



一种新型以碳为中心的醌酮自由基的检测和鉴定

朱本占*, 夏海英, 覃浩, 单国强, 黄春华, 任福荣, 邵杰, 曲娜

中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

* 联系人, E-mail: bzhu@rcees.ac.cn

2012-07-31 收稿, 2012-10-31 接受

国家杰出青年科学基金(20925724)、国家自然科学基金重点项目(21237005)、国家重点基础研究发展计划(2008CB418106)和中国科学院“百人计划”资助

摘要 最近发现卤代醌能通过不依赖于金属离子的途径促进氢过氧化物的分解而产生羟基或烷氧自由基, 并认为该反应通过亲核取代形成醌-过氧化物中间产物, 随后均裂分解生成羟基或烷氧自由基和醌氧自由基中间体. 然而, 在先前的研究中, 无论是对其主要反应产物, 还是对该机制中提出的醌-过氧化物中间体和醌氧自由基, 都没有被完全分离鉴定. 在最新的研究中, 以 2,5-二氯-1,4-苯醌(DCBQ)与叔丁基过氧化氢(*t*-BuOOH)反应体系为研究对象, 通过半制备高效液相色谱(HPLC), 分离纯化出一种主要反应产物, 采用多种分析方法鉴定该产物为 2-羟基-3-叔丁氧基-5-氯-1,4-苯醌(CBQ(OH)-O-*t*-Bu), 原来该物质是先前假设的醌-过氧化物中间体(CBQ-OO-*t*-Bu)的重排异构体. 继而发现, 自旋捕获剂 DMPO(5,5-二甲基-1-吡咯啉-*N*-氧化物)能抑制 CBQ(OH)-O-*t*-Bu 的形成, 同时伴随着形成一种新的含有一个氯原子、质荷比 m/z 为 268 的 DMPO 加合物. 在此基础上, 综合采用电子自旋共振、核磁共振-氢谱、高效液相-傅里叶变换离子回旋共振等分析方法, 并使用 O-17 标记的 H_2O_2 的研究表明: DMPO 捕获的并不是以氧为中心的醌氧自由基(CBQ-O $\cdot$), 而是其共振异构体——一种以碳为中心的醌酮自由基($\cdot$ CBQ=O). 这是第一次检测到一种新型的以碳为中心的醌酮自由基, 为先前提出的卤代醌介导的不依赖金属离子的氢过氧化物的分解机制提供了直接的实验证据, 并丰富和完善了该机制.

关键词

碳为中心的
醌酮自由基
共振异构体
酮-烯醇互变

卤代醌类物质是一类具有强烈肝毒性、肾毒性以及致癌性的有毒有害化合物, 常作为一类活性中间产物在卤代芳香持久性有机污染物的各种化学与酶反应的氧化及降解过程中产生^[1-8]. 最近在饮用水中检测到了 4 种潜在致肾癌的多卤代醌 2,6-二氯-1,4-苯醌、2,3,6-三氯-1,4-苯醌、2,6-二氯-3-甲基-1,4-苯醌和 2,6-二溴-1,4-苯醌等消毒副产物^[8].

有机氢过氧化物在生物体内可通过自由基与不饱和脂肪酸的化学反应产生, 也可通过酶催化氧化亚油酸或花生四烯酸产生. 过渡金属离子可催化有机氢过氧化物的分解和烷氧自由基的生成, 这能够

引发脂质过氧化或进一步分解产生不饱和醛基化合物, 进而导致 DNA 和其他生物大分子损伤^[9]. 过氧化氢在生物体内可自发产生. 环境因素如紫外线和环境污染可促进过氧化氢的生成. 羟基自由基被公认是生物系统中最具活性的活性氧物质, 能直接与生物大分子反应导致氧化损伤^[3,4,9]. 目前, 关于羟基自由基的产生机理, 最被广泛接受的是过渡金属离子(如二价铁离子)催化的过氧化氢的分解反应, 也称为 Fenton 反应^[9].

应用电子自旋共振和自旋捕获技术, 我们近期的研究^[10]发现, 有机氢过氧化物与卤代醌能通过不

引用格式: 朱本占, 夏海英, 覃浩, 等. 一种新型以碳为中心的醌酮自由基的检测和鉴定. 科学通报, 2013, 58: 1140–1146

Zhu B Z, Xia H Y, Qin H, et al. Detection and identification of a novel carbon-centered quinone ketoxy radical (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 1140–1146, doi: 10.1360/972012-517

依赖于过渡金属离子的途径产生烷氧自由基. 2,5-二氯-1,4-苯醌(DCBQ)与叔丁基过氧化氢(*t*-BuOOH)反应产生 *t*-BuO $\cdot$, 不仅不需要过渡金属离子参与, 也不是通过半醌自由基 DCSQ $\cdot$ 导的类 Fenton 反应, 产生的关键是 DCBQ 本身. 据此, 我们提出了 DCBQ 介导的 *t*-BuOOH 降解及 *t*-BuO $\cdot$ 的形成机制: *t*-BuOOH 对 DCBQ 亲核攻击形成醌-过氧化物中间体 5-氯-2-叔丁过氧基-1,4-苯醌(CBQ-OO-*t*-Bu), 随后其均裂分解形成叔丁氧基自由基(*t*-BuO $\cdot$)和 5-氯-对苯醌-2-氧自由基(CBQ-O $\cdot$), CBQ-O $\cdot$ 又歧化为离子形式的 5-氯-2-羟基-1,4-苯醌(CBQ-OH)^[10]. 我们也发现羟基自由基($\cdot$ OH)可通过类似的不依赖于过渡金属离子的机制由卤代醌和 H₂O₂ 反应产生^[3,4,11-13].

然而, 在过去的研究中, 无论是对以上反应的主要反应产物, 还是对假设存在的醌-过氧化物中间体 CBQ-OO-*t*-Bu 和 CBQ-O $\cdot$, 都没有确认它们准确的化学结构. 因此, 接下来的研究^[14]继续以 DCBQ/*t*-BuOOH 反应体系为研究对象, 希望解决以下几个问题: (1) 是否可能分离、纯化得到醌-过氧化物中间体; (2) 能否分离、纯化得到 CBQ-OH 或其他主要反应产物, 并运用 NMR, HPLC/MS 和其他分析方法鉴定其结构; (3) 能否综合采用 ESR 与 HPLC/MS 联用技术检测和鉴定 5-氯-对苯醌-2-氧自由基(CBQ $\cdot$)或其共振异构体?

1 DCBQ 和 *t*-BuOOH 反应的主要产物之一被鉴定为 2 羟基-3-叔丁氧基-5-氯-1,4-苯醌

在对 DCBQ/*t*-BuOOH 反应体系的研究中, 首先采用半制备高效液相色谱法来试图分离和纯化不稳定的醌-过氧化物中间体以及反应的主要产物. 结果表明, 分离纯化出两种主要反应产物, 其中之一经多种方法鉴定正是预期的 5-氯-2-羟基-1,4-苯醌(CBQ-OH).

另一种产物的 *m/z* 为 229, 最初被认为是醌-过氧化物中间体 5-氯-2-叔丁过氧基-1,4-苯醌(CBQ-OO-*t*-Bu)(分子量为 230), 因为该物质在进行电喷雾四极杆飞行时间质谱(ESI-Q-TOF MS)分析时, 其特征谱图呈现为一组质荷比 *m/z* 为 229 的一氯同位素簇峰. 对该物质的二级质谱分析表明, 质荷比 *m/z* 为 229 的峰不稳定, 可碎裂形成质荷比为 *m/z* 172 的碎片离子. 然而, 更多对该物质化学结构的详细研究表明, 该物质并不是预期的醌-过氧化物中间体.

NMR 和 IR 研究表明, 该物质结构中含有羟基基团. 证据如下: (1) ¹H NMR(DMSO-*d*₆)谱中化学位移 10.74 处正是典型的羟基峰, 重水(D₂O)交换实验表明, 加入 D₂O 后, 其峰随即消失; (2) 红外光谱显示 3318 cm⁻¹ 处有宽带峰, 这是一个典型的 O-H 键的振动信号; (3) 其在磷酸盐缓冲液中(pH 7.4)呈现紫色(最大吸收波长为 552 nm), 是典型醌羟基的吸收带. 此外, 该物质在反应液中至少能稳定存在 1 h.

基于上述分析与其他实验数据, 该物质被鉴定为 2-羟基-3-叔丁氧基-5-氯-1,4-苯醌(CBQ(OH)-O-*t*-Bu), 是先前认为的醌-过氧化物中间体 5-氯-2-叔丁过氧基-1,4-苯醌(CBQ-OO-*t*-Bu)的重排同分异构体.

上述令人惊奇的结果引出了两个新问题: (1) 该产物 CBQ(OH)-O-*t*-Bu 是否直接由不稳定的醌-过氧化物中间体(CBQ-OO-*t*-Bu)转化形成? (2) 如果由醌-过氧化物中间体直接转化形成, 那么具体的分子机制是什么? 为回答上述问题, 我们推测: 不稳定的 CBQ-OO-*t*-Bu 可均裂分解产生叔丁氧自由基(*t*-BuO $\cdot$)和 5-氯-对苯醌-2-氧自由基(CBQ $\cdot$). 以氧为中心的醌氧自由基 CBQ $\cdot$ 能自发转变为其共振异构体——以碳为中心的醌酮自由基($\cdot$ CBQ=O). 后者由于其结构中存在含 2 个共轭羰基基团的 p- π 系统, 使得未配对电子发生离域共振从而结构更稳定^[15]. $\cdot$ CBQ=O 随后与 *t*-BuO $\cdot$ 偶联, 再经酮-烯醇互变生成最终反应产物 CBQ(OH)-O-*t*-Bu.

2 自旋捕捉剂 DMPO 能抑制 CBQ(OH)-O-*t*-Bu 的形成

众所周知, 自旋捕捉剂 DMPO(5,5-二甲基-1-吡咯-N-氧化物)能够捕获烷氧自由基 *t*-BuO $\cdot$. 若上述推测正确, 那么在 DMPO 加入 DCBQ/*t*-BuOOH 反应体系后, DMPO 应该与 $\cdot$ CBQ=O 争夺 *t*-BuO $\cdot$, 从而抑制了 2-羟基-3-叔丁氧基-5-氯-对苯醌(CBQ(OH)-O-*t*-Bu)的形成. 实验结果证实确实如此. CBQ(OH)-O-*t*-Bu 的形成能被自旋捕获剂 DMPO 抑制, 且这种抑制作用呈浓度依赖性, DMPO 加入量越多, CBQ(OH)-O-*t*-Bu 形成量则越少.

3 高效液相色谱/质谱鉴定 DMPO-157 氮酮加合物

有趣的是, 在 HPLC/MS 研究中发现, 在加入

DMPO 的 DCBQ/*t*-BuOOH 反应体系中, 我们检测到了一种新的 DMPO 加合物, 其保留时间为 5.41 min (图 1(a)和(b)). 该物质在 ESI-Q-TOF-MS 分析的特征图谱显示为一组质荷比 m/z 为 268(负离子模式)(图 1(c))或质荷比 m/z 为 270(正离子模式)的一氯同位素簇峰.

这些数据表明, 该物质可能是 DMPO 与推测的醌氧自由基 CBQ-O $\cdot$ 或其共振异构体醌碳自由基 $\cdot$ CBQ=O(MW 157)的加合物(为方便起见, 该 DMPO 加合物简称为 DMPO-157). 傅里叶变换离子回旋共振(FTICR)质谱是一种可以提供高准确度和精确度质量数的质谱技术^[16,17]. 因此, 为获知 DMPO-157 的精确分子质量、元素组成和结构信息, 我们采用 FTICR/MS 手段进行进一步研究. FTICR/MS 研究表明, DMPO-157 的特征峰是一组质荷比为 268.0383 的一氯同位素簇峰, 其对应于去质子的氧化形式的 DMPO-157 氮酮加合物(理论值 m/z 为 268.0397). 此外, 当 *t*-BuOOH 被其他氢过氧化物如过氧化氢(H₂O₂)和异丙苯过氧化氢替代时, 能检测到同样的 DMPO-157 氮酮加合物. 当 DMPO 被另一种自旋捕获剂 BMPO(5-叔丁氧羰基-5-甲基-1-吡咯-*N*-氧化物, DMPO 结构类似物^[18])取代时, 能检测到 BMPO-157

加合物, 其特征峰是一组质荷比 m/z 为 354 的一氯同位素簇峰.

此外, FTICR/MS 研究还发现, 当 DCBQ 被其他卤代醌取代时, 也能检测到相应的 DMPO-醌自由基加合物, 如 2,5-二溴-1,4-苯醌(其加合物的谱图特征是一组质荷比 m/z 为 312 的一溴同位素簇峰)和三氯-1,4-苯醌(其加合物的谱图特征是一组质荷比 m/z 为 302 的二氯同位素簇峰). 但其他卤代醌(如 2,3-二氯、四氯-和四溴-1,4-苯醌)却没有形成类似的 DMPO 加合物.

4 H₂O₂是加合物DMPO-157中氧原子的来源

如上所述, 当 *t*-BuOOH 被 H₂O₂ 替代时, 也能检测到同样的 DMPO-157 加合物. 据前述假设, 插入到 DMPO-157 加合物中的氧原子应该来源于 H₂O₂. 为验证该推测是否属实, 进行了 DCBQ 与氧-17 标记的 H₂O₂([¹⁷O]-H₂O₂)和未标记的 H₂O₂ 反应的对照试验. 结果表明, 氧-17 标记的 H₂O₂ 与未标记的 H₂O₂ 相比, 去质子化的 DMPO-157 加合物的质量数变化了 1 个单位, 与预期值相同. 这些结果表明, H₂O₂ 是插入到 DMPO-157 加合物中氧原子的来源.

5 ESR 自旋捕获检测到以碳为中心的醌酮自由基

在先前对 DMPO/DCBQ/*t*-BuOOH 体系的 ESR 研究发现, 主要有两种自由基加合物具有很强的 ESR 信号, 分别是 DMPO/*t*-BuO $\cdot$ 和 DMPO/ $\cdot$ CH₃, 此外还能检测到一种次要的自由基加合物, 其 ESR 信号相对较弱, 该自由基加合物还不清楚是什么. 在最近的研究中也得到了类似的结果(图 2(c)). 对 DMPO/DCBQ/*t*-BuOOH 体系的 FTICR/MS 研究表明, 该次要的尚未鉴定的自由基加合物可能是 DMPO 与醌氧自由基 CBQ-O $\cdot$ 或其共振异构体醌碳自由基 $\cdot$ CBQ=O 的加合物. 然而, 由于 DMPO/*t*-BuO $\cdot$ 和 DMPO/ $\cdot$ CH₃ 的强信号干扰, 只能观测到一组弱的四线 ESR 信号(图 2(c)). 上述结果都不足以揭示 DMPO 捕获的自由基是 CBQ-O $\cdot$ 还是 $\cdot$ CBQ=O.

根据之前提出的卤代醌促进氢过氧化物分解并产生烷氧/羟基自由基机制^[10,11], 我们推测在 DMPO 存在时, DCBQ/H₂O₂ 反应体系也会产生与 DCBQ/*t*-BuOOH 体系中具有相同 ESR 特征的 DMPO-157 自由

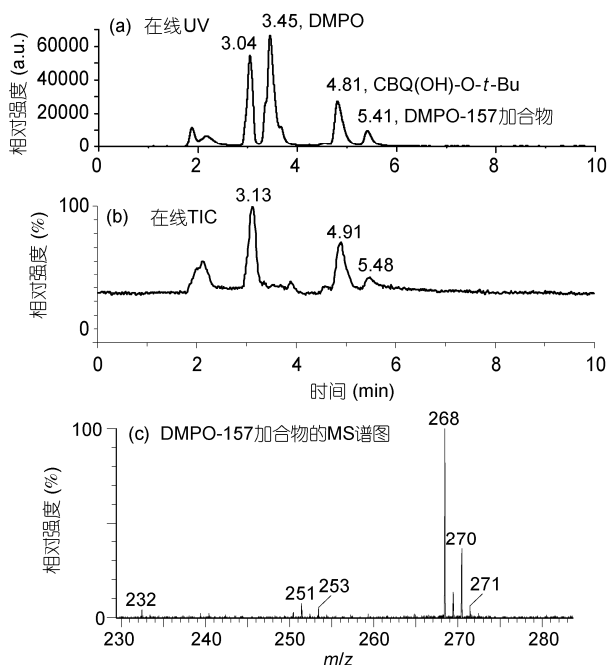


图1 DMP/DCBQ/*t*-BuOOH 的反应体系后产生的 DMPO-157 氮酮加合物

根据文献[14]修改

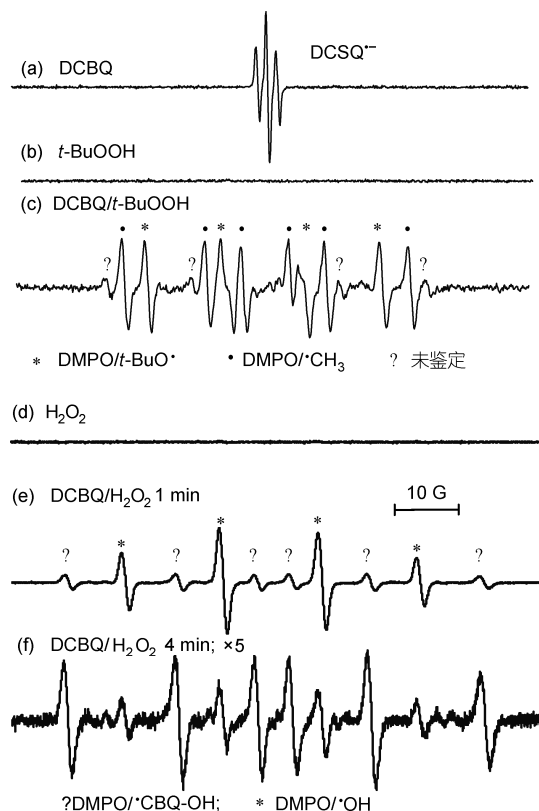


图2 在DMPO存在时,DCBQ/H₂O₂或DCBQ/*t*-BuOOH反应体系产生的ESR信号
根据文献[14]修改

基加合物。因此,为避免DMPO/*t*-BuO[•]和DMPO/[•]CH₃的强ESR信号干扰,获得清晰的DMPO-157的ESR图谱,对DMPO/DCBQ/H₂O₂体系进行了研究。结果正如预期,除可观察到典型的DMPO/[•]OH的信号,还可观察到等强度的六线ESR信号($a^H = 28.8$ G; $a^N = 17.0$ G; $a^N/a^H = 0.59$)(图2(e)和(f))。这些ESR结果表明,DMPO捕获的是以碳为中心的醌酮自由基[•]CBQ=O,而非以氧为中心的醌氧自由基CBQ-O[•][19,20]。因为假若DMPO捕获CBQ-O[•],应该具有四线ESR信号。DMPO/[•]CBQ=O可以进一步被氧化转化为稳定形式,DMPO-157氧化形式的加合物(DMPO/CBQ-OH),也就是我们前述的HPLC实验中发现的保留时间为5.41 min的物质。

当DCBQ被2,5-二溴和三氯-1,4苯醌取代时,也可观察到相似的DMPO与以碳为中心的醌酮自由基结合的加合物,显示为特征六线ESR信号。而2,3-DCBQ、四氯-和四溴-1,4苯醌参与的反应体系则检测不到相应的ESR信号。上述ESR数据与此前的

HPLC/MS和FTICR/MS检测结果相一致。这表明,对于卤代醌来说,如果其醌环结构中卤素原子的邻位是氢原子,则有利于观察到以碳为中心的醌酮自由基的形成。

6 DMPO-157的两种氧化还原形式:氮氧化物和氮酮

众所周知,由DMPO衍生的自旋捕获加合物可能以3种氧化还原形式存在:(1)氮氧化物的自由基形式;(2)单电子的羟胺还原形式;(3)单电子的氮酮氧化形式^[9]。这3种氧化还原形式中,只有氮酮形式的加合物被认为是一种稳定的物质。与之类似,本研究中的DMPO-157加合物可能以其中两种形式存在:DMPO-157氮氧化物形式以及其相应的氮酮形式。曾有研究通过MS手段检测到DMPO加合物的一种或所有形式^[21-24]。

在该研究中,采用HPLC/ESI-MS分析手段,并结合FTICR高分辨质谱的数据分析,认定质荷比 m/z 为268.0383的分子离子峰物质为DMPO-157氮氧自由基加合物氧化后的氮酮形式(理论分子量为269.0397)。二级质谱分析结果表明,质荷比 m/z 为268的分子离子峰可碎裂成质荷比 m/z 为251(-OH丢失)和 m/z 为236(甲基丢失)的峰。质荷比 m/z 为270的分子离子峰可依次丢失3个CO。上述二级质谱分析的结果进一步证实了如下结论:DMPO-157氮氧化物加合物是以碳为中心的醌酮加合物,而非以氧为中心的醌氧加合物。

为获得更有说服力的证据,我们采用半制备高

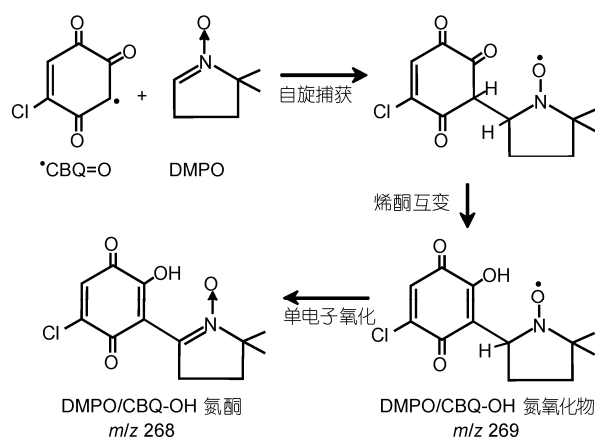


图3 DMPO-157转化的可能途径

根据文献[14]修改

效液相色谱分离出 DMPO-157 氮酮加合物, 并通过 $^1\text{H-NMR}$ 对其进行鉴定. 研究发现, 在氢谱低场区化学位移为 6.26 和 6.82 处的信号分别对应于 CBQ-OH 的 C_3' 位上的质子信号和 DMPO 的 C_2 位上的质子信号, 此两个特征信号在 DMPO-157 的氢谱图中消失了, 这表明 DMPO 和 CBQ-OH 的 C_2 , C_3' 之间形成了新的共价键. 该共价键的形成导致邻位质子的化学位移也发生明显变化(如 C_3 位上的质子), 但对较远质子的化学位移几乎没有影响(即 5,5-二甲基上的质子和 C_4 和 C_6 位上的质子). 上述 NMR 数据为证实 DMPO-157 氮酮加合物的结构提供了更直接的证据, 即在 DCBQ 与氢过氧化物反应体系中, DMPO 捕获了以碳为中心的醌酮自由基 $\text{CBQ}=\text{O}$ 形成 DMPO 氮氧化物自由基加合物, 该加合物极不稳定, 其随后转换为稳定的终产物 DMPO/CBQ-OH 氮酮加合物.

据我们所知, 这是首次报道通过联合运用 ESR 自旋捕获、NMR 和 FTICR/MS 等分析方法检测和鉴定到一种新型的以碳为中心的醌酮自由基.

然而, 尽管已经通过半制备高效液相色谱分离收集得到 DMPO/CBQ-OH 氮酮加合物, 但却没有收集到具有六线 ESR 信号的 DMPO-157 氮氧化物自由基加合物. 其原因可能为: 在分离过程中 DMPO-157 氮氧化物自由基加合物不稳定, 其在 HPLC 分离柱中就衰变成无 ESR 响应的氮酮形式加合物; 或收集组分中自由基加合物的浓度太低而不能检测到 ESR 信号. 因此, 还需进一步的研究.

7 卤代醌介导不依赖于金属离子的氢过氧化物分解的分子机制

在 DCBQ/ $t\text{-BuOOH}$ 反应体系中, 已经检测和鉴定反应的主要自由基中间体是以碳为中心的醌酮自由基, 且已分离和鉴定反应的主要产物为 CBQ(OH)-O- $t\text{-Bu}$. 尽管由于 CBQ-OO- $t\text{-Bu}$ 不稳定而没有分离和纯化得出该中间体, 以上结果也强烈表明 CBQ(OH)-O- $t\text{-Bu}$ 的异构体 CBQ-OO- $t\text{-Bu}$ 存在于反应体系中. 此外, 还分离和鉴定出 CBQ-OH 是反应的另一个主要产物. 上述结果都表明, 以氧为中心的醌氧自由基 CBQ-O $\cdot$ 也应存在于反应体系中, 尽管由于其较短半衰期, 或其稳态浓度太低不能通过 ESR 自旋捕获的方法直接检测到.

综上所述, 在卤代醌介导的不依赖金属离子的

氢过氧化物分解形成烷氧自由基的研究过程中, 本研究的结果为以碳为中心的醌酮自由基的存在提供了直接证据. 在结合先前研究成果与本研究的新结果基础上, 对先前提出的 DCBQ/ $t\text{-BuOOH}$ 反应的分子机制作了进一步补充与扩展, 那就是: DCBQ 与 $t\text{-BuOOH}$ 首先发生亲核反应, 形成醌过氧化反应中间体(CBQ-OO- $t\text{-Bu}$), 其均裂形成叔丁氧基自由基($t\text{-BuQ}\cdot$)和 5-氯-对苯醌-2-氧自由基(CBQ $\cdot$). CBQ $\cdot$ 随后或歧化生成反应产物之一 CBQ-OH, 或共振异构化形成以碳为中心的醌酮自由基 $\text{CBQ}=\text{O}$, $\text{CBQ}=\text{O}$ 再进一步与 $t\text{-BuQ}\cdot$ 耦联, 通过醌-烯醇互变形成另一种主要产物 CBQ(OH)- $t\text{-Bu}$ (图 4).

8 可能的生物学意义

该研究表明, 不仅 DCBQ, 其他卤代醌也都能与有机氢过氧化物或 H_2O_2 通过不依赖于金属的途径发生反应, 产生烷氧自由基(或羟基自由基)和以碳为中心的醌酮自由基. 这一发现可能具有重要的生物学意义. 例如, 许多广泛使用的杀虫剂, 包括氯代苯酚(如五氯酚和 2,4,6-三氯酚), 橙色剂(2,4,5-三氯苯氧基乙酸与 2,4-二氯苯氧基乙酸的混合物)和溴代阻燃剂 3,3',5,5'-四溴双酚 A 等可通过体内代谢^[1-4,25-27]或化学脱卤^[5-7]生成多卤取代醌. 本研究结果表明, 卤代醌与氢过氧化物发生反应, 不仅可以通过促进烷氧自由基(或羟基自由基)的产生发挥其毒性, 而且还可以通过形成碳为中心的醌酮自由基而发挥毒性. 该以碳为中心的醌酮自由基有可能直接与重要的生物

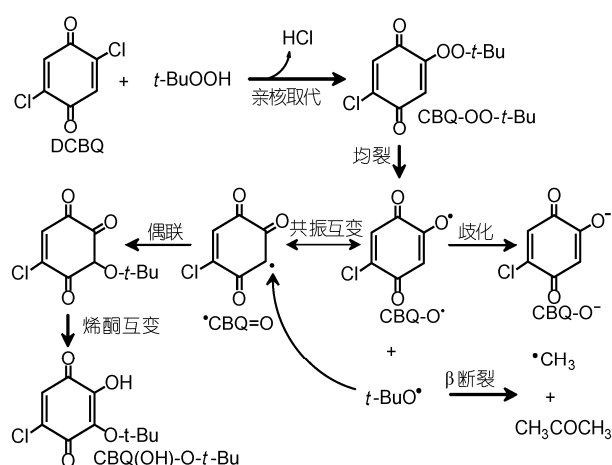


图4 DCBQ与 $t\text{-BuOOH}$ 反应可能的分子机制

根据文献[14]修改

大分子如 DNA、蛋白质和脂类反应。

近年来, H_2O_2 作为一种环境友好的氧化剂, 被越来越广泛地用于修复被污染物(如氯酚)污染的环境^[5-7]。在这些“环境友好”系统中, H_2O_2 的使用量通常是毫摩尔级。一项最近的研究表明, 在铁离子复合物的催化作用下, 2,4,6-三氯酚与 H_2O_2 反应产生的 2,6-二氯-1,4-苯醌能在反应的最初几分钟内检测到, 其随后发生进一步的转化^[7]。另一项研究发现^[28], H_2O_2 能将四氯-1,4-苯醌的分解速率提高 2 个数量级, 该反应太快只能在酸性 pH 条件下才能测得其反应速率。上述研究表明, 在使用或产生过氧化物的系统中,

依赖于过氧化物的卤代醌的分解途径是极其重要的。然而, 进一步转化的确切的分子机理并不清楚。我们的研究结果为深入理解废水处理或修复过程中形成的卤代醌的转化机制提供了崭新的视角。

然而, 仍有许多问题亟待解决, 尤其是关于这些反应的生物相关性方面的问题。例如, 卤代醌与 H_2O_2 或有机氢过氧化物反应的反应速率常数为何, 反应是否会与经典的 Fenton 反应相互竞争, 醌-过氧化物反应中间体的分解速率有多大, 这种途径产生的羟基自由基和以碳为中心的醌酮自由基能否在细胞和动物模型中检测到等。

参考文献

- 1 Bolton J L, Trush M A, Monks T J, et al. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13: 135–160
- 2 Song Y, Wagner B A, Buettner G R, et al. Nonenzymatic displacement of chlorine and formation of free radicals upon the reaction of glutathione with PCB quinones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9725–9730
- 3 Zhu B Z, Shan G Q. Potential mechanism for pentachlorophenol-induced carcinogenicity: A novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22: 969–977
- 4 朱本占. 新型羟基自由基产生分子机理的研究: 五氯酚的可能致癌机制. *科学通报*, 2009, 54: 1673–1680
- 5 Meunier B. Catalytic degradation of chlorinated phenols. *Science*, 2002, 296: 270–271
- 6 Gupta S S, Stadler M, Collins T J, et al. Rapid total destruction of chlorophenols by activated hydrogen peroxide. *Science*, 2002, 296: 326–328
- 7 Sorokin A, Seris J L, Meunier B. Efficient oxidative dechlorination and aromatic ring-cleavage of chlorinated phenols catalyzed by iron sulfophthalocyanine. *Science*, 1995, 268: 1163–1166
- 8 Zhao Y L, Qin F, Boyd J M, et al. Characterization and determination of chloro- and bromo-benzoquinones as new chlorination disinfection byproducts in drinking water. *Anal Chem*, 2010, 82: 4599–4605
- 9 Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2007
- 10 Zhu B Z, Zhao H T, Kalyanaraman B, et al. Mechanism of metal-independent decomposition of organic hydroperoxides and formation of alkoxyl radicals by halogenated quinones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3698–3702
- 11 Zhu B Z, Kalyanaraman B, Jiang G B. Molecular Mechanism of metal-independent production of hydroxyl radicals by hydrogen peroxide and halogenated quinones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17575–17578
- 12 Zhu B Z, Zhao H T, Kalyanaraman B, et al. Metal-independent production of hydroxyl radicals by halogenated quinones and hydrogen peroxide: An ESR spin trapping study. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32: 465–473
- 13 Zhu B Z, Kitrossky N, Chevion M. Evidence for production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide: A metal-independent organic Fenton reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270: 942–946
- 14 Zhu B Z, Shan G Q, Kalyanaraman B, et al. Metal-independent decomposition of hydroperoxides by halogenated quinones: Detection and identification of a quinone ketoxy radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 11466–11471
- 15 Zipse H. Radical stability—A theoretical perspective. In: Gansaeuer A, ed. *Topics in Current Chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2006. 163–189
- 16 Laude D A. *Electrospray Ionization/Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1997. 291–320
- 17 Cui L, Isbell M A, Chawengsub Y, et al. Structural characterization of monohydroxyeicosatetraenoic acids and dihydroxy- and trihydroxyeicosatrienoic acids by ESI-FTICR. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 569–585
- 18 Zhao H T, Joseph J, Zhang H, et al. Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: A relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathyl radicals. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31: 599–606
- 19 Li A S, Chignell C F J. The NoH value in EPR spin trapping: A new parameter for the identification of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide spin adducts. *Biochem Biophys Method*, 1991, 22: 83–87

- 20 Janzen E D, Li J I P. Radical addition reactions of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. ESR spin trapping with a cyclic nitron. *J Mag Reson*, 1973, 9: 510–512
- 21 Iwahashi H, Parker C E, Mason R P, et al. Combined liquid chromatography/electron paramagnetic resonance spectrometry/electrospray ionization mass spectrometry for radical identification. *Anal Chem*, 1992, 64: 2244–2252
- 22 Guo Q, Qian S Y, Mason R P. Separation and identification of DMPO adducts of oxygen-centered radicals formed from organic hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14: 862–871
- 23 Maurel V, Ravanat J L, Gambarelli S. Detection of reactive free radicals derived from nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry of DMPO spin trapping adducts. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 2235–2242
- 24 Domingues M R, Domingues P, Reis A, et al. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14: 406–416
- 25 van Ommen B, Adang A E, Brader L, et al. The microsomal metabolism of hexachlorobenzene origin of the covalent binding to protein. *Biochem Pharmacol*, 1986, 35: 3233–3238
- 26 Haugland R A, Schlemm D J, Lyons R P, et al. Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1357–1362
- 27 Chignell C F, Han S K, Mouithys-Mickalad A, et al. EPR studies of *in vivo* radical production by 3,3',5,5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA) in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230: 17–22
- 28 Sarr D H, Kazunga C, Charles M J, et al. Decomposition of tetrachloro-1,4-benzoquinone (*P*-chloranil) in aqueous solution. *Environ Sci Technol*, 1995, 29: 2735–2740

Detection and identification of a novel carbon-centered quinone ketoxy radical

ZHU BenZhan, XIA HaiYing, QIN Hao, SHAN GuoQiang, HUANG ChunHua, REN FuRong, SHAO Jie & QU Na

State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Eco-toxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

We have shown recently that halogenated quinones could enhance the decomposition of hydroperoxides and formation of alkoxyl/hydroxyl radicals through a metal-independent nucleophilic substitution coupled with hemolytic decomposition mechanism. However, neither the proposed quinone enoxy radical intermediate, nor the major reaction products were unambiguously identified. In the present study, one of the major reaction products between 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ) and *t*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) was isolated and purified by semipreparative HPLC, and identified as 2-hydroxy-3-*t*-butoxy-5-chloro-1,4-benzoquinone [CBQ(OH)-O-*t*-Bu], which is the rearranged isomer of the postulated quinone-peroxide reaction intermediate. The formation of CBQ(OH)-O-*t*-Bu was found to be inhibited by the spin trapping agent 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO), and concurrently, a new DMPO adduct with 1-chlorine isotope peak clusters at m/z 268 was observed. Further ESR spin trapping, ^1H NMR and HPLC/Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass spectrometric studies with O-17-labeled and unlabeled H_2O_2 strongly suggest that the radical trapped by DMPO is a carbon-centered quinone ketoxy radical, which is the spin isomer of the proposed oxygen-centered quinone enoxy radical. This study represents the first detection and identification of an unusual carbon-centered quinone ketoxy radical, which provides direct experimental evidence to further support and expand our previously proposed mechanism for metal-independent decomposition of hydroperoxides by halogenated quinones.

carbon-centered quinone ketoxy radical, spin isomerization, keto-enol tautomerization

doi: 10.1360/972012-517