

* 研究简讯 *

芳香氨基酸光电离过程的 pH 效应*

宋钦华 李全新 孙海虹 徐业平 陈从香 俞书勤 马兴孝

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

姚思德 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所,上海 201800)

摘要 运用 248 nm 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、咪唑环上 \geq NH 的解离。解释了国外学者在水合电子量子产额测定结果上的不一致现象。

关键词 激光闪光光解 芳香氨基酸 光电离过程 pH 效应

组成蛋白质的氨基酸中,仅有酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)3种芳香氨基酸在 UVB(280~320 nm)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 30 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^-)不相符合,甚至同一个研究小组前后得到的数据也不一致^[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]。

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 248 nm 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。

1 实验

DL-酪氨酸(Tyr)、D-色氨酸(Trp)和 L-苯丙氨酸(Phe)为 Sigma 公司产品,未经进一步纯化直接使用。溶液的 pH 值用氢氧化钠和磷酸(均为分析纯)溶液调节。由表 1 中 pK_a 值可知,在本文的 3 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。样品在实验前根据实验目的用高纯氮或氧化亚氮鼓泡 20 min。

1999-03-10 收稿,1999-05-17 收修改稿

* 中国博士后科学基金资助项目(批准号:中博基[1998]6号)

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 248 nm, 脉宽 20 ns, 每脉冲能量 ≤ 50 mJ, 信号由 HP54510B 300 MHz 瞬态记录仪记录, 并转化为数字信号送入 PC-486 个人计算机进行处理. 详细装置介绍见文献[20].

Tyr, Trp 和 Phe 的结构式如下:

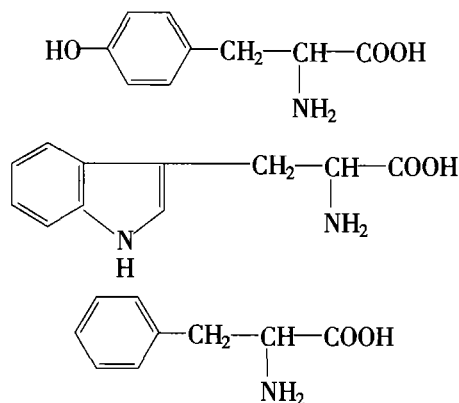


表 1 芳香氨基酸的 pK_a 和不同 pH 值溶液 248 nm 激光光电离的光强指数

芳香氨基酸	pK_a [11-13, 22]			光强指数 ^{a)}		
	-COOH	-NH ₃ ⁺	-OH	1.2 (pH)	6.5 (pH)	11.4 (pH)
Tyr	2.2	9.1	10.1	1.7 ^{b)}	1.5	1.0
Trp	2.4	9.4		1.6 ^{b)}	1.4	1.2
Phe	1.8	9.1		1.9 ^{b)}	1.9	1.8

a) 误差为 ± 0.1

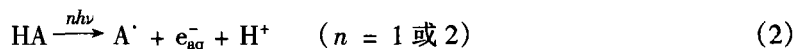
b) 分别在 Tyr, Trp, Phe 光电离生成的自由基的吸收峰 410, 330, 320 nm 处测定得到

2 结果与讨论

中性和碱性芳香氨基酸 N_2 饱和溶液在激光照射后立即观察到 290 ~ 400 nm 波段的光漂白现象和 400 ~ 600 nm 的强吸收带; 用 N_2O 饱和的溶液光解没有 400 ~ 600 nm 的吸收带, 结合其衰减动力学可知, 400 ~ 600 nm 的吸收带是水合电子 (e_{aq}^-) 的吸收 (e_{aq}^- 的吸收峰为 720 nm). 图 1, 图 2 和图 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. 2 μ s 时水合电子的吸收已基本消失(见图 1~3 中插图), 水合电子的衰减是由于与母体分子发生了如下反应:



水合电子的生成是芳香氨基酸在 248 nm 激光照射下发生了光电离的证据:



另外, 芳香氨基酸还可能直接解离生成自由基.

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

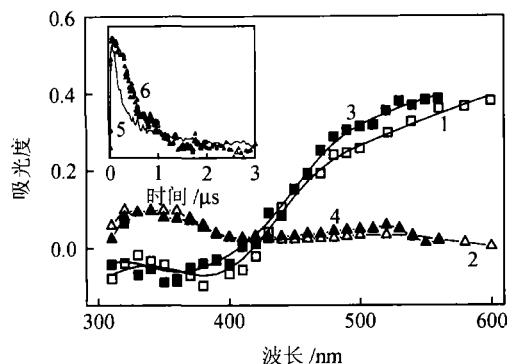


图 1 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 色氨酸水溶液的激光光解瞬态吸收光谱

pH 6.5: 1—80 ns (N_2 饱和), 2—0.1 μs (N_2O 饱和);
pH 11.4: 3—50 ns (N_2 饱和), 4—0.1 μs (N_2O 饱和). 插图: 560 nm 处吸收随时间的变化, 5—pH 6.5, 6—pH 11.4

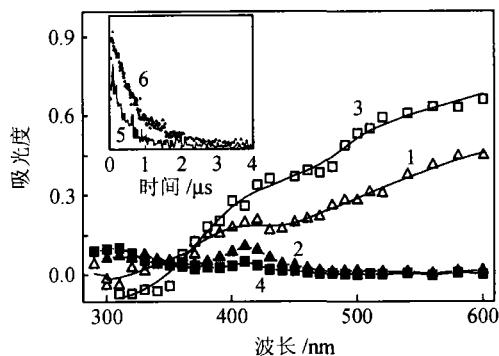


图 2 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 酪氨酸水溶液的激光光解瞬态吸收光谱

pH 6.5: 1—80 ns (N_2 饱和), 2—0.1 μs (N_2O 饱和);
pH 11.4: 3—50 ns (N_2 饱和), 4—0.1 μs (N_2O 饱和). 插图: 600 nm 处吸收随时间的变化, 5—pH 6.5, 6—pH 11.4

化.

激光照射酪氨酸溶液后 0.1 μs , 测定波长 650 nm 处吸收 (A_{650}) 随激光强度 (I_L) 的变化. 两者作图发现, 中性溶液可拟合为一曲线, 碱性溶液可拟合为一曲线 (图 4). 由 $\lg A_{650}$ 与 $\lg I_L$ 的关

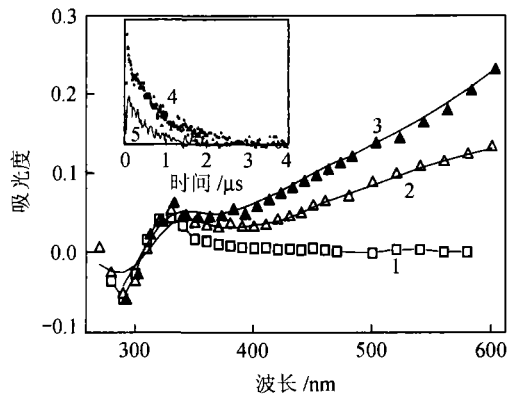


图 3 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 苯丙氨酸水溶液 N_2 饱和的瞬态吸收光谱

pH 1.2: 1—0.1 μs , pH 6.5: 2—0.1 μs , pH 11.4: 3—0.1 μs . 插图: 600 nm 处吸收随时间的变化, 4—pH 11.4, 5—pH 6.5

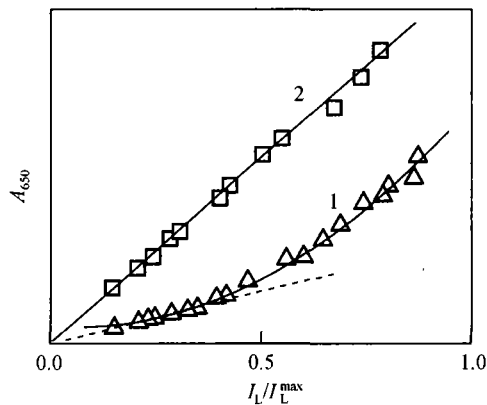


图 4 pH 6.5 (曲线 1) 和 pH 11.4 (曲线 2) 水溶液中酪氨酸光电离 650 nm 处吸收随激光强度的变化

系 ($\lg A_{650} = n \lg I_L$) 分别求得光强指数 n , pH 6.5 时为 1.5, pH 11.4 时为 1.0. 显然, 中性溶液中酪氨酸光电离同时存在单、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 4 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 ~ 600 nm 波段没有观察到 e_{aq}^- 的瞬态吸收 (见图 3), 这是因为 pH 1.2 时, e_{aq}^- 与 H^+ 快速反应生成 H^{\cdot} :



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^{\cdot}) 吸收峰的强度, 由两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 3 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。

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 1。结果显示, 光强指数随 pH 值变化较明显的是酪氨酸, 色氨酸有变化, 苯丙氨酸基本无变化。尽管 3 种芳香氨基酸- NH_3^+ 解离的 pK_a 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, 这与仅有酪氨酸的芳香取代基上酚羟基的 pK_a 也在这一 pH 值范围有关。

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 pK_a 处荧光量子产额增大, 酪氨酸只在其 $-COOH$ 脱质子的 pK_a 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^[21]。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 认为是由于吲哚环上 $>NH$ 在激发后脱质子引起^[21]。通常处于激发态的分子电子云密度比基态低, 酸性增强, pK_a 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。

宋钦华等人^[22, 23]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 等人^[24]测定了不同 pH 值溶液中的酪氨酸、色氨酸的氧化电位, 结果发现当溶液 $pH > pK_a$ (发色团) 时氧化电位大幅度降低。这一结果支持酪氨酸、色氨酸在其发色团上的活泼氢解离后 (即溶液 $pH \geq pK_a$ 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。这样, 也就解释了国外学者在水合电子量子产额的测定结果上的混乱现象。

参 考 文 献

- 1 Creed D. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids. I. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochem Photobiol*, 1984, 39: 537 ~ 562

- 2 Creed D. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids. II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochem Photobiol*, 1984, 39: 563 ~ 575
- 3 Harmon P A, Teraoka J, Asher S A. UV resonance raman saturation spectroscopy measures protein aromatic amino acid excited state relaxation rates. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 8 789 ~ 8 799
- 4 Repeyev Y A, Khoroshilova E V, Nikogosyan D N. 212.8 nm laser photolysis of aromatic and aliphatic amino acids and related peptides. *J Photochem Photobiol, B: Biol*, 1992, 12: 259 ~ 274
- 5 Bensasson R V, Land E J, Truscott T G. Proteins and components. In: Bensasson R V, Land E J, Truscott T G, eds. *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine. Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*. Oxford: Oxford University Press, 1993. 103 ~ 142
- 6 Grossweiner L I, Usui Y. Flash photolysis and inactivation of aqueous lysozyme. *Photochem Photobiol*, 1971, 13: 195 ~ 214
- 7 Santus R, Grossweiner L I. Primary products in the flash photolysis of tryptophan. *Photochem Photobiol*, 1972, 15: 101 ~ 105
- 8 Templer H, Thistlethwaite P J. Flash photolysis of aqueous tryptophan, and tryptophyl alanine. *Photochem Photobiol*, 1976, 23: 79 ~ 85
- 9 Amouyl E, Bernas A, Grand D. On the photoionization energy threshold of tryptophan in aqueous solutions. *Photochem Photobiol*, 1979, 29: 1 071 ~ 1 077
- 10 Bent D V, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. I. Tyrosine. *J Am Chem Soc*, 1975, 97: 2 599 ~ 2 606
- 11 Bent D V, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. II. Phenylalanine. *J Am Chem Soc*, 1975, 97: 2 606 ~ 2 612
- 12 Bent D V, Hayon E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *J Am Chem Soc*, 1975, 97: 2 612 ~ 2 619
- 13 Bryant F D, Santus R, Grossweiner L I. Laser flash photolysis of aqueous tryptophan. *J Phys Chem*, 1975, 79: 2 711 ~ 2 716
- 14 Lachish U, Shafferman A, Stein G. Intensity dependence in laser flash photolysis experiments: hydrated electron formation from ferrocyanide, tyrosine, and tryptophan. *J Chem Phys*, 1976, 64: 4 205 ~ 4 211
- 15 Baugher J F, Grossweiner L I. Photolysis mechanism of aqueous tryptophan. *J Phys Chem*, 1977, 81: 1 349 ~ 1 354
- 16 Finnstrom B, Tfibel F, Lindqvist L. One- and two-photon ionization of aqueous tryptophan by the harmonics of the Nd laser. *Chem Phys Lett*, 1980, 71: 312 ~ 316
- 17 Grossweiner L I, Brendzel A M, Blum A. Multiple pathways of tryptophan photoionization. *Chem Phys*, 1981, 57: 147 ~ 155
- 18 Mialocq J C, Amouyal E, Bernas A, et al. Picosecond laser photolysis of aqueous indole and tryptophan. *J Phys Chem*, 1982, 86: 3 173 ~ 3 177
- 19 Bazin M, Patterson L K, Santus R. Direct observation of monophotonic photoionization of tryptophan excited by 300 nm radiation. A laser photolysis study. *J Phys Chem*, 1983, 87: 189 ~ 190
- 20 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
- 21 Birks J B. *The Excited States of Biological Molecules*. Elsevier: John Wiley & London, 1976. 254
- 22 Song Q H, Yao S D, Wang W F, et al. Monophotonic ionization of guanine components in alkaline aqueous solution by 248 nm laser light: identification of guanine-derived radical anions. *J Photochem Photobiol, A: Chem*, 1997, 102: 197 ~ 201
- 23 Song Q H, Yao S D, Li N Y. Monophotonic ionization of poly[A, G] and DNA in alkaline aqueous solution by 248 nm laser light: formation of guanyl radical. *Radiat Phys Chem*, 1997, 50: 435 ~ 439
- 24 DeFelippis M R, Murthy C P, Broitman F, et al. Electrochemical properties of tyrosine phenoxy and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino acid analogues. *J Phys Chem*, 1991, 95: 3 416 ~ 3 419