

内容摘要

Y 361935

生物分子的光化学主要是涉及蛋白质与核酸及其组分的光化学，是研究光生物学的基础。生物分子对光的吸收在紫外光区，所以其光化学是研究紫外光对它们的作用。光化学感兴趣的氨基酸一是芳香氨基酸，一是含硫氨基酸。这两类氨基酸都是人体所必需的氨基酸，在人体代谢过程中起着重要作用。在芳香氨基酸生色团吸收紫外光引起的蛋白质光化学事件中，有些分子水平的变化会导致有害的生物效应：如引起细胞死亡，光致变异和光致癌等。作用方式有两种：即通过光敏剂敏化和直接作用。光化学对含硫氨基酸的研究兴趣主要在于对光作用引起的蛋白质中含硫氨酸的损伤和损伤的传递。氨基酸、肽、蛋白质及酶的光损伤除直接吸收 UV 辐射引起的损伤外，还通过光敏剂损伤。紫外光引起的生物分子的化学变化是光生物学的重要研究课题，其成果将为人们从分子水平上为生物合成和在遗传学提供理论根据。

本文主要结果如下：本文以不同结构芳香氨基酸、甲硫氨酸及其肽作为研究对象，运用激光光解瞬态吸收光谱方法研究它们的单电子氧化反应，光敏化反应和光电离过程，分析表征了三种过程中的瞬态产物。在三种反应体系中分别观察到肽分子内的电子转移；提出了单电子氧化反应，光敏化反应的反应机理并获得相应的动力学参数。

1. 芳香氨基酸被单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)和光电离过程中自由基的生成过程。pH 值对芳香氨基酸光电离过程的影响。二肽 (Trp-Tyr) 分子内的电子转移

含芳香氨基酸残基的简单肽和蛋白质模型中，研究分子内肽链电子转移一般采用脉冲辐解的研究方法。本文则运用激光闪光光解方法，研究了芳香氨基酸被单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)和光电离过程中的自由基的生成过程，分别在 Trp-Tyr 的单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)和光电离过程中，观察到由 $\text{Trp}/\text{N}^{\cdot-}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\cdot}$ 的自由基生成过程。pH 值对酪氨酸和色氨酸的光电离过程有显著影响，溶液 pH 增大，光电离倾向单光子过程，溶液 pH 减小倾向于双光子过程，而对苯丙氨酸几乎没有影响。进一步研究表明，酪氨酸、色氨酸光电离过程的 pH 效应分别源于酚羟基氢、吲哚环上 $>\text{NH}$ 的解离。

2. 采用丙酮敏化的方法, 对芳香氨基酸的激发三重态和自由基进行表征, 并获得相应的动力学参数, 在 Trp-Tyr/丙酮体系中, 首次直接观察到光敏剂激发三重态引发的 Trp/N^{*}-Tyr→Trp-Tyr/O^{*}分子内的电子转移

在丙酮存在下, 色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)的水溶液丙酮敏化光解, 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 Trp 激发三重态、N 中心色氨酸自由基(Trp/N^{*})和酪氨酸的酚氧自由基(Tyr/O^{*}); 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。含芳香氨基酸残基肽的丙酮敏化光解, 对于含色氨酸残基(trp)的肽, 丙酮三重态与 trp 分别进行 T-T 激发能转移和电子转移生成 trp 激发三重态和 N 中心自由基(trp/N^{*}); 而含酪氨酸残基的肽, 丙酮三重态仅与 tyr 进行电子转移生成 tyr 的酚氧自由基(tyr/O^{*})。尤其是 Trp-Tyr/Ac 光解体系, 首次直接观察到光敏剂激发三重态引发的 Trp/N^{*}-Tyr→Trp-Tyr/O^{*}分子内的电子转移。

3. 运用激光光解的方法, 在单电子氧化(SO₄^{•-})过程中, 首次在中性介质中直接观察到反应过程中生成了三种含硫三电子键自由基中间体

过去运用脉冲辐解研究 HO 自由基氧化含硫氨基酸提出的机理认为生成的[S[•]:S]⁺只能存在于强酸溶液中; 运用激光光解光敏化氧化含硫氨基酸也未能直接观察到反应过程中生成的含硫三电子键自由基中间体。本工作运用激光光解的方法, 研究 SO₄^{•-}单电子氧化 D-甲硫氨酸(Met)、L-甲硫氨酸甲酯(MME)、甲硫氨酰甲硫氨酸(Met-Met)、丙氨酰甲硫氨酸(Ala-Met)和 N-甲酰甲硫氨酰色氨酸(N-Formyl-Met-Trp)的反应过程。首次在中性介质中观察到反应过程中生成了三种含硫三电子键自由基中间体, [S[•]:S]⁺、[S[•]:N] 和 [S[•]:O], 测定了动力学常数, 分析了反应机理, 讨论了肽分子结构对三电子键形成的影响。

4. 首次获取了 4-硝基喹啉氧化物(4NQO)与含硫氨基酸及其衍生物和肽光敏化反应时, 4NQO 与甲硫氨酸残基发生电子转移的直接证据, 观察到 4-硝基喹啉氧化物(4NQO)与含硫氨基酸及其衍生物和肽光敏化反应时生成的α-烷基自由基

以 4-硝基喹啉氧化物(4NQO)为光敏剂, 研究了 4-硝基喹啉氧化物(4NQO)与甲硫氨酸、甲硫氨酸甲酯、含甲硫氨酸二肽(Met-Met, Ala-Met, Met-Lue 和 Met-Gly)和甲硫

氨酸三肽 (Met-Lue-Phe) 的光敏化反应。水溶液中的 4NQO 被 248nm 激光激发, 生成 4NQO 三重态, 4NQO 激发三重态被甲硫氨酸及其肽猝灭, 发生了电子转移反应, 在 290nm 和 450nm 观察 4NQO[•]H 和甲硫氨酸及其肽抽氢自由基- α -烷基自由基的生成。分析了反应机理, 并得到相应的速率常数。其中 α -烷基自由基是在光敏化反应过程中首次观察到的, 获得了甲硫氨酸及衍生物与 4NQO 光敏化反应中电子转移的直接证据。

- 5 运用可调波长激光光解方法研究芳香氨基酸的光电离过程, 首次通过激光光解方法获得了色氨酸, 酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位

常用于研究激光光解的激光波长是单一固定的, 给运用激光光解方法研究色氨酸, 酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位带来了一定的限制。本文在证实芳香氨基酸光电离为单光子过程之后, 通过改变激发光波长测定了色氨酸, 酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位。

关键词: 芳香氨基酸, 含硫氨基酸, 激光闪光光解, 光敏化反应, 激发三重态, 自由基, 电子转移, 反应机理

ABSTRACT

The photochemical processes of one-electron-oxidation, photosensitization and photoionization of aromatic amino acids, methionine and their dipeptides these biomolecules have been investigated in aqueous solution at room temperature using KrF (248nm) laser flash photolysis. The intermediate produced in three process were observed by transient absorption spectra, and kinetic data of these reaction were obtained. The electron transfer was observed in one-electron-oxidation($\text{SO}_4^{\bullet-}$), photoionization and photoionization of aromatic amino acids and methionine and their dipeptides respectively. The detail mechanisms of one-electron-oxidation and photosensitization mechanism of sulphur containing amino acids were proposed. The main results have been obtained as follow:

1. Studying the radicals formation process of aromatic amino acids in one electron oxidation($\text{SO}_4^{\bullet-}$) and photoionization, and intramolecular electron transfer. That the process of photoionization, of aromatic amino acid affected by pH value of solution was studied.

In model of aromatic amino acids and the simple peptides with aromatic amino acid, intramolecular electron transfer was studied almost with pulse radiolysis technique. In this research, it was studied, in laser induced one electron oxidation($\text{SO}_4^{\bullet-}$) and photoionization with laser photolysis respectively, The electron transfer in $\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\bullet}$ was all observed directly. The processes of photoionization of tyrosine, tryptophan are affected by pH value of solution, and phenylalanine no. Furthermore, the pH effects of photoionization of tyrosine, tryptophan resulting from the deprotonation of phenolic hydroxyl group, $>\text{NH}$ of indole ring respectively in alkaline solution have been demonstrated.

2. At first time, triplet acetone induced radical transformation: $\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\bullet}$ was observed directly.

In presence of acetone, formation of excited triplet states of tryptophan residues and

radicals (trp/N[•]), via a triplet-triplet (T-T) energy transfer and a electron transfer respectively, were observed in case of Trp-Phe, Trp-Gly and n-formyl-Met-Trp, while only phenolic hydroxy radical(tyr/O[•]), via a electron transfer, was observed in case of Phe-Tyr. Furthermore, triplet acetone induced radical transformation: Trp/N[•]-Tyr→Trp-Tyr/O[•] was observed directly, and the transformation resulting from intramolecular electron transfer was suggested.

3. With laser photolytical technique, in the process of one electron oxidation(SO₄^{•-}), three kinds of sulfur-containing radicals were observed directly in neutral aqueous solution.

The photoinduced oxidation reaction of D-methioine(Met), L-methioine-methyl ester and Met-Met Ala-Met n-formyl-Met-Trp dipeptides by SO₄^{•-} was investigated using 248nm laser photolysis of K₂S₂O₈ and absorption spectrum method. The presence of three electron-radical cation intermediates [S:•S]⁺, [S:•N]⁺ and [S:•O] were observed by transient absorption spectra. The kinetics of oxidative reaction has been investigated and kinetics constants of oxidative reaction determined. The results are compared to those of pulse radiolysis. A detail oxidation mechanism of sulphur containing amino acids was proposed. The structure of amino acid and peptide influence information of three electron bond was suggested.

4. In photochemical reaction of 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO) with methioine(Met) and its dipeptides, photoinduced electron transfer from amino acids to 4NQO was observed directly.

Utilizing 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO) as a photosensitizer, photochemical reactions of 4NQO with methioine(Met), Met-containing dipeptides(Met-Met, Ala-Met, Met-Lue and Met-Gly), and Met-containing tripeptides(Met-Lue-Phe) were investigated. Formation of excited triplet states of 4NQO and 4NQO radical(4NQOH[•]) and Met radical(α-alkythioakyla radical) were observed. The kinetics of reaction has been investigated and kinetic parameters of reactions were determined. Furthermore, triplet ¹4NQO* induced a electron transfer process(¹4NQO* + >CH-S-CH₃ → [4NQO^{•-} -•S(CH<)-CH₃] → 4NQO^{•-} + >CH-S^{•+}-CH₃) was observed directly at first time. A detail mechanism of the photochemical reaction of 4-

nitroquinoline 1-oxide(4NQO) with methioine(Met) and its dipeptides was suggested.

5. **The processes of photoionization of aromatic amino acid was studied by changeable wavelength laser photolysis technique, the redox potentials of tryptophan, tyrosine and phenylalanine were determined by laser photolysis technique at first time.**

Because laser wavelength was generally fixed in laser photolysis technique, it became difficult that the redox of aromatic amino acid was determined by this laser photolysis technique. In this work, after mono photonic process was proved in photoionization of aromatic amino acid, the redox potentials of tryptophan, tyrosine and phenylalanine were determined by changeable wavelength laser photolysis technique at first time.

Keyword: Aromatic amino acids, Sulphur-containing amino acids, Laser flash photolysis, Photosensitization, photoionization, Radical, Excited triplet states, Transient species, electron transfer, Reaction mechanism.

报送博士学位论文简况表

论文题目	芳香氨基酸、含硫氨基酸及其肽的激光研究		
作者姓名	徐业平	授予学位的 学科、专业	化 学 物理化学
作者单位	中国科大化学物理系	地 址	安徽省合肥市金寨路96号
导师姓名	马兴孝	专 业 技术职务	物理化学 教 授
导师单位	中国科大化学物理系	地 址	安徽省合肥市金寨路96号
论文隶属学科分类号 ^{注1}	064		
论文关键词 ^{注2}	芳香氨基酸、含硫氨基酸、激光闪光光谱、光敏化反应、激发态 电子转移、反应机理		
论文文摘(约400-500字,中文)	<p>以不同结构芳香氨基酸、甲硫氨基酸及其肽作为研究对象,运用激光光解瞬态吸收光谱方法研究它们的单电子氧化反应,光敏化反应和光电离过程,分析表征了三种过程中的瞬态产物。在一种反应体系中分别观察到肽分子内的电子转移;提出了单电子氧化反应、光敏化反应的反应机理并获得相应的动力学参数。1)芳香氨基酸被单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)和光电离过程中自由基的生成过程。pH值对芳香氨基酸光电离过程的影响。二肽(Trp-Tyr)分子内的电子转移。2)运用激光光解的方法,在单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)过程中,首次在中性条件下直接观察到反应过程中生成了三种含硫自由基中间体。3)首次获取了4-硝基喹啉氧化物(4NQO)与含硫氨基酸及其衍生物和肽光敏化反应时,4NQO与甲硫氨酸残基发生电子转移的直接证据,观察到4-硝基喹啉氧化物(4NQO)与含硫氨基酸及其衍生物和肽光敏化反应时生成烷基自由基。4)运用可调波长激光光解方法研究芳香氨基酸的光电离过程,首次通过激光光解方法获得了色氨酸,酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位。</p>		
论文在何时何地以何种方式发表			
获得学位日期	2000.9.19	报送日期	9.23
备 注			
收藏单位:北京图书馆(中国国家图书馆)。执行部门:国内资料组。			

注 1. 一般应注明《中国图书资料分类法》的类号

2. 为了文献标引工作从论文中选取出来用以表示全文主题内容信息款目的单词或术语。每篇论文选取3~8个词作为关键词。为了国际交流,应标注与中文对应的英文关键词。

第一章 芳香氨基酸、含硫氨基酸、衍生物及肽的光化学概述

摘要：简要介绍了芳香氨基酸和含硫氨基酸及其肽的化学结构、物理化学性质及光化学原理，回顾了它们光化学及激发态研究的发展历史，提出了芳香氨基酸和含硫氨基酸及其肽的光化学研究中有待解决的问题和工作的研究方向。

1.1 引言

生物分子的光化学主要是涉及蛋白质、酶与核酸及其组分的光化学，是研究光生物学的基础。主要研究紫外光对它们的作用。蛋白质与核酸的光化学是与光生物学的发展联系在一起的，并且已经成为光生物学中的一个组成部分。推动蛋白质与核酸光化学发展的动力是分子生物学的兴起和激光光解技术在化学领域中的广泛应用^[1-4]。由于人们对蛋白质与核酸的结构及其在生物合成和在遗传学中的作用有了进一步的了解，对紫外光引起的这些生物大分子物质的化学变化就有可能从分子水平找到理论根据。大多数氨基酸对紫外和可见光是透明的。光化学感兴趣的氨基酸有下列两类，一类是芳香氨基酸，一类是含硫氨基酸。这两类氨基酸都是人体必需的，在人体代谢过程中起着重要作用。对芳香氨基酸的研究主要集中在对光作用引起的芳香氨基酸的激发态，电子转移和能量转移，蛋白质中个别色氨酸对蛋白质总发光的贡献，内在和外芳香氨基酸的生色团所处的微环境及其溶剂的极性和弛豫的关系，蛋白质发光的不均一性及其与结构的关系等^[5-10]。通过上述的研究，可以提供生物大分子的构象以及大分子内组份之间的相互作用，以弥补 X 射线晶体分析的不足，并最终可以阐明溶液状态下的生物大分子的构象。

芳香氨基酸生色团吸收紫外光引起的蛋白质光化学事件中，有些分子水平的变化会导致有害的生物效应。如引起细胞死亡，光致变异和光致癌等。氨基酸的光损伤除直接吸收 UV 辐射引起的损伤外，还通过光敏剂引起损伤。即通过光敏剂间接作用。

研究含硫氨基酸光化学的兴趣主要在于对光作用引起的蛋白质残基含硫氨基酸的损伤和损伤的传递。含硫氨基酸本身不直接吸收紫外光，而是通过光诱导的光敏剂的激发三重态对其作用。含硫氨基酸在辐射损伤机理和辐射中的保护作用早就引起人们的注

意，并进行了深入的研究^[11-13]。主要的研究手段是脉冲辐解和激光光解瞬态吸收光谱。主要研究内容为含氮硫氨基酸及肽光敏化氧化反应^[14-16]。

最近，有关大气臭氧层的研究报告指出，臭氧含量明显减少，南极臭氧空洞正以每年一个美国陆地面积的速度增大，使地面紫外光幅射增强，皮肤癌，黑色素瘤发病率上升。因此，深入开展对蛋白质，氨基酸的光化学和光物理、光生物效应等方面的研究至关重要。

1.2 芳香氨基酸的光化学

1.2.1 芳香氨基酸的结构与能级图

在讨论芳香氨基酸的光化学之前，简要介绍一下芳香氨基酸的结构，能级图和紫外吸收光谱。芳香氨基酸的特点是具有共轭结构，如苯环，苯酚和吲哚，都具有 π 电子，易于激发，是紫外特定的生色团。能吸收大于 240 nm 波长的紫外光，发射荧光^[18-21]。

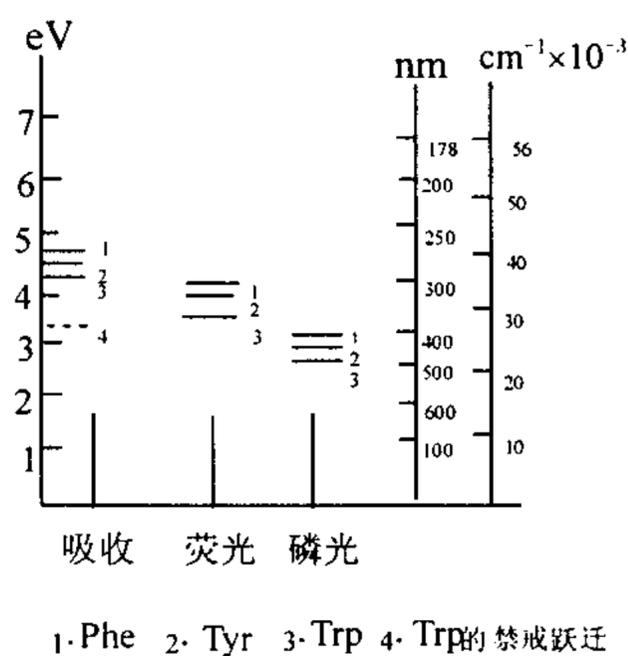


图 1.1 芳香氨基酸的能级图

图 1-1 是芳香氨基酸的能级图^[22]；图 1-2 是芳香氨基酸的结构图。

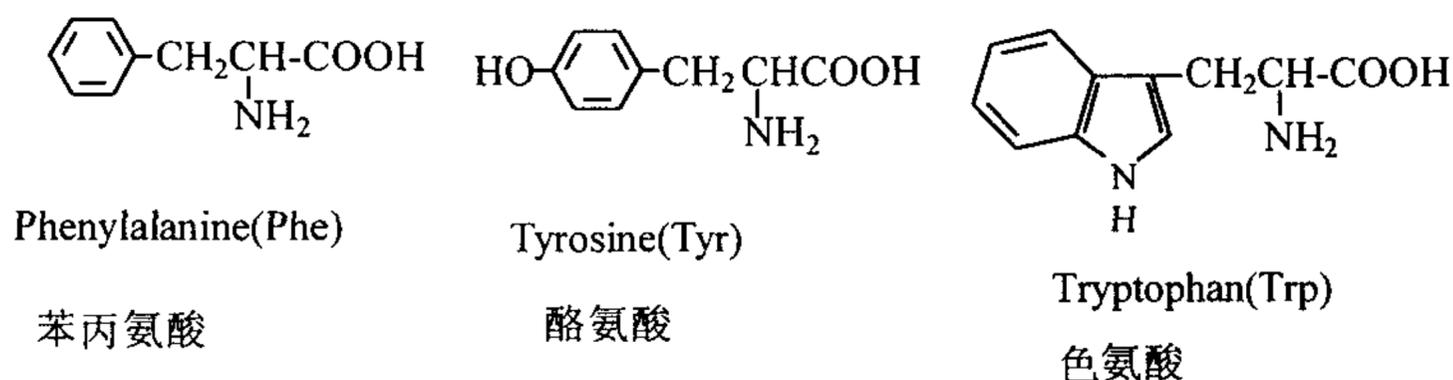
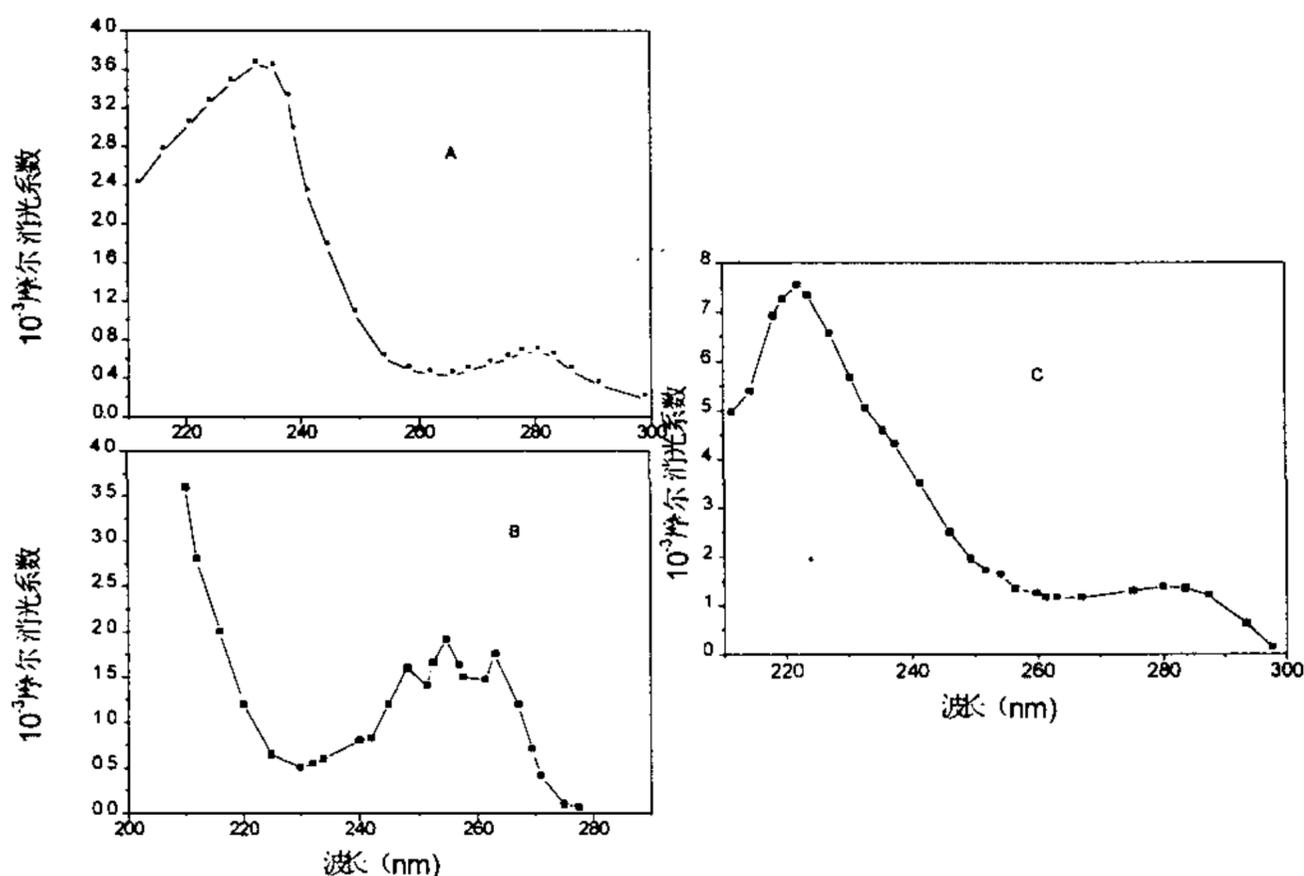


图 1.2 芳香氨基酸的分子结构

1.2.2 近紫外光辐射的激发

Hershenson, Wetlaufer, Brown 等人都对芳香氨基酸的紫外吸收光谱作了深入细致的研究^[23-26]。色氨酸，酪氨酸和苯丙氨酸的最长波长的电子跃迁在近紫外区。图 1-3

图 1.3 芳香氨基酸的紫外吸收光谱^[23]: (A) Tyr; (B) Phe; (C) Trp.

是芳香氨基酸的紫外吸收光谱^[23]。苯丙氨酸在 258 nm 处有一弱吸收带，Tyr 吸收峰的极大值分别出现在 235 nm 与 280 nm 左右。色氨酸在水溶液中的光谱的极大是在 220 nm，与 280 nm 波长处，此外偏振研究的结果指出，在 260-310nm 范围内至少有两个独立的电子跃迁分别与用自洽场方法计算预计在这个区域中存在两个跃迁的结果一致^[26]（图中看不出）。

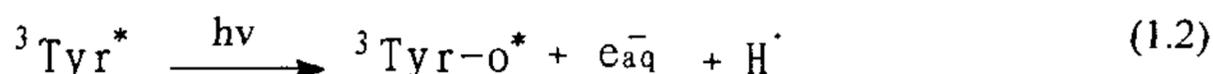
1.2.4 芳香氨基酸光化学研究概述

研究大致分三个阶段，第一阶段是 70 年代以前。这个时期对氨基酸与蛋白质光化学研究不是用单色光，着重分析破坏后的光解产物如 NH_3 、 CO_2 与 S 以及光谱特性。

这种分析对紫外光辐射的生物学效应意义不大^[22,27-28]；第二阶段是 70 年代的工作，主要用闪光光解技术进一步研究酶的失活机理及有关模型，当时提出的主要模型之一是 Grossweiner 提出的酶的失活量子产率 (ϕ) 决定于酶中主要的胱氨酸与色氨酸残基的光解^[28-31]；第三阶段是近年来开始的用脉冲激光研究一些芳香氨基酸与酶的作用，提出芳香氨基酸紫外光光解的多通道学说，并研究其间发生的电子、能量转移。激光光解芳香氨基酸研究的体系分三个层次，芳香氨基酸；芳香氨基酸的二肽；取代的芳香氨基酸（磷酸化的 Trp-Tyr）和含芳香氨基酸的蛋白质和酶（胰蛋白酶、白蛋白等）。研究的手段有单光子光解和双光子光解。研究的内容包括光解机理，电子转移和能量转移^[32-39]。

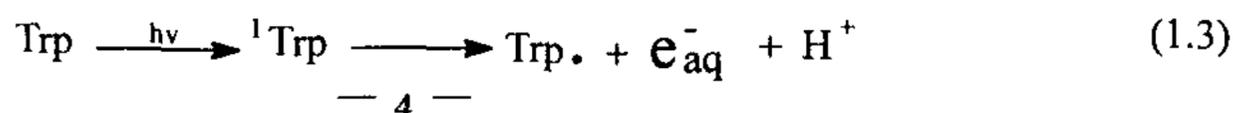
(1) 激光光解

Bent 与 Hayaon 首先用四倍频 YAG 激光器发出波长为 266nm (15 ns) 脉冲光激发，

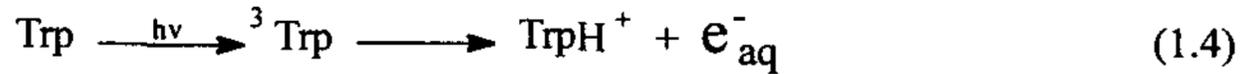


研究 25°C 时的芳香氨基酸及肽的光化学^[32-34]。发现 Tyr 的光解是通过三重态(${}^3\text{Tyr}^*$)双光子过程发生的^[32] ((1.1)-(1.2)式)，其它研究有报道单光子过程的^[41-42, 44, 46]，也有报道双光子过程的^[43, 45]。Tyr 的光解瞬态吸收光谱表明， ${}^3\text{Tyr}^*$ 在 250 nm-275 nm 有强吸收，350 nm 吸收为酪氨酸阴离子自由基(${}^3\text{Tyr-O}^*$)，大于 600 nm 的是水合电子(e_{aq}^-)的吸收峰。含有 Trp 的蛋白质光离解产生的水合电子可与氨基酸、肽键、二硫化物、含 SH 氨基酸等反应，并导致去氨基作用，电子转移反应与键断裂等，从而影响蛋白质的构象和活力。但由于仪器扫描的限制，没有观察到三重态的吸收峰。Phe 光解是经三重态通过双光子过程发生的^[33, 35, 40]，光解过程生成苄基和水合电子，瞬态吸收光谱表明，吸收峰位于 240 nm, 320 nm 和 600 nm，三重态寿命 3.1 μs ， ϕe_{aq}^- 为 0.034。Trp 的光解机理比较复杂，与介质 pH 有关，中性或碱性介质中为单重态过程((1.3)式)，酸性介质中为三重态过程^[34-35, 37-40] ((1.4)式)。

中性或碱性介质中的过程为：



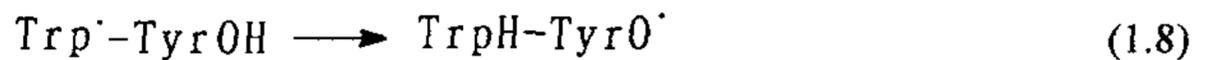
酸性介质中的相应过程：



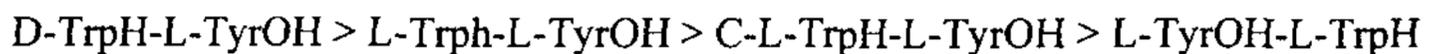
450-460nm 为三重态吸收，330nm 和 530nm 为色氨酸自由基的吸收，水合电子 e_{aq}^- 吸收大于 600nm，三重态寿命 20-45 ns，水合电子寿命与 pH 值有关。

(2) 电子转移

人们对氨基酸，肽链，蛋白质的电子转移研究早在 70 年代就已开始。Prutz, Land 为这个领域的创始人^[47-54]，Bobrowski 等人^[55-60] 对氨基酸，肽链的电子转移作出了大量富有创造性的研究，尤其 Marcus^[61] 等人电子转移理论的创立并获得诺贝尔奖给氨基酸、肽链、蛋白质的研究注入强大生命力，研究经久不衰。随着时间分辨技术如脉冲辐解，激光光解，ESR 等现代实验技术不断完善，为进一步深入研究开辟了广阔前景。在实际研究中对芳香氨基酸的电子转移运用较多的研究手段是脉冲辐解。Prutz 和 Land^[47] 最早研究色氨酸酪氨酸二肽的电子转移是由脉冲辐解产生的重氮离子作为引发



剂。510 nm 是吲哚自由基的特征吸收峰，390 nm/405 nm 是酚氧自由基的特征吸收((1.8)式)。电子转移受 Trp 和 Tyr 的连接顺序和在肽链中相隔距离等因素的影响。含 Trp 和 Tyr 二肽的电子转移的速率按下列次序减少^[62]：(数字为相对速率)



12

7

6

5

Faraggi^[62-64] 等人的研究表明，TrpH 和 TyrOH 在肽链中的连结次序影响电子转移速率。Prutz^[48] 等人的研究工作表明电子转移速率随温度升高而增加。Prutz 进一步研究发现 Trp 和 Tyr 二肽可发生电子的逆向转移^[53]。近年来，对芳香氨基酸电子转移研究兴趣集中在肽链的长度对电子转移的影响。M. Faraggi^[62-64] 等人报道了长肽链的电子转

移速率常数与 pH 的关系，并在含 Trp 和 Tyr 的二肽中插入谷氨酸，赖氨酸，研究它们的电子转移反应。现在研究最普遍的是在含 Trp 和 Tyr 的二肽中插入脯氨酸。研究电子转移的速率与 Trp 和 Tyr 分隔距离的依赖关系^[62-64]。

(3) 能量转移

早在 1928 年 Warburg 与 Negelein^[65-66]就已证明，一氧化碳中毒的酵母血红蛋白中的芳香氨基酸吸收光能后，可引起血红素连接的一氧化碳基团的断裂^[67]，从对酶的失活作用中看到，蛋白质不同部位吸收光能后，可将能量迁移到失活的部位^[68]。对蛋白质的研究表明，一些发色团吸收光能后，可以引起不直接吸收光的另一些发色团中发出荧光。蛋白质荧光的偏振度往往可以证明在大分子中同一种发色团之间可发生能量转移。含有芳香氨基酸的二肽（即掺入到肽中的芳香氨基酸），通过共振机制将激发能转移到其它发色团^[69]，在二肽 Trp-Tyr 中测不出酪氨酸的荧光^[69-70]，Edelhoc 等人认为这是因为激发能从酪氨酸转移到邻近的色氨酸上^[70]。Bucher^[73]，Vladimirov 与 Konev^[74]，Karreman 及其同事^[71]以及 Stryer^[72]分别讨论过蛋白质分子中的能量转移。能量转移是从苯丙氨酸→酪氨酸→色氨酸转移，蛋白质按含 Trp 和 Tyr 的情况分成 A 与 B 两类。A 类蛋白质中含 Tyr 一种，B 类蛋白质中含有 Tyr 与 Trp 两种，A 类具有 Tyr 发光光谱特点，B 类具有 Trp 发光光谱特点。Phe 在蛋白质中含量比后两者之和还要高，但测不出苯丙氨酸的发光，在蛋白质中也很少观测到苯丙氨酸的荧光^[75]。对于含芳香氨基酸的二肽来说苯丙氨酸残基吸收的光不能转移到相邻的酪氨酸或色氨酸残基上。在二肽中也测不出酪氨酸的荧光，Edelhoc 等人认为这是因为激发能从酪氨酸转移到邻近的色氨酸残基上。Cowgill^[76]发现，Trp-Tyr 的激发光谱与 Trp 的激发光谱一样。说明在含 Trp 的二肽中，其它芳香氨基酸的能量都向色氨酸转移。

Weber^[77]研究了酪氨酸之间的能量转移，认为在蛋白质分子中酪氨酸残基之间有能量转移。Teale 与 Weber^[75,78]仔细研究在用 280 nm-310 nm 波长范围激发许多蛋白质的色氨酸荧光量子产额的变化情况，证明能量从酪氨酸转移到了色氨酸。

蛋白质分子中的能量转移机制有下述不同的意见：通过导带中的电子迁移^[78-80]；藉质子、氢化物或氢基团在大分子周围的水分子有序结构上的迁移^[81]；藉发色团之间的共振相互作用^[74,82-84]等等。Frank 与 Livingston^[84]以及 Vladimirov 与 Konev^[77]对这些机制评论后指出，蛋白质中长距离的能量转移是由于共振转移机制产生的。

1.3 含硫氨基酸的光化学

含硫氨基酸的特点是都含有硫原子。如过硫键—S—S—，硫醇官能团—SH，和硫醚基—S—等（见图 1.4）。甲硫氨酸中硫原子氧化还原电位低易被抽取一个电子，在光敏化剂的作用下，容易发生光氧化反应^[85-88]。过硫键—S—S—是生色团，但在酸性溶液中对波长大于 230 nm 紫外光不吸收，在碱性溶液中则吸收。胱氨酸是最早知道的对紫外光最敏感的氨基酸。—SH 是蛋白质和酶的一个重要基团，对蛋白质和酶的生物活性影响较大。因此早期对蛋白质的紫外光化学的研究主要是对酶的失活及破坏产物的研究。1955 年 Setlow 就曾提出过 254 nm 波长紫外光照射酶溶液导致的失活，酶中的二硫键是关键。1980 年 Grosswein 等报道紫外光对酶的失活决定于酶中主要的胱氨酸与色氨酸残基的光解。

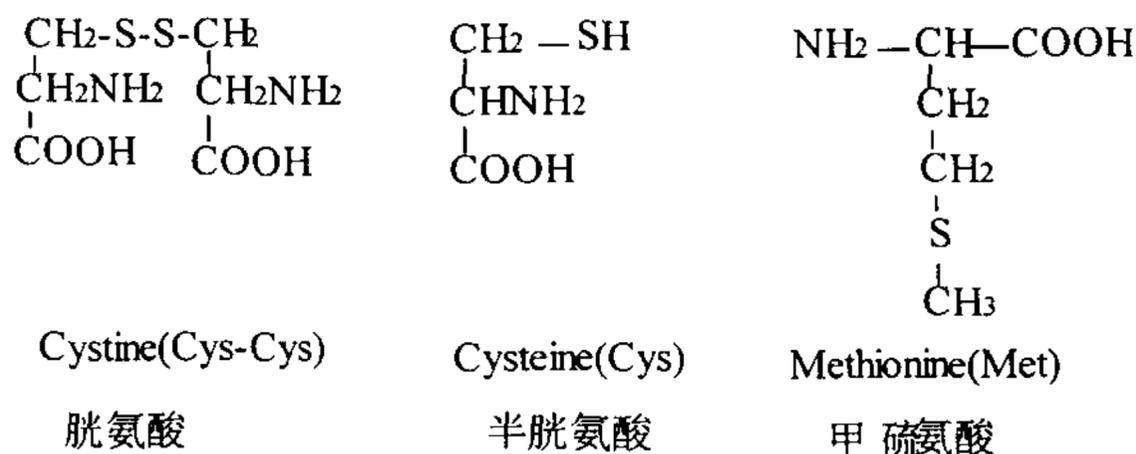


图 1.4 含硫氨基酸的分子结构

甲硫氨酸 (Met) 是人体必需氨基酸之一。它对几种激素中生物失活可能起着关键作用^[89-90]，如人的生长激素，促肾上腺皮质激素，甲状腺激素。此外 Met 还与几种疾病的致病病理有关。例如眼晶体内白内障的形成便与之有关。而且它还影响与药物相关的蛋白质的稳定，如松弛激素，interleukin-2。含硫氨基酸本身不直接吸收紫外可见光产生跃迁。但氨基酸残基之一的甲硫氨酸 (Met) 特别容易受到活性的 $n\pi^*$ 羰基三重态的进攻^[91]。因为 Met 含有容易氧化的硫醚基团。甲硫氨酸中硫原子氧化还原电位低易被抽取一个电子，在辐射和光敏化剂的作用下，容易发生氧化反应。

1.3.1 脉冲辐解的研究

含硫氨基酸是优良的辐射保护剂。对半胱氨酸和胱氨酸研究在六、七十年代就比较成熟^[60' 92-95]，但系统研究甲硫氨酸始于八十年代。K.-Ohiller 和 K.-O. Asmus^[96-99]是主

要作者, Bobrowski 等人^[54-60,96,99-102]作了深入的研究。他们用 1.55–3.8Mev 的电子脉冲, 在 N₂O 饱和水溶液的介质中, 对反应体系进行研究。结果表明, 在 pH 大于 3 的强酸水溶液中产生的含硫三电子键[S::S]⁺在 480nm 左右有强烈吸收; 在中性和碱性的条件下, 480nm 吸收峰消失。Hiller^[96]等人证明辐解产物中含有 CO₂, 因此推测发生了脱羧反应, 中间体是[S::N]⁺, 脱羧产物是 CO₂ 和 α-氨基自由基。Davies 用 ESR 方法检测出了该种自由基^[103], Hiller, Asmus 则用化学方法证明了它的存在, 并证明了它的很强的还原性^[97]。

1.3.2 由光敏剂诱导的含硫氨基酸和肽的光氧化反应

激发的羰基三重态因吸收光或因酶或非酶作用在暗过程中能在体内迅速产生^[104], 这种 n→π* 跃迁类型的三重态具有亲电子特性, 可作为典型的单电子氧化剂^[105], 与有氧化作用的自由基有类似的性质, 在生物体内这种类似于自由基反应的可导致细胞组织的损伤^[106]。所以人们在体外选择模型化合物二苯酮类和氨基酸及肽对光敏化氧化反应进行模拟, 以研究反应机理和产生的活性中间体等。

1.3.2.1 光敏剂—二苯甲酮 (BZ) 和 4-羧基二苯甲酮 (CB) 的结构与光谱性质

现代分子光化学中主要研究 n→π* 和 π→π* 跃迁, 其中 n→π* 跃迁是由于分子中参与形成双键的杂原子有孤对电子 (例如羰基 C=O 中的 O 上的孤对电子) 发生 n→π* 跃迁。酮类是最感兴趣的一类化合物, 常用的敏化剂是二苯甲酮 (BZ)^[107-108] 和 4-羧基二苯甲酮 (CB), 其中研究最多的是二苯甲酮 (见图 1.5)^[109-111]。二苯甲酮能够吸收不同波长的光, 既可能发生 n→π* 跃迁, 也可能发生 π→π* 跃迁, 但 n→π* 跃迁比 π→π* 跃迁需要的能量更多, 激发光波长更短。例如二苯甲酮在乙醇溶液中吸收了 316nm 波长的光后, 就发射 410、450 nm 两种波长较长的荧光。其中 410nm 荧光, 其强度的半衰期为 50 皮秒, 是吸收光子后, 跃迁到激发态通过发光回到基态的荧光; 而在 450 nm 光是由 S₁ 激发态经系间跨跃至较低能位的三重态 T₁ 后返回基态的磷光, 上述过程示意于图 1.6^[112]。除 BZ, CB 外, Seki^[113]、Bobrowski 等人运用过 4-硝基喹啉氧化物 (简称 4NQO) 和 N-(9-甲基嘌呤) 氯化吡啶 (Pyr⁺) 作为敏化剂, 光敏化氧化甲硫氨酸的反应^[114]。

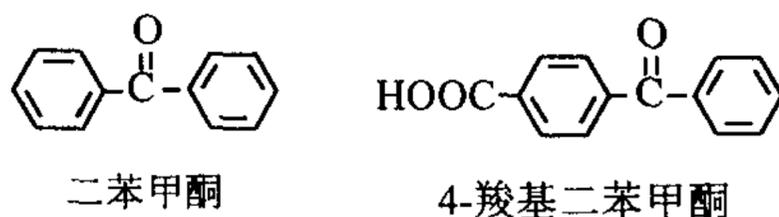


图 1.5 芳香酮的结构

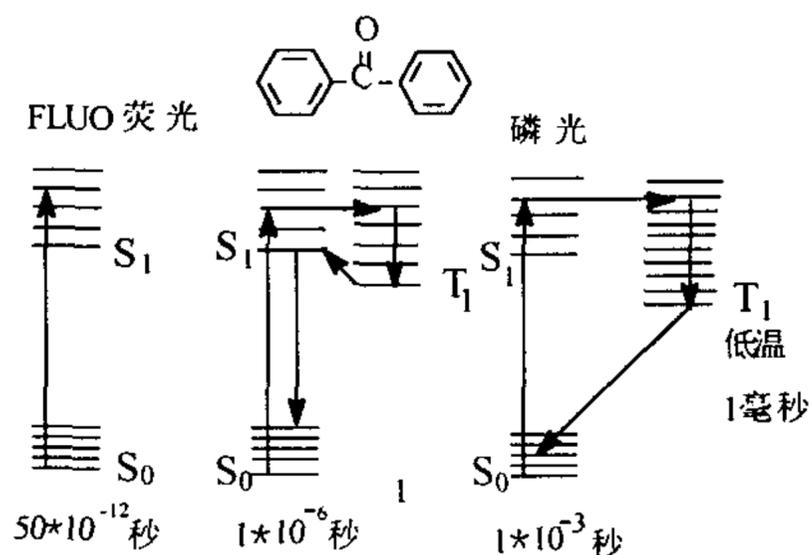


图 1.6 激发的二苯酮在三段时间里发射两种波长的光

1.3.2.2 BZ 光敏化氨基酸的氧化反应

早期研究中应用含有给电子基团的有机物猝灭芳香羰基化合物三重态，包括醇^[115]、胺^[116]、硫化物^[117]、硫醇^[117]、苯酚^[118]、二硫化物^[119]等。研究集中于猝灭过程中电子和质子的转移，早期产生的原初光产物产率，以及光还原效率。最早应用敏化方法研究甲硫氨酸及含硫化物的光敏化氧化反应的是 Cohen^[120]等。Battacharyya^[121]和 Encinas^[122]分别重复了他们的工作。在氨基酸中由于氨基被邻近其它的氨基，芳香基或芳香/杂环等官能团活化程度不同，例如 Trp 中的吲哚，Tyr 中的苯酚，Phe 中的苯基等活化的氢原子，形成了一类具有活性选择模式的还原剂，但这种活性选择模式是很复杂的。活性自由基对人体的损伤是已知的，BZ 三重态 $n\pi^*$ 自由基行为和亲电性的性质，以及激发的羰基三重态它在暗反应中毋需酶的存在也能迅速产生，促使人们应用氨基酸与 BZ 作为模型化合物进行研究，以试图查明蛋白质和酶的辐射诱导的损伤和失活自由基进攻的优先位置。Cohen^[120]、Battacharyya^[121]、以及 Encinas^[122] 及同事的研究涉及 BZ 还原产物的量子产率和 BZ 三重态被氨基酸猝灭常数，没有涉及反应机理和所产

生的活性中间体。实验表明 Met 是较好的猝灭剂, 并记录了吸收光谱但未作解释。Battacharyya^[121]进一步研究了氨基酸与金属离子作用对 BZ 的猝灭情况。Gly 是很差的猝灭剂(表 1.2), 但当它与金属离子络合, 则变成为较强的猝灭剂。Trp 与 Ni 络合, 猝灭能力会加一倍, 而与 CO、Fe 络合, 猝灭能力不变。

表 1.2 含硫氨基酸对 BZ 的猝灭和 ketyl 自由基的量子产率

猝灭剂	Kq	Φ_{ketyl}	Φ_{BZ^\cdot}
Gly	$2 \cdot 10^5$	-	-
Met	$3.5 \cdot 10^9$	-	0.51
GSH	$6.7 \cdot 10^9$	0.12	0.04
GSSG	$1.3 \cdot 10^9$	-	-

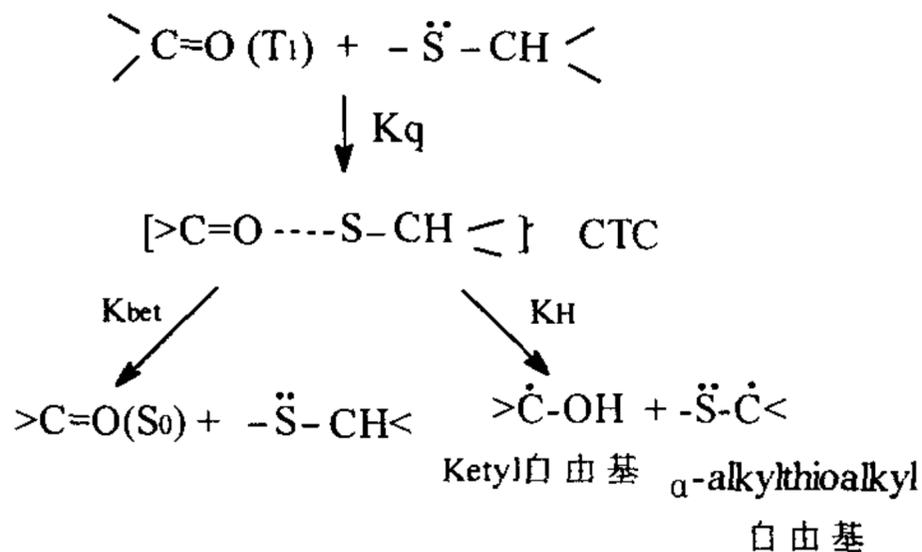
1.3.2.3 CB 敏化的含硫氨基酸的光氧化反应

CB 的结构类似 BZ, 在苯环的 4 位上有一羧基, 增加了其水溶性, 其光谱性质与 BZ 类似, 结果表明 CB 的瞬态吸收光谱与 BZ 的瞬态吸收光谱类似。进入 90 年代, Bobrowski^[109-110,112,114,123]等运用 CB 作为光敏剂, 对含硫氨基酸光敏化氧化反应进行深入的研究。研究分两个层次进行, 原初光化学反应和次级反应, 通过 CB 光化学产物和含硫化合物的活性中间体证实反应机理是电子转移参与 CB 三重态猝灭机理; 原初反应表明含硫氨基酸是良好的猝灭剂, 其中硫原子是产生猝灭的关键(首先生成含硫自由基); 次级反应表明, 含硫氨基酸及肽氧化是不可逆的即脱羧反应。脱羧反应生成 α -(α /ky/thio)a/ky/还是 α -amino/ky/自由基, 取决于用于猝灭剂酸的类型。

1.3.2.3.1 反应机理

Cohem 与 Gutlenplan^[120]首先提出 BZ 三重态对硫醚进行光敏化氧化反应时的反应机理是通过电荷转移生成电荷转移络合物(CTC), 并伴随 BZ 三重态的猝灭反应(Kq)。Cohen 和 Ojanpera 进行了补充和修正, 认为 BZ 三重态被 Met 猝灭时, 电荷迅速分别从硫原子和氧原子转移到羰基三重态分别生成 CTC-S 和 CTC-N 电荷转移络合物, 这两种形式以平衡状态存在。Bobrowski^[109-110,112,114,123]和同事, 直接观察到了 CTC-S 络

合物存在并解离成离子的证据和 Ketyl 自由基生成，并证实 CTC-S 络合物解离是主要的衰变途径。提出光敏化氧化反应机理是首先电子从硫原子转移到 CB 三重态生成过渡态络合物，该络合物通过三个竞争途径分裂衰变：1) 在络合物内质子转移(kH)，并扩散形成 Ketyl 自由基和 α -(alkylthio)alkyl 自由基。2) 络合物扩散分离生成 CB 和硫中心



自由基阳离子。3) 电子转移生成原来的反应物，即 CB 基态和氨基酸，但这不是主要途径。

1.3.2.3.2 影响猝灭反应的因素

猝灭反应是敏化反应的逆过程，在 CB 三重态敏化含硫氨基酸的过程中，CB 三重态本身被猝灭，含硫氨基酸是良好的猝灭剂，猝灭常数(Kq)与下列因素有关：1) 氨基酸中硫原子与 α -C 的距离的影响^[107]：氨基酸同系物的 Kq 值与吸电子基 $CH(NH^+)COO^-$ 与硫原子间距有关，间距增长， Kq 值增加。2) 取代基电负性和位阻的影响：在含硫氨基酸相对于硫原子的 β 碳引入吸电子基 NH^+ 后， Kq 值下降；但引入第二个 NH^+ 基，导致 Kq 值有较大的下降；这可能是位阻原因。在含硫氨基酸连接硫原子引入给电子基烷基团，给电子作用越大 Kq 值增加越大。3) pH 的影响^[110]：pH 对 CB/含硫氨基酸的电离形式有很大影响，因为 CB 具有有机酸性质 ($pK_{a(CB)}=4.5$)，氨基酸为两性中解。由 pH 决定其为酸式电离或碱式电离。在中性介质中 CB 三重态总是处于的羧酸阴离子形式，大部分氨基酸处于两性离子状况（取决于 pK_a ），在碱性条件下 ($pH11.5$)，CB 和氨基酸都处于阴离子形式，CB 及含硫氨基酸的电离形式对猝灭反应影响不大。氨基酸中的羰基，氨基在猝灭反应中不起关键作用，起关键作用的

是硫原子，Cohen^[105]也发现过这个现象。4) 猝灭剂的电荷的影响^[116]： K_q 值与猝灭剂的电荷有关，并随着共轭碱上阴离子电荷下降，次序是 $K_q(\text{acid}^{-1}) > K_q(\text{acid}^{-2}) > K_q(\text{acid})$ 。

1.3.2.3.2 反应活性中间体

含硫氨基酸很容易被 CB 三重态抽取一个电子，生成含硫自由基阳离子 $>S^+$ ， $>S^+$ 在水溶液中不稳定，寿命很短，由于 ^{32}S 没有核自旋，使 ESR 测量变得很困难。主要是通过瞬态吸收光谱测量反应过程产生的自由基阳离子，一般通过由 $>S^+$ 衰变产物，二聚反应产物 $[>S::S<]^+$ 和亲核反应产物 $[>S::X]$ 证实其存在。但在 CB 和 BZ 光敏化氧化反应中也没有直接观察到 $[>S::S<]^+$ 和亲核反应产物 $[>S::X]$ 吸收峰，而是运用解谱技术和脉冲辐解结果证明 $[>S::S<]^+$ 和亲核反应产物 $[>S::X]$ 的生成。

1.4 研究中有待解决的问题和本文的研究内容

运用脉冲辐解对含硫氨基酸衍生物及肽的氧化反应进行研究中，对反应机理为单电子氧化反应^[96,101]还存在疑义。脉冲辐解产生的 $\text{HO}\cdot$ 自由基氧化产生的 $[S::S]^+$ 只在 $\text{pH} < \text{pKa} (-\text{COOH})$ 时的强酸溶液中观察到，而在弱酸或中性溶液中到目前没有观察到 $[S::S]^+$ ^[96-102]。激光诱导含硫氨基酸（光敏剂为芳香酮）的光敏化氧化反应中，由于产生的芳香酮中间体吸收谱带宽、寿命长，影响含硫中间体吸收光谱的辨别和分析，以致通过复杂的解谱技术判断含硫中间体^[109-110,112,114,123]。

Seki 等^[113]运用 355nm 激光闪光光解研究的 4NQO 与甲硫氨酸(Met)的光解体系中，没有观察到 Met 阳离子自由基($>\text{CH}-S^+-\text{CH}_3$)的次级产物的生成，仅以 4NQOH \cdot 的生成推测 $^3\text{4NQO}\cdot$ 与 Met 之间发生了电子转移反应。

对芳香氨基酸及肽的光敏化反应的研究几乎未见报道。

综上所述，芳香氨基酸、含硫氨基酸及其肽的光化学的研究仍有许多值得进一步考察的。有鉴于此，本文拟采用激光闪光光解动态吸收光谱方法，选择不同结构的芳香氨基酸，甲硫氨酸和它们的肽，对以下问题开展研究。

- 1) 芳香氨基酸及其肽光敏化、单电子氧化反应；
- 2) 含硫氨基酸及其肽的单电子氧化反应；
- 3) 含硫氨基酸及其肽的光敏化反应；
- 4) 芳香氨基酸及其肽的光电离过程。

1.5 小结

- 1) 紫外光对芳香氨基酸的作用方式有两种：一种是芳香氨基酸的生色团（共轭结构）直接吸收紫外光；一种是通过光敏剂作用。光化学研究芳香氨基酸的内容主要包括光解、光激发、电子转移和能量转移等。
- 2) 紫外光对含硫氨基酸的作用方式主要是通过光敏剂作用。首先是光敏剂生成激发三重态；光敏剂激发三重态与含硫氨基酸作用，生成含硫自由基，光敏剂激发三重态被猝灭。因此含硫氨基酸离子自由基和光敏剂的光谱学是含硫氨基酸光物理与光化学的主要研究内容。
- 3) 对芳香氨基酸激发态，含硫氨基酸光氧化的研究从模型化合物到氨基酸，肽乃至蛋白质，从稳态到动态进而实现由间接推测到直接观测。
- 4) 有待解决的问题是：
 - (1) 光敏剂对芳香氨基酸及肽的作用的研究几乎没有进行；
 - (2) 含硫氨基酸及衍生物光氧化机理及产生的含硫自由基尚缺乏动态观测的直接证据。

参考文献

1. S.Y. Wang(ed.), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Vols. 1 and 2, Academic Press, New York, 1976.
2. D.N. Nikogosyan and V.S. Letokhov, Nonlinear laser photophysics, photochemistry and photobiology of nucleic acids, *Riv. Nuovo Cimento*, 1983, 6. 3 1-72 .
3. D.N. Nikogosyan, Two-quantum UV photochemistry of nucleic acids. Comparison with conventional low-intensity UV photochemistry and radiation chemistry, *Int.J Radiat Biol.*, 1990, 57 233-299.
4. 宋钦华, 徐业平, 李全新, 陈从香, *化学通报*, 1998,8, 17-21 .
5. I. Gryzynski, M.R. Eftink and J. R. *Biochim, Biophys. Acta* 1988, 954, 244, .

6. J.M. Becchem and L. Brand, *Annu. Rev. Biochem.* 1985,54, 43-77, .
7. L.H. Danni and S. H. Bruce, *Biochemistry* 1990,29, 5276-5285.
8. E.Bismuto, E.Gratton and G. Irace, *Biochemistry* 1988, 27, 2132-2136.
9. R.E. Maurice, J. Yiwei, H. Dana, A.G. Camillo, *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 5713-5723
10. Rita V., Yves E., Jacques I., Daniel B., 1995,34, 1734-1743
11. Hiller K. O., Masloch B., Gobl M., Asmus K.-D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103 :2734-2743.
12. Asmus K-D, Gobl M.,Hiller K. O., Mahling S. ,and Monig,J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1985,641—446.
13. Mcelroy W.T., Wayagood , *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990, 86(14): 2557-2564.
14. Borowski k., Marciniak B., Hug G. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114:10279-10288.
15. Bobrowski K., Hug G. L., Marciniak B., Kozubek H., *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 537-544.
16. Marciniak B., Hug G.L., Borbronski K., Kozubek H., *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 13560-13568
17. Congress Abstracts on 12th International Congress on photobiology 1996.
18. R. L.Bowan, P.A. Caulfield, and S. Udenfriend, *Science*, 1955,122, 32-33.
19. D. E. Duggan and S. Udenfriend, *J. Biol Chem.*, 1956,223, 313-319.
20. D. E. Duggan and R. L.Bowan, B.B. Brodide, and S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, 68 1-14.
21. H.Sprince, G. R. Roweley, and D.Jameson, *Science*, 1957,125,442-443.
22. 李善君, 纪才圭, 复旦大学出版社, 1993,412-431.
23. D. B. Wetlaufer, *Advan. Protein. Chem.*, 1962,17, 303-390.
24. H.M. Hershenson, Academic press, New York 1956,1930-1954.
25. D.B. Wetlaufer, *Adan .Protein. Chem.*, 1962,17, 303-390.
26. E. Yeagers, *Biophys. J.*, 1968, 8, 1505-1510.
27. J.A. Gally, and G.M. Edelman *Biochim. Biophys. Acta*1962, 60, 499.
28. J. Feitelson, E. Hayon, and A. Treinin, *J. Am. Chem. Soc.* 1973,95, 1025.
29. L. I. Grossweiner, G.W. Swenson, and E.F. Zwicher, *Science*, 1963,141, 805.

30. M.T. Paithorpe, J.P. Bonjour, *Photochem. Photobiol.*, 1973, 17 209.
31. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 2599-2606.
32. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 2606-2612.
33. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 2612.
34. J.F. Baugher, and L.I. Grossweiner, *J. Phys. Chem.*, 1978, 81, 1349-1354.
35. R.W. Sloper and E.J. Land *Photochem. Photobiol.*, 1980, 32, 687-689.
36. T. Hakon, S. Einar, *Radiat Phys. Chem.*, 1987, 30(4), 285-291.
37. H. Anthony, *J. Phys. Chem.*, 1987, 91, 6102-6104.
38. R.D. Michael, C.P. Murthy, et al. *J. Phys. Chem.*, 95, 1991, 3416-3419.
39. J.F. Baugher, L.I. Grossweiner, 1977, 81, 1349-1354.
40. K. Bobrowski, R. Lubis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1986, 50, 1039.
41. K. Bobrowski, J. Holcman, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987, 52, 139.
42. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990, 57, 919.
43. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1991, 2, 353.
44. K. Bobrowski, J. Holcman, J. Poznanski et al., *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 10036.
45. M.R. DeFelippis, M. Faraggi, M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 5141.
46. W.A. Prutz, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1979, 36, 513.
47. W.A. Prutz, E.J. Land, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, I, 1981, 77, 281.
48. W.A. Prutz, F. Siebert, J. Butler, et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1982, 705, 139.
49. J. Butler, E.J. Land, W.A. Prutz, et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1982, 705, 150.
50. J. Butler, E.J. Land, A.J. Swallow, et al., *Radiat. Phys. Chem.*, 1984, 23, 265.
51. W. A. Prutz, J. Butler, E.J. Land, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1985, 47, 149.
52. J. Butler, W.A. Prutz, E.J. Land, et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 348.
53. W.A. Prutz, J. Butler, E.J. Land, et al., *J. Radiat. Biol.*, 1989, 55, 539.
54. K. Bobrowski, J. Holcman, *Radiat. Phys. Chem.* 1989, 28, 555.
55. K. Bobrowski, R. Lubis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1986, 50, 1039.

56. K. Bobrowski, J. Holcman, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987, 52,139.
57. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990, 57, 919.
58. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991,2,353.
59. K. Bobrowski, J. Holcman, J. Poznanski, et al., *J. Phys. Chem.*, 1992,96, 1036.
60. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, 60, 507.
61. R.A. Marcus, N.Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 265(1985). *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 5141.
62. M.R. DeFelippis, M. Faraggi, M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 112, 507.
63. M. Faraggi, M.R. DeFelippis, M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 5141.
64. M.R. DeFelippis, M. Faraggi and M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 5640.
65. O. Warburg, E. Negelein, *Biochem. Z.* 1928, 193: 339.
66. O. Warburg, E. Negelein, *Biochem. Z.* 1929, 64: 214.
67. T. Bucher, J. Kaspers, *Biochim Biophys. Acta*, 1947,1:21-34,.
68. A. G. Szent, *Science*, 1941, 93:609.
69. R.W. Cowgill, *Biochim Biophys. Acta*, 1963, 75, 272.
70. H. Edelhoch, R.L. Perlman, M. Wilehek, *Biochemistry* 1968, 7, 3893.
71. G. Karreman, R.H. Steele, A. G. Sent, *Biochim Biophys. Acta*. 1957, 25:280.
72. L. Strye, *Radiat Res. Suppl.*, 1960, 2:432-51.
73. T. Bucher, *Advance. Ensymol.*, 1953, 14:1.
74. Y.A. Vladimirov, S.V. Konev, *Biophysics*, (Engl. Transl.) 1957, 2:1-19.
75. F. W. J. Teale, *Biochem. J.*, 1960, 76:381,
76. R.W. Cowgill, *Biochim Biophys. Acta*. 1963,75:272.
77. G. Weber, *Biochem. J.*, 1960,75:345.
78. F.W.J. Teale, G. Weber, *Biochem. J.*, 1959, 72:15P.
79. G.A. Szent, *Science*, 1941, 93:609,
80. G.A. Szent, *Nature*, 1941,148:157.

81. I. M. Klotz, J.H. Ayers et al *J Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2132.
82. T. T. Bannister, *Arch. Biochim Biophys.* 1954, 49:222-33,.
83. V.G. Shore, A.B. Pardee, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 62:355.
84. J. Fank,, R. Livingston, *Rev. Mod Phys.*, 1949, 21:505.
85. S. Arian, M. Benjamini, J. Feitelson and G. Stein *Photochem. Photobiol*, 1970, 481-487.
86. S.N. Battacharyya, P.K. Das *J Chem,Soc. Faraday Trans2*, 1984, 80,1107-1116.
87. M. V. Encinas, E. A. Lissi and A. F. Olea, *Photochem, Photobiol*, 1985, 42, 4 347-352.
88. N. Brot, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 223,271-281.
89. N. Brot, H. Weissbach, Stirling, C., Ed: Wiley: New York, 1988, 851-872.
90. Y. M. Terchinsky, Metzler, D., Ed: Pergamon Press Oxford, 1979.
91. W. A. Prutz, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1979, 36,5 13.
92. V .G. Wilkening, M. L. Arends and D. A. Armstrong, *Can. J. Chem.* 1967, 45,1209.
93. A.Al.-Thannon, R. M. Peterson and C.N. Trumbore, *J. Phys. Chem.*, 1968, 72, 2395.
94. J. W. Purdie, *Can. J. Chem.* 1971, 49, 752.
95. M. Z. Hoffman, E. Hayon, *J. Phys. Chem.*, 1973, 77(8),990.
96. K. O.Hiller, Masloch B., Gobl M., Asmus K.-D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103 :2734-2743.
97. Hiller K. O., Asmus K.-D., *J. Phys. Chem.*, 1983, 87:3682.
98. Asmus K.-D., et al., *J. Chem. Soc.Perkin Trans. II*, 1985, 641.
99. S.G. Cohen, et. Al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 5633-5644.
100. K. Bobrowski, J. Holcman, et al., *J. Phys. Chem.*, 1992, 96: 1036.
101. Bobrowski K., *J.Phys. Chem.*, 1989, 93: 6381-6387.
102. Bobrowski K., Schoneish C., Holcan J., Asmus K-D, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1991, 353-362.
103. M. J. Davies, B. C. Gilbert, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc.Perkin Trans.* 1983, II 731.
104. N, Duran, M. Haun, et al, *Photochem. Photobiol.* 1983, 37, 247-374.
105. J. C. Scaiano, *J. Photochem.* 1973/74, 2, 81-118.

106. M.V. Encinas, et. al., *J Photochem*, 1981,16, 43-49.
107. S.N. Battacharyya, P.K. Das, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 2.*,1984, 80, 1107-1116.
108. M.V. Encinas, et. Al., *Photochem, Photobiol*, 1985, 42, 347-352.
109. Marciniak B., Hug G.L., Borbronski K., Kozubek H., *J. Phys. Chem.* 1995, 99: 13560.
110. Borowski K., Marciniak B., Hug G. L. *J.Am.Chem.Soc.*, 1992, 114:10279.
111. Bobrowski K., Hug G. L., Marciniak B., Kozubek H., *J. Phys. Chem.*, 1994, 98: 537.
- 112 曹家桢等译, 化学中的机会, 中国化学会, 1986, 46.
113. Seki H, Takamatsu A, Arai S, *J. Phys. Chem.*, 1987, 91: 176.
114. Marciniak B, Hug G. L., R. Jarosław, Bobrowski K., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 127-134.
115. D. I. Schuster, P.B. Karp, *J. Photochem.* 1980, 12,333-344.
116. S. H. Inbar, Linschitz and S. G. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 1048-1054.
117. S. H. Inbar, Linschitz and S. G. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 1679-1682.
118. Das, P.K., M.V. Encinas, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981,103, 4154-4162.
119. Wallace, W.L., et al., , *J. Am. Chem. Soc.*, 1976,98, 5319-5326.
120. Cohen, S.G., A. Parola, and G.H. Parsons, *Chem Rev.*, 1973, 73,141-161.
121. S.N. Battacharyya and P. K. Das, *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 1984, 2, 80, 1107-1116.
- 122.M. V. Encinas, E. A. Lissi, A. F. Oiea, *Photochem. Photobiol.* 1985, 42, 347-352.
- 123 Marciniak B., Bobrowski K.,et al., *J. Phys. Chem.*,1994, 98, 4854-4860.

第二章 激光闪光光解瞬态吸收光谱法及装置的建立

摘要: 介绍激光光解的原理及其发展。详细介绍了本研究所采用的激光光解瞬态吸收光谱装置及数据处理方法, 并介绍了可变激光波长的激光光解瞬态吸收光谱装置建立方法。

2.1 引言

激光闪光光解(Laser flash photolysis)结合动态吸收光谱检测的方法也被称为时间分辨激光闪光光谱(Time-resolved laser flash spectroscopy), 是研究激发态和短寿命中间体结构及运动规律的一种有效手段。广泛应用于涉及光化学的诸多领域。它主要用于三重态和其它瞬态产物, (如由分子激发所产生的自由基) 的表征和动力学过程的监测。值得特别一提的是, 由于磷光发射光谱和电子自旋共振(ESR)测量通常不能在室温下进行, 因而室温下生物大分子核酸、芳香氨基酸及肽三重态的本质^[1-8]以及核酸和含硫氨基酸及肽光敏氧化反应的原初过程的信息^[9-10] 主要靠激光光解瞬态吸收光谱提供。

2.2 激光闪光光解瞬态吸收光谱概述

2.2.1 原理及发展

Norrish 和 Porter^[11]于 1949 年创建的闪光光解技术, 被用于研究光与物质作用的原初物理化学过程。六十年代引入了激光光源之后, 这项技术发展很快。现在已成为定性或定量地研究光化学过程中的激发态和中间体的强有力的工具。闪光光解的概念是: 利用强脉冲光射入一个吸收体系来瞬时地引发反应, 然后用吸收光谱实时地分析体中相关组份随时间的演变。显然, 脉冲激光是最好的闪光光解光源。激光闪光光解瞬态吸收光谱的时间分辨能力取决于激光脉冲的脉宽以及光谱测量系统的时间响应, 依装置及目的的不同, 可达微秒、纳秒直至皮秒、飞秒量级。激光闪光光解原理如图 2.1 所示: 样品吸收短脉冲激光导致瞬态产物生成。分析光垂直于激光通过样品。通常, 样品在分析光的波段范围基本上没有吸收, 而生成的瞬态产物有吸收。这样, 激光作用

后，在有吸收的波长范围分析光的透过率便有所下降。这种分析光透过光强随波长和时间的变化可以通过单色仪分光后，用光电管接受并将其转换为电信号加以记录并同时显示于示波器上。在不同的波长进行这样的测量，便得到瞬态吸收光谱(或称时间分辨吸收光谱)。

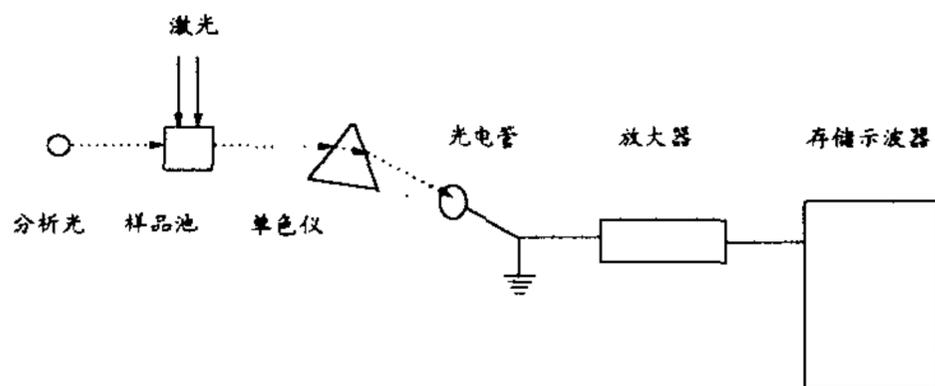


图 2.1 激光闪光光解原理示意图

激光闪光光解通过检测激光引发的激发态和短寿命中间体对分析光的吸收变化来研究物质光物理及光化学过程。这种方法有两个显著的特点：(1)直接——通过检测瞬态产物对光的吸收得到的瞬态吸收光谱，比发射光谱更为直接地“看到”瞬态产物同时不必在乎产物是否发光；(2)实时——由于检测是时间分辨的，可对瞬态产物进行实时跟踪。因此，激光闪光光解特别适用于对光反应中激发态和中间体演化过程的观察。

激光闪光光解采用的脉冲激光以及相应探测系统的时间分辨随技术发展不断改进。最初闪光光解使用的激励光源是充气放电灯，其闪光最小宽度大约为几个微秒 ($1\mu\text{s}=10^{-6}\text{s}$)，缺点是光的多色性，生成多种瞬态产物，使解释复杂化。激光用于闪光光解后，这个缺点已被克服。除单色性外，激光的强度高，可以获得相当高浓度的中间体。激光的脉宽窄，可以研究更快的光物理和光化学原初过程。同的激光脉宽也界定了它所研究化学反应过程的时标。激光技术及相应检测技术的发展，时间分辨越来越短，已将研究推向光物理和光化学过程中更为早期的事件，这也是激光闪光光解的发

展过程。八十年代中期出现的分步双激光闪光光解(Two-step two-laser flash photolysis), 也已广泛地应用于光反应中高激发态及中间体的光化学, 尤其是凝聚相光化学研究中^[12]。

2.2.2 可检测的瞬态产物

所谓“可检测的瞬态产物”是一个随人们认识和实验技术而系统发展的概念。六十年代初, 由于实验条件限制, 光化学的研究方法大多限于稳态分析和对反应产物的分离、鉴定, 激发三重态作为相当普遍存在的反应中间体多半是一种假设。因为激发单重态分子的弛豫过程多发生于亚纳秒, 即小于 1 纳秒时间范围内, 而激发三重态的弛豫则在纳秒到微秒范围, 这都需要有快速的分析手段才行。而激光的出现有力地促进了闪光光解技术的发展, 它的单色性和超短脉冲为研究光化学反应动力学提供了良好条件, 极大地推动了光化学反应动力学研究的发展。七十年代, 时间分辨光谱得到进一步发展, 光化学反应中出现的分子激发态和一些传统的瞬态产物(如激发三重态、卡宾、叶立德、自由基和双自由基等)得到了直接的光谱观察、表征和研究, 同时另外一些瞬态产物(如激发单重态、单重态与三线态的激基复合物、离子自由基等)也被列入到常见的瞬态产物之中。到八十年代, 实验设备进一步完善, 纳秒级时间分辨光谱技术变得十分普遍, 加上光化学反应机制研究中电子转移过程的广泛发现, 一系列新的反应瞬态产物(如接触离子对、溶剂分隔的离子对等)也逐步为人们所熟悉, 光化学反应机制的研究日益深入。

特定瞬态产物的生成和衰变的动力学分析, 展示了丰富多采的光物理与光化学过程。这些过程包括液体中分子取向弛豫, 分子间能量转移, 分子间和分子内电荷转移, 电子的分离和重合, 光电离和电子溶剂化, 分子内质子转移, 光分解以及在溶液中的笼效应等。

激光闪光光解在涉及光化学反应的学科领域有着广泛的应用, 主要表现在两个方面: 一是光化学反应中激发态和中间体态研究, 包括激发态、中间体的表征和反应动力学; 二是激发态的能量转移, 电子转移和质子转移。

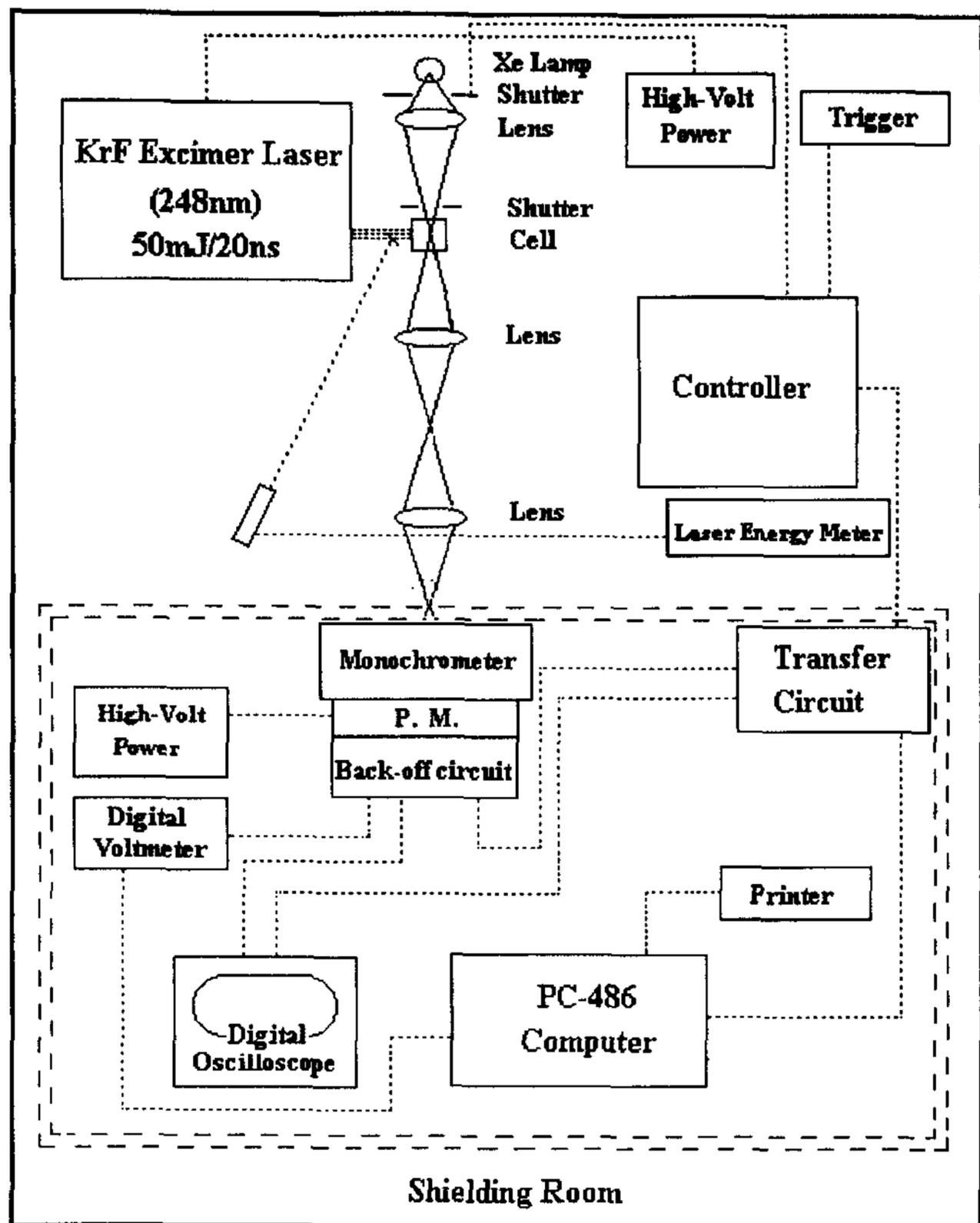


图 2.2 纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置示意图

2.3 纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置

激光闪光光解是以吸收测定由脉冲激光产生的瞬态产物的浓度(绝对或相对值), 来获得如下几种实验数据: 瞬态吸收光谱, 瞬态产物的消光系数, 量子产额及动力学, 另外, 可区分单, 双光子过程. 激光光解装置的实验过程通常为三步: 激励、探测和数据处理。

关于激光闪光光解装置已有多篇文献进行了报道^[13]。本文实验采用纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置^[14] (如图 2.2 所示)。其中激光器为 KrF 准分子激光器, 激光波长

为 248nm，脉冲宽度为 20ns，单次脉冲最大能量为 50mJ。分析光源为 500W 氙灯，在检测瞬态产物的吸收时可以加亮 100 倍。激光光束与分析光束垂直通过一 10mm X 10mm 的石英样品池。激发前后溶液的光信号经单色仪分光，再经光电倍增管转变为电信号，电信号由 HP54510B 300Hz 瞬态记录仪经过 A/D 转换成数字信号存于计算机内，最后用计算机处理数据。上述装置是由中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室建立和提供使用的。

本文的部分工作采用我们自己建立的纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置，其主要特点是光解激光波长可变。详见 2.5 节。

2.4 瞬态产物吸收光谱的检测及动力学分析方法

2.4.1 瞬态产物吸收光谱的检测

在同时考虑吸收池损耗和溶液本底吸收的情况下，激光引发“产物”的吸收可用如下的比尔定律描述：

$$T = T_0 e^{-\varepsilon Cl} \quad (2.1)$$

式中：T 为透射率； T_0 为本底透射率，即，不用激光引发时吸收池时溶液本身的透射率； ε 和 C 分别为产物消光系数和浓度；l 为“产物”的有效吸收长度。

由于 ε 和 T_0 依赖于波长，同时激光引发“产物”的浓度将随时间变化，故透射率 T 是波长和相对于激光脉冲的延迟时间的函数。为了明显的将“产物”浓度 C 表达出来，我们对 (2.1) 式取对数，得到

$$C = -(\ln T - \ln T_0) / \varepsilon l \quad (2.2)$$

可见，为了通过吸收谱来进行“产物”浓度测量，我们不仅需要测出 T 和 T_0 ，同时还要知道 ε 和 l。不过就我们研究的内容而言，我们感兴趣的并不一定是 C 在各个时刻的确切数值，而是 1) ε 取极大值因而 T 取极小值（对应于吸收峰）的波长位置。藉以判断“产物”的种类，2) 在一定波长（特别是“峰”所对应的波长）上，吸收（或透射率）随时间的变化规律。藉以了解该物种的动力学行为。这样一来，我们只需测出 T 和 T_0 并知道 ε 取极大值的波长就够了。

在弱吸收条件下，(2.2) 式可以化为更简便的形式。定义

$$A = 1 - T \quad (2.3)$$

$$A_0 = 1 - T_0 \quad (2.4)$$

它们分别对应于吸收率（或简称吸收）和背景吸收率。所谓弱吸收条件，是指 A 和 A_0 均远小于 1。将 (2.3) 和 (2.4) 代入 (2.2) 并应用弱吸收条件，得

$$\begin{aligned} C &= -[\ln(1-A) - \ln(1-A_0)] / \epsilon l \\ &\approx 1 (A - A_0) / \epsilon l \end{aligned}$$

$$\text{或者} \quad C \approx \Delta A / \epsilon l \quad (2.5)$$

$$\text{式中} \quad \Delta A_{\lambda} = A - A_0 \quad (2.6)$$

(2.5) 式也可写为

$$\Delta A = C \epsilon l \quad (2.7)$$

ΔA 对应于（扣除本底吸收以后）“产物”的净吸收。反过来，只有净吸收 ΔA 的变化才能正确的反映产物浓度的变化。我们将基本上使用(2.7)式。工作中掌握的要点是 1) 在一定时刻 t 测量 ΔA 随波长的变化—即该时刻的吸收谱，2) 从谱上找出与一定“产物”对应的特征吸收峰—确认“产物”并了解不同时刻各“产物”的消长情况，3) 跟踪特定“产物”特征峰随时间的演变，4) 从中分析引伸反应历程并抽取相应的反应速率常数。

在实际测量中，分析光通过样品池后的光信号经单色仪及光电倍增管后转变为电信号，电信号经 A/D 转换器转变成数字信号 V_{λ} ，并由计算机收集储存。瞬态记录仪记录下的电信号转换成吸光度要经过如下换算：

$$\Delta A = -\log(1 - RV/V_0)k \quad (2.8)$$

其中 R 为分流参数，与电路中的分流电阻有关，设计为 0.71； V_0 为加亮电压值， V 为瞬态产物在波长 λ 处光吸收所对应电信号的电压值； k 为归一化常数，与单脉冲计量有关，为平均强度除以单次脉冲计量。

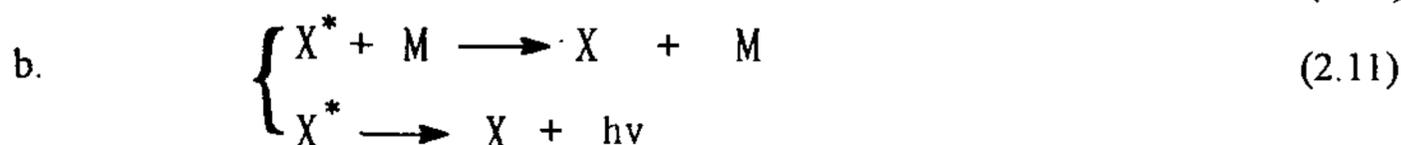
300MHz 瞬态记录仪在 0-80 μ s 范围内每隔 10ns(10^{-8} s)采集一个计数 N ，因而总共可采集 8000 个计数。 N 与 V 的关系是对应的：

$$N = (V_{\lambda}/V_{\max}) \cdot N_{\max} \quad (2.9)$$

其中 V_{\max} 和 N_{\max} 分别是最大电信号值和相应的最大计数。根据方程 (2.7) 及方程 (2.8)，由瞬态记录仪采集的计数，辅之各个实验参数就可以测定 ΔA ，进而由某一时刻各个波长处的 ΔA_{λ} 就可得到在某一时刻瞬态产物的吸收光谱。

2.4.3 动力学分析方法

1. 若瞬态产物的动力学过程符合一级动力学规律，这可分为两种情形：



式中 X 表示产物， M 为作用物。

在 a 的情形下，若 M 不被反应掉，或虽被反应掉，但被反应掉的只是极小一部分时（假或（准）一级反应）有

$$\begin{cases} \frac{d[X]}{dt} = -k[M][X] \\ [X] \Big|_{t=0} = [X]_0 \end{cases}$$

于是, $[X] = [X]_0 e^{-k[M]t}$

$$-\ln T[t]/T_0 = \epsilon l [X]_0 e^{-k[M]t}$$

$$\text{所以} \quad \ln \ln T_0/T[t] = \ln \epsilon l [X]_0 - k[M]t \quad (2.12)$$

或者当 $A(T) \ll 1$ 时,

$$\ln(A(t)-A_0) \approx \ln \epsilon l [X]_0 - k[M]t \quad (2.13)$$

因为 $[M] \approx$ 常数, 令 $k[M] = k_1$ 则有

$$\ln(\Delta A_t) = \ln \epsilon l [X]_0 - k_1 t \quad (2.14)$$

另一方面, 对于 b, 有:

$$d[X^*]/dt = (A+k[M])[X^*]$$

$$[X^*]_{t=0} = [X^*]_0$$

相应地有

$$\ln \ln T_0/T(t) = \ln \epsilon l [X^*]_0 - k(A+[M])t \quad (2.15)$$

或者当 $A(t) \ll 1$ 时有：

$$\ln(A(t)-A_0) \approx \ln \epsilon l [X^*]_0 - (A+k[M])t \quad (2.16)$$

因 A 、 $k[M]$ 为常数，令 $A+k[M]=k_1$

$$\ln(\Delta A_t) \approx \ln \epsilon l [X^*]_0 - k_1 t \quad (2.17)$$

若以 $\ln(\Delta A_t)$ 对 t 作图，得一直线，其斜率的绝对值即为瞬态产物的(表观)一级衰变速率常数 k_1 ，那么它的半衰期为 $\tau_{1/2} = 0.693/k$ 。

2. 若瞬态产物的动力学过程符合二级动力学规律，例如：



此时 S 的消失速率为：

$$-d[S]/dt = 2 k_2 [S]^2 \quad (2.19)$$

积分后并以相应的吸光度 ΔA 代替对应的浓度 $[S]$ ，则有：

$$1/(\Delta A_t) = 1/(\Delta A_0) + t 2k_2 \epsilon L \quad (2.20)$$

以 $1/(\Delta A_t)$ 对 t 作图得一直线，其斜率为 $2k_2 \epsilon L$ ，因此要得到二级动力学的速率常数 k_2 ，就必须知道反应物 S 的消光系数 ϵ 值。

2.5 激光闪光光解装置的建立

目前文献报道的研究生物分子光化学的激光光解瞬态吸收光谱装置运用的激励光源均是准分子激光器，能获得的激光波长为 KrF——240 nm; ArF——193 nm; KrCl——222 nm; XeCl——308 nm。由于生物分子结构的复杂性，研究生物分子光化学激励光的波长要具有选择性和可变性。例如，至今未见文献报道运用激光光解的方法测量芳香氨基酸的光电离电位，就是因为所运用的激光光解瞬态吸收光谱装置不能提供相应的激

光波长。

本文的部分工作就是建立了可变激光波长的激光光解瞬态吸收光谱装置。并具备以下几个特点：1)激光波长可调；2)激光能量可调（从 0.1mJ-100mJ），即能尽可能小地影响被测体系，且有利于将单光子与多光子过程区分开；3)采用小功率分析光源（150W 的 Xe 灯），以减少对样品的破坏。

图 2.3 是我们建立的纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置示意图

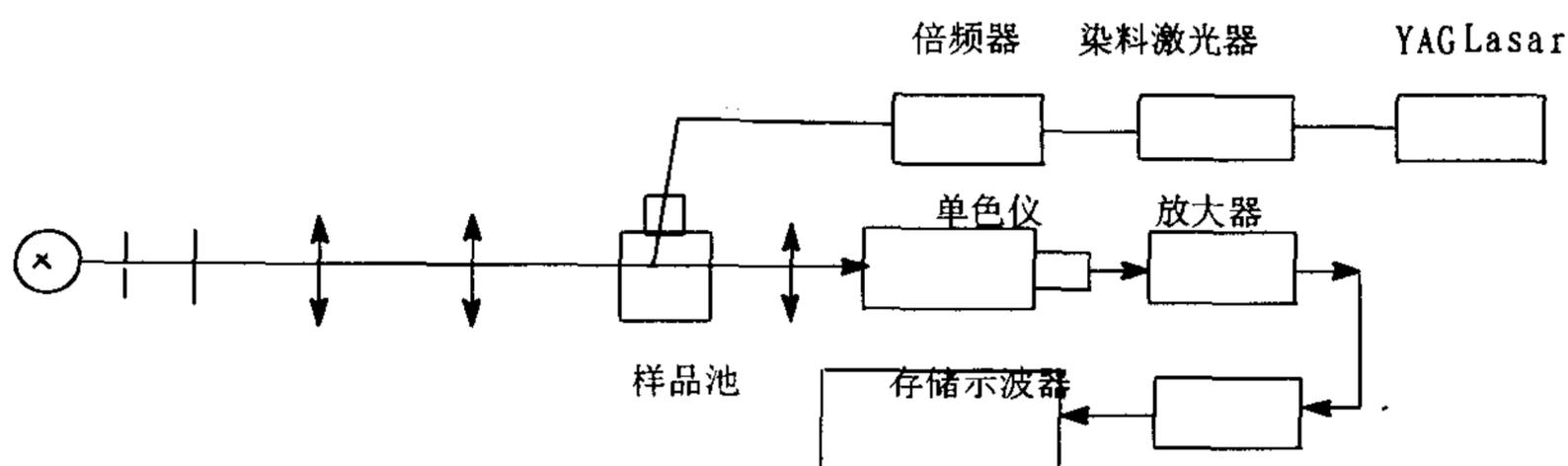


图 2.3 可变激发波长纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置示意图

激光光解瞬态吸收光谱装置的光源系统包括激光光源和分析光源两部分。激光光源：由 YAG 激光器（Spectra Physics, Model GCR-170）输出二倍频光（532 nm）或三倍频光（355 nm）泵浦一台染料激光器（Lumonics, Model HT-1000），经倍频或未经倍频输出可调谐的激光，其波长可在 200 nm-800 nm 之间选择，激光能量 1-3mJ/pulse, 脉宽 10 ns。分析光源：500 W 的连续氙灯（用金属网衰减至相当于 150 W 氙灯），输出波纹系数 2.5%。

检测体系是由单色仪，光电倍增管（GDB5 型和 EM15868D），数值储存示波器（400MHz, Tektronic TDS380 型）以及计算机组成的。其中光电倍增管及数值储存示波器的时间响应都在纳秒量级。由于采用较低激光能量，被激发的瞬态粒子数较少，为提高信噪比，采用多次平均的信号采集方式。

装置的时序由一套多通道脉冲发生器控制，其中激光器和示波器的触发是同步的。

2.6 小结

- 1) 概述了氨基酸，肽和蛋白质的激光化学实验方法，说明了激光光解是研究氨基酸及其主分激发态和自由基的最适合，最直接的方法；
- 2) 详细介绍了本文所采用的激光光解瞬态吸收光谱，以及数据处理方法。

参考文献

1. Bensasson R et al. *Photochem. Photobiol.*, 1972, 16,27
2. Salet C & Bensasson R. *Photochem. Photobiol.*, 1975, 22,231
3. Jian L., Wang W.-F., Zheng Z.-D., Yao S.-D., Zhang J.-S. and Lin N.-Y.. *Res. Chem. Intermed.*, 1991, 15, 293-301.
4. Li H.-C., Yao S.-D., Zuo Z.-H., Wang W.-F., Zhang J.-S. and Lin N.-Y.. *J. Photochem. Photobio. B: Biol.*, 1995, 28, 65-70.
5. Q.-H. Song, S.-D. Yao, H.-C. Li, Z.-H. Zuo, J.-S. Zhang and N.-Y. Lin, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1996,95 223-229.
6. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 1975,97,2599-2606.
7. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1975, 2606-2612.
8. D.V. Bent, and E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* 1975,97, 2612-
9. Armitage B., C. Yu, C. Devadoss, G. B. Schuster. *J. Am. Chem. Soc.*,1994, 116, 9847-9859.
10. Breslin D. T. and G. B. Schuster. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 2311-2319.
11. Norrish R G W and Portor M H. *Nature*, 1949, 164: 658
12. West M A in Ware W R (ed.). *Creation and Detection of the Excited State*, New York: Dekker, 1976, 4: 217.
13. 1) Arce R et al. *Photochem. Photobiol.*, 1980, 32,19; 2) Aveline B et al. *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59,328; 3) Bazin M & Ebbensen T W.. *Photochem. Photobiol.*, 1983, 37,675; 4) Grabner G et al., *Photochem. Photobiol.*, 1991, 54,673; 5) Hodgson B W & Keene J P. *Rev. Sci. Instrum.*, 1973, 43,493; 6) Kasama K et al. *J. Phys. Chem.*, 1982, 86,2420; 7)

- Keen J P & Bell C.. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.*, 1973, 5, 463; 8) Kobayashi H et al.. *Radiat. Phys. Chem.*, 1983, 21, 13; 9) Kobayashi H et al.. *Radiat. Phys. Chem.*, 1984, 21, 393; 10) Krieg M et al.. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1993, 1151, 168; 11) Loett I et al.. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 115, 8933; 12) Norrish R G W & Porter M H.. *Nature*, 1949, 164, 658; 13) Opitz J & Schulte-Frohlinde D.. *J. Photochem.*, 1987, 39, 145; 15) Reddi E et al. *Photochem. Photobiol.*, 1983, 38, 639; 16) Scaiano J C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 7747; 17) Schulte-Frohlinde D et al., *Int. J. Radiat. Biolo.*, 1985, 48, 397.
14. Zuo Z.-H., Yao S.-D., Luo J., Wang W.-F., Zhang J.-S. and Lin N.-Y. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1992, 15, 215-222.

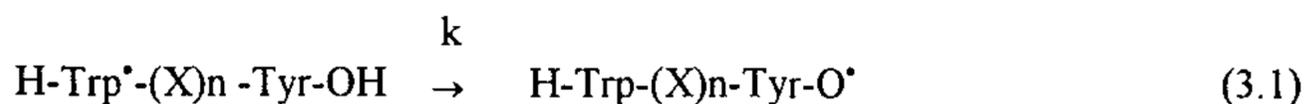
第三章 单电子氧化诱导芳香氨基酸肽链中电子转移

摘要: 运用 248 nm 激光闪光光解的方法, 研究了 DL-酪氨酸(Tyr)、D-色氨酸(Trp)、L-苯丙氨酸(Phe)、色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr)、色氨酰甘氨酸(Trp-Gly)和 n-甲酰甲硫氨酰色氨酸(n-f-Met-Tyr)被单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)过程中的自由基的生成过程。在 Trp-Tyr 的单电子氧化($\text{SO}_4^{\cdot-}$)过程中, 观察到由 $\text{Trp}/\text{N}^{\cdot-}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\cdot}$ 自由基的生成过程。

3.1 引言

最早研究肽链和蛋白质中电子转移的是 Prutz^[1-6]和 Swallow^[7-8], K. Bobrowski 和 J. Holcman 等^[9-15]做了大量卓有成效的工作, 为这一领域研究的发展作出了突出的贡献。M. Faraggi 和 M. R. DeFlippis^[16-19]等则是该领域后起之秀, 他们的研究的范围不断深入, 到目前为止, 已经完成了从开始时的二肽模型到多肽模型甚至到天然蛋白质^[5, 7]的过度, 模型肽链中的氨基酸也不仅限于开始时的色氨酸和酪氨酸, 扩展到含硫肽链中电子键的形成和电子转移; 用甘氨酸, 谷氨酸, 丝氨酸或脯氨酸等作为插入物连接到色氨酸和酪氨酸中间, 研究长程电子转移(LRET)情况。研究内容从开始时考察电子转移是通过分子间还是分子内进行的, 是通过骨架转移(TB)还是通过空间接触转移(TS), 到现在用 Marcus 理论^[20]研究反应机理和电子转移速率常数与转移距离的依赖关系。

含芳香氨基酸肽链中电子转移的研究基本上集中在含色氨酸和酪氨酸的肽链和蛋白质的电子转移:



k 是电子转移速率常数, X 是插入的氨基酸残基, X=Gly, Glu 和 Pro 等, n 是氨基酸残基的个数。对影响肽链中电子转移速率的各种因素前人已进行了详尽的考察, 这些因数包括氨基酸构型、氨基酸次序、温度、pH 值、添加物、插入物和链长的影响等。

上述研究基本上都是采用脉冲辐解进行的。在国内直到最近^[21-22]才有人对磷酸化的二肽进行了脉冲辐解和激光光解研究, 以探讨电子转移情况, 得出一些比较有意义的初步结果。本文运用激光光解过硫酸钠产生 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 自由基诱导芳香氨基酸及肽的氧化, 观察到含芳香氨基酸肽的电子转移反应。运用激光光解的方法进行含芳香氨基酸肽的

电子转移反应还未见文献报道。

3.2 实验

实验所用样品中，DL-酪氨酸(Tyr)、D-色氨酸(Trp)、L-苯丙氨酸(Phe)、色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr)、色氨酰甘氨酸(Trp-Gly)和 n-甲酰甲硫氨酰色氨酸(n-f-Met-Tyr)均为 Sigma 公司产品，未经进一步纯化直接使用。过硫酸钠为分析纯(上海试剂一厂产品)，经一次重结晶后使用。所有溶液的配制及纯化均用三重蒸馏水。样品在实验前用高纯氮(99.99%)鼓泡 20 分钟。

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 248nm，脉宽 20ns，每脉冲最高能量<50mJ，信号由 HP54510B 300MHz 瞬态记录仪记录，并转化为数字信号送入 PC-486 个微机进行处理。实验装置如图 2.2 所示，其详情已在 2.3 节中交待过。此外还可参看文献[23]。

3.3 实验结果

3.3.1 芳香氨基酸

图 3.1 是 10mMNa₂S₂O₈ 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱。从图 3.1 可见，激光作用下过硫酸钠分解为 SO₄^{•-} 自由基^[24]，在 450 nm 呈现一个吸收峰，随后逐渐衰减，即 SO₄^{•-} 自由基复合生成 S₂O₈²⁻。

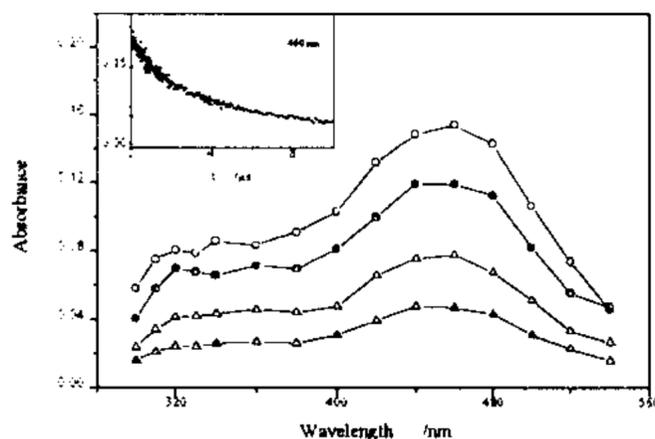


Fig. 3.1 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ neutral aqueous solution saturated with N₂ . at 0.1 μs(o), 2 μs(●), 5 μs(Δ), 10 μs(▲). Insets: Transient decay traces at 450nm



从 450 nm 处的瞬态吸收值随时间的变化关系可得到 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 衰减的二级速率常数为 $k_2 = 4.81 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

图 3.2、图 3.3 和图 3.4 分别是 0.2mMTrp/10mMNaS₂O₈、0.2mMTyr/10mMNaS₂O₈ 和 0.2mMPhe/10mMNaS₂O₈ 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱，图谱结果与脉冲辐解结果一致， $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 单电子氧化 Trp, Tyr, Phe 分别生成 Trp/N[•], TyrO[•], Phe[•] 的自由基。

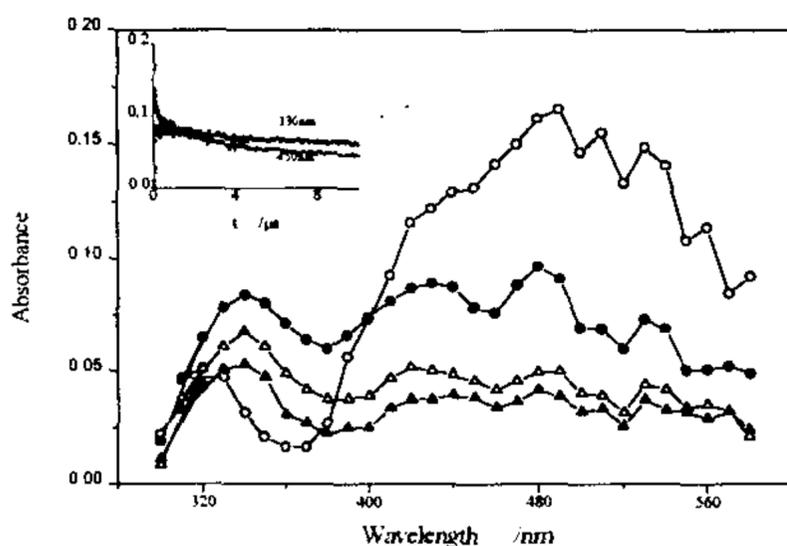


Fig. 3.2 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Trp}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 at $0.08 \mu\text{s}$ (○), $1 \mu\text{s}$ (●), $10 \mu\text{s}$ (△), $40 \mu\text{s}$ (▲) after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1) at 330nm (2) at 450nm

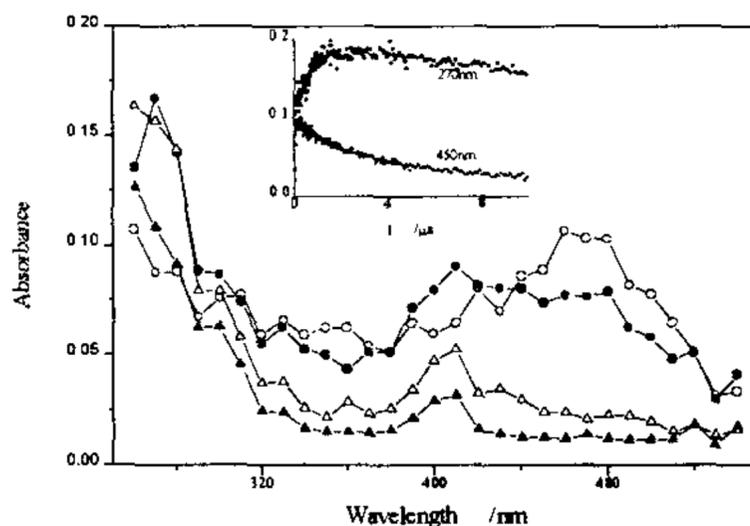


Fig. 3.3 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Tyr}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 at $0.1 \mu\text{s}$ (○), $1 \mu\text{s}$ (●), $10 \mu\text{s}$ (△), $40 \mu\text{s}$ (▲) after the laser pulse.

40 μ s(\blacktriangle). after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1) at 270nm (2) at 450nm

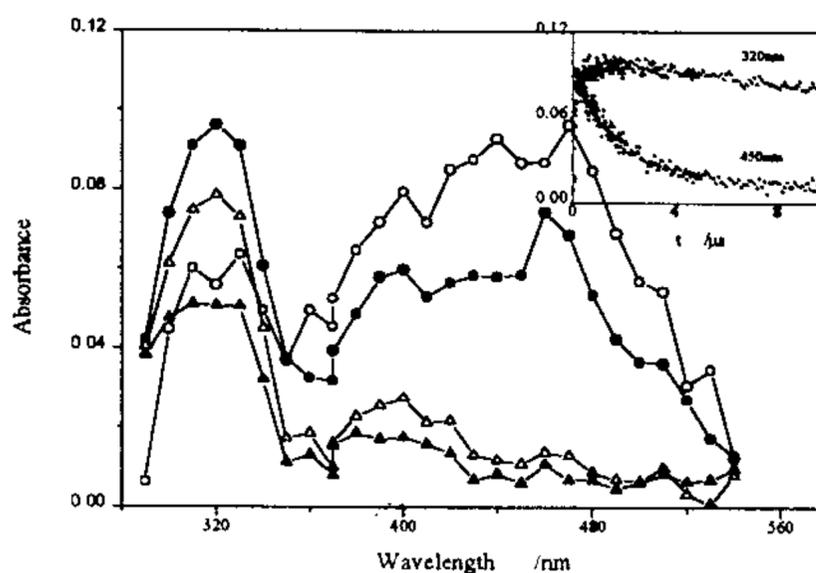


Fig. 3.4 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Phe neutral aqueous solution saturated with N_2 . at 0.1 μ s(o), 1 μ s(\bullet), 10 μ s(Δ), 40 μ s(\blacktriangle). after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1) at 320nm (2) at 450nm

3.3.2 含芳香氨基酸二肽

Trp-Gly, n-f-Met-Trp 与 Trp 被 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 单电子氧化后分别所得到的瞬态吸收光谱一致, 见图 3.2、图 3.5 和图 3.6。

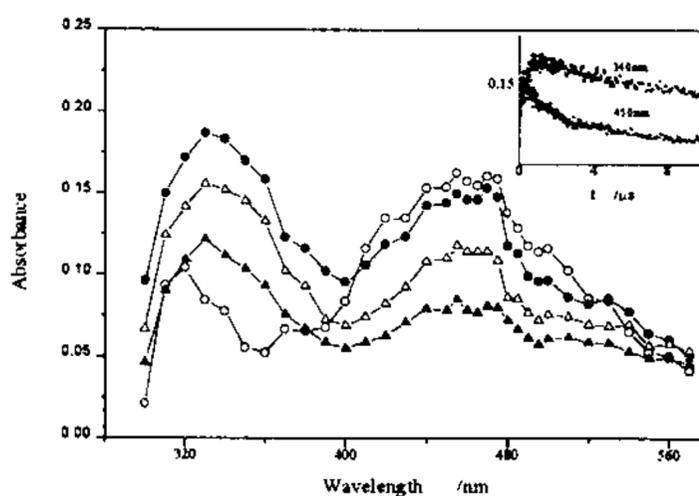


Fig. 3.5 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ N-Met-Trp neutral aqueous solution saturated with N_2 . at 0.1 μ s(o), 10 μ s(\bullet), 20 μ s(Δ), 40 μ s(\blacktriangle). after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1) at 340nm (2) at 450nm

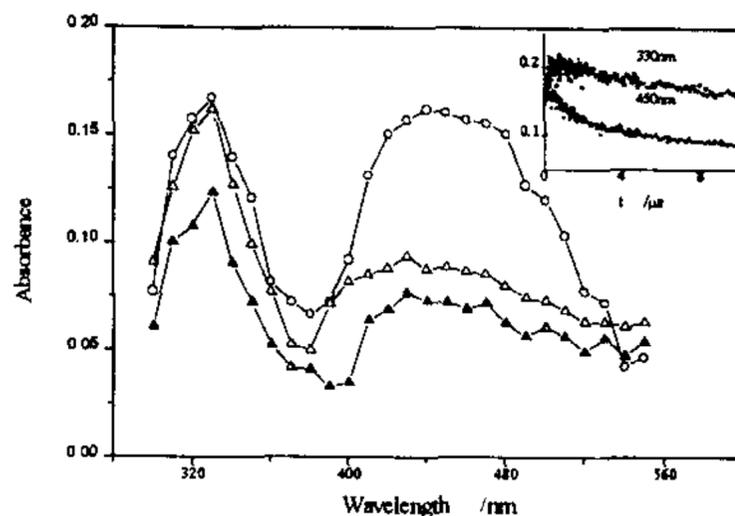


Fig. 3.6 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Trp-Gly}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 . at $0.1 \mu\text{s}$ (o), $10 \mu\text{s}$ (Δ), $40 \mu\text{s}$ (\blacktriangle). Inset: Transient decay traces (1) at 330 nm (2) at 450 nm

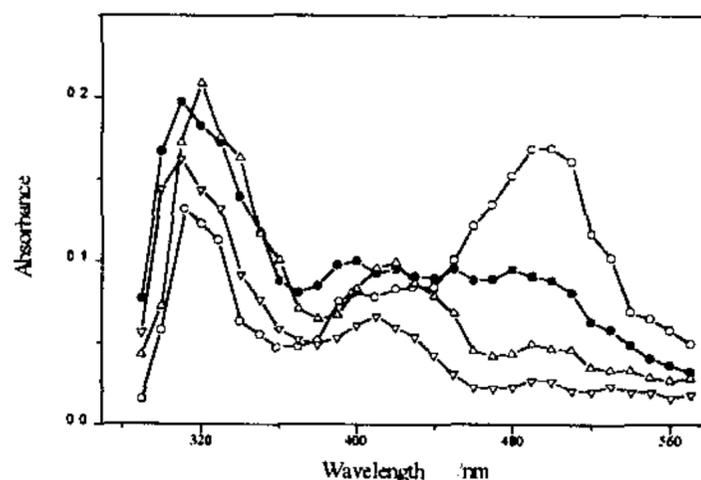


Fig. 3.7 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Trp-Tyr}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 . at $0.07 \mu\text{s}$ (\square), $0.5 \mu\text{s}$ (\blacksquare), $5 \mu\text{s}$ (Δ), $40 \mu\text{s}$ (\blacktriangle). after the laser pulse.

从 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 单电子氧化 Trp-Tyr 的瞬态吸收光谱(图 3.7)上可观察到分子内的电子转移, 即由 $\text{Trp/N}^{\cdot-}\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr/O}^{\cdot}$ 自由基的转变过程: 410 nm 的吸收峰(TyrO^{\cdot})逐渐生成。

3.4 小结

运用 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 诱导氧化芳香氨基酸和含芳香氨基酸二肽, 观察到 $\text{Trp}/\text{N}^{\cdot}$, TyrO^{\cdot} , Phe^{\cdot} 的自由基的生成和 $\text{Trp}/\text{N}^{\cdot}-\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}-\text{Tyr}/\text{O}^{\cdot}$ 的电子转移过程。因运用激光光解瞬态吸收光谱方法研究芳香氨基酸及肽的电子转移所得到的结果与前人运用脉冲辐解的方法研究芳香氨基酸及肽的电子转移所得到的结果相比, 没有发现新的结果, 所以没有进行进一步的详细分析。

参考文献

1. W. A. Prutz, *Int. J. Radiat. Bio.*, 36(1979)513.
2. W. A. Prutz, E. J. Land, *J. Chem. Soc., Faraday Trans., I*, 77(1981)281.
3. W. A. Prutz, F. Sirbert, J. Butler, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 705(1982)139.
4. J. Butler, E. J. Land, W. A. Prutz, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 705(1982)150.
5. W. A. Prutz, J. Butler, E. J. Land, *Int. J. Radiat. Biol.*, 47(1985)149.
6. W. A. Prutz, J. Butler, E. J. Land, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 55(1989)539
7. J. Butler, E. J. Land, A. J. Swallow, et al., *Radiat. Phys. Chem.*, 23(1984)265.
8. J. Butler, W. A. Prutler, E. J. Land, et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 348(1986).
9. K. Bobrowski, J. Holcman, *Radiat. Phys. Chem.*, 28(1989)555.
10. K. Bobrowski, R. Lubis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 50(1986)1039.
11. K. Bobrowski, J. Holcman, *Int. J. Radiat. Biol.*, 52(1987)139.
12. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 57 (1990) 919.
13. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2(1991) 353.
14. K. Bobrowski, J. Holcman, J. Poznanski et al., *J. Phys. Chem.*, 96(1992)10036.
15. K. Bobrowski, K.L. Wierzchowski, J. Holcman, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, 60 (1992)507.
16. M. R. DeFelippis, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 112(1990)5640.
17. M.R. DeFelippis, M. Faraggi, M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 112(1990) 5640.
18. M.R. DeFelippis, M. Faraggi, M.H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.*, 111(1989) 5141.

19. M.R. DeFelippis, C.P. Murthy, F. Broitman, et al., *J. Phys. Chem.*, 95(1991)3416.
20. R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, 818(1985)265.
21. Z. Y. Wang, Z. C. Zhang, M. W. Zhang, et al., *Chinese J. Chem Phys.*, 6(4), 1993, 335.
22. Z. Y. Wang, Z. C. Zhang, M. W. Zhang, et al., *Chinese J. Chem Phys.*, 8(3), 1995, 203.
23. Li H C, Yao S D, Zuo Z H et al. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1995, 28:65-70..
24. Mcelroy W.T., Wayagood. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990, 86 (14) : 2557-2564.
25. E. Hayon, A. Treinin and J. Wilf, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94: 47-57.

第四章 甲硫氨酸衍生物及其二肽的单电子氧化反应

4.1 引言

对蛋白质残基含硫氨基酸的光化学的研究经久不衰. 热点是围绕蛋白质残基甲硫氨酸产生的含硫活性中间体和反应机理研究. Hiller^[1]、Asmus^[2-3]和 Bobrowski^[4-5]及同事分别运用脉冲辐解实验方法作了大量的工作, 研究范围涉及含硫中心自由基的产生和衰变. 进行的脉冲辐解研究表明: 1. 氧化总是发生在甲硫氨酸的硫原子上; 2. 脉冲辐解产生的 HO 自由基诱导氧化含硫氨基酸的机理被认为是单电子氧化反应^[1]; 它的氧化过程经常不能由直接单电子转移描述, 因为 HO 自由基总是加到含硫氨基酸的硫原子上, 在溶液中的质子的帮助下脱去水分子, 并生成含硫阳离子^[1-5]. HO 自由基加成也许不是经过脱 OH 离子反应, 而是导致完全不同于电子转移反应的反应机理; 3. 氧化的硫原子具有与另一临近硫原子或杂原子上的游离 p 电子对络合变稳定的趋向^[2-5]; 4. HO 自由基氧化产生的[S..S]⁺只能存在 pH < pKa (-COOH)时强酸溶液中, 而在弱酸或中性溶液中没有观察到[S..S]⁺^[1-5].

激光诱导的含硫氨基酸的研究主要在光敏化氧化反应, 激光诱导单电子的氧化几乎没有报道. K₂S₂O₈ 是氧化剂, 在光化学中, 由于它经光解产生强氧化性的 SO₄⁻阴离子自由基, 而被广泛用于研究生物体系的反应^[6-10]. Schoneich^[11]等人用脉冲辐解方法在较低波段范围 (250-350 nm) 研究了 SO₄⁻ 在弱酸溶液中氧化 Thr-Met 二肽, 结果表明 N-端 Thr 分解生产率很低小分子乙醛. 国内运用脉冲辐解诱导产生 SO₄⁻ 对胱氨酸的氧化进行研究^[12]. 本工作选择含 MET 的模型二肽, 在生物体系 pH 为 7-7.4 环境中采用 248 nm 激光光解 K₂S₂O₈ 水溶液产生 SO₄⁻ 阴离子自由基, 研究典型的单电子氧化剂 SO₄⁻ 对甲硫氨酸及其肽衍生物的氧化反应, 用时间分辨的吸收光谱研究由此产生的活性中间体和氧化反应机理. 此类工作至今还未见文献报道.

4.2 材料与方方法

丙氨酸(Ala)、D-甲硫氨酸(Met)、L-甲硫氨酸甲脂(MME)、丙氨酰甲硫氨酸(Ala-Met), N-甲酰甲硫氨酰色氨酸(N-Formyl-Met-Trp)和甲硫氨酰甲硫氨酸(Met-Met)为

Sigma 公司的产品，未经处理直接使用。K₂S₂O₈(上海试剂一厂产品，分析纯)，重结晶后使用。实验在中性溶液中室温下进行，所有溶液用三重蒸馏水配制。样品试验前用高纯氮 N₂(99.99%)鼓泡 20 分钟，除去溶解于样品中的氧。

激光光解实验装置采用 KrF 准分子激光(波长 248nm，脉宽 20 ns，脉冲能量 20-30mJ)，辐照在石英样品池上(1×1cm)，光解 K₂S₂O₈ 产生 SO₄^{·-}。SO₄^{·-}与氨基酸反应产生的瞬态物质，由 500W 氙灯光源进行动态吸收测量，分析光经 44W 型单色仪分光后，被 1P28 光电倍增管接收产生的信号送入 HP54510B 数字示波器记录并经 SUN-486 计算机储存和处理。装置介绍详见文献[13]。

用 248 nm 激光辐照含 1×10⁻³ M K₂S₂O₈ 的中性去氧水溶液，获得瞬态吸收光谱见图 4.1。如图所示，在激光光解 1 μs 后，在 400 nm-500 nm 波长范围内产生

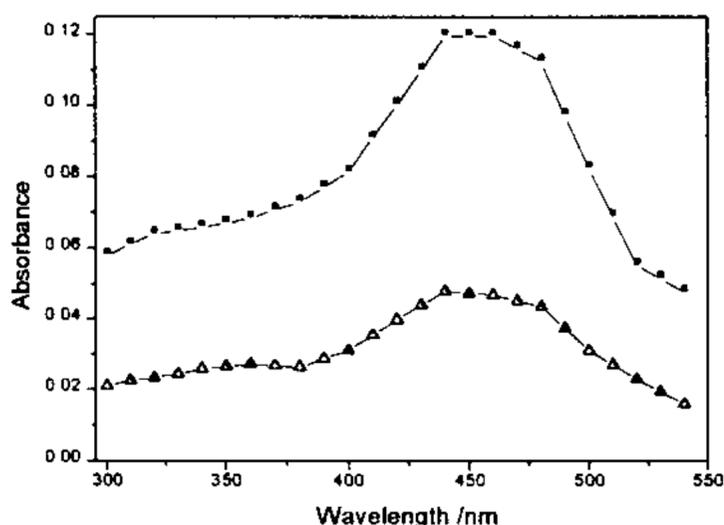


Fig.4.1 Transient absorption spectrum obtained from laser photolysis of 1×10⁻³ mol dm⁻³ K₂S₂O₈ neutral aqueous solution saturated with N₂ at ■(1 μs); ▲(10 μs); after the laser pulse.

一宽而强的吸收峰，最大吸收峰的位置450 nm。这一吸收是S₂O₈²⁻吸收一个光子产生SO₄^{·-}阴离子自由基(1式)的贡献。这与以前报导一致^[14]。10 μs后记录到得的瞬态吸收光谱的变化，450 nm位置的吸收峰大大减弱。



4.3. 甲硫氨酸衍生物单电子氧化的瞬态吸收光谱

4.3.1 甲硫氨酸

在 $K_2S_2O_8$ 中性水溶液加入一定的甲硫氨酸，经激光光解后获得的瞬态吸收光谱与由激光光解纯的 $K_2S_2O_8$ 中性水溶液获得的瞬态吸收光谱发生了很大的变化。图 4.2 是含 $1 \times 10^{-3} M K_2S_2O_8$ ， $2 \times 10^{-4} M Met$ 的中性水溶液的激光光解瞬态吸收光谱。与图 4.1 比较，480nm、380nm 处出现新的吸收峰。其 480nm 的吸收为 $[S \cdots S]^{+2}$ 中心-3 电子键(2C-3E)含硫阳离子自由基的贡献^[1]，在激光脉冲 $1 \mu s$ 达到

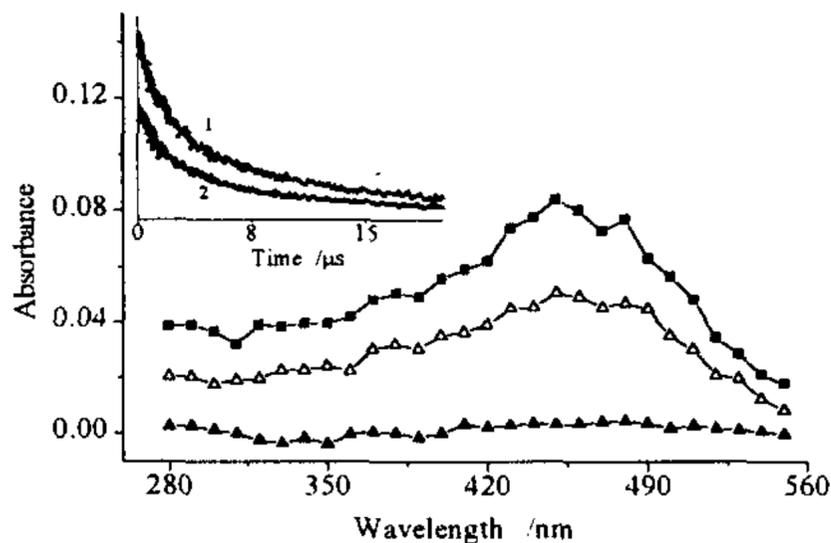
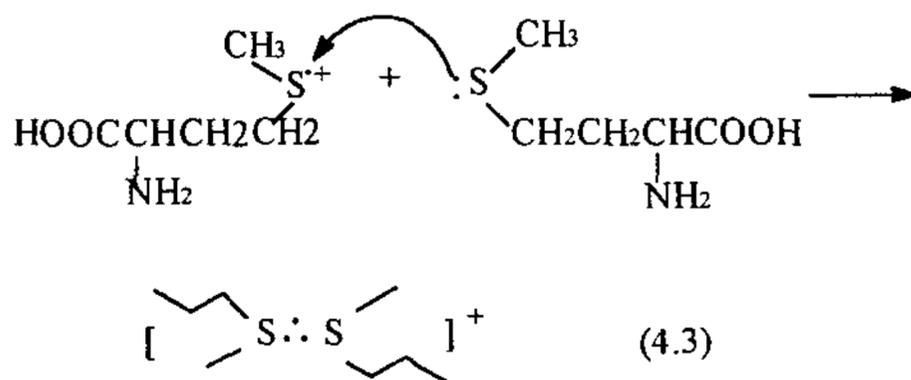
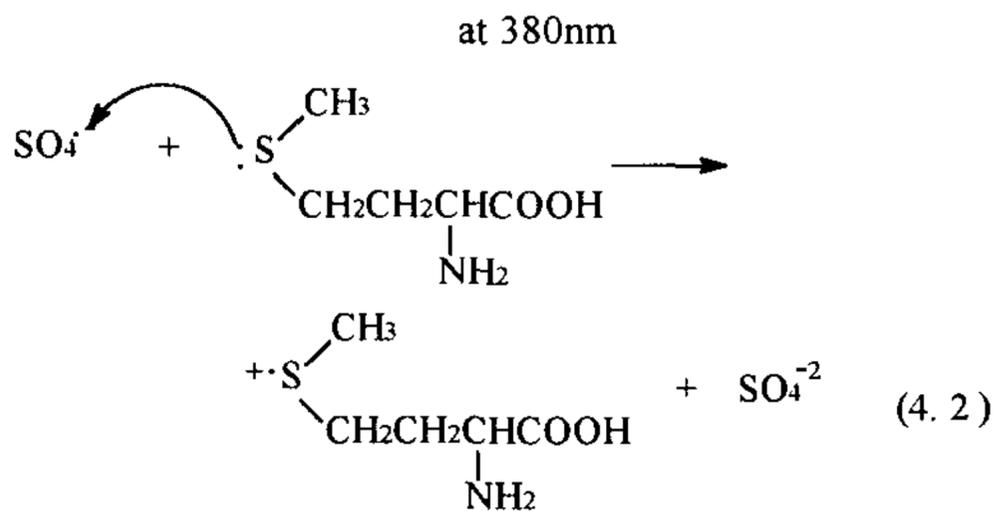


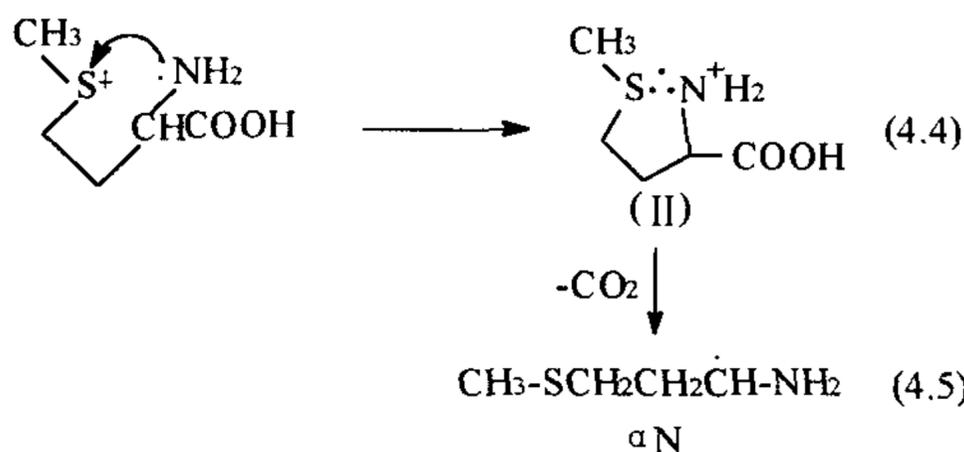
Fig.4.2 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} K_2S_2O_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} Met$ neutral aqueous solution saturated with N_2 at ($1 \mu s$); Δ ($10 \mu s$); \blacktriangle ($60 \mu s$) after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1)at 480nm (2)



最大值. $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 是强的单电子氧化剂, 含硫氨基酸中的硫原子电离势很低(10eV)^[15], 很容易被 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 从硫原子抽取一个电子, 反应生成含硫阳离子自由基 $>\text{S}^{\cdot+}$ (见式 4.2), $>\text{S}^{\cdot+}$ 不稳定, 有与周围环境 S 或杂原子上未配对的 P 电子对络合变的稳定的趋向. 所以第二个 Met 分子 S 原子上的 P 电子对与 $>\text{S}^{\cdot+}$ 进行分子间转移反应生成 $[\text{S}:\text{S}]^+$ (见式 4.3). 吸收由三电子键中的键合电子进行 $2\sigma-1\sigma^*$ 跃迁产生的.

4.3.2 380nm吸收峰归属

380 nm 是 $[\text{>S}:\text{N}]^+$ (II) 阳离子自由基的吸收. $[\text{>S}:\text{N}]^+$ 是由 $>\text{S}^{\cdot+}$ 与分子内氨基氮原子未配对的 p 电子对进行分子内电子转移产生的. 因 $>\text{S}^{\cdot+}$ 不稳定, 有与周围环境 S 或杂原子 (N 等) 上未配对的 P 电子对络合变的稳定的趋向. 氨基氮原子未配对的 p 电子对向 $>\text{S}^{\cdot+}$ 进行分子内电子转移产生 $[\text{>S}:\text{N}]^+$, 一是分散了上 $>\text{S}^{\cdot+}$ 的单自由基离子特征, 二是 $[\text{>S}:\text{N}]^+$ 具有五圆环结构, 在热力学上比较稳定. 通过对 380 nm 的衰变曲线分析, 其半衰期为 $4.16\mu\text{s}$.



4.3.3 甲硫氨酸甲脂

MME 与 Met 在结构上的区别是 Met 中的羧基被甲酯化. 图 4.3 是含 $4 \times 10^{-3}\text{M}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $2 \times 10^{-4}\text{M}$ MME, 中性溶液激光光解瞬态吸收光谱. 如图 4.3 所示, 比较图 4.2 和图 4.3, 与图 4.2 一样, 除了 450 nm 的 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的吸收外, 在 480 nm, 380 nm 处有强吸收峰. $10\mu\text{s}$ 后记录的瞬态吸收光谱, 380 nm 的吸收强于 480 nm 的吸收. 480 nm 由含硫三电子键 $[\text{S}:\text{S}]^+$ 产生的吸收. $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 首先与 MME 中的 S 原子进行电子转移反应生成 $>\text{S}^{\cdot+}$, $>\text{S}^{\cdot+}$ 与另一 MME 分子中的硫原子进行分子间的电子转移反应生成 $[\text{S}:\text{S}]^+$, 同时 $>\text{S}^{\cdot+}$ 与分子内与分子内氨基氮原子孤对 p 电子对进行分子内电子转移产生

$[S\cdot\cdot N]^+$. $10\mu s$ 后记录的瞬态吸收光谱, 380 nm 的吸收强于 480 nm 的吸收是因为 MME 与 Met 在结构上的区别是 Met 中的羧基被甲酯化, 生成的 $[>S\cdot\cdot N]^+$ (III) 不能脱羧, 其半衰期为 $7.65\mu s$, 比 (II) 稳定. 380 nm 的吸收变强, 480 nm 的吸收变弱. 说明 $>S^{\cdot+}$ 生分内电子转移和与第二个 Met 分子进行分子间电子转移反应是竞争反应.

4.3.4 丙氨酰甲硫氨酸

Ala-Met 结构特征是 C-端含 Met 的二肽. C-端 Met 不能生成 $[S\cdot\cdot N]^+$ ^[15-17]. 但图 4.4 表明激光光解含有 $10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的 $2\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ Ala-Met}$ 中性水溶液获

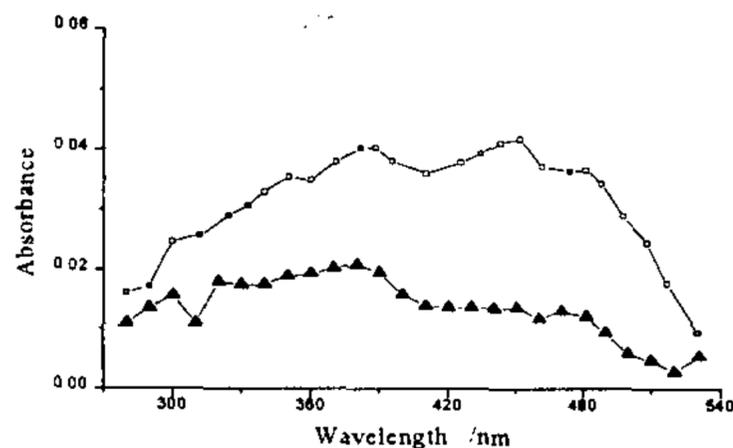
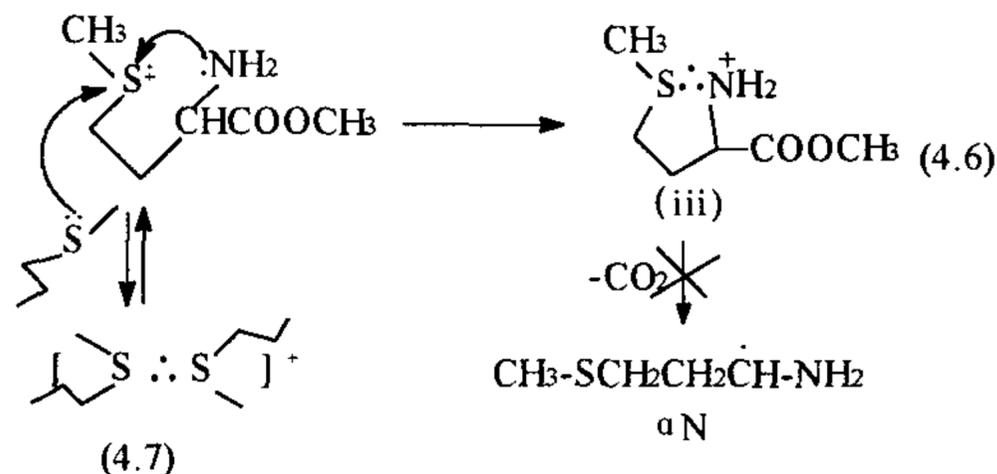


Fig.4.3 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1\times 10^{-3}\text{ mol dm}^{-3}\text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2\times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}\text{ MME}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 . at $1\mu s$ (■); at $10\mu s$ (▲); after the laser pulse.



得的瞬态吸收光谱. 激光作用之后立即($0.1\mu s$)记录的瞬态吸收光谱与单纯 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的水溶液的瞬态吸收光谱一致, 吸收峰为 450 nm , 表明激光作用之初体系中生成了 $\text{SO}_4^{\cdot-}$. $2\mu s$ 时除了 450 nm 处的吸收峰率变弱外, 在 380 nm 、和 480 nm 各有一吸收峰, 从较长时间记录的瞬态吸收谱($5\mu s$ 、 $20\mu s$)发现, 380 nm 吸收峰的寿命比 480 nm 的长. 480 nm 的吸收为 $[S\cdot\cdot S]^+$ 硫硫三电子键的贡献^[1-5]. 反应机理与 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 氧化 Met 和 MME 机

理相同，首先被 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 抽取一个电子生成 $>\text{S}^{\cdot+}$ ((6.8)式)， $>\text{S}^{\cdot+}$ 与另一甲硫氨酸中的 S 原子进行分子间电子转移形成硫-硫三电子键 $[\text{S}::\text{S}]^+$ ((4.9)式)。亦可发生分子内电子转移生成 α -硫烷基自由基((4.10)式)。 α -硫烷基自由基在 290 nm 处有弱的吸收^[1,4]，图 4.4 的结果与此相符。

4.3.5 $[\text{S}::\text{O}]$ 的生成

Ala-Met 结构特征是 C 端含 Met 的二肽。C 端 Met 不能生成 $[\text{S}::\text{N}]^+$ ^[15-17]。但图 4.4 表明在激光脉冲 $2\ \mu\text{s}$ 记录的瞬态吸收光谱，除已知的 450 nm 和 480 nm 的特征吸收峰外，380nm 左右也有吸收， $5\ \mu\text{s}$ 后记录的瞬态吸收光谱，450 nm、480 nm 的吸收迅速减弱， $20\ \mu\text{s}$ 后几乎消失，唯有 380 nm 左右的吸收存在。由于 $[\text{S}::\text{O}]$ 的吸收峰也在 380 nm^[3,15]，所以这一吸收峰可能源于 $[\text{S}::\text{O}]$ 。 $[\text{S}::\text{O}]$ 的生成过程是 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 氧化 Ala-Met 中 Met 残基生成 $>\text{S}^{\cdot+}$ ， $>\text{S}^{\cdot+}$ 与羧基氧原子的未成键电子对结合以稳定 $>\text{S}^{\cdot+}$ ，生成具有六员环 $[\text{S}::\text{O}]$ 三电子键(见(4.12)式)。 $[\text{S}::\text{O}]$ 衰变的机理是脱羧生成 α -N 自由基和 CO_2 (见(4.13)式)。 α -N 自由基是强还原剂，吸收峰在 350nm 左右^[1]。与图 6.4 中的实验事实相符。

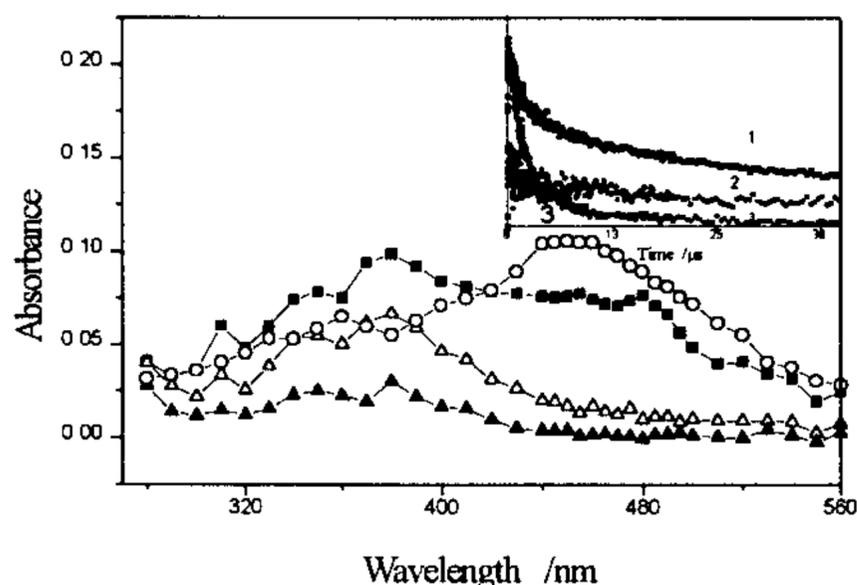
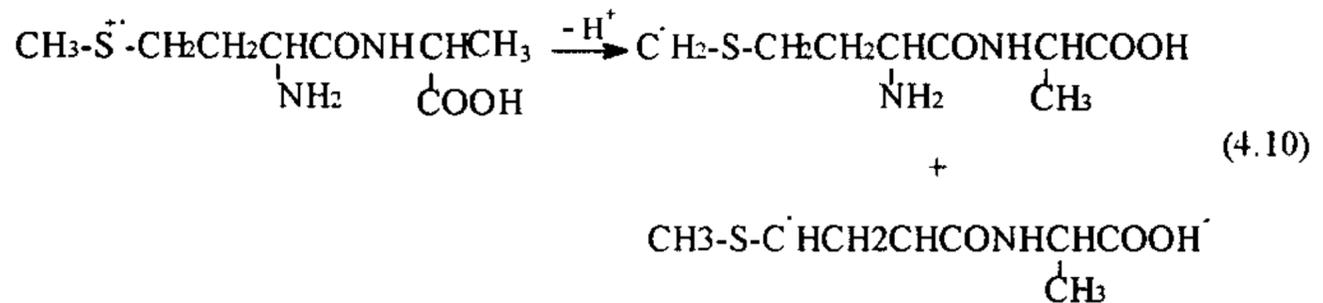
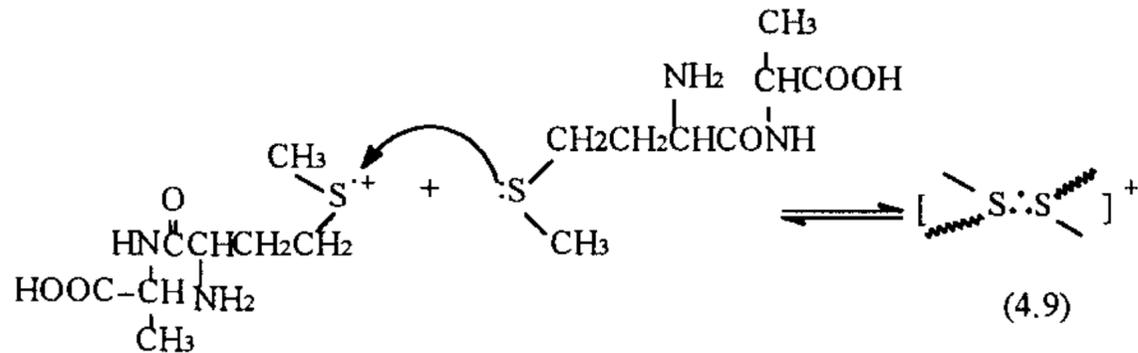
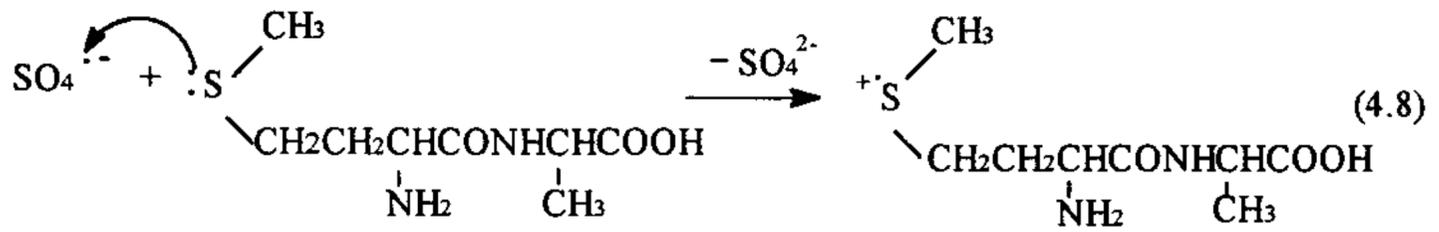
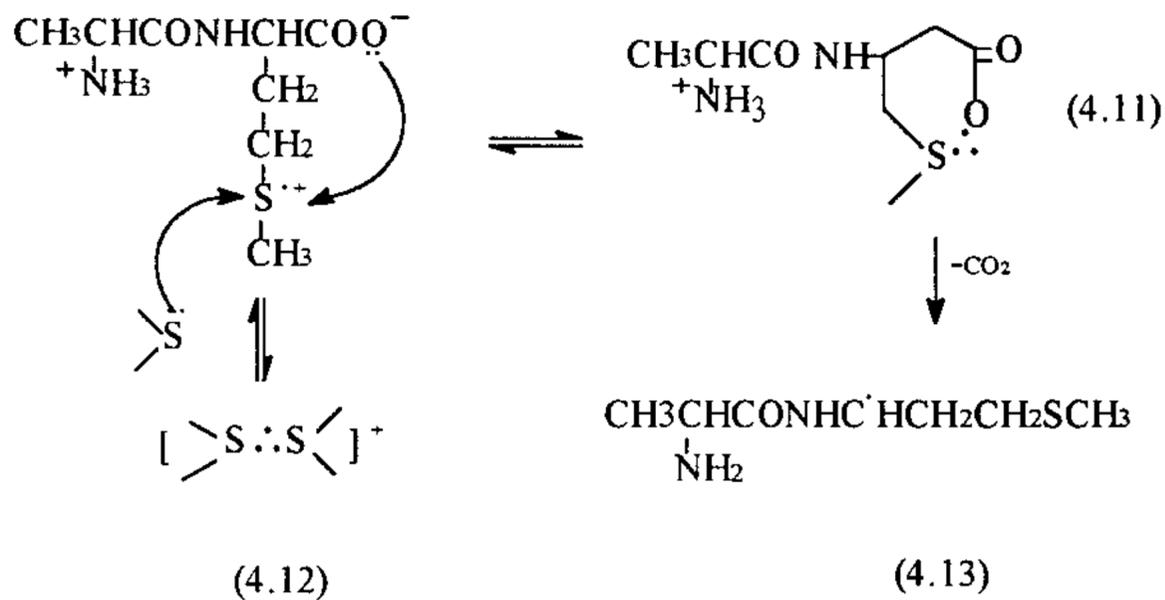


Fig.4.4 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Ala-Met neutral aqueous solution saturated with N_2 at 0 ($0.1\ \mu\text{s}$), \blacksquare ($2\ \mu\text{s}$), \triangle ($5\ \mu\text{s}$), \blacktriangle ($20\ \mu\text{s}$) after the laser pulse. Insets: Transient decay traces (1) at 380 nm (2) at 480nm (3) at 290 nm.



显然，(4.11)、(4.13)式与(4.12)式的反应是相互竞争的(见(4.11)-(4.12)式)。

以下二个因素有利于(4.11)和(4.13)式的反应：一是[S:O]为



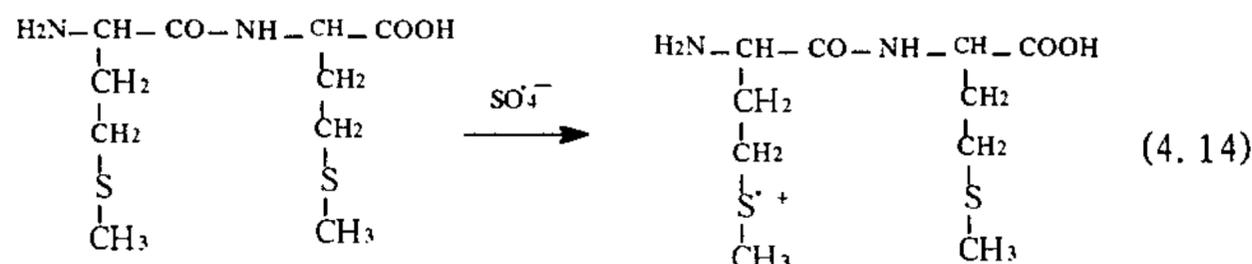
α-N自由基

六员环结构，在热力学上比较稳定；二是[S:O]经受脱羧反应为不可逆反应，平衡向[S:O]生成的方向转移，有利于[S:O]的生成。脱羧反应产生的α-N自由基是强还原剂，必然与体系中的SO₄^{·-}起氧化还原反应。大大消耗了SO₄^{·-}，与图4.1和图4.3相

比, $5 \mu\text{s}$ 后记录到的瞬态吸收光谱, $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 在 450nm 处的吸收大大减弱. 这一实验事实有力的证明了 $[\text{S}:\text{O}]$ 的生成.

4.3.6 甲硫氨酰甲硫氨酸

图 4.5 是 $1 \times 10^{-3} \text{ M K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和 $2 \times 10^{-4} \text{ M Met-Met}$ 中性水溶液激光光解后瞬态吸收光谱. 图中表明在 280 nm 至 560 nm 均有吸收, 吸收峰分别为 290 nm , $350\text{-}400 \text{ nm}$, 450 nm 和 480 nm . 衰变至 $10 \mu\text{s}$, 450 nm 和 480 nm 的吸收几乎消失, 在 $350\text{-}400 \text{ nm}$ 有一个吸收高峰, 形成平台, 在 280 nm 往下的低波段有强烈吸收. 图中的 480 nm 吸收峰类似在 Met , MME , Ala-Met 体系中观察到的是 $[\text{S}:\text{S}]^+$ 的吸收. Met-Met 结构特征是两个 Met 形成二肽, 分别为 N-端 Met 和 C-端 Met . Met-Met 中的两个硫离子被 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 进攻的机会相等, 分别生成 $\text{N-端} > \text{S}^{\cdot+}$ 和 $\text{C-端} > \text{S}^{\cdot+}$. ((4.14)-(4.15)式) Met-Met 的 $[\text{S}:\text{S}]^+$ 生成几率大于其它几种 Met 及含 Met 二肽



的 $[\text{S}:\text{S}]^+$ 生成几率, 但 Met-Met 生成的 $[\text{S}:\text{S}]^+$ 为大环结构((4.16)-(4.17)式), 热力学上不稳定.

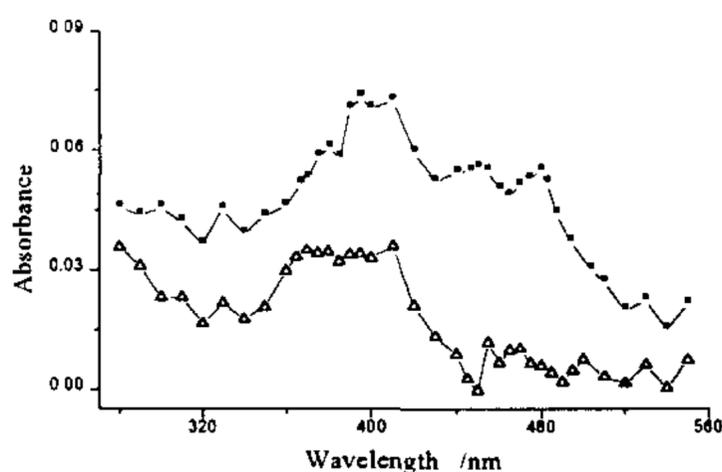
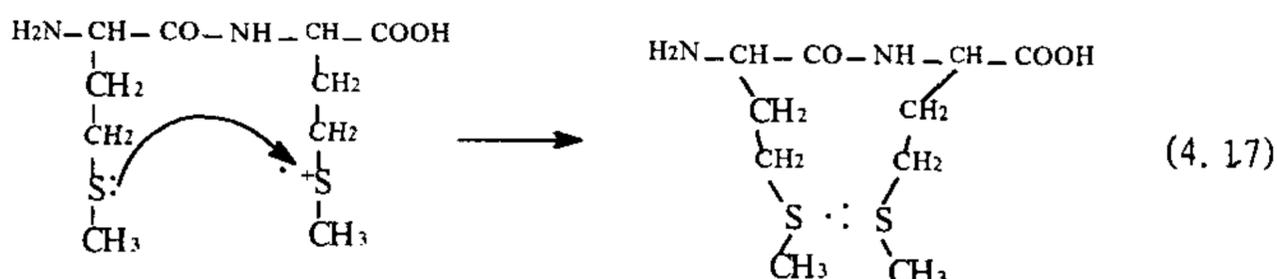
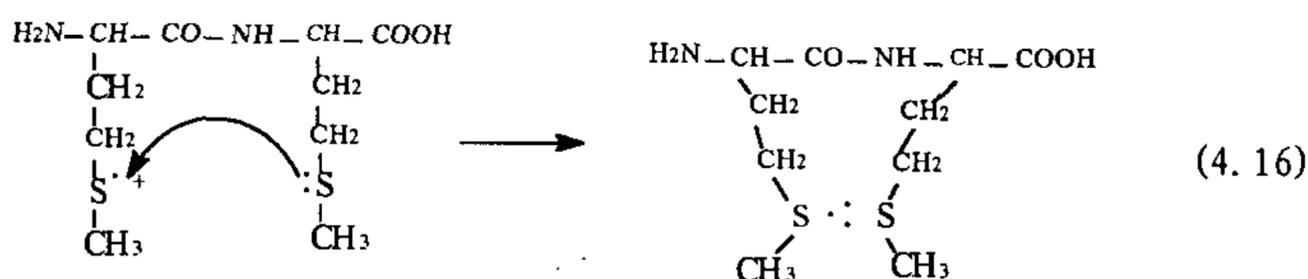
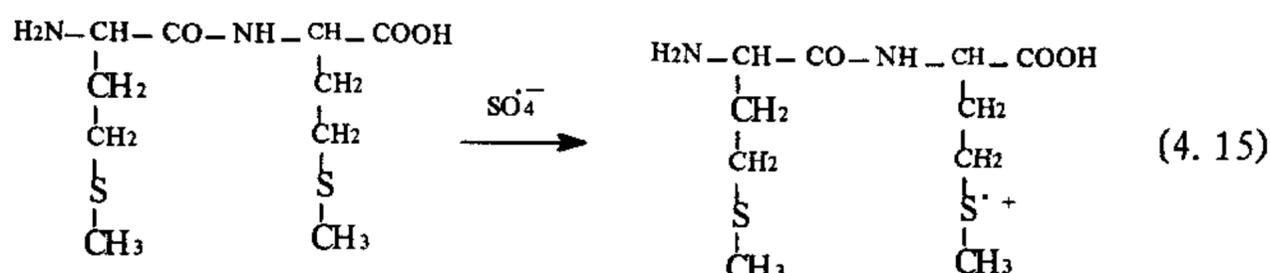
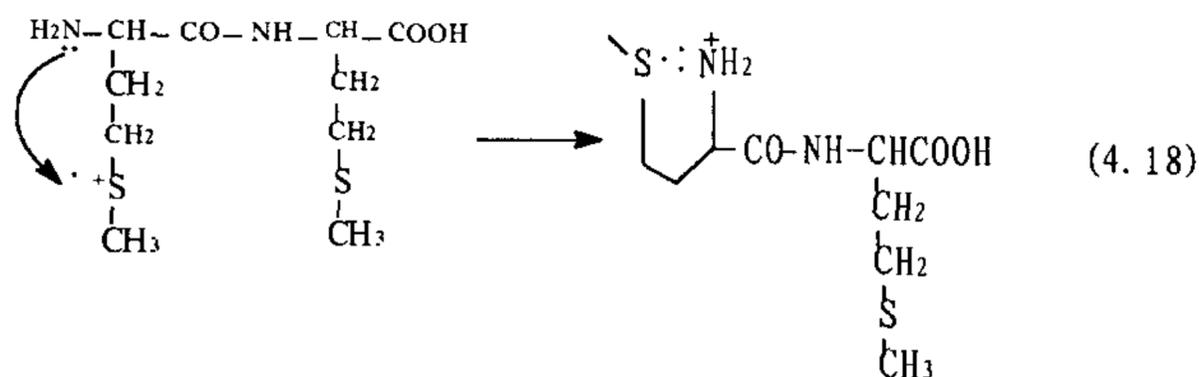


Fig.4.5 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Met-Met}$ neutral aqueous solution saturated with N_2 at

1 μ s(■); 10 μ s(△); after the laser pulse.

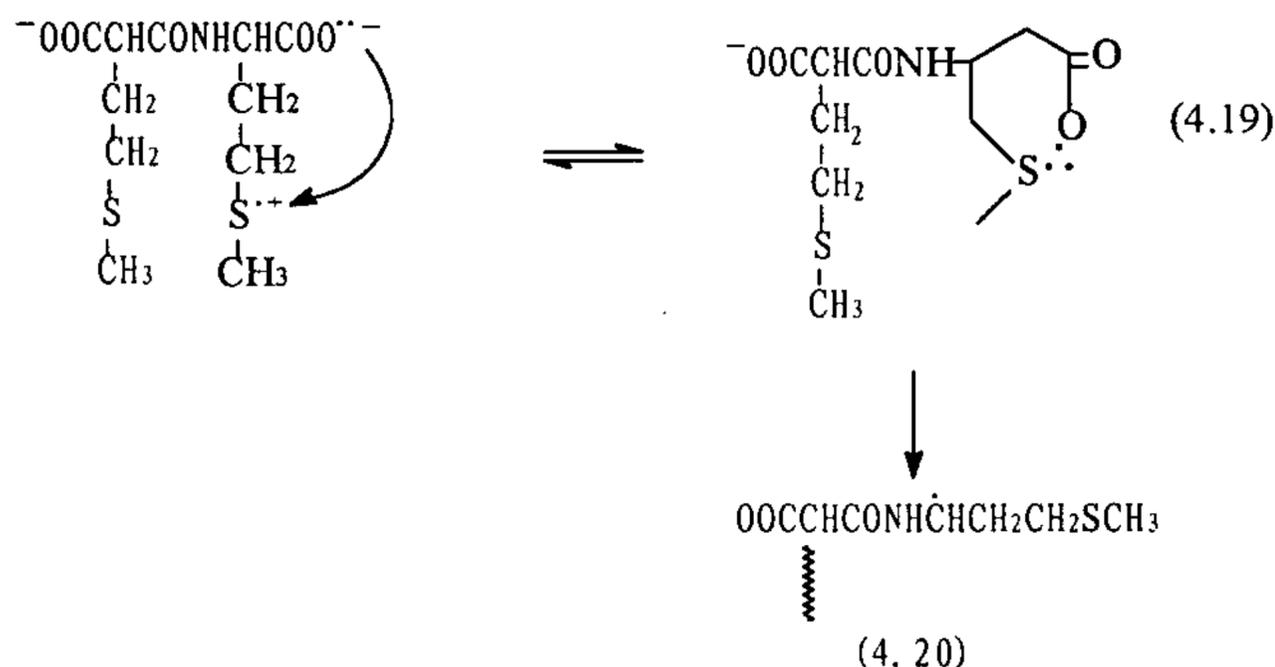


因为 N-端 Met 和 C-端 Met, 分别生成 N-端 $>\text{S}^{\cdot+}$ 和 C-端 $>\text{S}^{\cdot+}$. 对于 N-端 Met, 作者认为 N 原子和 S 原子在同一肽单位, 生成的 $>\text{S}^{\cdot+}$ 容易与分子内氨基 N 原子上 p 电子对反应产生 $[\text{S}:\text{N}]^+$ (4.18) 式. $[\text{S}:\text{N}]^+$ 为五元环结构. 因羧基将不能脱



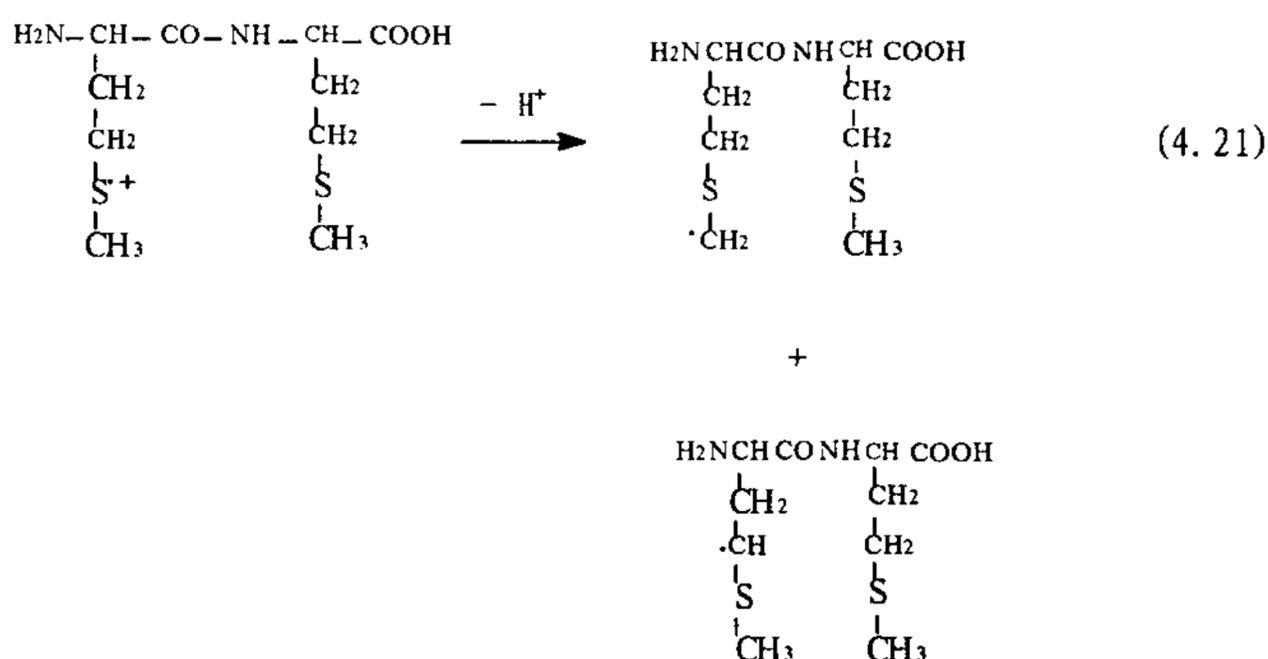
羧, 相对稳定. 而在 C-端 Met, 因氮和硫间被分子内肽键分开, 有效地阻止了 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 键的形成^[7,8]. 但与 Ala-Met 一样 C-端的 $>\text{S}^{\cdot+}$ 与同一肽与同一肽单位羧基上的氧原子游离 p 电子对进行电子转移反应. 生成 $[\text{S}:\text{O}]$ 型三电子键((4.19)式). $[\text{S}:\text{O}]$ 处于六元环结构比较稳定. 而且在中性溶液中, 羧基氧带有负电荷, 有利于向 C-端 $>\text{S}^{\cdot+}$ 转移电子产生 $[\text{S}:\text{O}]$. $[\text{S}:\text{O}]$ 的吸收一般与 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 在同一区域, 为 380 nm-400 nm^[3, 15]. 这与

图 4.3 中 390 nm 左右的吸收相吻合, 证实产生了[S:O]. [S:O]不稳定继续衰变, 脱羧生成 CO₂ 和αN 自由基 (式 (4.20))^[4]. αN 存在的证据是在 350 nm 有吸收 (见图 4.5). αN 自由基是强还原剂, 与 SO₄^{•-}反应, 降低溶液中的 SO₄^{•-}浓度. 所以激光脉冲后 10μs 记录到的瞬态吸收光谱, 450 nm 的吸收几乎消失, 是脱羧反应生成的αN 消耗 SO₄^{•-}的缘故. 350-400 nm 的吸收平台, 是αN、[S:N]⁺和[S:O]的吸收叠加而成.



4.3.5.2 290 nm 吸收峰的归属

图 4.5 中 10μs 记录的吸收光谱中 290 nm 有强吸收峰. 这是 α-烷硫基的吸收. 是含硫正离子自由基进行分子内脱质子反应, 和由 Met-Met 与 SO₄^{•-}直接脱氢反应产生的 (见式(4.21)).



4.3.7 含硫三电子键的验证

由于含硫三电子键离子自由基的特征和很短的寿命, 定性或定量的证明这些瞬态

中间体的是非常困难的，尤其在极性水溶液中，稳定含硫三电子键离子自由基以致用传统的检测手段直接观察和检测到它们是很难实现的。常用的方法是在低温下运用 ESR 和 MS 进行检测，ESR 虽是主要的测定自由基手段，但硫的主要的同位素来 ^{32}S 没有核自旋，检测硫三电子键离子自由基时经常受阻。但运用 ESR^[19]和 MS^[20]方法已经证明了含硫三电子键离子自由基的存在。另一类常见的方法，是运用 millisecond 和 microsecond 脉冲辐解和激光光解研究方法直接观察这种短寿命的含硫离子自由基。三是辅助化学手段，借助瞬态吸收光谱的方法。本文根据有关文献用后两种方法对瞬态产物进行归属和证明。

4.3.7.1 脉冲辐解研究方法

Hiller^[1], Asmus^[2-3]和 Bobrowski^[3-4]在用脉冲辐解方法研究 $\cdot\text{OH}$ 单电子氧化甲硫氨酸及其肽证明，在溶液 $\text{pH} < \text{pKa} (-\text{COOH})$ 时，生成了 $[\text{S}:\cdot\text{S}]^+$ ，最大吸收为 480nm； $\text{pH} > \text{pKa} (-\text{COOH})$ 时生成 $[\text{S}:\cdot\text{O}]$ 、 $\text{pH} > \text{pKa} (-\text{NH}_3^+)$ 时，生成了 $[\text{S}:\cdot\text{N}]^+$ ，二者的最大吸收都在 380-390nm。这三种自由基的产生除 pH 效应外，还与靶分子的浓度有关^[1, 3, 5, 18]。 $[\text{S}:\cdot\text{S}]^+$ 与 $[\text{S}:\cdot\text{N}]^+$ 在中性条件下不能生成， $[\text{S}:\cdot\text{O}]$ 最大吸收也在 380-400nm 左右，有吸收。作者认为如果 NH_2 被乙酰基化或 MET 处于二肽的 C-端，由于空间位阻以及 N 原子上的游离的 p 电子对与酰基形成共轭体系，不能向与 $>\text{S}^+$ 转移电子对生成 $[\text{S}:\cdot\text{N}]^+$ 。甲酰-甲硫氨酰-色氨酸结构上的特征是分子中的 NH_2 被乙酰基化，N 原子上的游离的 p 电子对与酰基形成共轭体系不，能向与 $>\text{S}^+$ 转移电子对生成 $[\text{S}:\cdot\text{N}]^+$ 。

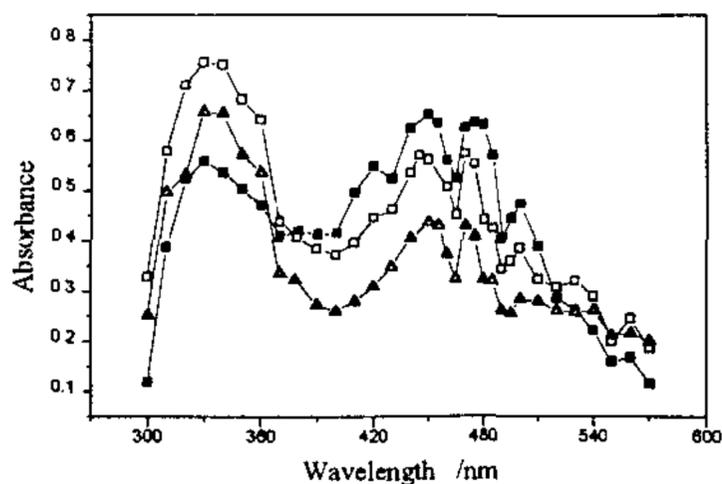


Fig.4.7 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ N-F-Met-Trp neutral aqueous solution saturated with N_2 at

1 μs (■); after the laser pulse.

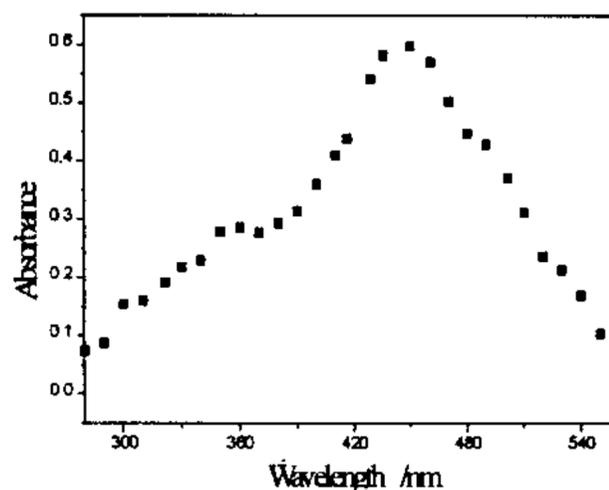


Fig.4.6 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Ala neutral aqueous solution saturated with N_2 at 1 μs (■) after the laser pulse.

4.3.7.2 化学方法

$\text{SO}_4^{\cdot-}$ 和 $[\text{S} \cdot \text{S}]^+$ 具有氧化性^[1], 与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 进行氧化反应生成的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 阴离子在 420 nm 具有特征吸收. 因 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 具有氧化性, 为排除干扰, 取 $C_{\text{Met}}/C_{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}}$ 浓度比为 25, 则激光脉冲后瞬间与的反应不到 4%, 可以忽略不计

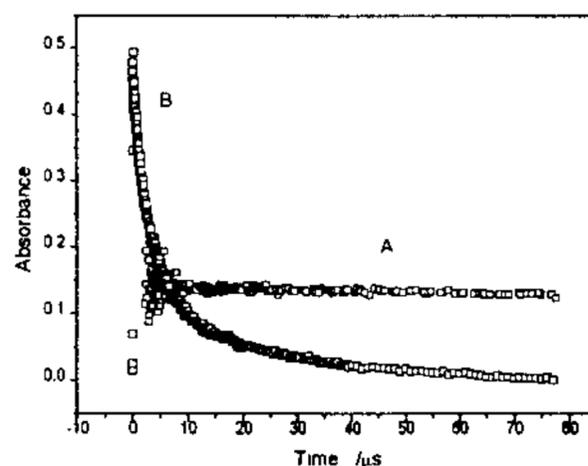
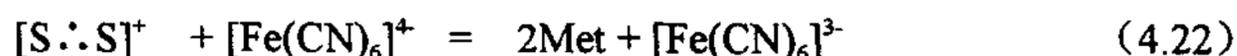


Fig.4.8 The kinetic decay curves observed in the pulse laser photolysis of N_2 -saturated solution recorded at 420nm (A) containing $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Met and $2 \times 10^{-5} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \text{ mol dm}^{-3}$ (B) containing $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3} \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Met.



[21]. 图 4.8 是在 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 氧化 Met 体系中加入低浓度的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 于 420nm 处观察到的动力学曲线. 从图 4.8 中可以看出, 在 PH5 时, 在 420nm 处观察到的是没有衰变的水平直线, 这是通过上述方应所产生的稳态阴离子的特征吸收, 表明方应体系中首先产生了含硫三电子键阳离子自由基 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 氧化生成了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 稳态阴离子, 而产生了 420 nm 处的稳态吸收.

4.3.8 反应机理

本工作中激光光解产生的 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 是典型的单电子氧化剂, 直接与 Met 中的硫原子进行电子转移反应生成 $>\text{S}^{\cdot +}$. $>\text{S}^{\cdot +}$ 将按下叙几种途径衰变:

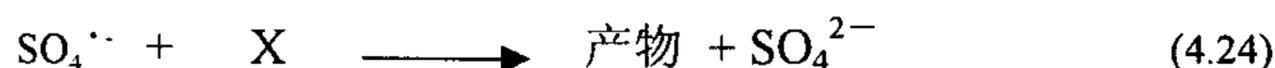
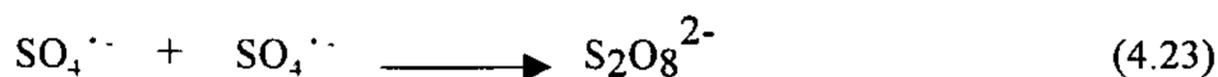
- 1) 与邻近碳原子上的氢原子进行抽氢反应, 生成 α -烷基自由基^[10].
- 2) 与母体分子进行分子间电子转移生成 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 自由基阳离子.
- 3) 与分子内的氨基氮分子 P 电子对进行分子内的电子转移反应生成 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 自由基阳离子.
- 4) 当 Met 处于二肽的 C 一端时, 与羧基氧原子的 p 电子对反应生成 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 自由基.

$[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$, $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 进一步进行脱羧反应生成 α N 自由基和 CO_2 . 当 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 中不含游离羧基时, $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 将不能脱羧.

4.4 反应动力学与动力学常数

4.4.1 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 的衰变:

对 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 随时间衰变曲线作动力学计算机模拟分析表明, $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 的衰变不能简单地规为一级或二级过程, 而是一级和二级的混合过程((4.23)–(4.24)式). 实验表明激光光解 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 水溶液体系, 以二级过程为主. 二级是 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 复合反应再生成母体((4.22)式). 加入氨基酸后, 发生氧化还原反应, 衰变速率加快. 一级过程是 [氨基酸] \gg [$\text{SO}_4^{\cdot -}$] 的假一级过程((4.23)式). $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 按下边的形式衰变:



这里 X 为还原剂.

图 4.9 是不同氨基酸和二肽对 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 的还原反应在 450nm 记录到的随时间衰变的瞬态吸收光谱. 加入氨基酸和二肽后, $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 的吸收减弱, 衰变加快. 与表 4.1 记录的的数据是一致的. N-Met-Trp 是个特例, N-Formyl-Met-Trp 反应体系中记录的瞬态吸收光谱表明 450nm 吸收峰强度变弱, 但衰变时间变长. N-Formyl-Met-Trp 二肽中含有色氨酸 (Trp), 在激光作用下 Trp 产生三重态 ($^3\text{Trp}^*$), $^3\text{Trp}^*$ 的吸收位置也在 450nm 处, 这里记录的瞬态吸收是 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 和 $^3\text{Trp}^*$ 吸收的叠加. 所以记录到 450nm 的半衰期很长.

4.4.2 $[\text{S}:\text{S}]^{\cdot -}$ 的衰变:

$[\text{S}:\text{S}]^{\cdot -}$ 衰变的机理是: 一. 分解成原反应物 (见(4.25)式), 二. $[\text{S}:\text{S}]^{\cdot -}$ 衰变成反应母体和 α -硫烷基自由基 (见(4.25)式). $[\text{S}:\text{S}]^{\cdot -}$ 衰变成反应母体和 α -硫烷基自由基 (见(4.24)-(4.25)式). 480 nm 的生成和衰变几乎是同时进行的. 生成和为, 衰变过程符合一级动力学规律 (见图 4.8), 其生成的表观速率常数分别是 $k_{\text{obs f}} = 5.66 \times 10^6 \text{s}^{-1}$; $k_{\text{obs d}} = 1.44 \times 10^5 \text{s}^{-1}$. 表 4.2 是在 480 nm 记录的 $[\text{S}:\text{S}]^{\cdot -}$ 的衰变常数, 半衰期和吸光度.

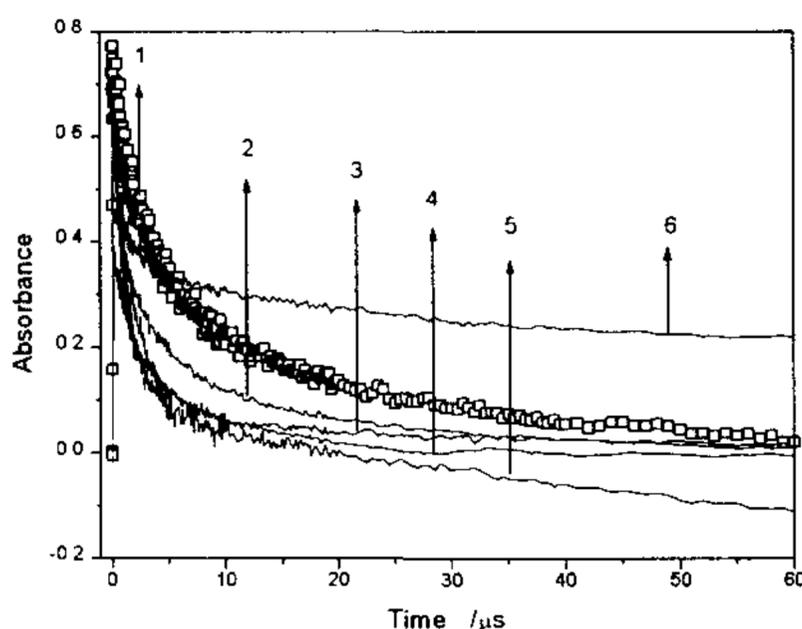
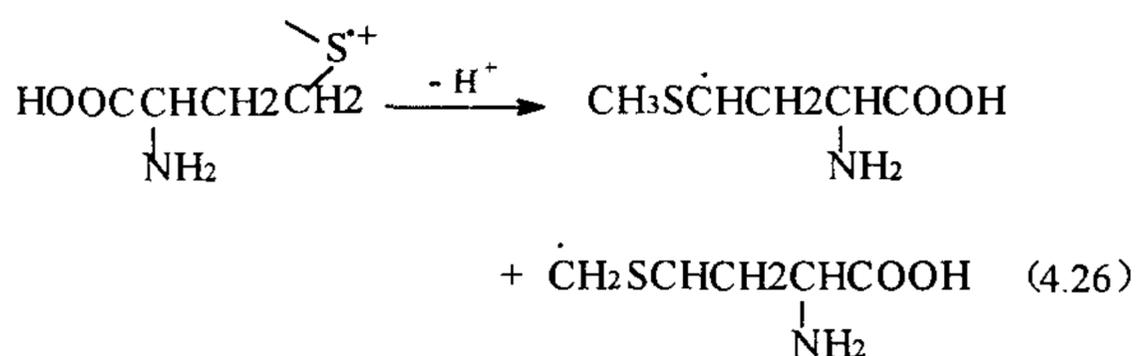
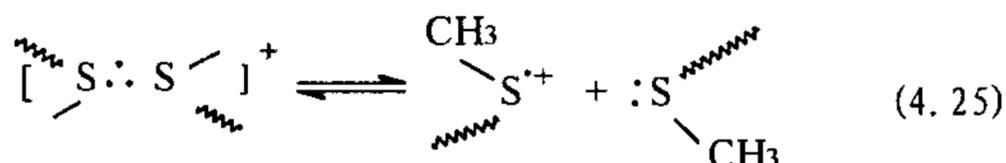


Fig.4.9 The kinetic decay curves observed in the pulse laser photolysis of N_2 -saturated solution containing 1mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and 0.1mM Met, MME, N-Met-Trp, Ala- Met and Met-Met respectively recorded at 450nm. (1) $\text{SO}_4^{\cdot -}$ (2) Met (3) MME (4) Ala-Met (5) Met-Met (6) N-Formal-Met-Trp.

Table 4.1 The rate constants and life time for decay of $\text{SO}_4^{\cdot-}$ determined at 450nm.

System	pH	$k_{1,d}$ $\text{mol}^3 \text{dm}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{2,d}$ $\text{mol}^3 \text{dm}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\tau_{1/2}$ (μs)
$\text{SO}_4^{\cdot-}$	7		4.25×10^7	7.83
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{Met}$	7	1.12×10^8		7.15
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{MME}$	7	1.60×10^8		4.61
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{Met-Met}$	7	2.22×10^8		3.12
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{Ala-Met}$	7	2.55×10^8		2.71
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{NMT}$	7	1.70×10^8		

Table 4.2 The rate constants and life time for decay of $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ determined at 480nm.

Oxide/Reduce reagent	pH	$k_{1,d}$ $\text{mol}^3 \text{dm}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\tau_{1/2}$ (μs)
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{Met}$	7	5.58×10^8	7.16
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{MME}$	7	7.70×10^8	4.5
$\text{SO}_4^{\cdot-}/\text{Met-Met}$	7	1.25×10^8	3.76

4.4.3 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 和 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 的衰变:

$[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 进一步衰变脱羧生成 αN 氨基烷基自由基(αN) 和 CO_2 (见(4.5)式), 衰变

过程为假一级过程(见图 4.9).

[S \cdot :O]衰变的机理是脱羧生成 α N 氨基烷基自由基(α N) 和 CO₂ (见 (44.20)).

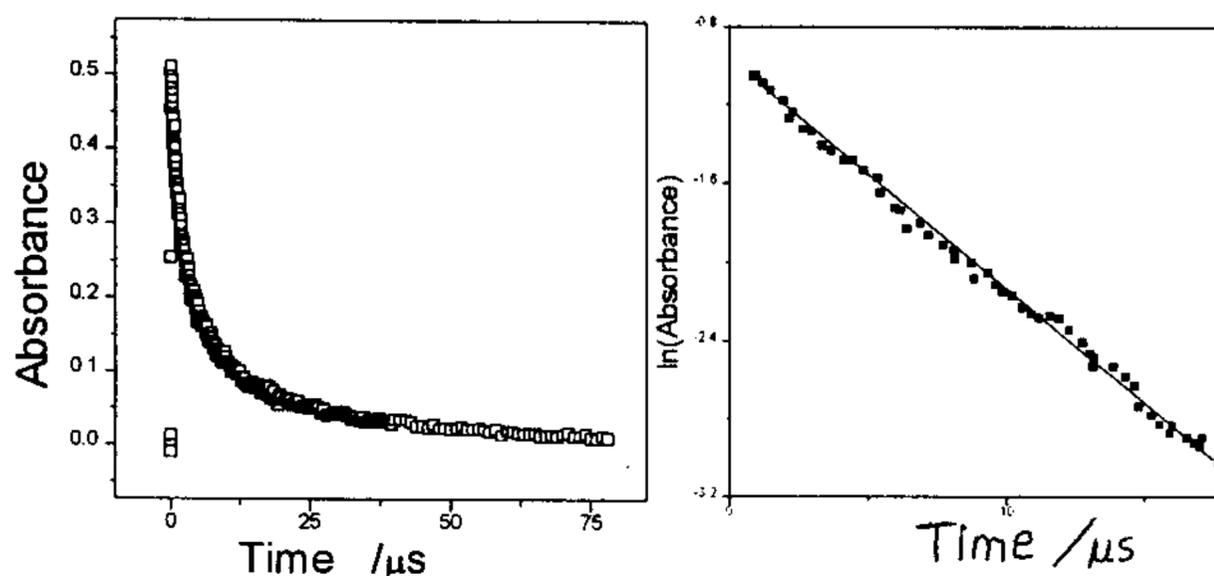


Fig. 4.10 The kinetic curves observed in the pulse laser photolysis of N₂-saturated aqueous solution containing $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, $1 \times 10^{-4} \text{ Met}$ recorded at 480nm. Left: The simulation curve according to the law of first-order decay by computer at 480nm

4.4.4 浓度对氧化过程的影响

在激光光解过程中, 反应体系中的浓度对激光光解的结果产生影响, 因为激光的能量较小 (50-20mj), 在体系中溶质直接受激光作用. 在二元反应体系中, 两种溶质的浓度比一定要恰当. 在本研究工作中, 如果 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 浓度过大, 只能观察到 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的吸收, 如果 Met 浓度过大, 不能观察到氧化过程引起的瞬态吸收光谱的变化. 图 4.12 是改变 Met 浓度对在不浓度时在 480 nm 获得的 $[\text{S}\cdot\text{S}]^+$ 的表观衰变常数 ($K_{\text{obs,d}}$) 作图获得的 $K_{\text{obs,d}}-C$ 关系图. 本章第一节中已经分析, 在 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的衰变过程中, 如果还原剂 (X) 的浓度为一定量时, 其衰变为假一级过程. 所以在 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{Met}$ 反应体系中, $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的衰变速率 $\text{SO}_4^{\cdot-} + \text{Met}$ 的氧化反应速率. 即图 4.12 的直线斜率为 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 氧化 Met 的绝对速率常数 $k_{(\text{SO}_4^{\cdot-} + \text{Met})}$.

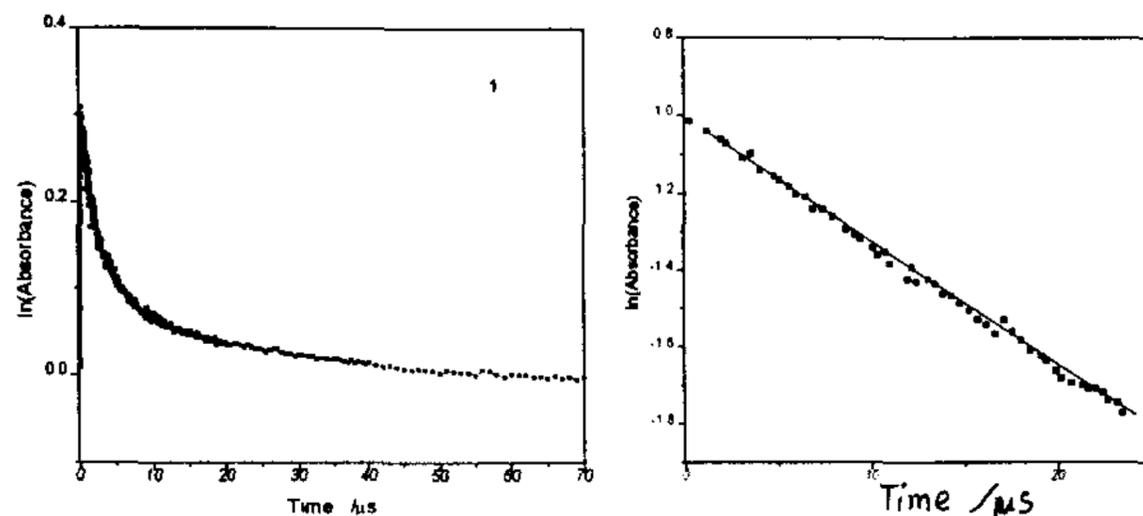


Fig 4.11 The kinetic curves observed in the pulse laser photolysis of N_2 -saturated aqueous solution containing $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, $1 \times 10^{-4} \text{ Met}$ recorded at 380nm. Left: The simulation curve according to the law of first-order decay by computer at 380nm.

Table 4.3 The rate constants and life time for decay of $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ determined at 380 nm.

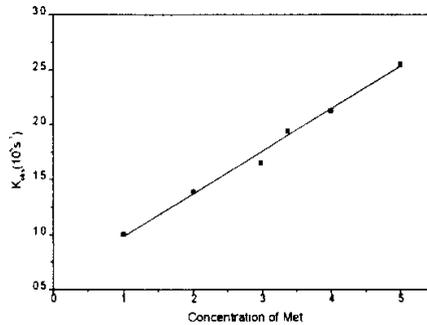
Oxide/Reduce reagent	pH	$k_{1,d}$ $\text{mol}^3 \text{dm}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\tau_{1,2}$ (μs)
$\text{SO}_4^{\cdot -} / \text{Met}$	7	5.8×10^8	6.82
$\text{SO}_4^{\cdot -} / \text{MME}$	7	4.58×10^8	7.60
$\text{SO}_4^{\cdot -} / \text{Met-Met}$	7	1.45×10^8	23.70
$\text{SO}_4^{\cdot -} / \text{Ala-Met}$	7	1.68×10^8	20.70

4.4.5 与脉冲辐解、光敏化氧化反应结果比较：

图4.2、图4.3、图4.4、图4.5和图4.7所示的结果表明，激光光解产生的 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 氧化Met及其衍生物和肽，与脉冲辐解产生的 HO^{\cdot} 氧化它们的反应结果不同^[2,8,10,12]， HO^{\cdot} 自由基氧化产生的 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 只能存在强酸溶液中，而在弱酸或中性溶液中没有观察到 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ ；也没有直接发现 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 的形成的证据^[2, 8-10]。这是因为它们的反应机理不同。 HO^{\cdot} 需和质子的反应脱去水分子形成反应活性中心含硫阳离子自由基 $>\text{S}^+$ 后，才能继续进行反应。 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 氧化不需要质子的参加，而直接进行电子转移反应生成 $>\text{S}^+$ 。所以 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 在中性水溶液中氧化Met、MME、Ala-Met、N-Met-Trp和Met-Me可观察到 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 的生成

[12]. 同样，在中性或碱性介质中，用4-羧基二苯甲酮光敏化氧化含硫氨基酸及其肽，通过光谱解析也能观测到 $[S\cdot\cdot S]^+$ 和 $[S\cdot\cdot N]$ 的生成，因光敏化氧化含硫氨基酸及其肽的反应机理，不需质子参加反应^[4,5,11]。但没有发现 $[S\cdot\cdot O]$ 的形成，因为运用激光光解技术研究含硫氨基酸光敏化氧化反应时，该过程产生的芳香酮中间体吸收谱带宽、寿命长，需通过大量数据和复杂的解谱技术才能分解出有关中间体的瞬态吸收光谱，可能因为 $[S\cdot\cdot O]$ 数据较少，而未能解出其的瞬态吸收光谱。二是 $SO_4^{\cdot-}$ 自由基的氧化性比 $\cdot OH$ 自由基的氧化性强的多（ $SO_4^{\cdot-}$ 的增敏作用）所引起的；而显 $S_2O_8^{2-}$ 经光解产生的自由基的量子产额（ $8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ）比水经电离辐射产生的 $\cdot OH$ 自由基的量子产额（ N_2O 饱和溶液， $6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ）高的多。

Fig.4.12 Plot of the obvious forming rate constants of the transient species $[S\cdot\cdot S]^+$ vs. the



concentration of Met($1-5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

4.5 氨基酸结构对含硫三电子键的稳定性的影响

两中心三电子键(2c-3e)最早是由 Pauling 在 1931 年在理论上提出的。可用势能图表示简单其简单分子轨道图 6.13。2c-3e 键电子结构为 $\sigma^2 \sigma^*1$ ，成键能力为 1/2，研究最多的是硫硫三电子键 $[S \square S]^+$ 。前文表明 $[S \square S]^+$ 相当容易在水溶液中产生，生成机理研究证明首先产生含硫自由基离子($>S^{\cdot+}$)，再通过 $1\sigma - 2\sigma^*$ 跃迁与反应母体分子的硫原子进行分子间的电子转移生成 $[S \square S]^+$ 。 $[S\cdot\cdot S]^+$ 的键能为 100-111 kJ/mol (Deng, Illies)^[11]，生成焓和熵分别为生成焓和熵分别为 $\Delta H^{\circ}_{\text{bond},567} : 111 \pm 2 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S^{\circ}_{\text{rxn},567} : 112 \pm 3 \text{ kJ/mol.k}$ 。研究表明：Met 结构($-NH_2, -COOH$)对 $[S\cdot\cdot S]^+$ 、 $[S\cdot\cdot N]^+$ 和 $[S\cdot\cdot O]$ 稳定性有较

大的影响.

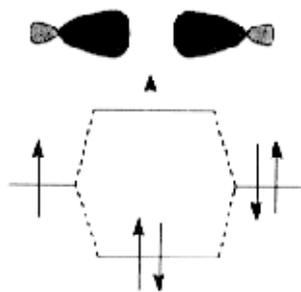


Fig.4.13 The potential energy diagram of 2 centra-3 electrons.

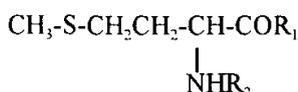
4.5.1 MET 的结构对[S \cdot :N] $^+$ 和[S \cdot :O]的影响

图 4.14 是光诱导产生的 SO $_4^{\cdot-}$ 氧化甲硫氨酸、衍生物及其肽在 380 nm 的随时间变化的瞬态吸收光谱. 从图中可知, 不同的甲硫氨酸、衍生物及其肽在 380 nm 处的衰变快慢速度不同. 与表 4.2 记录的由 Met-Met、Ala-Met、MME 和 Met 分别生成的[S \cdot :N] $^+$ 、[S \cdot :O]的寿命. 结论如下:

[S \cdot :N] $^+$ ([S \cdot :O]吸收位置相同) 的半衰期:

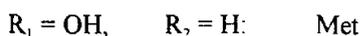
$$\tau_{\text{Met-Met } 1/2} > \tau_{\text{Ala-Met } 1/2} > \tau_{\text{MME } 1/2} > \tau_{\text{Met } 1/2}$$

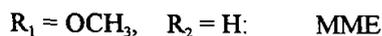
现分析对[S \cdot :N] $^+$ ([S \cdot :O]吸收位置相同) 稳定性的影响.



1) 羧基酯化 (R $_1$ = OR)

从图 4.2 和图 4.3 可看出, 10 μ s 后记录到的瞬态吸收光谱在 380 nm 的吸收强于 480 nm 的吸收. 图 6.14 进一步说明由 Met 产生的[S \cdot :N] $^+$ 的衰变速度比由 MME 产生的[S \cdot :N] $^+$ 的衰变速度快. Met 与 MME 结构上的区别在于 Met 的羧基被甲酯化即为 MME:





两者产生的 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 结构上有所区别，由 MME 生成的 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 的羧基被甲酯化，见 (4.4) 式中 (ii) 和 (4.6) 式中 (iii)。其对稳定性的影响在于， $[\text{S}:\text{N}]^+$ 进一步衰变脱羧生成 CO_2 与 $\alpha\text{-N}$ 自由基 (见 (4.5) 式)；而甲酯化的 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 不能衰变脱羧生成 CO_2 与 $\alpha\text{-}$ 自由基。

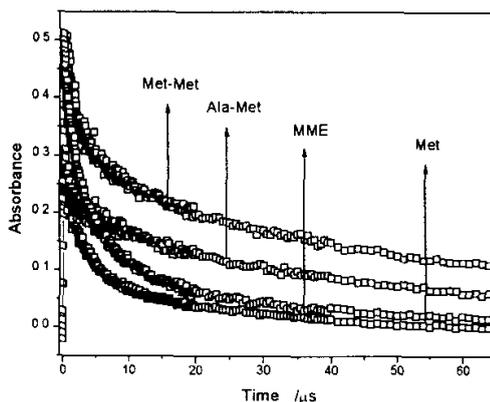
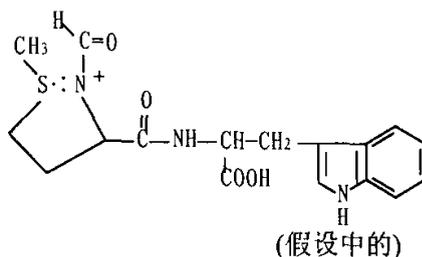


Fig.4.14 The kinetic decay curve of 1mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and 0.1 mM Met, MME, Ala-Met and Met-Met respectively recorded at 380 nm (1) Met-Met (2) Ala-Met (3) MME (4)Met

2) 氨基被酰基化 (-COR 即 C 端 Met)

图 4.7 与图 4.2、图 4.3、4.4 和图 4.5 的区别在于，图 4.7 中在 380 nm 处没有吸收。这是由 N-Met-Trp 结构不同造成的。N-Met-Trp 结构上的特点是 Met 中的 NH_2 被甲酰化，N 上 p 电子对与酰基形成 p- π 共轭体系，变的相当稳定，很难给



出电子进行分子内的电子转移反应生成 $[\text{S}:\text{N}]^+$ 。第二个原因是 N 原子上的甲基与 S 原

子上的甲基空间位阻大相互排斥，既时生 $[S\cdot\cdot N]^+$ 成也非常不稳定。

3) 氨基生成肽链(-CONH-)

图 4.4 与图 4.2、图 4.3 的区别在于图 6.4 中 380 nm 的吸收，5 μ s 后 450 nm, 480 nm 的吸收迅速减弱；20 μ s 后唯有 380 nm 的吸收。分析已经表明这里的 380nm 的吸收为 $[S\cdot\cdot O]$ 。 $[S\cdot\cdot O]$ 寿命较长（见表 4.2）。Ala-Met 结构上的特点是 Met 的氨基与丙氨酸的羧基生趁成肽键，N 原子上的 p 电子对与肽键生成 p- π 共轭不能生成 $[S\cdot\cdot N]^+$ ，与含硫自由基离子($>S^{\bullet}$)在同一肽单位的羧基氧原子上的游离 p 电子对向 $>S^{\bullet}$ 转移生成 $[S\cdot\cdot O]$ （见式 (4.11) - (4.12)）。 $[S\cdot\cdot O]$ 与 $[S\cdot\cdot S]$ 是竞争反应， $>S^{\bullet}$ 一方面与含硫氨基酸母体分子进行分子间的电子转移反应，生成 $[S\cdot\cdot S]^+$ ；一方面与羧基氧原子上的游离 p 电子对进行分子内电子转移反应生成 $[S\cdot\cdot O]$ 。 $[S\cdot\cdot O]$ 具有六员环结构在热力学比较稳定。 $[S\cdot\cdot O]$ 的衰变脱羧生成 CO_2 与 α -胺基自由基($\alpha-N$)。 $\alpha-N$ 中 C 自由基的 α 位置存在肽键相当稳定。 $[S\cdot\cdot O]$ 脱羧为不可逆反应平衡有利于向生成 $[S\cdot\cdot O]$ 方向转化。所以 $[S\cdot\cdot O]$ 较稳定。

4) 同时存在 C-Met 与 N-Met 的二肽

图 4.14 表明 Met-Met 产生 380 nm 衰变最慢，表 4.2 表明 Met-Met 产生 380 nm 瞬态产物寿命最长。图 4.5 中 10 μ s 后记录的瞬态吸收光谱，450 nm, 480 nm 的吸收几乎消失，在 350-400nm 出现吸收高峰，形成平台。Met-Met 为同时存在 C-Met 与 N-Met 的二肽，氧化时分子内同时生成 N 端 $>S^{\bullet}$ 和 C 端 $>S^{\bullet}$ ，N 端 $>S^{\bullet}$ 与同一肽单位 氮原子上 p 电子转移生成 $[S\cdot\cdot N]^+$ ；C 端 $>S^{\bullet}$ 与同一肽单位氧原子上 p 电子转移生成 $[S\cdot\cdot O]$ 。Met-Met 分子内同时生成 $[S\cdot\cdot N]^+$ 和 $[S\cdot\cdot O]$ 。 $\tau [S\cdot\cdot N]^+_{Met-Met} > \tau [S\cdot\cdot N]^+_{Ala-Met}$ 是因为前者含有两个 S 原子，成键几率大；二是因为 MET-MET 分子内同时生成 $[S\cdot\cdot N]^+$ 和 $[S\cdot\cdot O]$ ，两个吸收峰在同一位置，寿命是 $[S\cdot\cdot N]^+$ 和 $[S\cdot\cdot O]$ 寿命的加和。

4.5.2 MET 的结构对 $[S\cdot\cdot S]^+$ 的影响。

图 4.15 是光诱导产生的 $SO_4^{\bullet-}$ 氧化甲硫氨酸、衍生物及其肽在 480 nm 的随时间变化的瞬态吸收光谱。从图中可知，不同的甲硫氨酸、衍生物及其肽产生的 $[S\cdot\cdot S]^+$ 的衰

变快慢速度不同. 与表 1 记录的由 Met-Met、Ala-Met、MME 和 Met 分别生成的[S \cdot :S] $^+$ 结论如下:

$$\tau_{\text{Met}1/2} > \tau_{\text{Met-Met} 1/2}, \tau_{\text{Ala-Met} 1/2}, \tau_{\text{MME} 1/2}$$

[S \cdot :S] $^+$ 的稳定与甲硫氨酸、衍生物及其肽的结构有关. 表明 Met 生成的[S \cdot :S] $^+$ 寿命大于 MME、Ala-Met 和 Met-Met 生成的[S \cdot :S] $^+$ 的寿命, Met-Met 中的硫硫三电子键为大环, σ 成键电子正向重叠较小不稳定. 含硫三电子的稳定性与 P 轨道重叠程度和 C-C σ 键相互反应有关, 分子轨道理论分析表明, 不同类型的含硫三电子键的键长, 键角和对称性^[22-23]受组成三电子键原子电负性差和取代基的体积有关.

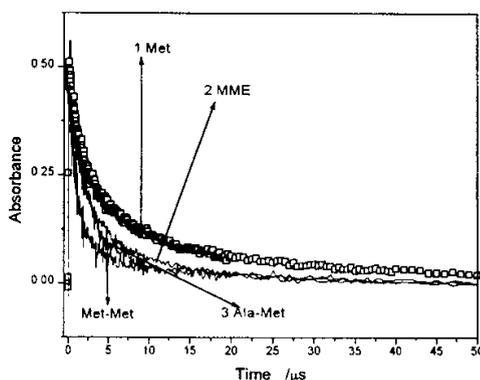


Fig.4.15 The kinetic decay curve of 1mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and 0.1 mM Met, MME, Ala-Met and Met-Met respectively recorded at 480 nm

以上 1) 形成含硫三电子键的两个中心原子的两个 σ 成键电子正向重叠越大, 三电子键越稳定; 2) 两中心原子上的取代基越大, 两个 σ 成键电子正向重叠越小, 三电子键越不稳定. 这与 Asmus^[24]含硫三电子的稳定性理论一致. 理论研究表明含硫三电子的稳定性与轨道的重叠不是线性关系. 这是因为反键 σ^* 电子去稳定效应相对于两个 σ 成键电子正向重叠的总值中变大.

运用 ESR 测定在 77K 温度下由辐射产生的含硫三电子键的稳定性顺序如下^[23]:



—————>
稳定性增强

由 ESR 和本实验得出的结果有差别, 我们认为:

- 1) ESR 与激光光解诱导的 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化的反应条件不同；ESR 是在低温冷冻条件下进行的，激光光解诱导的 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化的反应条件常温水溶液条件下进行的。溶剂化效应对含硫三电子键的稳定性有很大的影响。研究表明有四个水分子与含硫三电子键形成溶剂化络合物，结果降低了 $2\sigma-1\sigma^*$ 的能量，增加了含硫 $2c-3e$ 键的稳定性，使 λ_{\max} 蓝移。
- 2) ESR 与激光光解诱导的 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 氧化的反应体系不同；两中心原子上的取代基越大，两个 σ 成键电子正向重叠越小，三电子键越不稳定；我们实验中的反应体系，两中心原子上的取代基为不同体积的烷基，研究表明，烷基取代基使两个 σ 成键电子正向重叠变小，三电子键稳定性变小； λ_{\max} 红移。这与本实验中 $\tau[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]_{\text{Met}1,2}^+ > \tau[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]_{\text{Met-Met } 1/2}^+$ 实验事实相吻合。
- 3) 在水溶液中 $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ (或 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$) 的生成与 $[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]^+$ 的生成是竞争反应。又因为 αN 是强还原剂，必然与的 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 起氧化还原反应，体系中 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 的量大于 αN ， αN 一生成立刻被反应掉，使竞争反应中的 $[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]^+$ 不断解离，使平衡不断向有利于 $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 或 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ 反向转移。
- 4) $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ (或 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$) 衰变另一产物是 CO_2 ，是不可逆衰变。也有利于平衡不断向 $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 或 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ 方向转移。
- 5) 溶剂化效应对三电子键中 σ 去稳定性大于对 p 电子成键的稳定性。

4.6 结论

- 1) 激光光解诱导的 $\text{SO}_4^{\bullet-}$ 对 Met, 衍生物及二肽的氧化反应机理是单电子氧化还原反应；
- 2) S^{\bullet} 具有与邻近的 S, N 或 O 上的孤对 p 电子对络合变的较稳定的趋势；生成 $[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]^+$ 为分子间电子转移反应，生成 $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 和 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ 为分子内电子转移反应；
- 3) 在中性条件下生成 $[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]^+$, $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 和 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ ；
- 4) Met 的结构 ($-\text{NH}_2, -\text{COOH}$) 对生成的 $[\text{S}\cdot\cdot\text{S}]^+$, $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 和 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ 的结构和稳定性有影响；
- 5) $[\text{S}\cdot\cdot\text{N}]^+$ 和 $[\text{S}\cdot\cdot\text{O}]$ 进一步衰变成 CO_2 和 αN 自由基；

6) α N 自由基是强氧化剂.

参 考 文 献

1. Hiller K. O., Masloch B., Gobl M., Asmus K.-D., J. Am. Chem. Soc. 1981, 103 :2734-2743.
2. Mohling S., Asmus K-D, Glass R.S., Hojjatie M, Wilson G.S. , J. Org. Chem. 1987, 52: 3717.
3. Monig J., Gobl M., Asmus K.-D., J. Chem. Soc. Perkin Trans., II 1985,674—475.
4. Borowski k., Marciniak B., Hug G. L., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114:10279-10288.
5. Bobrowski K., J. Phys. Chem. 1989, 93: 6381-6387.
6. P.O' nill and S. E. Davies, Int. J. Radiat. Biol., 52(4), 577(1987).
7. J.L.Redpath and R. L. Willson, Int. J. Radiat. Biol., 27(4), 389(1975).
8. S.N.Rustgi and P.Riesz, Int. J. Radiat. Biol., 34, 301(1978).
9. D.K.Hazra and S.Steenken, J. Am. Chem. Soc., 105, 4380(1983).
10. S.Fujita, J. Radiat. Boil., 45, 371(1984).
11. C.Schoneich, F.Zhao, et. al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 4641-4652.
12. Z. R. Lian, S.D. Yao, W.F, Wang, et al. Chinese Sci. Bul., 38 (21), 1790 (1993).
13. Yao S. D., Sheng S.G., Cai J.H., Zhang J. S., Lin N.Y., Radiat. Phys. Chem, 1995, 46:105.
14. Mcelroy W.T., Wayagood , J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1990, 86 (14) : 2557-2564.
15. Asmus K-D, Acc. Chem. Res., 1979, 12, 436.
16. Marciniak B., Hug G.L., Borbronski K., Kozubek H., J. Phys. Chem. 1995, 99: 13560.
17. Bobrowski K. ,Holcman, J. Radiat. Biol, 1987, 52: 139
18. Bobrowski K, Schoneich C, Holcman J, Asmus K-D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1991, 353-362.
19. B.C. Gilbert, D.K.C. Hodgeman, and R.O.C.Norman, J Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1748(1973).
20. H.Mockel, Fresenius Z. Anal. Chem., 295, 241(1979).

21. A.V.Gogolev, A.V.Fedoseev, I.E.Makarov et al., *High Energy Chem.*, 23, 162(1989).
22. Y.Deng, A.J.Illies et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 420-428.
23. M.H. Champagne, M.W. Mullins et al., *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 6487-6493.
24. Asmus, K-D, *Acc. Chem. Res.* 1979, 12, 436-442.

第五章 芳香氨基酸及其肽光敏化氧化反应

摘要：运用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。在丙酮存在下的色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)的水溶液中，激光辐照后，分别观察到 Trp 激发三重态、N 中心色氨酸自由基 (Trp/N[•]) 和酪氨酸的酚自由基 (Tyr/O[•])，它们是丙酮三重态与 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；而苯丙氨酸 (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[•]-Tyr → Trp-Tyr/O[•] 自由基的转变过程。

5.1 引言

在生物体的二十种氨基酸中，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^[1,2]。这些研究的主要兴趣是利用发光作为研究蛋白质结构的探针。到目前为止，有关芳香氨基酸及肽的基本光化学过程的研究工作还不太多^[3]。

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^[3-4]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，使光谱难以解析、得到的动力学数据不够准确。本工作运用 KrF(248nm)激光光解瞬态吸收光谱，采取丙酮敏化的方法，获取了芳香氨基酸激发三重态的瞬态吸收光谱及动力学参数。进一步，研究了含芳香氨基酸残基的二肽的光化学反应过程，在色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr)的敏化光解过程中观察到肽分子内的电子转移。

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

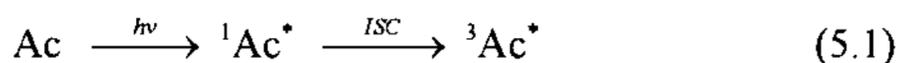
盐和二氧化锰经一次重结晶后使用。实验样品中光敏剂与目标物浓度的配比是将二者的 248nm 吸光度之比保持在 100 以上，使激光能量主要为光敏剂吸收，从而确保光敏化反应占据优势。所有溶液的配制及纯化均用三重蒸馏水。样品中均加入 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲溶液，在实验前根据实验目的用高纯氮和高纯氧(99.99%)鼓泡 20 分钟。

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 248nm，脉宽 20ns，每脉冲最高能量<50mJ，信号由 HP54510B 300MHz 瞬态记录仪记录，并转化为数字信号送入 PC-486 微机进行处理。实验装置及数据处理亦如前述，也可参见文献 [5]。

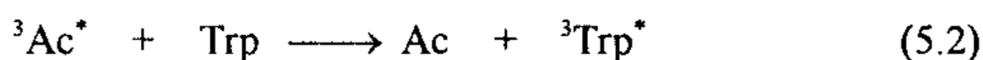
5.2 光敏化反应瞬态吸收光谱及瞬态产物鉴别

芳香氨基酸 芳香氨基酸在 248nm 激光直接作用下，会发生光电离，首先观察到的水合电子的强吸收带，水合电子衰减之后，才观察到光解反应产生的自由基的吸收光谱^[6-7]（见本文第七章）。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，激光能量主要被丙酮吸收，生成丙酮激发三重态($^3\text{Ac}^*$)，再通过 $^3\text{Ac}^*$ 激发三重态与芳香氨基酸进行三重态-三重态激发能转移或电子转移。

图 5.1 是 Trp 与 Ac 的中性水溶液的激光光解瞬态吸收光谱，激光作用之后立即 (70ns) 记录到的是 300-380nm 波段的吸收，它可指认为丙酮激发三重态 ($^3\text{Ac}^*$) 的吸收。这与前人的工作一致^[8-9]。在反应体系中，激光能量首先被丙酮吸收，生成丙酮激发三重态($^3\text{Ac}^*$)， $^3\text{Ac}^*$ 的摩尔消光系数为 $600 \pm 100 \text{Mcm}^{-1}(300 \text{nm})$ ^[8]。



随着 $^3\text{Ac}^*$ 吸收的衰减，在 460nm 的新吸收峰表明瞬态产物生成。在体系加入 Mn^{2+} 或通入氧气后光解，460nm 的吸收峰减弱或消失，它归属于色氨酸激发三重态($^3\text{Trp}^*$)的吸收。这与文献[10]报道的一致。 $^3\text{Trp}^*$ 是由 $^3\text{Ac}^*$ 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，理由详见 5.4 节，



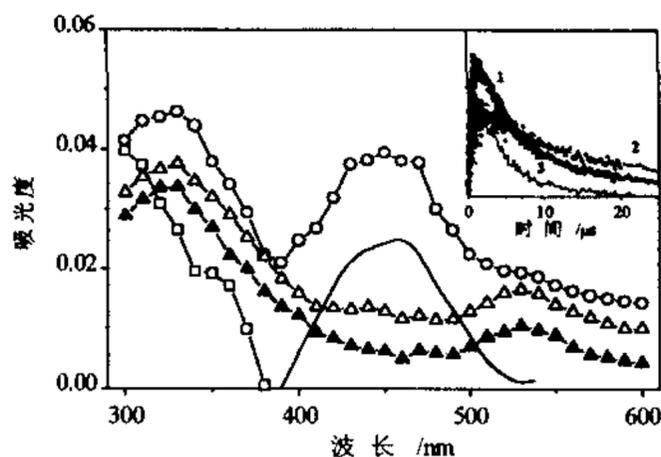


Fig. 5.1 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $2 \times 10^{-4} \text{ mol, dm}^{-3} \text{ Trp}$ aqueous solution containing $0.2 \text{ mol, dm}^{-3} \text{ Ac}$ saturated with N_2 : 70 ns (\square), $1 \mu\text{s}$ (\circ), $10 \mu\text{s}$ (\triangle), $20 \mu\text{s}$ (\blacktriangle), ${}^3\text{Trp}^*$ at $1 \mu\text{s}$ (—) by subtract. after the laser pulse. Inset: Dependence on time of the absorbance at: 460 nm (1)、 530 nm (2)、 $1-2$ (3).

在 330 、 530 nm 的 2 个吸收峰，与单电子氧化剂($\text{Br}_2^{\cdot-}$ 、 N_3^{\cdot} 等)氧化 Trp 生成 N 中心色氨酸自由基($\text{Trp}/\text{N}^{\cdot}$)的瞬态吸收谱^[11]一致。因此，激光作用 Trp/Ac 体系生成了 $\text{Trp}/\text{N}^{\cdot}$ 。这是 ${}^3\text{Ac}^*$ 与 Trp 通过电子转移反应生成的。进一步的理由见 5.4 节。



Trp/NH^{·-}脱质子和 Ac^{·-}结合质子的 pKa 分别为 5.1 ^[12]和 -2 ^[13]，所以在中性条件下，Trp/NH^{·-}脱质子与 Ac^{·-}结合质子将迅速协同完成。

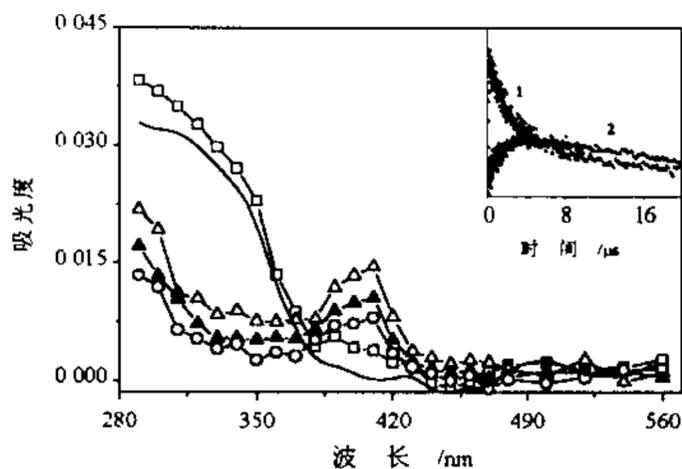


Fig. 5.2 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ Tyr}$ aqueous solution containing $0.2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Ac}$ saturated with N_2 : $1 \mu\text{s}$ (\square), $8 \mu\text{s}$ (\triangle), $10 \mu\text{s}$ (\blacktriangle), $20 \mu\text{s}$ (\circ).

after the laser pulse. Inset: Dependence on time of the absorbance at: 310nm(1), 410nm(2).

图 5.2 是 Tyr/Ac 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱, 激光照射后 $1\mu\text{s}$, 在 300-400nm 波段有明显吸收。激光作用后 $8\mu\text{s}$, 300-400nm 波段吸收明显减弱, 而在 410nm 生成一新的吸收峰。前文已分析 $^3\text{Ac}^*$ 的瞬态吸收在 300-380 nm, 但由于 $^3\text{Tyr}^*$ 的吸收也在这一波段范围^[14], 那么这一波段是否还有 $^3\text{Tyr}^*$ 的吸收? 改变 Tyr/Ac 氮气饱和水溶液中 Tyr 的浓度光解, 测得 $k(=k_0+k_s[\text{Ac}], [\text{Ac}]=0.2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 详见 5.3 节)与单纯 $0.2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{Ac}$ 氮气饱和水溶液光解测得的 k' 完全一致, 均为 $2.3\times 10^5\text{s}^{-1}$ 。这说明没有 $^3\text{Tyr}^*$ 生成。410nm 的吸收是酚氧自由基(Tyr/O^*)产生的。与单电子氧化 Tyr 生成酚氧自由基(Tyr/O^*)的瞬态吸收谱一致^[7]。它是 $^3\text{Ac}^*$ 与 Tyr 通过电子转移生成 (理论上的证明见 5.4 节)。

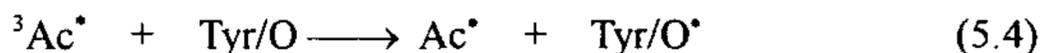


图 5.3 是 Phe/Ac 无氧水溶液的激光光解瞬态吸收光谱, 和 Ac 无氧水溶液的激光光解瞬态吸收光谱基本一致。改变 Phe 的浓度, 对衰减速率常数几乎无影响, 说明 $^3\text{Ac}^*$ 不能与 Phe 发生 T-T 激发能转移。并且 $^3\text{Ac}^*$ 与 Phe 间不能自发地进行电子转移。

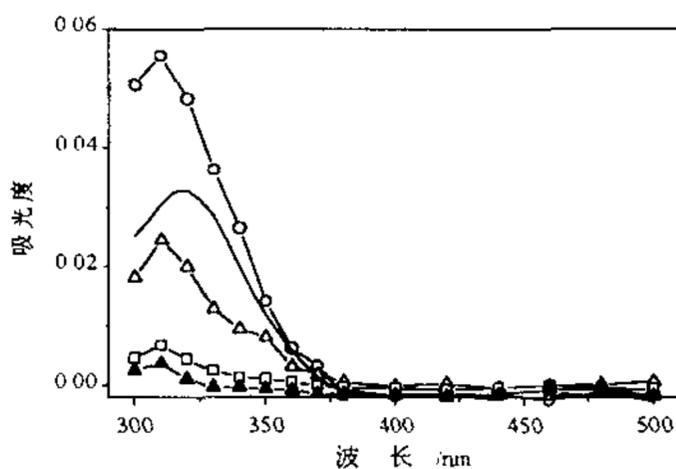


Fig. 5.3 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}\text{Phe}$ aqueous solution containing $0.2\text{mol dm}^{-3}\text{Ac}$ saturated with N_2 : $0.1\mu\text{s}$ (O), $1\mu\text{s}$ (Δ), $10\mu\text{s}$ (\square), $20\mu\text{s}$ (\blacktriangle).

after the laser pulse.

5.2.1 含芳香氨基酸的二肽

图 5.4 是 Trp-Phe/Ac 无氧水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱, 激光能量首先被

丙酮吸收，生成丙酮激发三重态($^3\text{Ac}^*$)，激光辐照 90ns 后，在 300-380 nm 产生吸收。1 μs 时一吸收峰在 460nm 的瞬态产物生成，并且在体系中加入激发三重态的猝灭剂氧或 Mn^{2+} 后这一吸收峰基本消失。由于 $^3\text{Trp}^*$ 的特征吸收峰在 460nm^[11]，因此，它归属于色氨酸残基激发三重态($^3\text{Trp}^*$)的吸收。 $^3\text{Trp}^*$ 是由 $^3\text{Ac}^*$ 诱导产生的，显然，它是通过 T-T 激发能转移生成。

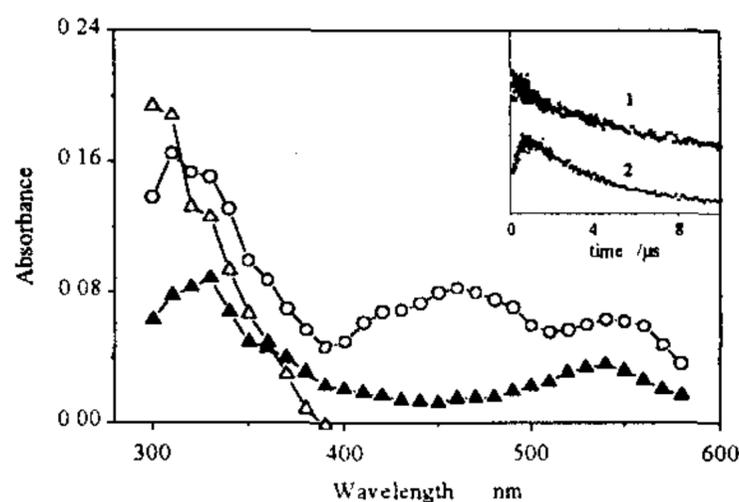
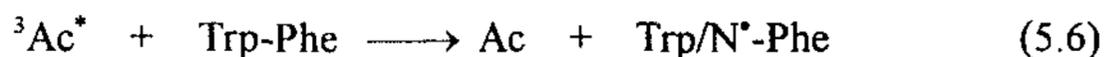


Fig. 5.4 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Trp-Phe aqueous solution containing 0.2 mol dm^{-3} Ac saturated with N_2 : 90ns(O), 1 μs (Δ), 20 μs (\blacktriangle) after the laser pulse. Inset: Dependence on time of the absorbance at: 320nm(1), 460nm(2).

激光作用后 10 μs ，460nm 的吸收峰消失，在 330 和 530nm 各有一吸收峰的长寿命瞬态产物生成(见图 5.4)，它与 Trp/ Ac 体系 Ac 敏化 Trp 生成 N 中心色氨酸自由基(Trp/N^*)的瞬态吸收谱(中性水溶液中，330、530nm 是 Trp/N^* 的特征吸收峰^[11])一致。因此，激光作用 Trp-Phe/Ac 体系生成了 $\text{Trp}/\text{N}^*\text{-Phe}$ ，



在 Trp-Gly/Ac 和 n-f-Met-Trp/Ac 光解体系也得到上述类似结果，不再赘述。

图 5.5 是 Phe-Tyr/Ac 水溶液的激光光解瞬态吸收光谱，随着 $^3\text{Ac}^*$ 的衰减，410nm 生成一吸收峰(图 5.5 插图)。吸收光谱与单电子氧化 Tyr 生成酚氧自由基(Tyr/O^*)的瞬态吸收谱一致^[10]，410nm 是 Tyr/O^* 的特征吸收峰，表明体系中生成了 Tyr/O^* 。在此光

解体系中，Phe 和 Tyr 残基激发三线态能级都比 ${}^3\text{Ac}^*$ 高，不能发生 T-T 能量转移，并且 Phe 残基与 ${}^3\text{Ac}^*$ 间也不能自发地发生电子转移反应，因此， ${}^3\text{Ac}^*$ 仅与 Tyr 发生电子转移反应，生成了 Phe-Tyr/ O^* 自由基。

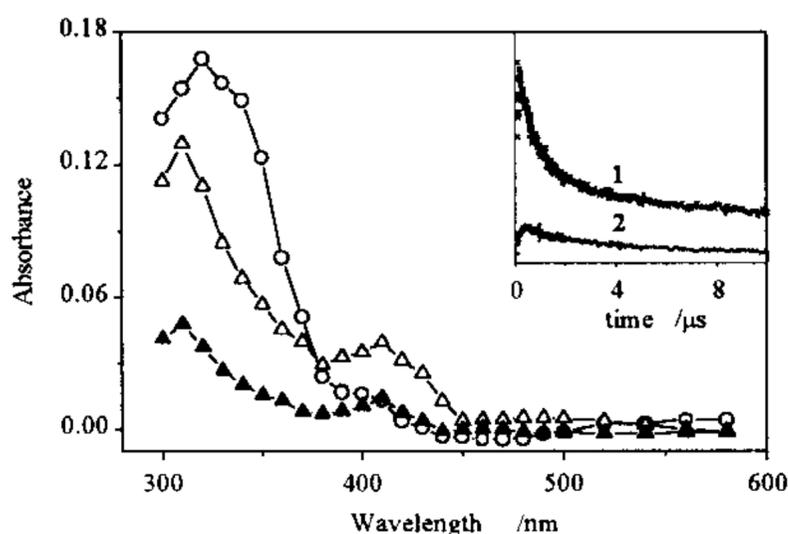


Fig. 5.5 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Phe-Tyr aqueous solution containing 0.2 mol dm^{-3} Ac saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (O), $1 \mu\text{s}$ (Δ), $20 \mu\text{s}$ (\blacktriangle).

Inset: Dependence on time of the absorbance at: 310 nm (1), 410 nm (2).

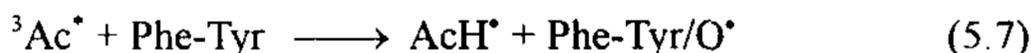


图 5.6 是 Trp-Tyr/Ac 无氧水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱。0.1 μs 时瞬态吸收谱 460nm 有一吸收峰，并且在体系中加入 Mn^{2+} 后这一吸收峰明显减弱。可推测 460nm 的吸收峰归属于 ${}^3\text{Trp}^*-\text{Tyr}$ 的瞬态吸收。1 μs 时，可观察到吸收峰蓝移(1 μs 时约为 430nm)，并在 330、530nm 形成二新的吸收峰，330、530nm 是 Trp/N^* 的特征吸收峰，表明光解过程中生成了 $\text{Trp}/\text{N}^*-\text{Tyr}$ 自由基。随着时间的推移，到 10 μs 只剩下 410nm 的吸收峰。此时的吸收光谱呈现 Tyr 酚氧自由基(Tyr/O^*)的瞬态吸收谱，即体系在激光照射后 10 μs 瞬态产物仅为 tyr/O^* 。显然，Trp-Tyr/Ac 无氧水溶液体系在激光作用后，发生了 $\text{Trp}/\text{N}^*-\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^*$ 的电子转移。由图 5.6 的插图可以看到，3 μs 时，瞬态吸收谱已基本上是 Tyr/O^* 的特征吸收谱了。对本文的体系，这么短的时间完成 $\text{Trp}/\text{N}^*-\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^*$

的转变只可能发生在分子内。

从上述分析可知，410nm、460nm、530nm 三个吸收峰分别归属于 Tyr/O[•]、³Trp^{*}和 -Trp/N[•]。

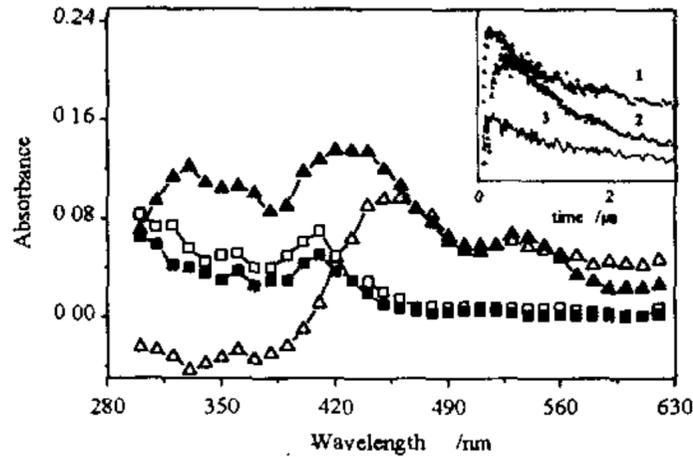
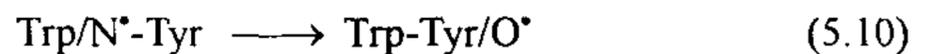
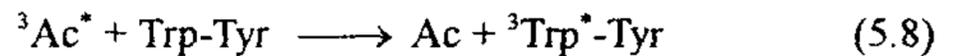


Fig. 5.6 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ Trp-Tyr aqueous solution containing 0.2 mol dm^{-3} Ac saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (Δ), $1 \mu\text{s}$ (\blacktriangle), $10 \mu\text{s}$ (\square), $20 \mu\text{s}$ (\blacksquare). Inset: Dependence on time of the absorbance at: 410nm(1), 460nm(2), 530nm(3).

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，



运用单电子氧化诱导多肽分子内电子转移已有脉冲辐解(Pulse Radiolysis)的研究报道^[15-16]，但光敏剂激发态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。

5.3 反应动力学

5.3.1 丙酮激发三重态

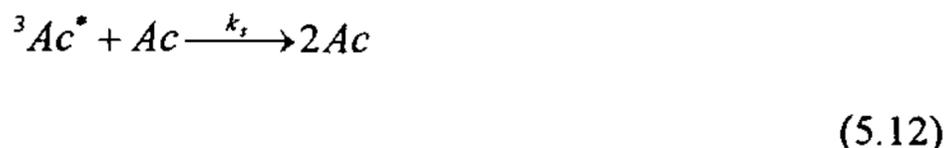
在本工作丙酮参与的光敏化反应体系中，激光能量首先被丙酮吸收，生成丙酮激发三重态(³Ac^{*}) (见(5.1)式)。丙酮激发三重态的失活主要通过以下几种途径：

- 1) 辐射跃迁(k_r)和非辐射跃迁(k_{nr})的单分子衰减过程，其单分子率减速率常数为

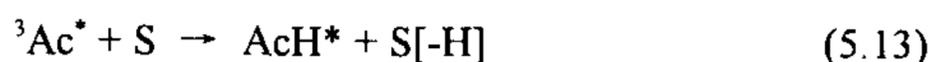
$k_0 (= k_r + k_{nr})$:



2) 与基态丙酮作用的自猝灭过程:



3) 与溶剂的抽氢反应, 这一反应在异丙醇存在时或在环己烷和乙醚等有机溶剂中表现的很明显^[17]。



4) 被三重态猝灭剂所猝灭, 或与激发三重态能级较底的分子发生激发能转移。



从上述反应可以看出, 丙酮激发三重态的失活表现为一级反应动力学, 在水溶液中, 当不考虑杂质的影响及其猝灭剂或能量受体不存在时, 丙酮激发三重态的表现一级衰减速率常数可表示为

$$K_{obs} = k_0 + k_s[Ac] \quad (5.16)$$

当 $[Ac] = 0.13M$ 时, 测得 $k'_{obs} = 3.1 \times 10^5 s^{-1}$, 其半衰期 $\tau = \ln 2 / k_{obs} = 2.2 \mu s$ 。

5.3.2 Trp 激发三重态动力学参数的测定

由 5.2.1 中的分析可知, Trp/Ac 体系光解的瞬态吸收谱是个复合谱。在不同的延长时间, 分别有 ${}^3Ac^*$ 、 ${}^3Trp^*$ 和/或 Trp/N^* 存在。要研究 ${}^3Trp^*$ 的猝灭动力学, 就必须排除 ${}^3Ac^*$ 和 Trp/N^* 的影响。从 530nm 处随时间衰减曲线的分析可知 (见图 5.1 中插图 2), 激光照射 $1\mu s$ 后, 530nm 处的衰减服从二级动力学, 仅为 Trp/N^* 的贡献, 460nm 附近的区域, 吸收是由 ${}^3Trp^*$ 及 Trp/N^* 的吸收复合而成的。20 μs 时, 460nm 的吸收峰消失, 就只剩下 Trp/N^* 了。

将激光照射后 $t\mu\text{s}$ 、在波长 λnm 的吸收值记为 A_t^λ ， ${}^3\text{Trp}^*$ 和 Trp/N^* 的浓度分别记为 $[\text{T}]_t$ 和 $[\text{N}]_t$ 。那么，由 Lambert-Beer 定律得出如下关系式：

$$A_t^{460} = [\text{T}]_t \cdot \varepsilon^{460}_{\text{T}} + [\text{N}]_t \cdot \varepsilon^{460}_{\text{N}} \quad (5.17)$$

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

$$A_{20}^{460} = [\text{N}]_{20} \cdot \varepsilon^{460}_{\text{N}} \quad (5.18)$$

$1\mu\text{s}$ 后，波长 530nm 处仅是 Trp/N^* 的吸收衰减，

$$A_t^{530} = [\text{N}]_t \cdot \varepsilon^{530}_{\text{N}} \quad (5.19)$$

$20\mu\text{s}$ 时，从方程(5.17)和(5.18)可以得到下式：

$$A_{20}^{460}/A_{20}^{530} = \varepsilon^{460}_{\text{N}}/\varepsilon^{530}_{\text{N}} = p \quad (5.20)$$

p 是个常数。由方程(5.17)(5.19)(5.20)得到下式：

$$\Delta A_t = A_t^{460} - A_t^{530} \cdot p = [\text{T}]_t \cdot \varepsilon^{460}_{\text{T}} \quad (5.21)$$

这便是从 460nm 中扣除了 Trp/N^* 的吸收、仅 ${}^3\text{Trp}^*$ 吸收随时间的变化关系，图 5.1 插图曲线 1、2 分别表示 530nm 、 460nm 的吸收随时间的变化 A_t^{530} 、 A_t^{460} 。曲线 3 是由 A_t^{460} 减去 A_t^{530} 与 p 之积得到的，它表示 ${}^3\text{Trp}^*$ 的衰减。其衰减规律很好地服从一级反应动力学。由此得到 ${}^3\text{Trp}^*$ 的表观衰减速率常数 $k_{\text{obs}} = 3.2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ 。

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：

$$k_{\text{obs}} = k^0 + k_s[\text{Trp}] + k_q[\text{Q}] \quad (5.22)$$

在不加三重态猝灭剂时 ($[\text{Q}]=0$)，改变 Trp 的浓度 ($[\text{Trp}]$) 可得到一系列 k_{obs} ，以 k_{obs} 对相应的 $[\text{Trp}]$ 作图拟合得到一直线。直线的斜率是 ${}^3\text{Trp}^*$ 被其基态分子猝灭的自猝灭速率常数 $k_s = 3.7 \times 10^8 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ，直线的截距为 ${}^3\text{Trp}^*$ 单分子衰减速率常数 $k^0 = 2.4 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ 。对含有 $2.5 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3} \text{O}_2$ (饱和空气的 O_2 含量) 的溶液光解，由(5.21)式得到 O_2 对 ${}^3\text{Trp}^*$ 的猝灭速率常数 $k_q = 4.9 \times 10^9 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

比较图 5.1 中 $1\mu\text{s}$ 和 $20\mu\text{s}$ 的瞬态吸收光谱，运用上述的减谱方法，可以获得 ${}^3\text{Trp}^*$ 在 $1\mu\text{s}$ 时的特征吸收光谱。由上述分析可知，图 5.1 中 $1\mu\text{s}$ 时 460nm 附近的吸收是衰减

$^3\text{Trp}^*$ 和 Trp/N^* 二者的贡献,而 $20\mu\text{s}$ 后 530nm 仅为 Trp/N^* 的贡献。从 A_1^λ 中减去 $A_{20}^\lambda \times A_1^{530}/A_{20}^{530}$ 得到 $^3\text{Trp}^*$ 在 $1\mu\text{s}$ 时的特征吸收谱,见图 5.1。

5.4 丙酮三重态与芳香氨基酸相互作用的热力学论证

在丙酮激发三重态与芳香氨基酸及肽发生光敏化反应过程中,可能伴随发生能量转移和电子转移过程。当发生有效的三重态能量转移反应,给体(敏化剂)最低激发三重态能量大于受体的激发三重态能量。而丙酮与芳香氨基酸最低激发三重态能级分别为 $\text{Ac } 337\text{kJ mol}^{-1}$ ^[13], $\text{Trp } 297\text{kJ mol}^{-1}$, $\text{Tyr } 342\text{kJ mol}^{-1}$, $\text{Phe } 345\text{kJ mol}^{-1}$ ^[8]。显然, $^3\text{Ac}^*$ 只能与 Trp 发生 T-T 激发能转移。

Table 5.1 The free energy change of electron transfer between peptides containing Aromatic amino acid and $^3\text{Ac}^*$

Related peptides	$E_{\text{ox}} (\text{V})(\text{SCE})^{[10]}$	$\Delta G \text{ kJ mol}^{-1}$
Trp	0.81	-36.5
Trp-Gly	0.79	-38.4
Gly-Trp	0.75	-42.3
Lys-Trp-Lys	0.76	-41.3
Gly-Trp-Gly	0.73	-44.2
Tyr	0.70	-47.1
Tyr-Gly	0.67	-50.0
Tyr-Lys	0.68	-49.2
Lys-Tyr	0.65	-52.1
Ala-Tyr-Ala	0.64	-52.9
Phe	1.44	24.3

对于电子转移反应,可用反应过程中的自由能变化判断。Rehm-Weller 方程可用于计算光诱导电子转移反应的自由能变化:

$$\Delta G = 96.48(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} - e^2/\epsilon d) - \Delta E_{0,0} \quad (5.23)$$

式中 $e^2/\epsilon d$ 项在水溶液中可以忽略^[18], $\Delta E_{0,0}$ 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 $-2.305V(SCE)$ 、 $\Delta E_{0,0}$ 为 $337kJ/mol$ ^[9]. 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)进行了计算, 结果列于表 5.1. 表 5.1 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。

5.5 小结

1. 水溶液中芳香氨基酸(Trp, Tyr 和 Phe)与丙酮三重态($^3Ac^*$)的光化学反应. 在 Trp/Ac、Tyr/Ac 两个光解体系中; 分别观察到 Trp 激发三重态($^3Trp^*$)和 N 中心色氨酸自由基(Trp/ N^*)、Tyr 的酚氧自由基(Tyr/ O^*), 阐述了 $^3Trp^*$ 、Trp/ N^* 和 Tyr/ O^* 是 $^3Ac^*$ 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; 而 Phe/Ac 光解体系中, 仅观察到 $^3Ac^*$, 即 $^3Ac^*$ 与 Phe 不能发生 T-T 激发能转移和电子转移.
2. 含芳香氨基酸残基肽的丙酮敏化光解, 对于含 Trp 残基的肽, 丙酮三重态与 Trp 分别进行 T-T 激发能转移和电子转移生成 Trp 激发三重态和 N 中心自由基(Trp/ N^*); 而含酪氨酸残基的肽, 丙酮三重态仅与 Tyr 进行电子转移生成 Tyr 的酚氧自由基(tyr/ O^*). 在 Trp-Tyr/Ac 光解体系中, 观察到由 Trp/ N^* -Tyr \rightarrow Trp-Tyr/ O^* 自由基的转变过程, 这是首次直接观察到光敏剂激发三重态引发的 Trp/ N^* -Tyr \rightarrow Trp-Tyr/ O^* 分子内的电子转移.

参考文献

1. Steiner R F, Weinryb I. "Excited states of proteins and nucleic acids", Plenum Press, New York, N. Y., 1971.
2. Konev S V. "Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids", Plenum Press, New York, N. Y., 1967.
3. Bensasson R V, Land E J, Truscott T G. Pyrimidines, Purine, and nucleic acids, in Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine, Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Oxford: Oxford University Press, 1993, pp.142-172.

4. Nikogosyan D N, Gorner H. Photolysis of aromatic amino acids in aqueous solution by nanosecond 248nm and 193nm laser light, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1992, 13: 219-234 and references cited therein.
5. 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.
6. 宋钦华, 李全新, 孙海虹, 徐业平等. 芳香氨基酸光电离过程的 pH 效应. *自然科学进展*, Vol.10 No.2, 174-177.
7. SONG Qinhu, LI Quanxin SUN Haihong et al., Photoionization of aromatic amino acid at different pH values, *PROGRESS IN NATURAL SCIENCE* Vol. 10 No.4:314-318.
8. Kasama k, A. Takematsu and S. Arai, *J. Phys. Chem. Soc.*, 1982, 86, 2420-2427.
9. Johnston L. J., J.C. Scaino and T.Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 1291.
10. Bent D V, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97(10):2612-2619.
11. Prutz W A, Land E I. Charge transfer in peptides. Pulse radiolysis investigation of one-electron reaction in dipeptides of tryptophan and tyrosine, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1979, 36,513-520.
12. DeFelippis 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, 3416-3419.
13. Kasama K, Takematsu A, Arai S. Photochemical reactions of triplet acetone with indole, purine and pyrimidine derivatives. *J. Phys. Chem.*, 1982, 86: 2420-2427.
14. Bent D.V., and Hayon E., *J. Am. Chem. Soc.* 1975,97, 2606-2612.
15. Bobrowski K, Holcman J, Polznanski J et al. Pulse radiolysis studies of intramolecular electron transfer in model peptides and proteins. 5. Trp[•]→Tyr[•] radical transformation in H- Trp-(Pro)n-Tyr-OH series of peptides. *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 10036-10043 and references cited therein.
16. Isied S S, Ogawa M Y, Wishart J F. Peptide-mediated intramolecular electron transfer: long-range distance dependence. *Chem. Rev.*, 1992, 92, 381-394.
17. Port G., R.W. Yip, J.M. Dunston, A.J. Cessna and S.E. Sugamori, *Trans. Faraday Soc.*, 1971, 76, 3149.

18. Fox M A, Chanon M. Photoinduced Electron Transfer, Amsterdam: Elsevier, 1988.

第六章 甲硫氨酸衍生物及其肽的光敏化氧化反应

摘要: 利用纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置, 以 4-硝基喹啉氧化物(4NQO)为光敏剂, 研究了 4NQO 与甲硫氨酸衍生物及其肽的光化学反应。在中性水溶液中, 观察到 4NQO 三重态, $4NQO^*H$ 和甲硫氨酸及其肽的抽氢自由基瞬态吸收光谱; 测定了衰减动力学参数, 论证了甲硫氨酸衍生物及其肽的抽氢自由基是通过电子转移反应生成的。总结提出了光化学反应的详细机理。

6.1 引言

甲硫氨酸 (MET) 不吸收紫外光, 但 MET 中的硫醚官能团很容易受到处在激发态的光敏剂的进攻发生氧化反应, 产生含硫阳离子自由基瞬态产物, 使蛋白质的构型遭到破坏。光敏化氧化反应中产生的自由基与生物体系氧化反应过程密切相关, 因而一直是光化学研究的热点。常用于光敏化氧化反应研究的光敏剂有二苯甲酮(BZ), 4-羧基二苯甲酮(CB)。反应机理概括为: 光化学反应的初始过程是通过光敏化剂激发三重态 ($^3CB^*$) 与 MET 进行电子转移导致 $^3CB^*$ 的猝灭; 次级过程为不可逆过程, 即脱羧反应。研究中存在的问题是: $^3CB^*$ 吸收波段范围宽, 寿命长, 不能直接观察含硫自由基的瞬态吸收。

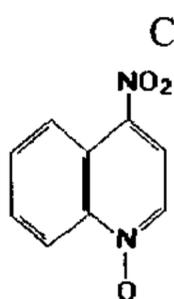
4-硝基喹啉氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 简称 4NQO)是一种典型的致癌物。在水溶液中, 具有与 DNA 通过电荷转移作用连接到碱基上的性质, 这一性质可能与致癌作用密切相关^[1-3]。由于 DNA 具有的遗传功能通过形成染色质来实现, 染色质是 DNA 与蛋白质形成的络合物, 这种蛋白质结合在 DNA 上, 同 DNA 碱基一样, 也可以参与由化学反应诱导的致癌过程。因此, 研究光引发 4NQO 与氨基酸及相关肽的反应对于了解光诱导 4NQO 致癌作用的分子机制有重要意义。

Seki 等^[4]运用 355nm 激光闪光光解研究了水溶液中 4NQO 激发三重态($^34NQO^*$)与几种氨基酸的反应, 观察到色氨酸(TrpH), 酪氨酸(TyrOH)的阳离子的脱质子自由基 (Trp^* 、 $TyrO^*$)和 4NQO 的加氢自由基($4NQOH^*$)的生成, 认为它们是通过 TrpH、TyrOH 与 $^34NQO^*$ 之间电子转移生成。然而, 在 4NQO 与甲硫氨酸(Met)的光解体系, 没有观察

到 Met 阳离子自由基($>CH-S^+-CH_3$)的次级产物的生成, 仅以 $4NQOH^*$ 的生成推测 $^34NQO^*$ 与 Met 之间发生了电子转移反应. 本工作研究了中性水溶液中含硫氨基酸的二肽与 $4NQO$ 在 248nm 激光的作用下的光化学反应, 观察到脱质子的甲硫氨酸残基阳离子自由基, 即 α -烷基自由基($>C^*-S-CH_3$)的生成.

$4NQO$ 、甲硫氨酸(Met)、甲硫氨酸甲酯(MME)、甲硫氨酰甲硫氨酸(Met-Met)、甲硫氨酰甘氨酸(Met-Gly)、丙氨酰甲硫氨酸(Ala-Met)、甲硫氨酰亮氨酸(Met-Lue) 和甲硫氨酰亮氨酰苯丙氨酸均为 Sigma 公司产品, 未经进一步纯化直接使用, 其结构式为:

$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$	Met
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-COOCCCH_3$	MME
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-CO-NH-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-S-CH_3$	Met-Met
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-CO-NH-CH_2-COO^-$	Met-Gly
$CH_3-CH(NH_3^+)-CO-NH-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-S-CH_3$	Ala-Met
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-CO-NH-CH(COO^-)-CH_2-CH(CH_3)_2$	Met-Lue
$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-CO-NH-CH(CH_2-CH(CH_3)_2)-COO^-$	Met-Lue-Phe



4NQO

所有溶液用三重蒸馏水配制, 缓冲溶液由磷酸钠盐配制, 实验在室温下中性溶液中进行. 样品实验前用高纯氮 N_2 (99.99%)鼓泡 20 分钟, 除去溶液中的氧.

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, 其波长为 248nm, 脉宽 20ns, 每脉冲能量 $\leq 50mJ$, 信号由 HP54510B 300MHz 瞬态记录仪记录, 并转化为数字信号送入 PC-486 计算机进行处理. 详细的实验装置介绍见文献[5].

6.2 4NQO 的光化学

6.2.1 4NQO 激发三重态的瞬态吸收光谱

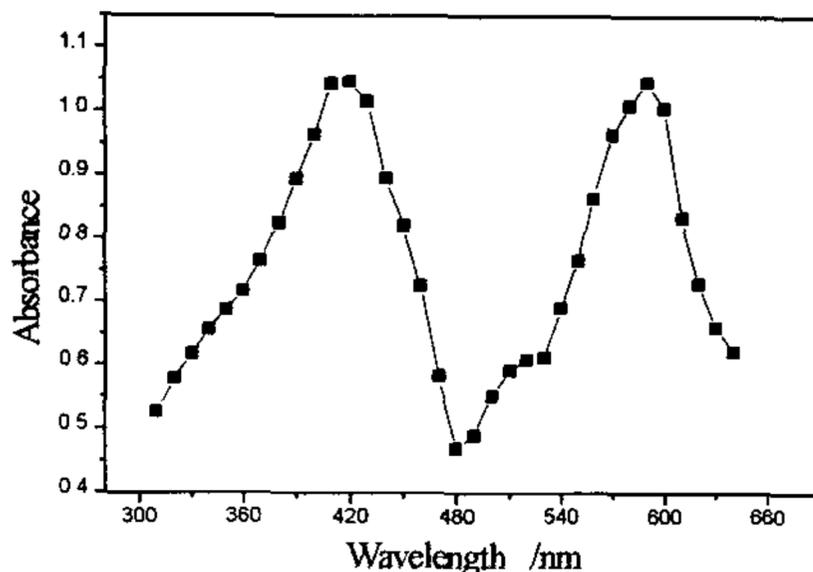
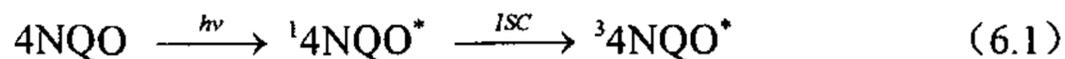


Fig. 6.1 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ aqueous solution 4NQO saturated with N_2 : $1 \mu\text{s}$ (■).

用 248nm 激光脉冲辐照 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 4NQO 中性水溶液，获得的瞬态吸收光谱见图 6.1。在 410 nm 和 590 nm 处各有一吸收峰，这二吸收峰归属于 4NQO 三重态($^3\text{4NQO}^*$)。依据是：1)可被氧猝灭，2)可敏化并四苯生成激发三重态：因 $^3\text{4NQO}^*$ 能量是 14800 cm^{-1} ，并四苯三重态的能量是 10250 cm^{-1} ，加入少量并四苯的 4NQO 苯溶液，激发 4NQO，可检测到并四苯激发三重态，显然是 $^3\text{4NQO}^*$ 与并四苯发生了 T-T 能量转移^[2,3]。Seki 等人用 355nm 激光光解 4NQO 缓冲溶液测得 590nm 处的摩尔吸收系数为 $7600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[2,3]。410nm 和 590nm 处的吸收衰变服从一级反应动力学， $^3\text{4NQO}^*$ 的衰减速率常数 k 值为 $2.48 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 。

6.2.2 4NQO 激发三重态的生成及衰减动力学

在紫外光的辐照下，4NQO 吸收一个光子从电子基态跃迁到激发单重态，这个过程很快，在 10^{-13} - 10^{-15} s 范围内 (ks) 完成，在纳秒级的瞬态吸收光谱上观察不到。在激发单重态上的电子经过系间转换 (ISC) 很容易被激发到三重态，这个过程约为 10^{-6} s 。



通过对 4NQO 激发三重态的生成曲线进行动力学分析得到 $k_{ISC} = 5.74 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (见 Fig.6.2).

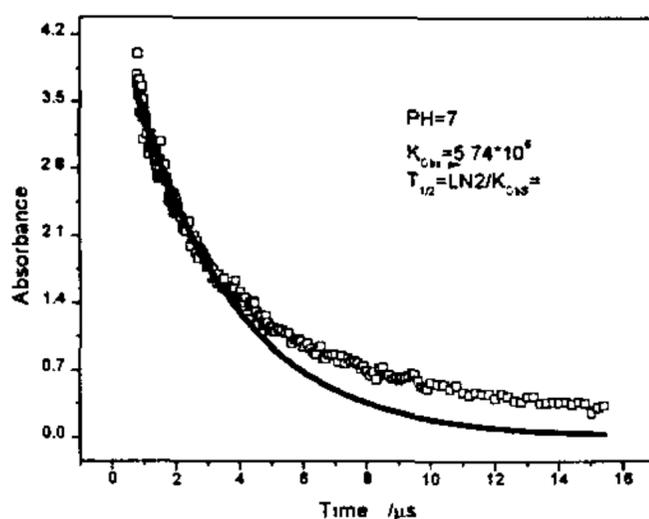


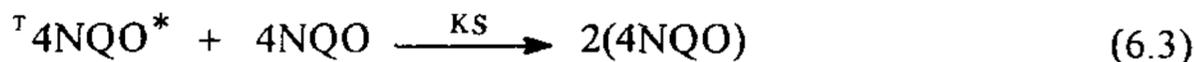
Fig.6.2 The experimental kinetic data of the transient species 4NQO at 590 nm (\square) and the simulation curves according to the law of first-order forming and decay by computer(-).

4NQO 激发三重态的失活主要通过以下几种途径:

- (1) 辐射跃迁 (k_r) 和非辐射跃迁 (k_{nr}) 的单分子过程, 其单分子衰减速率常数为 K_0 ($k_0 = k_r + k_{nr}$):

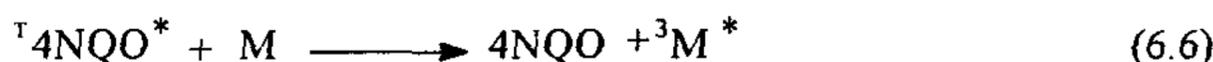
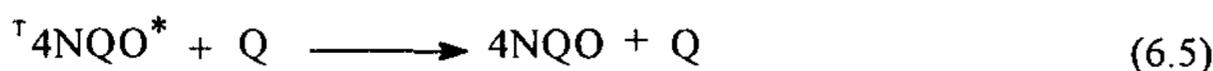


(2) 与基态 4NQO 作用的自猝灭过程:



(3) 与溶剂的抽氢反应, 这一反应在不含其它猝灭剂的水溶液中表现得很明显:

(4) 被三重态猝灭剂或其它猝灭剂所猝灭, 或与激发三重态能级较低的分子发生激发能转移生成另一激发三重态:



从反应 (6.2) - (6.6) 可知, 4NQO 激发三重态的失活表现为表观一级反应动力学。在水溶液中, 当不考虑杂质的影响及其它猝灭剂或能量受体不存在时, 4NQO 激发三重

态的表现一级衰减速率常数可表示为：

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_3[4\text{NQO}] \quad (6.7)$$

当 $[4\text{NQO}] = 1\text{mM}$ 时测得, $k_{\text{d, obs}} = 1.95 \times 10^5 \text{s}^{-1}$ 。

6.3 甲硫氨酸衍生物及其肽与 4NQO 光敏化氧化反应

用 248 nm 激光脉冲辐照含 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Met 及二肽的中性水溶液没有任何变化。表明 Met 及二肽在 248 nm 波长的紫外光的作用下, 不发生任何反应。

6.3.1 瞬态吸收光谱

6.3.1.1 甲硫氨酸及甲硫氨酸甲酯

用 248nm 激光脉冲辐照 4NQO 和 Met 的中性无氧水溶液, 其瞬态吸收光谱见 Fig.6.3。激光作用后立刻检测到 410nm 和 590nm 二个吸收峰, 与 Fig.6.1 中激光光解的单纯 4NQO 的水溶液产生的结果一致。410nm、590nm 的吸收峰是源于 4NQO 激发三重态($^14\text{NQO}^*$)。随着 410nm、590nm 瞬态吸收的衰减, 450nm 处出现新的吸收峰, 这与 4NQO 的加氢自由基($4\text{NQO}^*\text{H}$)的瞬态吸收谱一致^[2,3], 因此, 光解过程中产生了 $4\text{NQO}^*\text{H}$ 。另外在接近 300nm 处出现新的吸收。这是由 Met 产生的阳离子 $>\text{CH-S}^{++}\text{-CH}_3$ 经脱质子后产生的-硫烷基自由基($>\text{C}^*\text{-S-CH}_3$), 其特征吸收为 300nm 左右^[5, 6]。从图 6.3 的插图中可分别观察到 $>\text{C}^*\text{-S-CH}_3$ 的生成(320nm)和 $^14\text{NQO}^*$ 的衰减(590nm)。从上述实验现象和分析可知, 在 248nm 激光作用下, 甲硫氨酸及衍生物与 4NQO 发生了以下化学反应: 4NQO 吸收一个 248nm 的光子, 产生跃迁, 经迅速的系间窜跃(ISC)至三重态, 形成 $^14\text{NQO}^*$ 。 $^14\text{NQO}^*$ 与 Met 及衍生物发生电子转移反应, 生成电子转移络合物。络合物进一步分解, 生成 4NQO 的阴离子自由基(4NQO^{\bullet})、含硫阳离子自由基($>\text{CH-S}^{++}\text{-CH}_3$)。 4NQO^{\bullet} 与水分子反应生成 4NQOH^{\bullet} , $>\text{CH-S}^{++}\text{-CH}_3$ 脱质子生成 α -硫烷基自由基, $>\text{C}^*\text{-S-CH}_3$ 。实验分别观察到 $4\text{NQO}^*\text{H}$ 和 $>\text{C}^*\text{-S-CH}_3$ 的生成过程。因此, 4NQO 和 Met 及其肽的中性水溶液在 248nm 激光作用下, 4NQO 激发三重态与甲硫氨酸及衍生物产生了电子转移反应。在 4NQO 与 MME 的体系中也观察到上述现象(见 Fig.6.4)。

6.3.1.2 含甲硫氨酸的二肽

用 248nm 激光辐照 4NQO 和 Met-Met 的中性无氧水溶液, 其瞬态吸收光谱见图 6.5.

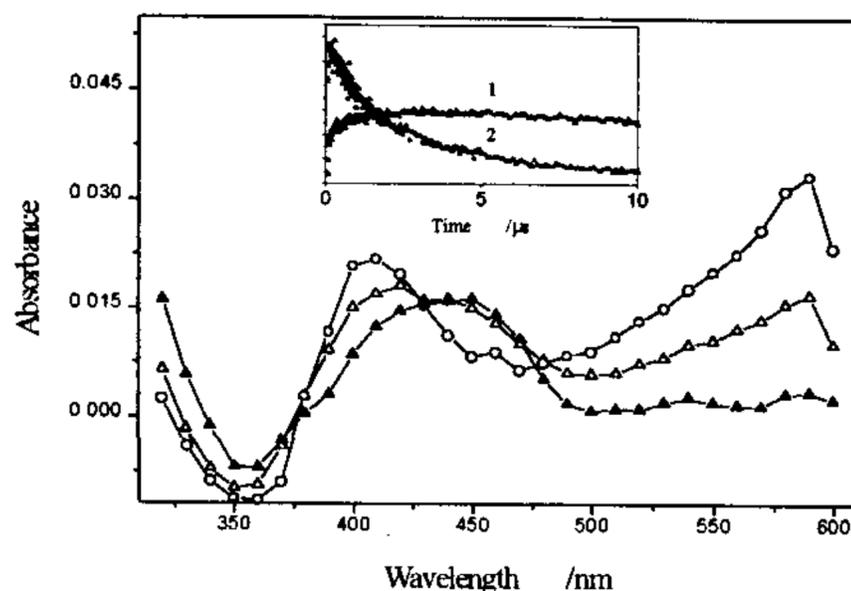


Fig. 6.3 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$ Met aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (\circ), $10 \mu\text{s}$ (Δ), $20 \mu\text{s}$ (\blacktriangle). Inset: Dependence on time of the absorbance at: 320nm(1), 590nm(2).

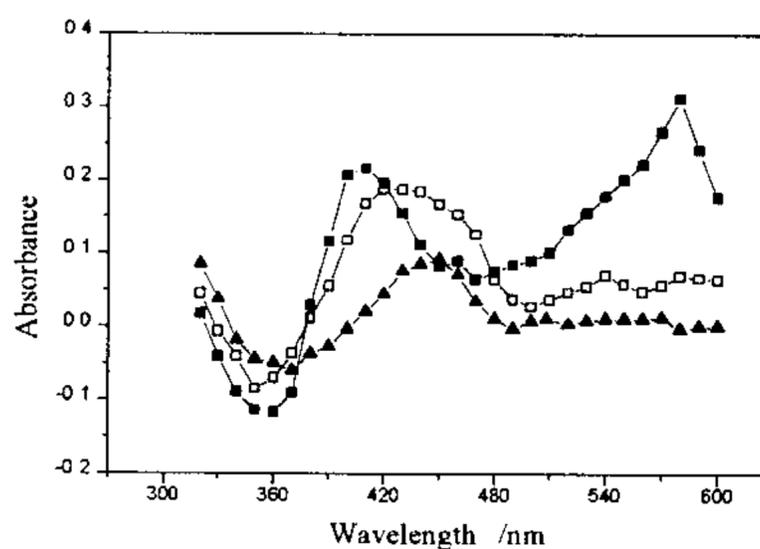


Fig. 6.4 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$ MME aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (\blacksquare), $20 \mu\text{s}$ (\square), $60 \mu\text{s}$ (\blacktriangle).

激光作用后立刻检测到 410nm 和 590nm 二个吸收峰, 与图 6.3、图 6.4 的结果一致, 是 4NQO 激发三重态($^14\text{NQO}^*$)的吸收. 随着 410nm、590nm 的吸收峰的衰减, 290nm、450nm 各出现一新的吸收峰, 450nm 的吸收峰与 4NQO 的加氢自由基($4\text{NQO}^*\text{H}$)的瞬态

吸收光谱一致^[3,4], 即光解过程中产生了 $4\text{NQO}^*\text{H}$. 290nm 吸收峰的归属可由脉冲辐解的结果得到. 在脉冲辐解研究 $^{\bullet}\text{OH}$ 单电子氧化甲硫氨酸及其肽生成的瞬态产物时证实, Met 阳离子($>\text{CH}-\text{S}^+-\text{CH}_3$)脱质子后产生的 α -烷基自由基($>\text{C}^{\bullet}-\text{S}-\text{CH}_3$), 其最大吸收在 290nm, 量子产额随 pH 值增大而增大^[6-8]. 可以推测, 290nm 的吸收峰归属于 α -烷基自由基. 从图 6.5 中插图可分别观察到 $>\text{C}^{\bullet}-\text{S}-\text{CH}_3$ 的生成(290nm)和 $^34\text{NQO}^*$ 的衰减(590nm),

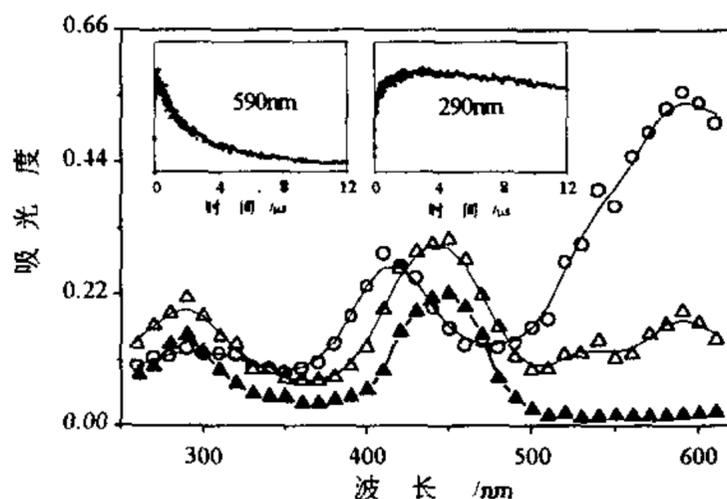


Fig. 6.5 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$ Met aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (\circ), $10 \mu\text{s}$ (\triangle), $20 \mu\text{s}$ (\blacktriangle). Inset: Dependence on time of the absorbance at: 320nm(1), 590nm(2).

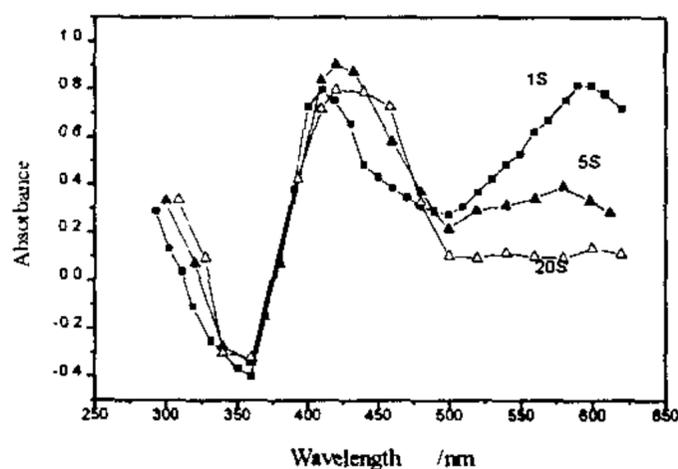


Fig. 6.6 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$ Ala-Met aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (\circ), $5 \mu\text{s}$ (\blacktriangle), $20 \mu\text{s}$ (\triangle).

4NQO 与 Met-Gly, Ala-Met 和 Met-Lue 的反应体系中都得到类似的结果. 图 6.6 是

248 nm 激光辐照 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 4NQO 和 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Ala-Met 无氧中性水溶液的瞬态吸收光谱。图 6.6 结果表明与图 6.3、图 6.4 和图 6.5 的结果一致。

从上述实验现象和分析可知， $^34\text{NQO}^*$ 与含 Met 的二肽发生电子转移反应，生成电子转移络合物， $[\text{4NQO}^{\bullet-} \cdots \text{S}(\text{CH}_2)\text{-CH}_3]$ 。络合物进一步分解，生成 4NQO 阴离子自由基($4\text{NQO}^{\bullet-}$)和含硫阳离子自由基， $>\text{CH-S}^{\bullet+}\text{-CH}_3$ 。4NQO $^{\bullet-}$ 与水分子反应生成 4NQOH^{\bullet} ， $>\text{CH-S}^{\bullet+}\text{-CH}_3$ 脱质子生成 α -烷基自由基， $>\text{C}^{\bullet}\text{-S-CH}_3$ 。实验分别观察到 4NQOH^{\bullet} ($\lambda_{\text{max}}=450\text{nm}$) 和 $>\text{C}^{\bullet}\text{-S-CH}_3$ ($\lambda_{\text{max}}=290\text{nm}$) 的生成。因此，4NQO 和含 Met-肽的中性水溶液在 248nm 激光作用下，4NQO 激发三重态与甲硫氨酸残基发生了电子转移反应。

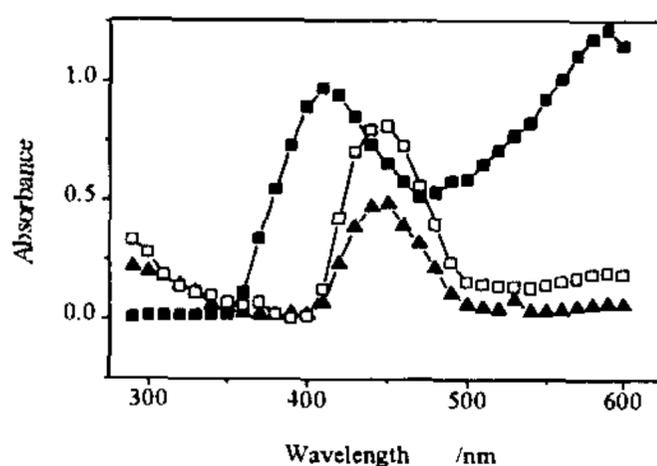


Fig.6.7 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{mol dm}^{-3}$ Met-Lue aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (■), $5 \mu\text{s}$ (□), $20 \mu\text{s}$ (▲).

Table 6.1 Rate constants of decay of $^34\text{NQO}^*$ and formation of $>\text{C-S}^{\bullet}\text{-CH}_3$

System	k_{d590}	k_{f290}
Met-Met/4NQO	$5.9 \times 10^5 \text{s}^{-1}$	$4.3 \times 10^5 \text{s}^{-1}$
Ala-Met/4NQO	$3.1 \times 10^5 \text{s}^{-1}$	$2.1 \times 10^5 \text{s}^{-1}$
Met-Lue/4NQO	$1.6 \times 10^5 \text{s}^{-1}$	$1.2 \times 10^5 \text{s}^{-1}$
Met-Gly/4NQO	$3.4 \times 10^5 \text{s}^{-1}$	$2.3 \times 10^5 \text{s}^{-1}$

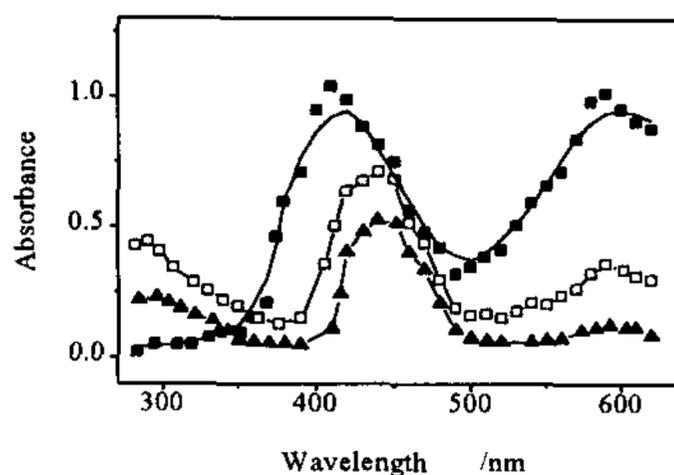


Fig.6.8 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Met-Gly aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (■), $5 \mu\text{s}$ (□), $20 \mu\text{s}$ (▲).

6.3.1.3 含甲硫氨酸三肽

图6.9是248nm激光辐照4NQO和Met-Leu-Phe的中性无氧水溶液的瞬态吸收谱。激光作用后立刻检测到410.nm和590.nm二个吸收峰，随着410.nm、590.nm的吸收峰的衰减，290.nm和450.nm处各出现一新的吸收峰。与图6.3-图6.6相同410.nm、590.nm的吸收峰是源于4NQO激发三重态($^14\text{NQO}^*$)。450.nm的吸收峰是 $4\text{NQO}^*\text{H}$ 的吸收^[3-4]，即4NQO与Met-Leu-Phe光解过程中产生了 $4\text{NQO}^*\text{H}$ 。290 nm吸收峰归属 $>\text{CH-S}^+-\text{CH}_3$ 的吸收。

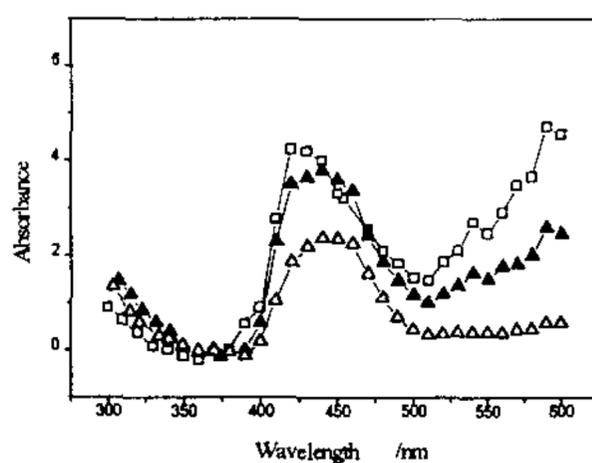
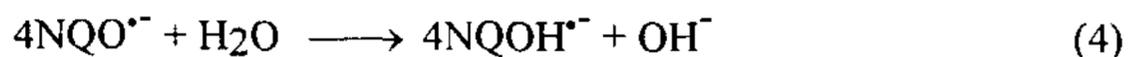
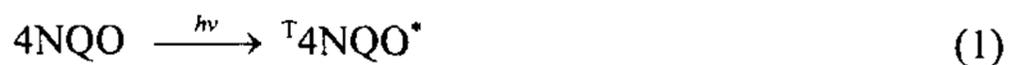


Fig.6.9 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Met-Leu-Phe aqueous solution containing $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 4NQO saturated with N_2 : $0.1 \mu\text{s}$ (□), $5 \mu\text{s}$ (▲), $20 \mu\text{s}$ (△).

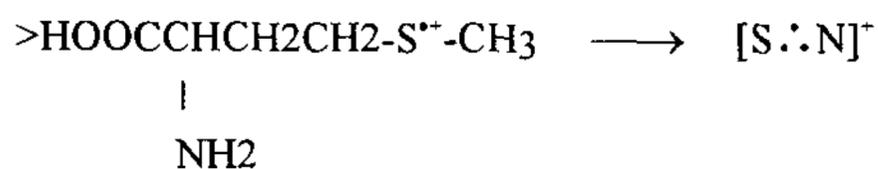
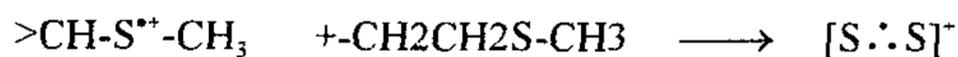
6.3.2 反应机理

甲硫氨酸衍生物及其肽与 4NQO 光敏化氧化反应的反应机理可概括为：

- 1) 4NQO 吸收一个 248nm 的光子，产生跃迁，经迅速的系间窜跃(ISC)至三重态，形成 $^14NQO^*$ 。
- 2) $^14NQO^*$ 与 Met 及衍生物发生电子转移反应，生成电子转移络合物。
- 3) 络合物进一步分解，生成 4NQO 的阴离子自由基($4NQO^{\bullet-}$)、含硫阳离子自由基($>CH-S^{\bullet+}-CH_3$)。
- 4) $4NQO^{\bullet-}$ 与水分子进行抽氢反应生成 $4NQOH^{\bullet-}$
- 5) $>CH-S^{\bullet+}-CH_3$ 脱质子生成 α -硫烷基自由基， $>C^{\bullet}-S-CH_3$ 。



- 6) 含硫阳离子自由基($>CH-S^{\bullet+}-CH_3$)有可能与母体分子进行分子间的电子反应生成硫硫两中心三电子键 $[S \cdots S]^+$ 。
- 7) 含硫阳离子自由基($>CH-S^{\bullet+}-CH_3$)有可能进行分子内的电子转移反应生成硫氮两中心三电子键 $[S \cdots N]^+$ 。



6.4 小结

1. 观察到水溶液中 4NQO 被激光作用生成的 4NQO 激发三重态 ($^14NQO^*$) 吸收光谱，测定了表观衰减动力学常数； $^14NQO^*$ 衰变的主要途径为：被猝灭剂猝灭，或与激发三重态能级较低的分子发生激发能转移生成另一激发三重态。

2. 水溶液中含硫氨基酸与 4NQO 激发三重态 ($^14NQO^*$) 的光化学反应, 在 Met/4NQO、MME/4NQO、含 Met 二肽//4NQO、含 Met 三肽//4NQO 的光解体系中, 分别观察到 $4NQO^*H$ 和甲硫氨酸及其肽抽氢自由基- α -烷基自由基的生成, 其中 α -烷基自由基是在光敏化反应过程中首次观察到的, 获得了甲硫氨酸及衍生物与 4NQO 光敏化反应中电子转移的直接证据。

3. 提出的反应机理为 $^34NQO^*$ 与含 Met 发生电子转移反应, 生成电子转移络合物 $[4NQO^* \cdots ^*S(CH_2)-CH_3]$, 络合物进一步分解, 生成 4NQO 阴离子自由基($4NQO^{\bullet-}$)和含硫阳离子自由基 ($>CH-S^{\bullet+}-CH_3$), $4NQO^*$ 与水分子反应生成 $4NQOH^*$, $>CH-S^{\bullet+}-CH_3$ 脱质子生成 α -烷基自由基, $>C^{\bullet}-S-CH_3$ 。并测定了表观衰减动力学常数。

参 考 文 献

1. Nagata C., Kodama M., Tagashira Y., Imamura A.. *Biopolymers*, 1966, 4, 409.
2. Okano T, Uekama K. *Chem. Pharm. Bull.*, 1967, 15, 1812.
3. Kasama K., Takematsu A., Yamamoto S., et al.. *J. Phys. Chem.*, 1984, 88: 4918.
4. Seki H, Takamatsu A, Arai S. *J. Phys. Chem.*, 1987, 91: 176.
5. Zuo Z. H., Yao S. D., Luo J., et al.. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1992, 15: 215
6. Bobrowski K, Schoneich C, Holcman J, et al.. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1991, 353.
7. Bobrowski K, Holcman J., *J. Phys. Chem.*, 1989, 93, 6381.
8. Hiller K-O, Masloch B, Gobl M, et al.. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103: 2734.
9. Borowski K., Marciniak B., Hug G. L.. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 10279.

第七章 芳香氨基酸及其肽的光电离过程

摘要：运用 248nm 激光闪光光解瞬态吸收光谱研究了不同 pH 值水溶液中芳香氨基酸的光电离过程。结果表明，pH 值对酪氨酸和色氨酸的光电离过程有显著影响：溶液的 pH 值增大，光电离倾向于单光子过程，pH 减小倾向于双光子过程；而对苯丙氨酸几乎没有影响。酪氨酸、色氨酸光电离过程的 pH 效应分别源于酚羟基氢、吡啶环上>NH 的解离。并运用可调波长激光光解方法研究芳香氨基酸的光电离过程，首先证实芳香氨基酸光电离为单光子过程，通过改变激发光的波长测定色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位。通过激光光解方法获得了色氨酸，酪氨酸和苯丙氨酸的电离电位。

7.1 引言

在人体必需的二十几种氨基酸中，仅有酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)三种芳香氨基酸在 UVB(280-320nm)波段有吸收，发色团为芳香性的取代基。芳香氨基酸尤其是 Trp 的 UV 光化学，近三十年来进行了广泛的研究^[1-5]，用低强度^[6-9]或高强度^[10-19]UV 激光进行了多种光电离的测量。然而，上述文献所报道的水合电子的量子产额(Φ_e)彼此不相符合，甚至同一个研究小组前后得到的值也不一致^[13, 15, 17]；至于芳香氨基酸的光电离过程，有报道单光子过程的^[12, 13, 15, 19]，也有报道双光子过程的^[14, 16]。

芳香氨基酸受到光辐射，使蛋白质受到辐射损伤影响。光电离生成含芳香氨基酸侧链自由基，并发生电子转移，使蛋白质受到辐射损伤进一步发生传递。Trp^{*}与 TyrO^{*}自由基已在许多涉及酶的反应中检测到，Trp 和 Tyr 在参与细胞色素的氧化反应和 DNA 的还原反应中分别生成 Trp^{*}与 TyrO^{*}自由基。

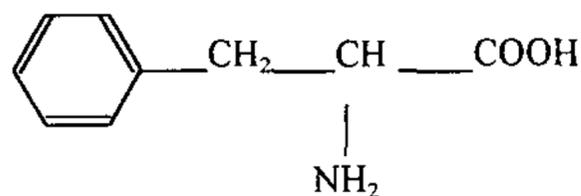
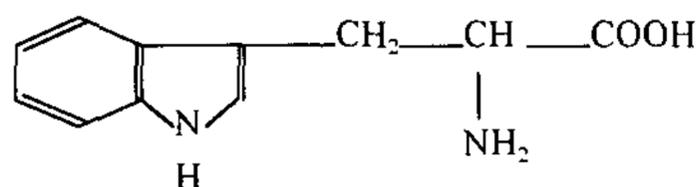
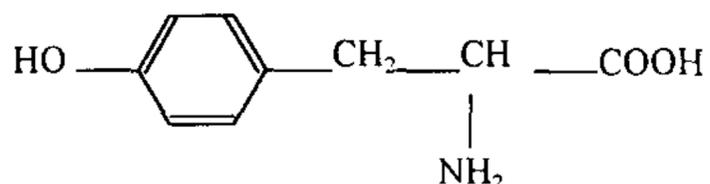
影响芳香氨基酸光电离性质，电子转移方向和蛋白质受损伤的程度的最重要因素之一是芳香氨基酸的氧化还原电位。到目前为止，文献报道的测量芳香氨基酸的氧化还原电位所运用的方法有电化学方法和脉冲辐解方法。

溶液 pH 值对芳香氨基酸发光性质的影响，人们已较为熟知，而 pH 值对芳香氨基酸光电离过程的影响还未见报道。本工作运用激光光解瞬态吸收光谱研究了 pH 值对芳

香氨基酸的 248nm 激光光电离过程的影响，并对上述在芳香氨基酸光电离测量中得不到一致结果的现象作了解释。另外，运用激光光解方法，通过调节激光波长，观察水合电子的吸收信号首次测定了酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)的光电离电位。

7.2 材料与方方法

DL-酪氨酸(Tyr)、D-色氨酸(Trp)、L-苯丙氨酸(Phe)、色氨酰肼氨酸(Trp-Gly)、色氨酰酪氨酸(Trp-Tyr)、n-甲酰甲硫氨酰色氨酸(n-f-Met-Trp)、甲硫氨酰苯丙氨酸(Met-Phe)和(Met-Leu-Phe)为 Sigma 公司产品，未经进一步纯化直接使用，其结构式见下面。溶液的 pH 值用氢氧化钠和磷酸(均为分析纯)溶液调节。由表 3.1 中 pKa 值可知，在本文的三个 pH 值下，芳香氨基酸(以 HA 表示)的存在形式分别为 pH 1.4: H_2A^+ ; pH 6.4: HA; pH 11.4: A^- (Trp、Phe)或 $A^-[-H]^2$ (Tyr)。所有溶液的配制及纯化均用三重蒸馏水。样品在实验前用高纯氮或氧化亚氮鼓泡 20min。



激光闪光光解实验在中国科学院辐射化学开放实验室完成。实验装置采用国产 KrF 准分子激光器作为激励光源，波长为 248nm，脉宽 20ns，每脉冲能量 ≤ 50 mJ，信号由 HP54510B 300MHz 瞬态记录仪记录，并转化为数字信号送入 PC-486 计算机进行处理。详细装置介绍见文献[20]。

测定酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)的光电离电位的激光光解装置由本室研制。激光系统由 YAG 激光器 (Spectra Physics:GCR-170), 泵浦染料激光器 (Lumonics:HT-500), 再经倍频器 (Lumonics:HT-1000) 倍频, 激光波长可调, 脉宽 10ns, 激光能量约为 2mj/pulse。分析光为 500W 氙灯, 激光光束与分析光束垂直照射 $10 \times 10 \text{mm}^2$ 的石英样品池。分析光通过样品池后经单色仪分光、光电倍增管接受转变为电信号, 经放大后输入 400MHz 储存示波器储存, 最后用 PC-486 计算机处理。

7.3 芳香氨基酸光电离过程的 pH 效应

中性和碱性芳香氨基酸 N_2 饱和溶液在激光照射后立刻观察到 290-400nm 波段的光漂白现象和 400-600nm 的强吸收带; 用 N_2O 饱和的溶液光解, 400-600nm 的吸收带消失, 结合其衰减动力学可知, 400-600nm 的吸收带是水合电子(e_{aq}^-)的吸收(e_{aq}^- 的最大吸收峰为 720nm)。图 7.1-图 7.3 显示的是中性和碱性溶液中, Trp、Tyr 和 Phe 在激光作用后的瞬态吸收光谱。水合电子的衰减(见图 7.1、7.2 和 7.3 中插图)是由于水合电子与母体分子发生了如下反应,

Table 1 Laser power density index of the absorption intensities of photoionization of aromatic amino acid by 248nm laser light in solutions

Aromatic amino acid	pKa ^[10-12]			Laser power density index ^{a)}		
	-COOH,	-NH ₃ ⁺ ,	-OH	1.2 ^{b)}	6.5 ^{b)}	11.4 ^{b)}
Tyr	2.2,	9.1,	10.1	1.7 ^{c)}	1.5	1.0
Trp	2.4,	9.4		1.6 ^{d)}	1.4	1.2
Phe	1.8,	9.1		1.9 ^{e)}	1.9	1.8

^{a)}Estimated to be accurate to ± 0.1 ; ^{b)}pH value; ^{c, d, e)}determined at 410nm, 330nm and 320nm respectively.



水合电子的生成是芳香氨基酸在 248nm 激光照射下发生了光电离的证据,



还可直接解离生成自由基，

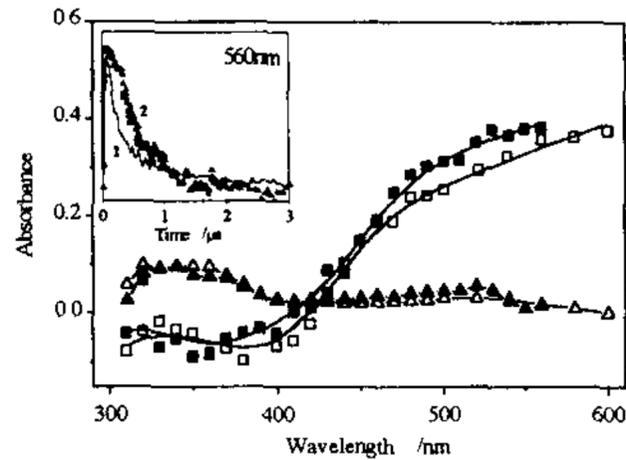


Fig. 7.1 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ Trp aqueous solution saturated with N_2 : pH6.5: \triangle —80ns, \triangle — $0.1\mu\text{s}$, pH11.4: \blacksquare —50ns, \blacktriangle — $0.1\mu\text{s}$. after the laser pulse.

Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm: pH 6.5 (1) , pH 11.4 (2) .

光电离生成水合电子的量，若是通过单光子途径，与激光强度成线性关系，即量子产额是一常数；而通过双光子途径则与激光强度的平方成线性关系，即量子产额随激光强度变化而变化。

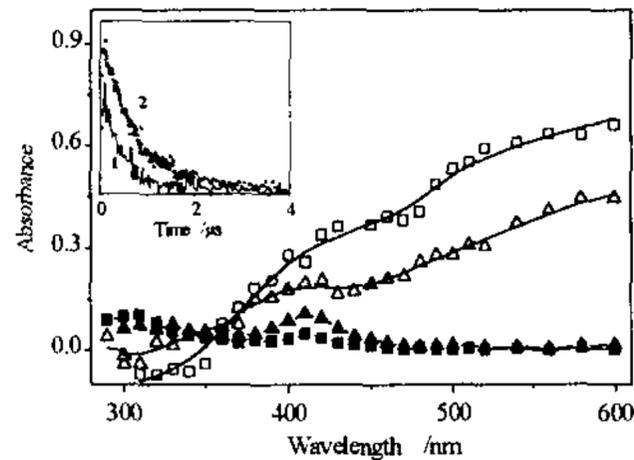


Fig. 7.2 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ Tyr aqueous solution saturated with N_2 : pH6.5: \triangle —80ns, \blacktriangle — $0.1\mu\text{s}$, pH11.4: \blacksquare —50ns, \square — $0.1\mu\text{s}$. after the laser pulse.

Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm: pH 6.5 (1) , pH 11.4 (2) .

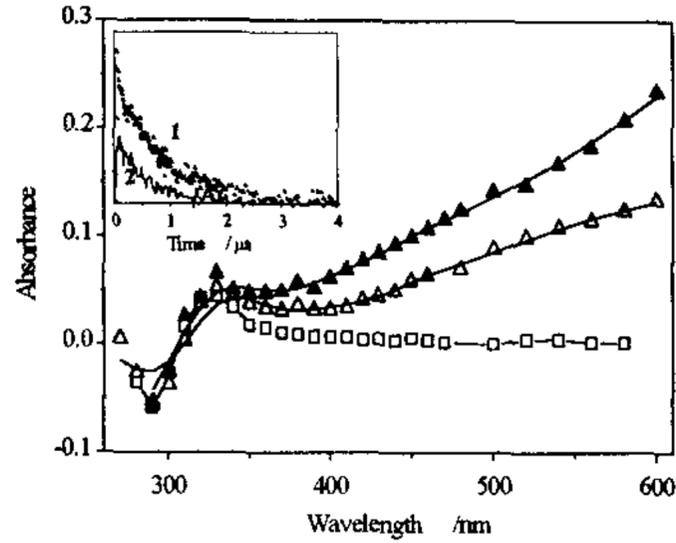


Fig. 7.3 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Phe aqueous solution saturated with N_2 : pH 1.2(\square — $0.1 \mu\text{s}$), pH 6.5 (\triangle — $0.1 \mu\text{s}$), pH 11.4(\blacktriangle — $0.1 \mu\text{s}$). after the laser pulse.

Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm: pH 11.4(1), pH 6.5 (2).

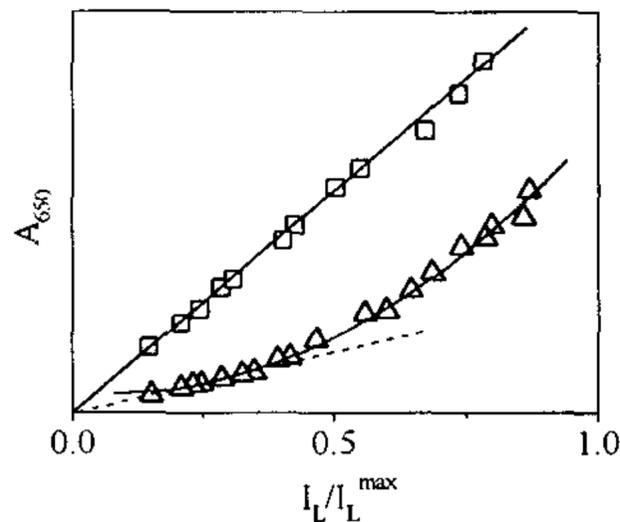


Fig. 7.4. Dependence on laser intensity of the absorbance of Tyr at 650nm $0.1 \mu\text{s}$ after laser pulse: pH 6.5(\triangle), pH 11.4(\square)

激光照射酪氨酸溶液后 $0.1 \mu\text{s}$ ，测定波长 650 nm 处吸收(A_{650})随激光强度(I_L)的变化。二者作图发现，中性溶液可拟合为一曲线，碱性溶液可拟合为一直线(图 7.4)。由 $\log A_{650}$ 与 $\log I_L$ 的关系($\log A_{650} = n \log I_L$)分别求得光强指数 n ，pH 6.5 时为 1.5，pH 11.4 时为 1。显然，中性溶液中随着光强的强弱的变化，酪氨酸光电离存在单、双光子过程；碱性溶液中为单光子过程。因此，溶液 pH 值改变了酪氨酸的光电离过程。另外，中性溶液中酪氨酸在较低激光强度下，倾向于单光子过程(图中虚线)，较高强度下，倾向于双光子过程。色氨酸、苯丙氨酸也有这一现象，即激光强度对芳香氨基酸的光电离过程也有

影响。

酸性、 N_2 饱和的芳香氨基酸水溶液在激光照射后，400-600nm 波段没有观察到 e_{aq}^- 的瞬态吸收，这是因为 pH=1.2 时， e_{aq}^- 与 H^+ 快速反应生成 H^\bullet 。



酸性溶液中芳香氨基酸的光电离过程，可通过改变激光强度测定芳香氨基酸自由基(A^\bullet)吸收峰的强度，由二者的关系得到光强指数，数据列入表 1，结果均大于 1.5，说明酸性溶液中三种芳香氨基酸光电离都以双光子过程为主。需要说明的是，由测定自由基吸收峰的强度得到的光强指数，准确地说应该是光解(包括光电离、光解离)的光强指数，因为其中包括了芳香氨基酸的直接解离(7.3 式)，它使测得的值偏低。

同样地，得到色氨酸、苯丙氨酸在中性和碱性溶液中光电离的光强指数，见表 7.1。结果显示，光强指数随 pH 值变化较明显的是酪氨酸，色氨酸，苯丙氨酸基本无变化。尽管三种芳香氨基酸- NH_3^+ 解离的 pKa 都在 pH 6.5-11.4 这一范围内，但只有酪氨酸的光强指数随 pH 值变化明显，而且酪氨酸的芳香取代基上酚羟基的 pKa 也在这一 pH 值范围，二者似乎相关。

Cowgill 曾研究了 pH 值对芳香氨基酸及其衍生物荧光量子产额的影响，结果发现，随着 pH 值增大，色氨酸、苯丙氨酸在其 -COOH、- NH_3^+ 脱质子的 pKa 处荧光量子产额增大，酪氨酸只在其 -COOH 脱质子的 pKa 处增大，而在 - NH_3^+ 、-OH 脱质子的 pH 范围 (9-10) 时荧光量子产额却减小^[23]。我们认为酪氨酸酚羟基的脱质子使荧光量子产额减小掩盖了 - NH_3^+ 脱质子使荧光量子产额增大。色氨酸在 pH 11 荧光量子产额开始减小，White 认为是由于吡啶环上 $>NH$ 在激发后脱质子引起^[23]。通常处于激发态的分子电子云密度比基态低，酸性增强，pKa 减小。由此可以看到，芳香氨基酸的芳香性取代基(发色团)上活泼氢解离(脱质子)时，荧光量子产额降低，我们认为这是因为处于激发态的芳香氨基酸有了另一个失活的通道：单光子电离。

宋钦华等^[21, 22]在研究鸟嘌呤衍生物及 DNA 光电离过程的 pH 效应时，曾作过详细的论证：鸟嘌呤 N1 位(发色团)上活泼氢的解离，导致电离电位的降低，使光电离过程改变，即在同一波长的激光下，低 pH 时鸟嘌呤不能被单光子电离，而在高 pH 时可单光子电离。DeFelippis 等^[24]测定了不同 pH 值溶液中的酪氨酸、色氨酸的氧化电位，结

果发现随着 pH 值的增大, 当 $\text{pH}=\text{pK}_a$ 时氧化电位大幅度降低。这一结果支持酪氨酸、色氨酸在其活泼氢解离后(即 $\text{pH}=\text{pK}_a$ 时), 电离电位降低, 光电离过程改变这一结论。因此, 溶液 pH 值对酪氨酸、色氨酸的光电离过程有影响, 而对苯丙氨酸几乎无影响, 其原因是酪氨酸、色氨酸的发色团上含有能随 pH 增大而解离的活泼氢, 而苯丙氨酸的发色团没有。

综上所述, 除激发光的波长外还有溶液 pH 值、激光强度两个因素影响芳香氨基酸的光电离过程, 进而影响光电离量子产额的测定结果。因此, 如果不周全考虑这些因素, 就不能得到一致的结果。

7.3 含芳香氨基酸残基肽的光电离

Trp-Gly, n-Met-Trp 的光电离瞬态吸收光谱与 Trp 光电离的一致(见图 7.5-7.6)。二肽中的 Gly 和 Met 不吸收紫外光, 不发生光解反应。

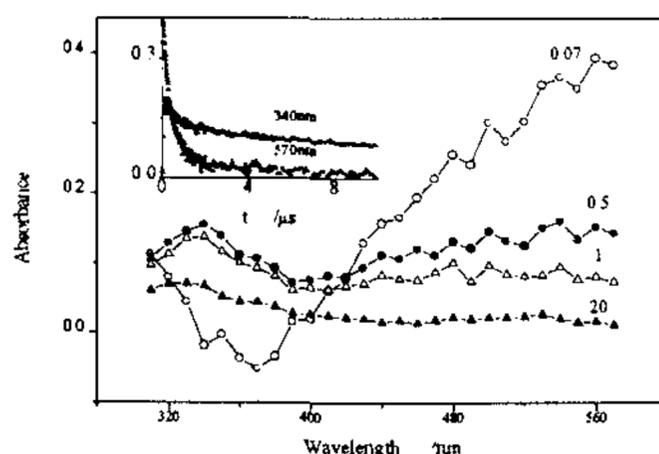
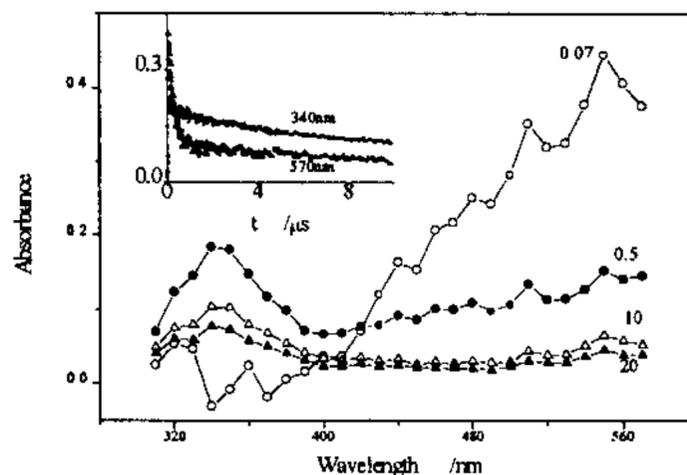


Fig. 7.5 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ Trp-Gly aqueous solution saturated with N_2 : (\square — $0.01\mu\text{s}$), (\blacksquare — $0.5\mu\text{s}$), (\triangle — $1\mu\text{s}$), (\blacktriangle — $20\mu\text{s}$). Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm : $\text{pH } 11.4$ (1), $\text{pH } 6.5$ (2).

图 7.7 是 Trp-Tyr 水溶液 N_2 饱和的瞬态吸收光谱, $0.02\mu\text{s}$ 记录的瞬态吸收光谱表明, 在 330 nm , 530 nm 有强吸收峰, 和 530 nm - 570 nm 有强吸收带。 $0.5\mu\text{s}$ 记录瞬态吸收光谱表明 530 nm - 570 nm 强吸收带消失, 410 nm 处出现新的吸收峰。 530 nm - 570 nm 的吸收显然是水合电子的吸收, 330 nm , 530 nm 吸收是 Trp/ N^\bullet 产生的特征吸收, 410 nm 是 Tyr/ O^\bullet 自由基的特征吸收。表明 Trp-Tyr 受光辐射后立刻发生光电离, 并产生 Trp/ N^\bullet , 接着发

生分子内电子转移。在 Trp-Tyr 光电离后，观察到由 $\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\bullet}$ 自由基的转变过程，这是直接观察到光电离引发的 $\text{Trp}/\text{N}^{\bullet}\text{-Tyr} \rightarrow \text{Trp-Tyr}/\text{O}^{\bullet}$ 分子内的电子转移。

Fig. 7.6 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ n-Met-Trp



aqueous solution saturated with N_2 : (\square — $0.02\mu\text{s}$), (\blacksquare — $0.5\mu\text{s}$), (\triangle — $10\mu\text{s}$), (\blacktriangle — $20\mu\text{s}$). after the laser pulse. Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm: pH 11.4(1), pH 6.5 (2).

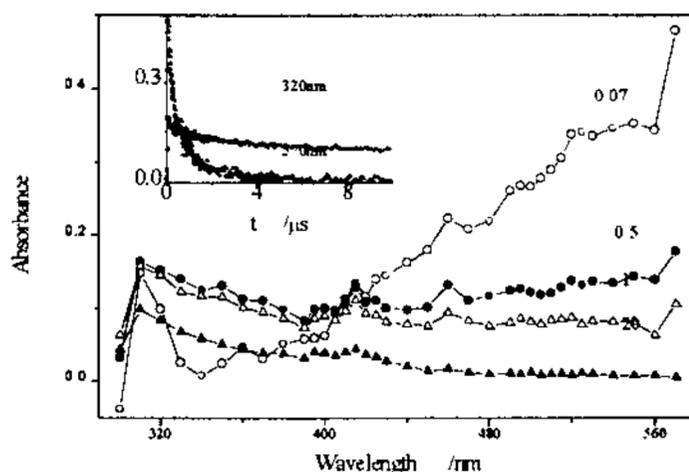


Fig. 7.7 Transient absorption spectra from laser flash photolysis of $10^{-3}\text{mol dm}^{-3}$ Trp-Tyr aqueous solution saturated with N_2 : (\square — $0.01\mu\text{s}$), (\blacksquare — $0.5\mu\text{s}$), (\triangle — $1\mu\text{s}$), (\blacktriangle — $20\mu\text{s}$). after the laser pulse. Inset: Dependence on time of the absorbance at 600nm: pH 11.4(1), pH 6.5 (2).

7.4 芳香氨基酸的电离电位的测定

测定芳香氨基酸的氧化还原电位的前提条件是光解机理是单光子过程。对于芳香

氨基酸的光电离机理文献报道不一，有双光子过程，也有单光子过程，这与反应条件有关。

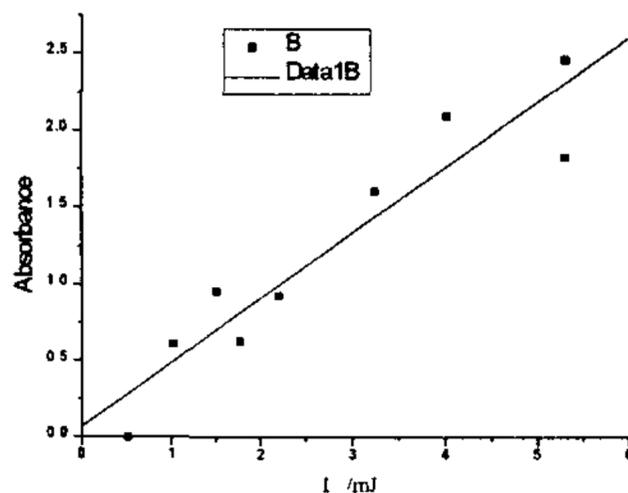


Fig.7.8 Dependence on laser intensity ($\lambda_{ex}=280nm$) of the absorbance of Tyr in neutral solution at 700nm
0.1 μs after laser pulse.

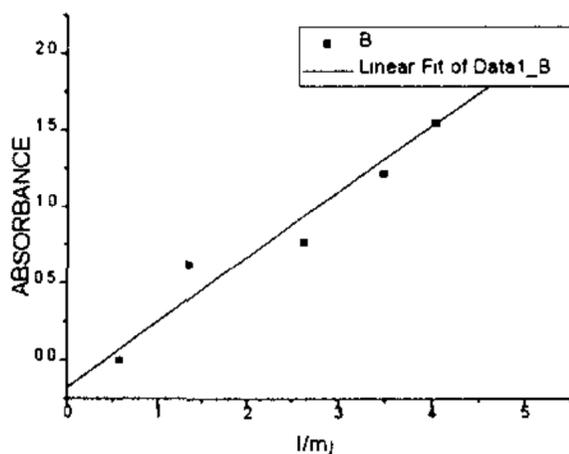
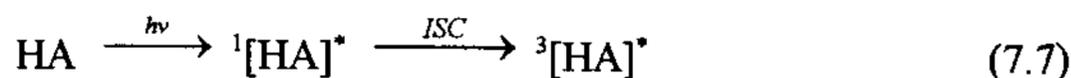


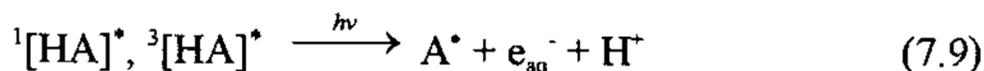
Fig.7.9 Dependence on laser intensity ($\lambda_{ex}=270nm$) of the absorbance of Trp in neutral solution at 700nm
0.1 μs after laser pulse.

在前部分中的研究表明酪氨酸的光电离机理受 pH 影响，在中性溶液中光电离，由于光强的变化，存在单、双光子过程；碱性溶液中为单光子过程。色氨酸、苯丙氨酸光电离机理受 pH 影响不如酪氨酸明显。另外，激光强度对芳香氨基酸的光电离过程也有影响。中性溶液中酪氨酸在较低激光强度下，倾向于单光子过程，较高强度下，倾向于双光子过程。色氨酸、苯丙氨酸也有这一现象。在本工作中运用的激光光解装置不同于前部分所运用的激光光解装置，激光光源，波长和能量都不同。因此首先证明在本工作条件下的光电离机理。

芳香氨基酸被激光光电离，或者单光子途径，



或者通过双光子途径电离，



假设芳香氨基酸被激光光电离同时存在单光子和双光子机理，光电离过程产生的水合电子产额（以 e_{aq}^- 的吸收强度 D_{700} 表示）与激光能量成正比

$$D_{700}/E = k_1 + k_2 E \quad (7.10)$$

k_1 表示单光子机理对光电离的贡献， $k_2 E$ 表示双光子机理对光电离的贡献。光电离生成水合电子的量，若是通过单光子途径，与激光强度成线性关系，即量子产额是一常数；而通过双光子途径则与激光强度的平方成线性关系，即量子产额随激光强度变化而变化。

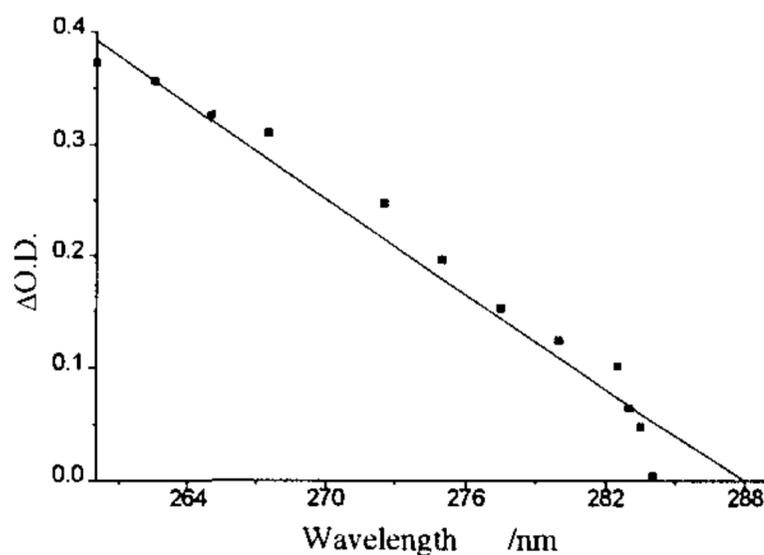


Fig.7.10 Dependence on laser wavelength of the absorbance of Trp in neutral solution at 700nm 0.1 μs after laser pulse.

从图 7.1 和 7.2 可知，激光光解色氨酸和酪氨酸，光电离产生的水合电子在 400-600nm 产生强吸收带，最大吸收峰为 720nm。分别用 560nm 和 540nm 波长染料光经倍频器倍频后光照色氨酸和酪氨酸并延时 0.1 μs 后，在 700nm 处测量吸收随激光强度变化，得到该处，吸收随激光强度为线性关系，截距基本为零（见图 7.8 和 7.9）。说明在激光能

量较低 (2mJ/pulse) 和中性条件下色氨酸和酪氨酸光电离为单光子过程。

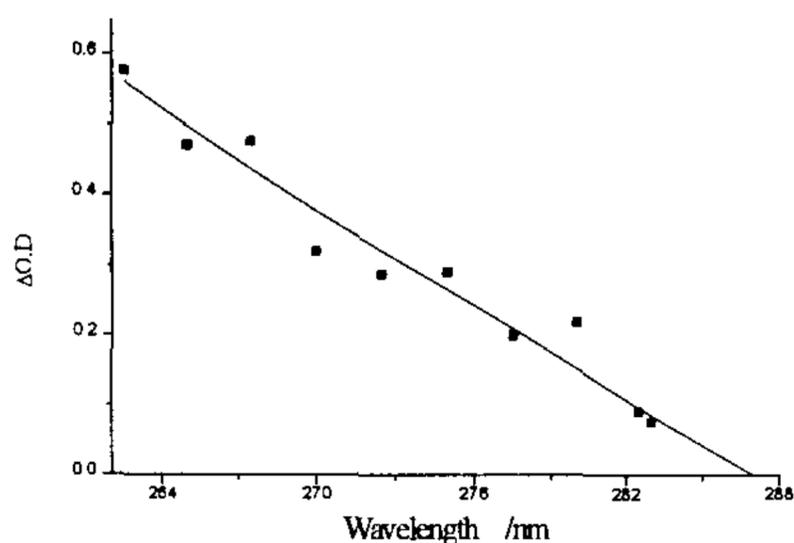


Fig.7.11 Dependence on laser wavelength of the absorbance of Tyr in neutral solution at 700nm 0.1 μ s after laser pulse.

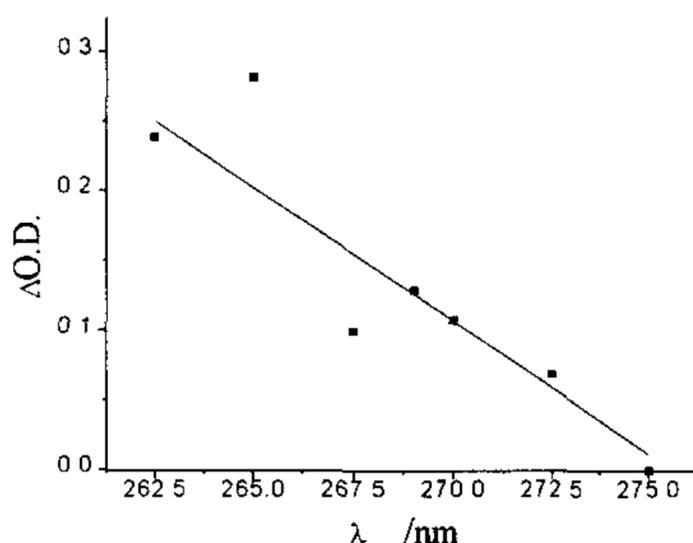


Fig.7.12 Dependence on laser wavelength of the absorbance of Phe in neutral solution at 700nm 0.1 μ s after laser pulse.

设芳香氨基酸的电离电位为 ΔE ，当辐照激光波长能量等于 ΔE 时，使芳香氨基酸开始电离，此时的激光波长即为氨基酸的电离电位。

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda \quad (7.11)$$

h 为普朗克常数 $6.626176 \times 10^{-34} \text{ JHz}^{-1}$ ， c 为光速， λ 为开始电离的激光波长。图 7.10-7.12 分别是色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)在中性水溶液中激光光解激光波长与吸收强度的关系图。由图可知芳香氨基酸发生光电离时，产生的水合电子产额与辐照

激光波长能量成正比，并达到饱和。使色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)发生光电离的激光波长分别是：288nm、286.2nm 和 275nm。这与色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)光解的难易程度及肽链芳香氨基酸分子内电子转移顺序是一致的。根据式(7.11)计算出这三个芳香氨基酸分子的电离电位。

$$\Delta E_{\text{Trp}} = 6.02 \times 10^{23} \times 6.626 \times 10^{-34} \times 3 \times 10^8 / 288 \times 10^{-7} = 4.157 \times 10^3 \text{ J/mol}$$

$$\Delta E_{\text{Tyr}} = 6.02 \times 10^{23} \times 6.626 \times 10^{-34} \times 3 \times 10^8 / 286.2 \times 10^{-7} = 4.183 \times 10^3 \text{ J/mol}$$

$$\Delta E_{\text{Phe}} = 6.02 \times 10^{23} \times 6.626 \times 10^{-34} \times 3 \times 10^8 / 275 \times 10^{-7} = 4.354 \times 10^3 \text{ J/mol}$$

7.5 小结

1. pH 值对酪氨酸和色氨酸的光电离过程有显著影响：溶液的 pH 值增大，光电离倾向于单光子过程，pH 减小倾向于双光子过程；而对苯丙氨酸几乎没有影响。酪氨酸、色氨酸光电离过程的 pH 效应分别源于酚羟基氢、吲哚环上>NH 的解离。
2. Trp-Gly, n-Met-Trp 的光电离瞬态吸收光谱与 Trp 光电离的一致（见图 7.5-7.6）。二肽中的 Gly 和 Met 不吸收紫外光，不发生光解反应。在 Trp-Tyr 光电离后，观察到由 Trp/N[•]-Tyr → Trp-Tyr/O[•] 自由基的转变过程。
3. 通过调节激发光的波长，测定了芳香氨基酸的电离电位：色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)发生光电离的激光波长分别是：288 nm、286.2nm 和 275nm。

参考文献

1. D. Creed, Photochem. Photobiol., 1984, 39, 537.
2. D. Creed, Photochem. Photobiol., 1984, 39, 563.
3. P. A. Harmon, J. Teraoka, S. A. Asher, J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 8789.
4. Yu A. Repeyev, E. V. Khoroshilova, D. N. Nikogosyan, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1992, 12, 295.
5. R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott, "Proteins and Components. In: Excited states and free radicals in biology and medicine. Contributions from flash photolysis and pulse radiolysis", Oxford University Press, Oxford, 1993.
6. L. I. Grossweiner, Y. Usui, Photochem. Photobiol., 1971, 13, 195.

7. R. Santus, L. I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.*, 1972, 15, 101.
8. H. Templer, P. J. Thistlethwaite, *Photochem. Photobiol.*, 1976, 23, 79.
9. E. Amouyal, A. Bernas, D. Grand, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 29, 1071.
10. D. V. Bent, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 2599.
11. D. V. Bent, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 2606.
12. D. V. Bent, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 2612.
13. F. D. Bryant, R. Santus, L. I. Grossweiner, *J. Phys. Chem.*, 1975, 79, 2711.
14. U. Lachish, A. Shafferman, G. Stein, *J. Chem. Phys.*, 1976, 64, 4205.
15. J. F. Baugher, L. I. Grossweiner, *J. Phys. Chem.*, 1977, 81, 1349.
16. B. Finnstrom, F. Tfibel, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.*, 1980, 71, 312.
17. L. I. Grossweiner, A. M. Brendzel, A. Blum, *Chem. Phys.*, 1981, 57, 147.
18. J. C. Mialocq, E. Amouyal, A. Bernas, *J. Phys. Chem.*, 1982, 86, 3173.
19. M. Bazin, L. K. Patterson, R. Santus, *J. Phys. Chem.*, 1983, 87, 189.
20. ZUO Zhi-Hua, YAO Si-De, LUO Jian, WANG Wen-Feng, ZHANG Jia-Shan, LIN Nian-Yun, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 1992, 15, 215.
21. SONG Qin-Hua, YAO Si-De, WANG Wen-Feng, LIN Nian-Yun, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1997, 102, 197.
22. SONG Qin-Hua, YAO Si-De, LIN Nian-Yun, *Radiat. Phys. Chem.*, 1997, 50, 435.
23. J. B. Birks (ed.), "The Excited States of Biological Molecules". John Wiley & London: Elsevier, 1976.
24. M. R. Defelippis, C. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi. And M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 3416.
25. M. R. Defelippis, C. P. Murthy, M. Faraggi and M. H. Klapper, *Biochemistry* 1989, 28, 4847-4853.

博士生期间发表的学术论文

1. 徐业平, 李全新, 宋钦华, 孙海虹, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝. $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 诱导含硫三电子键自由基的生成机理研究, 高等学校化学学报, 1999, 20(5)371-375.
2. 徐业平, 宋钦华, 马兴孝, 王文锋, 姚思德. 光诱导 4-硝基喹啉氧化物与甲硫氨酸衍生物的电子转移, 辐射研究与辐射工艺学报, 1999, 17(4)239-241.
3. 徐业平, 宋钦华, 陈从香, 马兴孝. 血液中碘代芳香胺的蛋白游离率的计算. 计算机与应用化学, 1999, 16(4) 283-286.
4. 徐业平, 宋钦华, 姚思德, 俞书勤, 陈从香, 马兴孝, 含甲硫氨酸二肽的单电子氧化反应: 激光闪光光解研究. 化学物理学报, 已接受.
5. 徐业平, 宋钦华, 俞书勤, 陈从香, 马兴孝. 光诱导 4-硝基喹啉氧化物与含甲硫氨酸二肽的电子转移, 高等学校化学学报, 2000, 21(7)561-564.
6. 徐业平, 汤峻松. 傅里叶红外光谱法对 BOPP 薄膜结晶度的研究, 现代商检科技, 1999, 9, 23-25.
7. 徐业平, 郑屏 汤峻松. 食品中偶氮染料的快速鉴定, 检验检疫科学, 2000, 11.
8. 宋钦华, 徐业平, 林维真, 姚思德. 丙酮三重态引发肽分子内电子转移的动态研究, 辐射研究与辐射工艺学报, 1999, 17(4)242-244
9. 宋钦华, 徐业平, 李全新, 陈从香. 激光闪光光解在凝聚相光化学中的应用. 化学通报, 1998, 第八期, 17-21.
10. 宋钦华, 徐业平, 俞书勤, 陈从香, 马兴孝, 王文锋, 姚思德, 林念芸, 芳香氨基酸光敏化瞬态产物的光谱学及动力学表征, 中国科学, B 辑, 1999, 29(6)526-531.
11. SONG Qinhu, XU Yeping, YU Shuqin, CHEN Congxiang, MA Xingxiao, WANG Wenfeng, YAO Side, LIN Nianyun, Characterization of transient species in laser photolysis of aromatic acids acetone as photosensitizer, SCIENCE IN CHINA(Series B), 1999, 42(6)561-566.
12. 宋钦华, 孙海虹, 徐业平, 李全新, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝. 酪氨酸光电离过程的激光闪光光谱研究: pH 效应. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(5)659-661.

13. 宋钦华, 李全新, 徐业平, 戴静华, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝. 激光引发 DNA 及多聚核苷酸与 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 作用的闪光光谱研究. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(4)521-524.
14. 宋钦华, 李全新, 孙海虹, 徐业平, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝. 芳香氨基酸光电离过程的 pH 效应. 自然科学进展, 2000, 10(2)174-177.
15. SONG Qinhu, LI Quanxin SUN Haihong XU Yeping, YU Shuqin, CHEN Congxiang, MA Xingxiao, WANG Wenfeng, YAO Side, LIN Nianyun, Photoionization of aromatic amino acid at different pH values, PROGRESS IN NATURAL SCIENCE, 2000, 10(4) 314-318.
16. 李全新, 张群, 束继年, 徐业平, 宋钦华, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝. CF 自由基二光子共振增强多光子电离研究: 5pRydberg 态观测与分析, 物理学报, 1999, 48(3)446-452.
17. 李全新, 张群, 束继年, 徐业平, 陈从香, 俞书勤, 马兴孝, 310nm-360nm 波长范围内 CF 自由基共振增强多光子电离研究. 原子物理学报, 1998, supplement(July): 196-198.
18. 徐业平, 宋钦华, 俞书勤, 陈从香, 马兴孝. 含硫三电子键的生成及稳定性的研究, 化学学报, 待发表

致 谢

我的博士论文工作是在导师马兴孝教授的直接指导下完成的。我衷心感谢马先生四年来，对我的言传身教和严格要求。马先生严谨的治学态度，渊博的知识，对实验和论文工作中问题的洞察力和独到的见解，以及对科学事业的不懈追求，给我留下了深刻的印象，他的科学工作方法和思维方式对我的今后的工作将具有深远的影响。

在整个论文工作过程中得到了陈从香、俞书勤教授的精心指导和帮助，陈老师几次阅读并帮助修改论文，俞老师审阅全文并提出宝贵的指导意见，他们治学精神，平易近人，热心助人的为人实为我今后为人的楷模。

衷心感谢宋钦华副教授，在我论文工作期间给我的无私帮助，我们在一起设计实验方案，进行工作，他对光化学的理解，和他诚实的人品都给我留下了深刻的印象，我为结识这样一位良师益友感到高兴。

感谢李全新副教授，束继年博士、张群博士、周晓国同学，孙海虹同学在实验工作中的大力帮助。

感谢陈场博士、刘士林博士、张立敏博士、戴静华主任、冉琴博士、陈军同学、徐海峰同学对我四年来的帮助，感谢桂生同志帮助打印了论文的第一章，我为我能溶入科大激光实验室这个大家庭感到无比的高兴。

感谢我的同学加挚友汪志勇博士对我博士论文工作的一贯支持，鼓励和帮助。

我的论文实验工作大部分是在中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室完成的，感谢中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室对我论文工作提供大力帮助，特别感谢林念芸教授，姚思德教授，王文峰副教授在生物分子光化学方面对我的影响和指导，由其感谢姚思德教授，王文峰副教授，林维真，陈雨林在实验工作方面给予的大力支持。

最后特别感谢我的家人，由其是我的爱人和孩子四年来对我的支持和理解。