

研究简报

(1*R*, 3*R*)-1-氨基-1,3-二羧基环丁烷衍生物桥联环糊精
与一组低分子量多肽之间的包合行为

宋乐新* 涂超 赵亮 郭子建*

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

关键词: 环糊精 氨基酸 多肽 包合物 分子识别
分类号: O657.6

近年来, 有关环糊精(CD)衍生物的合成、结构表征和应用方面的研究已引起越来越多化学家的关注^[1-3]。包含两个空腔的CD二聚体因其独特的理化性质而成为环糊精化学研究的一个热点^[4,5]。最近我们报道了几个由氨基二羧基衍生物桥联的CD二聚体的制备及其与一些低分子量多肽之间的相互作用, 讨论了主体桥联基团的结构效应及其对客体的异构体识别作用的影响^[6-8]。为了更深入地理解主客体化学中的分子识别概念、认识主体多重识别位点对客体产生协同包结的机制, 有必要进一步评估客体结构比如链长、取代基的性质与位置对包合反应、特

别是对CD二聚体双空腔协同效应的影响。为此, 我们选择了由Trp与Arg两种氨基酸构成的一组多肽分子(客体, Trp、Arg分别为色氨酸、精氨酸的简称)作为客体, 采用荧光偏光方法探讨异硫氰酸盐荧光素(FITC)^[9]标识的(1*R*, 3*R*)-1-氨基-1,3-二羧基环丁烷(Acbd)衍生物作为桥联试剂的环糊精二聚体FITC-Acbd(NH-β-CD)₂1(图1, 主体)在298K磷酸氢钾-磷酸二氢钾-氯化钾缓冲溶液(pH=7.4)中, 与一系列低分子量多肽(图1, 客体)之间的相互作用, 通过考察Trp、Arg两种氨基酸在多肽分子中的不同排列与多肽分子链长的变化, 探讨客体结构对

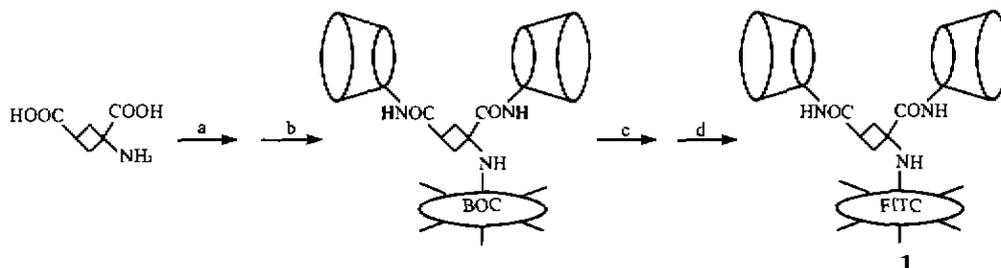


图1 β-CD二聚体1的合成

Fig. 1 Synthesis of β-cyclodextrin dimer 1

a: BOC-ON (2-*t*-butoxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile, 1 equiv.), NEt₃ (3 equiv.), H₂O (6mL), 4h;b: DMF (20 mL), mono-6-NH₂-β-CD(1 equiv.), 93h;c: TFA/H₂O (19/1, 2mL), cooled diethyl ether (10mL);d: NEt₃ (7 equiv.), FITC (1 equiv.), DMF (5 mL), H₂O (6 mL), 16 h, room temp.; 11% (yield, 4 steps).The structure of the guest molecules: NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-H 2; NH₂-Arg-Trp-Arg-Trp-H 3; NH₂-Trp-Arg-Arg-Trp-H 4;NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-H 5; NH₂-Trp-Trp-Arg-Arg-Trp-Trp-H 6; NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-H 7;NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-H 8

收稿日期: 2001-12-18。收修改稿日期: 2002-01-14。

国家自然科学基金资助项目(No. 29925102)。

* 通讯联系人。E-mail: solexm@netra.nju.edu.cn

第一作者: 宋乐新, 男, 37岁, 博士后, 副教授; 研究方向: 环糊精化学, 配位化学, 超分子化学。

主、客体相互识别作用的影响以及协同效应的产生对客体结构的要求。

1 试剂与仪器

β -环糊精为东京化成工业株式会社出品,使用前从二次水中重结晶两次,经 110℃ 真空干燥 24 小时后,存放于置有五氧化二磷的真空干燥器中。所用其它化学试剂均为市售分析纯产品,溶剂按标准方法经纯化、干燥后使用。多肽的合成在 Shimadzu-PSSM 8 多肽合成仪上完成,高效液相色谱(HPLC)仪为 Shimadzu-LC-6A-Tosoh-SC-8020,用于多肽的分析和纯化。多肽的浓度在 Union Giken SM 401 分光光度计上测定。元素分析用 Perkin-Elmer 240C 型元素分析仪测定。 ^1H NMR 用 Bruker-Am-500 型核磁共振仪测定, D_2O 为溶剂, 4,4'-二甲基-4-硅杂戊磺酸钠(DSS)为外标。质谱数据是将主、客体样品的储备液用二次水稀释至体积和浓度分别为 50 μL 、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 通过 Kratos Kompact-MALDI 3 质谱仪获得。荧光偏光数据在 Takara Shuzo Beacon 2000 全范围荧光偏光仪上测定。

2 合成、表征与测定

按文献^[9]方法合成 β -CD 二聚体 **1**(图 1), 粗产物经少量水洗涤, 以 $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ 为洗脱剂经硅胶柱色谱进一步纯化, 产率 11%。**1** 的 MALDI-TOF-MS (m/z): 2781.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\text{C}_{111}\text{H}_{158}\text{O}_{75}\text{N}_4\text{S} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 计算值: C, 46.74; H, 5.86; N, 1.96; S, 1.12, 实验值: C, 46.39; H, 5.95; N, 2.02; S, 0.94。 ^1H NMR (D_2O , ppm), δ : 6.6~7.8 (FITC 芳香环上的 C-H), 5.01 (CD 的 H_1); 3.2~3.9 (环丁烷的 CH, CD 的 H_4 , H_2 , H_3 , H_6 , H_3); 2.5~2.9 (环丁烷的 CH_2)。 R_f 为 0.49 (10% 氨水-乙醇-正丁醇, 2:7:1, $v/v/v$)。

低分子量多肽 **2**~**8** 通过固相 Fmoc 肽合成路线^[11,12]获得, 粗产物经 HPLC 分析和纯化^[9], 得到的储备液存放于冰箱中, **2**~**7** 的 MALDI-TOF-MS (m/z , $[\text{M} + \text{H}]^+$) 分别为: 703.2、703.5、703.3、1075.4、1075.5、1448.7 和 1821.1。称取一定量的 **1** 溶于 10.00 mL 二次水中, 得到主体 **1** ($2.32 \times 10^2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的储备液。客体储备液浓度经紫外-可见分光光度法确定, 分别为 **2** ($5.69 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**3** ($5.45 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**4** ($5.77 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**5** ($2.80 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**6** ($3.16 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、

7 ($2.43 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **8** ($4.05 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。荧光偏光实验的每份测试样品总体积均为 200 μL , 固定主体浓度 (**1** 为 $1.16 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 客体浓度范围为 $1.00 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 8.15 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验温度 25℃, 缓冲溶液为等体积的 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 和 50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的混合溶液 (pH = 7.4), 荧光偏光度 (P) 在 Takara Shuzo Beacon 2000 全范围荧光偏光仪上测定, 测定条件: 25℃, pH = 7.4, 光学滤光器: $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{nm}$, 数据读取间隔 15 秒, 为了便于数据处理, 利用荧光偏光度 (P) 与荧光各向异性值 (A) 之间的换算关系: $A = 2P / (3 - P)$ 将 P 转换为荧光各向异性值 (A)^[8]。

3 结果与讨论

研究表明, 溶液中主-客体包合物的生成常数 (K_b)、包合物的浓度 (c) 以及主、客体起始浓度 (H_0 , G_0) 之间的关系, 可以用方程 (1) 联系起来^[9]:

$$c \times (G_0 - c)^{-1} = H_0 \times K_b - c \times K_b \quad (1)$$

上式中的 c 与由实验获得的荧光各向异性值 (A) 之间的关系可以表示为: $c = H_0(A - A_0) / (A_b - A)^{-1}$, 其中 A_0 , A_b 分别为客体浓度为 0 或最大时体系的荧光各向异性值。以 $c \times (G_0 - c)^{-1}$ 对 c 作图, 从直线的斜率 ($-K_b$) 求出包合物的生成常数 (K_b , $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$)。图 2 为 **1-5**、**1-7** 两个包合体系、具有代表性的 Scatchard 图^[13]。图 3 给出了主体 **1** 与客体 **2**~**8** 七个体系的 K_b 值。

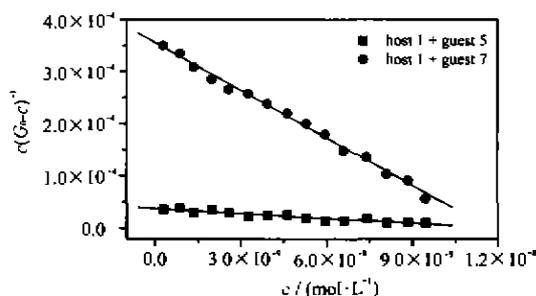


图 2 主体 **1** 与客体 **5**、**7** 两个体系典型的 Scatchard 图示
Fig. 2 Representative Scatchard plots for host **1** and guest **5** or **7**

从图 3 可以看出, 组成相同、结构不同的几个客体 (同分异构体, **2**、**3** 与 **4**; **5** 与 **6**), 当 Trp 或 Arg 两种氨基酸在多肽分子中的排列顺序不同时, 它们与二聚体 CD **1** 形成的包合物的稳定性存在明显差异 (**1-4** > **1-3** > **1-2**; **1-6** > **1-5**); 组成不同、结构类似

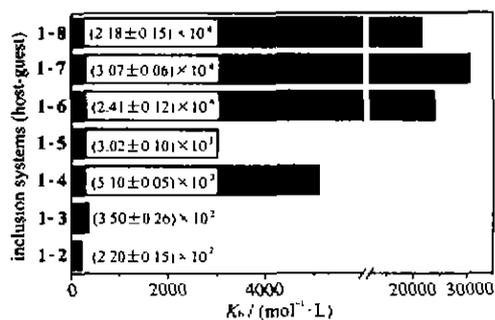


图 3 主、客体包合物的生成常数图示

Fig. 3 Formation constant plots of the inclusion compounds between host 1 and guests 2 ~ 8

的几个客体(同种氨基酸位于多肽的同一侧, 2、5、7与8), 随着多肽分子中 Trp 基团增多, 多肽与主体结合能力逐渐增强(1-7 > 1-5 > 1-2), 但是当 Trp 增加到 8 个时, K_b 不再随 Trp 的增加而增大(1-8 < 1-7)。

比较三个客体 2、3、4 的结构可以发现, 当两个 Trp 在多肽分子中处于 01、04 位置(氨基酸从左到右依此编号为 01、02、03...)时, 主、客体之间有相对较强的结合; 02、04 位置次之; 03、04 位置最弱。考察两个氨基酸的结构和性质(Trp, 有芳香环, 3 个亲水基团; Arg, 链状结构, 5 个亲水基团), 依据主客体化学中的性质近似、尺寸适合^[14, 15]原则, 可以看出 Trp 与 CD 腔体有更好的匹配, 从而进入基团最可能是多肽分子中一个或两个 Trp 组分上的苯环。众所周知, 小肽分子具有非常高的柔韧性, 通过初步的构型优化显示, 主体分子中与桥联基团相连的两个 CD 上六位碳之间的距离 d_{6C-6C} 在 0.96nm 左右, 多肽分子 2、3、4 的两个 Trp 的 α 碳之间的距离($d_{Trp-Trp}$, 图 4) 大约分别为 0.40nm[03, 04 位]、0.72nm[02, 04 位]、1.10nm[01, 04 位]), 据此结合 CD 二聚体的空间结构(图 4)可以推测, 客体 4 与二聚体 CD 1 之间存在的较强结合可能源于主体双空腔的协同效应, 即二聚体的两个空腔(d_{6C-6C}) 由于与客体的两个 Trp 在距离($d_{Trp-Trp}$)上合适, 可以分别接纳一个 Trp 形成较为稳定的超分子; 当两个 Trp 在多肽分子中处于 02, 04 或 03, 04 位置时, 即对客体 3 或 2 而言, 由于两个 Trp 组分相距太近, 彼此的进入基团由于空间跨度不够(客体两个 Trp 的 α 碳之间的距离小于主体六位碳之间的距离), 使其难以分别深入主体的两个空腔中, 从 Matsuyama 等^[16]报道 L-Trp 与 β -CD 的结合常数为 $218\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 以及本

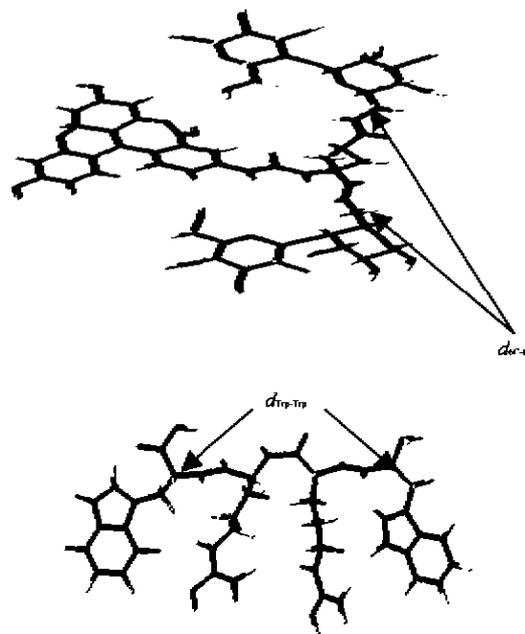


图 4 主体 1(每个 CD 仅显示出其中 2 个葡萄糖单元)和客体 4 的结构

Fig. 4 Structure of host 1 (illustrated by the bridging group and only two *D*-glucose units of every cyclic oligosaccharide) and guest 4

文 1-2 体系的数据 ($220\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$) 两者非常接近来看, 此时, 主、客体之间的包结类似于 Trp 与单个 CD 之间的结合。

考虑到肽链是由若干体积较大的氨基酸构成, 因此只与一个氨基酸相连、位于肽链一端的 Trp, 与处在肽链中间的 Trp 比较而言, 具有较小空间位阻, 在协同包结的竞争过程中, 可能优先与 CD 结合。与仅含有两个 Trp 的客体 2、3、4 不同, 5、6、7、8 四个客体分子中均包含有多个 Trp...Trp(两个 Trp 相邻、相间或相隔更远)组合。客体 5、7、8 的情况与客体 4 类似, 客体 6 的 02, 05 位两个 Trp 的 α 碳之间的距离也大约为 1.14nm, 由此预计主体 1 在与这四个客体的包结过程中, 也将产生协同效应, 这一推测从几个包合物的生成常数均大于 $10^3\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 数量级(图 3)得到了初步证实。

客体 5、6 系一对几何异构体, 它们不仅与主体 1 都有较强的结合, 而且形成的两个包合物生成常数之间也存在较大的差别($K_b^{1-6} / K_b^{1-5} = 7.98$)。比较 5、6 的结构可知, 二者结构上唯一的区别在于 6 的四个 Trp 分布于多肽的两端, 而 5 的四个 Trp 位于多肽的一侧, 由此来看, 客体 6 可能采用一种以上的

方式与主体 **1** 进行协同包结而形成几种产物, 例如, **6** 若采用 O1, O6 方式与主体结合, 则进入基团受到的位阻、邻近基团的亲水性影响(若紧挨亲水基团相对较多的 Arg 组分, 则分子内或分子间形成的氢键, 很可能影响 Trp 组分的进入基团在 CD 腔内的嵌入取向和深入程度^[17]) 均较小。有关 CD- 客体体系中客体(大体积) 众多基团的竞争包结问题、情况比较复杂, 这方面研究尚有待进一步开展。与客体 **4** 比较, 异构体 **2, 3** 难以与主体 **1** 形成稳定的包合物, 既然 $K_b^{1-4}/K_b^{1-3} = 14.57$, $K_b^{1-4}/K_b^{1-2} = 23.18$, 以及 $K_b^{1-6}/K_b^{1-5} = 7.98$ 均较大, 而大的比值意味着主体对客体有明显地异构体识别作用^[13], 可以推断, 通过选择适当结构的 CD 二聚体比如 **1** 作为主体, 利用其双空腔的协同包结机制有望实现对一组互为异构体的客体比如低分子量多肽进行鉴定、分析和分离。

客体 **2, 5, 7, 8** 的共同之处在于它们分别含有两个、四个、六个和八个彼此相连且位于多肽同一侧的 Trp 组分。 K_b^{1-2} 相对较小; $K_b^{1-3} < K_b^{1-7}$ 或 K_b^{1-8} 可能与客体基团的竞争包结有关; 当进一步增加多肽的链长, 由于空间位阻增大^[16], 预计主、客体之间的协同包结将会因此而削弱, 这从 $K_b^{1-8} < K_b^{1-7}$ 得到了证实。

从主、客体结构、邻近基团的空间位阻与亲水性、 d_{6C-6C} 与 $d_{Trp-Trp}$ 的相对大小以及经 3D 优化处理后的分子构型等因素综合来看, 主体 **1** 可能同时包结多肽分子 **4, 5, 6, 7, 8** 中处于右端位和另一个与右端位距离合适的两个 Trp 组分。若客体两个嵌入基团的跨度与主体双空腔的距离合适, 包结过程中两个 CD 便能够对客体产生较为有效的协同作用。由此可见, CD 二聚体对结构较为复杂的多肽进行包结时, 客体结构与性质对于主体双空腔能否对其产生协同包结起着很重要的作用, 这是因为多肽分子的链长以及组成多肽分子的氨基酸的结构、性质与周边环境均有可能影响主-客体包合物的形成与稳定。

致谢: 作者十分感谢日本工业技术院的 Morii 先生为本

文的质谱、荧光偏光测定等方面所做的工作。

参 考 文 献

- [1] Fujimoto T., Uejima Y., Imaki H., Kawarabayashi N., Jung J. H., Sakata Y., Kaneda T. *Chem. Lett.*, **2000**, 564.
- [2] Harata K., Song L. X., Morii H. *Supramol. Chem.*, **2000**, **11**, 217.
- [3] SONG Le-Xin(宋乐新), ZHOU Tao-Yu(周桃玉), GUO Zi-Jian(郭子建) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2001**, **17**, 9.
- [4] SONG Le-Xin(宋乐新), MENG Qing-Jin(孟庆金), YOU Xiao-Zeng(游效曾) *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **1996**, **54**, 777.
- [5] Breslow R., Dong S. D. *Chem. Rev.*, **1998**, **98**, 1997.
- [6] Song L. X. *Chin. Chem. Lett.*, **2001**, **12**, 119.
- [7] SONG Le-Xin(宋乐新), GUO Zi-Jian(郭子建) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2001**, **17**, 457.
- [8] SONG Le-Xin(宋乐新) *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **2001**, **59**, 1201.
- [9] Guim K., Ann E. R., Shompa D., Richard R. N. *Biochemistry*, **1993**, **32**, 2401.
- [10] Boger J., Corcoran R. J., Lehn L. M. *Helv. Chem. Acta*, **1978**, **61**, 2190.
- [11] Morii H., Takenawa T., Arisaka F., Shimizu T. *Biochemistry*, **1997**, **36**, 1933.
- [12] Muraki M., Moii H., Harata K. *Protein and Peptide Chem.*, **1998**, **5**, 193.
- [13] Scatchard G. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1949**, **51**, 660.
- [14] LIU Yu(刘育), ZHANG Yi-Min(张毅民), SUN Shi-Xin(孙世新), ZHANG Zhi-Hui(张智慧), CHEN Rong-Ti(陈荣梯) *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **1997**, **55**, 779.
- [15] Liu Y., Han B. H., Sun S. X., Wada T., Inoue Y. *J. Org. Chem.*, **1999**, **64**, 1487.
- [16] Matsuyama K., El-Gizawy S., Perrin J. H. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1987**, **13**, 2687.
- [17] Szejtli J., Osa T. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon: Oxford, **1996**, Vol. **3**(9), p289.
- [18] Nagata Y., Aso T., Kinoshita A., Tsujita Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1994**, **67**, 495.

**Inclusion Behavior of the Double Cyclodextrin Bridged with
(1*R*, 3*R*)-1-Amino-Cyclobutane-*cis*-1, 3-Dicarboxylic Acid
Derivative to the Peptides with Low Molecular Weight**

SONG Le-Xin TU Chao ZHAO Liang GUO Zi-Jian*

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

The interactions between several peptides with low molecular weight (guest, NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-H 2; NH₂-Arg-Trp-Arg-Arg-Trp-H 3; NH₂-Trp-Arg-Arg-Trp-H 4; NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-H 5; NH₂-Trp-Trp-Arg-Arg-Trp-Trp-H 6; NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-H 7; NH₂-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-Trp-H 8) and β -cyclodextrin dimer (host, 1) bridged with the derivative of (1*R*, 3*R*)-1-aminocyclobutane-*cis*-1, 3-dicarboxylic acid were investigated by using fluorescence polarization method in buffer aqueous solution (pH 7.4) at 298K. The binding constants of the cyclodextrin dimer 1 to the guests 2-8 were determined. It was shown that there was a cooperative action of the two cavities of a cyclodextrin dimer in the binding of large substrates, and that the structure and properties of amino acid in the peptides played very important roles in the synergic complexation between host and guest.

Keywords: cyclodextrin amino acid peptide inclusion compound molecular recognition