气相中环糊精与甘氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸和 甘氨酸三肽非共价复合物的质谱研究

何小丹 许崇晟 储艳秋 丁传凡*

(复旦大学化学系 上海市分子催化和功能材料重点实验室 上海 200433)

摘要 为了探索环糊精和寡肽的非共价相互作用,一定化学计量比的 α -, β -, γ -环糊精(CD)分别和甘氨酸三肽(GGG)、甘氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸三肽(GFF)在室温下反应达到平衡并用正离子模式质谱检测。实验结果显示 GGG, GFF 均可以和 α -, β -, γ -CD 生成 1:1 配合比的非共价复合物。碰撞诱导解离实验进一步验证了 α -, β -, γ -CD 与 GGG, GFF 非共价复合物的形成。质谱滴定法测得的结合常数结果表明环糊精和两种三肽形成非共价复合物的结合强度均按照 γ -, β -, α -CD 的次序逐渐增大。GGG 和 α -, β -, γ -CD 复合物的结合常数分别为 2799.96, 2528.73, 1697.11 L·mol⁻¹, GFF 和 α -, β -, γ -CD 复合物的结合常数分别为 2773.94, 2134.03, 1330.68 L·mol⁻¹。对于 α -, β -或 γ -CD, 含有苯基的 GFF+CD 复合物的结合强度要小于相应的脂肪族的 GGG+CD 复合物, 表明虽然在气相 GFF+CD 复合物的构象与溶液中的构象有所变化, 但是苯基仍然参与和环糊精疏水腔体的键合作用。

关键词 环糊精; 三肽; 非共价复合物; 质谱法; 生成常数

Investigation on Non-Covalent Complexes of Cyclodextrins with GGG and GFF Tripeptides in Gas Phase by Mass Spectrometry

He, Xiaodan Xu, Chongsheng Chu, Yanqiu Ding, Chuanfan*

(Shanghai Key Laboratory of Molecular Catalysis and Innovative Materials, Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract To investigate the non-covalent interaction between α -, β -, γ -cyclodextrins and peptides, a stoichiometry of α -, β -, γ -cyclodextrins (CD) with GGG (Gly-Gly-Gly) or GFF (Gly-Phe-Phe) was mixed respectively, and then incubated at room temperature for 12 h to reach the equilibrium. In positive mode, the electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) results indicated that α -, β -, γ -CD with GGG or GFF could form non-covalent complexes, respectively. The binding of cyclodextrins with GGG or GFF was further confirmed by collision induced dissociation (CID) in a tandem mass spectrometer. The formation constants of six complexes (GGG+CD and GFF+CD) were determined by mass spectrometric titration. The results showed the formation constants for both GGG's and GFF's complexes increased according to the order γ -CD, β -CD, α -CD. The formation constants K_{st} values for GGG complexes with α -CD, β -CD or γ -CD are 2799.96, 2528.73, 1697.11 L·mol⁻¹, respectively. While the formation constants K_{st} values for GFF complexes with α -CD, β -CD or γ -CD are 2773.94, 2134.03, 1330.68 L·mol⁻¹ respectively. For α -CD, β -CD or γ -CD, the K_{st} values of GFF complexes containing aromatic group are smaller than those of GGG complexes only containing aliphatic group. The main reason is that in gas phase, with the weakening of hydrophobic force, Van der Waals force plays an important role in the conjugation process of GFF with CD, the coordinating group of GFF is still phenyl group. While in GGG's complexes, the hydrogen bond dominates in the conjugation process. Our convincing results from the formation constants provides a new evidence, indicating that although the conformations for GFF+CD complexes change slightly when the analysts transfer from solution to gas phase, the phenyl group still takes part in coordinating.

Keywords cyclodextrins; GGG and GFF tripeptide; non-covalent complex; mass spectrometry; formation constants

1 引言

在过去的几十年里,许多新技术被先后应用到质谱仪的研发中,质谱仪的研究范围和分析性能已经获得了很大的提高^[1-3],强有力地推动了蛋白质、多肽和寡聚糖等生物大分子与氨基酸、有机小分子、金属离子之间

的非共价作用研究^[4-6]。例如,陈湧等^[7]评论了环糊精超分子组装体与核酸的相互作用,其中包括一些生物活性的环糊精超分子组装体,如环糊精假聚轮烷、环糊精/金纳米粒子组装体、环糊精/富勒烯组装体、环糊精/碳纳米管组装体等的构筑及其与核酸的相互作用,以及对

* E-mail: cfding@fudan.edu.cn; Tel.: 0086-010-55664549.

Received November 12, 2012; published January 21, 2013.

Project supported by the National Key Technology R&D Program of China (No. 2009BAK60B03).

项目受国家科技支撑计划(No. 2009BAK60B03)资助。

核酸的切割、凝聚、传递作用和对核酸酶的抑制作用等方面的研究进展。齐墩果酸和熊果酸^[8]是两种三萜类化合物的同分异构体,以游离酸或配糖体的形式广泛存在于多种植物中,具有抗糖尿病、抗溃疡、降低血糖等多种生物学效应,在某种特定的条件下,它们的生物活性会有差异,Yu等^[8]用傅立叶变换离子回旋共振质谱仪结合持续偏共振照射(SORI)碰撞诱导解离分析了齐墩果酸和熊果酸分别与七-(2,6-二-O-甲基)- β -环糊精(DM- β -CD)形成的非共价复合物的碎片,利用碎片差异区分了齐墩果酸或熊果酸的结构差异。因此,用质谱法研究非共价复合物越来越多地受到人们的重视。

环糊精(cyclodextrin, CD)是一种天然的寡聚糖环状化合物^[9,10],一般由6~12个D-(+)-葡萄糖(吡喃型)残基经 α -1,4-糖苷键连接而成。目前研究较多并且具有重要实际意义的是含有6,7,8个葡萄糖单元分子,依次称为 α -、 β -和 γ -环糊精(α -、 β -和 γ -CD)。由于环糊精呈圆台形,其外缘(Rim)亲水而内腔(Cavity)疏水,因而可以提供疏水的部位,作为主体(Host)分子结合各种尺寸适当的客体(Guest),如含有疏水苯环的有机或生物客体分子通过氢键、疏水力和范德华力等非共价作用与环糊精分子相结合形成超分子复合物。

近年来,由于在食品、药品、化妆品等许多领域具有实际的应用,环糊精与多肽或蛋白质等生物分子形成非共价复合物的研究日益引起人们的兴趣^[11~13]。例如,由于环糊精具有较低的毒性,因此可以作为食品添加剂,在环糊精的疏水腔内包裹氨基酸或多肽可以抑制食品的苦味和不愉快的味道,蛋白质与环糊精结合之后,可以改变蛋白质的性质,如抑制蛋白质的聚集,防止蛋白质降解和功能发生改变。最近,Pandey等^[14]评论了环糊精对提高多肽和蛋白质药物的传输作用,环糊精一方面可以通过改进药物溶解度和渗透性来提高药物的生物利用度,另一方面可以保护治疗药物,防止其在长时间的消化过程中发生水解或降解。此外,环糊精还可以考虑作为合适的生物酶模型^[15],有希望在绿色化学中开发新的催化剂。

然而,在电喷雾产生的气相中,含有亲水基团的多肽能否与环糊精形成特异性结合的非共价包合物仍然存在一定的争论^[16~18]。到目前为止,气相中环糊精与含有芳香性氨基酸的多肽的结合是否一定是苯基与环糊精疏水腔体的结合仍然存在不同看法^[19,20]。例如,Vouros等^[21]在测定了许多客体分子包括带有芳香性和非芳香性侧链的氨基酸、寡肽等与环糊精主体分子生成的复合物后得出结论,在气相中得到的产物与液相中完全不同,气相中得到的纯粹是静电作用加合物,而不是包合物。此后不久,Lebrilla等^[22]用客体交换反应质谱实验并结合理论计算,提出了不同的观点,即有证据证明环糊精和苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸等在液相和气相中均可以形成特异性结合的包合物,只是它们在结构上略

有差异。最近,Yeguas等^[23]采用分子动力学模拟结合量子力学-分子力学理论计算了含有苯基的Ace-Phe-Nme多肽与 β -环糊精的反应,计算结果表明多肽的骨架链位于环糊精的小口,并且NH基团上的氢原子和环糊精仲羟基上的氧原子形成了较强的氢键,量子力学模拟的复合物的优势构象显示,苯基位于环糊精的小口内。

因此,进一步深入探讨在气相中环糊精能否与只含有亲水基团的多肽(GGG)形成特异性结合的包合物,以及环糊精与同时含有疏水苯基和亲水羧基的多肽(GFF)反应的结合位点不仅是十分有趣的,而且对于理解主客体超分子复合物的分子识别机制也是非常重要的。

我们^[24~28]已经采用电喷雾质谱等方法成功地测定了抗抑郁哌嗪衍生物化合物SIP15358等与 α -、 β -或 γ -环糊精(CD)分子生成的非共价复合物结合强度和结合位点。本文则将 α -、 β -、 γ -环糊精分别与两种三肽(亲水的GGG和含有两个疏水苯基的GFF)进行反应,采用离子阱质谱探索它们在气相中形成特异性结合的非共价复合物的可能性,同时结合碰撞诱导解离确认非共价复合物是否为包合物以及复合物的配合比。另外还测定了GGG或GFF同时与三种环糊精 α -、 β -、 γ -CD混合后作竞争反应的质谱结果,定性地比较了GGG或GFF与不同尺寸环糊精的结合能力,并采用质谱滴定法测定了各种复合物的结合常数。

2 结果与讨论

2.1 环糊精分别和三肽混合后的质谱测量结果

α -、 β -、 γ -环糊精分别和三肽GGG或GFF以1:1混合反应后得到的质谱图,如图1、图2所示。图1所示为GGG和环糊精结合的质谱图,图1A中, α -环糊精可以和GGG生成1:1结合的产物, m/z 190.00归属为 $[GGG+H]^+$, m/z 972.93归属为 $[\alpha\text{-CD}+H]^+$, m/z 1162.07归属为 α -环糊精与GGG 1:1结合的正一价产物峰 $[\alpha\text{-CD}+GGG+H]^+$;与此类似,图1B中, m/z 1134.87归属为 $[\beta\text{-CD}+H]^+$, m/z 1324.20归属为 β -环糊精与GGG结合的产物峰 $[\beta\text{-CD}+GGG+H]^+$;图1C中, m/z 1296.93归属为 $[\gamma\text{-CD}+H]^+$, m/z 1486.27归属为 γ -环糊精与GGG结合的产物峰 $[\gamma\text{-CD}+GGG+H]^+$ 。

图2所示为GFF和环糊精反应后的质谱图,图2A中, α -环糊精也可以和GFF生成1:1结合的产物, m/z 370.13归属为 $[GFF+H]^+$, m/z 1342.13归属为 α -环糊精与GFF 1:1结合的产物峰 $[\alpha\text{-CD}+GFF+H]^+$;与此类似,图2B中, m/z 1504.33归属为 β -环糊精与GFF结合的产物峰 $[\beta\text{-CD}+GFF+H]^+$;图2C中, m/z 1666.33归属为 γ -环糊精与GFF结合的产物峰 $[\gamma\text{-CD}+GFF+H]^+$ 。从质谱的检测结果可以发现环糊精可以和三肽生成1:1结合的产物,在检测范围内没有发现其它配合比的结合产物,由此可见,三肽和环糊精混合后经过化学反应,可以导致非共价复合物的生成。

图1 GGG分别与三种环糊精1:1摩尔比混合后的质谱

Figure 1 The mass spectra for GGG with α -CD, β -CD, γ -CD in a molar ratio of 1:1

(A) GGG + α -CD; (B) GGG + β -CD; (C) GGG + γ -CD; [GGG] = 1.0×10^{-4} mol·L $^{-1}$

2.2 三肽和环糊精混合后竞争反应的质谱测量结果

为了定性地比较GGG或GFF与不同尺寸环糊精的结合强度,将GGG或GFF同时和 α -, β -, γ -CD三种环糊精混合,充分反应后测定了竞争反应的质谱图.图3A显示了GGG和 α -, β -, γ -CD竞争反应的结果,从产物的峰强度可以看出,GGG和 α -CD结合最强, β -CD次之,但是和 α -CD差别不是很大, γ -CD稍弱;图3B显示的

图2 GFF分别与三种环糊精1:1摩尔比混合后质谱图

Figure 2 The mass spectra for GFF with α -CD, β -CD, γ -CD in a molar ratio of 1:1

(A) GFF + α -CD; (B) GFF + β -CD; (C) GFF + γ -CD; [GFF] = 1.0×10^{-4} mol·L $^{-1}$

是GFF和 α -, β -, γ -CD竞争反应的质谱结果,从峰强度可以看出,GFF和环糊精竞争反应的结果是 α -CD > β -CD > γ -CD,这一结果与GGG的竞争反应结果相类似,表明不论是GGG还是GFF,都是和 α -CD结合强度最大.

2.3 质谱峰强度与归一化碰撞能量关系

为了确定碰撞诱导解离的合适能量,探索了质谱峰强度与归一化碰撞诱导能量的关系,结果见图4,为了简单起见,图4中所指碰撞诱导能量均为归一化碰撞诱

图3 三肽和三种环糊精 1:1:1:1 摩尔比混合后竞争反应的质谱图

Figure 3 The mass spectra for competition reaction of tripeptides with CDs in a molar ratio of 1:1:1:1

(A) GGG with CDs; (B) GFF with CDs; [GGG]=[GFF]= 1.0×10^{-4} mol·L⁻¹

导能量. 图 4A 显示的是母离子为 [GGG+H]⁺, [α-CD+GGG+H]⁺, [β-CD+GGG+H]⁺, [γ-CD+GGG+H]⁺ 的碰撞诱导解离曲线. 从曲线上可以看出, 对于 [GGG+H]⁺ 母离子, 当碰撞诱导解离能为 16% 时, 母离子的峰强度开始出现明显的下降, 说明在 LCQ 仪器中 [GGG+H]⁺ 的碰撞诱导解离能的临界值为 15%~16%. 前驱体离子 [α-CD+GGG+H]⁺, [β-CD+GGG+H]⁺, [γ-CD+GGG+H]⁺ 的解离能临界值均和 [GGG+H]⁺ 相同 (为 15%~16%), 相较于 α-, β-, γ-CD 的解离能临界值分别提高了 3%, 4%, 6% (α-, β-, γ-CD 解离能临界值分别为 13%, 12%, 10%, 数据未在图中显示). 图 4B 显示的是母离子为 [GFF+H]⁺, [α-CD+GFF+H]⁺, [β-CD+GFF+H]⁺, [γ-CD+GFF+H]⁺ 的碰撞诱导解离曲线. 从曲线上可以看出, 对于 [GFF+H]⁺ 母离子, 当碰撞解离能为 17% 时, 母离子的峰强度开始出现明显的下降, 说明 [GFF+H]⁺ 的碰撞解离能的临界值为 16%~17%. 前驱体离子 [α-CD+GFF+H]⁺, [β-CD+GFF+H]⁺, [γ-CD+

GFF+H]⁺ 的解离能临界值均和 [GFF+H]⁺ 相同 (为 16%~17%), 相较于 α-, β-, γ-CD 分别提高了 4%, 5%, 7%. 根据图 4 可知, 20% 为适合的能量值用于研究环糊精和 GGG、GFF 形成的非共价复合物的碰撞诱导解离.

图4 质谱峰强度与归一化碰撞能量关系图

Figure 4 The relationship between intensity of mass spectrometric peak and normalized collision energy

(A) [GGG+H]⁺ with [CD+GGG+H]⁺; (B) [GFF+H]⁺ with [CD+GFF+H]⁺

2.4 环糊精分别和三肽形成的非共价复合物的碰撞诱导解离实验

为了进一步确认环糊精和 GGG 或 GFF 形成的非共价复合物, 对 [CD+L+H]⁺ 前驱体离子做了碰撞诱导解离 (CID) 实验, L 为 GGG 或 GFF, CD 表示环糊精.

图 5 显示是 GGG, GGG+CD, GFF 和 GFF+CD 的碰撞诱导解离质谱图, 碰撞诱导能量均为 20%. 图 5A 所示为前驱体离子 [GGG+H]⁺ 的碰撞诱导解离碎片, *m/z* 114.87 为母离子丢失 NHCH₂COOH 的碎片离子; 图 5B~D 显示是 [GGG+α-CD+H]⁺, [GGG+β-CD+H]⁺, [GGG+γ-CD+H]⁺ 在碰撞能量为 20% 下的质谱图, 母离子峰碎裂程度达 90%, 大部分转变为环糊精的碎片峰. *m/z* 810.67, 648.67, 486.53 依次为环糊精丢失一系列 *m/z* 162 葡萄糖单元的碎片峰.

图 5E 所示为前驱体离子 [GFF+H]⁺ 的碰撞诱导解离碎片, *m/z* 166.07 和 *m/z* 204.93 分别为母离子丢失

图5 三肽和非共价复合物的CID谱图

Figure 5 Collision induced dissociation (CID) curves for the precursor

(A) [GGG+H]⁺; (B) [GGG+α-CD+H]⁺; (C) [GGG+β-CD+H]⁺; (D) [GGG+γ-CD+H]⁺; (E) [GFF+H]⁺; (F) [GFF+α-CD+H]⁺; (G) [GFF+β-CD+H]⁺; (H) [GFF+γ-CD+H]⁺

COCH(CH₂C₆H₅)NHCOCH₂NH₂ 和 NHCH(COOH)CH₂-C₆H₅ 的碎片离子峰; 图 5F~H 显示是前驱体离子 [GFF+ α -CD+H]⁺, [GFF+ β -CD+H]⁺, [GFF+ γ -CD+H]⁺ 在碰撞能量为 20% 下的质谱图, 碎裂程度同样达 90%, 由于环糊精发生中性分子丢失, 在谱图中只能观察到极少的环糊精碎片峰. 碰撞诱导解离实验进一步确认了 α -, β -, γ -CD 与 GGG, GFF 可以形成配合比为 1:1 的非共价复合物.

2.5 计算环糊精和三肽形成非共价复合物的生成常数

前文^[22]的结果表明由于电喷雾质谱在静电力克服表面张力的情况下才能形成可检测的离子峰, 如此大的静电力作用会导致由静电作用形成的非共价键被强化, 而由疏水作用形成的非共价键被弱化. 在某些情况下, 需要用响应因子对各种质点的离子化效率进行校正^[4]. 然而, 由于电喷雾离子化的时间是足够短(毫秒级), 不会对化学平衡产生明显的影响, 因此, 只要主体和客体分子研究体系选择适当, 就可以大大降低主体和客体分子等严重的离子化效率差异以及质谱信号相互抑制等现象的发生. 事实上, 在大多数情况下, 用电喷雾质谱测得的非共价复合物的生成常数与溶液中的真实情况还是基本相符的^[3,4].

将 GGG 或 GFF 和 α -, β -, γ -环糊精按照一系列不同摩尔比进行混合, 其中环糊精的浓度不变, 改变三肽的浓度, 环糊精和三肽的浓度比范围为 1:0.2~1:2, 其它条件保持不变, 当三肽的浓度逐渐增加, 只能观察到 1:1 结合的产物, 说明环糊精和三肽形成了特异性结合的产物.

由于环糊精和三肽反应后, 得到配合比为 1:1 的复合物, 所以可以采用文献^[3]推导的公式(1)来计算 GGG 或 GFF 和 α -, β -, γ -环糊精反应的生成常数.

$$\frac{1}{I_r} = \frac{1}{K_c[L]_i[CD]_i K_{st}} + \frac{1}{K_c[CD]_i} \quad (1)$$

公式(1)中, $K_{st} = [CD+L]/[CD][L]$, L 为三肽 GGG 或 GFF, 相对强度 $I_r = I_c/(I_c + I_L)$, 其中 I_L 和 I_c 分别表示三肽 L 和结合产物 CD+L 的质谱峰强度, K_c 为比例常数, $[CD]_i$ 和 $[L]_i$ 分别表示的是三肽 L 和环糊精 CD 的反应初始浓度, 根据公式(1), $1/I_r$ 和 $1/[CD]_i$ 之间存在着一个线性关系, 所以可以根据线性拟合曲线的截距和斜率计算反应的结合常数 K_{st} .

图 6 显示的是 GGG, GFF 和环糊精反应的线性拟合曲线. 根据三肽 L 和环糊精 CD 反应时的初始浓度, 由公式(1)可以计算出 α -, β -, γ -CD 分别和 GGG, GFF 反应的线性拟合方程, 其结果列于表 1(结合常数为 3 次测定的平均值). 由截距推导出比例常数 K_c 后, 即可计算得到结合常数 K_{st} . 由表 1 可以看出, 随着 α -, β -, γ -CD 三种环糊精疏水空腔尺寸的增大, GGG 或 GFF 与之结合

的合常数依次为 2799.96, 2528.73 和 1697.11 L·mol⁻¹, 对于 GFF, 它和 α -, β -, γ -CD 反应的结合常数依次为 2773.94, 2134.03 和 1330.68 L·mol⁻¹. 质谱定量测得反应的结合常数结果与质谱测得竞争反应的定性结果相一致, 即不论是 GGG 还是 GFF, 和环糊精形成非共价复合物的结合强度均按照 γ -, β -, α -环糊精的次序逐渐增大. 前文^[23]曾经指出特异性结合指的是客体包含在环糊精的疏水腔体内, 而非特异性结合指的是客体包含在环糊精的疏水腔体外. 当环糊精和客体分子在溶液中形成主客体包合物时, 其主要驱动力为主体和客体非极性部分的去溶剂化, 即疏水作用. 当被分析样品从液相转为气相时^[26], 条件发生明显的变化, 其构象会发生一定的变化. 主客体相互作用将和溶剂化作用相竞争, 导致由静电作用和氢键形成的非共价键被强化, 另一方面, 由于疏水作用起源于获得溶剂分子熵值, 该熵值在液相复合反应过程中由溶剂化壳层释放, 而在气相中缺少这种变化, 疏水作用的非共价键将被弱化. 因此, Vourros 等^[21]曾经提出芳香性氨基酸与环糊精主体分子生成的复合物, 在气相中得到的是静电作用结合的非特异性加合物, 而不是主客体包合物. 然而 Lebrilla 等^[22]的研究结果表明当同时含有苯基和羧基的苯丙氨酸与环糊精结合时, 在气相中仍然可以形成非共价结合的包合物, 苯丙氨酸与环糊精作用时, 羧基位于环糊精的小口, 而

图 6 GGG, GFF 和三种环糊精反应的线性拟合曲线
Figure 6 The relationship linear fit curve for tripeptides with CD (A) GGG+CD; (B) GFF+CD

苯基位于环糊精的大口. Li 等^[18]通过密度泛函理论计算得出结论, 当苯甲酸与环糊精作用时无论是特异性结合的包合物还是非特异性结合的加合物, 羧基始终位于环糊精的小口.

表 1 环糊精与三肽反应的线性拟合方程和生成常数

Table 1 The formation constants and linear fit equation for CD and tripeptides

CD	L	线性拟合方程	r^2	K_{st}
α -CD	GGG	$1/I_t = 5.42E-4(1/[\alpha\text{-CD}]_0) + 1.5173$	0.9596	2799.96(± 57)
β -CD	GGG	$1/I_t = 5.08E-4(1/[\beta\text{-CD}]_0) + 1.2851$	0.9894	2528.73(± 42)
γ -CD	GGG	$1/I_t = 7.62E-4(1/[\gamma\text{-CD}]_0) + 1.2932$	0.9917	1697.11(± 44)
α -CD	GFF	$1/I_t = 1.58E-3(1/[\alpha\text{-CD}]_0) + 4.3734$	0.9967	2773.94(± 62)
β -CD	GFF	$1/I_t = 2.00E-3(1/[\beta\text{-CD}]_0) + 4.2702$	0.9906	2134.03(± 74)
γ -CD	GFF	$1/I_t = 3.08E-3(1/[\gamma\text{-CD}]_0) + 4.0933$	0.9877	1330.68(± 32)

结合 Lebrilla 的研究结果, 我们可以看出, 含有苯基的 GFF 与 α -, β -, γ -CD 反应的结合常数均小于 GGG, 该结果表明很有可能是 GFF 中的苯基参与了和环糊精的结合, 也就是说有疏水作用为其驱动力. GGG 中没有苯基, 羧基和氨基与环糊精的羟基发生作用, 与苯甲酸相类似, 羧基与环糊精小口的羟基形成氢键. 由于氢键的作用要大于范德华力, 所以在气相中, 只含有亲水基团的 GGG 可以与环糊精通过氢键形成特异性结合的包合型复合物, 其结合常数要大于通过苯基参与的由范德华力结合的 GFF+CD 包合物.

3 结论

电喷雾质谱结果显示 GGG, GFF 均可以和 α -, β -, γ -环糊精结合, 生成 1:1 配合比的非共价复合物. 碰撞诱导解离实验进一步验证 α -, β -, γ -环糊精与 GGG, GFF 非共价复合物的形成. 质谱峰强度与归一化碰撞能量关系图显示归一化碰撞能量为 20% 为适合的能量值用于研究环糊精和 GGG, GFF 形成的非共价复合物的碰撞诱导解离. 碰撞诱导解离实验进一步确认 α -, β -, γ -CD 可以与 GGG, GFF 形成稳定的非共价复合物.

竞争反应定性结果表明, 对 GGG 或 GFF 而言, 它们与环糊精形成的非共价复合物的结合强度都是 α -CD > β -CD > γ -CD, 即两种三肽都是与 α -CD 结合强度最大.

质谱滴定法测得的结合常数结果表明环糊精和两种三肽形成的非共价复合物的结合强度均按照 γ -, β -, α -CD 的次序逐渐增大. GGG 和 α -, β -, γ -CD 复合物的结合常数分别为 2799.96, 2528.73, 1697.11 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$, GFF 和 α -, β -, γ -CD 复合物的结合常数分别为 2773.94, 2134.03, 1330.68 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$. 对于 α -, β -或 γ -环糊精, 含有芳香族苯基的 GFF+CD 复合物的结合强度要小于相应的脂肪族的 GGG+CD 复合物, 其主要原因是因为在气相中, GFF 中仍然有苯基参与配位, 范德华力占主导地位,

其作用要小于中氢键占主导地位的 GGG+CD 复合物.

本工作从结合常数的角度提供了又一新的证据, 表明虽然在气相中 GFF+CD 复合物的构象与溶液中的构象有所变化, 但是苯基仍然参与同环糊精的疏水腔体的键合作用.

4 实验部分

4.1 实验试剂

α -环糊精(α -CD, MW = 972.86), β -环糊精(β -CD, MW = 1134.98), γ -环糊精(γ -CD, MW = 1297.12)(图 1)购买于 Sigma (St. Louis, MO, USA); GGG(甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸)和 GFF(甘氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸), 纯度 95%, 购买于吉尔生肽化学试剂有限公司(上海, 中国), 图 2 表示甘氨酸三肽(GGG)是由 3 个甘氨酸脱水组成的三肽(Gly-Gly-Gly, MW = 189.10), 甘氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸三肽(GFF)是由甘氨酸、苯丙氨酸和苯丙氨酸脱水组成的三肽(Gly-Phe-Phe, MW = 369.20). 甲酸购买于国药集团化学试剂有限公司(上海, 中国); α -, β -, γ -环糊精配成 $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水溶液, GGG 和 GFF 配成 $2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水溶液, 甲酸配成 1% 水溶液(以体积计); 乙腈(HPLC 级别)购买于 Merck 公司(Darmstadt, Germany).

图 7 3 种环糊精的结构式, n 为 6, 7, 8 时分别为 α -, β -, γ -环糊精
Figure 7 The structure of α -CD, β -CD and γ -CD ($n=6, 7, 8$)

图式 1 (A) 甘氨酸三肽(GGG)和(B)甘氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸三肽(GFF)的结构式

Scheme 1 The structure of (A) Gly-Gly-Gly (GGG) and (B) Gly-Phe-Phe (GFF)

4.2 非共价复合物的制备

环糊精和三肽以 1:1 摩尔比进行混合, 加入 1% 甲酸水溶液调节信号, 并用 HPLC 乙腈稀释; 所有溶液中含有 70% 乙腈(以体积计), 环糊精和三肽浓度均为 10^{-4} mol·L⁻¹, 甲酸浓度为 0.1%(以体积计), 并在室温下放置 12 h, 用于质谱定性检测。

环糊精和三肽以一系列不同摩尔比进行混合, 其中环糊精的浓度保持不变, 三肽的浓度改变, 环糊精和三肽的摩尔比依次为 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8, 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6, 1:1.8, 1:2, 加入 1% 甲酸水溶液调节信号, 并用 HPLC 乙腈稀释; 所有溶液中含有 70% 乙腈(以体积计), 环糊精浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹, 甲酸浓度为 0.1%(以体积计), 并在室温下放置 12 h, 用于质谱定量检测。

将 GGG 和 3 种环糊精按照摩尔比为 1:1:1:1 进行混合, GFF 和 3 种环糊精按照摩尔比 1:1:1:1 进行混合, 所有溶液中含有 70% 乙腈(以体积计), 环糊精浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹, 甲酸浓度为 0.1%(以体积计), 并在室温下放置 12 h, 用于竞争反应检测。

4.3 电喷雾电离质谱的测定和碰撞诱导解离分析

电喷雾电离源(ESI) Finnigan LCQ 三维离子阱质谱仪(Thermo Finnigan, USA, *m/z* 2000), 进样速度 2 μ L·min⁻¹, 正离子模式, 助喷雾气和帘气为 99.999% 氮气, 碰撞气体为 99.999% 氦气。离子活化 *Q* 值为 0.250, 活化时间为 30 ms, 文中出现的离子碰撞解离能均为归一化数值。文中碎裂程度用百分比表示, 将前驱体离子已解离的绝对峰强度除以未解离前的绝对峰强度。

References

- [1] Duan, X. Y.; Luo, G. A.; Chen, Y.; Kong, X. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 1126.
- [2] Jia, W. T.; Lu, H. J.; Yun, D.; Yang, P. Y. *Acta Chim. Sinica* **2007**, 65, 177. (贾韦韬, 陆豪杰, 俞栋, 杨芑原, 化学学报, **2007**, 65, 177.)
- [3] Dotsikas, Y.; Loukas, Y. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 1123.
- [4] Dai, Z. Y.; Chu, Y. Q.; Wu, B.; Wu, L.; Ding, C. F. *Acta Pharmacol. Sin.* **2008**, 29, 759.
- [5] Ren, S. F.; Wang, H. Y.; Guo, Y. L. *Acta Chim. Sinica* **2004**, 62, 1959. (任士芳, 王昊阳, 郭寅龙, 化学学报, **2004**, 62, 1959.)
- [6] Lu, H. J.; Guo, Y. L.; Yang, P. Y. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1612.
- [7] Chen, Y.; Liu, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, 32, 805. (陈湧, 刘育, 有机化学, **2012**, 32, 805.)
- [8] Yu, Z.; Cui, M.; Yan, C. Y.; Song, F. R.; Liu, Z. Q.; Liu, S. Y.; Zhang, H. X. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45, 444.
- [9] Chen, G. S.; Jiang, M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2254.
- [10] Huang, X.; Liu, X. M.; Luo, Q.; Liu, J. Q.; Shen, J. C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1171.
- [11] Cao, S. X.; Su, Y. Q.; Yang, X. L.; Chen, X. L.; Zhao, Y. F. *Anal. Lett.* **2004**, 37, 1871.
- [12] Irie, T.; Uekama, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, 36, 101.
- [13] Aachmann, F. L.; Otzen, D. E.; Larsen, K. L.; Wimmer, R. *Protein Eng.* **2003**, 16, 905.
- [14] Pandey, S.; Kumar, B.; Swamy, V. S. M.; Gupta, A. *Int. J. Pharm. Technol.* **2010**, 2, 281.
- [15] Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3088.
- [16] Matsubara, K.; Ando, Y.; Irie, T.; Uekama, K. *Pharm. Res.* **1997**, 14, 1401.
- [17] Nishijo, J.; Tsuchitani, M. *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90, 134.
- [18] Li, Z. S.; Couzijn, E. P. A.; Zhang, X. Y. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 943.
- [19] Cooper, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9208.
- [20] Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997.
- [21] Cuniff, J. B.; Vouros, P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, 6, 437.
- [22] Ramirez, J.; Ahn, S.; Grigorean, G.; Carroll, J. A.; Lebrilla, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6884.
- [23] Yeguas, V.; Altarsha, M.; Monard, G.; Lopez, R.; Ruiz-Lopez, M. F. *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, 11810.
- [24] He, X. D.; Jiang, D.; Chen, C.; Chu, Y. Q.; Ding, C. F.; Weng, Z. J.; Li, J. Q. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2010**, 26, 2604. (何小丹, 姜丹, 陈琛, 储艳秋, 丁传凡, 翁志洁, 李建其, 物理化学学报, **2010**, 26, 2604.)
- [25] Dai, X. H.; Chu, Y. Q.; Jiang, D.; He, X. D.; Fang, X.; Ding, C. F. *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, 38, 1747. (戴新华, 储艳秋, 姜丹, 何小丹, 方向, 丁传凡, 分析化学, **2010**, 38, 1747.)
- [26] Chu, Y. Q.; Dai, X. H.; Jiang, D.; Fang, X.; Ding, C. F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 2255.
- [27] Lü, N.; Zheng, Y. Y.; Li, J. Q.; Pan, T. T.; Chu, Y. Q.; Zhou, M. F.; Ding, C. F. *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, 37, 199. (吕娜, 郑永勇, 李建其, 潘婷婷, 储艳秋, 周鸣飞, 丁传凡, 分析化学, **2009**, 37, 199.)
- [28] Pan, T. T.; Chu, Y. Q.; Zhou, M. F.; Ding, C. F.; Lü, N.; Weng, Z. J.; Li, J. Q. *Acta Chim. Sinica* **2008**, 66, 2462. (潘婷婷, 储艳秋, 周鸣飞, 丁传凡, 吕娜, 翁志洁, 李建其, 化学学报, **2008**, 66, 2462.)

(Qin, X.)