

• 研究论文 •

## 锰离子参与的类 Fenton 反应的 HPLC 和 ESR 波谱研究

于怀东<sup>a</sup> 方 茹<sup>a</sup> 陈士明<sup>b</sup> 邹国林<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> 武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

(<sup>b</sup> 复旦大学分析测试中心 上海 200433)

**摘要** 利用自旋捕捉-ESR 技术及芳环羟基化反应-高效液相色谱(HPLC)法两种方法研究了  $Mn^{2+}$  参与的类 Fenton 反应。两种方法均检测到  $Mn^{2+}$  与  $H_2O_2$  反应产生  $\bullet OH$ 。建立了 HPLC-荧光检测器对  $\bullet OH$  的高灵敏快速检测方法。检测了超氧化物歧化酶以及几种  $Mn^{2+}$  配体对产生  $\bullet OH$  的影响。结果显示,  $Mn^{2+}$  与  $H_2O_2$  反应可以发生类 Fenton 反应, 产生  $\bullet OH$ 。这一现象可能是  $Mn^{2+}$  引起生物体内氧化损伤的重要原因。

**关键词** 锰; 羟基自由基; 类 Fenton 反应; 电子顺磁共振; 高效液相色谱; 氧化胁迫

## Manganous Participation in Fenton Like Reaction Studied by HPLC and ESR Spectroscopy

YU, Huai-Dong<sup>a</sup> FANG, Ru<sup>a</sup> CHEN, Shi-Ming<sup>b</sup> ZOU, Guo-Lin<sup>\*a</sup>

(<sup>a</sup> School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

(<sup>b</sup> Center of Analysis and Measurement, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** Using ESR spectroscopy, it was showed that manganous could substitute for iron or copper ion in Fenton system to evolve hydroxyl radical. In the presence of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO), four hyperfine splitting line signal of DMPO/ $\bullet OH$  adduct was observed. HPLC with fluorescence detection (excitation 277 nm and emission 306 nm) was also used to detect the generation of hydroxyl radical in this system. *L*-Phenylalanine, which could be converted to highly fluorescent *L*-tyrosine in the presence of  $\bullet OH$ , was used as fluorescence probe. The variety of fluorescence intensity of *L*-tyrosine reflected the generation of  $\bullet OH$ . ESR spectrum and HPLC result proved that hydroxyl radical was generated in this system. The effect of several *in vivo* environment factors, such as Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD), chelators (phosphate, pyrophosphate, EDTA and desferrioxamine) were also considered. ESR spectrum showed that Cu-Zn SOD restrained DMPO/ $\bullet OH$  adduct signal markedly, which could not be restrained by denatured enzyme. Chelators partly restricted the generation of  $\bullet OH$ , but could not eliminate the radical. It is suggested that hydroxyl radical initiated by manganous complex and hydrogen peroxide might be an important reason why manganous could induce oxidative stress *in vivo*.

**Keywords** manganous; hydroxyl radical; Fenton like reaction; ESR; HPLC; oxidative stress

Cu, Fe, Mn 等 3d 轨道过渡金属具有相近的化学性质。Fe<sup>2+</sup> 可以与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应产生羟基自由基( $\bullet OH$ )，此反应(1)于 1894 年由 Fenton 首次报道，被称为 Fenton 反

应<sup>[1]</sup>。其它过渡金属，如 Cu, V, Cr, Co, Ti 等也已经被证明可以参与类 Fenton 反应<sup>[2,3]</sup>。在 Fenton 反应体系中，能否产生  $\bullet OH$ ，以及  $\bullet OH$  的产生速度与溶液中过渡金属离

\* E-mail: zouguolin@whu.edu.cn; Tel: 027-87645674.

Received October 26, 2004; revised January 12, 2005; accepted March 18, 2005.

国家自然科学基金(No. 30370366)、高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

子的配体及反应体系的 pH 密切相关<sup>[4,5]</sup>.



在生物体内,  $\cdot\text{OH}$  是造成 DNA、蛋白质、脂膜等生物大分子氧化损伤的主要原因<sup>[5,6]</sup>. 过渡金属配合物离子在体内参与生成包括  $\cdot\text{OH}$  在内的一系列氧自由基造成氧化损伤是氧胁迫发生甚至导致衰老的重要原因<sup>[3,7,8]</sup>. 因此, 众多 3d 轨道过渡金属离子被认为在生物体内具有促氧化损伤的活性.

Mn 作为生物体内重要的微量元素, 主要以  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{3+}$  的形式存在. Mn 在生物体内是否具有类似其它 3d 轨道过渡金属一样的促氧化损伤活性一直存在争论<sup>[9,10]</sup>. 众多文献报道 Mn 可以催化超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )和  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[11~14]</sup> 的歧化反应. 这些结果支持 Mn 具有与其它过渡金属离子截然相反的抗氧化损伤活性. 然而随着 Mn 与帕金森氏症相互关系研究的发展<sup>[15,16]</sup>, 近年也有很多文献报道了 Mn 在生物体内的促氧化损伤活性<sup>[15,17,18]</sup>. 但是目前 Mn 促氧化损伤的机理还不清楚. 参与类 Fenton 反应的 3d 轨道过渡金属离子在生物体内都被证明可以参与对生物大分子的氧化损伤, 造成氧胁迫的发生<sup>[2]</sup>. Mn 的促氧化活性是否与  $\text{Mn}^{2+}$  参与类 Fenton 反应有关? 目前, 还没有直接关于  $\text{Mn}^{2+}$  是否参与类 Fenton 反应的试验报道.

本实验利用自旋捕捉-ESR 技术和芳环羟基化反应-HPLC 两种方法对  $\text{Mn}^{2+}$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系中产生  $\cdot\text{OH}$  进行了研究, 检测了超氧化物歧化酶以及几种锰离子配体对该反应体系产生  $\cdot\text{OH}$  的影响, 并对  $\text{Mn}^{2+}$  参与的类 Fenton 反应机理进行了初步探讨.

芳环羟基化反应是目前被广泛采用的一种  $\cdot\text{OH}$  检测方法, 试验中采用弱荧光物质 *L*-苯丙氨酸(*L*-Phe)为羟基化底物, 若反应体系中存在  $\cdot\text{OH}$ , *L*-Phe 可与  $\cdot\text{OH}$  发生羟基化反应生成 *L*-酪氨酸(*L*-Tyr)的几种异构体: *L*-ortho-Tyr, *L*-meta-Tyr 以及 *L*-para-Tyr, 这三种产物在 277 nm 激发波下可在 306 nm 检测到较强的发射荧光. 3 种 *L*-Tyr 异构体的的荧光增量  $\Delta F$  可定性检测  $\cdot\text{OH}$  的产生. 因为  $\text{H}_2\text{O}_2$  不能将 *L*-Phe 氧化为 *L*-Tyr<sup>[13]</sup>, 所以此方法对检测  $\cdot\text{OH}$  有较强的专一性. 荧光检测器(FLD)对 *L*-Tyr 的灵敏度高, 线性范围宽, 使得该方法适于对  $\cdot\text{OH}$  的检测. 芳环羟基化产物比自旋捕捉剂  $\cdot\text{OH}$  加合物稳定, 羟基化产物可以积累, 结合 FLD 的高灵敏度, 使得该方法为微量自由基的检测开辟了一条简便可行的途径.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂及仪器

自旋捕捉剂 5,5-二甲基-1-吡咯啉-1-氧化物

(DMPO),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , *L*-Phe 及脱铁敏(desferrioxamine, DFO)购自 Sigma 公司, Cu-Zn SOD 购自华美公司, 其它试剂均为国产分析纯以上.  $\text{MnCl}_2$  溶液及  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液在每次使用前均重新配置. 试验用水均为 Milli-Q Water system 超纯水(18.2 M $\Omega$ /cm<sup>2</sup>). 试验中所有容器均采用塑料器皿, 以避免使用玻璃器皿而引入的金属离子干扰.

### 1.2 自旋捕捉-ESR 实验

ESR 使用 Bruker ER-200D-SRC 波谱仪和 JEOLJES-IXG 波谱仪, 在 25 °C, X 波段工作, 微波功率 100 mW, 调制幅度 1 G. DMPO 在  $\text{N}_2$  保护下, 避光经活性炭纯化后使用.

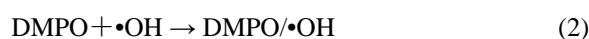
### 1.3 芳环羟基化实验

以 *L*-Phe 为荧光探针, 应用 HPLC/FLD 对羟基化产物进行分离检测. HPLC 使用 Agilent1100 液相色谱, 色谱条件为<sup>[19]</sup>: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm)柱; 洗脱液为磷酸盐缓冲液(500 mmol/L, pH 3.0): 甲醇 (90:10, V:V), 流动相由 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤并脱气后使用; 流速 1 mL/min; 柱温 20 °C; 手动进样, 进样量 5  $\mu\text{L}$ ; FLD 激发波长 277 nm, 发射波长 306 nm, PMT-Gain 14.

## 2 结果与讨论

### 2.1 ESR 对 $\cdot\text{OH}$ 的检测结果

$\text{Mn}^{2+}$  具有顺磁性, ESR 信号为 6 峰超精细谱线, DMPO  $\cdot\text{OH}$  加合物信号为 1:2:2:1 的 4 峰曲线. 图 1a 显示  $\text{Mn}^{2+}$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应产生  $\cdot\text{OH}$ , 通过反应(2)生成 DMPO  $\cdot\text{OH}$  信号. DMPO  $\cdot\text{OH}$  的 4 峰曲线位于  $\text{Mn}^{2+}$  的 6 峰曲线之中. 图 1b~1e 显示, 随着反应的进行,  $\text{Mn}^{2+}$  信号(6 峰曲线中的 2 个峰)减弱, DMPO  $\cdot\text{OH}$  加合物信号增加, 说明  $\cdot\text{OH}$  的产生伴随着  $\text{Mn}^{2+}$  的氧化. 进一步实验显示, 在此反应体系中,  $\text{Mn}^{2+}$  浓度范围在 2.1  $\mu\text{mol/L}$ ~2.4 mmol/L 之间, 可以检测到 DMPO  $\cdot\text{OH}$  加合物信号, 而此范围之外则检测不到加合物信号.



### 2.2 HPLC-芳环羟基化实验对 $\cdot\text{OH}$ 的检测结果

图 2 为芳环羟基化法对  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系中  $\cdot\text{OH}$  检测结果. 芳环底物 *L*-Phe 受  $\cdot\text{OH}$  攻击, 发生羟基化, 生成 *L*-ortho-Tyr, *L*-meta-Tyr 以及 *L*-para-Tyr. 图中 a 是底物 *L*-Phe 的色谱图, b 是反应 4 h 后的色谱图. 结果显示羟基化产物峰增长明显. 自旋捕捉-ESR 实验与 HPLC-芳环羟基化实验结果一致, 均显示在  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系中有  $\cdot\text{OH}$  产生.

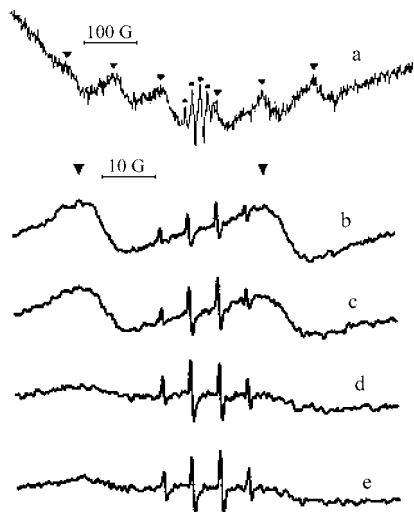


图1  $Mn^{2+}$ 及DMPO•OH的ESR谱

Figure 1 ESR spectra of  $Mn^{2+}$  and DMPO•OH adduct

EPR spectra were obtained with 1.2 mmol/L  $Mn^{2+}$ , 3%  $H_2O_2$ , and 100 mmol/L DMPO in the presence of 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). •—hyperfine splitting lines of DMPO•OH; ▼—convex curves which represented  $Mn^{2+}$  signal. As the reaction proceeding, the signals of  $Mn^{2+}$  decreased, while the signals of hydroxyl radical adduct increased, as shown in b~e, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, respectively

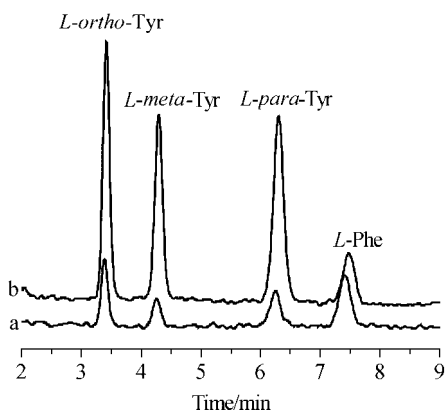


图2 芳环羟基化反应产物的HPLC图谱

Figure 2 HPLC results of aromatic hydroxylation reaction

HPLC results were obtained with 1.5  $\mu\text{mol/L}$   $Mn^{2+}$ , 0.03%  $H_2O_2$  and 100  $\mu\text{mol/L}$   $L\text{-Phe}$  in the presence of 1 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). a—the beginning of reaction; b—4 h later.

### 2.3 Cu-Zn SOD对 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 体系产生•OH的影响

Cu-Zn SOD催化 $O_2^-$ 的歧化反应,是生物体内清除超氧自由基的重要酶类.利用ESR检测了Cu-Zn SOD对 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 体系的影响.图3显示,反应体系中加入Cu-Zn SOD后可以明显抑制•OH的产生.而相同条件下,相同量的经高温灭活处理的Cu-Zn SOD则不能抑制•OH的产生.此结果说明在 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 体系中存在 $O_2^-$ ,并且 $O_2^-$ 与•OH的产生紧密相关<sup>[20]</sup>.

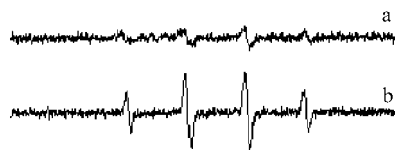


图3 Cu-Zn SOD抑制DMPO•OH的产生

Figure 3 Inhibition of DMPO•OH adduct production by Cu-Zn SOD

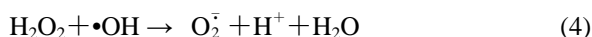
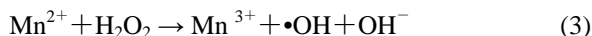
EPR spectra were obtained with 1.2 mmol/L  $Mn^{2+}$ , 3%  $H_2O_2$ , 100 mmol/L DMPO and in the presence of 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). a—in the presence of trace Cu-Zn SOD; b—in the presence of the same amount of denatured enzyme

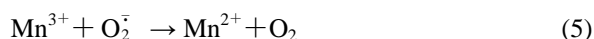
### 2.4 几种金属离子配体对 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 反应体系产生•OH的影响

金属离子在生物体内主要以络离子的形式存在.此外,一些药物专一络合某些金属离子,依靠改变这些离子的反应活性而发挥药效.如,EDTA络合 $Fe^{2+}$ 可以降低其参与Fenton反应的活性,而DFO则依靠选择性络合3价金属阳离子发挥作用.磷酸盐、焦磷酸盐分别是生物体内非酶结合的自由 $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ 的主要配体<sup>[21]</sup>.应用芳环羟基化法研究了焦磷酸盐、DFO及EDTA对 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 反应体系中产生•OH的影响情况,如图4所示.结果表明,这些配体的存在可以明显抑制 $Mn^{2+}/H_2O_2$ 反应体系中•OH的产生,提示 $Mn^{2+}$ 离子在生物体内参与产生•OH的能力较体外试验要弱得多.但是,几种配体均不能消除体系中•OH的产生.ESR试验结果显示, $Mn^{2+}/H_2O_2$ 反应体系可以长时间产生•OH,反应开始23 h后仍能检测到DMPO•OH信号,并且信号强度仅下降到反应初始强度的1/3;而相同条件下 $Fe^{2+}/H_2O_2$ 反应体系的DMPO•OH信号在反应开始0.5 h后就检测不到了.综合上述结果说明, $Mn^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 反应可以持续产生低量•OH.这一现象可能是 $Mn^{2+}$ 引起的生物体内氧化损伤的重要原因.

### 2.5 $Mn^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 反应的机理初探

总结上述试验结果显示: $Mn^{2+}$ 与 $H_2O_2$ 反应中产生•OH;反应体系中有 $O_2^-$ 存在;配体的存在可以抑制 $Mn^{2+}$ 参与反应的能力.络合3价金属阳离子的DFO可以明显抑制•OH的产生,说明反应体系中存在 $Mn^{3+}$ ,并且 $Mn^{3+}$ 对•OH的产生也起到了关键作用.考虑Mn与Cu, Fe具有相近的化学性质,并且在 $pH > 7$ 时有 $E_{H_2O_2/\cdot OH} > E_{Mn^{3+}/Mn^{2+}} > E_{O_2/O_2^-}$ ,  $Mn^{2+}$ 离子在此体系中可能通过经典的类Fenton及Haber-Weiss反应产生•OH:





联立(3), (4), (5)可表示为:

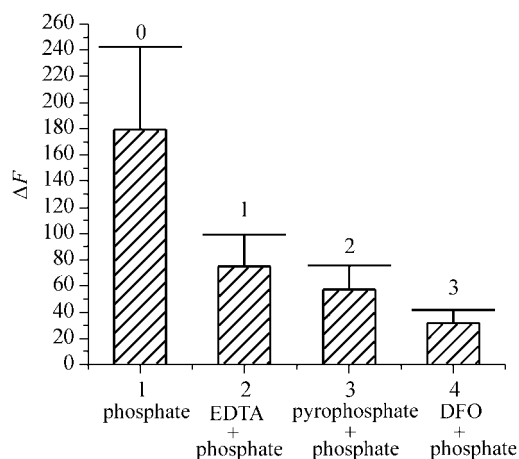


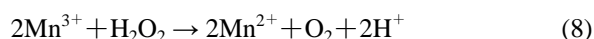
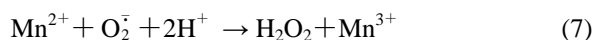
图4 螯合剂对  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系中生成  $\bullet\text{OH}$  的影响

**Figure 4** Effect of chelators on the generation of  $\bullet\text{OH}$  in  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  system

1.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Mn}^{2+}$ , 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  *L*-Phe in the presence of 1 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). 0—1 mmol/L phosphate buffer; 1—1 mmol/L phosphate buffer+1 mmol/L EDTA; 2—1 mmol/L phosphate buffer +1 mmol/L pyrophosphate; 3—1 mmol/L phosphate+1 mmol/L DFO. The vertical lines represent the means  $\pm$  standard deviations from three independent experiments.

## 2.6 $\text{O}_2^-$ 与 $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 反应体系

有文献报道,  $\text{O}_2^-$  可以氧化  $\text{Mn}^{2+}$  的焦磷酸盐配合物为  $\text{Mn}^{3+}$ , 如反应(7)所示<sup>[22,23]</sup>.  $\text{Mn}^{3+}$  在高氯酸或在 pH 6.5 的焦磷酸盐溶液中可以被  $\text{H}_2\text{O}_2$  或  $\text{O}_2^-$  还原为  $\text{Mn}^{2+}$ , 如反应(8), (9)所示<sup>[22]</sup>.



联合反应(7), (8)或反应(7), (9)可以说明  $\text{Mn}^{2+}$  催化  $\text{O}_2^-$  歧化反应的能力<sup>[12,22]</sup>. 但是在反应(7), (8)中, 除反应(7)外, 没有再生  $\text{Mn}^{3+}$  的机制存在<sup>[24]</sup>, 所以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解的反应(8)不能正常进行. 而反应(7), (9)不能解决  $\text{H}_2\text{O}_2$  的去向, 并且同  $\text{Mn}^{2+}$  分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  的实验报道矛盾<sup>[24]</sup>, 因此可以认为反应(7), (9)途径不是  $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系中的主要反应. 而  $\text{Mn}^{2+}$  参与的类 Fenton 反应机理, 如反应(3), (4), (5)所示, 可以比较合理地解释  $\text{Mn}^{2+}$  对  $\text{O}_2^-$  的歧化以

及对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的降解.

$\text{O}_2^-$  是生物体内发生氧化损伤及氧化胁迫的关键分子,  $\text{Mn}^{2+}$  催化  $\text{O}_2^-$  的歧化主要通过反应(7), (9)进行<sup>[7]</sup>. 反应(9)中的还原剂底物也可以由生物体内的还原性小分子(还原型谷胱甘肽、NADPH 等)代替. 产物  $\text{H}_2\text{O}_2$  则由过氧化氢酶催化降解. 通过这一途径,  $\text{Mn}^{2+}$  与  $\text{O}_2^-$  反应, 表现出抗氧化损伤活性. 而在  $\text{H}_2\text{O}_2$  充足的境况下, 则可能发生反应(3), (4), (5). 反应中产生的  $\bullet\text{OH}$  造成 DNA、蛋白质、脂膜等生物大分子氧化损伤. 通过这一途径,  $\text{Mn}^{2+}$  参与类 Fenton 反应, 表现出促氧化损伤活性.

## References

- Fenton, H. J. *J. Chem. Soc.* **1894**, 65, 899.
- Kasprzak, K. S. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 958.
- Liochev, S. I. *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, 36, 1.
- Goldstein, S.; Meyerstein, D.; Czapski, G. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 15, 435.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. *Biochem. J.* **1984**, 219, 1.
- Fridovich, I. *J. Exp. Biol.* **1998**, 201, 1203.
- Halliwell, B.; Gutteridge, M. C. *Free Radical Biology and Medicine*, Oxford University Press, London, **1999**, pp. 784~859.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature* **2000**, 408, 239.
- Aschner, M. *Neurotoxicology* **2002**, 23, 123.
- HaMai, D.; Bondy, S. *Neurochem. Int.* **2004**, 44, 223.
- Sziraki, I.; Rauhala, P.; Chiueh, C. C. *Brain Res.* **1995**, 698, 285.
- Archibald, F. S.; Fridovich, I. *J. Bacteriol.* **1981**, 145, 442.
- Hussain, S.; Ali, S. F. *Neurosci. Lett.* **1999**, 261, 21.
- Coassin, M.; Ursini, F.; Bindoli, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 299, 330.
- Takeda, A. *Brain Res. Rev.* **2003**, 41, 79.
- Fariss, M. W.; Zhang, J. G. *Toxicology* **2003**, 189, 129.
- Yamada, M.; Ohno, S.; Okayasu, I.; Okeda, R.; Hatakeyama, S.; Watanabe, H.; Ushio, K.; Tsukagoshi, H. *Acta Neuropathol.* **1986**, 70, 723.
- Gerlach, M.; Ben-Shachar, D.; Riederer, P.; Youdim, M. B. *J. Neurochem.* **1994**, 63, 793.
- Kaur, H.; Halliwell, B. *Anal. Biochem.* **1994**, 220, 11.
- Kehrer, J. P. *Toxicology* **2000**, 149, 43.
- Cheton, P. L.; Archibald, F. S. *Free Radical Biol. Med.* **1988**, 5, 325.
- Archibald, F. S.; Fridovich, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 214, 452.
- Kono, Y.; Takahashi, M. A.; Asada, K. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, 174, 452.
- Stadtman, E. R.; Berlett, B. S.; Chock, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 384.