

研究工作

藻红胆素二甲酯的溶液构型分析

马金石 方 娟 孙贤育

(中国科学院感光化学研究所, 北京)

藻红胆素是藻红蛋白的发色团, 属于胆二烯 a, b 类的线型四吡咯化合物。藻红蛋白是红藻、蓝绿藻中的天线色素, 它首先接收太阳光, 然后将激发能量传递给藻蓝蛋白→别藻蓝蛋白→叶绿素 a, 到达光合作用反应中心, 这个过程效率可达 90% 以上^[1]。这种高效率与藻胆色素在蛋白中的构型、构象有关, 因此研究藻红胆素及其衍生物的空间结构、热化学和光化学性质, 以及在溶液中的结构特征等, 有助于我们搞清它在蛋白中的立体结构和这种结构在能量传递中的作用。

我们从采集的红藻——多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 中提取出了藻胆蛋白, 并用化学方法离析出藻红胆素, 制成二甲酯(图 1), 然后对其质子化产物从吸收光谱、¹H 核磁共振波谱等方面进行研究, 除阐明其光谱特征外, 对其在构型上的变化也进行了分析, 认为在质子化的同时, 在 C—10 位上可能伴随着一个从 Z 型到 E 型的构型变化。

材 料 和 方 法

多管藻采自山东省青岛市海滨。吸收光谱仅为岛津 202 型分光光度计。核磁共振仪为

Varian XL-400 FT 型。有机溶剂和重氢试剂均

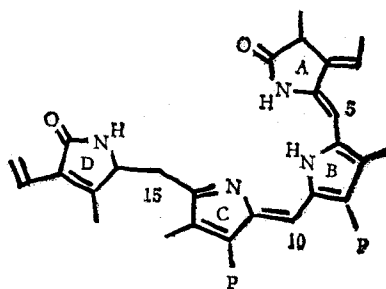


图 1 藻红胆素 ($P = CH_2CH_2COOH$) 和藻红胆素二甲酯 ($P = CH_2CH_2COOCH_3$) 的结构式

为北京化工厂产品, 除注明外, 均未经进一步纯化。光化学实验使用 450 瓦中压汞灯, 滤光片透过范围大于 510 nm。

藻红胆素二甲酯的制备, 参考文献 [2] 并有所改进。酯化后的藻红胆素以四氯化碳/乙酸乙酯 (2/1) 为展开体系, 用硅胶薄层层析进行分离, 将 R_f 值为 0.48 和 0.36 的两条红带分别刮下来后, 用比例为 20/1 的氯仿/甲醇溶解萃取, 真空低温旋转蒸发至干, 然后再用同样薄层层析方法提纯一次, 分别得到 5.4 毫克和 6.9 毫克。它们是藻红胆素二甲酯的两个构型异构体(图 2)。

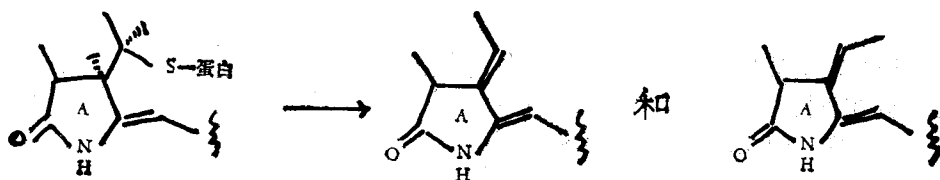


图 2 藻红胆素从蛋白上断裂下来时产生的两个构型异构体

结果和讨论

1. 核磁共振氢谱

藻红胆素通过硫醚键将环A的乙烯基同藻红蛋白上的半胱氨酸残基相连。用沸腾甲醇处理时,硫醚键断裂,在环A的C-3位上产生环外双键,当消除反应进行时这个环外双键可以形成Z型和E型(图2),这可能是得到两个藻红胆素二甲酯的原因,正如 Rüdiger^[3]等用铬酸氧化得到Z和E型两种2-亚乙基-3-甲基丁二酰亚胺一样。这两种藻红胆素二甲酯核磁共振氢谱数据是基本上一致的(表1)。

关于藻红胆素二甲酯的¹H NMR数据在鉴定^[2]和合成的文章^[4]中已有报道,但从来没有比较质子化前后的数据。比较藻红胆素二甲酯在

重氢丙酮(图3)和含 $1.8 \times 10^{-2} M$ 三氟乙酸的重氢丙酮中的化学位移,可以发现在中性溶液中C-5和C-10上的质子的化学位移分别处在 $\delta 6$ 和 $\delta 7$ ppm左右;当含酸时,C-5上的质子几乎没有变化,而C-10上的质子移向低场7.38 ppm处。这是由于C环上的氮原子成为铵离子,由于它的诱导作用,使C-10上的电子云密度降低,使它上面质子的化学位移移向低场。从核磁共振的分析来看,似乎并不存在B环和C环之间的双键相互转移^[5]。不然在加酸以后,C-5上的质子也会移向低场。

A、B、C环都处于共轭体系之中,比较加酸前后的¹H NMR数据,可以发现质子化以后,几乎所有的质子的化学位移都多少受些影响而移向低场(表1)。D环和C环之间没有双键相

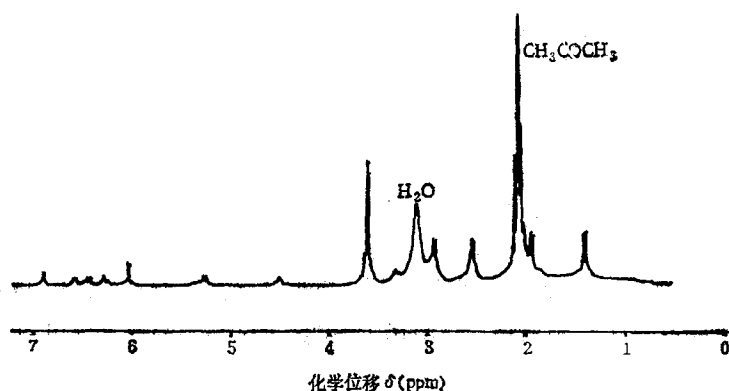


图3 藻红胆素二甲酯在重氢丙酮中的核磁共振氢谱
TMS = 0, 400 MHz.

连,无共轭传递,D环不会受到铵离子的影响。化学位移不应有较大的变化,但在外双键的三个质子 H_A 、 H_B 和 H_X (图4)的化学位移都向高场移动,分别增加0.136, 0.240和0.062 ppm,以 H_B 位移最多。这说明它处在一个特殊的环境之中,最大可能是处在正屏蔽区。利用分子模型改变分子构型可以发现,当C-10位上的桥双键从Z型变成E型后,D环外双键上的三个质子可以正好处在B环上丙酸的羧基平面上, H_B 正好处在正屏蔽区的喇叭口底部, H_A 在上部, H_X 在边缘(图5)。它们向高场位移的多少和它们所处的位置应受到的影响相一致。

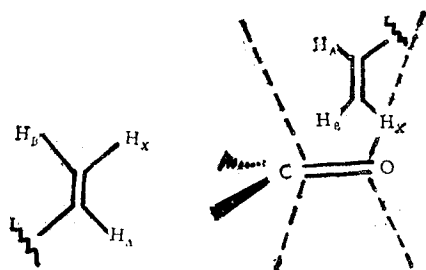


图4 D环C-18位上的双键

图5 D环C-18位上的双键处在羧基正屏蔽区的图示

2. 吸收光谱

胆三烯和胆二烯a、b类化合物都有两个主

表 1 藻红胆素二甲酯的 ^1H NMR 数据① TMS = 0, ppm, 400MHz.

	R_f 为 0.36 的样品, 重氢丙酮中	R_f 为 0.48 的样品	
		重氢丙酮中	Δ^2
2-CH ₃	1.406	1.394 (d, $J = 7.8\text{Hz}$)	-0.004
亚乙基上 CH ₃	1.933	1.932 (dd, $J = 7.3\text{Hz}, 1.1\text{Hz}$)	+0.032
CH ₃	2.001	2.041 (s)	+0.052
CH ₃	③	2.083 (s)	+0.041
CH ₃	2.102	2.094 (s)	+0.083
丙酸链上 α -CH ₂	2.535	2.530 (t)	+0.021, +0.119④
丙酸链上 β -CH ₂	2.920	2.918 (t)	+0.110, +0.186④
15-CH ₃	3.100	2.984⑤	
2-H	3.295	3.311 (q, $J = 7.8\text{Hz}$)	+0.379
●CH ₃	3.590	3.589 (s)	-0.002
	3.603	3.601 (s)	-0.003
16-H	4.485	4.485 (t, $J = 4\text{Hz}$)	+0.031
H _x	5.245	5.242 (dd, $J_{AX} = 11.5\text{Hz}, J_{BX} = 3.0\text{Hz}$)	-0.062
5-H	6.020	6.020 (s)	+0.012
H _B	6.248	6.264 (dd, $J_{AB} = 17.5\text{Hz}, J_{BX} = 3\text{Hz}$)	-0.240
亚乙基上 H	6.563	6.560 (dq, $J = 7.3\text{Hz}, 2.1\text{Hz}$)	+0.177
H _A	6.442	6.445 (dd, $J_{AB} = 17.5\text{Hz}, J_{AX} = 11.5\text{Hz}$)	-0.136
10-H	6.877	6.882 (s)	+0.502

注 ① 文献数据可参考 [2, 4]。② 在含 $1.8 \times 10^{-2} M$ 三氟乙酸的重氢丙酮中与在重氢丙酮中的化学位移差。③ 与丙酮峰重迭。④ 加酸后可分辨出四个 CH₂。⑤ 与水峰重迭。

要吸收峰,一个在紫外区,一个在可见区。根据理论计算和实验结果表明,不仅胆三烯类化合物^[6],而且胆二烯 a、b 类化合物^[7-9]都具有一个明显的特征,即两个吸收峰强度之比 Q_{UV}^{VIS} 可以用来推测它们的构型变化。当分子构型处于大螺环型,即四个吡咯环构成一个比较闭合的结构时, Q_{UV}^{VIS} 值比较小;而当构型比较张开时,即四个吡咯环的排列接近线型,至少有一个环间双键由 Z 型变成 E 型时, Q_{UV}^{VIS} 值比较大。另外当构型改变时,还伴随着吸收峰位置的位移。

藻红胆素二甲酯在氯仿中的两个最大吸收峰(见表 2)分别处在 534 nm 和 320 nm,

$$Q_{UV}^{VIS} = 1.36,$$

而在含 20 mM 三氟乙酸的氯仿中,最大吸收峰为 604 nm, 331 nm, 此时 $Q_{UV}^{VIS} = 2.40$ 。在苯中 Q_{UV}^{VIS} 值由 0.95 变成 1.51。因此很有可能其构型从大环螺旋型变成了比较伸展的张开型,这和 ^1H NMR 的结论是一致的。

将藻红胆素二甲酯的氯仿(经纯化除去稳定剂)溶液,浓度为 $3 \times 10^{-5} M$,用氩气饱和和 20

分钟以后,在密闭吸收池内进行光照,光源为 450 瓦中压汞灯,滤色片在 510 nm 以上全透过,光照距离为 1 cm。红色溶液会逐渐变蓝,最大吸收从 534 nm 移到 602 nm,在紫外区 330 nm 吸收峰的吸收强度逐渐减弱,等吸收点在 560 nm (见图 6)。这可能是由于氯仿在光照过程中,释放出 HCl,使分子质子化,C 环上的氮原子变成四级铵离子,C-10 位上的双键发生从 Z 型到 E 型的变化,吸收光谱也发生变化,可见区的吸收发生红移。紫外区的吸收变化比较复杂,可能是由于氯仿光解产物引起的。

天然的藻红蛋白用尿素或加酸变性以后, Q_{UV}^{VIS} 也有明显的变化,变性后蛋白对发色团影响变小,使发色团更自由,因此由天然状态下的伸展型变成螺旋型^[9]。R-藻红蛋白在变性时,可见区的吸收由 540 nm 和 565 nm 两个峰变成一个吸收峰(556 nm)。变性前吸收光谱的

$$Q_{UV}^{VIS} = 5.59,$$

变性后为 2.01,这可以说明发色团-藻红胆素在构型上的变化。C-藻红蛋白在天然状态、以

表 2 藻红胆素二甲酯的吸收光谱

溶 剂	A_{nm}	A_{nm}	Q_{vis}
氯仿	A_{534} 1.53	A_{320} 1.24	1.36
三氟乙酸-氯仿	A_{604} 1.13	A_{331} 0.47	2.40
苯	A_{540} 0.82	A_{335} 0.86	0.95
三氟乙酸-苯	A_{610} 1.42	A_{335} 0.94	1.51

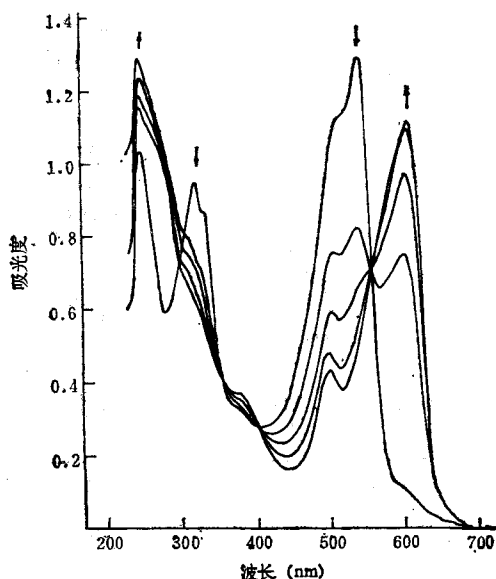


图 6 藻红胆素二甲酯在不含稳定剂的氯仿溶液中，
光照时的吸收光谱变化
光照 5 小时。

及 pH 7 和 pH 3 的 8M 尿素中的变性状态下的吸收光谱的 Q_{vis} 值分别为 6.68, 1.25 和 1.99^[7]。这也说明了发色团在构型上的变化。

当发色团连在蛋白上时，变性前后吸收峰的位置都没有明显的红移或蓝移现象，这说明蛋白和发色团之间存在着一定的相互作用。这很象一些胆三烯化合物，当 C—15 上的双键构

型从 Z 型变为 E 型时，吸收峰发生蓝移。而含胆三烯的植物光敏色素，当构型从 Z 型变为 E 型时，由于蛋白的作用，吸收峰的位置却发生了红移^[6,10]。

总之，藻红胆素二甲酯在溶液中，加进酸以后，C 环的氮原子形成四级铵盐，吸收光谱的位置和强度都发生了变化，再结合 ¹H NMR 数据分析，我们推断在质子化的同时，C—10 位上的双键构型也发生了变化，由 Z 型变成 E 型。当发色团连结于蛋白时，发色团的构型在天然状态下呈比较扩展型，和自由发色团在酸性溶液中类似；蛋白变性以后，发色团的构型呈比较关闭型，和自由发色团在中性溶液中的结构类似。

感谢蒋丽金教授对工作的支持。感谢中国科学院生物物理所核磁组同志们的大力协助。

参 考 文 献

- [1] 蒋丽金等：《海洋与湖沼》，14，316—323，1983。
- [2] Chapman, D. J. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5976, 1967.
- [3] Köst, H. P. et al.: *Tetrahedron Lett.*, p. 3417, 1974.
- [4] Gossauer, G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5928, 1978.
- [5] McDonagh, A. F.: in *The Porphyrins*, Ed. by Dolphin, D., Vol. 6, Academic Press, New York, 1979.
- [6] Rüdiger W.: *Structure and Bonding*, **40**, 101, 1980.
- [7] Langer, E. et al.: *Z. Naturforsch.*, **35C**, 367, 1980.
- [8] Scheer, H.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 241, 1981.
- [9] MacColl, R. et al.: *Arch Microbiol.*, **135**, 194, 1983.
- [10] 马金石：《有机化学》，3，169—177，1986。

【本文于 1986 年 4 月 7 日收到】