

2-蒽醌磺酸三重态与高聚鸟嘌呤核苷酸 相互作用的激光光解

马建华

(厦门集美大学生物工程学院, 厦门 361021)

林维真 王文峰 韩镇辉 姚思德 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室, 上海 201800)

摘要 利用 248 nm(KrF)激光光解技术研究了乙腈-水(97:3)溶液中 2-蒽醌磺酸激发三重态电子转移光氧化高聚鸟嘌呤核苷酸的原初过程, 直接检测了上述电子转移氧化反应生成的阴阳离子自由基对的瞬态吸收光谱, 分别获取了各自的表现反应速率常数, 协同反应的自由能变化, 阐明了电子转移反应的三重态机理.

关键词 2-蒽醌磺酸 激发三重态 高聚鸟嘌呤核苷酸 激光光解

蒽醌及其衍生物是一类有广泛用途的光敏剂. 它不但能光敏氧化许多有机化合物, 还能切断肿瘤细胞的 DNA^[1,2]. 蒽醌衍生物 2-蒽醌磺酸(AQS)历来被用作强光敏剂的模型化合物, 其光化学早已引起人们的广泛注意^[3-5]. AQS 激发三重态是引发光氧化反应的首要瞬态产物, 但由于 AQS 激发三重态与水具有很强的反应活性^[4], 从而大大缩短了其寿命, 同时所生成的瞬态产物, 尤其长寿命瞬态产物的吸收峰的重叠干扰, 有碍于研究 AQS 与生物分子的相互作用.

本文用纳秒级激光光解研究了乙腈-水(3%)(V/V)溶液中 AQS 三重态电子转移光氧化高聚鸟嘌呤核苷酸 poly[G]所生成的阴、阳离子自由基对的存在, 分别检测了 AQS 阴离子自由基与 poly[G]阳离子自由基的瞬态吸收谱, 据此阐明了反应机理.

1 实验部分

2-蒽醌磺酸(AQS)为 Flua 公司产品. 高聚鸟嘌呤核苷酸 poly[G]为 Sigma 公司产品; 乙腈、丙酮、特丁醇和氯化锰、磷酸酯及其钠盐、亚硝酸钠均为分析纯, 有机试剂经一次重蒸馏、无机盐类经一次重结晶后使用. 所有溶液的配制及药品纯化均采用三次重蒸馏水. 样品在实验前使用 99.99% 的高纯氮鼓泡 20 min 以除氧.

本研究采用纳秒级激光光解瞬态吸收光谱装置. 其中激光器为 KrF 准分子激光器, 激光波长为 248 nm, 脉冲宽度为 20 ns, 单次脉冲最大能量为 50 mJ. 分析光源为 500 W 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个 10 mm 的石英样品

2001-08-10 收稿, 2001-11-07 收修稿

符号说明: A—poly[G]

池. 激发前后溶液的光信号改变经单色仪分光、光电倍增管转变为电信号, 然后由 HP54510B 300 MHz 瞬态记录仪以数字信号记录, 并储存于 PC-486 微机, 最后用实验室编制的软件进行数据处理.

2 结果与讨论

2.1 乙腈-水(97:3)(V/V)溶液中 AQS 激发三重态、AQS 阴离子自由基的特征吸收

水溶液中 AQS 激发三重态、AQS 阴离子自由基与水有强的反应活性, AQS 激发三重态寿命太短, 生成多种瞬态产物而使体系复杂化^[3]. 至今尚未获取 AQS 激发三重态与 poly[G]之间发生了电子转移反应的原初证据. 对此, 我们研究了乙腈-水(97:3)溶液中 AQS 激发三重态、AQS 阴离子的特征吸收.

2.1.1 乙腈-水(97:3)溶液中 AQS 阴离子自由基的特征吸收

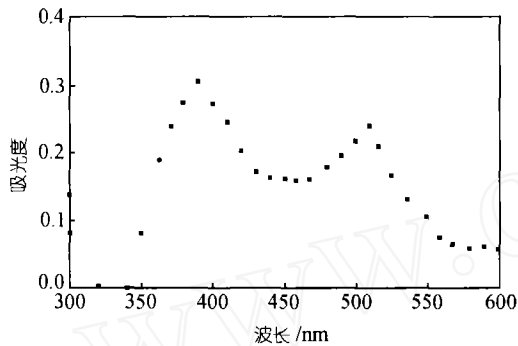
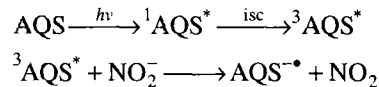


图 1 0.3 mmol/L AQS, 0.1 mol/L NaNO₂ 脱氧乙腈-水(3%)溶液激光照射后(■)1 μs 时的瞬态吸收谱

0.3 mmol/L AQS 与 100 mmol/L NaNO₂ 脱氧乙腈-水(97:3)溶液激光光解后生成的 AQS 阴离子自由基的瞬态吸收谱如图 1 所示. 由图 1 可见, 1 μs 时出现以 380 和 510 nm 处强吸收为特征的吸收谱, 这与文献[4]报道的 AQS 阴离子自由基一致, 文献[4]中 AQS 阴离子自由基由于与水形成氢键而基本稳定化, 而在脱氧乙腈-水(97:3)溶液中, AQS 阴离子自由基的特征吸收在激光脉冲后 40 μs 时已完全消失, 显然, 此体系 AQS 阴离子自由基的寿命明显缩短了, AQS 阴离子自由基产生机理为:



2.1.2 乙腈-水(97:3)(V/V)溶液中 AQS 激发三重态的特征吸收

图 2 为激光光解 0.3 mmol/L AQS 的氮脱氧乙腈-水(97:3)溶液不同时标时瞬态吸收谱. 激光照射 0.07 μs 时, 在波段 360~580 nm 区域, 380 nm 处出现一强吸收峰; 470, 580 nm 出现 2 个较弱的吸收峰. 这 3 个吸收峰衰减服从一级动力学规律. 并且均能被氧气所猝灭, 当归属于 AQS 激发三重态的吸收. 其衰减速率常数 $k_d = 6.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, 寿命约为 10.3 μs. 文献[3]中, AQS 激发三重态在水溶液中与水有极强的反应活性, 致使 AQS 激发三重态寿命很短, 生成多种瞬态产物, 使 AQS 激发三重态特征吸收峰受重叠干扰, 体系复杂化. 而在乙腈-水(97:3)溶液中 AQS 激发三重态的寿命却比其在水溶液中的寿命延长近 30 倍, 同时图 2 还表明, 该体系无其

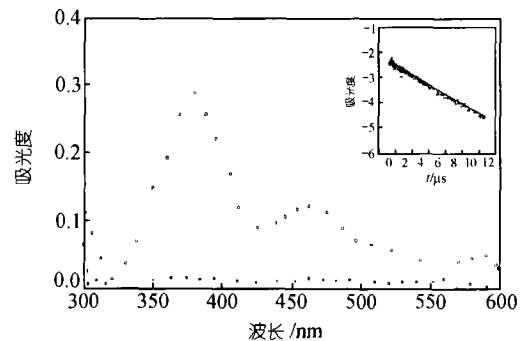
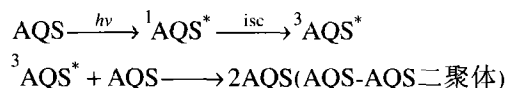


图 2 0.3 mmol/L AQS 的乙腈-水(3%)溶液激光照射后(○)1 μs, (●)10 μs 时的瞬态吸收谱
插图: 在 380 nm 吸光度的对数与时间的关系图

他瞬态产物对 AQS 激发三重态特征峰的吸收干扰。

AQS 激发三重态产生的过程为: AQS 分子受激光直接激发生成单重态(ns 级设备不能检测 $^1\text{AQS}^*$ 行为), 单重态经系间交叉转换生成了三重激发态, 三重激发态可经辐射和非辐射跃迁而去活化, 或为其基态所猝灭, 亦可能生成二聚体:



3 AQS 三重态电子转移光氧化高聚脱氧鸟苷酸的激光光解研究

3.1 瞬态吸收光谱

AQS 与高聚脱氧鸟苷酸对 248 nm 激光均有吸收, 为使激光能量主要首先被 AQS 吸收, 从而先使其被激发而产生 AQS 三重态, 尽量减少脱氧鸟苷酸吸收与激发, 实验确定 AQS 与 poly[G] 的浓度配比为 0.3 : 0.07, poly[G] 在 0.07 mmol 时对 248 nm 激光的吸光度与 0.3 mmol AQS 吸光度相比几乎为零。

激光光解高聚脱氧鸟苷酸与 AQS 脱氧乙腈-水(97 : 3) 溶液不同时标记的瞬态吸收谱如图 3 所示。

图 3 表明, 激光照射后 1 μs 时, 在 390, 510 nm 出现 2 个吸收峰, 其峰形不仅与图 1 一致, 而且与文献报道的 AQS 阴离子自由基瞬态吸收谱相似, 但略显差异, 可归因于 AQS 三重态 380~470 nm 瞬态吸收对 AQS 阴离子自由基特征吸收的干扰^[4]。该瞬态产物归属于 AQS 三重态与 poly[G] 之间发生电子转移生成的 AQS 阴离子自由基。40 μs 时, 310, 390 nm 出现一强一弱 2 个吸收峰。显然, 光解过程中除了生成 AQS 激发三重态、AQS 阴离子自由基外, 还有一长寿命瞬态产物。该瞬态产物的衰减服从二级反应动力学, 其瞬态吸收谱的特征与脱氧乙腈溶液中丙酮光敏化脱氧鸟苷 dG 及 AQS 激发三重态电子转移光氧化脱氧鸟苷 dG 所生成的脱氧鸟苷 dG 阳离子自由基基本一致, 即在 310 nm 都有一较强吸收, 390 nm 有一弱特征吸收, 还与丙酮敏化水溶液中脱氧鸟苷酸 dGMP 的瞬态吸收谱及 SO_4^- 单电子氧化鸟嘌呤 Gua, 鸟苷 Guo 的吸收谱非常相似^[6-8]。因此, 可以推断 AQS 三重态与 poly[G] 之间通过电子转移反应产生了 AQS 阴离子自由基与 poly[G] 阳离子自由基的离子对。

3.2 AQS 电子转移光氧化 poly[G] 的动力学与自由能变化

据上述二元体系 AQS 激发三重态的衰减、AQS 阴离子自由基及 poly[G] 阳离子自由基的生成分别计算了各瞬态产物的动力学参数, 计算过程如下:

脱氧乙腈-水(97 : 3) 溶液中 AQS 激发三重态电子转移光氧化 poly[G] 的瞬态吸收, 是由 AQS 三重态、AQS 阴离子自由基与 poly[G] 阳离子自由基吸收的叠加, 为了测定 AQS 三重态

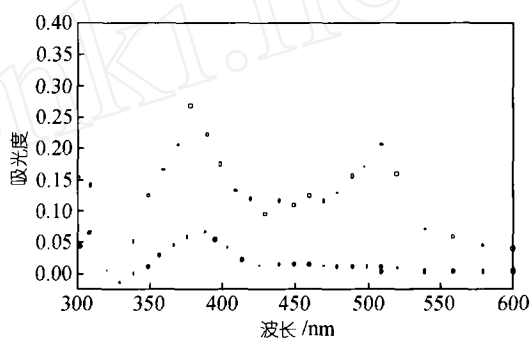


图 3 0.07 mmol/L poly[G], 0.3 mmol/L AQS 乙腈-水(3%) 溶液激光照射后(o) 1 μs , (●) 40 μs 时瞬态吸收谱

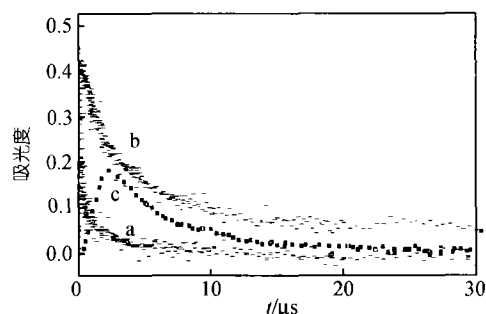


图4 0.07 mmol/L poly[G]与0.3 mmol/L AQS 乙腈-水(3%)溶液激光光解瞬态吸收随时间的变化
曲线 a 检测波长 510 nm; b 检测波长 580 nm; c 检测波长 510 nm(由原 510 nm 的曲线 a 扣除曲线 b 与 A^{510}/A^{580} 之积得到)

自由基表观生成速率(k_f)见表 1.

表 1 AQS 三重态表观衰减速率常数及 AQS 阴离子自由基、Poly[G]阳离子自由基表观生成速率常数

$k_f \times 10^5/s^{-1}$		$k_d \times 10^5/s^{-1}$	
310 nm	510 nm	510 nm	580 nm
5.3	4.8		5.8

表 1 表明, poly[G]阳离子自由基、AQS 阴离子的表观生成速率常数(k_f)近似于 AQS 三重态的表观衰减速率常数(k_d).

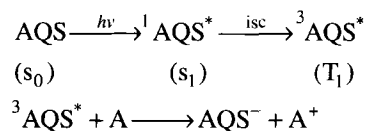
AQS 激发三重态 poly[G]组分电子转移光氧化的热力学. 根据 Rehm-Weller 方程^[9]

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

可得到 AQS 三重态与核苷之间电子转移反应的自由能变化(ΔG)值. Rehm-Weller 方程式中, E_{red} 表示授体 AQS 的还原电位, $E_{red} = -0.81 \text{ V(SCE)}$; E_{ox} 表示供体鸟嘌呤的氧化电位, 按经验公式 $E_{ox} = 0.89IP - 6.04 \text{ V(SCE)}$ 计算而得^[10], 式中鸟嘌呤的电离电位 IP 值来自文献[11], 计算结果, 鸟嘌呤的 E_{ox} 值为 1.08 V(SCE) . $\Delta E_{0,0}$ 表示 AQS 激发三重态的能量, 其值为 $2.68 \text{ eV}^{[5]}$; $e^2/\epsilon d$ 为 Coulomb 项, 在乙腈溶液中 $e^2/\epsilon d = 0.06 \text{ eV}^{[9]}$. $E_{red} = -0.81 \text{ V(vs SCE)}$ 是复旦大学电化学实验室通过循环伏安法测得的结果. 测定的条件为: 溶剂: 97% 乙腈-3% 水(V/V); 参比电极: $\text{Ag}/\text{AgCl(SCE)}$; 对电极: Pt 电极; 工作电极: 玻碳电极(GC); 扫描速度: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; 测定温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; N_2 保护. 将各相关值代入 Rehm-Weller 方程, 计算得 AQS 三重态与鸟嘌呤之间自由能变化 ΔG 值为 $-47.27 (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$. 该结果表明 AQS 激发三重态与鸟嘌呤发生电子转移反应为热力学允许的过程.

综上所述, 通过 248 nm 激光辐照 AQS 与 poly[G]乙腈-水(97:3)溶液体系, 直接、同时检测了 AQS 激发三重态与 poly[G]之间发生电子转移反应生成的 poly[G]阳离子自由基及 AQS 阴离子自由基的瞬态吸收谱及其完整的动力学参数. 并以热力学计算予以了验证. 获取了 AQS 激发三重态与 poly[G]之间发生了电子转移反应的原初证据. 其机理概括为:

的动力学, 必须排除或尽量避开后两者的干扰. 由于在 580 nm 的吸收基本是纯 AQS 三重态吸收^[3], 因此 AQS 三重态的动力学可直接由 580 nm 的吸收求得. poly[G]阳离子自由基的动力学可直接由 310 nm 的吸收求得, 因为 AQS 三重态与 AQS 阴离子自由基在此基本上无吸收, 而 AQS 阴离子自由基 510 nm 的吸收却有 AQS 三重态吸收的干扰. 可利用动力学计算的差谱方法, 即由 A_t^{510} 减去 A_t^{580} 与 A^{510}/A^{580} 之积以扣除 AQS 三重态在 510 nm 的贡献而获取 AQS 阴离子自由基的动力学参数, 见图 4 所示. AQS 三重态表观猝灭速率(k_d)、AQS 阴离子自由基和 poly[G]阳离子



参 考 文 献

- 1 Armitage B, Yu C, Devadoss C, et al. Cationic anthraquinone derivatives as catalytic DNA photonuclases: mechanisms for DNA damage and quinone recycling. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 9847~9859
- 2 David T, Breslin D T, Coury J R, et al. Anthraquinone photonuclase structure determines its mode of binding to DNA and the cleavage chemistry observed. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 5043~5045
- 3 Loeff I, Trelinin A, Linschitz H. Photochemistry of 9,10-anthraquinone-2-sulfonate in solution. 1. Intermediates and mechanism. *J Phys Chem*, 1983, 87: 2536~2544
- 4 Loeff I, Trelinin A, Linschitz H. The photochemistry of 9,10-anthraquinone-2-sulfonate in solution. 2. Effects of inorganic anions: Quenching vs. radical formation at moderate and high anion concentration. *J Phys Chem*, 1984, 88: 4931~4937
- 5 Loeff I, Rabani J, Linschitz H. Charge transfer and reactivity of $n\pi^*$ and $\pi\pi^*$ organic triplets, including anthraquinonesulfonates, in interactions with inorganic anion: A comparative study based on classical Marcus theory. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 8933~8942
- 6 Song Q H, Yao S D, Lin N Y. Laser-induced modification of DNA and poly[A,G] at guanine moiety using acetone as photosensitizer. *J Photochem Photobiol, B: Biol*, 1997, 40: 199~203
- 7 O'Neill P, Davis S E. Pulse radiolytic study of the interaction of SO_4^- with deoxynucleosides. Possible implications for direct energy deposition. *Int J Radiat Biol*, 1987, 52: 577~587
- 8 Candeias L P, Steenken S. Electron transfer in di(deoxy)nucleoside phosphates in aqueous solution: rapid migration of oxidation damage (via adenine) to guanine. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 2437~2440
- 9 Rehm D, Weller D. Kinetics of fluorescence quenching by electron and hydrogen-atom transfer. *Isr J Chem*, 1970, 8: 259~271
- 10 Miller L L, Nordblum G D, Mayeda E A. A simple comprehensive correlation of organic oxidation and ionization potentials. *J Org Chem*, 1972, 37: 916~918
- 11 Nikogosyan D N. Two-quantum UV photochemistry of nucleic acids: Comparison with conventional low-intensity UV photochemistry and radiation chemistry. *Int J Radiat Biol*, 1990, 57: 2.233~299