芳香氨基酸光敏化瞬态产物的光谱学及动力学表征*

宋钦华 徐业平 俞书勤 陈从香 马兴孝
(中国科学技术大学化学物理系, 合肥 230026)
王文锋 姚思德 林念芸
(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室, 上海 201800)

摘要 运用 KrF 激光闪光光解瞬态吸收光谱, 以丙酮为光敏剂, 研究了水溶液中芳香氨基酸的光化学反应. 通过动力学分析和猝灭实验, 鉴别了光化学反应过程中的瞬态产物, 获取了激发三重态的瞬态吸收光谱及动力学参数. 在丙酮存在下, 色氨酸(Trp) 和酪氨酸(Tyr) 的水溶液光解, 分别观察到 Trp 激发三重态 、N 中心色氨酸自由基(Trp/N$^{\bullet}$) 和酪氨酸的酚氧自由基(Tyr/O$^{\bullet}$), 阐述了二者是丙酮三重态与 Trp, Tyr 分别通过三重态-三重态(T-T) 激发能转移和电子转移生成; 苯丙氨酸(Phe) 不能与丙酮三重态进行激发能转移和电子转移. 进一步, 在色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr) 敏化光解过程中, 观察到分子内的电子转移, 即 Trp/N$^{\bullet}$-Tyr $\rightarrow$ Trp-Tyr/O$^{\bullet}$ 自由基的生成过程.

关键词 芳香氨基酸 激光闪光光解 激发三重态 自由基 电子转移

在自然界存在的氨基酸中, 可发光的仅有芳香氨基酸. 研究发现, 蛋白质大分子的发光由苯丙氨酸(Phe) 、酪氨酸(Tyr) 和色氨酸(Trp) 的发光性质所决定, 并受蛋白质及肽链结构的影响. 人们对蛋白质及芳香氨基酸的发光及通过发光对其能量转移过程(单 、三重态) 进行了大量研究[1]. 这些研究主要是利用发光作为研究蛋白质结构的探针. 然而, 有关芳香氨基酸及肽的基本光化学机理的工作却很少[2].

芳香氨基酸及肽的激发态化学正受到人们的关注, 其目标是对这些分子光电离和光解离原初过程的瞬态产物进行表征. 过去的研究[2, 3] 都是采取直接激发以期产生这些瞬态产物, 由于直接激发会同时发生多种过程(光激发 、光电离和光解离), 产物复杂, 光谱难以解析, 得到的动力学数据不够准确. 本工作运用 KrF(248 nm) 激光光解瞬态吸收光谱, 采取丙酮敏化的方法, 获得了芳香氨基酸激发三重态和自由基的瞬态吸收光谱及动力学参数. 进一步, 在二肽(Trp-Tyr) 的敏化光解过程中观察到肽分子内的电子转移.

1 材料与方法

DL-酪氨酸(Tyr) 、D-色氨酸(Trp) 、L-苯丙氨酸(Phe) 和色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr) 均为 Sigma

1998-12-21 收稿, 1999-05-25 收修改稿
* 中国博士后科学基金资助项目(批准号: 中博基[1998]6 号)

公司产品, 未经进一步纯化直接使用. 丙酮(Ac) 、磷酸钠盐和二氧化锰为分析纯, 丙酮经一次重蒸馏, 磷酸钠盐和二氧化锰经一次重结晶后使用. 实验样品中光敏剂与目标物浓度的配比是将两者的 248 nm 吸光度之比保持在 100 以上, 这样可以保证激光能量首先被光敏剂吸收. 所有溶液的配制及试剂纯化均用三重蒸馏水. 样品中均加入 pH= 7.2 的磷酸盐缓冲溶液, 在实验前根据实验目的用高纯氮和高纯氧(99.99%) 鼓泡 20 min.

激光光解实验装置采用国产 KrF 准分子激光器作为激励光源, 波长为 248 nm, 脉宽 20 ns, 每脉冲最高能量< 50 mJ, 信号由 HP54510B 300 MHz 瞬态记录仪记录, 并转化为数字信号送入 PC-486 个人计算机进行处理. 实验装置及数据处理详见文献[4].

2　结果与讨论

2.1　瞬态产物的鉴别

前文[1)] 研究了芳香氨基酸(以 HA 表示) 光电离过程的 pH 效应. 中性水溶液中, 芳香氨基酸在 248 nm 激光直接作用下会发生光电离, 在 400~ 600 nm 观察到水合电子的强吸收带(λ_{max}= 720 nm), 水合电子衰减之后呈现的是自由基的吸收光谱:

$$HA \xrightarrow{h\nu} A^{\bullet} + H^{+} + e^{-}_{aq} \qquad (1)$$

另外, 还存在直接解离生成的自由基.

采用敏化光解可避免直接激发而导致光电离和光解离, 使过程单一. 在本文的体系中, 激光能量首先被丙酮吸收, 生成丙酮激发三重态($^3Ac^*$):

$$Ac \xrightarrow{h\nu} {}^1Ac^* \xrightarrow{ISC} {}^3Ac^* \qquad (2)$$

图 1 是 Trp/Ac 水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱, 激光照射后 70 ns 观察到的是 $^3Ac^*$ 的吸收谱, 1 μs 时, 在 330 和 460 nm 分别有一强吸收峰. 在体系通入氧气后光解, 没有了 460 nm 的吸收峰. 因此, 可以认为它归属于色氨酸激发三重态($^3Trp^*$) 的吸收. 这与文献[5] 报道的一致. $^3Trp^*$ 是由 $^3Ac^*$ 诱导产生的, 显然, 它是通过三重态-三重态(T-T) 激发能转移生成:

$$^3Ac^* + Trp \rightarrow Ac + {}^3Trp^* \qquad (3)$$

激光作用后 10 μs, 460 nm 的吸收峰消失, 而在 330 及 530 nm 呈现出 2 个吸收峰, 它们在 20 μs 时依然存在(见图 1), 它与单电子氧化剂($Br_2^{\bullet -}$, $N_3^{\bullet}$ 等) 氧化 Trp 生成 N 中心色氨酸自由基(Trp/N$^{\bullet}$) 的瞬态吸收谱[6] 一致. 因此, 激光作用 Trp/Ac 体系生成了 Trp/N$^{\bullet}$.

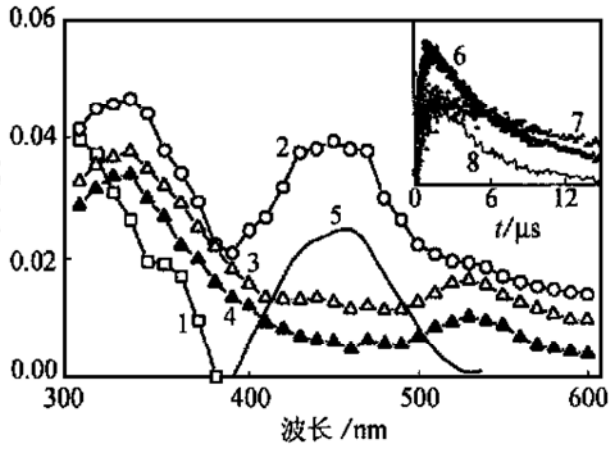


图 1　Trp/Ac 水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱

2×10^{-4} mol·L^{-1} Trp 与 0.2 mol·L^{-1} Ac 氮气饱和水溶液的激光光解瞬态吸收光谱: 1——70 ns, 2——1 μs, 3——10 μs, 4——20 μs, 5——减谱得到的 $^3Trp^*$ 在 1 μs 时的瞬态吸收谱. 插图: 吸收值随时间的变化: 6——460 nm, 7——530 nm, 8——曲线 6- 曲线 7

Rehm-Weller 方程可用于计算光诱导电子转移反应的自由能变化:

1) 宋钦华, 李全新, 孙海虹, 等. 芳香氨基酸光电离过程的 pH 效应, 自然科学进展(待发表)

$$\Delta G = 96.48(E_{ox} - E_{red} - e^2/\varepsilon l) - \Delta E_{0,0}, \quad (4)$$

式中 $e^2/\varepsilon l$ 项在水溶液中可以忽略[7], $\Delta E_{0,0}$为激发三重态能量, E_{ox}为被氧化物质的氧化电位, E_{red}为被还原物质的还原电位. 丙酮的 E_{red}为 − 2.305 V(SCE), $\Delta E_{0,0}$为 337 kJ/mol[8]. 代入芳香氨基酸及某些肽的 E_{ox}, 对其与$^3Ac^*$ 电子转移反应的自由能变化(ΔG)进行计算, 结果列于表 1. 表 1 中 ΔG 值表明, 除苯丙氨酸不能进行自发的电子转移反应外, 色氨酸和酪氨酸及相关的肽都可自发地进行电子转移反应. 有理由认为, $^3Ac^*$ 与 Trp 通过电子转移反应生成了 Trp/$N^\bullet$:

$$Trp + {}^3Ac^* \rightarrow {}^3(Trp/NH\text{-}Ac)^* \rightarrow Trp/NH^{\bullet+} \text{-} {}^{\bullet-}Ac \rightarrow Trp/N^\bullet + AcH^\bullet \quad (5)$$

表 1 芳香氨基酸及肽与丙酮三重态发生电子转移反应的自由能变化

芳香氨基酸及肽	E_{ox}/ V(SCE)[9]	ΔG/ kJ•mol^{-1}
Trp	0.81	− 36.5
Trp-Gly	0.79	− 38.4
Gly-Trp	0.75	− 42.3
Gly-Trp-Gly	0.73	− 44.2
Tyr	0.70	− 47.1
Tyr-Gly	0.67	− 50.0
Ala-Tyr-Ala	0.64	− 52.9
Phe	1.44	24.3

Trp/$NH^{\bullet+}$ 脱质子和 $Ac^{\bullet-}$ 结合质子的 pK_a 分别为 5.1[9]和− 2[8], 所以在中性条件下, Trp/$NH^{\bullet+}$ 脱质子与 $Ac^{\bullet-}$ 结合质子将迅速协同完成.

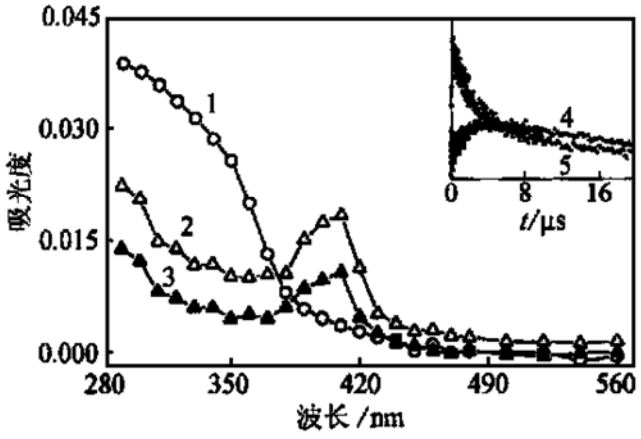


图 2 Tyr/Ac 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱
4×10^{-4} mol•L^{-1} Tyr 与 0.2 mol•L^{-1} Ac 氮气饱和水溶液的激光光解瞬态吸收光谱: 1——1 μs, 2——8 μs, 3——20 μs. 插图: 吸收值随时间的变化: 4——410 nm, 5——310 nm

图 2 是 Tyr/Ac 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱. 激光照射后 1 μs, 在 290~ 400 nm 波段生成一瞬态吸收谱(接近 290 nm 吸收峰强). 由于$^3Ac^*$ 的瞬态吸收在 300~ 380 nm, 那么这一波段是否还有$^3Tyr^*$ 的吸收? 改变 Tyr/Ac 氮气饱和水溶液中 Tyr 的浓度光解, 测得 $k(= k_0 + k_s[Ac]$, $[Ac] = 0.2$ mol•L^{-1}) 与单纯 0.2 mol•L^{-1} Ac 氮气饱和水溶液光解测得的 k' 完全一致, 均为 2.3×10^5 s^{-1}. 这说明没有$^3Tyr^*$ 生成.

激光作用后 8 μs, 300~ 400 nm 波段吸收明显减弱, 在 410 nm 生成一新的吸收峰并达到最大吸收. 此时的吸收谱与单电子氧化 Tyr 生成酚氧自由基(Tyr/$O^\bullet$)的瞬态吸收谱一致[6]. 根据前面电子转移的自由能变化计算可以推测, Tyr/$O^\bullet$ 是 $^3Ac^*$ 与 Tyr 通过电子转移生成. 从 410 nm 的吸收变化曲线可得到生成速率常数为 4.06×10^5 s^{-1}.

图 3 是 Phe/Ac 无氧水溶液和 Ac 无氧水溶液的激光光解瞬态吸收光谱, 两者基本一致.

改变 Phe 的浓度, 对衰减速率常数几乎无影响, 说明$^3Ac^*$ 不能与 Phe 发生 T-T 激发能转移和电子转移. 后者与前面的计算结果一致.

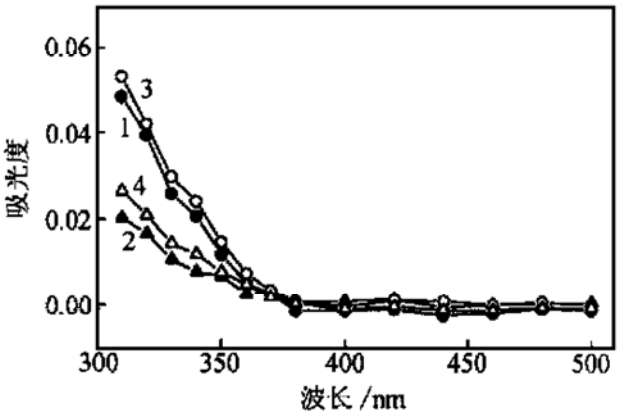


图 3　氮气饱和水溶液的激光光解瞬态吸收光谱
10^{-3} mol·L^{-1} Phe + 0.2 mol·L^{-1} Ac: 1——0.1 μs, 2——1 μs; 0.2 mol·L^{-1} Ac: 3——0.1 μs, 4——10 μs

2.2　Trp 激发三重态动力学参数的测定

由上面的分析可知, Trp/Ac 体系光解的瞬态吸收谱是个复合谱. 在不同的时间段内, 分别有$^3Ac^*$, $^3Trp^*$ 和/或 Trp/$N^\bullet$ 存在. 要研究$^3Trp^*$ 的猝灭动力学, 就必须排除$^3Ac^*$ 和 Trp/$N^\bullet$ 的影响. 从图 1 分析得到, 激光照射 1 μs 后, 530 nm 处的衰减服从二级动力学, 仅为 Trp/$N^\bullet$ 的贡献, 460 nm 附近的区域, 吸收是由$^3Trp^*$ 及 Trp/$N^\bullet$ 的吸收复合而成的. 20 μs 时, 460 nm 的吸收峰消失, 就仅剩下 Trp/$N^\bullet$ 了.

将激光照射 t μs 后, 将在波长 λ nm 的吸收值记为 A_t^λ, $^3Trp^*$ 和 Trp/$N^\bullet$ 的浓度分别记为 $[T]_t$ 和 $[N]_t$, 由 Lambert-Beer 定律得

$$A_t^{460} = [T]_t \cdot \varepsilon_T^{460} + [N]_t \cdot \varepsilon_N^{460}. \tag{6}$$

因为$^3Trp^*$ 在脉冲后 20 μs 时完全消失, 即 $[T]_{20} = 0$, 那么

$$A_{20}^{460} = [N]_{20} \cdot \varepsilon_N^{460}; \tag{7}$$

1 μs 后, 波长 530 nm 处仅是 Trp/$N^\bullet$ 的吸收衰减:

$$A_t^{530} = [N]_t \cdot \varepsilon_N^{530}; \tag{8}$$

20 μs 时, 从(7)和(8)式可得

$$A_{20}^{460}/A_{20}^{530} = \varepsilon_N^{460}/\varepsilon_N^{530} = C. \tag{9}$$

由(6)、(8)和(9)式得

$$\Delta A_t = A_t^{460} - A_t^{530} \cdot C = [T]_t \cdot \varepsilon_T^{460}, \tag{10}$$

这就是从 460 nm 中扣除了 Trp/$N^\bullet$ 的吸收, 仅$^3Trp^*$ 吸收随时间的变化关系. 图 1 插图曲线 6, 7 分别表示 460 和 530 nm 的吸收随时间的变化 A_t^{460}, A_t^{530}. 曲线 8 是由 A_t^{460} 减去 A_t^{530} 与 C 之积得到的, 它表示$^3Trp^*$ 的衰减, 其衰减规律很好地服从一级反应动力学. 由此得到$^3Trp^*$ 的表观衰减速率常数 $k_{obs} = 3.2 \times 10^5\ s^{-1}$.

芳香氨基酸激发三重态按准一级动力学衰减, 其表观速率常数可表示为

$$k_{obs} = k_0 + k_s[Trp] + k_q[Q]. \tag{11}$$

在不加三重态猝灭剂时($[Q] = 0$), 改变 Trp 的浓度($[Trp]$)可得到一系列 k_{obs}, 以 k_{obs} 对相应的 [Trp] 作图拟合得到一直线. 直线的斜率是$^3Trp^*$ 被其基态分子猝灭的自猝灭速率常数 $k_s = 3.7 \times 10^8\ L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, 直线的截距为$^3Trp^*$ 单分子衰减速率常数 $k_0 = 2.4 \times 10^5\ s^{-1}$. 对含有 2.5×10^{-4} mol·L^{-1} O_2(饱和空气的 O_2 含量)的溶液光解, 由(11)式得到 O_2 对$^3Trp^*$ 的猝灭速率常数 $k_q = 4.9 \times 10^9\ L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$.

比较图 1 中 1 μs 和 20 μs 的瞬态吸收光谱, 运用上述的减谱方法, 可以获得$^3Trp^*$ 在 1 μs 时的特征吸收光谱. 由上面分析可知, 图 1 中 1 μs 时 460 nm 附近的吸收是$^3Trp^*$ 和 Trp/$N^\bullet$ 两者

的贡献, 而 20 μs 后的 530 nm 吸收仅为 Trp/N$^{\bullet}$的贡献. 从 A_1^{λ} 中减去 $A_{20}^{\lambda} \times A_1^{530}/A_{20}^{530}$ 得到^{3}Trp* 在 1 μs 时的特征吸收谱, 见图 1.

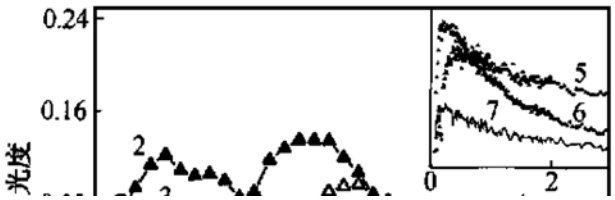


图 4 Trp_Tyr/Ac 无氧水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱

4×10^{-4} mol•L^{-1} Trp_Tyr 与 0.2 mol•L^{-1} Ac 氮气饱和水溶液的激光光解瞬态吸收光谱: 1——0.1 μs, 2——1 μs, 3——10 μs, 4——20 μs. 插图: 吸收值随时间的变化: 5——410 nm, 6——460 nm, 7——530 nm

2.3 肽分子内的电子转移

图 4 是 Trp-Tyr/Ac 无氧水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱. 激光作用后 0.1 μs 的瞬态吸收谱在 460 nm 有一吸收峰, 其衰减服从一级反应速征吸收峰, 随着时间的推移, 到 10 μs 仅剩下 410 nm 的吸收峰. 410 nm 是酚氧自由基的吸收峰, 所以体系在激光照射后 10 μs 生成了酚氧自由基.

从上述猝灭实验和动力学分析可以得到 Trp-Tyr/Ac 无氧水溶液体系光解过程:

$$^3\text{Ac}^* + \text{Trp-Tyr} \rightarrow \text{Ac} + {}^3\text{Trp}^*\text{-Tyr} \quad (12)$$

$$^3\text{Ac}^* + \text{Trp-Tyr} \rightarrow \text{AcH}^{\bullet} + \text{Trp/N}^{\bullet}\text{-Tyr/Trp-Tyr/O}^{\bullet} \quad (13)$$

$$\text{Trp/N}^{\bullet}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr/O}^{\bullet} \quad (14)$$

从上述分析可知, 410, 460 和 530 nm 3 个吸收峰分别归属于-Tyr/O$^{\bullet}$, ^{3}Trp* 和 Trp/N$^{\bullet}$-, 这 3 种瞬态产物的生成速率常数分别为 $k_{460}^f = (3.07 \pm 0.22) \times 10^9$ L•mol^{-1}•s^{-1}, $k_{530}^f = (2.50 \pm 0.46) \times 10^9$ L•mol^{-1}•s^{-1}, $k_{410}^f = (1.15 \pm 0.12) \times 10^9$ L•mol^{-1}•s^{-1}, 表观衰减速率常数为 $k_{460}^d = (5.73 \pm 0.11) \times 10^5$ s^{-1}, $k_{530}^d = (2.67 \pm 0.12) \times 10^5$ s^{-1}, $k_{410}^d = (6.91 \pm 0.13) \times 10^4$ s^{-1}. 460 nm 的峰生成和衰减最快, 410 nm 的峰最慢.

由 410, 460 和 530 nm 的峰的生成和衰减曲线(图 4 中插图)可以观察到上述过程. 460, 530 nm 先于 410 nm 达到最大吸收, 随后快速衰减; 而 410 nm 的生成和衰减都落后于 460 和 530 nm, 从这 3 个波长的吸收变化的时间上看, 3 μs 时已基本完成了(14)式的转变. 进一步, 改变激光强度测定 410 和 530 nm 的吸收随时间的变化, 得到 k_{410}^f 和 k_{530}^d 基本不变, 说明这一转变过程发生在分子内. 因此, Trp-Tyr/Ac 无氧水溶液体系在激光作用下, 发生了分子内的 Trp/N$^{\bullet}$-Tyr $\rightarrow$ Trp-Tyr/O$^{\bullet}$ 的电子转移.

运用单电子氧化诱导多肽分子内电子转移已有脉冲辐解的精彩研究报道[10,11], 但光敏化引发分子内电子转移还未见报道. 本工作是首次运用激光光解观察到光敏剂激发态引发肽分子内的电子转移过程.

参 考 文 献

1 Szabo A G, Ragner D M. Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. J Am Chem Soc, 1980, 102(2): 554~563

2 Bensasson R V, Land E J, Truscott T G. Proteins and Components, in Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine,

Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Oxford: Oxford University Press, 1993. 103~ 142

3 Nikogosyan D N, Gorner H. Photolysis of aromatic amino acids in aqueous solution by nanosecond 248 nm and 193 nm laser light. J Photochem Photobiol, B: Biol, 1992, 13: 219~ 234

4 Zuo Z H, Yao S D, Luo J, et al. Laser photolysis of cytosine, cytidine and dCMP in aqueous solution. J Photochem Photobiol, B: Biol, 1992, 15: 215~ 222

5 Bent D V, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. J Am Chem Soc, 1975, 97: 2 612~ 2 619

9 Deterippis M R, Murthy C P, Broitman F, et al. Electrochemical properties of tyrosine phenoxy and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino analogues. J Phys Chem, 1991, 95: 3 416~ 3 419

10 Bobrowski K, Holcman J, Polznanski J, et al. Pulse radiolysis studies of intramolecular electron transfer in model peptides and proteins. 5. $Trp^{\bullet} \rightarrow Tyr^{\bullet}$ radical transformation in H-Trp-(Pro)$_n$-Tyr-OH series of peptides. J Phys Chem, 1992, 96: 10 036~ 10 043

11 Isied S S, Ogawa M Y, Wishart J F. Peptide-mediated intramolecular electron transfer: long-range distance dependence. Chem Rev, 1992, 92: 381~ 394