

质谱法研究气相中 18-冠醚-6 与氨基酸的非共价相互作用

吴若菲 黄彦东 储艳秋* 刘智攀 丁传凡*

(复旦大学化学系,上海 200433)

摘 要 利用电喷雾电离质谱研究了在气相条件下 18-冠醚-6 与 20 余种天然氨基酸及其异构体间的非共价相互作用。定性结果表明,在气相中 18-冠醚-6 可以与氨基酸形成化学计量比为 1:1 的非共价复合物。配制一系列不同浓度的 18-冠醚-6 分别与固定浓度的氨基酸反应,利用质谱测得反应物和产物的质谱峰,计算冠醚分别与 *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-赖氨酸和 *L*-天冬氨酸反应的复合物结合常数 $\lg K_a$ 分别为 3.90、3.75、4.06 和 3.64,基于此建立了校准曲线。通过竞争反应实验,以上述 4 种氨基酸与冠醚复合物的结合常数为参考值,可推算得到其余氨基酸与冠醚的结合常数。实验结果表明,冠醚-氨基酸复合物的稳定性与氨基酸的种类相关,碱性氨基酸以及侧链是烷基(或氢原子)的氨基酸对冠醚的亲合性更好,而酸性氨基酸(如 *L*-丝氨酸)以及侧链上有酰胺键的氨基酸,对冠醚的亲合性较低。研究了 18-冠醚-6 对 *L* 型氨基酸及其 *D* 型异构体的手性选择性,结果表明,18-冠醚-6 只能识别部分中性氨基酸。

关键词 18-冠醚-6; 氨基酸; 电喷雾电离质谱; 非共价相互作用

1 引言

1967 年,杜邦公司的 Pedersen^[1,2] 在实验室首次合成了一种新的大环聚醚化合物,这类化合物主要由 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 的重复单元组成,由于其形状酷似皇冠,所以被统称为冠醚。典型的冠醚及其衍生物如图 1 所示,冠醚的命名原则通常采用 Pedersen 法^[1]。例如 1,4,7,10,13,16-六氧环十八烷 $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_6$ (图 1a),可称为 18-冠醚-6(简写成 18-冠-6 或 18c6)。

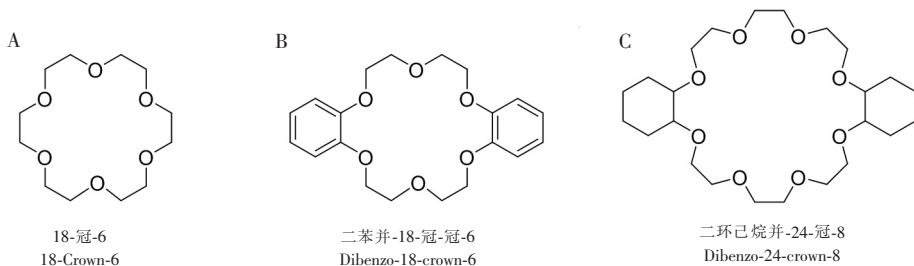


图 1 典型的冠醚及衍生物示意图
Fig. 1 Diagram of some classical crown ethers

冠醚外层亲脂而内层亲水,其空腔可由不同的合成方法被调控,因此,它能够选择性地与金属阳离子或其它小分子络合^[3,4]。此外,冠醚衍生物还可以手性识别和分离某些对映体化合物^[5,6]。如今,冠醚的应用涉及生物化学、能源等多个领域,包括离子选择性电极、离子活化与抑制、色谱手性固定相、大环液晶、相转移催化剂、膜转运离子载体等^[7~10]。

近年来,由于冠醚与蛋白质或多肽等生物大分子中的某些氨基酸残基如赖氨酸残基的特异性结合非共价相互作用日益受到人们的关注,这种结合使得冠醚可以作为蛋白质的结构探针,即冠醚具有潜在的分子识别作用^[11]。在进行以非共价方式加合蛋白质的探针实验^[12~13]时,冠醚类化合物可与蛋白质上的赖氨酸残基的侧链相结合。Stedwell 等^[14]通过红外多光子解离技术研究了冠醚与质子化氨基酸形

成的复合物,红外光谱图显示 NH_3^+ 中 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动的红移比较明显,表明 NH_3^+ 与冠醚间的相互作用相当稳定。Chen 等^[15]通过导向离子束串联质谱(GIB-MS)及理论计算,对 18-冠-6 与 5 种氨基酸分别形成的复合物进行研究,发现冠醚与氨基酸的结合常数随其质子亲和性增强而减小。研究冠醚与各种氨基酸间结合作用的强弱,对于冠醚在多肽药物的筛选,以及冠醚在靶向药物方面的应用都具有积极意义。但目前尚未见对冠醚和常见氨基酸的非共价作用进行系统性定性和定量分析的文献报道。

近年来,随着质谱技术迅速发展,电喷雾质谱已经成为研究非共价复合物一种强有力的工具^[16,17]。本研究在以 18-冠-6 为代表,采用电喷雾电离质谱法(ESI-MS)研究冠醚对 20 种 *L* 型天然氨基酸的非共价作用,用质谱滴定法定量测定 18-冠-6 分别与 20 种 *L* 或 *D* 型氨基酸的结合常数,探讨不同氨基酸的氨基端、羧基端和侧链对复合物结合强度的影响,同时用简易的方法探索了 18-冠-6 对氨基酸对映体的手性选择性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

电喷雾电离质谱(ESI-MS)仪器为 API3000 型质谱仪(SCIEX 公司),质量精度由聚丙二醇(PPG)校准,实验气体均为 99.99% 的高纯氮气。

18-冠-6(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);甘氨酸(Glycine, Gly)、*L*-赖氨酸(Lysine, Lys)、*L*-精氨酸(Arginine, Arg)、*L*-组氨酸(Histidine, His)、*L*-丙氨酸(Alanine, Ala)、*L*-苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)、*L*-色氨酸(Tryptophan, Trp)、*L*-缬氨酸(Valine, Val)、*L*-亮氨酸(Leucine, Leu)、*L*-异亮氨酸(Isoleucine, Ile)、*L*-脯氨酸(Proline, Pro)、*L*-蛋氨酸(Methionine, Met)、*L*-酪氨酸(Tyrosine, Tyr)、*L*-丝氨酸(Serine, Ser)、*L*-苏氨酸(Threonine, Thr)、*L*-半胱氨酸(Cysteine, Cys)、*L*-天冬氨酸(Aspartic acid, Asp)、*L*-天冬酰胺(Asparagine, Asn)、*L*-谷氨酸(Glutamic acid, Glu)和 *L*-谷氨酰胺(Glutamine, Gln)及它们的 *D* 型异构体(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度 $\geq 98\%$)。

2.2 实验方法

ESI 正离子模式,电喷雾电压为 4.5 kV,进样速率为 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。实验中,所有溶剂均为甲醇-水体系(1:1, *V/V*, 含有 0.1% 甲酸), $\text{pH}=3.6$ 。

2.2.1 质谱滴定法测定 18-冠-6 分别与 Tyr、Phe、Lys 和 Asp 的结合常数 参照文献[18]中 ESI-MS 测定 β -环糊精与磺化偶氮染料配体反应的结合常数的方法,建立质谱滴定法,进行定量分析,方程如下:

$$a_m = \frac{[\text{HG}]}{[\text{H}]_0} = \frac{I_{\text{HG}}}{I_{\text{H}} + I_{\text{HG}}} \quad (1)$$

$$k_{\text{d},m} = \frac{(1 - \sum a_n)([\text{G}]_0 + [\text{H}]_0 \sum n a_n)^m}{a_m} \quad (2)$$

$$K_{\text{a}} = \frac{1}{K_{\text{d}}} \quad (3)$$

其中, $[\text{H}]_0$ 和 $[\text{G}]_0$ 分别为 18-冠-6 和氨基酸的初始浓度, $[\text{HG}]$ 表示 18-冠-6 与质子化氨基酸的复合物 ($[\text{18c6} + \text{AA} + \text{H}]^+$) 的平衡浓度, I_{H} 和 I_{HG} 分别为 $[\text{18c6} + \text{H}]^+$ 和 $[\text{18c6} + \text{AA} + \text{H}]^+$ 的峰强。式(2)中, $1 \leq m \leq n$ 。由于 $[\text{H}]_0$ 和 $[\text{G}]_0$ 已知,故可推导求得解离常数 K_{d} 和结合常数 K_{a} 。通过测定不同浓度的 18-冠-6 与固定浓度的氨基酸的结合常数,即可求得结合常数的平均值,并得到浓度-峰强的校准曲线。

2.2.2 竞争反应 根据文献[17],在得到了样品的结合常数和浓度-峰强的校准曲线后,可以用竞争反应的方法测定其它氨基酸及其异构体与冠醚的结合常数。为避免不同性质的氨基酸混合后发生反应,根据氨基酸侧链的极性和酸碱性,分别以酸性氨基酸 *L*-Asp、碱性氨基酸 *L*-Lys、非极性氨基酸 *L*-Phe 和中性氨基酸 *L*-Tyr 与 18-冠-6 为第一客体(参比物),其余氨基酸为第二客体(待测物质),利用竞争反应方程求得第二客体与冠醚(主体)的结合常数。

$$[\text{H}]_{\text{F}} = [\text{H}]_{\text{T}} - ([\text{HG}_{\text{R}}]_{\text{F}} + [\text{HG}_{\text{N}}]_{\text{F}}) \quad (4)$$

$$[\text{G}_{\text{N}}]_{\text{F}} = [\text{G}]_{\text{T}} - [\text{H}_{\text{N}}]_{\text{F}} \quad (5)$$

$$K_R = \frac{[HG_R]_F}{\{[H]_T - ([HG_R]_F + [HG_N]_F)\}([G]_T - [HG_R]_F)} \quad (6)$$

$$K_N = \frac{[HG_N]_F}{[H]_F [G_N]_F} \quad (7)$$

式中, $[H]_T$ 和 $[G]_T$ 分别表示 18-冠-6 和氨基酸的初始浓度, $[H]_F$ 和 $[G]_F$ 分别表示 18-冠-6 和氨基酸的平衡浓度; K_R 和 K_N 分别代表参比物质和待测的复合物的结合常数。其中 $[H]_T$ 、 $[G]_T$ 和 K_R 已知, $[HG_R]_F$ 从校准曲线中推导而来, 由此可计算得到 K_N 值。

3 结果与讨论

3.1 产物与反应物浓度的关系

将 18-冠-6 与 *L*-Phe 按不同比例混合, 使得冠醚与氨基酸的摩尔比分别为 1.0:2.5 和 1.0:1.0, 质谱图如图 2 所示, m/z 264.6、282.1 和 430.2 的峰对应于离子 $[18c6+H]^+$ 、 $[18c6+H_2O+H]^+$ 、 $[18c6+L-Phe+H]^+$ 。由此可知, 18-冠-6 与 *L*-Phe 反应可形成稳定的、配合比为 1:1 的非共价复合物。

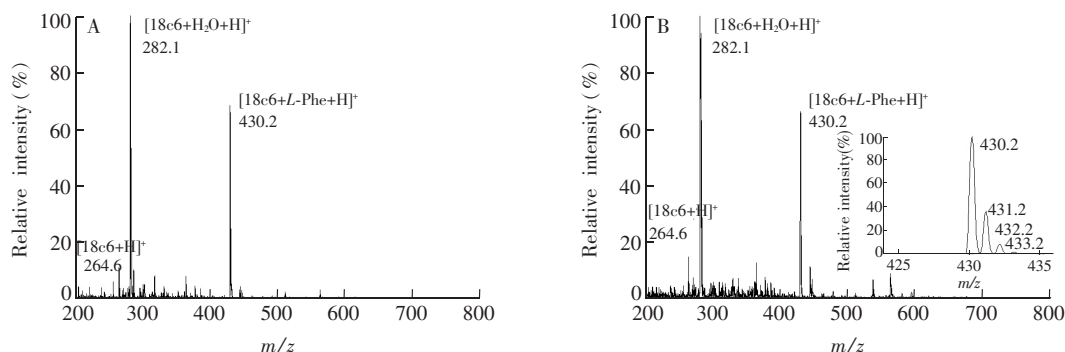


图2 18-冠-6 与 *L*-Phe 以 1:2.5 (A) 和 1:1 (B) 摩尔比混合物的质谱图, B 中插图是 $m/z=430$ 附近谱峰的高分辨质谱图

Fig. 2 Mass spectra of 18-crown-6 (18c6) mixed with *L*-Phe in different molar ratios: (A) $[18c6]:[L-Phe] = 1:2.5$ (B) $[18c6]:[L-Phe] = 1:1$. Inset in B is the high resolution mass spectrum of peaks around $m/z=430$

3.2 串联质谱结果

对 $[18c6+L-Phe+H]^+$ 在质心坐标能量 (Center of mass frame collision energy, E_{CM}) 为 1.2 eV 下进行碰撞诱导解离, 得到的碎片如图 3 所示, $[18c6+L-Phe+H]^+$ 发生解离, 主要产生 m/z 89.0、133.2、166.3、177.3 和 265.1 碎片离子。其中 m/z 265.1、177.3、133.3、89.0 的质谱峰分别表示 $[18c6+H-nC_2H_4O]^+$ ($n=0, 2, 3, 4$) 的离子, m/z 166.3 的质谱峰为 $[L-Phe+H]^+$ 。在图 3 中未出现其它碎片离子, 初步推断在进行 CID 时, 复合物中的氨基酸与冠醚结合的位点会优先断开, 其次是冠醚环状骨架的碎裂, 因此, 仅凭 CID 无法判断 18-冠-6 与 *L*-Phe 的结合位点。将 18-冠-6 分别与 *L*-Asp、*L*-Lys、*L*-Phe 和 *L*-Tyr 以 1:1 的化学计量比混合, 进行碰撞诱导解离, 前体离子强度随碰撞能量的变化如图 4 所示。以图 4 中 50% 的前体离子解离时的质心坐标能量值 (E_{CM50}) 衡量 18-冠-6 与对应的氨基酸形成的复合物的稳定性。 $[18c6+L-Lys+H]^+$ 在解离 50% 时, (E_{CM50}) 最大, 即 $[18c6+L-Lys+H]^+$ 最为稳定。由此可知, 上述 4 种氨基酸对 18-冠-6 的亲合性按 *L*-Lys、*L*-Phe、*L*-Tyr、*L*-Asp

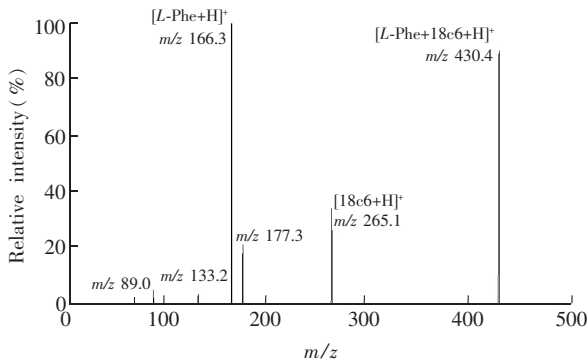


图3 $[18c6+L-Phe+H]^+$ 在 $E_{CM}=1.2$ eV 下的串联质谱图

Fig. 3 Collision induced dissociation (CID) mass spectrum of the complex of 18c6 with *L*-Phe at 1.2 eV in the center of mass frame

的顺序依次降低。

3.3 结合常数的计算

将不同浓度的 18-冠-6 与 *L*-Phe 混合,使得混合后 18-冠-6 的浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mmol/L,氨基酸的浓度为 0.10 mmol/L。由一级质谱图和式(1)、(2)、(3)可以得到表 1。

采用同样方法可以得到冠醚分别与 *L*-Tyr、*L*-Lys 和 *L*-Asp 及与其 *D* 型异构体间的结合常数(表 2)。结合图 4 可知,定性分析结果与定量计算结果相符。以 *L*-Asp、*L*-Lys、*L*-Phe 和 *L*-Tyr 为第一客体,分别绘制校准曲线(表 3)。

将 18-冠-6 与 *L*-Phe 按摩尔比 1:1 混合,两种物质的初始浓度均为 0.10 mmol/L。反应后的质谱图

表 1 质谱滴定法计算 18-冠-6 与 *L*-Phe 的结合常数

Table 1 lg*K*_a of 18c6-*L*-Phe by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) titration

18-冠-6 浓度 [18c6] (mmol/L)	<i>L</i> -苯丙氨酸浓度 [<i>L</i> -Phe] (mmol/L)	[18c6+H] ⁺ 峰强 <i>I</i> _H (10 ⁶ cps)	[18c6+H ₂ O] ⁺ 峰强 <i>I</i> _{H+H₂O} (10 ⁶ cps)	复合物峰强 <i>I</i> _{H-C} (10 ⁶ cps)	<i>a</i> ₁	结合常数 lg <i>K</i> _a
0.02	0.10	1.34	14.04	9.10	0.36	3.81
0.04	0.10	1.44	14.14	9.36	0.36	3.85
0.06	0.10	1.22	14.40	9.96	0.39	3.92
0.08	0.10	1.98	14.38	10.18	0.38	3.95
0.10	0.10	2.26	15.6	10.42	0.37	3.97
平均值 Average			3.90			
方差 SD			0.07			
相对标准偏差 RSD(%)			1.8			

表 2 4 种参比物质与 18-冠-6 的结合常数

Table 2 lg*K*_a for the complexes of 18c6 with reference amino acids

氨基酸 Amino acid	结合常数 lg <i>K</i> _a	氨基酸 Amino acid	结合常数 lg <i>K</i> _a
<i>L</i> -Phe	3.90	<i>D</i> -Phe	3.99
<i>L</i> -Tyr	3.75	<i>D</i> -Tyr	3.62
<i>L</i> -Lys	4.06	<i>D</i> -Lys	4.01
<i>L</i> -Asp	3.64	<i>D</i> -Asp	4.08

如图 5A 所示,则可根据式(1)、(2)和(3)推出 [18c6+*L*-Phe+H]⁺的平衡浓度为 3.72×10⁻⁵ mol/L。同理,将 18-冠-6、*L*-Phe 和 *L*-Met 按摩尔比 1:1:1

混合,上述物质初始浓度也均为 0.10 mmol/L,反应后的质谱图如图 5B 所示。因为 [18c6+*L*-Phe+H]⁺的峰强由 1.04×10⁷ cps(图 5A)下降到 0.99×10⁷ cps(图 5B),故可推出加入 *L*-Met 后 [18c6+*L*-Phe+H]⁺的平衡浓度变为 2.65×10⁻⁵ mol/L。由式(6)可得到 [18c6+*L*-Met+H]⁺的平衡浓度为 3.12×10⁻⁵ mol/L,又 [18c6+H]⁺和 [*L*-Met+H]⁺的平衡浓度可由式(4)、(5)得到,故最终可由式(7)求得 18-冠-6 与 *L*-Met 的结合常数 lg*K*_a=4.04。同理,18-冠-6 与其它的 *L*-氨基酸或其 *D* 型异构体的结合常数列于表 4 中。

由表 2 和表 4 可知,在 *L* 型氨基酸中,碱性氨基酸以及侧链组成是烷基(或氢原子)的氨基酸对 18-冠-6 的亲和力较大。具体而言,碱性氨基酸中的 *L*-Lys、*L*-Arg、*L*-His 与冠醚的结合常数分别为 4.06、4.09 和 3.93,其共同点是氨基酸上有不止一个氨基,由此可推测 *N*-端氨基可能是冠醚与氨基酸间的配

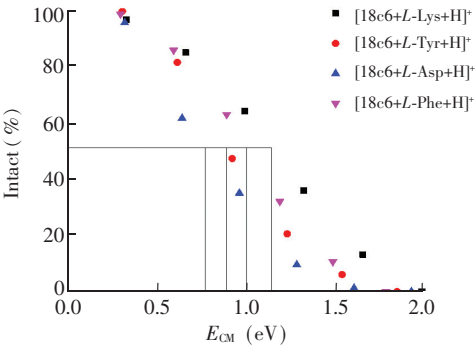


图 4 18-冠-6 分别与 *L*-Asp、*L*-Lys、*L*-Phe 和 *L*-Tyr 形成的复合物母离子强度随碰撞能量的变化关系

Fig. 4 Normalized percentage of the intact complexes plotted against collision energy of mass frame

表 3 *L*-Phe、*L*-Tyr、*L*-Lys 和 *L*-Asp 与冠醚形成的复合物的浓度-峰强校准曲线

Table 3 Linear equations for the complexes of 18c6 with *L*-Phe, *L*-Tyr, *L*-Lys and *L*-Asp

氨基酸 Amino acid	线性方程 Linear equation	相关系数 <i>R</i> ²
<i>L</i> -Phe	<i>y</i> _a =4.57×10 ¹⁰ <i>x</i> +8.72×10 ⁶	0.994
<i>L</i> -Tyr	<i>y</i> _b =9.61×10 ¹⁰ <i>x</i> +3.16×10 ⁶	0.997
<i>L</i> -Lys	<i>y</i> _c =3.09×10 ¹⁰ <i>x</i> +2.77×10 ⁶	0.998
<i>L</i> -Asp	<i>y</i> _d =1.21×10 ¹¹ <i>x</i> +1.43×10 ⁶	0.994

注:下标 a、b、c 和 d 表示不同的氨基酸分组。
Note: Thesubscript a, b, c or d were symbols representing different equations.

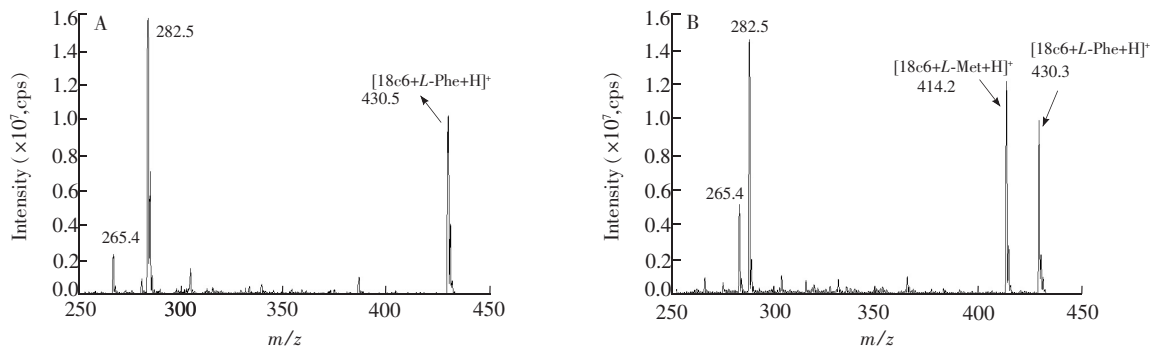


图5 (A)18-冠-6 和 *L*-Phe 按摩尔比 1:1 混合后的质谱图,(B)18-冠-6、*L*-Phe 和 *L*-Met 按摩尔比 1:1:1 混合后的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of the host-guest system for the complexes of 18c6 (host) with the reference guest *L*-Phe (A), and with the reference guest *L*-Phe and the second guest *L*-Met (B)

表 4 通过竞争反应测定的 18-冠-6 与氨基酸的结合常数

Table 4 Binding constants for the complexes of 18c6 with amino acids using the competitive ESI-MS method

氨基酸 Amino Acid	结合常数 lg <i>K</i> _a	氨基酸 Amino Acid	结合常数 lg <i>K</i> _a	氨基酸 Amino Acid	结合常数 lg <i>K</i> _a	氨基酸 Amino Acid	结合常数 lg <i>K</i> _a
<i>L</i> -Trp	4.04 ^a	<i>D</i> -Trp	4.00 ^a	<i>L</i> -Cys	3.80 ^b	<i>D</i> -Cys	3.88 ^b
<i>L</i> -Ala	4.11 ^a	<i>D</i> -Ala	4.00 ^a	<i>L</i> -Asn	3.34 ^b	<i>D</i> -Asn	3.69 ^b
<i>L</i> -Val	4.01 ^a	<i>D</i> -Val	4.00 ^a	<i>L</i> -Gln	2.93 ^b	<i>D</i> -Gln	3.28 ^b
<i>L</i> -Leu	4.10 ^a	<i>D</i> -Leu	3.93 ^a	<i>L</i> -Ser	3.50 ^b	<i>D</i> -Ser	4.06 ^b
<i>L</i> -Ile	3.84 ^a	<i>D</i> -Ile	4.00 ^a	<i>L</i> -Arg	4.09 ^c	<i>D</i> -Arg	4.07 ^c
<i>L</i> -Pro	3.17 ^a	<i>D</i> -Pro	3.15 ^a	<i>L</i> -His	3.93 ^c	<i>D</i> -His	3.97 ^c
<i>L</i> -Met	4.04 ^a	<i>D</i> -Met	4.08 ^a	<i>L</i> -Glu	4.01 ^d	<i>D</i> -Glu	3.99 ^d
<i>L</i> -Thr	3.36 ^b	<i>D</i> -Thr	3.45 ^b	Gly	4.12 ^b		

注: 下标 a、b、c 和 d 表示不同的氨基酸分组(与表 3 含义相同)。
Note: The subscript a, b, c or d are symbols representing different equations, which is the same as in Table 3.

位点。在对冠醚亲和性更高的几个氨基酸中,*L*-Leu 对冠醚的亲合性比 *L*-Ala 和 *L*-Gly 低,可能因为侧链中异丁基的空间效应。

L-Pro 与冠醚的结合常数($\lg K_a = 3.17$)较低,可能的原因在于 *N*-端的刚性结构使其不易与冠醚结合。酸性氨基酸中,*L*-Glu 与冠醚的结合常数($\lg K_a = 4.01$)大于 *L*-Asp($\lg K_a = 3.64$),因为 *L*-Glu 侧链上的羧基离 *N*-端氨基较远,吸电子效应更低。在中性氨基酸中,*L*-Ser 和 *L*-Thr 对冠醚的亲合力也较低,推测是 *N*-端氨基上的氮原子与侧链的羟基上的氧原子间形成了分子内氢键^[19]、导致质子化的氨基难以进攻冠醚;*L*-Asn 或 *L*-Gln 与冠醚的结合常数是 20 种氨基酸中最低的,可能因为它们的侧链上具有吸电子的酰胺。

此外,测量和计算方法也会对氨基酸跟冠醚的结合常数的大小产生影响。Chen 等^[15]的实验结果表明,在碱性氨基酸中,*L*-Lys 对 18-冠-6 的亲合性最强,故 *L*-Lys 残基的侧链是冠醚与蛋白质或多肽类物质结合时的有效位点;Gly 对冠醚的亲合性最强,即比起氨基酸侧链上的氨基,其 *N*-端上的氨基更易与冠醚配位。Chen 等^[15]认为这是因为 18-冠-6 具有三重对称轴(D_{3d}),且空腔尺寸合适,所以形成了 3 个 $N-H \cdots O$ 的氢键,而冠醚能使质子化的 NH_3^+ 稳定存在,即冠醚对 NH_3^+ 有很好的亲合力。Yu 等^[20]通过荧光滴定法测得的 18-冠-6 与 Trp 的结合常数($\lg K_a = 2.19$)低于本研究测得值($\lg K_a = 4.04$)。这是因为 ESI-MS 会加强静电作用,削弱疏水作用,因此通过 ESI-MS 测得的结合常数大于通过荧光法测得值。

总之,因氨基酸侧链上的基团不同,氨基酸对 18-冠-6 的亲合性也不同。通常,当氨基酸具有多个 $-NH_2$ 基团或不含侧链时,它对冠醚的亲合性会更高。因此,推测 $-NH_3^+$ 与冠醚的配位方式如图 6 所示。

由表 2 和表 4 还可发现,由于氨基酸对映异构体的空间结构上的差异,冠醚对 *L* 型氨基酸的亲合性与

对其异构体的亲和性并不一致。例如, *D*-Phe 侧链上的苄基与氨基为异侧, 减小了 *N*-端氨基与冠醚配位时的位阻, 因此 *D*-Phe 与 18-冠-6 的结合常数 ($\lg K_a = 3.99$) 略大于 *L*-Phe 与冠醚的结合常数 ($\lg K_a = 3.90$)。

Usacheva 等^[21] 等采用量热法探讨了 *L*-Phe 与 18-冠-6 的复合物稳定性, 结果表明, 溶剂组成对 *L*-Phe 与 18-冠-6 复合物的稳定性也会产生影响, 在水和乙醇混合溶剂中, 提高乙醇的比例有利于复合物的稳定和复合过程的放热。

3.4 18-冠-6 对 *L* 型氨基酸及其异构体的选择性

冠醚对 *L* 型氨基酸及其 *D* 型异构体的手性识别能力可由手性选择性 (R_{chiral})^[22,23] 衡量。计算公式如下:

$$R_L = \frac{I_{L\text{-complex}}}{I_{18c6}}$$

(8)

$$R_D = \frac{I_{D\text{-complex}}}{I'_{18c6}}$$

(9)

$$R_{\text{Chiral}} = \frac{R_L}{R_D}$$

(10)

根据 R_{chiral} 的大小, 可以定性判定冠醚对氨基酸异构体的手性识别能力: R_{chiral} 越偏离 1, 冠醚的手性识别力越好; 反之, 手性识别能力越差。

将 18-冠-6 分别与 *L*-Asn、*D*-Asn 等摩尔混合, 得到的质谱图如图 7 所示, 结合式(8)和(9)计算出 $R_L(0.18)$ 和 $R_D(0.35)$ 的值, 继而由式(10)得到 18-冠-6 对 *L*-Asn 和 *D*-Asn 的手性选择性 $R_{\text{chiral}} = 0.50$ 。

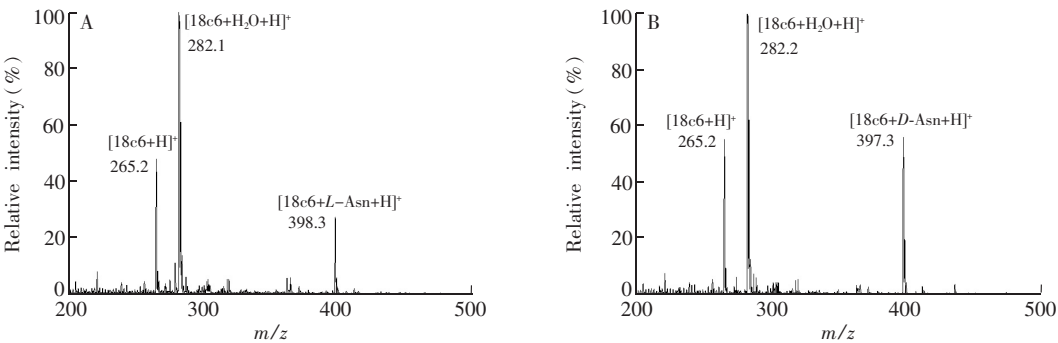


图 7 18-冠-6 与 (A) *L*-Asn 和 (B) *D*-Asn 按摩尔比 1:1 混合后的质谱图

Fig. 7 Mass spectra of complexes of 18c6 with (A) *L*-Ser and (B) *D*-Ser at molar ratio of 1:1

18-冠-6 对 19 种天然氨基酸的对映异构体的手性选择性如表 5 所示, 18-冠-6 对中性氨基酸的 R_{chiral} 多偏离 1, 例如 Asn、Gln、Ser 和 Thr 的 R_{chiral} 分别为 0.50、0.45、0.57 和 0.72, 表明冠醚可识别这 4 种氨基酸的异构体; 但对于碱性氨基酸, $R_{\text{chiral}} \approx 1$, 即冠醚基本无法识别 Lys、Arg 和 His; 对于多数的非极性氨

表 5 18-冠-6 对 *L* 型和 *D* 型氨基酸的手性选择性

Table 5 Chiral selectivity (R_{chiral}) of 18c6 with *L*- and *D*-amino acids

氨基酸 Amino Acid	手性选择性 R_{chiral}	氨基酸 Amino Acid	手性选择性 R_{chiral}	氨基酸 Amino Acid	手性选择性 R_{chiral}	氨基酸 Amino Acid	手性选择性 R_{chiral}
Ser	0.57	Tyr	1.23	Ala	1.06	Arg	1.01
Thr	0.72	Phe	0.93	Val	1.00	His	0.98
Asn	0.50	Trp	1.02	Leu	1.01	Asp	0.75
Gln	0.45	Pro	1.10	Met	0.96	Glu	1.02
Ile	0.59	Lys	1.10	Cys	0.89		

氨酸(如 Phe、Trp、Ala、Val),冠醚也很难识别;但是,从现有的数据中并未发现酸性氨基酸的相关规律。因此,18-冠-6 只能识别一部分中性氨基酸的手性异构体。

尽管如此,若使冠醚衍生物具有手性中心,则能大大增强冠醚类化合物对手性物质的识别能力^[24,25]。

4 结论

本研究利用 ESI-MS 研究了 18-冠醚-6 和 20 种天然氨基酸之间的非共价相互作用。结果表明,18-冠醚-6 与氨基酸能形成化学计量比为 1:1 的非共价复合物。冠醚主要通过与其氨基酸上的 $-\text{NH}_2$ 配位而与其结合,故在 L 型氨基酸中,侧链为烷基(或氢原子)的氨基酸、碱性氨基酸对冠醚的亲合性更强。同时,实验也表明冠醚仅能识别部分中性氨基酸及其异构体。

拟在本研究基础上,继续研究冠醚与特定的多肽的结合情况,观察是否符合冠醚与氨基酸的结合规律,也可以探索空腔尺寸不同的冠醚或冠醚衍生物与氨基酸极其衍生物的结合情况,以期为冠醚类化合物在生物制药筛选等领域的发展提供参考。

References

- 1 Pedersen C J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1988**, 27: 1021–1027
- 2 Ge L, Still W C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115: 3804–3805
- 3 LIU Yong, LIU Yu-Ming, XIA Zhi-Ning. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2003**, 31(12): 1500–1503
刘勇, 刘玉明, 夏之宁. *分析化学*, **2003**, 31(12): 1500–1503
- 4 Al-Jallal N A, Al-Kahtani A A, El-Azhary A A. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109: 3694–3703
- 5 Lee A, Choi H J, Jin K B, Hyun M H. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(26): 4071–4076
- 6 Yamashita J, Minagawa M, Sonobe A, Ohashi S. *Chem. Lett.*, **1982**, 9: 1409–1412
- 7 Ackerman R G, Brown W H, Wright G F. *J. Org. Chem.*, **1955**, 20: 1147–1158
- 8 Brown G R, Foubister A. *J. Med. Chem.*, **1983**, 26: 590–592
- 9 LIU Yu-Jian, LIU Zhi-Min, XU Zhi-Gang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(3): 369–373
刘育坚, 刘智敏, 许志刚. *分析化学*, **2017**, 45(3): 369–373
- 10 Mistarz U H, Brown J M, Haselmann K F, Rand K D. *Structure*, **2016**, 24: 310–318
- 11 Gromiha M M, Selvaraj S. *Curr. Bioinform.*, **2008**, 3(1): 1–9
- 12 Liu Z J, Cheng S J, Gallie D R, Julian R R. *Anal. Chem.*, **2008**, 80: 3846–3852
- 13 Frański R, Schroeder G, Kamysz W, Niedzialkowski P, Ossowski T. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42: 459–466
- 14 Stedwell C N, Galindo J F, Gulyuz K, Roitberg A E, Polfer N C. *J. Phys. Chem. A*, **2013**, 117: 1181–1188
- 15 Chen Y, Rodgers M T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134: 5863–5875
- 16 Schmidt A C, Neustadt M, Otto M. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42: 771–780
- 17 Kempen E C, Brodbelt J S. *Anal. Chem.*, **2000**, 72: 5411–5416
- 18 Zhang H R, Chen G, Wang L, Ding L, Tian Y, Jin W Q, Zhang H Q. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 252: 1–10
- 19 TANG Ming-Sheng, LI Xiao-Fei. *J. Zhengzhou Univ.*, **2004**, 36(3): 59–63
唐明生, 李晓飞. *郑州大学学报(理学版)*, **2004**, 36(3): 59–63
- 20 Yu Q, Cao J, Liu T, Wang Z. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2009**, 25(3): 362–367
- 21 Usacheva T R, Shamin V A, Chemov I V, Matteoli E, Terekhova I V, Kumeev R S. *Chem. Phys. Lett.*, **2012**, 543: 155–158
- 22 Wei W, Chu Y, Wang, R, He, X, Ding, C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2015**, 29: 927–936
- 23 LI Ming, CHEN Huan-Wen, LIU Zhi-Qiang, LIU Shu-Ying, JIN Qin-Han. *Prog. Chem.*, **2006**, 18(10): 1369–1374
李明, 陈焕文, 刘志强, 刘淑莹, 金钦汉. *化学进展*, **2006**, 18(10): 1369–1374
- 24 YUAN Bi, CHEN Wei-Hong, WANG Wu-Lin, SHI Hao. *Zhejiang Chemical Industry*, **2013**, 44(5): 25–31
袁碧, 陈卫红, 汪吴林, 石浩. *浙江化工*, **2013**, 44(5): 25–31
- 25 Wu E Q, Kim K T, Adidi S K, Lee Y K, Cho J W, Lee W, Kang J S, *Arch. Pharm. Res.*, **2015**, 38(8): 1499–1505

Investigation of Non-covalent Interactions of 18-Crown-6 with Amino Acids in Gas Phase by Mass Spectrometry

WU Ruo-Fei, HUANG Yan-Dong, CHU Yan-Qiu*, LIU Zhi-Pan, DING Chuan-Fan*

(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract The non-covalent interactions between 18-crown-6 (18c6) and 20 common types of protonated amino acids were explored by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The mass spectra showed the formation of 1 : 1 stoichiometric non-covalent complexes between 18c6 and amino acids. The calibration curves and linear equations for the complexes of *L*-Phe, *L*-Tyr, *L*-Lys and *L*-Asp with 18c6 were established by mass spectrometric titration and used as reference values for competitive ESI-MS. Through competitive equilibrium, the binding constants for the complexes of 18c6 with other *L*-amino acids and their *D*-isomers were derived. It was found, as a general trend, lgKa for the complexes of 18c6 with the basic amino acid and the amino acid with alkyl side chain were larger than other complexes, and among the amino acids with alkyl side chain, Gly and Ala exhibited greater 18c6 binding affinities. As for Ser and Thr, the intramolecular hydrogen bond between the nitrogen atom from terminal —NH₂ and the oxygen atom from carboxyl may impede their protonated amino-group to attack the 18c6. Furthermore, Gln and Asn exhibited lower 18c6 binding affinities probably due to effects of electron-withdrawing group of acylamide. Finally, the chiral selectivity of 18c6 for 19 *L*-, or *D*-amino acids was measured by ESI-MS, indicating 18c6 could only recognize some neutral amino acid isomers.

Keywords 18-Crown-6; Amino acid; Electrospray ionization mass spectrometry; Non-covalent binding affinity

(Received 5 May 2017; accepted 20 September 2017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 2011YQ14015006).

(上接 224 页)

沃特世公司营销副总裁 Jeff Mazzeo 表示:“能够与马尔文帕纳科这样的创新企业携手攻克棘手的分子表征难题,沃特世深感荣幸。作为各自领域的领军企业,我们将以此次合作为契机,整合并优化双方技术,协助科学家们实现其分析目标。”

马尔文帕纳科先进材料副总裁 Steven Horder 表示:“马尔文帕纳科很荣幸能与沃特世公司合作,让 OMNISEC REVEAL 先进检测器模块成为高分离度、高分离效率的 APC 系统的完美搭档,充分发挥其高灵敏度、低扩散性的优势。我们相信这套组合系统的分析能力一定能让研究人员满意,因为它拥有适合天然聚合物和合成聚合物分析的绝佳性能,能挖掘出其它分析技术可能会忽视的详细信息。沃特世 APC 与马尔文帕纳科 OMNISEC REVEAL 强强联合,为聚合物的研发翻开了新的篇章,并有望研发出性能更加出众的产品。”