

# 富勒烯乙二胺的抗辐射损伤性能

林 涛, 钟志京, 李群岭, 辉永庆

中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900

**摘要:**合成了一种水溶性富勒烯衍生物——富勒烯乙二胺, 分别采用<sup>60</sup>Co 源和中子加速器等辐照装置, 并结合红外光谱(FTIR)、电子自旋共振技术(ESR)和电喷雾质谱(ESI-MS)等表征手段, 比较考察了富勒烯乙二胺与香兰素对受  $\gamma$  射线和中子等高能射线或粒子照射所产生自由基的清除性能。结果表明: 对于经  $\gamma$  射线和中子辐照产生的自由基, 所制得的富勒烯乙二胺均表现出了较好的抗辐射损伤特性; 相同条件下对样品辐照所产生的自由基的清除性能明显优于市购的香兰素。

**关键词:**富勒烯乙二胺; 抗辐射损伤; 自由基清除

**中图分类号:**X591 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-9950(2014)03-0169-06

**doi:**10.7538/hhx.2014.36.03.0169

## Anti-Radiation Damage Performance of Fullerene Ethylenediamine

LIN Tao, ZHONG Zhi-jing, LI Qun-ling, HUI Yong-qing

Institute of Nuclear Physics and Chemistry, Chinese Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China

**Abstract:** In this paper, a water-soluble fullerene derivatives has been synthesized. The products have been characterized by the FTIR, ESR and ESI-MS. The free radical elimination capabilities of the fullerene derivatives and vanilin have been investigated through  $\gamma$  and neutron irradiation. The results show the fullerene derivatives indicate better anti-radiation damage performance under the same conditions, and the free radical elimination capability of the fullerene derivatives is better than vanilin.

**Key words:** fullerene ethylenediamine; anti-radiation damage; free radical elimination

随着核电、辐射加工、工业探伤、射线安检、辐射勘探及放射治疗等核技术在国民经济各领域越来越广泛的应用, 其在造福人类的同时, 也给当今世界带来了核辐射危害方面的重大风险。为了预防和减轻核辐射事故对人体健康的危害, 积极研究辐射损伤防治手段、寻找有效辐射防护剂已成为一个需要迫切解决的问题。为此, 中草药因其药源广、毒性相对较轻而被人们用作辐射防护剂来研究, 香兰素是其中的典型代表物之一。研究

发现<sup>[1-4]</sup>, 香兰素能防止食物变质, 能抗镰刀型贫血, 且对动物基因具有保护作用, 对细菌、哺乳动物细胞及动物全身实验均表现出了对基因突变的抑制作用。文献[5-6]研究发现, 香兰素及其衍生物具有较强的清除体内自由基的能力是其可用作辐射防护剂的关键。Sasaki<sup>[1]</sup>还发现其能抑制 X 射线照射所诱导的 DNA 单链断裂、染色体断裂核交联; Tamai<sup>[7]</sup>、Liu<sup>[8]</sup>则均曾发现其具有促进 DNA 断链复合从而降低染色体的畸变率, 还能增

强 DNA 修复和复制功能。尽管如此, 但将香兰素用于所需的作用浓度相对较高, 而防护作用依然偏低。因此, 研制并筛选其中具有更好防护效果的制剂, 成为了国内外相关学者关注的热点。近年来, 人们大多尝试从中草药中寻找解决方案, 虽已取得一定进展, 但仍然存在技术难度高且防护效果有限等问题。研究表明, 富勒烯及其衍生物具备很强的清除自由基的能力, 是目前国内外相关研究的热点之一。

富勒烯独特的结构赋予它许多特殊的物理、化学性质。如富勒烯通过光诱导产生单重态氧高达 100%, 被喻为“单重态的发生器”; 富勒烯极易与游离基反应, 被喻为“吸收游离基的海绵<sup>[9]</sup>”; 富勒烯的体积与 HIV 病毒活性中心的孔穴大小相匹配, 又可能堵住洞口, 切断病毒的营养供给; 富勒烯有 30 个双键, 可以发生多种化学反应, 是药物设计的理想基体, 可以根据需要接上多种基团, 人们把富勒烯喻为药物设计中的“化学针插”。富勒烯的这些特性引起了生物化学家、药物学家的浓厚兴趣, 并已在富勒烯及其衍生物的生物活性方面取得了一些令人振奋的结果。但是, 富勒烯固有的疏水性和生物毒性, 使它们在生物化学领域的研究和应用受到限制, 因此, 制备水溶性及低生物毒性的富勒烯衍生物具有重要的意义。

距今为止, 国内外有关水溶性富勒烯衍生物辐射生物学效应的研究还十分有限, 且仅限于对  $\gamma$  射线的辐射防护性能研究, 对  $\alpha$  射线以及中子/ $\gamma$  射线复合的辐射防护性能则未见有关报道。有研究表明, 富勒醇可用于生物体系的自由基清除以减少有病血液中的自由基的浓度和抑制不正常或有病细胞生长, 当溶液中富勒醇的质量浓度为 50 mg/L 时, 对  $O_2^-$  基的清除率可达到 80%, 显示  $C_{60}(OH)_n$  对水溶液中的氧自由基有很强的清除作用<sup>[9]</sup>。Sameh<sup>[10]</sup> 则合成含有三个丙二酸的富勒烯衍生物, 该类物质具有类似于超氧化物歧化酶(SOD)的性质, 能够清除生物体中由于细胞代谢产生的副产物超氧自由基, 其速率常数  $K_{cs}$  为  $2 \times 10^6 / (\text{mol} \cdot \text{s})$ 。

综上所述, 目前国内外已有的辐射防护剂还不理想, 主要问题是防护效果低、毒副作用较大。本工作拟采用在富勒烯碳笼上添加  $-C_2H_4(NH_2)_2$  等水溶性基团, 制备富勒烯乙二胺富勒烯衍生物, 以增加富勒烯的水溶性。且以水溶性富勒烯乙二胺为对象并采购香兰素作为对比的自由基清除

剂, 考察其在  $\gamma$  射线、中子照射下的抗辐射损伤性能, 研究结果将为水溶性富勒烯衍生物在辐射防护剂方面的应用提供参考。

## 1 实验部分

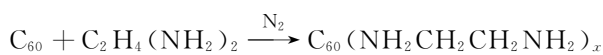
### 1.1 试剂及仪器

富勒烯( $C_{60}$ ), 河南濮阳永新科技有限公司, 纯度大于 99%;  $C_6H_{11}NO$  (DMPO), 美国 Sigma 公司, 纯度大于 97%; 胸苷酸( $C_{10}H_{13}N_2Na_2O_8P \cdot xH_2O$ ), 美国 Sigma 公司, 纯度大于 99%; 4-羟-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶(HTMP), 南通惠康国际有限公司, 纯度大于 99%; 其余试剂均为色谱纯。

电子天平, 感量 0.1 mg, 普利赛斯(上海)有限公司; Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; 三重四极杆液相色谱串联质谱仪, Thermo Scientific 公司; E500 电子顺磁共振波谱仪(ESP300), 德国 Bluker 公司。

### 1.2 富勒烯乙二胺的制备

富勒烯和二胺化合物的加成反应已有一些报道, Wudl<sup>[11]</sup> 首次制备出  $C_{60}$  和二胺的衍生物, 陈远荫等<sup>[12]</sup> 用  $C_{60}$  和甲苯、乙二胺反应, 减压分离、离心得到富勒烯乙二胺衍生物。本工作采用的制备方法反应机理如下:



称取 100 mg  $C_{60}$  加入到 125 mL 锥形瓶, 再加入一定体积乙二胺, 在氮气保护下室温搅拌反应相当时间。此时锥形瓶底部无黑色  $C_{60}$ , 将反应后的溶液平均移入离心管, 加入甲醇至近满, 离心, 倒出上层溶液, 加入 3 mL 超纯水溶解粗产物, 再加入甲醇至近满, 离心, 重复 3 次。将产物放到通风橱挥发有机物 4 h 后, 放入干燥器。干燥后产物为亮褐色固体, 称量产物为 110.6 mg。

### 1.3 傅立叶红外光谱测试(FTIR)

取少量样品与适量 KBr 混合, 充分研磨后压片。利用红外光谱仪分析其化学基团峰。

### 1.4 电喷雾质谱测试(ESI-MS)

取少量样品溶解于水中, 制成样品溶液, 进样测试。

### 1.5 辐照实验

将自旋捕集剂 DMPO 用重蒸馏水溶解后制成 40 mmol/L 水溶液, 然后将乙醇或者 HTMP (自由基产生剂) 与不同浓度的富勒烯乙二胺溶液充分混合, 配置成不同的辐照样品种。样品配置完

成后通入氮气,1 h后封管。

$\gamma$  辐照实验在中国工程物理研究院核物理与化学研究所  $1.81 \times 10^{16}$  Bq  $^{60}\text{Co}$  源大型辐照场中进行。中子辐照实验则在中国工程物理研究院核物理与化学研究所 k-400 加速器上进行, k-400 加速器通过氚靶激发产生 14 MeV 的中子, 中子注量约为  $2.57 \times 10^{10}/\text{s}$ 。

辐照实验的样品分为空白对照样品和自由基清除剂样品。空白对照样品是含一定浓度的自由基产生剂和自旋捕集剂的混合溶液, 是产生自由基量的基准; 自由基清除剂样品是把不同浓度的富勒烯乙二胺添加到含一定浓度自由基产生剂和自旋捕集剂溶液中, 形成混合溶液。

以 DMPO 作为自旋捕集剂, 采用电子自旋共振技术(ESR) 研究自由基产生剂受中子/ $\gamma$  射线照射产生的自由基, 自旋捕集 ESR 信号会有典型的特征性谱线, 可以证实存在自由基。

以 ESR 波谱的第二个峰高表示自由基信号的强度, 用式(1)计算清除效率:

$$\text{清除效率} =$$

$$\frac{\text{空白对照样品峰强} - \text{自由基清除剂样品峰强}}{\text{空白对照样品峰强}} \times 100\% \quad (1)$$

ESR 测试参数: 调频 100 kHz, 调幅 0.3 T, 中心场 350 T, 磁场频率 9.854 GHz, 扫描宽度 20 T, 微波功率 2 mW, 接收器衰减 20 dB, 时间常数 5.12 ms, 扫描时间 20.03 s。

## 2 结果与讨论

### 2.1 傅立叶红外光谱表征

图 1 为富勒烯乙二胺的红外光谱图。图中  $3276.64 \text{ cm}^{-1}$  归属于  $\text{NH}_2$  的振动峰,  $2862.49 \text{ cm}^{-1}$

归属于  $-\text{CH}_2$  的对称振动峰,  $1573.06 \text{ cm}^{-1}$  归属于  $-\text{NH}_2$  的振动峰。  $1322.04 \text{ cm}^{-1}$  和  $1232.71 \text{ cm}^{-1}$  归属于 C—N 的振动峰, 这应该是乙二胺连接在富勒烯上使 C—N 发生了偏移。这些都表明乙二胺已连接在富勒烯上。

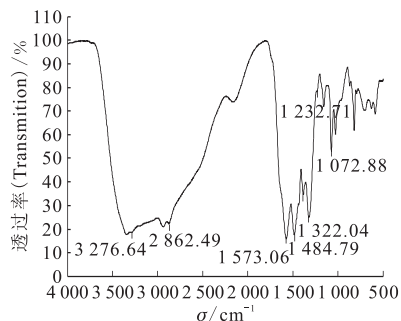


图 1 红外吸收光谱

Fig. 1 FTIR spectrum

### 2.2 电喷雾质谱表征

从富勒烯乙二胺的 ESI-MS 扫描总离子流图(图 2(a))中, 选取丰度最高的一段得到相应的质荷比图(图 2(b))。已发现富勒烯和胺在惰性气氛下反应, 得到多胺基加合物<sup>[11,13]</sup>, 在空气中反应, 则在加合胺的同时也加合了氧, 得到  $\text{C}_{60}\text{O}_n\text{X}_m$  (X 为胺)。富勒烯乙二胺衍生物可以表示为  $\text{C}_{60}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_x$ ,  $x$  取整数。

由图 2(b)可以看出, 富勒烯乙二胺衍生物的质谱图较为复杂, 这是由于质谱仪在运行过程中由于溶剂的组成和各种添加剂不同以及样品的杂质等复杂原因, 都可能导致电喷雾质谱的谱图复杂化, 常常共存多种加合物离子。常见的加合物离子有阳离子复合物  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{K}]^+$  等, 溶剂簇离子  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ 、

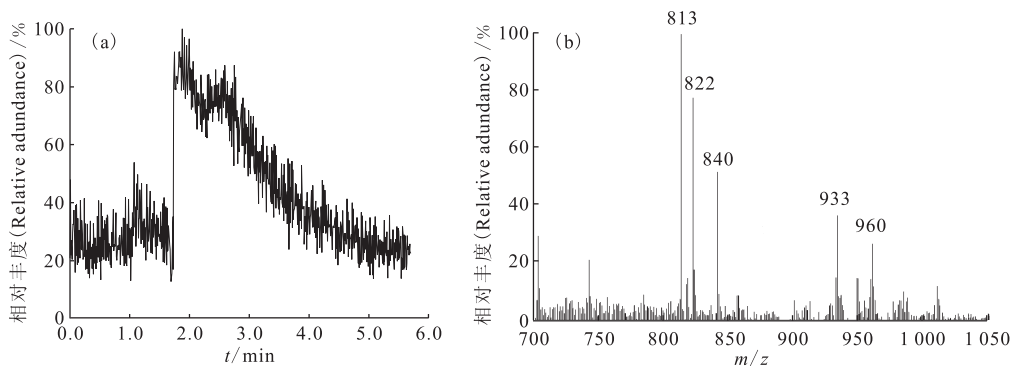


图 2 ESI-MS 总离子流图(a)和质谱图(b)

Fig. 2 ESI-MS total ion current(a) and mass spectrum(b)

$[M+CH_3OH+H]^+$ 、 $[M+CH_3CN+H]^+$  等<sup>[14]</sup> (M 表示  $C_{60}$  衍生物)。对合成的  $C_{60}$  乙二胺衍生物结构式的分析列于表 1。如表 1 所示,可以得出  $C_{60}$  与乙二胺的加成产物主要有  $C_{60}NH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_2$ 、 $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_3$  和  $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_4$ 。

表 1  $C_{60}$  与乙二胺加成产物的电喷雾质谱分析结果  
Table 1 Results of ESI-MS

$m/z$	相对丰度 (Relative abundance)/%	$x$	加合物离子 (Additive ion)
813	100	1	$[M+CH_3OH+H]^+$
822	77.8	1	$[M+CH_3CN+H]^+$
840	51.7	2	-
933	36.7	3	$[M+CH_3OH+H]^+$
960	26.7	4	-

### 2.3 富勒烯乙二胺的辐射效应研究

(1) 富勒烯乙二胺对  $\gamma$  射线辐照所产生的自由基清除性能研究

通过分析研究和探索性实验发现,乙醇-水溶液体系对  $\gamma$  射线辐照敏感,易生成  $\alpha$ -羟乙基自由基,因此配制了乙醇-水溶液以考察富勒烯乙二胺对  $\gamma$  射线辐照所产生的  $\alpha$ -羟乙基自由基的清除性能,乙醇-水溶液的浓度为 0.2 mol/L。

在剂量率为 145 Gy/min,  $^{60}Co$  源  $\gamma$  射线辐照时间为 10 min,测得不同浓度的富勒烯乙醇胺中自旋捕获剂 DMPO 捕获  $\alpha$ -羟乙基自由基的 ESR 测试谱图及清除率变化曲线示于图 3。由图 3 可以看出,随着富勒烯乙二胺浓度的增加,自旋捕获剂 DMPO 捕获  $\alpha$ -羟乙基自由基的强度呈现减小的趋势,相对应的富勒烯乙二胺对  $\alpha$ -羟乙基自由基的清除率呈现增大的趋势。富勒烯乙二胺质量

浓度为 0.30 g/L 时,  $\alpha$ -羟乙基自由基的清除率达到最大,为 77.3%。

(2) 富勒烯乙二胺对中子辐照所产生的自由基清除性能研究

由于 4-羟-2,2,6,6-四甲基哌啶 (HTMP) 水溶液经一定剂量中子辐照可有效量化生成 4-羟-2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧自由基 (HTMPO),因此在通过查阅大量文献以及前期探索性试验基础上,优选了 HTMP 作为 HTMPO 的前驱体,以考察富勒烯乙二胺对中子辐照所产生的哌啶类氮氧自由基的清除性能。

在剂量率为 12 Gy/h、14 MeV 中子辐照时间为 6 h,测得不同浓度的富勒烯乙二胺中自旋捕获剂 DMPO 捕获氮氧自由基的 ESR 谱图及清除率变化曲线示于图 4。由图 4 可以看出,随着富勒烯乙二胺浓度的增加,自旋捕获剂 DMPO 捕获氮氧自由基的强度呈现增大的趋势,相对应的富勒烯乙二胺对氮氧自由基的清除率呈现减小的趋势。富勒烯乙二胺质量浓度为 0.10 g/L 时,氮氧自由基的清除率达到最大,为 62.8%。这应与中子属于高 LET 射线有关,可能是由于高 LET 特性的中子具有更强的初级辐射电离效应而破坏了辐射防护剂的分子结构,使其对自由基的清除率呈现降低的趋势。

### 2.4 香兰素的辐射效应研究

(1) 香兰素对  $\gamma$  射线辐照所产生的自由基清除性能研究

在剂量率为 145 Gy/min、 $^{60}Co$  源  $\gamma$  射线辐照时间为 10 min,测得不同浓度的香兰素中自旋捕获剂 DMPO 捕获  $\alpha$ -羟乙基自由基的 ESR 测试谱图及清除率变化曲线示于图 5。由图 5 可以看出,随着香兰素浓度的增加,自旋捕获剂 DMPO 捕获  $\alpha$ -羟乙基自由基的强度呈现减小的趋势,相

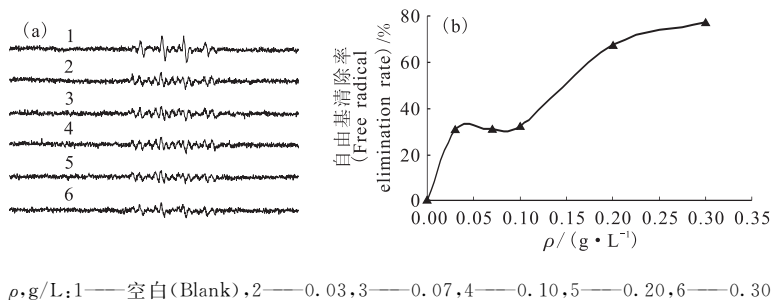


图 3 不同浓度富勒烯乙二胺对  $\gamma$  辐照产生的  $\alpha$ -羟乙基自由基的 ESR 谱图(a)和清除率变化曲线(b)

Fig. 3 ESR spectrum(a) and free radical elimination rate(b)

by  $\gamma$ -irradiation for different concentrations of fullerene ethylenediamine

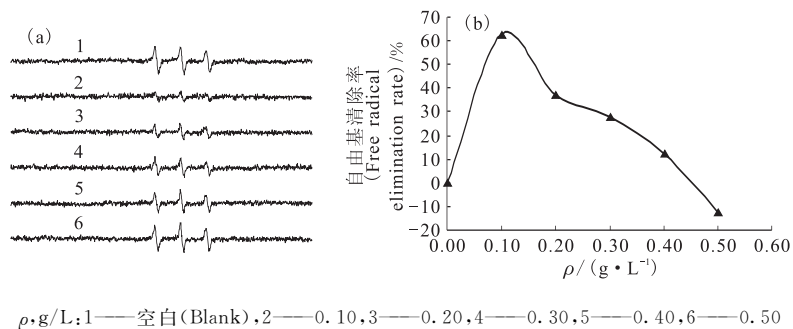


图 4 不同浓度富勒烯乙二胺对 中子辐照产生的氮氧自由基的 ESR 谱图(a)和清除率变化曲线(b)

Fig. 4 ESR spectrum(a) and free radical elimination rate(b)

by neutron irradiation for different concentrations of fullerene ethylenediamine

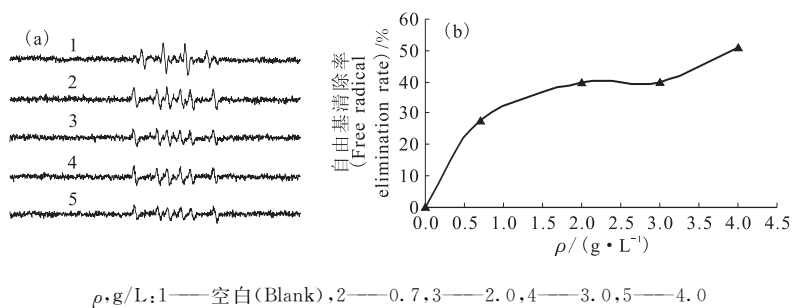


图 5 不同浓度香兰素对 γ 辐照产生的 α-羟乙基自由基的 ESR 谱图(a)及清除率变化曲线(b)

Fig. 5 ESR spectrum(a) and free radical elimination rate(b) by γ-irradiation for different concentrations of vanillin

对应的香兰素对 α-羟乙基自由基的清除率呈现增大的趋势。香兰素质量浓度为 4.0 g/L 时, α-羟乙基自由基的清除率达到最大,为 51.1%。

(2) 香兰素对 中子辐照所产生的自由基清除性能研究

在剂量率为 12 Gy/h、14 MeV 中子辐照时间为 6 h,测得不同浓度的香兰素中自旋捕获剂 DMPO 捕获氮氧自由基的 ESR 谱图及清除率变化曲线示于图 6。由图 6 可看出,随着香兰素浓度的增加,自旋捕获剂 DMPO 捕获氮氧自由基的强度呈现增大趋势,相对应的香兰素对氮氧自由基的清

除率呈现减小趋势。香兰素质量浓度为 0.2 g/L 时,氮氧自由基的清除率达到最大,为 16.7%。

### 2.5 富勒烯乙二胺与香兰素对自由基清除性能的比较

通过 2.3 与 2.4 节可以看出,以乙醇-水溶液体系制得的样品,在剂量率为 145 Gy/min、<sup>60</sup>Co 源 γ 射线辐照时间为 10 min,所得的富勒烯乙二胺对 α-羟乙基自由基的最高清除率为 77.3%,明显高于香兰素对 α-羟乙基自由基的最高清除率 51.1%,表明本工作自制的富勒烯乙二胺具有优良的清除 γ 辐照产生的 α-羟乙基自由基特性,可

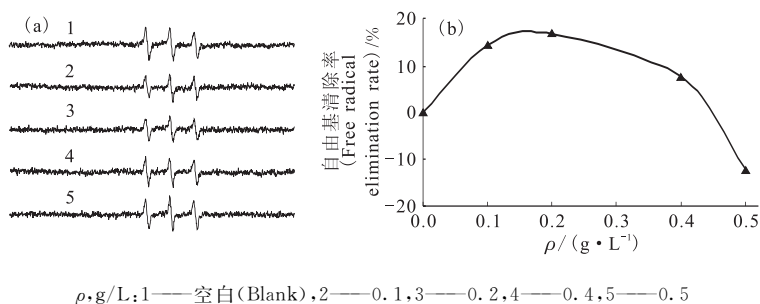


图 6 不同浓度香兰素对 中子辐照产生的氮氧自由基的 ESR 谱图(a)及清除率变化曲线(b)

Fig. 6 ESR spectrum(a) and free radical elimination rate(b)

by neutron irradiation for different concentrations of vanillin

作为辐射防护剂,其性能明显优于市售的香兰素,这应该与富勒烯对自由基良好的吸收性能有关,值得进一步深入研究。

以 HTMP 的水溶液体系制得的样品,在剂量率为 12 Gy/h、14 MeV 中子加速器辐照 6 h,所得的富勒烯乙二胺对氮氧自由基的最高清除率为 62.8%,明显高于香兰素对氮氧自由基的最高清除率 16.7%。表明本工作自制的富勒烯乙二胺水溶性富勒烯衍生物在中子辐照下对氮氧自由基的清除效果比市购的香兰素要好,可作为辐射防护剂,其性能明显优于市售的香兰素,这应该与富勒烯对自由基良好的吸收性能有关,值得进一步深入研究。

### 3 结 论

以富勒烯( $C_{60}$ )为原料,通过优化实验条件,合成了一种水溶性富勒烯衍生物——富勒烯乙二胺,并分别用 FTIR 和 ESI-MS 对其结构组成进行了表征。红外吸收光谱结果表明乙二胺已连接在  $C_{60}$  上,电喷雾质谱结果表明  $C_{60}$  与乙二胺的加成产物主要有  $C_{60}NH_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_2$ 、 $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_3$  和  $C_{60}(NH_2CH_2CH_2NH_2)_4$ 。对于经  $\gamma$  射线和中子辐照产生的自由基,所制得的富勒烯乙二胺均表现出了较好的抗辐射损伤特性,相同条件下对样品辐照所产生的自由基的清除性能明显优于市购的香兰素。

### 参考文献:

- [1] Sasaki Y F, Imanishi H, Watanabe M, et al. Suppressing effect of antimutagenic flavorings on chromosome aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells[J]. *Mutat Res*, 1990, 229(1): 1-10.
- [2] Keshava C, Keshava N, Ong T M, et al. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cells[J]. *Mutat Res*, 1998, 397(2): 149-159.
- [3] Shaughnessy D T, Setzer R W, DeMarini D M, et al. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites[J]. *Mutat Res*, 2001, 480-481(1): 55-69.
- [4] Kumar S S, Ghosh A, Devasagayam T P, et al. Effect of vanillin on methylene blue plus light-induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA[J]. *Mutat Res*, 2000, 469(2): 207-214.
- [5] Kumar S S, Priyadarsini K I, Sainis K B, et al. Inhibition of peroxy-nitrite-mediated reactions by vanillin[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(1): 139-145.
- [6] Kamat J P, Ghosh A, Devasagayam T P. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization[J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 209(1-2): 47-53.
- [7] Tamai K, Tezuka H, Kuroda Y, et al. Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes induced by EMS and  $H_2O_2$  in cultured Chinese hamster cells[J]. *Mutat Res*, 1992, 268(2): 231-237.
- [8] Liu J, Mori A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA[J]. *Neuropharmacology*, 1993, 32(7): 659-669.
- [9] McEwen C N, McKay R G, Larsen B S.  $C_{60}$  as a radical sponge[J]. *J Am Chem Soc*, 1992, 114(11): 4412-4414.
- [10] Ali S S, Hardt J I, Quick K L, et al. A biologically effective fullerene ( $C_{60}$ ) derivative with superoxide dismutase mimetic properties[J]. *Free Radical Biol Med*, 2004, 37(8): 1191-1202.
- [11] Wudl F, Hirsch A, Khemani K C, et al. In fullerenes[J]. *ACS Symposium Series*, 1992, 481: 161.
- [12] 陈远荫,方鹏飞,朱绫,等.  $C_{60}$  乙二胺衍生物铂配合物的合成及其催化硅氢化性能[J]. *高等化学学报*, 1998, 19(7): 1011-1015.
- [13] Seshadri R, Govindaraj A, Nagarajan R, et al. Addition of amines and halogens to fullerenes  $C_{60}$  and  $C_{70}$  [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33(15): 2069-2070.
- [14] Pramanik B N, Ganguly A K, Gross M L. 电喷雾质谱应用技术[M]. 蒋宏建,俞克佳,译. 北京:化学工业出版社,2005:26-31.