

Vitamin K₁ 在水 - 有机溶剂中单电子还原电位的测定*

陈家富 储高升 葛学武 张志成 姚思德¹

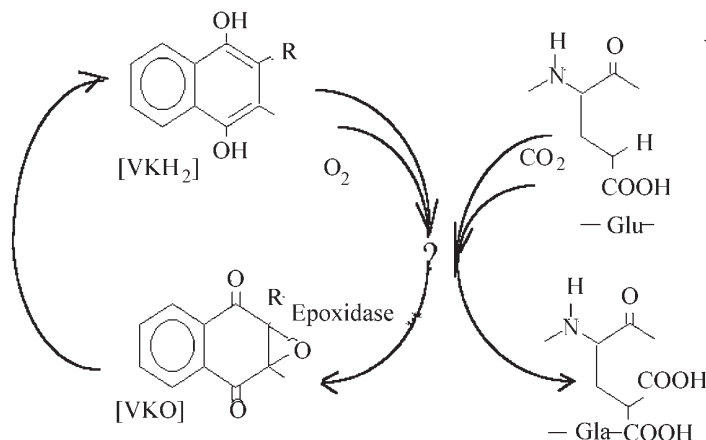
(中国科学技术大学应用化学系, 合肥 230026;

¹ 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)

关键词: Vitamin K₁, 单电子还原电位, 脉冲辐解

学科代码: B030606

Vitamin K₁ (VK₁) 是一种非常重要的脂溶性维生素, 其止血功能已为人们所熟悉. 下图显示在生物体内 VK 参与的止血过程, 在这个氧化还原循环过程中, VKH₂ 环氧化变成 VKO 与 -Glu- (谷氨酸蛋白) 羧化而转变成 -Gla- (γ-羧基谷氨酸蛋白) 是同时发生的, 但前一过程对后一过程有什么贡献至今还不清楚. VK₁ 除了参与止血过程以外, 还是许多重要生化过程中不可缺少的辅助因子, 如: 蛋白质 C、M、S 及 Z 与骨钙的联结依赖 VK₁ 的活化作用. 在生物膜的电子传递系统内, VK₁ 与 UQ (泛醌) 一样都是氧化还原过程的主要成分, 最新的观点认为 VK₁ 与 α-tocopherol (即 Vitamin E) 一样都是优良的抗脂质过氧化剂, 这当然与它的萘醌结构有关^[1, 2]. 作者曾采用脉冲辐解技术对 VK₁ 在水 - 异丙醇 - 丙酮混合溶剂中的动态吸收光谱和动力学进行过较详细的研究^[3]. 本文采用甲基紫精作为参比物, 测定了 VK₁ 分别在水 - 异丙醇 - 丙酮混合溶剂氮气饱和的磷酸盐缓冲溶液体系及水 - 异丙醇混合溶剂 - 氧化二氮除氧的磷酸盐缓冲溶液体系中的单电子还原电位, 两体系均为 pH = 7. 该测定有助于了解 VK₁ 得失电子能力的强弱, 为揭示其诸多功能提供重要的参考信息.



1999-01-28 收到初稿, 1999-03-22 收到修改稿. 联系人: 陈家富. * 中国科学院辐射化学开放实验室资助项目

1 实验部分

1.1 实验试剂

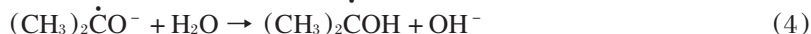
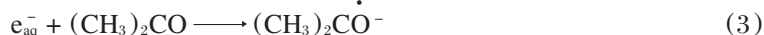
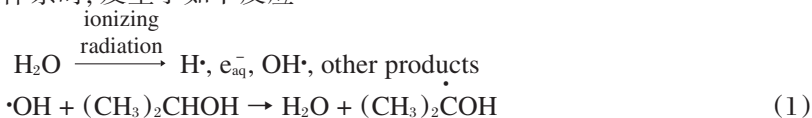
VK₁ 为 Merck(美国)公司产品, 未经纯化直接使用, 异丙醇、丙酮为上海试剂公司产品, 分析纯, 使用前经蒸馏纯化. 磷酸盐为上海试剂公司产品, 分析纯, 经三次蒸馏水重结晶后使用. 甲基紫精(MV²⁺)为 Aldrich 公司产品. 实验选用 NaOH、HClO₄ 和磷酸盐来调节溶液的 pH 值. N₂ 和 N₂O 均为 99.99% (V/V)的高纯气体. 所使用的水均为三次蒸馏水, 水蒸出与辐照时间间隔不超过 24h.

1.2 实验装置

实验是在纳秒级脉冲辐解动态吸收光谱装置上进行. 脉冲辐解实验所用的加速器能量为 8MeV、电子脉冲宽度为 8ns、脉冲电流 2~3A. 使用空气饱和的 1×10⁻²mol·dm⁻³的 KSCN 溶液进行单脉冲剂量的标定, 辐照产生的 (SCN)₂⁻ 的产额 G_{(SCN)₂⁻} = 2.9, 它在 480nm 处的摩尔吸光系数为 7600 dm³·mol⁻¹·cm⁻¹. 本实验单脉冲剂量 5~40Gy(可调). 其详细性能及实验操作方法参见有关文献^[4,5].

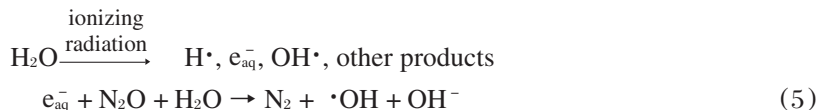
1.3 实验方法

(1)由 30.2 mol·dm⁻³的水、5 mol·dm⁻³异丙醇和 1 mol·dm⁻³丙酮组成混合溶剂体系, 电子脉冲辐照 N₂ 饱和的该体系时, 发生了如下反应^[6]



脉冲辐解最终形成的只是单一的具有还原性的活性粒子(CH₃)₂·COH, 因此, 主要考虑活性粒子(CH₃)₂·COH 与研究的目标基质作用, 从而大大简化研究过程.

(2)N₂O 饱和的水 - 异丙醇体系. 电子脉冲辐照该体系时, 体系发生了如下反应,



辐解产生也只是单一的具有还原性的活性粒子(CH₃)₂·COH.

VK₁ 单电子还原电位的测定则采用动力学分析方法, 选择甲基紫精作为参比物.

2 结果与讨论

2.1 VK₁ 在水 - 异丙醇 - 丙酮混合溶剂中的脉冲辐解研究

图 1 为 N₂ 饱和的 0.05 mmol·dm⁻³VK₁, pH = 1 的混合溶剂体系经脉冲辐解后得到的瞬态吸收光谱. 谱图显示, 脉冲辐照 10μs 后 370nm 处出现最大吸收峰, 直到 50μs 后吸收才达到最大. 当观察时间小于 10μs 时, 很难看清 370nm 处的吸收峰, 表明 370nm 处的瞬态粒子形成过程较慢. 将 370nm 的吸收峰归为 VK₁ 的加氢自由基: VK₁H·; 因为酸性条件下, 辐解产生

的 $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{OH}$ 将 VK_1 还原为 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 。图1插图给出了 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 第一半生长期 $t_{1/2}$ 与吸收剂量的关系,可见, $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 的 $t_{1/2}$ 与吸收剂量大小基本无关,即 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 形成过程是表观一级反应。 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 的形成过程可表示为:

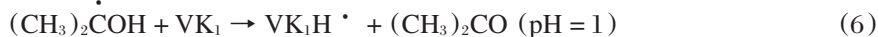


图2为 N_2 饱和的 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{VK}_1$, $\text{pH} = 7$ 的磷酸缓冲混合溶剂体系经电子脉冲辐照后得到的瞬态吸收光谱。光谱图显示,电子脉冲 $10 \mu\text{s}$ 后,在 390 nm 处开始出现最大吸收峰,到 $70 \mu\text{s}$ 后吸收达到最大值。可以判定 390 nm 附近的吸收峰归属 VK_1 阴离子自由基即 $\text{VK}_1^- \cdot$ 。因为近中性范围内,辐解产生的 $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{OH}$ 将 VK_1 还原为 $\text{VK}_1^- \cdot$ (因为 VK_1 加氢自由基 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 的 pK_a 为 5.4 ± 0.1)。图2插图给出了 $\text{VK}_1^- \cdot$ 第一半生长期 $t_{1/2}$ 与吸收剂量的关系,与 $\text{VK}_1\text{H}^\bullet$ 的形成过程相类似, $\text{VK}_1^- \cdot$ 的形成过程也属表观一级反应。的形成过程可表示为:

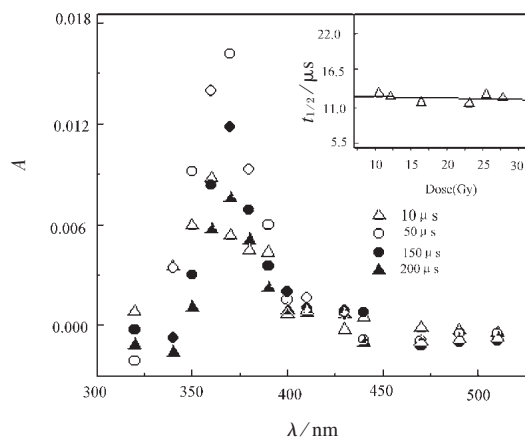
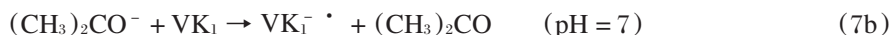
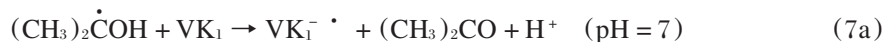


图1 电子脉冲辐照氮气饱和的水-异丙醇-丙酮混合溶剂体系瞬态吸收光谱

Fig. 1 Transient absorption spectra observed in the pulse radiolysis of N_2 -saturated water-isopropanol-acetone

$5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{VK}_1$, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_2\text{SO}_4$

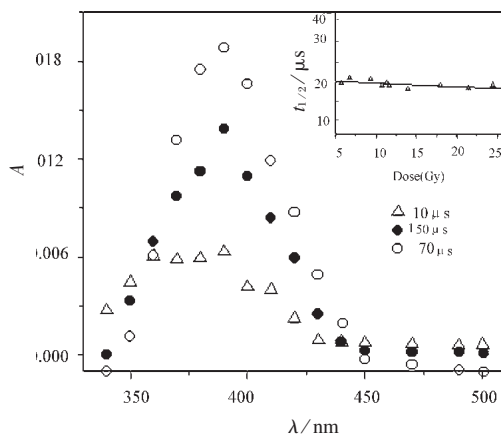


图2 电子脉冲氮气饱和的水-异丙醇-丙酮混合溶剂体系瞬态吸收光谱

Fig. 2 Transient absorption spectra observed in the pulse radiolysis of N_2 -saturated water-isopropanol-acetone

$5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{VK}_1$, $\text{pH} = 7$ phosphate buffer

2.2 VK_1 在水-异丙醇混合溶剂的脉冲辐解研究

图3为 N_2O 饱和的 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{VK}_1$, $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 异丙醇, $\text{pH} = 7$ 磷酸缓冲水溶液经电子脉冲辐照后得到的瞬态吸收光谱。谱图显示,电子脉冲 $15 \mu\text{s}$ 后 390 nm 附近开始出现最大吸收峰,在 $0 \mu\text{s} \sim 300 \mu\text{s}$ 范围内该最大吸收一直在增加(图3插图示),表明 390 nm 附近形成的瞬态粒子很稳定。 390 nm 附近的吸收峰为 VK_1 的阴离子自由基即: $\text{VK}_1^- \cdot$ 。因为近中性范围内,辐解产生的 $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}\text{OH}$ 将 VK_1 还原为 $\text{VK}_1^- \cdot$,这一结果与前面所得结果恰好一致。研究表明:随吸收剂量的增大, $\text{VK}_1^- \cdot$ 的第一半生长期 $t_{1/2}$ 减小,表明 $\text{VK}_1^- \cdot$ 的形成过程是一个二级

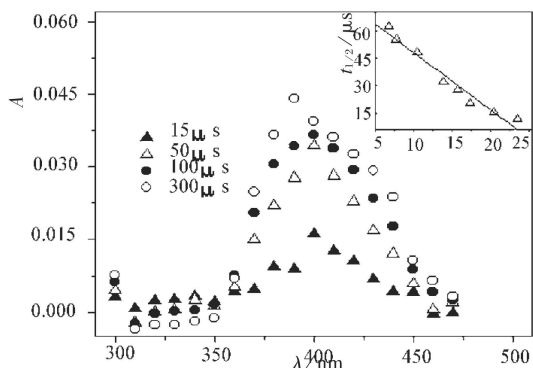


图3 电子脉冲辐照一氧化二氮饱和的水-异丙醇体系的瞬态吸收光谱

Fig. 3 Transient absorption spectra observed in the pulse radiolysis of N_2O -saturated water-isopropanol solution

$5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} VK_1$, $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ isopropanol, pH = 7 phosphate buffer

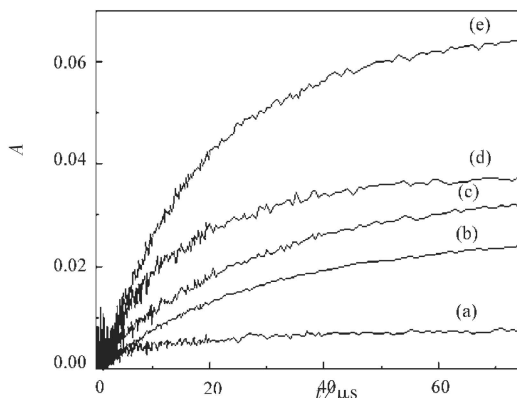


图4 $VK_1 \cdot^-$ 在 390nm 处的动力学生成曲线

Fig. 4 The kinetic curves of formation of $VK_1 \cdot^-$

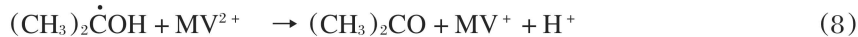
N_2O -saturated solution, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} MV^{2+}$, $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ isopropanol, pH = 7 phosphate buffer
 $C_{VK_1} / \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$: (a) 0, (b) 0. 01, (c) 0. 015, (d) 0. 02, (e) 0. 03 recorded at 390nm

反应,这与 $VK_1 \cdot^-$ 在前一体系的生成行为不同,原因目前尚不明瞭,有待进一步研究,我们认为其原因之一可能是由于溶剂的影响.

2.3 脉冲辐解法测定 VK_1 单电子还原电位

2.3.1 VK_1 与 MV^+ 之间的单电子转移

辐照产生的异丙醇自由基 $(CH_3)_2\dot{C}OH$ 与溶质发生单电子转移反应,由于浓度的差异, $(CH_3)_2\dot{C}OH$ 首先与 MV^{2+} 反应形成 MV^+ ,接着 VK_1 从 MV^+ 夺取电子完成电子转移反应



2.3.2 VK_1 单电子还原电位的测定

在选定的检测波长 390nm 处, MV^+ 的吸收很小(其最大吸收在 340nm、580nm)而 $VK_1 \cdot^-$ 有最大吸收,因而可以直接观察 $VK_1 \cdot^-$ 的生成过程,进而可以求出反应(9)的表观速率常数 k_{app} . 通过改变 $[VK_1] / [MV^{2+}]$ 的浓度比,以 $k_{app} / [MV^{2+}]$ 对 $[VK_1] / [MV^{2+}]$ 作图得到一条直线,直线的斜率是 k_t ,截距是 k_b ,由此可计算出电子转移反应(9)的平衡常数 K :

$$K = k_t / k_b \quad (10)$$

VK_1 的单电子还原电位计算式为

$$E^1(VK_1 / VK_1 \cdot^-) = E^1(MV^{2+} / MV^+) - RT \ln K / F \quad (11)$$

其中 $E^1(VK_1 / VK_1 \cdot^-)$, $E^1(MV^{2+} / MV^+)$ 分别为 VK_1 和 MV^{2+} 的单电子还原电位,在水-有机混合溶液体系中, MV^{2+} 单电子还原电位为 $-330 \text{ mV}^{[7,8]}$.

(I) VK_1 在水-异丙醇一氧化二氮除氧的体系

图4是 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} MV^{2+}$ 、 $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 异丙醇、不同浓度的 VK_1 、 N_2O 饱和的磷酸缓

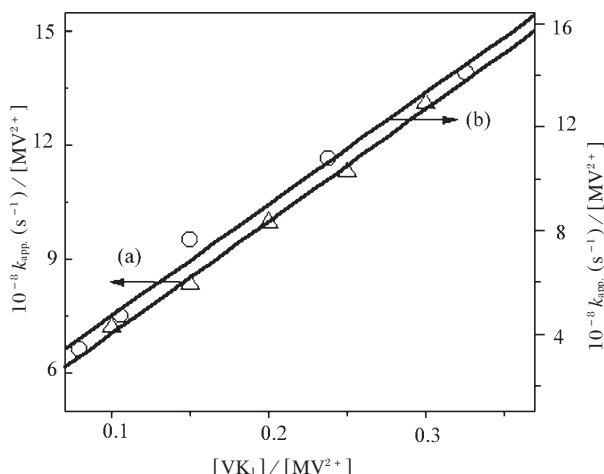


图5 以 $k_{app}/[MV^{2+}]$ 对 $[VK_1]/[MV^{2+}]$ 作图
 Fig. 5 Plot of $k_{app}/[MV^{2+}]$ vs. $[VK_1]/[MV^{2+}]$.
 (a) in water-isopropanol N_2O -saturated system,
 (b) in water-isopropanol-acetone N_2 -saturated system.

冲溶液 ($pH = 7$) 经电子脉冲作用后在 $390nm$ 的动力学生成曲线, 由于甲基紫精电子加合物在 $390nm$ 的吸收很小, 而 $VK_1^{\cdot -}$ 在 $390nm$ 处的吸收很大, 所以观察到的动态吸收曲线实际上是 $VK_1^{\cdot -}$ 的生成曲线. 通过该生成曲线及实验室自编的计算机程序, 可直接求出电子转移反应的表现形成速率常数 k_{app} , 图 5(a) 是以 $k_{app}/[MV^{2+}]$ 对 $[VK_1]/[MV^{2+}]$ 作图得到的, 由图中的直线可以确定: $k_f = 2.95 \times 10^9 dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, $k_b = 4.10 \times 10^8 dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ 即 $K = 7.20$, 故 $E^1(VK_1/VK_1^{\cdot -}) = -279 mV$.

由于电子转移反应(9)中, 反应物之一 VK_1 不带电荷, 故不必考虑离子强度的影响.

(II) VK_1 在水 - 异丙醇 - 丙酮氮气饱和的体系

以 $0.2 mmol \cdot dm^{-3} MV^{2+}$, 不同浓度的 VK_1 , 混合溶剂 ($30.2 mol \cdot dm^{-3}$ 的水、 $5 mol \cdot dm^{-3}$ 异丙醇和 $1 mol \cdot dm^{-3}$ 丙酮) N_2 饱和的磷酸缓冲 ($pH = 7$) 溶液经电子脉冲作用后观察 $390nm$ 处瞬态粒子的生成曲线, 类似上述的数据处理方法和步骤, 得到图 5(b), 该体系的有关数据为: $k_f = 3.79 \times 10^9 dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, $k_b = 3.06 \times 10^8 dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$, $K = 12.4$, $E^1(VK_1/VK_1^{\cdot -}) = 266 mV$.

基于同样的分析, 不必考虑离子强度对 $E^1(VK_1/VK_1^{\cdot -})$ 的影响.

3 结论

采用纳秒级脉冲辐解技术, 研究了异丙醇自由基 $(CH_3)_2\dot{C}OH$ 与 VK_1 的作用过程. 研究表明: 在不同 pH 条件下 VK_1 的还原产物分别以两种形式存在, 即 VK_1H^{\cdot} ($pH < 5.4$) 和 $VK_1^{\cdot -}$ ($pH > 5.4$), 它们的最大吸收峰分别位于 $370nm$ 和 $390nm$. 用甲基紫精 (MV^{2+}) 作参比物, 分别在水 - 异丙醇 - 丙酮混合溶剂氮气除氧的磷酸盐缓冲溶液 $pH = 7$ 体系及水 - 异丙醇 - 氧化二氮除氧的磷酸盐缓冲溶液 $pH = 7$ 体系中, 测得 VK_1 的单电子还原电位分别为 -266 和 $-279 mV$.

参考文献

- 1 Dowd P, Ham S W, Geib S J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, **113**: 7734
- 2 Fackir L, Jore D, Albert M G. *Radiat. Res.*, **1995**, **141**: 82
- 3 Chen J F, Yao S D, Chu G S, et al. *Radiat. Phys. Chem.*, **1998**, **53**: 161
- 4 Chen Jiafu, Yao Side, Chu Gaosheng, et al. *Chemical Journal of Chinese Universities*, **1997**, **18**: 2004; 陈家富, 姚思德, 储高升

- 等. 高等学校化学学报 (*Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*), **1997**, **18**: 2004
- 5 Yao S D, Sheng S S, Cai J H. *Radiat. Phys. Chem.*, **1995**, **46**(1): 105
- 6 Pal H, Mukherjee T, Mittal J P. *Radiat. Phys. Chem.*, **1994**, **44**(1): 603
- 7 Wardman P. *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, **1989**, **18**(4): 1637
- 8 Pal H, Palit D K, Mittal J P. *Radiat. Phys. Chem.*, **1992**, **40**: 529

Determination of One-Electron Reduction Potential of Vitamin K₁ in Mixed Solvent*

Chen Jiafu Chu Gaosheng Ge Xuewu Zhang Zhicheng Yao Side¹

(*Department of Applied Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026,*

¹Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Science, Shanghai 201800)

Abstract The reaction process of VK₁ and isopropanol radical has been investigated by using pulse radiolytical technique. It has been found that the reduction states of VK₁ exist in two forms under different pH conditions, that are VK₁H[•] (pH < 5.4) and VK₁^{-•} (pH > 5.4), their maximum absorption peaks are 370 nm and 390 nm respectively. Selecting MV²⁺ as the reference, the one-electron reduction potential of VK₁ in N₂-saturated aqueous-isopropanol-acetone mixed solvent and in N₂O-saturated water-isopropanol has been determined as -266 and -279mV respectively.

Keywords: Vitamin K₁, One-electron reduction potential, Pulse radiolysis

Received 1999-01-28, revised 1999-03-22. Correspondent: Chen Jiafu * The Project Supported by Open Laboratory of Radiation Chemistry, Chinese Academy of Science