

文章编号: 0455-2059 (2000) -0026-11

4NQO 与色氨酸、酪氨酸光化学反应 动力学的 pH 效应

盛振宇¹, 宋钦华², 周晓国¹, 王仲¹, 李江¹,

戴静华¹, 李全新², 俞书勤¹, 马兴孝¹

(1. 中国科学技术大学, 化学物理系, 选键开放实验室;

2. 中国科学技术大学, 化学系, 安徽 合肥, 230026)

摘要: 运用激光闪光光解瞬态吸收光谱研究了 4NQO 激发三重态(^T4NQO)的自猝灭及与色氨酸(Trp), 酪氨酸(Tyr)反应的 pH 效应. 结果显示, 随着 pH 值的降低, ^T4NQO 的自猝灭速率常数减小; ^T4NQO 与 Trp, Tyr 之间电子转移的速率常数在 pH=7 时为最大, pH 在大于或小于 7 时, 随着 pH 值升高或降低, 速率常数均减小. 分析表明, 这种光化学动力学过程的 pH 效应, 是由 4NQO, Trp 和 Tyr 的氧化还原电位, Trp 吲哚自由基的吸收光谱随 pH 变化所致.

关键词: 4-硝基喹啉氧化物; 色氨酸; 酪氨酸; 光化学反应动力学; pH 效应

4-硝基喹啉氧化物(4NQO)是一种典型致癌化合物, 该化合物在水溶液中能够通过电荷转移与 DNA 键合^[1-2]. 人们对 4NQO 化学特性与生物效应进行了广泛地研究^[1-9].

Arai 等运用激光闪光光解研究 4NQO 与氨基酸, DNA 及相关化合物在水溶液中的光化学反应^[6-7]. 在 355 nm 的激光脉冲辐照下, 形成三重态 ^T4NQO, 其瞬态特征吸收峰位于 410 与 590 nm. 通过 ^T4NQO 的吸收衰减可以得到 ^T4NQO 的猝灭速率常数, 且获得从猝灭剂到 ^T4NQO 电子转移的速率常数. Arai 小组研究发现氧化电势较低的化合物, 如 Trp, Tyr 及含 Trp 或 Tyr 残基的蛋白质可以扩散控制速率有效地猝灭 ^T4NQO, 而其它氨基酸及不含 Trp, Tyr 残基的蛋白质的猝灭速率常数则较低($\sim 10^7 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

观察 ^T4NQO 自猝灭及其与 Trp, Tyr 光化学反应的 pH 效应, 对于理解 4NQO 与蛋白质在不同 pH 值下的反应特性是很有意义的. 我们曾报道了酸性条件下, 不同 pH 值溶液中 ^T4NQO 与 Trp 或 Tyr 间电子转移速率常数^[10]. 最近我们又对碱性条件下, 不同 pH 值时

基金项目: 国家 973 计划基金资助项目.

作者简介: 盛振宇 (1977-), 男, 博士研究生.

的速率常数进行测定. 本文对此光化学反应动力学的 pH 效应作全面分析讨论.

1 实验部分

本实验采用激光闪光光解瞬态吸收光谱检测方法. 所用之仪器, 流程可详见文献^[11]. 激发光为 Nd: YAG laser 的三倍频光(355 nm) (Max_Laser Kids of ICT Lasers Ltd.) 脉宽 10 ns. 分析光采用的是 500 W 氙灯, 激光与分析光两光束相互垂直通过一石英样品池, 光程长度为 10 mm. 分析光束通过样品池后即刻进入单色仪 (MC-30N of Ritsu Oyo Kogaku Co. Ltd.) 最后由一台型号为 GDB59 的光电倍增管放大并转化为电信号. 从光电倍增管输出的信号在示波器 (Tektronix TDS 380 信号采集平均 256 次) 上显示为一时间函数. 瞬态谱图是由同一样品的一系列不同波长示波器信号逐点描绘而得.

4NQO 和所用的氨基酸由 Sigma 公司购得. 样品均由三重蒸馏水配制而成. 在我们的实验中, 不同的 pH 是由 NaOH 及 H₃PO₄ (或 HClO₄) 配制而成的. 激光辐照前, 所有的样品均在室温下通入高纯氮鼓泡 20 min. 样品的氧化, 还原电势由循环伏安谱仪 (CV-27) 测得.

2 结果与讨论

2.1 4NQO 的光物理过程及其 pH 效应

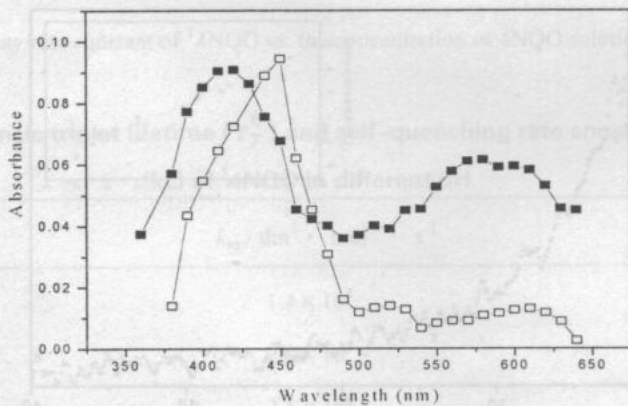
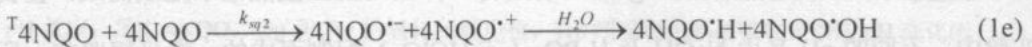
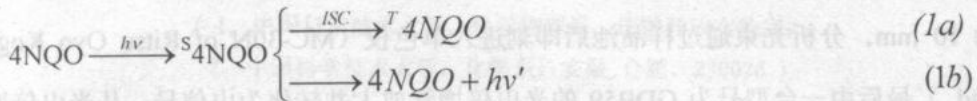


图 1 $0.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4NQO 中性水溶液的激光闪光光解瞬态吸收谱. 激光脉冲 $5 \mu\text{s}$

Fig.1 Transient absorption spectra for neutral aqueous solution of $0.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4NQO containing phosphate buffer ($5 \mu\text{s}$ (■), $20 \mu\text{s}$ (□) after laser pulse).

图1是 $0.25 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4NQO 中性水溶液的激光闪光光解瞬态吸收谱, 激光脉冲 $5 \mu\text{s}$ 后, 可以清楚地看见源于 4NQO 三重激发态(^T4NQO)的两个吸收峰, 分别位于 $410, 590 \text{ nm}$ 处^[6, 7]. $20 \mu\text{s}$ 时, 上述两个吸收峰几乎完全消失, 取而代之的是一个位于 450 nm 处的慢衰减谱峰. 这种慢衰减谱峰归属于 $4\text{NQO} \cdot \text{H}$ ^[6]. 从以上的结果可推测 4NQO 的光物理和光化学过程如下:



这里 ${}^S4\text{NQO}$ 为单重激发态, ${}^T4\text{NQO}$ 的衰减为准一级动力学, 其衰减速率常数 $1/\tau_T$ 可表示如下^[12, 13]

$$1/\tau_T = 1/\tau_T^0 + k_{sq}[4\text{NQO}] \quad (2)$$

其中: τ_T^0 代表 ${}^T4\text{NQO}$ 的固有三重态寿命, $K_{sq} = K_{sq1} + K_{sq2}$.

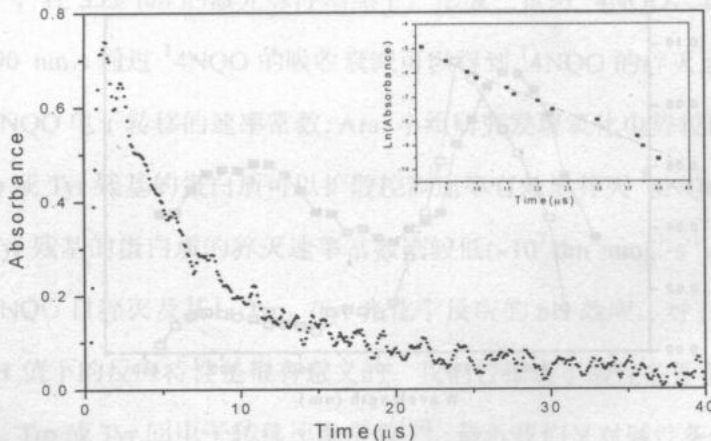


Fig 2 Transient absorption decay trace obtained by photolysis $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4NQO aqueous solution of pH 7.0 at 590 nm . Inset: Logarithmic plot of absorbance vs. time

^14NQO 的猝灭速率可从 590 nm 处的吸收衰减变化获得 (图 2)。由图 2 之插图可见 ^14NQO 的衰减轨迹很好地符合一级动力学规律。直线之斜率即为 ^14NQO 的衰减速率常数 $k_{\text{obs}} (=1/\tau_T)$ 。图 3 为 k_{obs} 对 4NQO 浓度作图, 可见很好地符合线性关系。从图 3 的斜率容易得出在中性条件下, ^14NQO 被其基态自猝灭的速率常数 $k_{\text{sq}} (6.1 \times 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, 而数值 $1/\tau_T^0$ 则可由图 3 之截距获得。

对图 3 不同曲线作同样处理, 我们获得 ^14NQO 在不同 pH 条件下的自猝灭动力学参数, 具体的数据详见表 1。

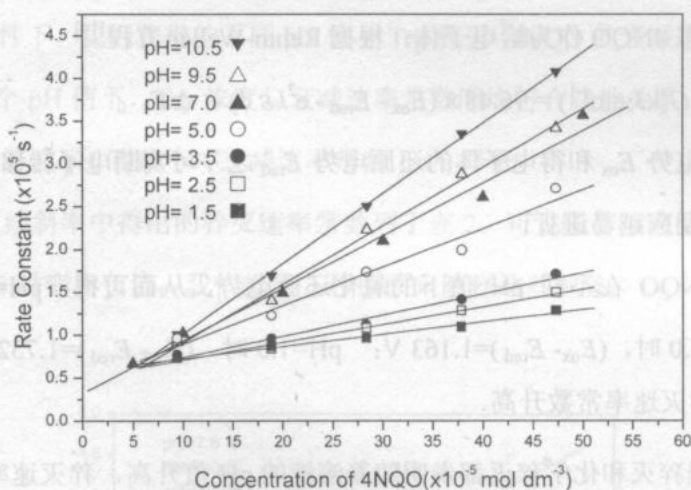


Fig. 3 Plot of the decay rate constant of ^14NQO vs. the concentration of 4NQO solution in different pH value

Table 1 Intrinsic triplet lifetime (τ_T^0) and self-quenching rate constant (k_{sq}) of ^14NQO in different pH.

pH	$k_{\text{sq}} / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\tau_T^0 / \mu\text{s}$
1.5	1.4×10^8	18
2.5	2.1×10^8	20
3.5	2.5×10^8	21
5.0	4.5×10^8	23
7.0	6.1×10^8	31

很明显, k_{sq} 是随着溶液酸性的提高而降低的. 因为 4NQO 是具有弱碱性的分子, 在酸性环境下它易于结合质子而形成 $4NQOH^+$ 阳离子. 激发态的电子处于外壳层, 与基态 4NQO 相比, 14NQO 有较大正电性, 这样 $4NQOH^+$ 阳离子与 14NQO (或 ${}^14NQOH^+$) 之间的碰撞的概率将会减小, 所以在强酸性环境下, 自猝灭速率常数显著地降低.

碱性情况下, k_{sq} 随着碱性的增强而增大. 因为 4NQO 作为弱碱性分子, 在碱性情况下带有负电荷, 且碱性越强, 电负性越强, 这样它与 14NQO 碰撞几率要比中性溶液中 4NQO 的大, 从而在强碱性条件下, 自猝灭速率常数显著增升.

以上为 14NQO 物理猝灭情况(1d), 再从化学猝灭(1e)式角度来看, 激发三重态 14NQO 作为得电子体, 基态 4NQO 作为给电子体. 根据 Rehm-Weller 方程^[14]

$$\Delta G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = 96.48 \times (E_{\text{ox}} - E_{\text{red}} - e^2/\epsilon d) - \Delta E_{0,0} \quad (3)$$

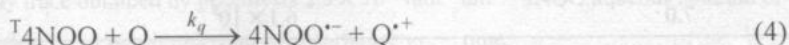
由给电子体的氧化电势 E_{ox} 和得电子体的还原电势 E_{red} 之差可判断电子转移难易程度. 差值越小, 电子转移反应越易进行.

我们测量了 4NQO 在不同 pH 值下的氧化还原电势, 从而可得: pH=9.7 时, $(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) = 1.0 \text{ V}$; pH=7.0 时, $(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) = 1.163 \text{ V}$; pH=1.0 时, $(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) = 1.752 \text{ V}$, 可见随着 pH 值的升高, 自猝灭速率常数升高.

由 14NQO 物理猝灭和化学猝灭都表明随着溶液的 pH 值升高, 猝灭速率常数增加.

2.2 14NQO 与 Trp, Tyr 反应动力学的 pH 效应

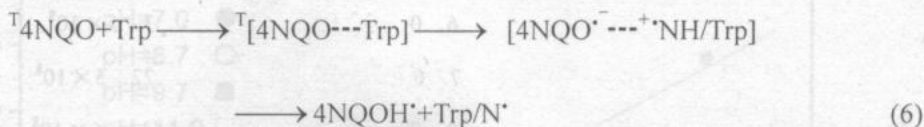
在中性溶液中由于 4 位硝基和 1 位上的 O 的吸电子的作用, 4NQO 的喹啉环是缺电子的. 与基态相比, 由于电子密度的降低, 14NQO 三重激发态是强吸电子性的. 所以, 可发生从氨基酸到 14NQO 上的电子转移反应. 根据 Rehm-Weller 方程^[14], 14NQO 与氨基酸间电子转移反应的自由能变化(ΔG)可被计算出来. 水溶液中库仑项 $e^2/\epsilon d$ 可被忽略. E_{ox} , E_{red} 分别为电子供体的氧化电势及电子受体的还原电势. $\Delta E_{0,0}$ 为 14NQO 最低能级与基态的能量差, 约为 $178 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^[6]. 计算表明, 从猝灭剂 Q (如 Trp, Tyr) 到 14NQO 的电子转移反应可以自发地进行.



k_q 为猝灭速率常数, 由上式而得出 14NQO 的衰减速率常数

$$1/\tau_T = 1/\tau_T^0 + k_{sq}[4NQO] + k_q[Q] \quad (5)$$

中性条件下, 由于 $4NQO^-$ 的质子化过程及 Trp/NH^{+} (pK_a 5.1^[15]) 的脱质子化过程进行的非常快速, 因而络合物离子 $[Trp/NH^{+} \cdots {}^14NQO]$ 的离解可同时发生. 我们推断 14NQO 与 Trp , Tyr 电子转移过程如下:



酸性条件下, 我们获得的不同 pH 值下 Trp 猝灭 14NQO 的衰减速率如图 4 所示. 由图 4 可知, 每个 pH 值下, Trp 浓度与衰减速率常数间均符合线性关系. 酸性条件下, 等 Trp 浓度下随着溶液 pH 的减小, 衰减速率常数 $1/\tau_T$ 降低.

从直线斜率中得出的猝灭速率常数列于表 2. 可见随着溶液酸性增强, k_q 值降低, 且当 $pH < 4.5$ 时变为负值. 我们提出 3 种原因来解释这些现象.

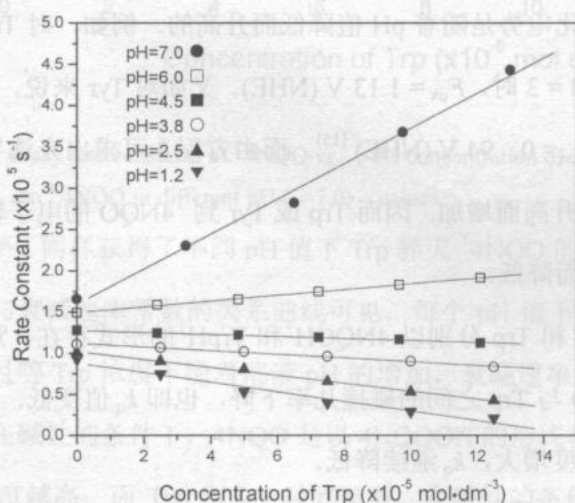


Fig. 4 Plot of the decay rate constants of 14NQO vs. the concentration of Trp solution containing $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $4NQO$ in different $pH (\leq 7.0)$ values.

Table 2 Quenching rate constants of ^14NQO with Trp or Tyr at different pH values.

Quencher	pH	$k_q / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Trp	1. 2	-5.8×10^8
	2. 5	-4.8×10^8
	3. 8	-2.2×10^8
	4. 5	-1.2×10^8
	6. 0	3.5×10^8
	7. 0	22.5×10^8
	8. 7	13.6×10^8
	9. 7	11.2×10^8
	11. 0	2.6×10^8
Tyr	1. 5	-6.6×10^8
	2. 5	-5.6×10^8
	3. 5	-4.0×10^8
	5. 5	4.0×10^8
	7. 0	23.9×10^8

首先, Trp 或 Tyr 的氧化电势是随着 pH 值降低而升高的. 例如, 对 Trp 来说, pH = 7 时, $E_{\text{ox}} = 1.05 \text{ V (NHE)}$; pH = 3 时, $E_{\text{ox}} = 1.13 \text{ V (NHE)}$. 又如对 Tyr 来说, pH = 11 时, $E_{\text{ox}} = 0.76 \text{ V (NHE)}$; pH = 7 时, $E_{\text{ox}} = 0.94 \text{ V (NHE)}$ ^[15]. 而由方程 3 可求出光诱导电子转移反应的自由能变化. ΔG 随 E_{ox} 升高而增加. 因而 Trp 或 Tyr 到 ^14NQO 的电子转移速率常数随 E_{ox} 升高也即溶液酸性增强而降低.

在酸性条件下, 4NQO 和 Trp 分别以 4NQOH^+ 和 TrpH^+ 的形式存在, 这样由于二者的静电排斥作用, 造成 4NQO 与 Trp 之间的碰撞几率下降, 也即 k_q 值变低. 随着 pH 值的下降, 4NQOH^+ 与 TrpH^+ 的浓度增大, k_q 继续降低.

上述二个因素造成在酸性溶液中电子转移速率常数下降, 但不致于会导致速率常数出现负值. 实验发现至 pH 值小于 4.5 以后, ^14NQO 衰减速率随 Trp 或 Tyr 浓度升高而下降了, 以致于电子转移速率常数为负值, 这里必有另一个因素在起作用.

汪志勇等研究指出, 中性溶液中的 Trp/N[•] 自由基存在两个吸收峰, $\lambda_{\max}=330, 530$ nm. 当 pH 值小于 5 时, 530 nm 处的峰移向 580 nm, 且随着 pH 降低, 580 nm 峰值增加^[16]. Trp/N[•] 自由基的寿命远大于 ^T4NQO, 也即衰减速率常数远小于 ^T4NQO 的, 这样在 590 nm 处增加了一个慢衰减中间体的吸收贡献, 进而造成本实验中 k_q 值变负.

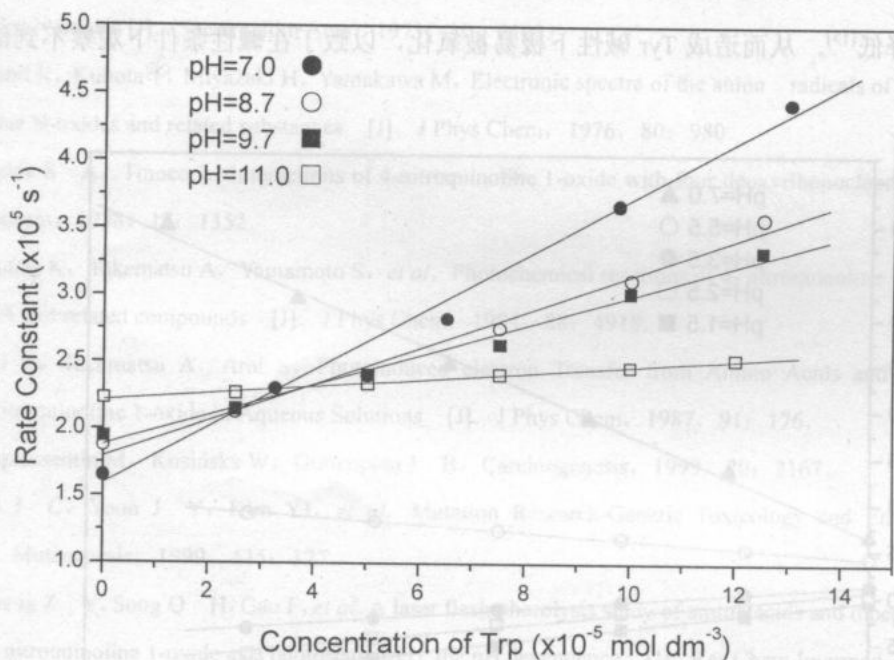


Fig. 5 Plot of the decay rate constants of ^T4NQO vs. the concentration of Trp solution containing $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4NQO in different pH (≥ 7.0) values.

碱性条件下, 同样获得了不同 pH 值下 Trp 猝灭 ^T4NQO 的衰减速率常数. 由图 5 绘制出的 Trp 浓度与衰减速率常数的关系曲线可见, 每个 pH 值下 Trp 浓度与衰减速率间均符合线性关系, 且等 Trp 浓度下随着溶液 pH 的增加, 衰减速率常数 $1/\tau_T$ 下降.

这是由于在碱性的条件下, 4NQO 是以 4NQOOH^- 的形式存在的, 随着 pH 值的升高, 4NQOOH^- 的浓度越高; 而 Trp 作为一种氨基酸, 在碱性的条件下同样以 Trp-COO^- 的形式存在, 所以由于二者静电排斥作用, 4NQO 与 Trp 在溶液中碰撞几率降低, 从而 k_q 减小.

虽然在碱性条件下, 随着溶液 pH 增加, k_q 值下降, 但由于在碱性溶液中不存在象

性溶液中所发生的 580 nm 吸收峰的干扰, 所以不会出现 k_q 变为负值的现象. 但对于强碱性下的氨基酸溶液, 激光脉冲辐照后, 含 4NQO 与氨基酸样品的颜色会变深且无瞬态信号. 这是由于氨基酸在强碱性条件下易被氧化所造成的.

Tyr 与 4NQO 光化学反应的在酸性条件下的 pH 效应与 Trp 的反应类似如图 6 所示, 其电子转移速率常数同样见于表 2. 而在碱性条件下, 由于其酚羟基—OH 易解离, ($pK_a=10.1$), 氧化电位降低^[15]. 从而造成 Tyr 碱性下极易被氧化, 以致于在碱性条件下观察不到信号.

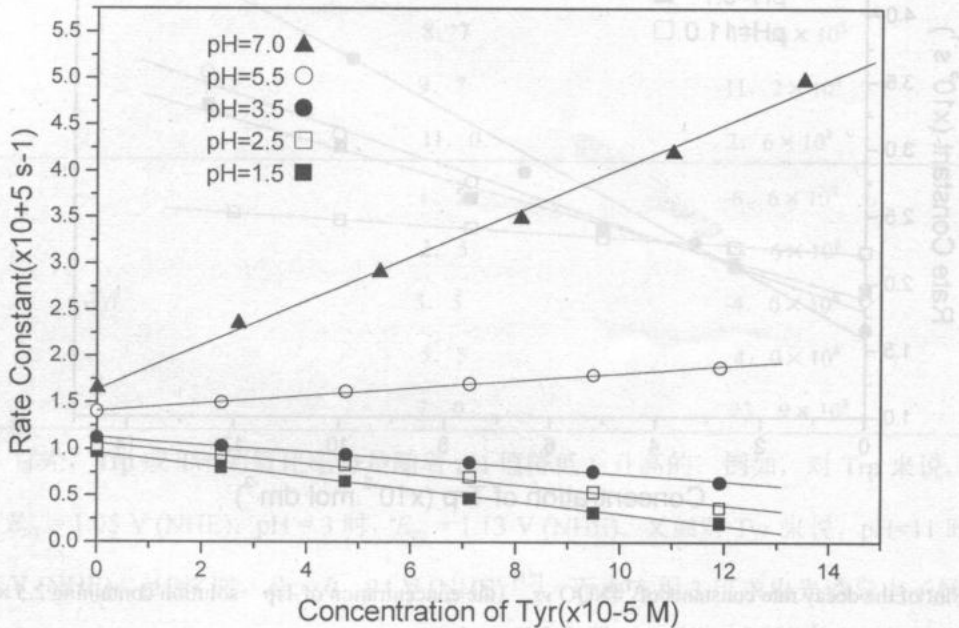


Fig. 6 Plot of the decay rate constants of 14NQO vs. the concentration of Tyr solution containing $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 4NQO in different pH (≤ 7.0)

综上所述: 在酸性条件下, 14NQO 的自猝灭速率常数及从氨基酸到 14NQO 的电子转移速率常数会随着 pH 值的降低而减小. 在碱性条件下, 14NQO 的自猝灭速率常数随 pH 值升高而增加, 但与色氨酸的电子转移速率常数是随 pH 值升高而下降的. 在碱性下, 受激光脉冲辐照的酪氨酸易被 4NQO 氧化.

参 考 文 献

- [1] Nagata C, Kodama M, Tagashira Y, *et al.* Interaction of polynuclear aromatic hydrocarbons, 4-Nitroquinoline 1-oxides, and various dyes with deoxyribonucleic acid [J]. *Biopolymers*, 1966, 4: 409.
- [2] Okano T, Uakama K, Interaction of 4NQO and 4-nitropyridine 1-oxide with DNA and deoxyribonucleosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1967, 15: 1812.
- [3] M. Yamakawa, T. Kubota, K. Ezumi and Y. Mizuno, Singlet-triplet absorption spectra of heterocyclic amine N-oxides [J]. *Spectrochim Acta*, 1973, 30: 2103.
- [4] Ezumi K, Kubota T, Miyazaki H, Yamakawa M, Electronic spectra of the anion radicals of heterocyclic amine N-oxides and related substances [J]. *J Phys Chem*, 1976, 80: 980.
- [5] Winkle S A, Tinoco I. Interactions of 4-nitroquinoline 1-oxide with four deoxyribonucleotides [J]. *J Biochem*, 1978, 17: 1352.
- [6] Kasama K, Takematsu A, Yamamoto S, *et al.* Photochemical reactions of 4-nitroquinoline 1-oxide with DNA and related compounds [J]. *J Phys Chem*, 1984, 88: 4918.
- [7] Seki H, Takematsu A, Arai S, Photoinduced electron Transfer from Amino Acids and proteins to 4-Nitroquinoline 1-oxide in Aqueous Solutions [J]. *J Phys Chem*, 1987, 91: 176.
- [8] Vonpressentin M, Kosinska W, Guttenplan J B, *Carcinogenesis*, 1999, 20: 2167.
- [9] Ryu J C, Youn J Y, Kim YJ, *et al.* Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental [J]. *Mutagenesis*, 1999, 445: 127.
- [10] Sheng Z Y, Song Q H, Gao F, *et al.* A laser flash photolysis study of amino acids and dipeptides using 4-nitroquinoline 1-oxide as a photosensitizer: the pH dependence [J]. *Res Chem Intermed*, 2000, 26:
- [11] Sun H H, Li Q X, Song Q H, *et al.* *Chinese J Quan Electro*, 2000, 17: 180.
- [12] Kumar C V, Qin L, Das P K, Aromatic thioketone triplets and their quenching behaviour towards oxygen and di-t-butyl nitroxy radical: A laser flash photolysis study [J]. *J Chem Soc, Faraday Trans*, 1984, 80: 783.
- [13] Alam M M, Fujitsuka M, Watanabe A, *et al.* Photochemical properties of excited triplet state of 6H-Purine-6-thione Investigated by laser flash photolysis [J]. *J Phys Chem A*, 1998, 102: 1338.
- [14] Rehm D, Weller D. Fluorescence polarization measurements on molecules oriented in liquid crystals [J]. *Isr J Chem*, 1970, 8: 259.
- [15] DeFelippis M R, Murthy C P, Broitman F, *et al.* Electrochemical properties of Tyrosine phenoxyl and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino acid analogues [J]. *J Phys Chem*, 1991, 95: 3416.
- [16] Wang T Y, Zhang Z C, Zhang M W, *et al.* *Chin J Chem Phys*, 1993, 6: 291.

The Photochemical Reaction Kinetics of Tryptophan(Trp), Tyrosine(Tyr) with 4-nitroquinoline 1-oxide : The pH Effects

Sheng Zhenyu¹, Song Qinhu², Zhou Xiaoguo¹, Wang Zhong¹, Li Jiang¹,

Dai Jinghua¹, Li Quanxin¹, Yu Shuqin¹, Ma Xingxiao¹

(1. Open Laboratory of Bond Selective Chemistry, Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China; 2. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei, 230026, China)

Abstract: The self-quenching of triplet 4-nitroquinoline 1-oxide (34NQO) and pH effects on the photochemical reaction of Tryptophan(Trp) and Tyrosine(Tyr) with 34NQO have been investigated by laser flash photolysis. The results show that the self-quenching rate constants of 34NQO decrease with pH value decreasing. The rate constants of electron transfer within Trp, Tyr and 34NQO is the largest at pH=7.0, while the pH value is either higher or lower than 7.0, the rate constants decrease with pH values arising. From the analysis of the pH effects, we can conclude that it is caused not only by the oxidation/reduction potentials of 34NQO , Trp and Tyr, but also the absorption spectrum of Trp^{*} radical.

Key words: 4-nitroquinoline 1-oxide; tryptophan; tyrosine; photochemical reaction kinetics; pH effects