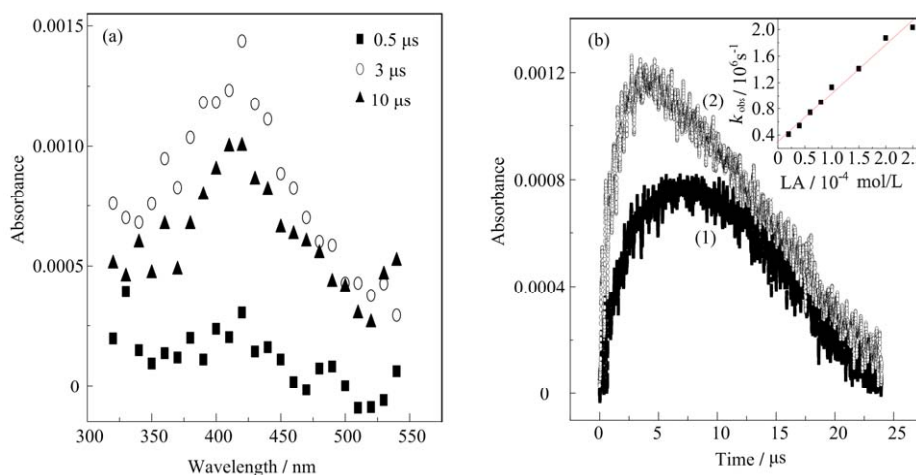
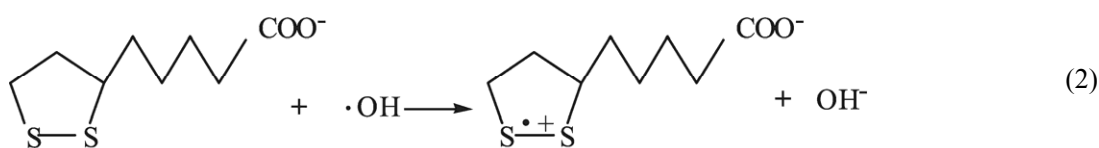
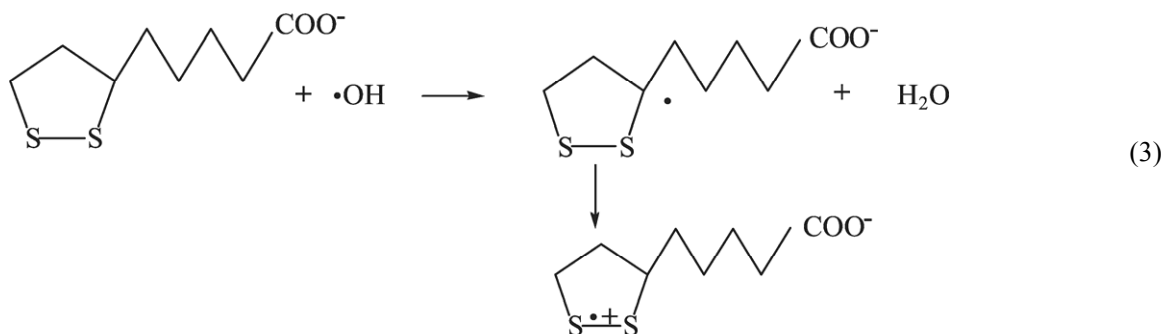


Fig.1 (a) Transient absorbance spectra observed at 0.5 μs , 3 μs and 10 μs in the pulse radiolysis of N_2O -saturated $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LA aqueous solution buffered with phosphate. (b) Transient absorbance spectra observed at 420 nm after pulse radiolysis of LA: (1): $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (2): $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Inset: Determination of the rate constant for the reaction of LA with $\cdot\text{OH}$



或者硫辛酸手性碳受到羟基自由基进攻，失去氢原子，形成叔碳自由基，而后发生电子转移形成

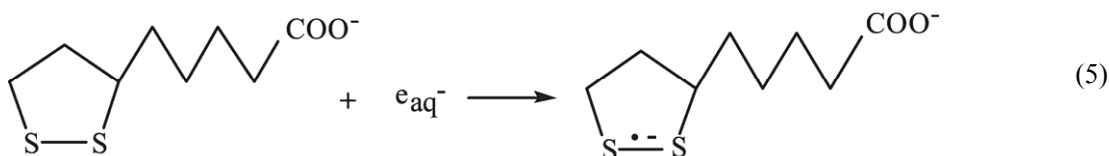
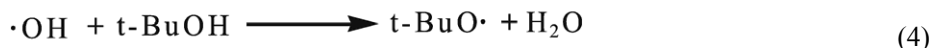
硫辛酸阳离子自由基，反应机理如(3)式所示：



2.2 硫辛酸与水合电子的反应

含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 特丁醇、 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫辛酸磷酸盐缓冲溶液通 N_2 饱和 20 min 后经脉冲辐解得到 $0.05 \mu\text{s}$ 、 $0.8 \mu\text{s}$ 的瞬态吸收谱如图 2(a) 所示，可以观察到随着 640 nm 处一宽吸收峰的衰减在 400 nm

处有一瞬态产物同步生成。在此条件下 $\cdot\text{OH}$ 自由基被特丁醇清除（见方程 4），体系中初始自由基主要为 e_{aq}^- ， 640 nm 处的宽瞬态吸收谱可以归结为 e_{aq}^- 的贡献，而 400 nm 处生成的瞬态产物则为硫辛酸阴离子自由基。 e_{aq}^- 与硫辛酸双硫键反应，生成硫辛酸阴离子自由基（见方程 5）。



随着硫辛酸浓度的增加， e_{aq}^- 的衰减速率越来越快（见图 2(b)），将 e_{aq}^- 的衰减速率与加入硫辛酸的

浓度作图（见图 2(b)插图），可以得到硫辛酸清除 e_{aq}^- 速率常数为 $1.3 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

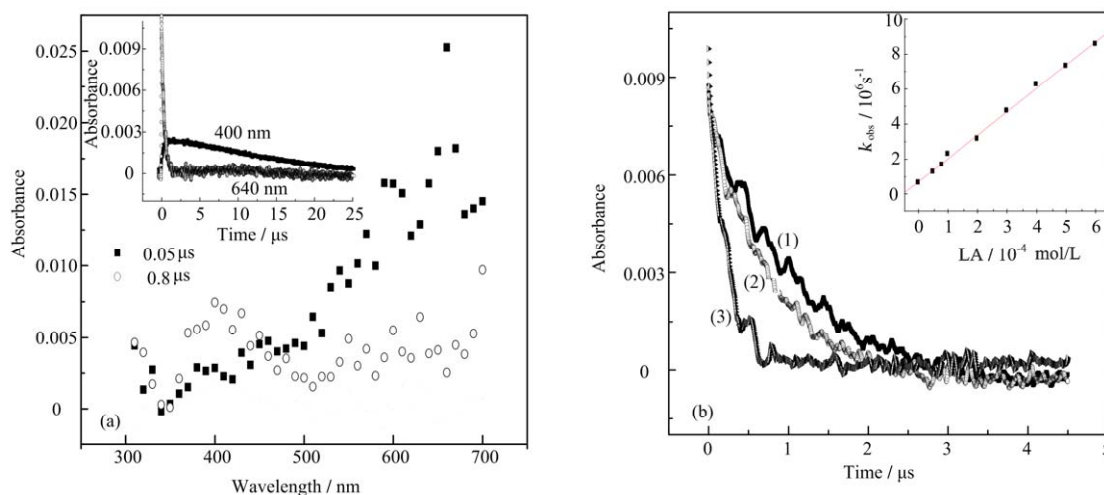
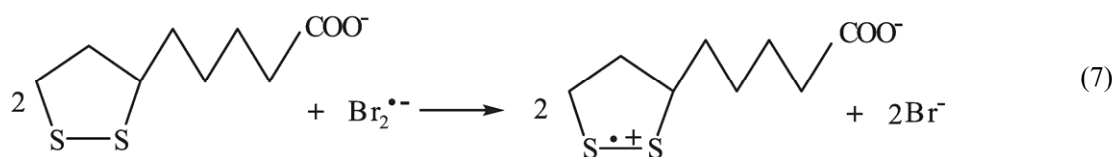


Fig.2 (a) Transient absorbance spectra observed at $0.05 \mu\text{s}$, $0.8 \mu\text{s}$ in the pulse radiolysis of N_2 -saturated $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LA aqueous solution buffered with phosphate and added with 0.1 mol/L tert-Butanol. Inset: Transient absorbance spectra observed at (1) 400 nm and (2) 640 nm after pulse radiolysis of N_2 -saturated aqueous solution containing $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LA (b) The absorption/time profiles observed at 640 nm LA : (1): $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2): $8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3) $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Inset): Dependence of decay rate constant k_{obs} at 640 nm on concentration of LA

2.3 硫辛酸与溴二阴离子自由基以及碳酸根阴离子自由基的反应

含 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫辛酸、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KBr}$ 的磷酸盐缓冲液通 N_2O 饱和后经脉冲辐解得到的瞬态吸收谱, 在 360 nm 和 420 nm 处可以观察到瞬态吸收峰。随着 360 nm 处瞬态吸收的衰减在 420 nm 处的瞬态产物同步生成 (见图 3 插图(b))。该体系中水辐解生成的羟基自由基都有可能同时氧化硫辛酸和溴负离子, 由于两者和羟基自由基的反应速率相



随着硫辛酸浓度的增加, $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 的衰减速率越来越快 (见图 3)。将 $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 的衰减速率常数与硫辛酸的浓度作图, 可得到硫辛酸清除 $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 速率常数为 $2.0 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

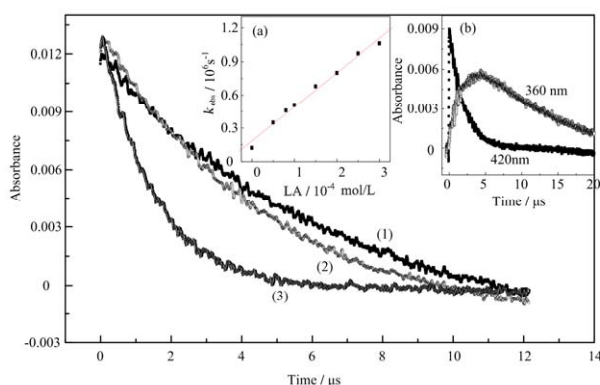


Fig.3 The absorption/time profiles observed at 360 nm respectively in the pulse radiolysis of N_2O -saturated buffered with phosphate containing 0.1 mol/L KBr , (1): without LA (2): $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3): $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Inset.

(a): Dependence of decay rate constant k_{obs} determined at 360 nm on concentration of LA. Inset (b): The absorption / time profiles observed at (1) 360 nm (2): 420 nm respectively after pulse radiolysis of N_2O -saturated buffered with phosphate containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KBr}$, LA: 2×10^{-4}

$1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫辛酸的碳酸盐缓冲液通 N_2O 饱和后经脉冲辐解得到 $0.5 \mu\text{s}$ 、 $10 \mu\text{s}$ 的瞬态吸收谱如图 4 插图, 600 nm 处有一衰减过程同时在 420 nm 有一生成过程。根据文献 600 nm 处的宽吸收归结为 $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 的吸收^[18], 420 nm 处的瞬态产物则为硫辛酸与碳酸根阴离子自由基反应后得到的产物。图 4 为 420 nm 处和 600 nm 处瞬态吸

当, 在溴负离子浓度远大于硫辛酸的情况下, 羟基自由基几乎首先与溴负离子反应, 生成溴二阴离子自由基, 然后 $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 再经由电子转移氧化硫辛酸的。所以 360 nm 的产物可以归结为 $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 的吸收^[17], $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 夺取硫辛酸双硫键上的电子, 将硫辛酸氧化成硫辛酸阳离子自由基, 420 nm 处可以归结为硫辛酸阳离子自由基的吸收。反应机理如(6)、(7)。

收随时间的变化曲线, 可以看出 420 nm 处产物的生成和 $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 的衰减过程同步。基于与 $\text{Br}_2^{\cdot -}$ 同样的理由, 首先生成了 $\text{CO}_3^{\cdot -}$, $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 进攻硫辛酸双硫键夺取电子, 将硫辛酸氧化成阳离子自由基, 机理如(8)、(9)。

随着硫辛酸浓度的增加, $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 的衰减速率明显加快, 将 $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 的衰减速率对硫辛酸的浓度作图 (见图 4 插图(b)) 可以得到硫辛酸清除 $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 速率常数为 $9.8 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。图中可以看出, $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 的寿命比较长, 尽管在 600 nm 有水合电子的瞬态吸收, 由于水合电子寿命很短, 所以基本不会影响对 $\text{CO}_3^{\cdot -}$ 衰减动力学测定。

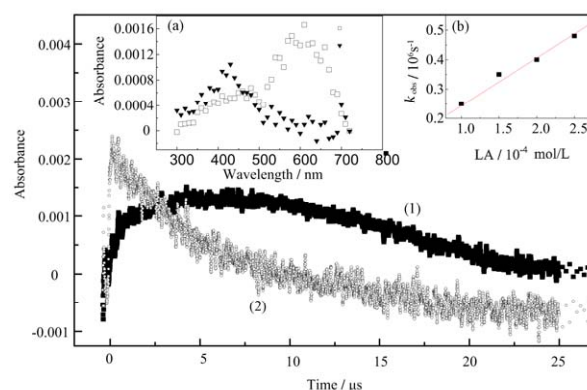
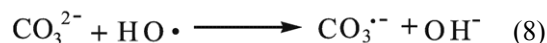
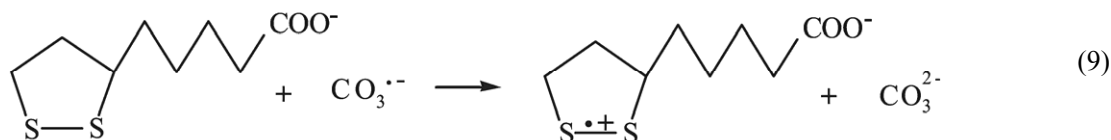


Fig.4 The absorption/time profiles observed at (1) 420 nm (2) 600 nm respectively in the pulse radiolysis of N_2O -saturated aqueous solution containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ carbonate and $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LA: buffered with phosphate.

Inset (a) Transient absorbance spectra observed at $0.5 \mu\text{s}$, $10 \mu\text{s}$ Inset (b) Dependence of $\text{CO}_3^{\cdot -}$ decay rate constant k_{obs} at 600 nm on concentration of LA





2.4 硫辛酸与硫酸根阴离子自由基的反应

$2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫辛酸和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的磷酸盐缓冲液经 266 nm 激光激发后, 可以观察到在 450 nm 处有强瞬态吸收, 根据文献[19]其应为 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的特征吸收; 由于在 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 硫辛酸对 266 nm 激光几乎无吸收, 只有过硫酸根吸收 266 nm 光子, 经光分解生成 $\text{SO}_4^{\cdot-}$, 所以首先观察到的是 $\text{SO}_4^{\cdot-}$, 随着 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的衰减在 420 nm 有新的瞬

态产物生成, 可以确定为硫辛酸阳离子自由基。经数据减谱处理, 可以分别得到 450 nm $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的衰减和 420 nm 处硫辛酸阳离子自由基的瞬态吸收随时间的变化曲线(见图 5 插图(a)), 具体机理为 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 进攻硫辛酸双硫键, 生成硫辛酸阳离子自由基(方程式 10、11)。

将 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的衰减表观速率常数对硫辛酸的浓度做图(见图 5 插图(b)), 得到硫辛酸清除 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 速率常数为 $2.3 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

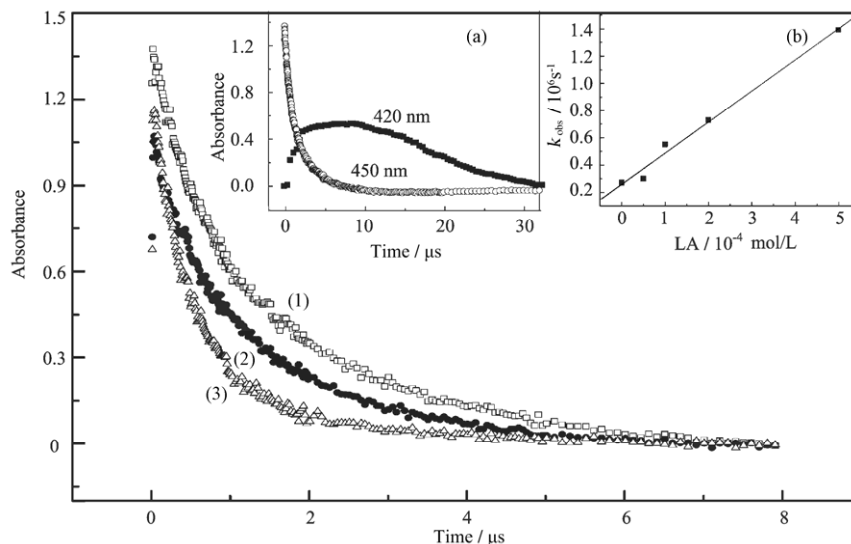
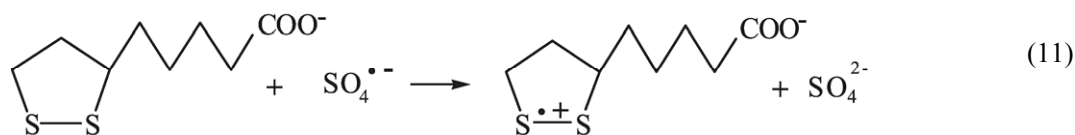
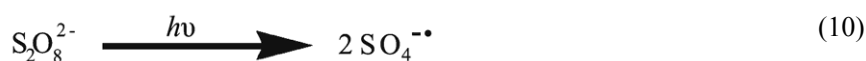


Fig.5 The absorption/time profiles observed at 450 nm from 266 nm LFP N_2 -saturated phosphate buffer containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and LA (1): $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2): $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3): $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Inset (a): The absorption/time profiles observed at (1) 420 nm (2) 450 nm . Inset (b): Dependence of decay rate constant k_{obs} at 450 nm on concentration of LA



3 结论

硫辛酸作为一种具有较好应用前景的天然抗氧化剂而被广泛关注, 但原有的研究主要涉及稳态反

应以及生物学效应。本文利用脉冲辐解和激光光解等研究手段, 探究了硫辛酸清除 $\cdot\text{OH}$, e_{aq}^- , $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\text{SO}_4^{\cdot-}$, $\text{Br}_2^{\cdot-}$ 等自由基的反应动力学与机理, $\cdot\text{OH}$ 可能通过直接抽取双硫键上的电子, 最终形成硫辛酸

阳离子自由基; e_{aq}^- 与硫辛酸反应生成硫辛酸阴离子自由基; $CO_3^{\cdot-}$, $SO_4^{\cdot-}$, $Br_2^{\cdot-}$ 与硫辛酸反应则是通过夺取其双硫键上电子形成硫酸根阳离子自由基。以上结果表明硫辛酸能有效清除上述几种活性氧自由基,为更好地了解其在生物体内的抗氧化作用提供参考。

参考文献

- Packer L, Tritschler J. *Free Radic Biol Med*, 1996, **20**: 625-626
- Packer L, Witt E H, Tritschler H J. *Free Radic Biol Med*, 1995, **19**: 227-250
- Haenen G R, Bast A. *Biochem Pharmacol*, 1991, **42**: 2244-2246
- Devasagayam T P, Subramanian M, Pradhan D S, *et al.* *Chem Biol Interact*, 1993, **86**: 79-92
- Ziegler D. *International Conference on Recent Advances in Diabetes Mellitus and Its Complications*, Al Ain. U Arab Emirates: Blackwell Publishing, 2006. 250-266
- Jacob S, Henriksen E J, Tritschler H.J, *et al.* *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996, **104**: 284-288
- Kamenova P. *Hormones (Athens)*, 2006, **5**: 251-258
- Packer L, Tritschler H J, Wessel K. *Free Radical Biol Med*, 1997, **22**: 359-378
- El Midaouri A, de-Champlén J, Elimadi A, *et al.* *Am J Hypertension*, 2003, **16**: 173-179
- Ou P, Tritschler H J, Wolff S P. *Biochem Pharmacol*, 1995, **50**: 123-126
- Stoll S, Rostock A, Bartsch R, *et al.* 5th International Congress of the International-Association-of-Biomedical-Gerontology, Budapest. Hungary: New York Acad Sciences, 1994. 117-118
- Arderwald C, Koca G, Fuernsinn C, *et al.* *Liver*, 2002, **22**: 356-362
- Bucher G, Lu C, Sander W. *Chem Phys Chem* 2005, **6**: 2607-2618
- Lu C, Bucher G, Sander W. *Chem Phys Chem*, 2004, **5**: 47-56
- 储高升, 姚思德, 张曼维, 等. *化学学报*, 1997, **55**: 703-709
CHU Gaosheng, YAO Side, ZHANG Manwei, *et al.* *Acta Chim Sinica*, 1997, **55**: 703-709
- 王淑惠, 于勇, 侯健, 等. *化学学报*, 2001, **59**: 151-155
WANG Shuhui, YU Yong, HOU Jian, *et al.* *Acta Chim Sinica*, 2001, **59**: 151-155
- Lind J, Shen X, Eriksen T E, *et al.* *J Am Chem Soc*, 1991, **113**: 4629-4633
- David B, Gideon C, Itzhak D. *J Phys Chem*, 1970, **74**(10): 2206-2210
- Jiang P Y, Katsumura Y, Nagaishi R, *et al.* *J Chem Soc Faraday Trans*, 1992, **88**: 1653-1658

Pulse radiolysis and laser flash photolysis studies on α -lipoic acid

SONG Xiyu^{1,2} ZHANG Peng^{1,2} LI Haixia^{1,2} WANG Wenfeng¹

¹ (Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

² (Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT In this work the property of α -lipoic acid (LA) was studied by using pulse radiolysis and laser flash photolysis technology. The characteristics and mechanism of the reactions of LA with ROS (reactive oxygen species) were studied. Transient spectra of LA radicals were observed and the transient species with characteristic absorption spectra were identified. It has been found that LA can effectively quench active oxygen radicals such as $\cdot OH$, $CO_3^{\cdot-}$, $SO_4^{\cdot-}$, e_{aq}^- , $Br_2^{\cdot-}$ at the rates of 7.4×10^9 , 9.8×10^8 , 2.3×10^9 , 1.3×10^{10} and 2.0×10^9 $mol^{-1} \cdot s^{-1}$, respectively. The relevant mechanism of the reactions has been discussed. The studies indicate that LA can quench free radicals existing in biological system effectively as a powerful antioxidant.

KEYWORDS Pulse radiolysis, Lipoic acid, Antioxidant, Reactive oxygen species

CLC O644.12, O621.25, O623.81