

光声量热法测定辅酶 B₁₂ 光解的焓变和体积变化*

李 刚 罗来斌 陈慧兰

(南京大学化学系, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

傅少伟 张淑仪

(南京大学声学研究所, 近代声学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 用时间分辨的光声量热法研究了辅酶 B₁₂ 的光解反应, 首次测定了脉冲激光诱导辅酶 B₁₂ 光解反应的焓变和反应体积变化, 其值分别为 $131 \pm 12 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $6 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$, 推测该反应体积变化可能与 Co-C 键断裂引起的柔性咕啉环构象变化有关。

关键词: 辅酶 B₁₂, 光声量热, 焓变, 体积变化

辅酶 B₁₂, 即 5'-脱氧腺苷钴胺素 (5'-deoxyadenosylcobalamin) 是具有生物活性的天然有机金属化合物, 作为新陈代谢以及 DNA 合成有关的一系列酶反应的天然辅因子, 在生物体内的多种分子内重排反应及核苷酸还原反应中起重要作用, 其 Co-C 键均裂产生 Co(II) 配合物和 5'-脱氧腺苷自由基是酶催化反应的关键步骤^[1,2]。辅酶 B₁₂ 在光诱导下也发生 Co-C 键均裂, 产物与酶反应相同, 因此研究辅酶 B₁₂ 的光解反应及测定与 Co-C 键离解有关的热力学和动力学数据对其在生物体内的功能以及酶催化反应机理很有意义。过去对于辅酶 B₁₂ 光解的研究主要是测定了反应速率、产物和量子产率^[3-6]等, 而反应的体积变化则未见报导。

时间分辨的光声量热法 (Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry) 简称为光声量热法 (PAC), 是八十年代发展起来的研究脉冲激光诱发的快速光化学反应动力学和热力学性质的一种有效的方法^[7,8]。该方法基于激光脉冲能量被分子吸收后形成亚稳态物质, 其非辐射失活过程在介质中局部产生热量, 由热膨胀 (或收缩) 效应引起的超声波可由声换能器测得。因此, 测量声波振幅的大小可测定光解反应焓变和反应体积变化等。光声量热法适用于研究自由基反应、生物体系的电子传递过程和反应机理等。本文运用光声量热法通过测量不同温度下辅酶 B₁₂ 光解产生的光声信号, 首次同时测得其 Co-C 键均裂的焓变和反应体积变化, 并分析了引起体积变化的原因。

1 实验

1.1 试剂及仪器

辅酶 B₁₂ (Aldrich 产品, 纯度为 99.9%), K₂Cr₂O₇ (AR), 氩气 (纯度为 99%, 质量分数, 下同), Continuum NP70 脉冲激光器, 圆管形压电陶瓷超声换能器 (自制), HP54510B 数字示波器,

1997-10-27 收到初稿, 1998-02-23 收到修改稿, 联系人: 陈慧兰。* 国家自然科学基金资助项目

HP8447F 前置放大器, DigiRad R-752 辐射能量计及控温装置等。

1.2 实验方法

分别将辅酶 B₁₂ 和 K₂Cr₂O₇ 配制在 355 nm 下吸光度 $A=0.20\pm 0.02$ (浓度为 1.80×10^{-5} mol·L⁻¹), pH=6.9 的水溶液, 经氩气除氧后充满两端用石英玻璃作窗口密封的样品池内, 并用恒流泵使溶液在体系中缓慢流动; 脉冲激光 (波长 355nm, 脉冲宽度 8ns, 频率 10Hz) 穿过圆管中心, 在光路上的溶液分子吸收光能而发生化学反应, 由此产生的声压信号由压电换能器转换成电信号, 经放大后传输至数字示波器显示, 最后由计算机进行数据处理。实验装置与已有报导相似^[7,9], 所观察到的光声信号如图 2 所示。实验中接收到的信号的第一个峰值代表被测溶液光声信号的大小。为标定被测样品的非辐射热量, 需选用能在极短时间内 (<10ns) 将所吸收的光能全部转变为热能释放出来的溶液作为参比溶液, K₂Cr₂O₇ 溶液就适合做这样的参比。

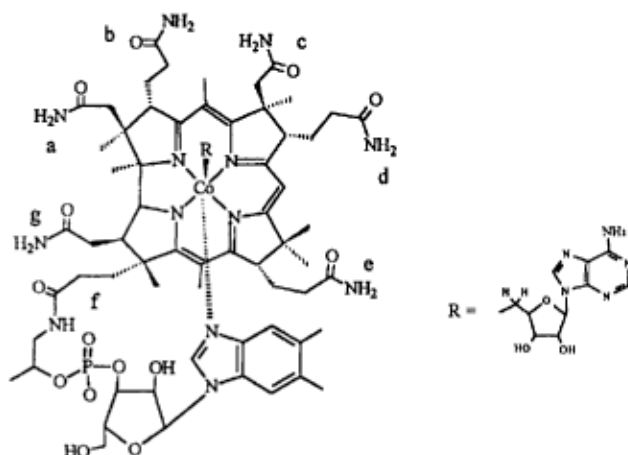


图 1 辅酶 B₁₂ 的结构示意图

Fig.1 The structure of 5'-deoxyadenosylcobalamin

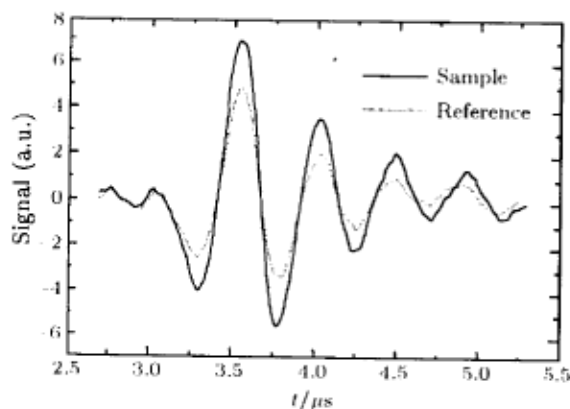


图 2 实验所得光声信号的波形

Fig.2 Experimental waveforms of PAC signals in aqueous solution at 8 °C

2 结果和讨论

2.1 辅酶 B₁₂ 的光解反应

辅酶 B₁₂ 在中性水溶液中绝大部分以 base-on 形式存在^[10], 即轴向 5'-脱氧腺苷基反位的二甲基苯并咪唑碱与 Co(III) 配位。辅酶 B₁₂ 对光极为敏感, 其光解过程中 Co-C 键的均裂可能经历激发态 (*Co,C) 和自由基对 (Co,C)_[geminate pair] 中间体等多个过程, 产生 B_{12r} (即 Co(II) 配合物) 和 5'-脱氧腺苷自由基 (以 C· 表示), 如图 3 所示。辅酶 B₁₂ 在 307.2 K 时光解速率为 10^8-10^9 s⁻¹^[10], 产生的自由基寿命比所用的换能器的响应时间长, 适用于光声量热方法的研究。

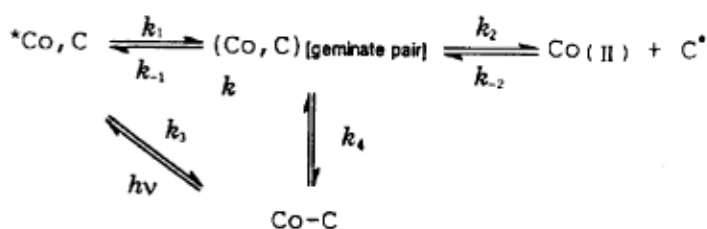


图 3 辅酶 B₁₂ 的光解过程
Fig.3 Photolysis of AdoCbl

2.2 辅酶 B₁₂ 光解过程的光声效应

辅酶 B₁₂ 光解过程中产生的光声信号 S_s 可由两部分组成, 一是由非辐射热释放引起的体积变化 (ΔV_{th}) 产生的声压信号; 二是由反应分子的体积变化 (ΔV_r) 带来的声压信号. 后者可能是由于键的生成与断裂、分子构象变化和溶剂的电致伸缩效应等引起的 [7], 因此光声信号 S_s 可表示为:

$$S_s = K(\Delta V_{th} + \Delta V_r) \quad (1)$$

式中 K 是仪器常数. 由非辐射热释放 E_{th} 引起的体积变化 ΔV_{th} 可表示为:

$$\Delta V_{th} = E_{th}(\beta/C_p\rho) \quad (2)$$

式中 β 是溶液的热膨胀系数, C_p 为定压比热容, ρ 是溶液的密度. 辅酶 B₁₂ 光解过程中, Co-C 键断裂反应的热转换效率 α_s 为辅酶 B₁₂ 吸收的光能转化为热能的比例, 即

$$\alpha_s = E_{th}/E_{h\nu} \quad (3)$$

$E_{h\nu}$ 是分子吸收的光子能量, 因此 S_s 可写成:

$$S_s = K[\alpha_s E_{h\nu}(\beta/C_p\rho) + \Delta V_r] \quad (4)$$

对 $K_2Cr_2O_7$ 参比溶液而言, 其光声信号 S_{ref} 只由非辐射热释放引起的体积变化产生, 且其吸收的光子能量完全以热的形式快速释放出来 (即 $\alpha_{ref} = 1$)

$$S_{ref} = K E_{h\nu}(\beta/C_p\rho) \quad (5)$$

由 (4) 和 (5) 式, 得声波振幅的比值,

$$\phi = S_s/S_{ref} = \alpha_s + \Delta V_r[(C_p\rho)/(\beta E_{h\nu})]$$

整理得

$$\phi E_{h\nu} = \alpha_s E_{h\nu} + \Delta V_r(C_p\rho/\beta) \quad (6)$$

2.3 辅酶 B₁₂ 光解过程中的焓变和反应体积变化

根据 (6) 式在相同的脉冲激光能量的照射下, 分别测量参比溶液 ($K_2Cr_2O_7$ 溶液) 和样品溶液 (辅酶 B₁₂ 溶液) 在不同温度下 (7 ~ 25 °C 的 7 个温度点) 的光声信号, 并进行能量归一化, 再求

出溶液在相应温度下的 $C_p\rho/\beta$ 值^[11]。在水溶液中, 热膨胀系数 β 随温度的改变有明显变化, 如 4 °C 时 $\beta \approx 0$, 25 °C 时 $\beta = 2.8 \times 10^{-4} \text{K}^{-1}$, 则将不同温度下的 $\phi E_{h\nu}$ 值与对应的 $C_p\rho/\beta$ 值作图, 得到如图 4 所示的一条直线, 其斜率为 ΔV_r , 即辅酶 B₁₂ 光解反应的体积变化。该直线截距为 $\alpha_S E_{h\nu}$, 其物理意义为辅酶 B₁₂ 吸收 355nm 的光能后释放出来的非辐射热量。考虑量子产率 ϕ , 辅酶 B₁₂ 光解 Co-C 键断裂反应焓变

$$\Delta H_R = E_{h\nu}(1 - \alpha_S)/\phi \quad (7)$$

由图 4 及式 (7), 且考虑到辅酶 B₁₂ 溶液在 355nm 光解的量子产率为 0.23 ± 0.03 ^[6], 以及 $E_{355} = 336.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 我们测得了辅酶 B₁₂ 光解反应的焓变 ΔH_R 为 $131 \pm 12 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 反应体积变化 ΔV_r 为 $6 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

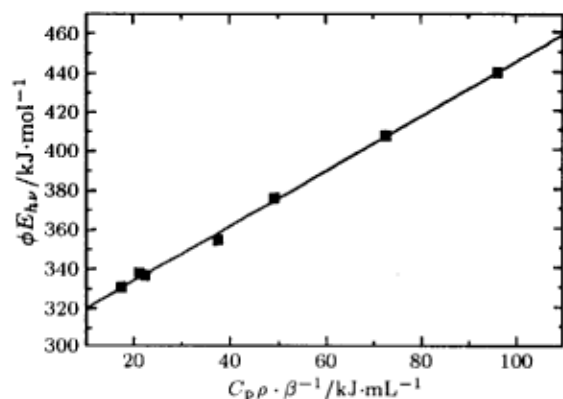


图 4 辅酶 B₁₂ 的 $\phi E_{h\nu}-C_p\rho/\beta$ 关系图

Fig.4 Plots of $\phi E_{h\nu}$ vs $C_p\rho/\beta$ for AdoCbl

脱氧腺苷基之间的位阻相互作用, 致使 Co-C 键伸长, Co-C α -C 键角增大。X 衍射晶体结构数据表明, Co-C 键长为 205pm, 比一般 Co-R 键稍长, 其 Co-C α -C 键角为 125°, 远大于正四面体的 109.5°^[12], 这种相应形变将导致 5'-脱氧腺苷基和咕啉环之间产生扭变能, 一方面使得 Co-C 键变得不稳定, 容易断裂, 另一方面, 当 Co-C 键断裂后, 轴向 5'-脱氧腺苷基配体离开中心离子, 咕啉环“向上折叠”(upward folding), Co(II) 离子略向下偏移, 使得咕啉环构象发生较大的变化, 这也由 X 衍射晶体结构得以证实: 辅酶 B₁₂ 中咕啉环的折叠角为 13.3°, B_{12r} 中咕啉环的折叠角为 16.3°^[13]。因此, 辅酶 B₁₂ 在光解发生 Co-C 键断裂过程中, 反应体积变化与上述咕啉环构象变化有关。

2.4 讨论

辅酶 B₁₂ 是以 Co(III) 为中心离子的配合物, 其赤道配体为类咕啉化合物, 由于它的不饱和程度低, 所以与卟啉环相比, 咕啉环刚性小, 柔性大, 易发生构象变化, 而且构象与环上的取代基有关^[1]。辅酶 B₁₂ 中 Co(III) 和 5'-脱氧腺苷基之间存在直接的金属-碳键, 其 Co-C 键的形成与解离是辅酶 B₁₂ 的重要性质, 也是发挥其生物功能的基础。在酶反应中, 与辅酶 B₁₂ 键合的酶蛋白诱导了咕啉环折叠运动, 进一步增加了咕啉环上取代基与 5'-

参 考 文 献

- 1 Dolphin D. ed. B₁₂, New York: J. Wiley & Sons, 1982, Vol.1, p369
- 2 Halpern J. *Science*, **1985**, **227**:869
- 3 Pratt J M. *Inorganic Chemistry of VB₁₂*, Chapt.14, London: Academic Press, **1972**,163
- 4 Taylor R, Smucker L, Hanna M L, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1973**, **156**:521
- 5 Endicott J, Netzel T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, **101**:4000
- 6 Chen E, Chance M R. *J. Bio. Chem.*, **1990**, **256**:12987

- 7 Peters K S, Snyder G J. *Science*, **1988**, **241**:1053
- 8 Braslavsky S E, Heibel G E. *Chem. Rev.*, **1992**, **92**:1381
- 9 Fu S W, Zhang S Y, Chen H L, *et al.* *IEEE Ultras. Sym. Proc.*, **1995**:859
- 10 a) Chemaly S M, Pratt J M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1980**:2259
b) Martin B D, Finke R G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, **114**:585
- 11 Weast R C. ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 67th ed., Florida: CRC Press, 1986-87, F-4, F-5.
- 12 Savage H F J, Lindley P F, Finney J L. *Acta. Cryst.*, **1987**, **B43**:280
- 13 Krautter B, Keller W, Kratky C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**:8938

Determination of Enthalpy and Volume Changes in Photolysis of Coenzyme B₁₂ Using Photoacoustic Calorimetry*

Li Gang Luo Laibin Chen Huilan

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Fu Shaowei Zhang Shuyi

(Laboratory of Modern Acoustics and Institute of Acoustics, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract The photolysis of coenzyme B₁₂ (5'-deoxyadenosylcobalamin, AdoCbl) at 355nm in aqueous solution is investigated by Photoacoustic Calorimetry (PAC). Both enthalpy and reaction volume change for this photoinitiated reaction have been determined to be $131 \pm 12 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $6 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. It can be suggested that the reaction volume change is related to the conformational change of corrin ring which accompanies the homolytic cleavage of the cobalt-carbon(Co-C) bond.

Keywords: Coenzyme B₁₂, Photoacoustic calorimetry, Enthalpy, Volume change

Received 1997-10-27, revised 1998-02-23. Correspondent: Chen Huilan. * The Project Supported by NSFC