

用对苯二甲酸测定铜催化 Fenton 反应产生的羟自由基

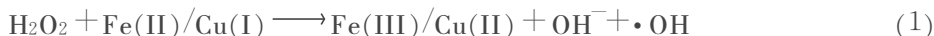
淮 清 李久强⁽¹⁾ 方兴旺

(北京大学技术物理系 北京 100871)

摘要 研究了剂量率对对苯二甲酸剂量计的影响和该剂量计用于测定铜催化的类 Fenton 反应产生羟自由基的速率的可行性。羟自由基与对苯二甲酸(TA)加成生成的自由基被 O_2 氧化成具有很强荧光的稳定产物羟基对苯二甲酸(HOTA)。在很广的剂量率范围内($8.2 \times 10^{-3} \sim 1.6 \text{Gys}^{-1}$), $G(\text{HOTA})$ 恒定。 Cu^{2+} 的存在使 $G(\text{HOTA})$ 降低。但当 $[\text{Cu}^{2+}] \leq [\text{TA}]/10$ 时, $G(\text{HOTA})$ 不随 $[\text{Cu}^{2+}]$ 变化而变化, 因此, 对苯二甲酸剂量计可用来测定铜催化的类 Fenton 反应产生的羟自由基。

关键词 对苯二甲酸剂量计, 类 Fenton 反应, 羟自由基

$\cdot\text{OH}$ 是一种反应性极高的氧化性自由基, 它可以与周围存在的几乎所有物质起反应^[1]。在生物体内, 当 H_2O_2 与 $\text{Fe}(\text{II})$ 或 $\text{Cu}(\text{I})$ 同时存在时, 就会产生 $\cdot\text{OH}$:



如果 $\cdot\text{OH}$ 产量高于正常水平, 它就会带来细胞毒性。由于 $\cdot\text{OH}$ 的反应性很高, 判断生物体系中 $\cdot\text{OH}$ 是否产生以及产生速度的定量测定方法一直是人们关注的问题^[2,3]。苯甲酸被 $\cdot\text{OH}$ 氧化后的稳定产物羟基苯甲酸具有很强的荧光, 检测羟自由基灵敏, 因此常用于生物体系中 $\cdot\text{OH}$ 的检测^[4]。对苯二甲酸(TA)被 $\cdot\text{OH}$ 氧化后的稳定产物羟基对苯二甲酸(HOTA)^[5~7]:



也具有强烈的荧光, 被用作低剂量水平的 γ 辐照剂量计以及超声波产生的 $\cdot\text{OH}$ 的测定, 但未见有关用于类 Fenton 反应研究的报道。与苯甲酸相比, TA 的 $\cdot\text{OH}$ 氧化产物更单纯 ($\cdot\text{OH}$ 进攻位点只有 2 类, 而苯甲酸的进攻位点有 4 类), 因此结果分析更加方便。本文测定了剂量率 ($\cdot\text{OH}$ 产生速率) 对 $G(\text{HOTA})$ 的影响, 并将 TA 用于研究铜催化的类 Fenton 反应。

1 材料与方法

对苯二甲酸钠(sodium terephthalate acid, 纯度 $>99\%$), Merck 产品; 其它化学试剂均为分析纯。所有溶液均用 3 次蒸馏水配制, 用 0.01 mol l^{-1} 磷酸盐缓冲, 以 NaOH 调 pH 值。HOTA 用 Shimadzu RF-540 荧光分光光度计测定(激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 315 \text{nm}$, 发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{nm}$)。

国家自然科学基金资助课题 (29371003)

⁽¹⁾通讯联系人

收稿日期: 初稿 1997-04-24, 修回 1998-04-01

2 结果与讨论

2.1 剂量率和吸收剂量对 HOTA 产额值的影响

要将一个辐射化学剂量计推广到测定生物体系产生 $\cdot\text{OH}$ 速率, 必须具备 (a) $\cdot\text{OH}$ 反应后所得的稳定产物易于检测且检测灵敏度高; (b) 被检测产物具有确定的产额 (即具有稳定的转化率), 不随 $\cdot\text{OH}$ 产生速率变化而变化。TA 清除 $\cdot\text{OH}$ 后在 O_2 或其它氧化剂存在时生成稳定产物 HOTA 因具有很强的荧光, 检出限低于 $10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$, 能满足生物体系的要求。但对于 HOTA 的产额是否随剂量率的改变而改变, 文献报道仍存在分歧。Armstrong 等^[5]研究表明, 剂量率从 8.33×10^{-5} 到 $1.7 \times 10^{-1} \text{ Gys}^{-1}$ 变化时, $G(\text{HOTA})$ 不变, 而 Matthews^[6]研究发现, 当剂量率增加到 $1.2 \times 10^{-1} \text{ Gys}^{-1}$ 时, $G(\text{HOTA})$ 降低了 14%。但根据 TA 的水溶液的辐射化学^[7], 由于 $\text{HO-TA}\cdot$ 自身双分子衰减很慢 ($2k=4 \times 10^7 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 而与 O_2 加成生成过氧自由基 ($k=1.6 \times 10^7 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 并单分子衰变成 HOTA ($k=390 \text{ s}^{-1}$) 的反应较快, 即使剂量率达到 10 Gys^{-1} , $\text{HO-TA}\cdot$ 和 $\text{HO-TAO}_2\cdot$ 自由基双分子反应造成的 $G(\text{HOTA})$ 降低也不超过 5%。因此重新研究了剂量率对 $G(\text{HOTA})$ 的影响 (图 1)。

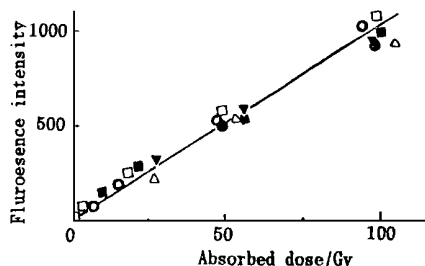


Fig.1 The yield of HOTA in the radiolysis of aerated $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ TA solution at dose rate of 8.2×10^{-3} ($\square$); 1.8×10^{-2} ($\circ$); 0.13 ($\blacksquare$); 0.47 ($\triangle$); 0.95 ($\blacktriangledown$); and 1.6 Gy/s ($\bullet$); respectively

由图 1 结果表明, 在剂量率 $8.2 \times 10^{-3} \sim 1.60 \text{ Gys}^{-1}$ 下辐照空气饱和的 TA 水溶液时, $[\text{HOTA}]$ 随吸收剂量线性递增, 但递增速率 ($G(\text{HOTA}) = 0.93 \times 10^{-7} \text{ mol J}^{-1}$) 并不随剂量率的变化而变化。这与由 TA 水溶液辐解产生 HOTA 有关反应的动力学常数预测的结果是一致的^[7]。可见, 从理论到实验验证, TA 剂量计适用的剂量范围极广, 可推广到生物体系 $\cdot\text{OH}$ 产生速率的测定。

2.2 TA 用于检测铜催化的类 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 的可行性

铜是必需微量元素, 但过量时会引起多种疾病 (如类风湿病), 其中一个重要原因是铜能催化类 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, 导致组织损伤^[8], 因此研究这一反应具有重要意义。是否能将 TA 用于检测这一反应中产生的 $\cdot\text{OH}$, 首先观测了 Cu^{2+} 本身对 HOTA 荧光性质的影响。结果表明, 在 $\lambda_{\text{ex}} = 315 \text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$ 下, $0 \sim 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 对 HOTA 的荧光强度的影响可忽略。

根据文献^[7], $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 不能氧化 $\text{HO-TA}\cdot$, 而 IrCl_6^{2-} 能将 $\text{HO-TA}\cdot$ 100% 氧化为 HOTA, 其效率比 O_2 氧化时高很多, $G(\text{HOTA})$ 增加了一倍以上。 Cu^{2+} 的氧化性介于 Fe(III) 和 Ir(IV) 之间, 因此有必要测定 Cu^{2+} 是否参与 $\text{HO-TA}\cdot$ 的氧化反应, 即 Cu^{2+} 的存在是否会改变 $\cdot\text{OH}$ 被 TA 清除后转化为 HOTA 的效率, 这对体系中产生的 $\cdot\text{OH}$ 的定量测定是必要的。

由图 2 可知, 当空气饱和的 TA (浓度 $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) 辐解时, 加入 $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时, $G(\text{HOTA})$ 并不升高, 反而由无 Cu^{2+} 时的 0.93 降低到 0.53, 说明与 O_2 相比 Cu^{2+} 将 $\text{HO-TA}\cdot$ 氧化成 HOTA 的反应可忽略。 $G(\text{HOTA})$ 的降低可能归因于辐解产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ 。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 来源于三方面: (1) e_{aq}^- 与 TA 加成所得阴离子自由基与 O_2 反应转化为 $\text{O}_2^{\cdot-}$; (2) $\cdot\text{OH}$ 与 TA 加成

产物部分(35%)转化为 HOTA 同时释放 $\text{HO}_2^{\cdot}$ [7]; (3) $\cdot\text{H}$ 与 TA 加成后所得二羧基环己二烯基自由基再与 O_2 加成并消去 $\text{HO}_2^{\cdot}$ ($\text{pK}_a=4.8$, $\text{pH}=7$ 绝大部分解离成 $\text{O}_2^{\cdot-}$), 因此 $G(\text{O}_2^{\cdot-})=G_{e_{aq}^-}+35\%G_{\text{OH}}+G_{\text{H}}+G_{\text{HO}_2^{\cdot}}\approx 2.8+0.33\times 2.8+0.55+0.03=4.3$ 这与空气饱和时 TA 辐解所得 $G(\text{H}_2\text{O}_2)=2.7$ 基本相符, $G(\text{H}_2\text{O}_2)=0.5\times G(\text{O}_2^{\cdot-})+G\text{H}_2\text{O}_2$ [6]。当体系中加入少量 Cu^{2+} 时, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自身双分子歧化产生 H_2O_2 的反应可忽略, 主要被 Cu^{2+} 氧化成 O_2 , 而 Cu^{2+} 被还原成 Cu^+ , 因此 $G(\text{Cu}^+)=4.3$ 。吸收剂量为 50Gy 时, Cu^+ 可达 $2\times 10^{-5}\text{mol l}^{-1}$, 生成的 Cu^+ 一方面与 TA 竞争 $\cdot\text{OH}$, 由于 Cu^+ 和 TA 与 $\cdot\text{OH}$ 反应的速率常数分别为 2×10^{10} 和 $3.3\times 10^9\text{l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ [1], 因此约 10% 的 $\cdot\text{OH}$ 将被 Cu^+ 清除; 另一方面, Cu^+ 可能将 $\text{HO-TAO}_2^{\cdot-}$ 还原成 HO-TAOOH (如 Cu^+ 还原羟乙基过氧自由基的速率常数大于 $10^9\text{l mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ [9]), 使 $G(\text{HOTA})$ 降低。事实上, 当有 Cu^{2+} 和无 Cu^{2+} 的 TA 辐解液放置数小时后, 含 Cu^{2+} 辐解液中 HOTA 含量明显增加了, 而无 Cu^{2+} 辐解液中 HOTA 含量不变, 说明有部分 HO-TAOOH 消去 H_2O_2 变成了 HOTA (在数小时内 Cu^{2+} 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot\text{OH}$ 相对于辐解产生的 $\cdot\text{OH}$ 量可忽略)。因此, Cu^{2+} 存在时 $G(\text{HOTA})$ 降低到 0.53 (降低了 43%) 是可以理解的。

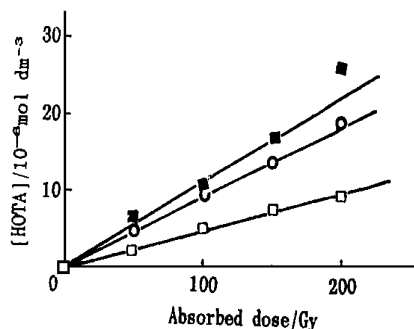


Fig.2 The yield of HOTA in the radiolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ TA in air-saturated ($\square$) and $\text{N}_2\text{O}/\text{trace-O}_2$ ($\blacksquare$) in the absence ($\circ$) and presence ($\blacksquare$) of $5\times 10^{-5}\text{mol dm}^{-3}\text{Cu}^{2+}$

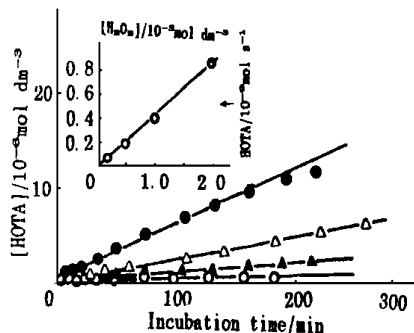


Fig.3 Generation HOTA by $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ in 0.01mol dm^{-3} phosphate buffer ($\text{pH } 7.0$).

$$[\text{Cu}^{2+}]=1\times 10^{-4}\text{mol dm}^{-3},$$

$$[\text{TA}]=1\times 10^{-3}\text{mol dm}^{-3}, [\text{H}_2\text{O}_2] \text{ is at } 2\times 10^{-4}$$

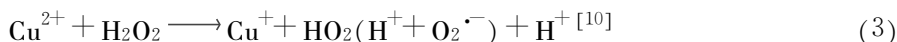
$$(\circ); 5\times 10^{-4} (\blacktriangle); 1\times 10^{-3} (\triangle); 2\times 10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$$

$$(\bullet) \text{ respectively}$$

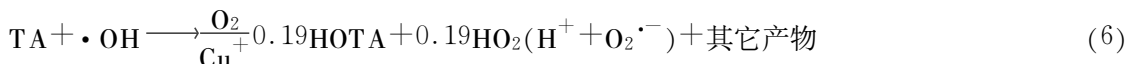
同时也测定了 N_2O 饱和并有微量 O_2 时 Cu^{2+} 对 $G(\text{HOTA})$ 的影响。 N_2O 饱和时, 由于 e_{aq}^- 被转化为 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 的产额加倍, $[\text{O}_2]$ 的降低 ($\geq 1\%$ 饱和浓度) 并不影响 O_2 将 $\text{HO-TA}\cdot$ 氧化成 HO-TA 的效率 [6,7], 因此 $G(\text{HOTA})$ 也加倍。实验结果 (图 2) 表明, Cu^{2+} 存在时, $G(\text{HOTA})=1.1$, 约为有 Cu^{2+} 并空气饱和时的 2 倍。这进一步说明, Cu^{2+} 并不直接氧化 $\text{HO-TA}\cdot$ 。但由于 Cu^{2+} 还原产生的 Cu^+ 可以与 TA 竞争 $\cdot\text{OH}$, 更重要的是可以将 $\text{HO-TAO}_2^{\cdot-}$ 还原成 HO-TAOOH , 使 $G(\text{HOTA})$ 降低。 Cu^{2+} 存在时, $\cdot\text{OH}$ 被 TA 清除并转化为 HOTA 的效率只有 19%。不过, 当 $[\text{Cu}^{2+}]\leq [\text{TA}]/10$ 时, $G(\text{HOTA})$ 不随 $[\text{Cu}^{2+}]$ 变化而变化, 因此, 只要对测定效率做必要的矫正, Cu^{2+} 的存在并不影响 $\cdot\text{OH}$ 的定量测定, 对苯二甲酸剂量计可用来测定铜催化的类 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 。

2.3 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基的反应动力学研究

在 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系(磷酸盐缓冲, $\text{pH}=7$)中, 通过反应(3)~(5)产生 $\cdot\text{OH}$:



由于体系中 $[\text{Cu}^+]$ 很低, 加入大量 TA 后, 反应(5)产生的 $\cdot\text{OH}$ 全部被 TA 清除, 并进一步转化为 HOTA:



由 2.2 可见, $\cdot\text{OH}$ 被 TA 清除并转化成 HOTA 的效率只有 $33\% \times (1-0.43) = 19\%$ 。由于反应(3)很慢, 而反应(4)~(6)都很快, 因此可以用稳态处理, 假设:

$$d[\text{Cu}^+]/dt = k_3[\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2] + k_4[\text{Cu}^{2+}][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_5[\text{Cu}^+][\text{H}_2\text{O}_2] = 0 \quad (7)$$

$$d[\text{O}_2^{\cdot-}]/dt = k_3[\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2] - k_4[\text{Cu}^{2+}][\text{O}_2^{\cdot-}] + 0.19k_6[\text{TA}][\cdot\text{OH}] = 0 \quad (8)$$

$$d[\cdot\text{OH}]/dt = k_5[\text{Cu}^+][\text{H}_2\text{O}_2] - k_6[\text{TA}][\cdot\text{OH}] = 0 \quad (9)$$

$$\text{由式(9)得} \quad k_6[\text{TA}][\cdot\text{OH}] = k_5[\text{Cu}^+][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (10)$$

式(7)+(8), 并将式(10)代入, 得

$$[\text{Cu}^+] = 2k_3[\text{Cu}^{2+}]/0.81k_5 = 2.47k_3[\text{Cu}^{2+}]/k_5 \quad (11)$$

因此, HOTA 的生成速率为:

$$d[\text{HOTA}]/dt = 0.19k_6[\text{TA}][\cdot\text{OH}] = 0.19k_5[\text{Cu}^+][\text{H}_2\text{O}_2] = 0.47k_3[\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (12)$$

由于反应(3)很慢, 在反应开始阶段 $[\text{Cu}^{2+}]$ 和 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 的变化可忽略, 因此 $[\text{HOTA}]$ 应随时间直线增长, 而且增长速率与 $[\text{Cu}^{2+}]$ 和 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 成正比, 这与实际观测结果是一致的(见图 3)。由 $[\text{HOTA}]$ 增长速率随 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 的变化可求得 $k_3 = 9.4 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 而 $\cdot\text{OH}$ 生成速率为:

$$k_5[\text{Cu}^+][\text{H}_2\text{O}_2] = 2.47k_3[\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2] = 0.023[\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (13)$$

Florence^[11]通过 O_2 释放测得 $k_3 = 0.46 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 约为本文测得的 k_3 的 50 倍。大量研究表明, 类 Fenton 反应确实能产生 $\cdot\text{OH}$, 但其中间过程很复杂, 产生的“ $\cdot\text{OH}$ ”常是被束缚的、非均相的, 因而不容易被自由基清除剂所清除^[2~3]。本实验所反映的只是可被自由基清除剂所能清除的相对自由的 $\cdot\text{OH}$, 根据实际的 k_3 值, 估算出这部分 $\cdot\text{OH}$ 约占 2%。事实上, Florence 在同一文章中用对硝基酚作为捕捉剂测得 $[\text{Cu}^{2+}]$ 和 $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 分别为 10^{-4} 和 $3.5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ 时, $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系产生 $\cdot\text{OH}$ 的速率为 $2.8 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 只有本文所测值的 1/3[参照式(13)], 这说明本文提出的新测量方法比用对硝基酚作为捕捉剂测定类 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 更有效。

参 考 文 献

- 1 Buxton G V, Greenstock C L, Helman W P *et al*. J Phys Chem Ref Data, 1998, 17, 513
- 2 Koppenol W H. Free Rad Biol Med, 1993, 15, 645
- 3 Prousek J. Chem Listy, 1995, 89, 11
- 4 Richmond R, Halliwell B, Chauhan J *et al*. Anal Biochem, 1981, 118, 328
- 5 Armstrong W A, Facey R A, Grant D W *et al*. Can J Chem, 1963, 41, 1575
- 6 Matthews R W. Rad Res, 1990, 83, 27
- 7 Fang X W, Mark G, von Sonntag C. Ultrasonic Sonochem, 1996, 3, 57
- 8 Hartmann H J, Gartner A, Weser U. Clin Chim Acta, 1985, 152, 95
- 9 MacLachlan A J. Phys Chem, 1976, 71, 4132
- 10 Stoewe R, Protz W A. Free Rad Biol Med, 1987, 3, 97
- 11 Florence T M. J Inorg Biochem, 1984, 22, 221

DETERMINATION OF $\cdot\text{OH}$ GENERATED IN COPPER ION CATALYZED FENTON REACTION BY TEREPHTHALATE

Huai Qing Li Jiuqiang Fang Xingwang

(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT The effect of dose rate on the radiation chemical yield of hydroxyterephthalate (HOTA) in the radiolysis of aerated terephthalate(TA) aqueous solution has been investigated, and the generation of $\cdot\text{OH}$ by copper ion catalyzed Fenton reaction has been evaluated with the help of TA. No significant difference in the $G(\text{HOTA})$ was observed at dose rate ranging from 8.2×10^{-3} to 1.6 Gy s^{-1} . The presence of Cu^{2+} at concentration less than $1/10$ of $[\text{TA}]$ lowers the $G(\text{HOTA})$ to 0.53, however $G(\text{HOTA})$ does not change with $[\text{Cu}^{2+}]$ added. As indicated by the formation of HOTA, the “ $\cdot\text{OH}$ ” generated by the Fenton-type reaction catalyzed by copper ion is different from that generated radiolytic, the former is rather localized and therefore difficult to be scavenged by TA.

KEYWORDS Terephthalate dosimeter, Fenton-type reaction, hydroxyl radical