

以 β -环糊精包结的亚硝基叔丁烷为捕获剂对辅酶 B_{12} 及其类似物光解的 ESR 研究

吴悦 罗来斌 韩德燕 陈慧兰*

(配位化学国家重点实验室, 配位化学研究所, 南京大学化学化工学院, 南京 210093. * 联系人)

摘要 以亚硝基叔丁烷为捕获剂, 加入环糊精后用 ESR 方法研究了辅酶 B_{12} (Adocbl) 及 5 种类似物: (1) 甲基钴胺素 (Mecbl); (2) 新戊基钴胺素 (Neocbl); (3) 2'-脱氧腺苷钴胺素 (2' dAdocbl); (4) 1-甲基-5-脱氧- β -D(-) 呋喃核糖钴胺素 (Ribcbl); (5) 1-甲基-2, 3-O-异亚丙基-5-脱氧- β -D(-) 呋喃核糖钴胺素 (Rib* cbl) 的光解反应, 检测了形成的自由基氮氧加合物, 求得了各加合物的超精细分裂常数, 与不加环糊精相比发现 N 的超精细分裂减小, β -H 超精细分裂也有不同程度的改变, 说明光解形成的自由基加合物部分包结在环糊精腔中, 导致 β -H 的空间取向不同. 在此基础上分析了加合物与环糊精的包结方式, 讨论了氢键对于加合物形成的影响, 并以环糊精为酶模型探讨了辅酶 B_{12} 有关的反应机理和辅因子结构对酶活性的影响.

关键词 β -环糊精 辅酶 B_{12} 钴胺素 亚硝基叔丁烷 ESR

辅酶 B_{12} , 即 5'-脱氧腺苷钴胺素 (Adocbl) 是生物体中存在的有机金属化合物, 它具有一个相对不稳定的 σ 钴-碳键. 辅酶 B_{12} 作为某些酶的辅因子, 促进分子内重排反应的进行. 研究表明此类反应机理中, 酶诱导 Adocbl 的 Co-C 键断裂形成 B_{12r} 和 5'-脱氧腺苷自由基是整个酶催化反应的关键步骤^[1]. 由于辅酶 B_{12} 及其类似物的光解反应也生成相应的自由基, 因此对该反应的研究有助于了解辅酶 B_{12} 参与的酶反应机理.

辅酶 B_{12} 的光解产物 B_{12r} 已被 ESR 光谱和 UV/vis 光谱证实^[2]. 对于光解产生的自由基则可通过自旋捕集 ESR 法来研究, 该方法便于检测短寿命的自由基. 亚硝基叔丁烷 (t-NB) 是常用的捕获剂, 与自由基形成较稳定的、可用 ESR 检测的自旋加合产物, 其中 R 基团直接与氮原子连接, 易从其 ESR 谱中 N 特征峰的进一步分裂而获得被捕获自由基结构信息, 对鉴别 R 基团非常有利^[3, 4]. 但在实验过程中也发现了 t-NB 的一些不足之处^[5, 6], 如: (1) 对光和热不稳定, 其结果是亚硝基化合物的自旋加合物的 ESR 谱总迭加有杂质氮氧基的谱; (2) 在水中溶解度很小, 不适合水溶液或生物体系的研究; (3) t-NB 常以非活性的二聚形式存在, 不能参与自由基的捕获.

众所周知, 环糊精 (简称为 CD) 有稳定客体 and 增加其水中溶解度的作用, 我们的 ^1H NMR 研究发现 β -CD 可催化 t-NB 二聚体分解为单体, 在 t-NB 为捕获剂, 辅酶 B_{12} 及其类似物光解的 ESR 研究体系中加入环糊精, 实验结果表明加入环糊精后可以克服 t-NB 的上述缺点, 并能得到辅酶 B_{12} 有关的反应机理的信息. 本工作研究了辅酶 B_{12} (Adocbl) 及其 5 种类似物: (1) 甲基钴胺素 (Mecbl), (2) 新戊基钴胺素 (Neocbl), (3) 2'-脱氧腺苷钴胺素 (2' dAdocbl), (4) 1-甲基-5-脱氧- β -D(-) 呋喃核糖钴胺素 (Ribcbl), (5) 1-甲基-2, 3-O-异亚丙基-5-脱氧- β -D(-) 呋喃核糖钴胺素 (Rib* cbl).

1 实验

(1) 药品. α -CD 为 Sigma 产品; γ -CD 为瑞士 Neachatel 大学 Tabacchi 教授赠送; β -CD 由

南京发酵研究所提供,用水重结晶2次,80℃真空干燥而得.

Mecbl, Adocbl, Neocbl, Ribcbl, Rib^{*}cbl, 2'-dAdocbl, t-NB 由本组过去实验合成. 经 500 MHz ¹H NMR 鉴定纯度合格.

(2) 仪器和测定方法. ¹H NMR 谱采用 Bruker 500 MHz 核磁共振仪, D₂O 为溶剂, DSS 为外标, 溶液浓度为 0.01 mol·L⁻¹, 残余水峰(HDO)用预饱和方法压制.

ESR 谱在 JEOL_FEIXG 电子顺磁共振仪上记录并用计算机进行数据采集, 高压汞灯为 BMO_500D, 采用滤光片调节光强, 调制频率为 100 kHz, 调制宽度为 > 1 G, 微波功率为 2~5 mW, 响应时间为 0.1 s.

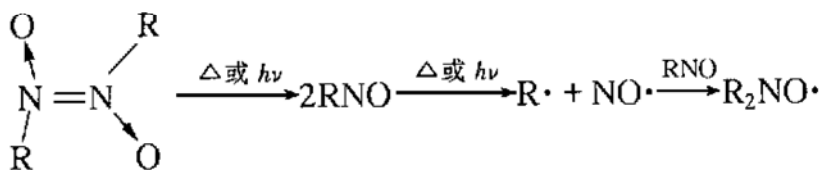
ESR 样品的制备均在避光条件下进行. 水作溶剂, 分别配制: () 浓度约为 6 × 10⁻² mol·L⁻¹ t-NB 水溶液(25 mg t-NB 在 5 mL 2 次水中通 N₂ 0.5 h, 于 45℃避光搅拌 4 h 溶解后使用); () 浓度 2 × 10⁻² mol·L⁻¹ 左右的 t-NB 与环糊精 1:1 的溶液; () 1 mL 上述 2 种溶液加入约 10 mg 标题样品, 溶解后用针筒注入石英扁平管.

2 结果和讨论

2.1 t-NB/CD 的¹H NMR 和 ESR 研究

根据文献[7]得知¹H NMR 谱(CCl₄ 溶液)中 t-NB 双聚体在 δ= 1.5 附近有一单峰, 而其单体的峰在 δ= 1.2 附近. 核磁实验表明 t-NB 在水溶液中以双聚体形式存在, 其 δ= 1.58, 当加入 CD 后¹H NMR 谱中还出现 δ= 1.33 的峰, 说明 CD 可催化 t-NB 双聚体分解为单体. 根据峰面积测得在 α, β, γ-CD 的新配溶液中单体形式所占的百分比分别为: 9.1%, 54.4% 和 8.7%, 因此 β-CD 对 t-NB 双聚体分解的催化能力最强. 故以下研究采用 t-NB/β-CD 溶液作为捕获剂. 此外由¹H NMR 谱得知: β-CD 的位于腔内的质子 H₅ 化学位移发生变化, 说明 t-NB 被包结. 但由于 CD 与客体之间为分子间作用力, 该变化不大(δ< 0.1).

t-NB 常以二聚形式存在, 光照或加热可促进其分解成单体, t-NB 单体进一步分解成叔丁基自由基, 被其自身捕获形成氮氧自由基(DTBN), ESR 谱中出现¹⁴N 的三重分裂峰. 上述反应如下式所示:



ESR 实验中发现, 紫外光照射 t-NB(双聚)/β-CD 水溶液后, 检测出信号的时间短于不含环糊精的溶液, 然而, 信号强度相对于 t-NB 水溶液很弱, 且一段时间后, 信号可稳定, 说明 t-NB/β-CD 对光稳定, 其 ESR 信号来源于溶液中未被包结的 t-NB 单体.

t-NB 水溶液中加入 β-CD 后, N 的超精细分裂值由 1.71 mT 减小至 1.67 mT, 由于该值反映溶剂或介质极性, 即溶剂或介质极性越小, A_N 值越小, 因而这也是氮氧自由基已被环糊精疏水腔包结的证明.

2.2 t-NB/CD 与辅酶 B₁₂ 及其类似物光解产物的 ESR 研究

在我们研究的体系中, t-NB(双聚)溶解于环糊精水溶液光照后形成 t-NB(单体)及 DTBN(双叔丁基氮氧自由基)都可能与 CD 包结^[8], 溶液中辅酶 B₁₂ 或其类似物在紫外光照射下, Co—C 键断裂形成 R·, 已被自旋捕集 ESR 法证实^[9]. 当不加或加入 CD, R·与 t-NB 形成加合

物的 ESR 研究结果列于表 1, 根据表中数据我们分别讨论不同 R 自由基的情况.

表 1 t -NB 与辅酶 B_{12} 及其类似物形成的氮氧自由基加合物
在水中 N, H 超精细分裂常数(单位: mT)

氮氧自由基加合物		A_N	A_{H1}	A_{H2}	$A_{H1} + A_{H2}$
t -NB-Me	free	1.73 ^{a)}	1.43 ^{a)}		
	β -CD	1.61	1.32		
t -NB-Neo	free	1.75 ^{a)}	1.06 ^{a)}		
	β -CD	1.67	0.92		
t -NB-Ado	free	1.64 ^{a)}	0.79 ^{a)}	1.46 ^{a)}	2.25 ^{a)}
	β -CD	1.50	0.63	1.21	1.84
t -NB-dAdo	free	1.68 ^{a)}	0.79 ^{a)}	1.45 ^{a)}	2.24 ^{a)}
	β -CD	1.61	0.75	1.44	2.19
t -NB-Rib	free	1.67	1.09	1.50	2.59
	β -CD	1.73	0.81	1.67	2.48
t -NB-Rib ^{a)}	free	1.70	1.08	1.48	2.56
	β -CD	1.73	0.81	1.67	2.48

a) 为燕红博士论文数据

() Me $\cdot$ 和 Neo $\cdot$

Me $\cdot$ 与 t -NB 加合物应产生 3 组四重分裂峰, 见图 1, S 为 DTBN 的峰.

Neo $\cdot$ 加合物谱图见图 2, 图中 3 个 S 峰很强, 较其他加合物大, 一方面由于 2 个 β -H 造成的 N 核 1:2:1 分裂与 DTBN 峰重叠, 另一方面 Neo $\cdot$ 与 t -NB 结构相似, 也可能被 CD 包结, 导致溶液中存在游离态的 t -NB 单体, 它对光不稳定, 易生成 DTBN/ β -CD, 所以 DTBN 的特征峰较大.

N 的超精细分裂值与环境极性有关, 而 β -H 超精细分裂与 $\cos^2\theta$ 的时间平均值有关 (Heller-McConnell 公式)^[10], 其中 θ 是 C-N 键与 N 原子上孤电子 p 轨道组成的平面与 N-C- β -H 平面之间的二面角, β -H 超精细分裂变化反映加合物构象的变化.

表 1 数据中 t -NB/Me $\cdot$ 和 Neo $\cdot$ 加入 β -CD 后, A_N , A_H 均减小, 说明形成的加合物被包结, β -H 取向发生改变. 根据两种氮氧自由基加合物的初步 MM 计算, 考虑到位阻效应, 并参考文献[7], 我们推测结构见图 1 中 iv 和 ㉔所示.

() Ado $\cdot$ 和 dAdo $\cdot$

Ado $\cdot$ 和 dAdo $\cdot$ 与 t -NB 加合物中两个不等价的 β -H 产生 3 组 1:1:1:1 的四重峰^[10], 加入 β -CD 后的 ESR 谱(见图 3), S 峰由于强度较弱而被其他峰覆盖. 其 N, H 超精细分裂常数都比无环糊精存在时小, 这与前述规律相符, 说明自由基加合物可能部分进入 CD 疏水腔. 我们推测 t -NB-Ado/ β -CD 包结物结构如图 3 中 ㉕所示.

dAdocbl 的结构与 Adocbl 仅差一个 2' 位呋喃糖环羟基, ESR 谱中 N 和 β -H 超精细分裂值

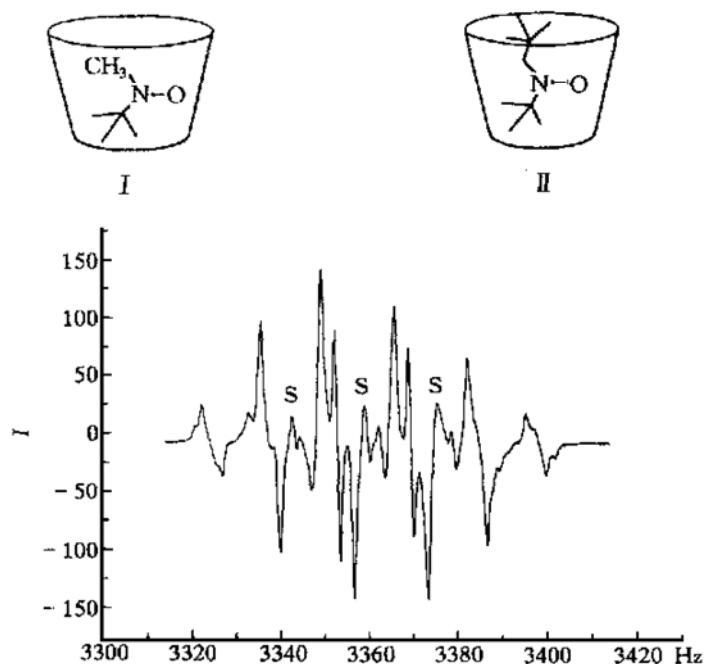
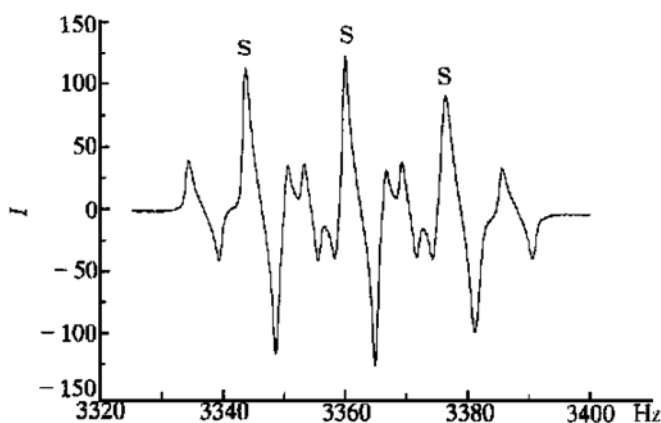
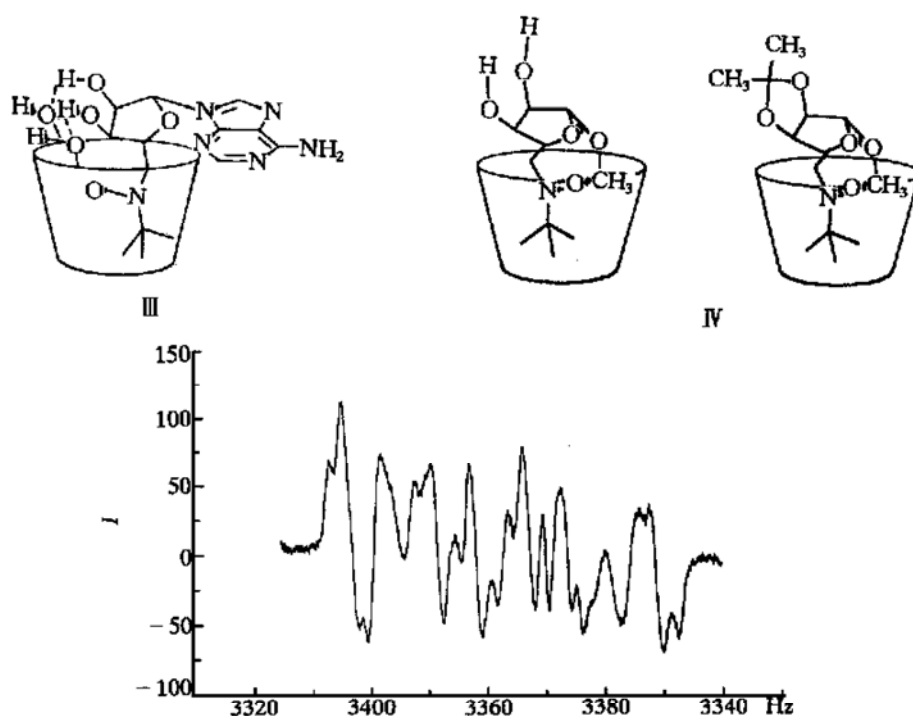


图 1 t -NB-Me/ β -CD 水溶液 ESR 谱图

相似,而加入 β -CD后,Ado的 A_N 值降低更多,可能因为Ado呋喃糖环上的2'位羟基如同其3'位羟基也可与CD腔口的羟基基团组形成氢键,而且这个氢键的形成使包结物更稳定. 以往的研究^[11]中表明: dAdocbl 作为酶的辅因子活性仅为天然辅因子 Adocbl 的 1%~2%,其原因可能是轴向呋喃糖环的2'羟基处于反应活性位置,与酶蛋白存在着氢键相互作用,这对于酶诱导的咕啉环构型变化和位阻效应,从而对Co—C键断裂有重要作用. 这与前述ESR研究结果极为相似,所以CD可能作为

图2 t-NB-Neo/ β -CD水溶液 ESR 谱图图3 t-NB-Ado/ β -CD水溶液 ESR 谱图

酶模型来研究辅酶 B_{12} 参与的酶反应机理.

() Rib $\cdot$ 和 Rib $\cdot^*$

图形与 Ado $\cdot$ 和 dAdo $\cdot$ 与 t-NB 加合物类似,只是谱峰叠加较严重.

t-NB-Rib 及 t-NB-Rib $\cdot^*$ 与 β -CD 包结后 A_N 略有增大, A_{H1} 减小,而 A_{H2} 增大,总的 $A_{H1}+A_{H2}$ 减小.

Rib $\cdot$ 与 Rib $\cdot^*$ 结构相似,差别仅在于 Rib $\cdot^*$ 上2',3'位羟基被保护 Σ ,这样 Rib $\cdot^*$ 与 β -CD之间不可能形成氢键,由表1可见 t-NB-Rib/ β -CD 和 t-NB-Rib $\cdot^*$ / β -CD 的超精细分裂值相等,即羟基保护与否对 A_N , A_H 无影响,因此 Rib 上的羟基可能也不与环糊精形成氢键. 我们推测 Rib 上的甲氧基团体积较小,有可能与叔丁基一起被包结,导致 $C_\alpha-C_\beta$ 键旋转,使甲氧基进入腔内,同时呋喃糖环2',3'位两个羟基取向向上,从而无法与 β -CD形成氢键(⑤). 根据酶活性与氢键的形成之间的关系,我们也可解释为何 Ado 上的腺嘌呤碱基被甲氧基取代形成 Rib

后不具酶活性. 此外上述变化也可能使 N 暴露在腔边上, 进入极性较大的环境导致 A_N 增大. 而 A_{H1} 和 A_{H2} 的变化也反映了腺嘌呤碱基被甲氧基取代后呋喃糖环 5 位两个 H 的空间取向的改变.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号:29671019)资助项目.

参 考 文 献

- 1 陈慧兰. 辅酶 B₁₂及其模型化合物. 化学通报, 1989, (6): 1
- 2 Dolphin D. B₁₂. Wiley: New York, 1982. 1: chap. 11 and chap. 12
- 3 张建中, 赵保路. 自旋捕集技术及其应用. 化学通报, 1988, (1): 27
- 4 陈慧兰, 钱 钺, 陈冠菁, 等. 辅酶 B₁₂模型化合物的研究——④ 自旋捕集 ESR 法鉴定 RCo(salen)L 溶液中的烷基自由基. 科学通报, 1990, 35(14): 1 070~ 1 073
- 5 Perb M J. Radical Chemistry. New York: 1994. 65
- 6 Lagercrantz C. Spin Tripping of Some Short-Lived Radicals by the Nitroxide Method. J Phys Chem, 1971, 75(22): 3 466~ 3 475
- 7 Stowell C. tert-Alkyl Nitroso Compounds: Synthesis and Dimerization Equilibria. J Org Chem, 1971, 36: (20): 3 055~ 3 057
- 8 Okazaki M, Kuwata K. Anisotropic Rotational Diffusion of Di-tert-butyl nitroxide in the Inclusion Complex of β -Cyclodextrin in Aqueous Solution. J Phys Chem, 1984, 88: 4 181~ 4 184
- 9 Yan H, Chen H, Qian Y, et al. The First Study on 2', 5'-Dideoxynucleosidyl Radicals Formed from the Anaerobic Photolysis of 2', 5'-Dideoxynucleosidylcobalamins by the ESR Spin-Tripping Technique. J Inorg Biochem, 1994, 56: 265~ 271
- 10 Kotake Y, Janzen E G. Recognition Ability of Cyclodextrin for Alkyl Group in Nitroxides as Studied by Electron Spin Resonance. J Am Chem Soc, 1989, 111: 2 066~ 2 070
- 11 Calafat A M, Toka S, Puckett J M, et al. Structural and Electronic Similarity but Functional Difference in Methylmalonyl-CoA Mutase Between Coenzyme B₁₂ and the Analog 2' 5' Dideoxynucleosylcobalamin. Biochemistry, 1995, 34(43): 14 125~ 14 130

(1997_07_09 收稿, 1997_12_12 收修改稿)

用锥形量热仪研究 Cu_2O 和 MoO_3 对 PVC 阻燃抑烟的作用

李 斌^④ 王建祺^{*} 张爱英^④

(东北林业大学化学系, 哈尔滨 150040; ④北京理工大学国家阻燃材料研究实验室, 北京 100081. * 联系人)

摘要 大量的研究工作表明 Cu_2O 及 MoO_3 对 PVC 具有明显的阻燃, 特别是抑烟的效果, 锥形量热仪(Cone)是新一代的量热手段之一, 可以同时给出多种热及烟的参数, 对材料在实际火情中的行为具有重要的实用和理论价值. 结合常规的热失重(TGA)实验对 PVC 在空气存在条件下的热降解、阻燃和抑烟过程进行了简要分析和报道.

关键词 锥形量热仪 聚氯乙烯 阻燃 抑烟 氧化亚铜 三氧化钼

聚氯乙烯(PVC)燃烧时产生的浓烟严重影响了它的广泛应用和发展. 也是阻燃领域中的重要前沿课题之一. 研究结果表明许多过渡金属化合物, 特别是铜和钼的化合物对 PVC 都有良好的抑烟和阻燃效果^[1], 有关抑烟的微观作用机理已有研究报道^[2~5].