

1003 - 7713/2000/05 - 0567 - 04

含甲硫氨酸二肽的单电子氧化反应： 激光闪光光解研究

徐业平， 宋钦华， 俞书勤*， 陈从香， 马兴孝

(中国科学技术大学 中国科学院选键化学开放实验室，化学物理系，合肥 230026)

姚思德

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室，上海 201800)

摘 要： 运用 248nm 激光光解瞬态吸收光谱研究了中性水溶液中丙氨酰甲硫氨酸(Ala-Met)和 N-甲酰甲硫氨酰色氨酸(N-Formyl-Met-Trp)的单电子氧化反应过程，分别观察到 $[S \cdot : S]^+$ 和 $[S \cdot : O]$ 含硫三电子键的生成，但在 N-甲酰甲硫氨酰色氨酸体系中并没有观察到 $[S \cdot : N]^+$ 的生成。提出了 $[S \cdot : S]^+$ 和 $[S \cdot : O]$ 含硫三电子键的生成机理，认为 N-甲酰甲硫氨酰色氨酸体系不能生成 $[S \cdot : N \backslash]^+$ 三电子键是源于其本身的分子结构。

关键词： 含甲硫氨酸的二肽；含硫三电子键；激光闪光光解

中图分类号： O643.12 文献标识码： A

1 引 言

蛋白质中的含硫氨基酸残基容易被氧化，进而导致蛋白质结构变化和酶的失活^[1]。脉冲辐解研究表明，氧化剂与甲硫氨酸的反应通常是硫被氧化，氧化的硫原子 $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ S^+ \\ \diagdown \end{array} \right)$ 具有与另一邻近硫、氮或氧原子上的未成键电子对络合的趋向^[2,3]，但 $\cdot OH$ 诱导的氧化反应只能在酸性溶液中生成 $[S \cdot : S]^+$ 自由基。运用激光光解技术以芳香酮为光敏剂研究含硫氨基酸光敏化氧化反应时，由于反应过程产生的芳香酮的瞬态产物吸收谱带宽、寿命长，均不能直接观察含硫中间体的瞬态吸收，也没有得到 $[S \cdot : O]$ 生成的证据^[4-6]。本工作运用激光光解瞬态吸收光谱研究 $SO_4^{\cdot -}$ 与含甲硫氨酸二肽的氧化反应，在中性水溶液中观察到 $[S \cdot : O]$ 以及 $[S \cdot : S]^+$ 、 $[S \cdot : N]^+$ 含硫三电子键的生成。

2 实 验

丙氨酸(Ala)、丙氨酰甲硫氨酸(Ala-Met)、N-甲酰甲硫氨酰色氨酸(N-Formyl-Met-Trp)为 Sigma 公司的产品未经处理直接使用。 $K_2S_2O_8$ 为上海试剂一厂产品，重结晶后使用。所有溶液用三重蒸馏水配制。实验在室温下进行，样品试验前用高纯氮 N_2 (99.99%) 鼓泡 20 min 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，波长为 248 nm，脉宽 20 ns，每脉冲最高能量为 50 mJ，信号由 HP54510B 300 MHz 瞬态记录仪记录，

* 通讯联系人。

并转化为数字信号送入 PC-586 个人计算机进行处理。实验装置及数据处理详见文献 [7]。

$K_2S_2O_8$ 水溶液在紫外光辐照下可分解产生 $SO_4^{\cdot-}$, 其吸收峰为 450 nm^[8]。本文通过 $S_2O_8^{2-}$ 吸收 248 nm 激光分解产生 $SO_4^{\cdot-}$, 采用瞬态吸收光谱观察 $SO_4^{\cdot-}$ 单电子氧化含甲硫氨酸二肽的过程:



3 结果与讨论

图 1 是含有 10 mmol/L $K_2S_2O_8$ 的 0.2 mmol/L Ala-Met 中性水溶液的激光光解瞬态吸收光谱。激光作用之后立即记录的瞬态吸收光谱与单纯 $K_2S_2O_8$ 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 $SO_4^{\cdot-}$ 。2 μ s 时, 在 380 和 480 nm 各有一吸收峰, 从较长时间记录的瞬态吸收谱 (5 与 20 μ s) 发现 380 nm 吸收峰的寿命比 480 nm 的长。480 nm 的吸收为 $[S \cdot S]^+$ 含硫三电子键阳离子的贡献^[9]。 $SO_4^{\cdot-}$ 是强的单电子氧化剂, 甲硫氨酸残基的硫原子氧化电位较低^[10], 容易被 $SO_4^{\cdot-}$ 夺取一个电子生成

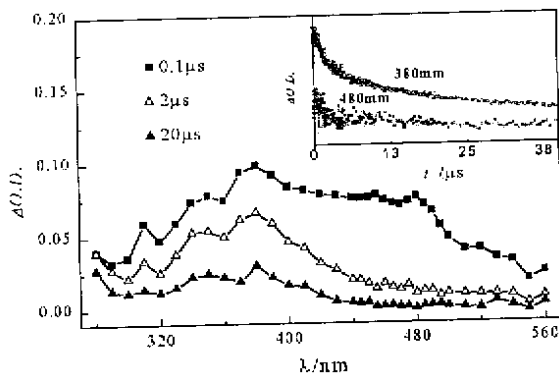
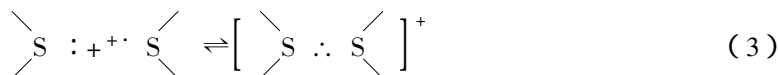
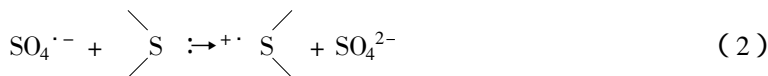


图 1 含 10 mmol/L $K_2S_2O_8$ 的 0.2 mmol/L Ala-Met 中性脱气水溶液的激光光解瞬态吸收光谱

Fig. 1 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of 10 mmol/L $K_2S_2O_8$ and 0.2 mmol/L Ala-Met neutral aqueous solution saturated with N_2

发生分子内电子转移生成共振稳定的 α -硫烷基自由基。 α -硫烷基自由基在 290 nm 处有弱的吸收^[9], 图 1 的结果与此相符。



脉冲辐解研究发现, $\cdot OH$ 与甲硫氨酸氧化反应只能在强酸溶液中生成 $[S \cdot S]^+$, 而在弱酸或中性溶液中没有观察到 $[S \cdot S]^+$ 的生成^[2,3]。这是因为 $\cdot OH$ 氧化甲硫氨酸过程中, $\cdot OH$ 首先结合到

S 原子上, 在 H^+ 的参与下生成水分子和含硫阳离子自由基 $\begin{array}{c} \diagup \\ S^+ \\ \diagdown \end{array}$, 然后与邻近的 S 形成

$[S \cdot S]^+$ 。 $SO_4^{\cdot-}$ 氧化甲硫氨酸不需要 H^+ 的参与, 直接从 S 上夺取一个电子生成

$\begin{array}{c} \diagup \\ S^+ \\ \diagdown \end{array}$ 。 $\begin{array}{c} \diagup \\ S^+ \\ \diagdown \end{array}$ 和 $[S \cdot S]^+$ 的另一旁证是在 Ala/ $K_2S_2O_8$ 体系光解的瞬态吸收光谱上没有观察

到 290、480 nm 吸收峰。

运用激光闪光光解研究 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 单电子氧化甲硫氨酸 (Met) 甲硫氨酸甲酯 (MME) 和甲硫氨酰甲硫氨酸 (Met - Met) 证实^[11], 380 nm 的吸收峰归属于 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 的吸收。 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 是由

$\text{S}^{\cdot +}$ 与分子内氨基 N 上的未成键电子对进行分子内电子转移产生的^[2, 3, 10, 11]。图 2 中 380

nm 处没有吸收峰, 我们认为 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

上的未成键电子对与酰基形成共轭体系, 不能向

与 $\text{S}^{\cdot +}$ 转移电子对生成 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ 。Ala - Met

中 Met 残基处在 C 端。有研究表明, Met 残基在

C 端的肽不能生成 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]^+$ ^[2, 3]。然而, 从图 2

中 $1 \mu\text{s}$ 记录的瞬态吸收光谱上可以看到, 除已

知的 450 和 480 nm 的特征吸收峰外, 380 nm 左右也有吸收。

$5 \mu\text{s}$ 后记录的瞬态吸收光谱, 450、

480 nm 的吸收迅速减弱, $20 \mu\text{s}$ 后几乎消失, 而

380 nm 左右仍有吸收。由于 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 的吸收峰也

在 380 nm^[8], 所以这一吸收峰可能源于 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 。

$[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 的生成过程可能是 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 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, 生成具有六员环 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 三电子键。 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 衰变是脱羧生成 α - N 自由基

(α - N) 和 CO_2 (见 7 式) α - N 自由基的吸收峰在 350nm 左右, 与图 2 中吸收光谱相符。

(α - N) 和 CO_2 (见 7 式) α - N 自由基的吸收峰在 350nm 左右, 与图 2 中吸收光谱相符。

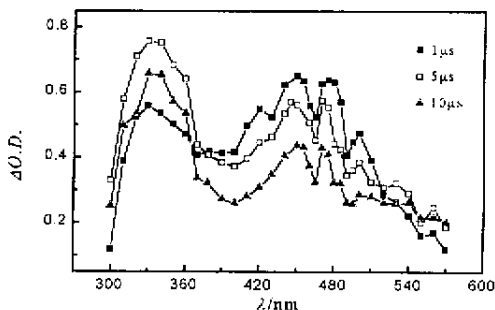
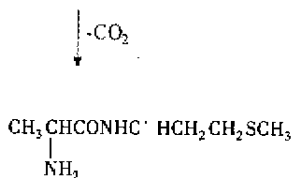
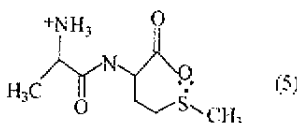
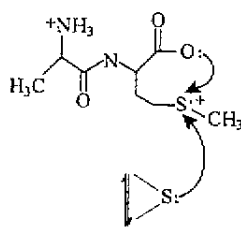


图 2 含 10 mmol/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的 0.2 mmol/L N - Formyl - Met - Trp 中性脱气水溶液的激光闪光光解瞬态吸收光谱

Fig.2 Transient absorption spectra obtained from laser photolysis of 10mmol/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ and 0.2 mmol/L N - Formyl - Met - Trp neutral aqueous solution saturated with N_2



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 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 和 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]$ 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^[4-6]。上述文献中没有发现 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 的生成可能是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, 必须在获得足够数据的基础上解析复合谱得到有关中间体的瞬态吸收光谱, 由于 $[\text{S} \cdot \cdot \text{O}]$ 数据较少 $[\text{S} \cdot \cdot \text{S}]^+$ 和 $[\text{S} \cdot \cdot \text{N}]$

$\text{N}]^+$ 数据较丰富,所以只解析出后者的瞬态吸收光谱,而未能解出前者的瞬态吸收光谱。在本文的实验中,由于 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 的 450 nm 的吸收峰与 $[\text{S}:\text{O}]$ 的 380 nm 的吸收峰分得较开,因而无须解谱便可得到 $[\text{S}:\text{O}]$ 的瞬态吸收光谱。

参 考 文 献

- [1] Brot N, Weissbach H. in *The Chemistry of Sulphones and Sulphoxides*: Stirling C, Ed., Wiley: New York, 1988: 851
- [2] Asmus K D, Gobl M, Hiller K O, Mahling S, Monig J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1985, **2**: 641
- [3] Monig J, Gobl M, Asmus K D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1985, **2**: 674
- [4] Marciniak B, Hug G L, Borbronski K, Kozubek H. *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**: 13560
- [5] Borowski k, Marciniak B, Hug G L. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**: 10279
- [6] Bobrowski K, Hug G L, Marciniak B, Kozubek H. *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**: 537
- [7] Song Q H, Yao S D, Li H C, Zuo Z H, Zhang J S, Lin N Y. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1996, **95**: 223
- [8] Mcelroy W T, Wayagood. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990, **86**: 2557
- [9] Hiller K O, Masloch B, Gobl M, Asmus K D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**: 2734
- [10] Asmus K D. *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**: 436
- [11] Xu Yeping(徐业平), Li Quanxin(李全新), Song Qinhua(宋钦华), Sun Haihong(孙海虹), Yao Side(姚思德), Yu Shuqin(俞书勤), Chen Congxiang(陈从香), Ma Xingxia(马兴孝). *Chem. J. Chin. Univ.* (高等学校化学学报), 1999, **5**: 731
- [12] Mohling S, Asmus K D, Glass R S, Hojjatie M, Wilson G S. *J. Org. Chem.*, 1987, **52**: 3717

Reaction of One – Electron – Oxidation of Methionine – Containing Dipeptides : A Laser Flash Photolysis Study

Xu Yeping, Song Qinhua, Yu Shuqin*, Chen Congxiang, Ma Xingxia

(Open Laboratory for Bond – Selective Chemistry, Department of
Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Yao Side

(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research,
Chinese Academy of Science, Shanghai 201800)

Abstract The $\text{SO}_4^{\cdot-}$ induced oxidation of Ala – Met and N – Met – Trp dipeptides were investigated using 248nm laser photolysis. The presence of three electron – bond intermediates $[\text{S}:\text{S}]^+$ and $[\text{S}:\text{O}]$ are identified, but no observation of $[\text{S}:\text{N}]^+$ formed, from their transient absorption spectra. It was suggested that the formation of the three electron – bonds depended on the structure of peptide molecule.

Key words Laser flash photolysis, Methionine – containing dipeptide, Three – electron bond

* To whom correspondence should be addressed.