

气相中碱基与核苷自由基的产生与结构研究

寇敏¹, 徐诗音¹, 焦鲁杨¹, 杜梦颖¹, 李树奇¹, 孔祥蕾^{1,2,3}

(1. 南开大学化学学院, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;

2. 南开大学有机新物质创造前沿科学中心, 天津 300071;

3. 南开大学化学学院, 天津市生物传感与分子识别重点实验室, 天津 300071)

摘要: 核苷自由基在生物体内扮演着关键角色, 特别是在 DNA 损伤过程中。为深入研究这些自由基的性质、反应机制以及与其他生物分子的相互作用, 确定其结构至关重要。质谱通过提供高真空环境, 为自由基离子创造了惰性的研究环境, 在核苷自由基和碱基自由基的气相研究中展示了不可替代的作用。此外, 结合串联质谱和理论计算, 能够更准确地分析自由基结构。本文总结了近 20 年来基于质谱技术的气相中碱基与核苷自由基的研究, 详细介绍了自由基离子的产生方法、研究手段以及结构分析的最新成果, 提出了对于高活性自由基中间体的结构研究, 以及自由基异构体的选择性产生仍然面临挑战, 亟需发展新的实验方法和技术手段。

关键词: 质谱; 核苷; 自由基阳离子; 气相结构; 光解离光谱

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)01-0090-13

doi: 10.7538/zpxb.2023.0125

Production and Structure Study of Free Radicals of Bases and Nucleosides in Gas Phase

KOU Min¹, XU Shi-yin¹, JIAO Lu-yang¹, DU Meng-ying¹,

LI Shu-qi¹, KONG Xiang-lei^{1,2,3}

(1. State Key Laboratory and Institute of Elemento-Organic Chemistry,

College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Frontiers Science Center for New Organic Matte, Nankai University, Tianjin 300071, China;

3. Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition,

College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Nucleoside free radicals have important functions in organisms and play a crucial role in DNA damage. Accurately understanding the structure of nucleoside free radicals is crucial for studying their properties, reaction mechanisms, and interactions with other biomolecules. The high vacuum in the mass spectrometer provides an inert environment for free radicals. Further tandem mass spectrometry combined with theoretical calculation is crucial for achieving their structural informations. This article reviewed gas phase studies of base and nucleoside radicals based on mass spectrometry in

the past two decades, and provided a detailed introduction and comparison of their production methods, structural research methods and progress. Different methods were developed for the generation of the free radical ions, including collision induced dissociation of precursor ions of ternary transition metal complexes or those introducing free radical initiators, electron transfer dissociation of precursor ions charge-tagged, and UV photodissociation of precursor ions including C—I bonds. Besides, the methods for studying the structure of free radical ions in gas phase have gradually enriched, including commonly used tandem mass spectrometry, UV-visible and IR photodissociation spectroscopy. Based on the above methods, many different base and nucleoside free radical ions were generated and structurally determined in gas phase. On the other hand, the research of the highly active free radical intermediates and the selective generation of free radical isomers still pose challenges, and there is an urgent need to develop new experimental method.

Key words: mass spectrometry; nucleosides; radical cations; gas phase structure; photodissociation spectroscopy

自由基在涉及蛋白质和 DNA 等生物分子的反应中发挥着关键作用。核苷自由基在生物体内可能引发一系列重要的反应,如氧化、还原、自由基链式等,这些反应可以导致 DNA 和 RNA 的进一步损伤,从而对细胞的正常功能和遗传信息造成影响。近年来,有研究^[1-3]表明,核苷自由基是 RNA/DNA 损伤的关键中间体。以氮为中心的核苷自由基通常是暴露于 γ 射线或氧化剂的 DNA 产生的反应中间体,但对其关键结构以及相关反应的细节仍不清楚。为研究反应中形成的瞬态物种,科学家们开发了多种产生核苷自由基的方法,然而,由于不同方法产生的自由基可能具有不同的位点,因此对产生的自由基及其异构体结构的精确定义非常重要,但也非常困难。

一般情况下, DNA 电离通过氧化或还原途径进行,分别形成阳离子自由基和阴离子自由基中间体。以腺嘌呤为例,目前公认的碱基自由基形成机制有 2 种^[4]:一种是通过氧化电离产生瞬态阳离子自由基,这些阳离子自由基通过电子或质子转移后进一步反应;另一种是通过还原电离捕获电子,形成短寿命的阴离子自由基,通过阴离子消除或溶剂质子化转化为自由基。在液相研究中,羟基自由基直接进攻核苷是一种常用的方法^[5-7],可以选择性地产生羟基自由基,使其与核苷发生反应产生核苷自由基。此外,一些研究人员利用其他自由基氧化

剂,如硫酸根自由基^[8-9]、氯自由基^[10]等,在适当的实验条件下诱导核苷的氧化反应产生核苷自由基,并利用瞬态吸收光谱对其结构进行研究。这些方法均具有较高的选择性和灵敏度,但需要准确控制实验条件和选择合适的试剂。

在凝聚相中产生的这些不稳定自由基很容易与所处的环境分子(如溶剂分子)发生一系列反应,使它们的结构分析更复杂。利用气相中的离子分子不受溶剂和抗衡离子效应干扰的优势^[11-12],科学家们在气相中对相关自由基进行研究,通过比较实验结果与理论计算结果,能够从分子水平上更加清晰地获得它们的结构和动力学信息。近年来,随着质谱技术的发展,尤其是串联质谱法以及电喷雾电离(ESI)^[13]的广泛应用,使气相自由基的相关研究取得了很大进步。

本文将聚焦基于质谱技术的碱基自由基与核苷自由基的气相研究,详细介绍它们的产生方式、研究方法以及结构研究进展。

1 气相中碱基核苷自由基的产生方法

传统的电子轰击电离(EI)虽然可以用来产生核苷自由基离子,但受产率的影响,难以进行后续的结构研究。为揭示核苷自由基的结构和性质,研究人员开发了一些新的自由基产生方法,如利用碱基与金属离子和相关配体形成的

配合物通过碰撞诱导解离(CID)产生自由基离子^[14-15],使用不同的前体分子并结合各种离子

活化技术在气相中制备多种类型的自由基离子等,示于图1。

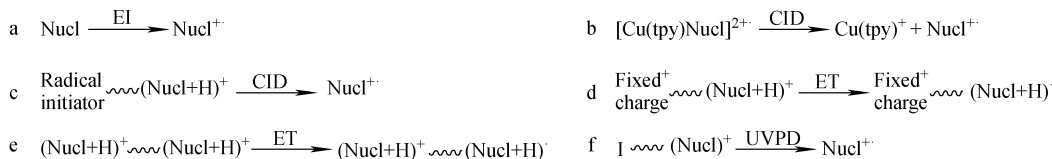


图1 气相中碱基、核苷和核苷酸阳离子自由基的形成方法

Fig. 1 Formation methods of cationic free radicals of base, nucleoside, and nucleotide in gas phase

1.1 EI源直接产生

最早,研究人员采用高能电子撞击电离(EI)技术产生核苷碱基的自由基阳离子,示于图1a。由于含氮的核苷碱基是富电子体,在初期形成核酸自由基时,电子空穴主要集中在碱基上,产生以碱基为中心的自由基。在气相中,核苷碱基的电离能量从低到高依次为鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、尿嘌呤(U)^[16-18]。有关核苷构建模块的报道大多数是基于高能电子碰撞电离方法研究碱基自由基阳离子的碎裂途径^[19-20],然而,由于方法本身的局限性,缺乏对自由基深入的研究。

1.2 三元过渡金属配合物

O'Hair等^[21]研究表明,一些核苷自由基阳离子可以通过ESI形成的三元金属配合物离子 $[\text{M}(\text{L}3)(\text{N})]^{2+}$ (M: Cu(II), Pt(II); L: dien, tpy, Nu: A, dA, G, dG, C, dC)的碰撞诱导解离引发分子内电子转移而产生,示于图1b^[21]。随后,研究人员先后研究了脱氧胞苷-脱氧鸟苷配对、胞嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤^[22-25]。以三联吡啶(terpy)作为配体,将ESI产生的 $[\text{M}(\text{II})(\text{L}3)\text{N}]^{2+}$ (m/z 211)作为前体离子,通过CID方法可以在其串联质谱图上观察到胸腺嘧啶自由基阳离子(m/z 126),示于图2。

1.3 引入自由基引发剂

Tureček课题组^[26]报道了一种产生核碱基阳离子自由基的非还原方法,有望应用于核苷和核苷酸阳离子自由基,示于图1c。该课题组通过在糖环C5'上引入自由基引发剂,如4,4'-偶氮二(4-氰酸)(ABCV),并利用CID产生核苷自由基阳离子,成功产生了腺苷和鸟苷自由基阳离子。核糖核苷偶联物通过ESI产生单

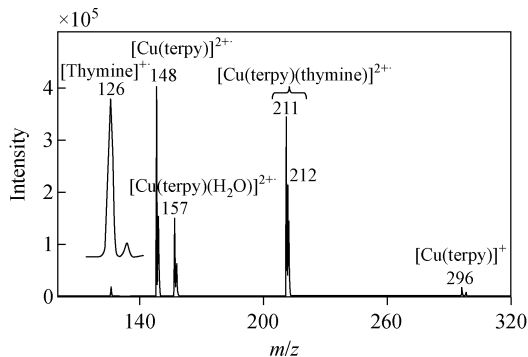


图2 $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{thymine})]^{2+}$ 离子的 CID 质谱图^[24]

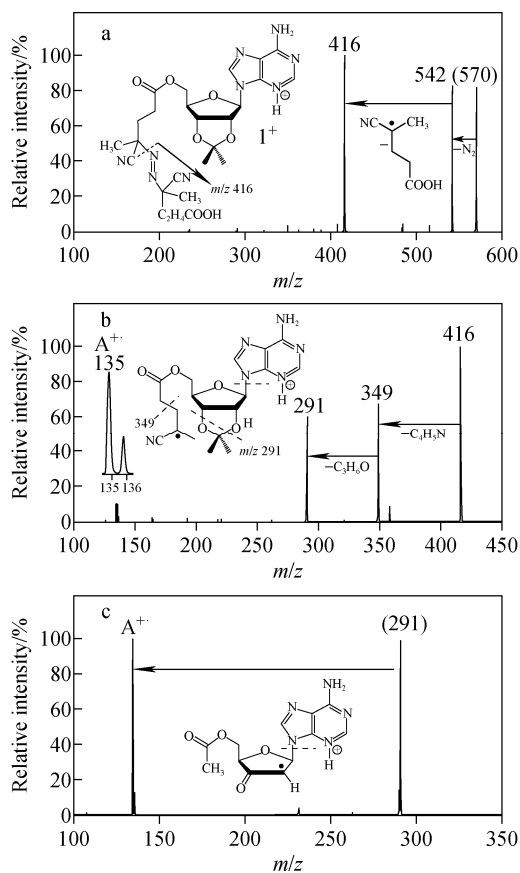
Fig. 2 Collision-induced dissociation mass spectrum of $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{thymine})]^{2+}$ ^[24]

电荷离子,这些离子通过质量选择并进行CID,从阳离子 1^+ (m/z 570)的腺苷 ABCV 复合物CID-MS²开始,导致N2和2-甲基戊二腈自由基的联合损失而形成 m/z 416自由基离子,示于图3a。然后,选择该自由基离子并进行CID-MS³,发现这一中间体的解离是从二氧戊环中连续消除2-甲基丙-2-烯腈(67 u)和丙酮(58 u),分别形成 m/z 349、291自由基离子,示于图3b。 m/z 291中间体的CID-MS⁴谱图示于图3c, A^{•+}的丰度很高,是通过消除中性5'-O-乙酰基形成的唯一产物。综上,该方法需要CID-MS⁴才能产生自由基,过程较复杂。

1.4 电荷基团标记法

利用三元过渡金属配合物的方法产生的自由基绝大多数是碱基自由基,少数是脱氧鸟苷-胞苷配对的自由基。Tureček课题组开发了一种产生带电荷标记核苷自由基的新方法,示于图1d^[27-29]。以腺嘌呤核苷为例,在腺苷C5'位上引入固定电荷基团的6-三甲基己烷-1-胺羧基铵,该带电复合物通过ESI进一步带电,形

成的双电荷离子通过质荷比选择并存储于四极离子阱中,然后与苝蒽阴离子自由基经过离子-离子反应传递电子,将双电荷离子还原为阳离子自由基,再次经过质荷比选择并存储在离子阱中。该方法有望应用于与 DNA 和 RNA 中电子转移相关的其他核苷,提供与电离损伤早期阶段相关的反应中间体的电子结构。



注:a. MS² m/z 570; b. MS³ m/z 416; c. MS⁴ m/z 291

图3 多级串联质谱显示 A⁺• 的形成过程^[26]

Fig. 3 Formation process of A⁺•

by multistage tandem mass spectrometry^[26]

Tureček课题组^[30-32]还发现,此类自由基的产生可依赖多重电荷寡核苷酸离子,示于图 1e。为促进产生稳定阳离子自由基 1⁺• 和 2⁺•,采用 1²⁺• 和 2²⁺• 与二苯并冠醚(DBCE)配合物进行电子转移解离(ETD),导致电荷减少并伴随 DBCE 配体的损失,从而产生阳离子自由基 1⁺• (m/z 469),且未被解离副产物污染,示于图 4a。类似地,(2²⁺• + DBCE)在 m/z 394.5 处的 ETD 导致 m/z 429 处形成阳离子自由基

2⁺•,示于图 4b。与引入自由基引发剂相比,电荷基团标记法不需要 4 级以上质谱产生自由基,但需要结合 ETD,这在许多质谱仪中不容易实现。

1.5 紫外光解离法

光解离法通过使用光能将分子激发到激发态进而生成自由基^[33-34]。该方法具有灵活性和可扩展性,通过调整激光的波长、强度和脉冲宽度等参数,可以有效控制核苷自由基的产生。孔祥雷课题组^[35]通过在傅里叶变换离子回旋共振(FT-ICR)分析池中对锂离子化或钠离子化的 2-碘代核苷阳离子进行 UV 照射,使其发生 C-I 键均裂,进而产生核苷及配对核苷自由基阳离子,示于图 1f。将锂离子化或钠离子化的 2-碘代核苷阳离子选择出来,然后引入紫外激光,在紫外光解离-串联质谱(UVPD-MS²)图中可以观察到相应的腺苷自由基阳离子^[36],示于图 5。该方法可以通过在不同位置灵活地引入 C-I 键来制备不同自由基异构体。

1.6 中和-再电离质谱法

中和-再电离质谱(NRMS)法是一种独特的研究方法。Tureček等^[4,37-38]利用 NRMS 法研究了阳离子通过碰撞电子转移产生相应中性自由基的过程,其在气相中分为 2 个阶段:首先,通过电喷雾电离(ESI)产生阳离子自由基,经过质量选择后,离子被加速到较高的速度(以尿嘧啶离子为例,其速度为 119 000 m/s),并通过与电子供体的二甲基二硫醚(CH₃SSCH₃)的掠射碰撞形成中性自由基;然后,通过再电离获得相应的质谱信号。该方法也可通过在前体分子中引入-C₂H₅基团,选择性地生成相应的碱基自由基。

2 气相中碱基核苷自由基结构的研究方法

对于在气相中产生与 DNA 相关的自由基离子,可以在质谱仪中进行质量选择,并利用串联质谱和光解离光谱等方法进一步研究其结构、反应性和动力学。对目标自由基离子进行选择后,可以采用不同的离子活化方法进行活化,并进一步利用串联质谱研究裂解通道和产物。目前,离子活化手段主要有 CID、红外多光子光解离光谱(IRMPD)以及紫外-可见光解离

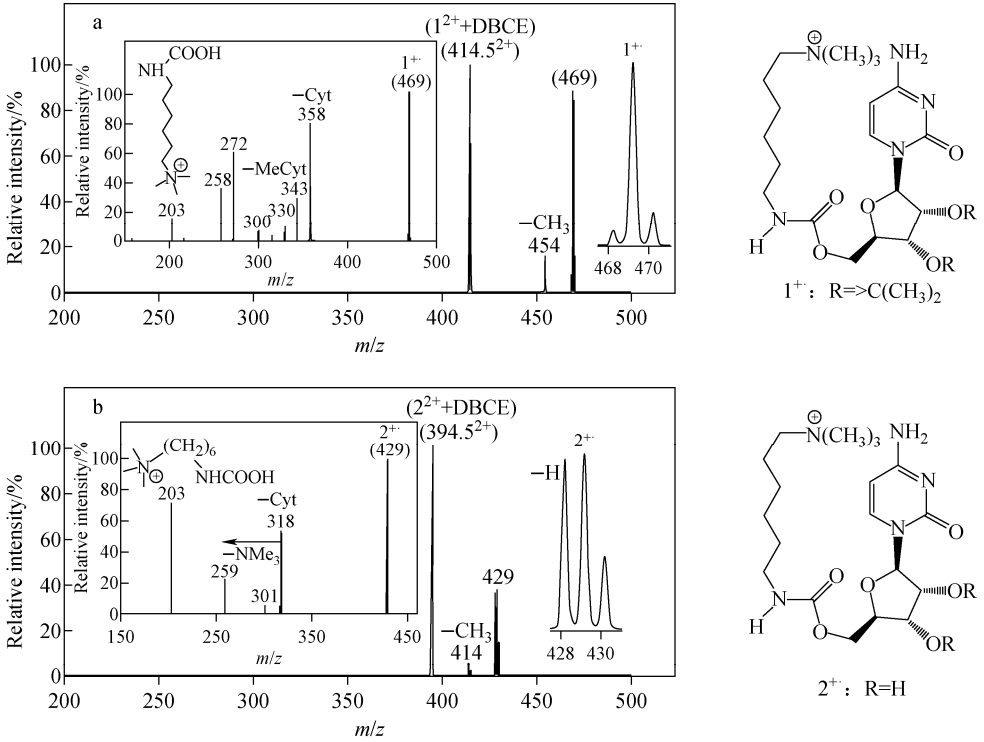
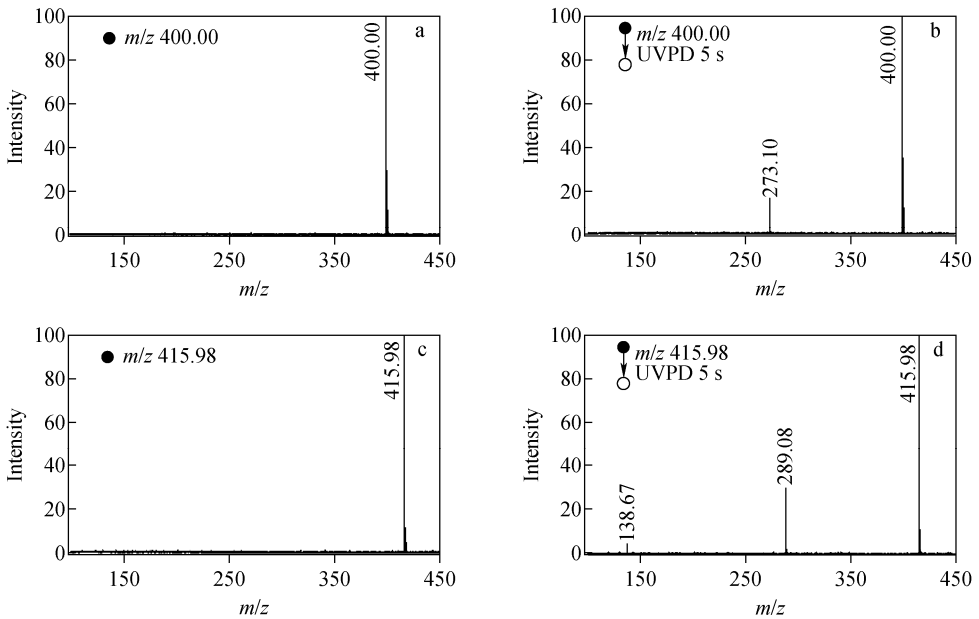


图 4 m/z 414.5 处 ($1^{2+} + \text{DBCE}$) 的 ETD-MS² 质谱图(a), 插图为 m/z 469 处 1^{+} 的 CID-MS³ 质谱图; m/z 394.5 处 ($2^{2+} + \text{DBCE}$) 的 ETD-MS² 质谱图(b), 插图为 m/z 429 处 2^{+} 的 CID-MS³ 质谱图^[28]

Fig. 4 ETD-MS² spectrum of ($1^{2+} + \text{DBCE}$) at m/z 414.5 (a), the inset shows the CID-MS³ spectrum of 1^{+} at m/z 469; ETD-MS² spectrum of ($2^{2+} + \text{DBCE}$) at m/z 394.5 (b), the inset shows the CID-MS³ spectrum of 2^{+} at m/z 429^[28]



注: a. c. 分别为质量选择后的母离子 m/z 400.00、415.98;
b. d. 分别为 m/z 400.00、415.98 对应的紫外光解离质谱图(280 nm, 照射 5 s)

图 5 [¹Ade+Li]⁺ (a, b) 和 [¹Ade+Na]⁺ (c, d) 的质谱图^[36]

Fig. 5 Mass spectra of [¹Ade+Li]⁺ (a, b) and [¹Ade+Na]⁺ (c, d)^[36]

(UV-VisPD),采用可调谐激光可进一步获得自由基离子的 IRMPD 光谱或 UVPD 光谱。另外,还有一些结合质谱或串联质谱研究离子结构和动力学的方法,如与相关物种的反应质谱^[4,37-38]、光电子能谱(PES)^[39-45]以及离子碰撞横截面(CCS)测量^[46-51]等,示于图 6。其中,

PES 在自由基研究中的应用较广泛,但主要集中于小分子自由基,如丙烯自由基和苯胺自由基等^[40-41,44];基于离子迁移的 CCS 测量已逐渐增多,但只有少数研究涉及若干阳离子自由基^[46-51],这是因为自由基的不稳定性导致其在迁移过程中可能伴随 CCS 改变。

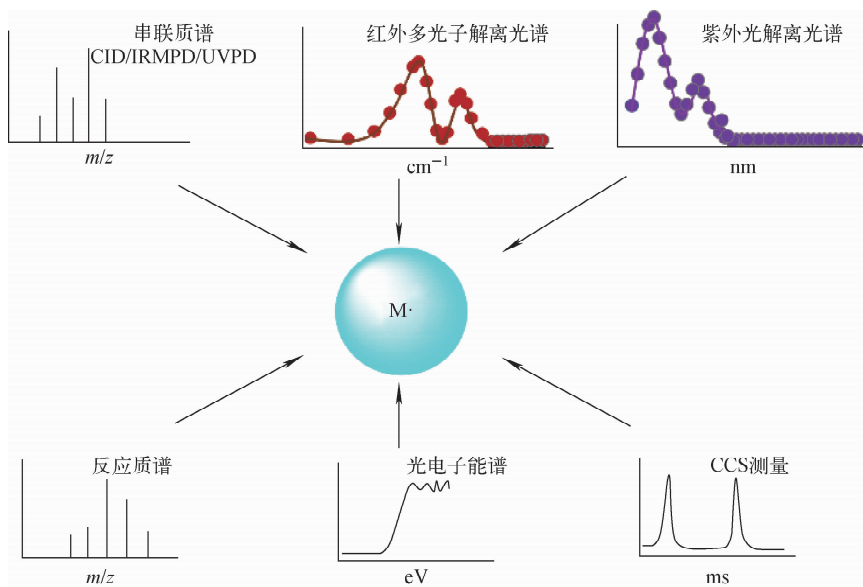


图 6 基于不同串联质谱方法的碱基与核苷自由基的结构研究

Fig. 6 Structural study of free radicals of bases and nucleosides based on different tandem mass spectrometry methods

由于目前大部分商品化质谱仪不提供 IRMPD 和 UVPD 光谱的功能,为实现这一目标,需要对其进行改造。这要求所选择的质谱仪应具备较强的多级串联质谱能力或多种活化手段,以便能够产生相应的自由基离子。其中,基于离子阱的用于串联 MS^n -UVPD 光谱学研究的实验装置主要有 2 种^[52]: 1 种是基于 Thermo LTQ 质谱仪改造的,以实现将紫外光束引入线性离子阱中,改造的主要方法是在用于产生阴离子的辅助化学电离源的插入块中钻出直径为 1 mm 的孔,并使用 1 块在入射光束路径位置上有 1 个密封石英窗的铝板取代化学电离源的背面真空法兰,示于图 7a;另 1 种是基于 Bruker amaZon 质谱仪改造的,将紫外光束引入 3D 离子阱中,在环形电极上钻出 2 个直径 1 mm 的孔(分别在顶部中心和底部中心),将改装后的环形电极正上方的真空法兰更换为紫外线窗口法兰,同时将 2 个反射镜固定

在改装后的环形电极下方,示于图 7b。

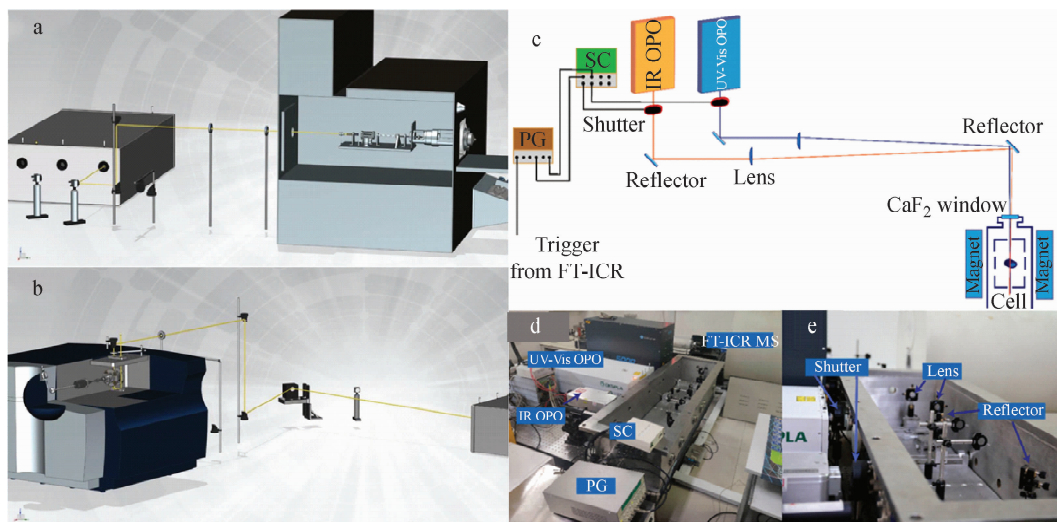
为了能够在同一台质谱仪上同时获得目标离子的红外及紫外光解离质谱与光谱,孔祥蕾课题组^[35]将 2 束可调谐激光引入到 1 台磁场强度为 7.0 T 的 FT-ICR 质谱仪分析池中,示于图 7c、7d。其中,1 台是紫外-可见 OPO 激光器,可用于产生碱基自由基阳离子或核苷自由基阳离子,也可用于研究紫外光解离质谱与光谱;另 1 台是可调谐红外激光器,输出波长范围为 2 700~3 800 cm^{-1} ,可以对自由基离子的红外光解离光谱进行研究。该装置虽然不具备 ETD 功能,但可以实现 IRMPD、UVPD、CID 等 3 种离子活化方法的任意结合,并共同作用于同一离子^[11-12,35-36]。

3 气相中碱基核苷自由基结构的研究进展

近年来,科学家们基于以上自由基的产生方法和结构研究手段^[22-32,36-38],并结合理论计

算^[53-54],对核苷自由基离子的结构和反应性进行了较全面的研究。核酸中的核苷是由嘌呤或嘧啶碱基与核糖或脱氧核糖缩合而成,一般来说,核糖分子中的碳原子(C1)与嘧啶

分子中的氮原子(N1)或嘌呤分子中的氮原子(N9)之间形成糖苷键,称为核糖核苷。为方便文章阅读,对碱基及糖环上的原子进行编号,示于图 8。



注:a. 改造后的 Thermo LTQ 质谱仪;b. 改造后的 Bruker amaZon 质谱仪;
c. 实验装置示意图;d,e. 实验装置实物图,PG 表示脉冲发生器,SC 表示快门控制器

图 7 通过引入可调谐激光,可获取 MS^n -UPVD 光谱的仪器装置(a,b)^[52];通过向 FT-ICR 质谱仪引入可调谐激光,可获取 MS^n -UPVD 和 IRMPD 光谱的仪器装置(c~e)^[35]

Fig. 7 Instrument setups for obtaining MS^n -UPVD spectra by introducing tunable lasers (a, b)^[52]; instrument setup for obtaining MS^n -UPVD and IRMPD spectra by introducing tunable lasers in a FT-ICR mass spectrometer (c-e)^[35]

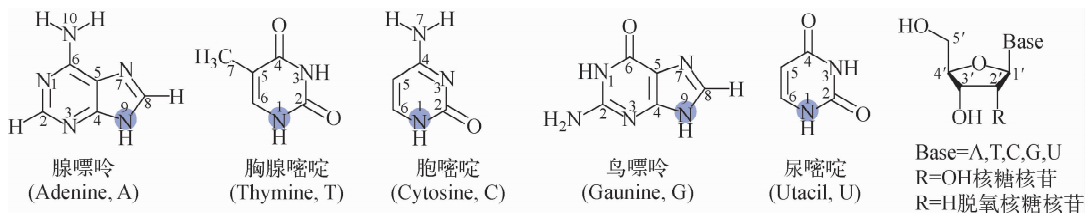


图 8 碱基及糖环上的原子编号

Fig. 8 Reference numbers for the atoms on base and sugar rings

3.1 腺嘌呤以及腺苷自由基

Turecek 等^[25]利用三元过渡金属配合物通过碰撞诱导解离形成腺嘌呤(A)和 9-甲基腺嘌呤的阳离子自由基,提出了腺嘌呤可能存在的异构体,并通过紫外-可见光谱和基于理论计算的振动光谱证明了离子化的嘌呤核碱基在气相中倾向于形成经典互变异构体结构;为了研究氢原子与腺苷结合位点,该课题组利用固定电荷基团标记法在气相中产生带有固定电荷基

团的腺苷自由基,通过串联质谱、氘标记和 UV/Vis 作用光谱对其进行结构表征,发现带电荷标记的自由基在波长 200~600 nm 处有紫外吸收;同时还考虑了 H 原子结合在 N1、C2、N3、N7、和 C8 这 5 种情况,通过开展氘标记实验,得出 H 原子仅结合在 N1、N3 和 N7 位点上;进一步与分子动力学、从头计算和激发态计算相结合,明确此处产生的腺苷自由基为 N7 氢原子加合物。Gerbaux 等^[4]利用 NRMS 方

法产生腺嘌呤自由基,并将电喷雾电离、气相离子化学和碰撞电子转移相结合,发现 N1 氢原子加合物最稳定,被认为是 DNA 放射性损伤的初始中间体之一。

为了揭示碱金属离子与腺苷自由基的相互作用,孔祥蕾课题组^[36]利用紫外光解离法产生锂离子化和钠离子化的腺苷自由基,示于图 9,通过将红外多光子解离与理论计算相结合,确定了 2 种自由基最稳定的异构体,它们具有金属离子三配位模式的共同特征。对于这 2 种自由基物种而言,最低能量的异构体都经历了氢转移,但考虑到 C—I 均裂后直接形成的自由基具有一些相似的光谱特性,不能排除存在经直接均裂后生成的自由基异构体。

3.2 胸腺嘧啶以及胸苷自由基

Tureček 等^[24]利用胸腺嘧啶(T)自由基相应的三元 Cu^{II} 络合物在气相中的解离反应产生 T 自由基阳离子,并通过离子-分子反应、紫外-可见光解离作用光谱、从头计算和密度泛函理论计算进行表征,结果表明,传统的[胸腺嘧啶]⁺并非能量最低的异构体,主要由含 C-7-H2 基团的非经典互变异构体混合物(约占 77%)和作为次要成分的典型 2,4-二氧化-N1, N3-H 异构体(约占 23%)构成。

3.3 鸟嘌呤以及鸟苷自由基

对于与腺嘌呤结构相似的鸟嘌呤(G)来说, Marek 等^[29]利用电荷标记法在气相中产生 $(\text{G}+\text{H})\cdot$ 型鸟苷自由基,作者首先考虑了 N1、N7、N3、O6 这 4 种质子化位点,然后通过 CID、UVPD 和紫外-可见光谱与理论计算相结合,表征离子为 N7-H 鸟苷自由基互变异构体,发现可见光和近紫外区域的吸收带是 H 原子结合在 N7 位上特异性 $(\text{G}+\text{H})\cdot$ 型鸟苷自由基的特征。

3.4 胞嘧啶以及胞苷自由基

Tureček 等^[38]在气相中特异性地产生了与位于胞嘧啶(C)环 N3 和 C5 位的氢原子加合物相对应的瞬态自由基,发现这 2 种异构体自由基是稳定的、不同物种的,其通过 H 原子或 CH_3 基团的损失和环断裂以及小分子的失去发生特定的单分子解离。随后,该课题组^[28]利用电荷标记法对胞苷自由基的紫外-可见光谱和结构进行研究,发现双电荷胞苷复合物在 310、270 nm 处显示出分别归属于通过电喷雾形成的 N3-和 O2-质子化胞嘧啶互变异构体的谱带。相反,在非共价络合物中,发现与二苯并-18-冠-6-醚(DBCE)配位的胞苷偶联物有利于 N3 位被质子化,从而形成单离子互变异构体,可以进一步通过配合物的电子转移解离形成胞苷 N3-H 自由基,并研究它们的作用光谱。而胞苷自由基在光谱可见区没有显示出强吸收带,使用分子动力学结合 DFT 计算,发现碰撞诱导的胞苷自由基解离主要通过 N1-C1' 糖苷键断裂,具有胞嘧啶损失和 N3 氢原子竞争性损失的解离特征。

对于 1^{++} 来说,通过监测 m/z 468(损失 H)、358(损失胞嘧啶)、343(丢失甲基胞嘧啶)、272 这 4 个主要的光碎片离子通道,从紫外光谱图中观察到最强的吸收在 250 nm 处,而在 500 nm 以上未观察到光解离,示于图 10a。对于 2^{++} 来说,主要吸收带在 250、300 nm 处,有 m/z 428(损失 H)、259、203 等 3 个主要碎片离子通道,示于图 10b。总体而言,胞苷自由基在动力学和热力学上比先前报道^[27,29]的类似腺苷和鸟苷自由基更稳定。

Tureček 等^[23]利用三元 Cu^{II} 络合物在气相中的解离产生胞嘧啶自由基阳离子,并通过指纹区的 IRMPD 光谱、UVPD 光谱、离子-分子反

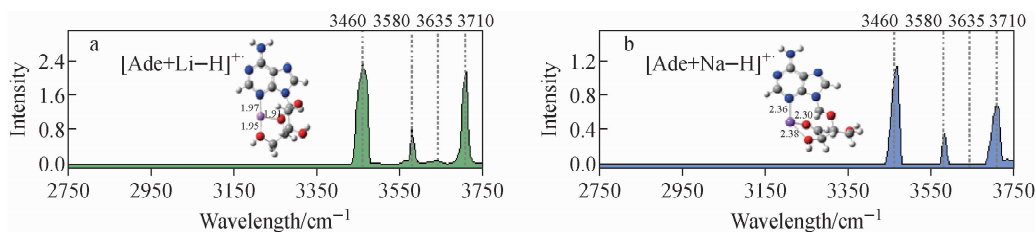


图 9 [Ade+Li-H]⁺ (a) 和 [Ade+Na-H]⁺ (b) 的红外实验光谱图^[36]

Fig. 9 Experimental IRMPD spectra of [Ade+Li-H]⁺ (a) and [Ade+Na-H]⁺ (b)^[36]

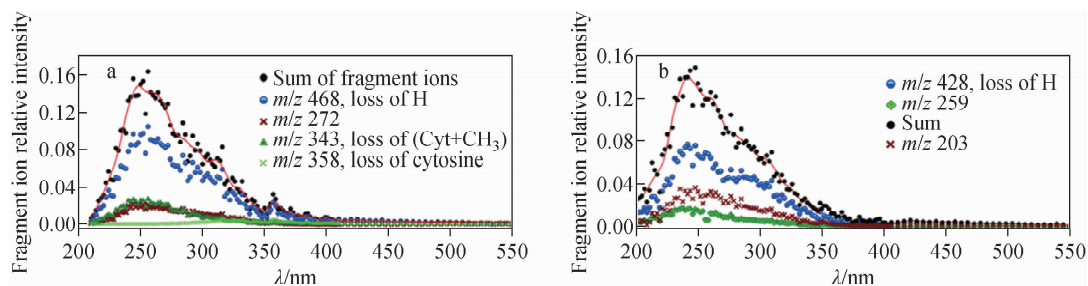


图 10 $1^{+\cdot}$ (a)、 $2^{+\cdot}$ (b) 自由基离子的紫外光解离光谱图^[28]

Fig. 10 Experimental UVPD spectra of $1^{+\cdot}$ (a) and $2^{+\cdot}$ (b) radical ions^[28]

应和理论计算(密度泛函 Cyt 理论和从头计算)进行表征。IRMPD 实验光谱具有 2 个 Cyt 的烯醇氨基和 2 个酮氨基互变异构体的诊断谱带。UVPD 作用光谱可以与文章中报道的 4 种最低能量互变异构体的组合相匹配,但不排除存在非经典双离子自由基阳离子。

3.5 尿嘌呤以及尿苷自由基

对于与胞嘧啶结构相似的尿嘌呤(U)来说,Tureček等^[37]利用 NRMS 法研究发现氢原子与尿嘧啶加成的 2 个关键中间体是在气相中特异性产生的 2 个尿嘧啶异构体自由基。其中,自由基 1 是尿嘧啶中 C-5 的 H 原子加合物,是直接加成机制中难以捕捉的过渡中间体;自由基 2 则是尿嘧啶中 O-4 的 H 原子加合物,代表电子捕获质子化机制的瞬态中间体。理论计算表明,自由基 1 是加合物中最稳定的异构体,预计 298 K 温度时占 H 原子加成的 96%。

3.6 鸟嘌呤-胞嘧啶配对

相比于碱基自由基和核苷自由基,碱基配对的结构较复杂。Tureček等^[30]利用电荷标记法对 GC 配对的自由基紫外-可见光谱和结构进行研究,并通过紫外-可见光解离作用光谱、结构和相对能量的从头计算进行表征。理论计算表明,由电子转移形成的 $(dGG+2H)^{+\cdot}$ 阳离子自由基经历了放热的构象坍塌,并伴随鸟嘌呤环的堆积和核间氢原子的容易转移,形成 3'-鸟嘌呤 C8-H 自由基。相反,在 $(dCG+2H)^{+\cdot}$ 中,从 5'-胞嘧啶自由基到鸟嘌呤环的放热氢转移在动力学上受到阻碍,导致形成了 5'-嘧啶和 3'-鸟嘌呤自由基的混合物,指示物中的冠醚络

合依赖于核碱基及其 3' 或 5' 位置,并且稳定带中含有 N-7-质子化鸟嘌呤和 N-3-质子化胞嘧啶的二核苷酸质子体。

4 总结与展望

通过不同方法产生和研究核苷自由基,为深入了解其形成机制、反应性质以及生物学功能具有重要意义。质谱仪系统中的高真空为高反应性瞬态分子和自由基等提供了惰性环境,有利于它们的生成和结构研究。本文总结了近 20 年来基于质谱技术的碱基自由基与核苷自由基的气相研究,详细介绍了产生方式、研究方法以及结构研究进展,具体信息列于表 1。从产生方法来看,除早期使用的 EI 法外,目前已有多种方法被应用,如基于碱基或核苷与 Cu^{II} 和配体形成的三元过渡金属配合物或通过引入自由基引发剂的 CID 方法,基于电荷标记后的 ETD 方法,以及基于引入碳碘键后的 UVPD 法等。在结构研究中,既可以通过基于串联质谱的离子活化法获得解离碎片信息,又可以获得重要自由基离子的紫外-可见或红外光解离光谱,并与理论计算结果对比。基于以上方法,许多不同碱基与核苷自由基离子的结构得以明确,但其高活性自由基中间体的结构表征,以及不同自由基位点的自由基异构体的选择性产生仍具有挑战性。目前,相关自由基离子的研究主要集中于阳离子,而对于阴离子的产生和研究仍然非常困难,可以进一步利用反应质谱、光电子能谱以及 CCS 测量等方法实现对这些物种结构的精准分析。

表 1 气相中碱基与核苷自由基的产生以及结构研究方法

Table 1 Production and structural research methods of free radicals of bases and nucleosides in gas phase

产生方法 Generation method	自由基类型 Radical type	结构研究方法 Structural research method	文献 Reference
EI 源直接产生	鸟嘌呤、腺嘌呤	—	[19-20]
三元过渡金属配合物	腺嘌呤、脱氧腺苷、脱氧腺苷酸	—	[21]
	鸟嘌呤、脱氧鸟苷、脱氧鸟苷酸		
	胞嘧啶、脱氧胞苷、脱氧胞苷酸		
	胸腺嘧啶、脱氧胸苷、脱氧胸苷酸		
	脱氧鸟苷-脱氧胞苷配对	CID+IRMPD 光谱	[22]
	胞嘧啶	IRMPD 光谱+UVPD 光谱	[23]
	胸腺嘧啶	UVPD 光谱	[24]
引入自由基引发剂	腺嘌呤	UVPD 光谱	[25]
	9-甲基腺嘌呤	UVPD 光谱	
	腺苷	CID+UVPD 光谱	[26]
	胞苷	CID+ETD+UVPD 光谱	[27]
	鸟苷	CID+ETD+UVPD 光谱	[28]
电荷标记法	GC 二核苷酸	CID+ETD+UVPD 光谱	[29]
	GATC 四核苷酸	CID+ETD+UVPD 光谱	[30]
	GATC 四核苷酸	ETD+UVPD 光谱	[31]
	GATC 四核苷酸	ETD+UVPD 光谱	[32]
	腺苷	ETD+UVPD 光谱	[36]
紫外光解离法	腺苷	CID+IRMPD 光谱	[36]
	尿嘧啶	NRMS	[37]
	1-甲基胞嘧啶	NRMS	[38]
中和-再电离质谱法	腺嘌呤	NRMS+D 取代	[4]

参考文献:

- [1] ZHENG L, GREENBERG M M. DNA damage emanating from a neutral purine radical reveals the sequence dependent convergence of the direct and indirect effects of γ -radiolysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(49): 17 751-17 754.
- [2] LUNDAHL M N, SARKSIAN R, YANG H, JODTS R J, PAGNIER A, SMITH D F, MOSQUERA M A, van der DONK W A, HOFFMAN B M, BRODERICK W E, BRODERICK J B. Mechanism of radical S-adenosyl-l-methionine adenosylation; radical intermediates and the catalytic competence of the 5'-deoxyadenosyl radical[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(11): 5 087-5 098.
- [3] ZHENG L, GREENBERG M M. Traceless tandem lesion formation in DNA from a nitrogen-centered purine radical[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(20): 6 400-6 407.
- [4] CHEN X, SYRSTAD E A, NGUYEN M T, GERBAUX P, TURECEK F. Adenine radicals in the gas phase: an experimental and computational study of hydrogen atom adducts to adenine [J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2005, 109(36): 8 121-8 132.
- [5] CANDEIAS L P, STEENKEN S. Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)[J]. *Chemistry*, 2000, 6(3): 475-484.
- [6] ROKHLENKO Y, CADET J, GEACINTOV N E, SHAFIROVICH V. Mechanistic aspects of hydration of guanine radical cations in DNA[J].

- Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(16): 5 956-5 962.
- [7] SANTIAGO J, de FARIA J C, SAN-MIGUEL M, BERNAL M A. A TD-DFT-based study on the attack of the OH• radical on a guanine nucleotide[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 10 007.
- [8] CHOI J, YANG C, FUJITSUKA M, TOJO S, IHEE H, MAJIMA T. Proton transfer of guanine radical cations studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy combined with pulse radiolysis[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2015, 6(24): 5 045-5 050.
- [9] WU L, LIU K, JIE J, SONG D, SU H. Direct observation of guanine radical cation deprotonation in G-quadruplex DNA[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(1): 259-266.
- [10] JIE J, LIU K, WU L, ZHAO H, SONG D, SU H. Capturing the radical ion-pair intermediate in DNA guanine oxidation[J]. Science Advances, 2017, 3(6): e1700171.
- [11] SHI Y, DU M, REN J, ZHANG K, XU Y, KONG X. Application of infrared multiple photon dissociation (IRMPD) spectroscopy in chiral analysis[J]. Molecules, 2020, 25(21): 5 152.
- [12] MA L, REN J, FENG R, ZHANG K, KONG X. Structural characterizations of protonated homodimers of amino acids; revealed by infrared multiple photon dissociation (IRMPD) spectroscopy and theoretical calculations[J]. Chinese Chemical Letters, 2018, 29(9): 1 333-1 339.
- [13] FENN J B, MANN M, MENG C K, WONG S F, WHITEHOUSE C M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules[J]. Science, 1989, 246(4 926): 64-71.
- [14] SLENO L, VOLMER D A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2004, 39(10): 1 091-1 112.
- [15] BAYAT P, LESAGE D, COLE R B. Tutorial; ion activation in tandem mass spectrometry using ultra-high resolution instrumentation[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2020, 39 (5/6): 680-702.
- [16] HUSH N S, CHEUNG A S. Ionization potentials and donor properties of nucleic acid bases and related compounds[J]. Chemical Physics Letters, 1975, 34(1): 11-13.
- [17] LIN J, YU C, PENG S, AKIYAMA I, LI K, LEE L K, LeBRETON P R. Ultraviolet photoelectron studies of the ground-state electronic structure and gas-phase tautomerism of purine and adenine[J]. Journal of the American Chemical Society, 1980, 102(14): 4 627-4 631.
- [18] YU C, PENG S, AKIYAMA I, LIN J, LeBRETON P R. Ultraviolet photoelectron studies of biological pyrimidines. The valence electronic structure of cytosine[J]. Journal of the American Chemical Society, 1978, 100(8): 2 303-2 307.
- [19] RICE J M, DUDEK G O, BARBER M. Mass spectra of nucleic acid derivatives. Pyrimidines [J]. Journal of the American Chemical Society, 1965, 87(20): 4 569-4 576.
- [20] RICE J M, DUDEK G O. Mass spectra of nucleic acid derivatives. II. Guanine, adenine, and related compounds[J]. Journal of the American Chemical Society, 1967, 89(11): 2 719-2 725.
- [21] WEE S, O' HAIR R A J, McFADYEN W D. Can radical cations of the constituents of nucleic acids be formed in the gas phase using ternary transition metal complexes?[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM, 2005, 19 (13): 1 797-1 805.
- [22] FEKETEÓVÁ L, CHAN B, KHAIRALLAH G N, STEINMETZ V, MAITRE P, RADOM L, O' HAIR R A J. Watson-crick base pair radical cation as a model for oxidative damage in DNA [J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2017, 8(13): 3 159-3 165.
- [23] LESSLIE M, LAWLER J T, DANG A, KORN J A, BÍM D, STEINMETZ V, MAÎTRE P, TUREČEK F, RYZHOV V. Cytosine radical cations: a gas-phase study combining IRMPD spectroscopy, UVPD spectroscopy, ion-molecule reactions, and theoretical calculations[J]. Chemphyschem; a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry, 2017, 18(10): 1 293-1 301.
- [24] DANG A, NGUYEN H T H, RUIZ H, PIA-CENTINO E, RYZHOV V, TUREČEK F. Experimental evidence for noncanonical thymine cation radicals in the gas phase[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2018, 122(1): 86-97.

- [25] HUANG S R, DANG A, TUREČEK F. Ground and excited states of gas-phase DNA nucleobase cation-radicals. A UV-vis photodissociation action spectroscopy and computational study of adenine and 9-methyladenine[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(6): 1 271-1 281.
- [26] ZIMA V, LIU Y, TUREČEK F. Radical cascade dissociation pathways to unusual nucleobase cation radicals[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2022, 33(6): 1 038-1 047.
- [27] LIU Y, DANG A, URBAN J, TUREČEK F. Charge-tagged DNA radicals in the gas phase characterized by UV/vis photodissociation action spectroscopy[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2020, 59(20): 7 772-7 777.
- [28] LIU Y, MA C, NOVÁKOVÁ G, MAREK A, TUREČEK F. Charge-tagged nucleosides in the gas phase: UV-vis action spectroscopy and structures of cytidine cations, dications, and cation radicals[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2021, 125(28): 6 096-6 108.
- [29] LIU Y, MA C, LEONEN C J A, CHATTERJEE C, NOVÁKOVÁ G, MAREK A, TUREČEK F. Tackling a curious case: generation of charge-tagged guanosine radicals by gas-phase electron transfer and their characterization by UV-vis photodissociation action spectroscopy and theory [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2021, 32(3): 772-785.
- [30] LIU Y, KORN J A, DANG A, TUREČEK F. Hydrogen-rich cation radicals of DNA dinucleotides: generation and structure elucidation by UV-vis action spectroscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 122(42): 9 665-9 680.
- [31] HUANG S R, LIU Y, TUREČEK F. UV-vis photodissociation action spectroscopy reveals cytosine-guanine hydrogen transfer in DNA tetranucleotide cation radicals upon one-electron reduction[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, 124(17): 3 505-3 517.
- [32] LIU Y, HUANG S R, TUREČEK F. Guanine-adenine interactions in DNA tetranucleotide cation radicals revealed by UV/vis photodissociation action spectroscopy and theory[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 2020, 22(29): 16 831-16 842.
- [33] KHANDURI D, COLLINS S, KUMAR A, ADHIKARY A, SEVILLA M D. Formation of sugar radicals in RNA model systems and oligomers via excitation of guanine cation radical [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(7): 2 168-2 178.
- [34] BANYASZ A, KETOLA T M, MUÑOZ-LOSA A, RISHI S, ADHIKARY A, SEVILLA M D, MARTINEZ-FERNANDEZ L, IMPROTA R, MARKOVITSI D. UV-induced adenine radicals induced in DNA a-tracts: spectral and dynamical characterization[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2016, 7(19): 3 949-3 953.
- [35] ZHANG K, SHI Y, DU M, XU Y, WANG Y, KONG X. Versatile double-beam confocal laser system combined with a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for photodissociation mass spectrometry and spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(26): 9 056-9 063.
- [36] KOU M, JIAO L, XU S, DU M, HOU Y, KONG X. Structural characterization of the metalized radical cations of adenosine ($[Ade + Li - H]^+$ and $[Ade + Na - H]^+$) by infrared multiphoton dissociation spectroscopy and theoretical studies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(20): 15 385.
- [37] WOLKEN J K, SYRSTAD E A, VIVEKANANDA S, TURECEK F. Uracil radicals in the gas phase: specific generation and energetics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(24): 5 804-5 805.
- [38] YAO C, CUADRADO-PEINADO M L, POLÁSEK M, TURECEK F. Specific generation of 1-methylcytosine radicals in the gas phase[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2005, 44(41): 6 708-6 711.
- [39] YUAN Q, FENG W, CAO W, ZHOU Y, CHENG L, WANG X B. Sodium cationization enables exotic deprotonation sites on gaseous mononucleotides[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2022, 13(42): 9 975-9 982.
- [40] HOULE F A, BEAUCHAMP J L. Detection

- and investigation of allyl and benzyl radicals by photoelectron spectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(11): 3 290-3 294.
- [41] SCHÜBLER T, DEYERL H J, D'UMMLER S, FISCHER I, ALCARAZ C, ELHANINE M. The vacuum ultraviolet photochemistry of the allyl radical investigated using synchrotron radiation[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2003, 118(20): 9 077-9 080.
- [42] WANG X B, WOO H K, WANG L S, MINO-FAR B, JUNGWIRTH P. Determination of the electron affinity of the acetyloxy radical (CH_3COO) by low-temperature anion photoelectron spectroscopy and AB initio calculations[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2006, 110(15): 5 047-5 050.
- [43] HOSSAIN E, DENG S M, GOZEM S, KRYLOV A I, WANG X B, WENTHOLD P G. Photoelectron spectroscopy study of quinonimides [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(32): 11 138-11 148.
- [44] HRODMARSSON H R, GARCIA G A, NAHON L, GANS B, LOISON J C. Threshold photoelectron spectrum of the anilino radical[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2019, 123(42): 9 193-9 198.
- [45] FISCHER I, PRATT S T. Photoelectron spectroscopy in molecular physical chemistry[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2022, 24(4): 1 944-1 959.
- [46] RUOTOLO B T, HYUNG S J, ROBINSON P M, GILES K, BATEMAN R H, ROBINSON C V. Ion mobility-mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2007, 46(42): 8 001-8 004.
- [47] MOSS C L, CHAMOT-ROOKE J, NICOL E, BROWN J, CAMPUZANO I, RICHARDSON K, WILLIAMS J P, BUSH M F, BYTHELL B, PAIZS B, TURECEK F. Assigning structures to gas-phase peptide cations and cation-radicals. An infrared multiphoton dissociation, ion mobility, electron transfer, and computational study of a histidine peptide ion[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(10): 3 445-3 456.
- [48] PLATT S P, ATTAH I K, AZIZ S, EL-SHALL M S. Communication; Ion mobility of the radical cation dimers; (Naphthalene) $2(+\bullet)$ and naphthalene $(+\bullet)$ -benzene; evidence for stacked sandwich and T-shape structures [J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2015, 142(19): 191 102.
- [49] ZIMA V, VLK M, WAN J, CVAČKA J, TUREČEK F. Tracking isomerizations of high-energy adenine cation radicals by UV-vis action spectroscopy and cyclic ion mobility mass spectrometry[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2023, 127(28): 5 899-5 913.
- [50] GOZZO T A, BUSH M F. Effects of charge on protein ion structure: lessons from cation-to-anion, proton-transfer reactions[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2023: 1-26.
- [51] NAYLOR C N, SCHAEFER C, KIRK A T, ZIMMERMANN S. The origin of isomerization of aniline revealed by high kinetic energy ion mobility spectrometry (HiKE-IMS)[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2023, 25(2): 1 139-1 152.
- [52] DANG A, KORN J A, GLADDEN J, MOZZONE B, TUREČEK F. UV-vis photodissociation action spectroscopy on thermo LTQ-XL ETD and Bruker AmaZon ion trap mass spectrometers: a practical guide[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(9): 1 558-1 564.
- [53] EVANGELISTA F A, SCHAEFER H F. Hydrogen atom and hydride anion addition to adenine: structures and energetics[J]. *Chemphyschem; a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 2006, 7(7): 1 471-1 480.
- [54] HEBERT S P, SCHLEGEL H B. Computational study of the pH-dependent competition between carbonate and thymine addition to the guanine radical[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, 32(1): 195-210.

(收稿日期:2023-11-05;修回日期:2023-12-18)