

ESR 自旋稳定化技术在漆酶化学中的应用

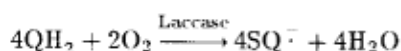
花建丽 宋才生 王光辉¹ 蔡明中(江西师范大学化学系, 南昌 330027; ¹ 武汉大学化学学院, 武汉 430072)

摘要 用 ESR 自旋稳定化技术对十六个儿茶酚类底物的漆酶催化氧化反应进行了 ESR 追踪, 捕获到相应的半醌自由基. 结果表明, ESR 自旋稳定化技术的运用, 开辟了一条在静态条件下用漆酶/O₂ 体系获取高稳态浓度半醌自由基的有效途径.

关键词: 漆酶, 半醌自由基, 儿茶酚类底物, ESR 自旋稳定化技术

愈来愈多的实验结果表明, 半醌自由基与许多重要的生命现象和疾病有密切关系^[1-3]. 随着半醌自由基的研究深入到生命和医学领域, 需要建立各种酶模型来考察在酶存在下半醌自由基的行为, 模拟半醌自由基的生成、衰减及所参与的生理作用. 以往被采用的这类酶模型有过氧化物酶/H₂O₂ 体系^[4]、酪氨酸酶/O₂ 体系^[5] 和黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤体系. 1960 年, Nakamura 采用 ESR 谱仪和连续流动技术, 研究了对苯二酚在漆酶催化下的氧化反应, 首次观察到对苯半醌自由基的生成.

漆酶是以邻、对苯二酚类(QH₂) 为主要底物的多铜氧化酶, 它把底物的单电子氧化反应和氧分子的四电子还原反应偶联起来, 使底物氧化成半醌自由基阴离子(SQ⁻), 分子氧还原成水.



漆酶的单电子转移这一催化特点为半醌自由基的酶法研究提供了有力的手段. 只是由于漆酶催化氧化过程的复杂性和半醌自由基的动力学不稳定性, 难以在静止条件下进行半醌自由基的波谱检测, 至九十年代初, 未见有关报导. 作者先后利用强吸电子基团使孤电子离域稳定半醌自由基^[7]、运用有机溶剂延缓半醌自由基衰减^[8] 二种途径, 建立起了在静态条件下用漆酶/O₂ 体系获取高稳态浓度半醌自由基阴离子的有效方法. 本文介绍采用 ESR 自旋稳定化技术在用该体系获取半醌自由基的研究新进展. 所研究的底物结构式如下:

Comp.	R ¹			R ²			R ³				
	R ¹	R ²	R ³	Comp.	R ¹	R ²	R ³	Comp.	R ¹	R ²	R ³
I	H	C(CH ₃) ₃	H	VII	H	COCH ₃	H	XIII	H	H	C ₁₆ H ₃₁
II	Br	C(CH ₃) ₃	H	VIII	H	COC ₄ H ₉	H	XIV	H	CH ₂ CH ₂ NH ₂	H
III	OCH ₃	C(CH ₃) ₃	H	IX	H	COC ₆ H ₁₇	H	XV	H	CHCH ₂ NH ₂ OH	H
IV	CH ₃	C(CH ₃) ₃	H	X	H	COOCH ₃	H	XVI	H	CHCH ₂ NH OH CH ₃	H
V	C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃	H	XI	H	COOC ₄ H ₉	H				
VI	C(CH ₃) ₃	H	C(CH ₃) ₃	XII	H	COOC ₆ H ₁₇	H				

1998-04-20 收到初稿, 1998-08-25 收到修改稿. 联系人: 花建丽

1 实验部分

1.1 漆酶、试剂与仪器

漆酶来自湖北竹溪漆树漆液, 其分离、纯化和活性测定方法见文献 [7]. 底物盐酸多巴胺为瑞士产品, 底物 (I - XIII) 按文献 [9] 制备, 其它底物 (XV-XVI) 为针剂. 试剂均为分析纯.

检测仪器: JES-FE/XG 电子自旋共振谱仪 (日本电子)

1.2 邻苯半醌自由基阴离子的 ESR 谱测定

将一定量的底物加到某一 pH 值的含抗磁性金属离子 (如 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等) 缓冲液中, 再加入漆酶液, 搅匀后装入 ESR 测定管中, 用电子自旋共振谱仪记录 ESR 信号.

2 结果和讨论

邻苯二酚类底物的漆酶酶催化氧化反应, 在静止条件下用吸收光谱检测, 只能观察到相应邻醌的生成, 没有出现半醌自由基信号, 用电子自旋共振谱仪在静态条件下也未能追踪到邻苯半醌自由基的 ESR 信号. 但当采用 ESR 自旋稳定化技术后 [9], 在抗磁性 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子存在下, 则十分方便地记录到络合的邻苯半醌自由基阴离子的 ESR 谱, 并深入到生命领域研究了儿茶酚胺的半醌自由基及变化情况.

2.1 含叔丁基的邻苯二酚类

这类底物 (I-VI) 酶反应的 ESR 谱图分为两种类型 (如图 1 所示). 一类为两组多重峰, 另一类为强度 1:2:1 的三重峰. 显然两组多重峰是底物 I-V 所生成的邻苯半醌自由基阴离子 1(或 2), 处于自由电子对位苯环上的 1H_4 核和 5 位叔丁基上的 9 个等价 $^1H_{5\beta}$ 核共同参与裂分形成的, 其中 1H_4 核的偶合影响最大. 三重峰的生成则是底物 VI 的邻苯半醌自由基阴离子 3 中自由电子对位苯环上的 1H_4 核和 1H_5 核等价作用的结果, 叔丁基上的 $^1H_{\beta}$ 核未参与裂分.

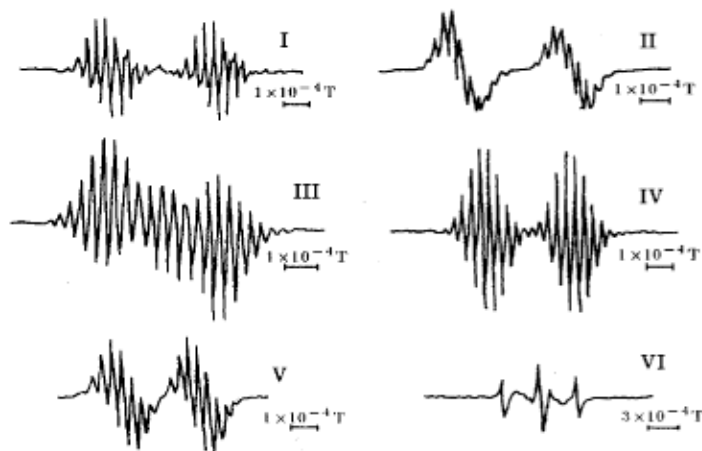
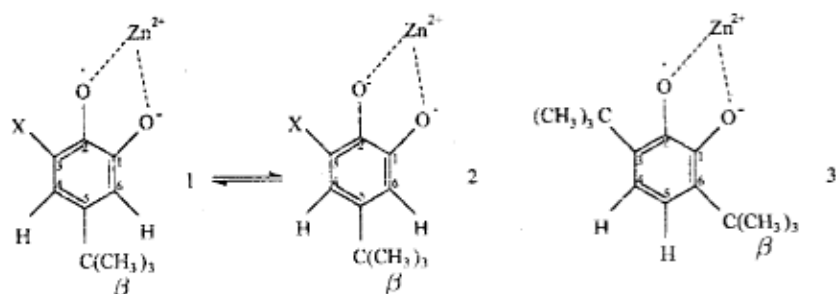


图 1 底物 (I-VI) 在含 Zn^{2+} 的醋酸缓冲液 (pH6.0) 中的漆酶催化氧化下的 ESR 谱

Fig.1 The ESR spectra of Zn^{2+} -complexed semiquinones from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates in acetic acid buffer containing Zn^{2+} (pH6.0)



X=H, Br, OCH₃, CH₃; (CH₃)₃C.

六个半醌自由基阴离子的 ESR 参数见表 1

表 1 漆酶催化氧化底物 (I-VI) 时生成的半醌自由基阴离子的 ESR 参数

Table 1 The ESR parameter of Zn²⁺-complexed semiquinone from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates (I-VI)

Substrates ^{a)}	<i>g</i> ^{b)}	<i>A</i> (1 × 10 ⁻⁴ T)		
I	2.0039	<i>a</i> ₃ =0.330	<i>a</i> ₄ =4.121	<i>a</i> ₅ =0.357(5β)
II	2.0041	<i>a</i> ₄ =4.066	<i>a</i> ₅ =0.305	(5β)
III	2.0034	<i>a</i> ₃ =0.330(β)	<i>a</i> ₄ =2.885	<i>a</i> ₅ =0.330 (5β)
IV	2.0036	<i>a</i> ₄ =0.3214	<i>a</i> ₅ =0.330	(5β)
V	2.0038	<i>a</i> ₄ =2.841	<i>a</i> ₅ =0.357	(5β)
VI	2.0039	<i>a</i> ₄ =3.420	<i>a</i> ₅ =3.420	

a) acetic acid buffer containing Zn²⁺ (pH6.0), b) DPPH as int. standard

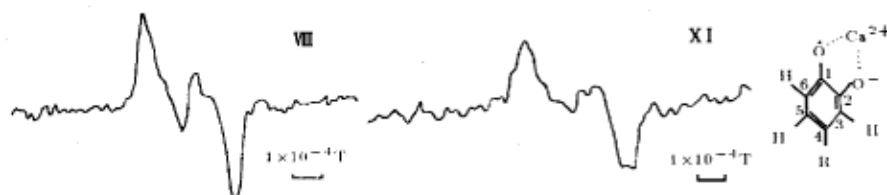


图 2 底物 (VII, XI) 在含 Ca²⁺ 的 Tris 缓冲液 (pH=8.0) 中的漆酶催化氧化下的 ESR 谱

Fig.2 The ESR spectra of Ca²⁺-complexed semiquinones from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates(VII, XI) in Tris-HCl buffer containing Ca²⁺ (pH=8.0)

2.2 含酰基和酯基的邻苯二酚类

这两类底物 (VII - XII) 的酶催化氧化反应的半醌自由基是在加入抗磁性离子 Ca²⁺ 后才追踪到的, 从它们的 ESR 谱看 (如图 2 所示, 分别以 VII、XI 为例), 其超精细裂分结构都表现为两组峰, 显然是由于自由基对位的苯环上 ¹H₅ 核和 ¹H₆ 核参与裂分造成的, 其中 ¹H₅ 核的作用影响最大。

对酰基和酯基邻苯二酚两类底物的酶催化反应的 ESR 测定, 发现只有当它们在 pH 为 8.0 的弱碱性环境中才能捕获到其半醌自由基信号, 这表明与叔丁基儿茶酚不同, 这些底物的疏水化并不能利用漆酶所提供的微环境效应, 使底物能在远低于其一级离解所需的 pH 环境中进行, 而是底物首先要能离解, 以一级离解形式与酶形成复合物, 再经电子转移产生半醌自由基。

2.3 饱和漆酚 (XIII)

饱和漆酚在抗磁性金属 Zn^{2+} 离子存在下, 十分方便地记录到 Zn^{2+} 络合的邻苯半醌自由基阴离子的 ESR 谱, 如图 3 所示. ESR 谱图的超精细裂分结构表现为三组峰, 显然是由于自由基对位的苯环上 1H_4 核和 1H_5 核等价参与裂分造成的. 对生漆成分——饱和漆酚的半醌自由基的首次捕获, 为漆树漆液的氧化成膜机理的确立提供了直接证据.



图 3 底物 (XIII) 在含 Zn^{2+} 的醋酸缓冲液 (pH=6.0) 中的漆酶催化氧化下的 ESR 谱

Fig.3 The ESR spectra of Zn^{2+} -complexed semiquinones from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates(XIII) in acetic acid buffer containing Zn^{2+} (pH=6.0)

2.4 儿茶酚胺类

在此基础上捕获到神经递质 XIV - XVI (多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素) 的半醌自由基, 获取了清晰的 ESR 谱图, 如图 4 所示. 并用 DPPH 作参比, 校正了它们的 g 因子, 在高分辨的范围内, 计算了它们的 A 值, 见表 2.

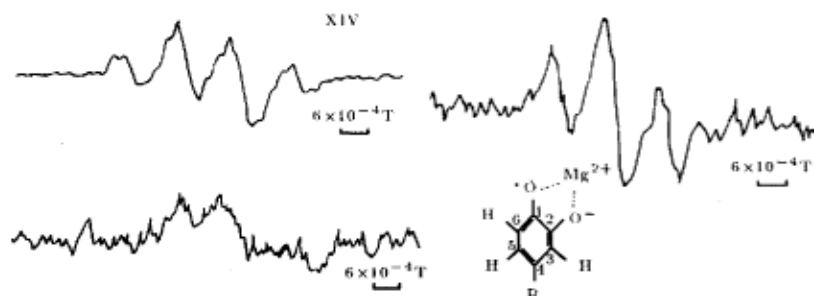


图 4 底物 (XIV - XVI) 在含 Mg^{2+} 的 Tris 缓冲液 (pH=8.0) 中的漆酶催化氧化下的 ESR 谱

Fig.4 The ESR spectra of Mg^{2+} -complexed semiquinones from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates(XIV - XVI) in Tris-HCl buffer containing Mg^{2+} (pH=8.0)

表 2 漆酶催化氧化底物 (XIV - XVI) 时生成的半醌自由基阴离子的 ESR 参数

Table 2 The ESR parameters of Mg^{2+} -complexed semiquinones from the Laccase-catalyzed oxidation of the substrates (XIV - XVI)

Substrates ^{a)}	$g^b)$	A ($1 \times 10^{-4} T$)				
XIV	2.0043	$a_3=0.962$	$a_4=3.388$ (α)	$a_5=3.388$	$a_6=1.648$	
XV	2.0040	$a_3=0.412$	$a_4=3.434$ (α)	$a_5=3.434$	$a_6=0.962$	$a_{OH}=1.923$
XVI	2.0044	$a_3=0.412$	$a_4=2.473$ (α)	$a_5=2.473$	$a_6=0.687$	$a_{OH}=1.648$

a) Tris-HCl buffer containing Mg^{2+} (pH8.0), b) DPPH as int. standard

由这三个 ESR 谱可看出, 底物 XVI 的超精细裂分结构表现为 4 组重峰, 底物 XV、XVI 为 3 组多重峰, 显然是由于处于自由基对位苯环上的 $^1\text{H}_5$ 核和 4 位边链 $^1\text{H}_4$ 核等价参与裂分造成的, $^1\text{H}_3$ 核和 $^1\text{H}_6$ 核影响弱, 不易归属。

以上研究结果表明, 在静态条件下, 十六个底物上的所有取代基都缺乏使半醌自由基具有一定浓度 ($>0.1\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 并保持一定时间 (几秒钟) 的能力, 唯有依靠金属离子的捕获来提高半醌自由基的动力学稳定性。

ESR 自旋稳定化技术的运用, 不仅开辟了一条用漆酶 / O_2 体系获取和研究 α -半醌自由基的有效途径, 它雄辩地证明, 儿茶酚类底物的漆酶催化氧化, 无例外地都要经历半醌自由基的阶段, 而且是酶反应的直接产物; 对多巴胺类神经传感物半醌自由基的捕获, 使利用漆酶 / O_2 体系作为研究生物体内半醌自由基的形成、衰减及生物学效应的酶模型成为可能; 对饱和漆酚半醌自由基的首次捕获, 有利于对漆树漆液的氧化成膜机理的进一步认识。

参 考 文 献

- 1 Ruchart C. *Free Rad. Res. Commun.*, 1987, 2(4-6): 207
- 2 Schreiber J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109(2): 348
- 3 Kalyanaraman B. *J. Biol. Chem.*; 1984, 259(22): 14018
- 4 Kalyanaraman B. *J. Biol. Chem.*; 1986, 259(1): 354
- 5 Van Meanca JMS. *Free Rad. Res. Commun.*, 1988, 4(6): 371
- 6 Kalyanaraman B. *Federation Proc.*, 1986, 45(10): 2477
- 7 Wang Guanghui(王光辉), Jiang Tao(江涛), Zhang Changjun(张昌军). *Wuhan Daxue Xuebao(武汉大学学报)*, 1992(4): 88
- 8 Wang Guanghui(王光辉), Jiang Tao(江涛). *Wuhan Daxue Xuebao(武汉大学学报)*, 1994, (6): 65
- 9 Hua Jianli(花建丽). Master Thesis(硕士学位论文). Wuhan(武汉): Wuhan University(武汉大学), 1991

The application of ESR-spin Stable Technique in Laccase Chemical System

Hua Jianli Song Caisheng Wang Guanghui¹ Cai Mingzhong

(Department of Chemistry, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027; ¹College of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract A method for the effective generation of high steady state concentration of semiquinone radicals was established in laccase/ O_2 system by using ESR-spin stable technique in static condition. The result of ESR demonstrated that the laccase-catalyzed reaction of these substrates underwent the stage of semiquinones.

Keywords: *Rhus vernicifera* laccase, Semiquinone radical, Catechol substrates, ESR-spin stable technique

Received 1998-04-20, revised 1998-08-25. Correspondent: Hua Jianli.