

. 概述

自旋捕捉技术是当今检测和鉴别不稳定自由基的最可靠的手段之一。顺磁共振波谱 (ESR) 捕捉剂能够成功的检测体内或体外生成的超氧自由基和羟自由基等。

BMPO是同仁化学研究所 (DOJINDO) 自主开发生产的新型高效、高稳定型自由基捕捉剂。它在捕捉自由基能力上优于PBN、DMPO等一般捕获剂,与自由基的结合能力更强,半衰期 ($t_{1/2}=23$ min) 更长,ESR谱图能够明显的区别不同的自由基结构如:GS和·OH。BMPO检测结果可靠性高、重复性强。由于具有高水溶性的特点,更利于水相体系自由基的研究,尤其是生物体系的自由基研究。

. 常规参数

名称: 5-tert-Butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide

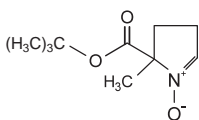
性状: 白色粉末

纯度: 99.0%

分子量: 199.25, $C_{10}H_{17}NO_3$

保存条件: -20 , 注意防潮

运输要求: 室温



. 操作步骤

常规检测步骤 (*本数据仅供参考,具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

检测芬顿 (Fenton) 反应所产生的羟自由基:

1. 将1.5 mg的BMPO溶解于5 ml的超纯水。
2. 取15 μ l的BMPO溶液, 75 μ l的1 mM的 H_2O_2 和75 μ l的100 μ M的 $FeSO_4$ 加入到50 μ l的超纯水中。
3. 放置一段时间 (例如1 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
4. 通过峰值计算相对强度。

检测黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶体系 (XO) 所产生的超氧自由基:

1. 溶液A: 将1 mg的BMPO溶解于1 ml的浓度为50 mM的PBS溶液 (pH 7.4)。
2. 溶液B: 用50 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 配制含有1 mM DTPA和0.4 mM黄嘌呤的混合溶液。
3. 溶液C: 用50 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 配制含有0.1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 取15 μ l溶液A, 135 μ l溶液B和10 μ l溶液C混合。
5. 放置一段时间 (例如8 min) 将溶液转入ESR样品管中检测。
6. 通过峰值计算相对强度。

. 实验例

(*本数据仅供参考,具体参数可能因仪器厂家的不同而适当调整)

*本数据均由Bruker公司ESR仪器检测得出,由于BMPO的分子结构在平面上下差异较大,使得图中BMPO/·OH的两种异构体的超精细结构常数较大能够被ESR分辨出来。本实验中BMPO/·OH的两种立体异构体与BMPO/·OOH的构成相似,两种BMPO结合物的适宜条件为:

构象异构体 (conformer) :

$a_N=13.47$ G, $a_H^\beta=15.31$ G, $a_H^{71}=0.62$ G

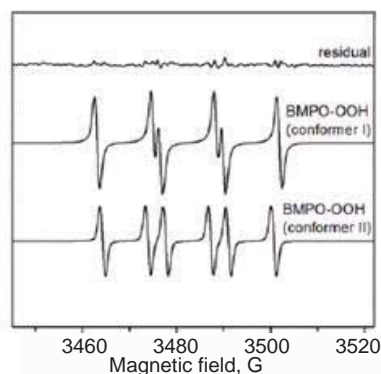
构象异构体 (conformer) :

$a_N=13.56$ G, $a_H^\beta=12.3$ G, $a_H^{71}=0.66$ G

超氧化物检测操作流程

1. 用100 mM的PBS溶液 (pH 7.4) 制备浓度为25 μ M的DTPA, 作为过渡金属螯合剂。
2. 用100 mM PBS (pH 7.4)配制1 mM次黄嘌呤溶液。
3. 配制1 U/ml的黄嘌呤氧化酶溶液。
4. 将10 mg的BMPO溶于200 μ l的PBS溶液中。(终浓度约为250 mM)。
5. 向EP管中加入70 μ l缓冲液。
6. 继续添加20 μ l浓度为250 mM的BMPO和100 μ l步骤2中准备的1 mM的次黄嘌呤溶液。
7. 加入10 μ l黄嘌呤氧化酶触发反应, 将EP管漩涡震荡后转移到扁平池。
8. 上样并调整参数, 获得图谱。

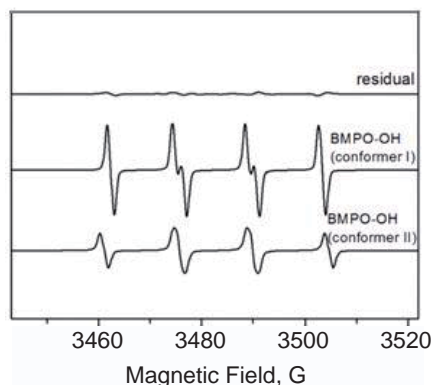
溶液终浓度为: 25 mM BMPO, 0.5 mM次黄嘌呤和0.05 U/ml的黄嘌呤氧化酶。



羟自由基操作流程

1. 分别准备1 mM的 $FeSO_4$, 10 mM的 H_2O_2 和250 mM的BMPO水溶液。
2. 向EP管中加入140 μ l的超纯水。
3. 继续加入20 μ l浓度为250 mM的BMPO和20 μ l浓度为1 mM的 $FeSO_4$ 。
4. 加入20 μ l浓度为10 mM的 H_2O_2 , 触发反应。
5. 混合并迅速转移至扁平池中。
6. 上样并调整参数, 获得图谱。

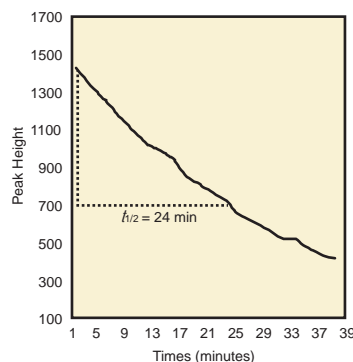
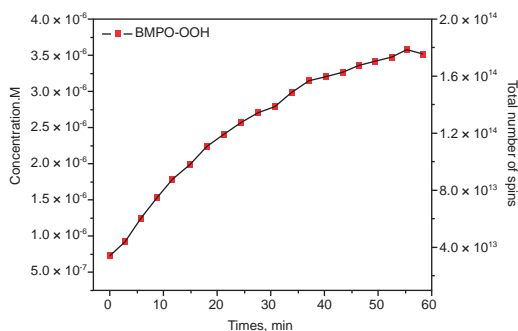
溶液终浓度为: 25 mM BMPO, 0.1 mM $FeSO_4$ 和1 mM H_2O_2



*建议实验人员做背景图片，以在ESR图谱中排除自选杂质的干扰。

V. 相关参考数据

超氧化物信号强弱随时间的变化曲线和半衰期时间



*BMPO检测超氧阴离子 $O_2^{\cdot -}$ 的半衰期 (pH=7.4) 更长。因此更适合长时间观察样品的实验。(如检测生物酶反应)

. 参考文献

1. Yuxian Wang, *et al.*, Tailored synthesis of active reduced graphene oxides from waste graphite: Structural defects and pollutant-dependent reactive radicals in aqueous organics decontamination, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2018**, 229, 71-80
2. Ke Xu, *et al.*, Quinone group enhances the degradation of levofloxacin by aqueous permanganate: Kinetics and mechanism, *Water Research*, **2018**, 143, 109–116
3. Shengjiang Yang, *et al.*, MOF-templated synthesis of $CoFe_2O_4$ nanocrystals and its coupling with peroxymonosulfate for degradation of bisphenol A, *Chemical Engineering Journal*, **2018**, 353, 329-339
4. Yanbin Wang, *et al.*, Peroxymonosulfate enhanced visible light photocatalytic degradation bisphenol A by single-atom dispersed Ag mesoporous g- C_3N_4 hybrid, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2017**, 211, 79-88
5. Huixin Shao, *et al.*, Synergetic Activation of Peroxymonosulfate by Co_3O_4 Modified g- C_3N_4 for Enhanced Degradation of Diclofenac Sodium under Visible Light Irradiation, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2017**, 218, 810-818
6. Ke Xu, *et al.*, Impact of humic acid on the degradation of levofloxacin by aqueous permanganate: Kinetics and mechanism, *Water Research*, **2017**, 123, 67-74