

## 配体间相互作用研究

### ——氨基酸与二肽配体形成质子复合物的稳定性

张向东\* 何美 孙锦玉 张锋 宋溪明 刘祁涛

(辽宁大学化学系 沈阳 110036)

**摘要** 用pH电位滴定法测定了苯丙氨酰亮氨酸(PL)与甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)在离子强度为0.1mol/L(NaNO<sub>3</sub>), (25.0±0.1)℃时形成质子复合物的稳定常数,并对苯丙氨酰亮氨酸与六种氨基酸相互作用体系进行了量子化学和分子力学计算.从配体间弱相互作用的观点,讨论了二肽配体对氨基酸分子的识别.结果表明,二肽与氨基酸配体间的结合主要受到配体间静电、氢键作用的控制,同时受到范德华力和键间排斥能等弱相互作用的影响.

**关键词** 氨基酸,二肽,稳定常数,弱相互作用

## Studies on Ligand - Ligand Interaction

### ——Formation and Stability of Proton - Dipeptide - Amino Acid Complexes

ZHANG Xiang - Dong\* HE Mei SUN Jin - Yu

ZHANG Feng SONG Xi - Ming LIU Qi - Tao

(Department of Chemistry, Liaoning University, Shenyang, 110036)

**Abstract** Potentiometric titration method was used to determine the stabilities of proton complexes forming between phenylalanyl - L - leucine and six amino acids (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine and phenylalanine) at ionic strength of 0.1mol/L (NaNO<sub>3</sub>) and 25℃. The results show that the order of stability of the two forms of complexes is valine > alanine > leucine > isoleucine > phenylalanine > glycine. For further understanding of these results, semiempirical calculations at PM3 level and molecular mechanic (AMBER force field) method were used to optimize the conformation and the energy of proton complexes. In the view of weak interligand interaction, the recognitions of amino acids by phenylalanyl - L - leucine are discussed. The results show that the electrostatic forces and hydrogen bond give main contributions to the stabilities of the complexes. The van der Waals interactions and the bonding interactions also play a very important role in the complexation.

**Keywords** amino acid, dipeptide, stability constant, weak interaction

氨基酸和短肽是重要的基本生命配体.它们常与金属离子一起,共同在酶催化、生物膜物质运送等

众多生物过程中起关键作用.因此,许多工作者一直致力于有关生命金属离子配合物结构和稳定性的研

\* E-mail: xdzhang@lnu.edu.cn

收稿日期:2000-05-17,修回日期:2000-06-22,定稿日期:2000-08-01,国家自然科学基金(29671017)、辽宁省科委自然科学基金(972089)资助项目

(Received May 17, 2000. Revised June 22, 2000. Accepted August 1, 2000)

究<sup>[1]</sup>. 研究表明, 金属离子与氨基酸、短肽所形成的混配配合物, 常常由于配合物中配位体间非配位基团的弱相互作用而具有额外稳定性<sup>[2,3]</sup>. 随着超分子化学研究的深入, 尤其是分子间通过非共价相互作用形成结构明确、稳定、具有特定功能的分子聚集体或超分子结构的研究逐步深入, 人们认识到在生物体系中, 除了生物配体与金属离子的互相作用外, 生物配体间也存在着的直接相互作用在生理过程中也很重要, 而且有些重要的生物反应过程仅依靠生物配体间相互作用就得以完成<sup>[4]</sup>. 但目前直接研究配体间尤其是氨基酸等生物配体间相互作用的报道还较少, 特别缺少有关配体相互结合的热力学稳定性方面的研究报道<sup>[4~7]</sup>. 本文以具有芳环和较大疏水侧基的苯丙氨酸-L-亮氨酸二肽为主体分子, 研究它们与不同侧基结构的氨基酸分子间相互作用, 探讨溶液中质子氢参与的氨基酸-二肽体系形成质子复合物稳定性的变化规律及影响稳定性的结构因素.

## 1 实验

### 1.1 试剂

苯丙氨酸-L-亮氨酸(PL)二肽及六种氨基酸[甘氨酸(Gly), 丙氨酸(Ala), 缬氨酸(Val), 亮氨酸(Leu), 异亮氨酸(Ile), 苯丙氨酸(Phe)]均为 Sigam 生化试剂, 其它实验试剂为分析纯级. 均未经纯化, 直接配制溶液. 实验用水为二次去离子水( $< 2.0 \times 10^{-5} \text{S/cm}$ ).

### 1.2 质子复合物稳定性测定方法

在温度( $25 \pm 0.1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、离子强度 0.1 mol/L ( $\text{NaNO}_3$ )条件下, 采用 pH 电位滴定法, 测定了二肽与六种氨基酸的质子化常数和它们形成质子化复合物的稳定常数. 所用仪器为瑞士产 METTLER DL-21 型自动电位测定仪, 配 DG114-SC 型复合玻璃电极(精度  $\pm 0.001 \text{pH}$ ). 首先用三种标准缓冲溶液(pH 值各为 4.003, 6.864, 9.182)校正 pH 计, 然后在高纯氮气保护下, 用已除去  $\text{CO}_2$  的氢氧化钠溶液滴定二肽或氨基酸或其混合溶液(在单一二肽或氨基酸溶液中, 其浓度为  $5.000 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ , 在混合溶液中二肽与氨基酸浓度比为 1:1). 实验细节可见文献[8]. 每组实验至少平行 3~6 次, 实验数据在 486 微机, 采用 SUPERQUAD 程序<sup>[9]</sup>进行物种拟合处理. 在实验条件下, 氨基酸和二肽的混合溶液中仅有 101, 102, 011, 012, 111 和 112 等物种存在, 水的表现离子

积常数  $\text{p}K_w$  值经计算为  $13.702 \pm 0.005$ , 有关各物种稳定常数的对数值列于表 1 和表 2.

表 1 氨基酸和二肽配体的质子化常数

[ $t = (25 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ , 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$ ]

体系	$\lg\beta_{011}$	$\lg\beta_{012}$
Gly	$9.64 \pm 0.01$	$12.15 \pm 0.01$
Ala	$9.79 \pm 0.01$	$12.45 \pm 0.01$
Val	$9.62 \pm 0.01$	$12.19 \pm 0.01$
Ile	$9.66 \pm 0.01$	$12.24 \pm 0.01$
Leu	$9.63 \pm 0.01$	$12.32 \pm 0.01$
Phe	$9.14 \pm 0.01$	$11.69 \pm 0.01$
PL	$7.33 \pm 0.03^{\text{a}}$	$11.08 \pm 0.05^{\text{b}}$

a)  $\lg\beta_{101}$ ; b)  $\lg\beta_{102}$

表 2 氨基酸-二肽配体质子复合物稳定常数

[ $t = (25 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ , 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$ ]

体系	$\lg\beta_{111}$	$\lg\beta_{112}$	$\lg K_a$	$\lg K_b$
PL-Gly	$12.49 \pm 0.06$	$20.39 \pm 0.03$	2.85	3.42
PL-Ala	$13.60 \pm 0.04$	$21.25 \pm 0.04$	3.81	4.13
PL-Val	$13.68 \pm 0.04$	$21.33 \pm 0.05$	4.06	4.38
PL-Ile	$13.36 \pm 0.04$	$21.06 \pm 0.04$	3.70	4.06
PL-Leu	$13.39 \pm 0.03$	$21.03 \pm 0.04$	3.76	4.07
PL-Phe	$12.13 \pm 0.06$	$19.91 \pm 0.04$	2.99	3.44

### 1.3 $^1\text{H}$ NMR 测定

用 BRUKER 公司 ARX-300 核磁共振仪, 在 pH 值为 7.0~8.0 的  $\text{D}_2\text{O}$  溶液中, 以 DSS 为内标, 室温下测定了 PL, Phe 及其混合物的  $^1\text{H}$  NMR 谱.

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基酸-二肽质子复合物的稳定常数

表 1 中  $\lg\beta_{011}$  和  $\lg\beta_{012}$  分别代表二肽及氨基酸配体的质子化平衡: (1)  $\text{A}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HA}^{\pm}$  和 (2)  $\text{A}^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{A}^+$  的平衡常数值对数值. 同理, 当二肽与氨基酸配体形成 1:1 型质子复合物时, 其平衡方程为 (3)  $\text{L}^- + \text{A}^- + s\text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{LAH}_s]^{\pm-s}$ ; L 代表二肽, A 为氨基酸, s 为质子复合物中质子的数目. 表 2 中的  $\lg\beta_{111}$  和  $\lg\beta_{112}$  值即为平衡 (3) 式中分别结合 1 个质子和 2 个质子时氨基酸-二肽质子复合物的结合常数. 显然, 由方程 (1), (2) 和 (3) 的  $\lg\beta$  值可分别求得平衡 (4)  $\text{HA}^{\pm} + \text{L}^- \rightleftharpoons \text{HAL}^-$  和 (5)  $\text{HA}^{\pm} + \text{HL}^{\pm} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{LA}$  的平衡常数  $\lg K_a$  和  $\lg K_b$  值, 结果也列于表 2 之中.

由表 2 结果可以看出, 二肽与氨基酸形成 1:1 型质子化复合物时, 对每一组二肽-氨基酸体系, 都是质子化的 PL 二肽比未质子化的 PL 二肽配体形成的质子复合物稳定性较高, 即  $\lg K_b > \lg K_a$ . 这说明二肽配体与氨基酸形成 1:1 型质子复合物的稳定性与配位体结构及配位体所带电荷多少有关<sup>[5]</sup>. 从二肽

与氨基酸的结构考虑,它们之间所发生的识别作用,首先应当是由氨基酸配体解离的羧基或质子化的氨基与二肽配体间发生氢键、静电作用引起,所以当二肽配体的氨基发生质子化作用后,增加了配体的电荷和作用强度,使质子复合物稳定性有一定程度的提高是可以理解的.通常有疏水侧基的二肽在与具有相应疏水侧基的氨基酸配体一起形成混配金属配合物时,配体分子未配位的侧基基团有可能发生芳环堆砌或疏水缔合作用,从而增加金属配合物的稳定性<sup>[1,2]</sup>,但在本文中,具有疏水侧基和芳环的 PL 二肽与氨基酸配体分子形成质子复合物时,所形成的质子复合物并未在具有芳环的 Phe 配体或具有较大疏水侧基的 Leu 配体处表现出最大稳定性,即质子复合物稳定性并没有简单地随氨基酸配体疏水侧基增大呈递增的趋势.这一点与金属离子配合物稳定性变化规律不同<sup>[1-3]</sup>.说明配体侧基间疏水作用在氨基酸-二肽配体的分子识别过程中可能有一定的促进作用,但显然不是决定性推动力.究其原因,可能是在质子复合物形成时,配体间形成氢键具有一定的方向性所造成的.当氨基酸配体和二肽分子通过形成氢键而结合时,两个分子相互接近的方向和角度必然会影响到两个配体侧基间的空间匹配性,即芳环堆砌或疏水缔合程度.因此,为了说明质子复合物的稳定性变化规律,弄清质子复合物的空间构型和结合能的构成是重要的.

## 2.2 空间构型(能量)计算

为了进一步探讨二肽与氨基酸配体间的相互作用规律,按图 1 中二肽与氨基酸分子间可能发生的作用方式,优化计算苯丙氨酰亮氨酸(PL)负离子与六种两性离子型氨基酸配体分子相互作用的空间构型和能量.计算采用 HyperChem 软件包<sup>[10]</sup>,在 586 微机机上完成.量子化学计算用 PM3 法;分子力学法计算体系能量时,包括键间相互作用和非键相互作用两部分,分别由成键项、键角项、两面角项和范德华作用项、氢键及静电作用项构成,计算选用 AMBER 力场参数.计算首先采用分子力学方法对各配体和质子复合物分子进行构型优化,然后采用 PM3 法计算各个分子的电荷分布,在考虑各基团电荷分布的基础上,采用分子力学计算重新优化构型和能量.表 3 列出了计算所得各配体和质子复合物的总能量  $E_{PL-AA}$  和  $E_{PL}$  或  $E_{AA}$ .当氨基酸与二肽结合形成质子复合物时,其能量变化应符合公式:  $\Delta E = E_{PL-AA} - (E_{PL} + E_{AA})$ .  $\Delta E$  值计算结果也列入表 3.图 2 为优化所得的 PL 与六种氨基酸相互识别的空间平衡构型图.

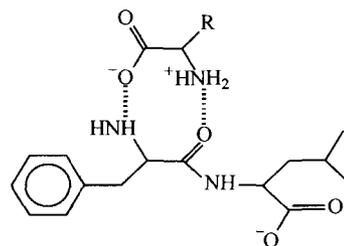


图 1 二肽(PL)与 L-氨基酸的作用模式

表 3 配体和质子复合物的总能量以及质子复合物的结合能(kJ/mol)

体系	PL	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe
$-E_{AA}, -E_{PL}$	37.818	97.288	73.616	60.282	66.232	74.948	76.720
$-E_{PL-AA}$		226.18	204.25	193.87	196.66	205.50	205.19
$\Delta E$		91.074	92.816	95.770	92.610	92.734	90.652

表 4 苯丙氨酰亮氨酸-氨基酸质子复合物结合能的构成(kJ/mol)

体系	$\Delta E$	$\Delta E_e$	$\Delta E_w$	$\Delta E_b$
Gly-PL	-91.074	-111.060	7.236	12.750
Ala-PL	-92.816	-102.974	1.736	8.422
Val-PL	-95.770	-107.400	3.431	8.199
Ile-PL	-92.610	-105.930	0.891	12.429
Leu-PL	-92.734	-110.029	6.562	10.733
Phe-PL	-90.652	-107.953	7.795	9.506

对这一系列质子复合物的形成反应[反应(4)和(5)],由于作用方式、键合位置和反应环境均十分相似,实验表明其作用的熵变相差不大<sup>[11]</sup>,如果将其视为常数,则按化学热力学的基本原理, $\Delta E$ 与  $\lg K_a$ 或  $\lg K_b$ 间应有直线关系.事实上,用  $\Delta E$ 对  $\lg K_a$ 或  $\lg K_b$ 作图,其线性相关系数分别达到 0.88 和 0.91.说明实验测定与计算结果是基本吻合的.表 4 进一步给出各质子复合物能量变化  $\Delta E$  的基本构成,能量差可分为三部分组成,分别是静电、氢键能  $\Delta E_e$ ,范德华能  $\Delta E_w$  和来自键间的排斥能  $\Delta E_b$ .从表 4 数据不难看出,质子复合物形成的推动力主要来自静电和氢键作用.但是,仅用  $\Delta E_e$ 与  $\lg K_a$ 或  $\lg K_b$ 相关联,并不能得到好的相关性,其相关系数仅分别为 0.52 和 0.50.对比表 4 和表 2 数据可见,Val,Ala 配体的质子复合物之所以具有高的稳定性与它们具有较低的键间排斥能和强的范德华作用有很大关系;而 Ile 配体形成的质子复合物虽然具有较高的键间排斥能,但其范德华作用却格外强,促使质子复合物稳定存在;Gly 配体形成的质子复合物虽然具有较强的氢键·静电作用,但其高的键间排斥能和范德华作用能却不利于复合物形成,造成复合物稳定性较差.这说明虽然氨基酸与二肽配体间的氢键·静电作

用是形成质子复合物的主要推动力,但是其它两类作用也不可忽视,是几类作用共同决定质子化复合物的稳定性.由于静电作用的位置和氢键的方向性,PL与氨基酸的侧基间的芳环堆砌或疏水缔合作用受到很大影响.由图2可以清楚看到,Ile,Ala与PL有较大的侧基缔合作用,而Phe的苯环与二肽配体侧基间基本没有任何堆砌作用,这与它们的 $\Delta E_w$ 值的变化是一致的.为了进一步探明质子复合物中是否存在侧基间的芳环堆砌作用,按照文献[12]的方法研究了PL-Phe体系的 $^1\text{H}$  NMR谱,主要结果如表

5所示.表5数据说明,质子复合物体系中Phe侧基苯环上的质子氢与PL二肽配体的侧基苯环上质子氢的化学位移值并未由于形成PL-Phe质子复合物而发生任何明显的改变,说明它们的芳环侧基之间确无明显作用.这与图2的描述是完全一致的.

表5 PL-Phe体系苯基质子的 $^1\text{H}$  NMR化学位移  
( $\text{D}_2\text{O}$ 溶液,DSS内标,pD=7.0~8.0)

$\delta$	体系		
	Phe	PL	PL-Phe
	7.36	7.39	7.37

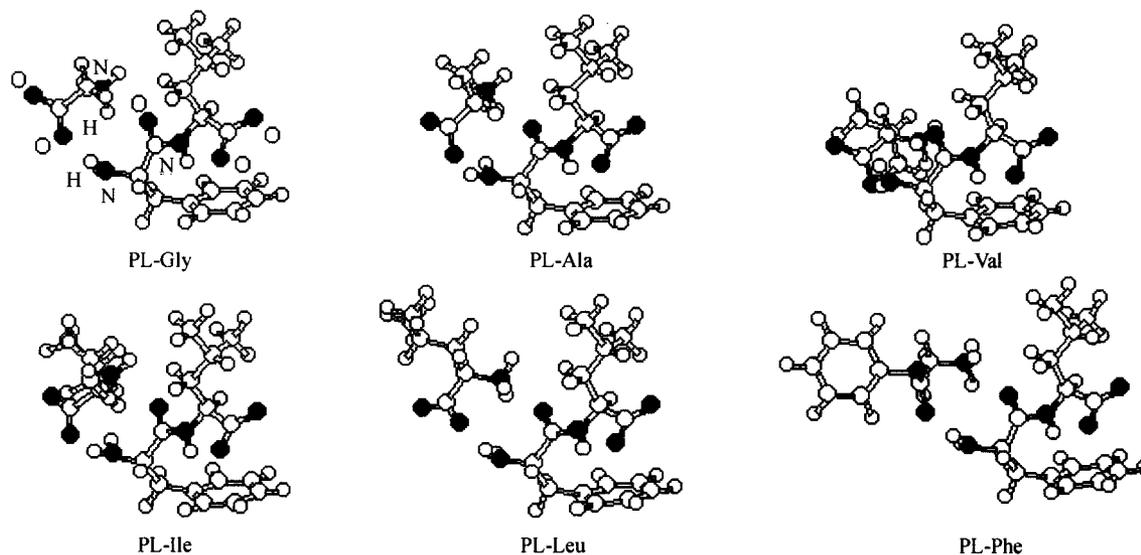


图2 PL与六种氨基酸配体的质子复合物的优化构型图

## References

- 1 A. V. Vaidyan, P. K. Bhattacharya, *Can. J. Chem.*, **1994**, 72, 1107.
- 2 A. V. Vaidyan, P. K. Bhattacharya, *Indian J. Chem.*, **1994**, 33A, 1003.
- 3 Liu Qi - Tao, Tian Ji - Kun, Zhang Feng, Zhang Xiang - Dong, Tong Jian, *Acta Chim. Sinica*, **1994**, 52(11), 1100(in Chinese).
- 4 K. Merissi - Arifi, M. Zenkour, G. Schlewer, B. Spiess, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1996**, 92(17), 3101.
- 5 A. D. Robertis, C. D. Stefano, C. Foti, S. Sammartano, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1995**, 91(11), 1619.
- 6 C. D. Stefano, C. Foti, A. Gianguzza, O. Giuffre, S. Sammartano, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1996**, 92(9), 1511.
- 7 Jin Hong - Wei, Feng Ji - Kang, Ren Ai - Min, Li Zhi - Ru, Wang Zhi - Qiang, Zhang Xi, *Acta Chim. Sinica*, **2000**, 58(2), 194 (in Chinese).
- 8 Zhang Feng, Liu Qi - Tao, *Chem. J. Chin. Univ.*, **1987**, 8, 306 (in Chinese).
- 9 P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195.
- 10 *HyperChem, Hypercube Release 5.1*, Hypercube, Inc., Waterloo, Ontario, **1999**.
- 11 Gao En - Jun, Wang Qui, Liu Qi - Tao, *Acta Chim. Sinica*, **1993**, 51, 646(in Chinese).
- 12 Gao En - Jun, Zhang Xiang - Dong, Liu Qi - Tao, *Chin. Sci. Bull.*, **1992**, 37, 742.

(Ed. PAN Bing - Feng)

(ZHENG Guo - Cheng)