

核磁共振法研究 β -环糊精 及其衍生物对苯丙氨酸的包和过程

曹宁军 伦世仪 陶冠军 丁绍东 祝耀初

(发酵工程系)

(中央研究设计所)

摘要 本文采用 ^1H 和 ^{13}C 核磁共振方法,依据化学位移的改变量,系统地研究了 β -环糊精及其琥珀酰化衍生物对苯丙氨酸的包和能力以及包和过程运动状态。结果表明苯丙氨酸以苯基为前导经 β -环糊精二级羟基口与其发生包和反应;琥珀酰化不但提高 β -环糊精对苯丙氨酸的结合能力,而且完全改变了包和过程的结合方式,使得苯丙氨酸以 α 碳为前导经二级羟基口与 β -环糊精产生包和。

关键词 β -环糊精; 苯丙氨酸; 包和反应

0 引 言

β -环糊精(β -CD)是由7个葡萄糖残基经 α -1,4糖苷键连接而成的环状寡糖,其形状类似于一个中空管。其二端分别冠有一级和二级羟基环,内外表面分别是相对疏水和亲水性的。这种结构特点具有将多种小分子包和进它的疏水性内环中的能力^[1-3]。正是这一重要特性,环糊精已被广泛地应用于众多的研究及应用领域,其中之一便是作为新型固相材料出现于层析分离的领域之中^[4]。芳香氨基酸有着不同于其它氨基酸的结构特征,从而决定了它们具有与 β -CD发生包和反应的能力。

β -CD对芳香氨基酸在液固相条件下均具有一定的包和能力^[5,6],这已得到一些结合关系的推断。但是这些推断仅限于 β -CD母体,对于化学修饰的 β -CD,特别是琥珀酰化产物(BCD)未见报道。

本文采用核磁共振方法(NMR);依据化学位移的改变与包和方式存在固有联系的特性,报道了 β -CD及BCD对苯丙氨酸不同的包和过程,为层析工作的开展提供了有效的证据。

1 材料与方 法

1.1 材料

β -环糊精 苏州味精厂产品,本实验室纯化后达色谱纯。

7-(6-琥珀酰基)-β-环糊精(BCD) 实验室合成, 色谱纯。

苯丙氨酸(Phe) 上海生化研究所。

核磁共振试剂 Sigma产品

1.2 方法

1.2.1 核磁共振化学位移 $^1\text{H-NMR}$ (90MHz)及 $^{13}\text{C-NMR}$ (22.5MHz) 波谱使用 JEOL、FX90Q核磁共振波谱仪进行测定, 分辨率0.2Hz, 数据由JEOL、JEC-100计算机累加处理。化学位移以水为溶剂, 四甲基硅烷作外标进行测定。

1.2.2 包和解离常数的测定 随着 $[\text{Phe.}/\beta\text{-CD}]$ 比值的改变, $\beta\text{-CD}$ 中 H_3 的化学位移将发生相应的改变, 根据改进的Hild-Ebrand-Benesi方法^[7,8], 有方程存在:

$$K_d/Q + \frac{[\text{CD}_0] + [\text{Phe}_0]}{Q} = \frac{[\text{Phe}_0]}{\Delta\delta}$$

$$Q = \delta_{\text{CDphe}} - \delta_{\text{CD}}$$

$$\Delta\delta = \frac{[\text{CDPhe.}]}{[\text{CD}_0]} (\delta_{\text{CDphe.}} - \delta_{\text{CD}})$$

通过曲线拟合法测定包和解离常数 K_d 值。

2 结 果

2.1 包和解离常数

以Phe.作为实验对象, 采用 $^1\text{H-NMR}$ 方法测定包和后环糊精 H_3 的化学位移变化量。芳

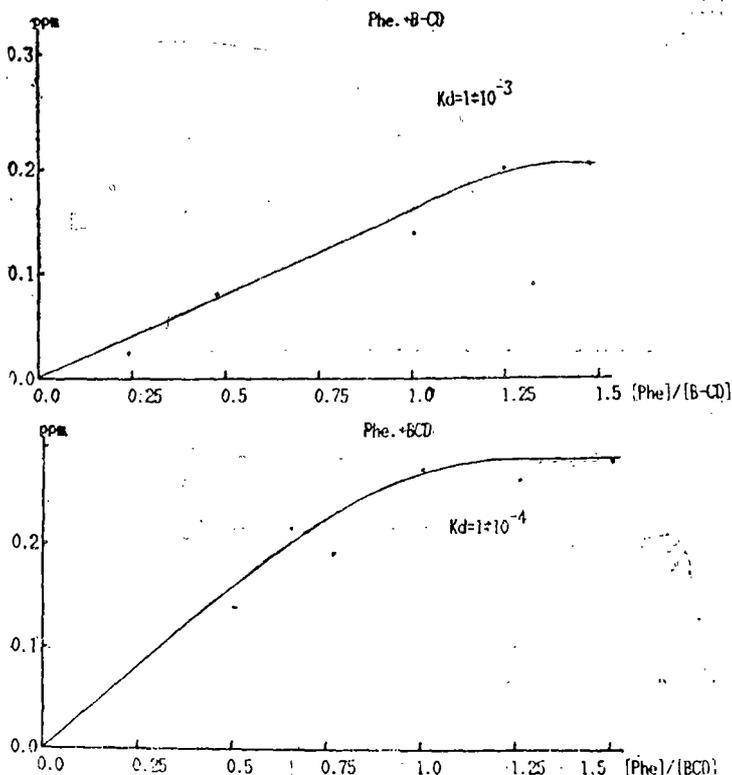


图1 化学位移变化量

香物质的进入可引起 H_3 的高场位移,其移动程度与包和程度呈正比关系。当 $Phe.$ 的浓度大大超过环糊精浓度时,化学位移变化量达最大值。经 $\Delta\delta-[Phe.]/[CD]$ 曲线拟合(图1), β -CD- $Phe.$ 的值 K_d 为 $3 \times 10^{-3}/mol$,而BCD- $Phe.$ 的 K_d 值为 $3 \times 10^{-4}/mol$ 。清楚地说明 β -CD母体与其衍生物均可同 $Phe.$ 发生包和反应,在中性偏酸条件下琥珀酰化提高了环糊精对苯丙氨酸的结合能力。

2.2 苯丙氨酸与环糊精的包和方式

苯丙氨酸与环糊精之间如有包和反应产生,受影响的将是环糊精内表面的氢(H_3 和 H_5),而外表面的氢(H_2 、 H_4 、 H_1)却很少受影响^[9]。因此以 H_1 的化学位移为参照(5.18ppm)观察其它氢的相对化学位移变化量(图2)。在任何一种情况下 H_1 、 H_2 、 H_4 的 $\Delta\delta$ 均不超过0.02ppm,而内侧氢却随着包和程度的增高, H_3 和 H_5 的 $\Delta\delta$ 值分别向高场及低场移动。在 β -CD中, $\Delta\delta_3$ 与 $\Delta\delta_5$ 分别为0.22ppm和-0.15ppm;而在BCD中 $\Delta\delta_3$ 与 $\Delta\delta_5$ 分别为0.29ppm和-0.05ppm。结果表明在任一条件下均有包和反应发生,其程度与 H_3 的化学位移变化量呈正比,琥珀酰化更有利于对 $Phe.$ 的包和。此外,观察顶部氢 H_6 的化学位移变化,琥珀酰化引起 $\Delta\delta_6=0.06ppm$ 的改变,证明 $Phe.$ 是由环糊精的二级羟基口插入包和的,同时仅有一套谱线存在,每一个氢仅对应一条谱线,证明包和物高度对称,所有 H_3 磁等价。

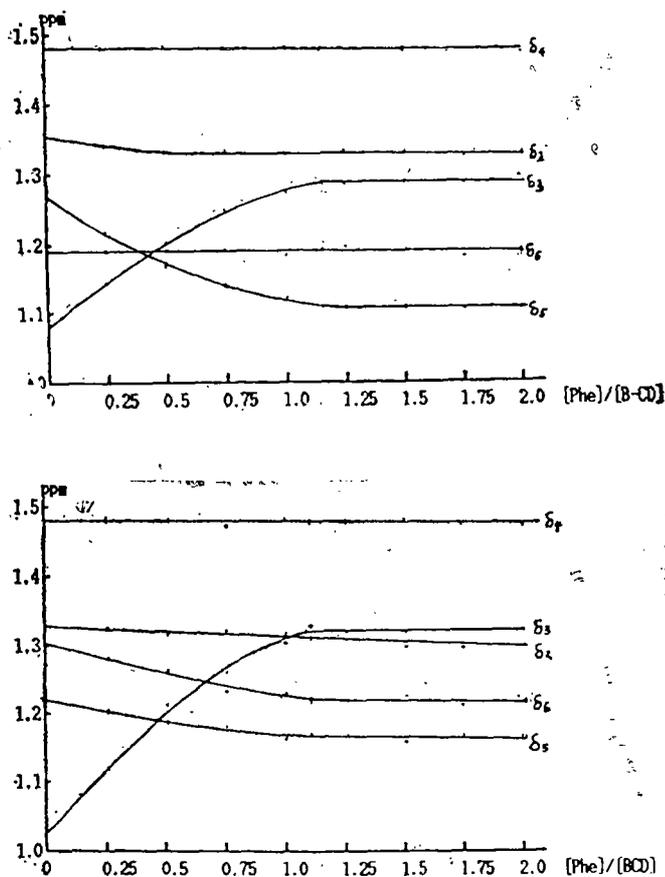


图2 相对化学位移变化量

包和过程不仅影响环糊精氢谱的改变,同时也影响被包和物核磁共振波谱的改变,表1

给出不同状态下苯丙氨酸 ^{13}C 谱的化学位移。

表1 phe.在不同条件下 ^{13}C -NMR化学位移值

phe.碳原子包和物	r'	o'	m'	p'	β'	α'
phe.	135.00	129.50	129.27	127.79	36.42	56.11
phe. + BCD	133.91	128.79	127.79	127.32	35.25	56.86
phe. + - CD	137.45	128.33	127.65	125.79	40.32	56.67

由表可见,有,无环糊精存在,Phe.各碳原子表现出较大的波谱差异。如果有包和作用存在,被包和物的进入部分(头)将产生高场位移,而未插入部分(尾)将向低场位移,从位移的状态很容易判断出芳香分子的插入方式^[10]。向 β -CD分子内的插入,使Phe.的 α 、 β 、 γ 碳原子产生较强的低场化学位移,并且位移程度 γ 和 β 碳大于 α 碳;而苯环上的 o' 、 m' 、 p' 位碳原子有着明显的高场化学位移,以对位碳原子最为明显,说明phe.的插入以苯环为头。

与此相反,对BCD的插入诱导phe.的全部碳原子共振波谱向高场位移, α 、 β 和 γ 碳原子移动程度大于苯环上的各碳原子。与 β -CD相比较苯环上最大高场位移是基碳 γ ,最小的是对位碳原子, o' 、 m' 和 p' 位碳原子的位移均小于 β -CD存在时的位移量,说明最大的可能是Phe.以丙氨酸基(α 碳)为头插入BCD中。

3 讨 论

环糊精分子具有二个入口,一个较大的二级羟基口(C_2 、 C_3)和一个较小的一级羟基口(C_6)。环状结构的存在,使得每一个葡萄糖单位的构象呈刚性,不因包和复合物的形成而发生明显改变。采用NMR方法测定结合过程,其 $\Delta\delta$ 的改变并不是由于空间结构的总体改变所产生的,它仅与邻近电子效应相关。所以采用此方法可以证明芳香氨基酸的插入方向和程度。

β -CD无论是否发生化学修饰,其分子结构保持不变,因此在与phe.包和时,phe.分子可以从任何一个入口插入,插入方式的了解将有助于层析分离机制的认识。苯环是一个磁各向异性基团,其环平面上下方为屏蔽区,其它方向为去屏蔽区,如果苯环由二级羟基口插入, H_5 将处于它的屏蔽区内,而 H_3 可根据苯环的部分插入而处于去屏蔽区,分别产生高、低场位移,反之如果由一级羟基口插入,二个氢会产生完全相反的结果,同时 H_6 也将显示出高场位移。与实验结果相比较,可以确认前一种状态,即由二级羟基口的插入是与实验相符合的。从这一角度出发我们可以说明BCD与 β -CD在化学位移上所产生的差别。 H_3 的位移程度正比于苯环的插入深度,BCD中 H_3 更大的高场位移说明BCD与Phe.有更强的结合。由于苯环的深度插入,对于高为0.78nm的环糊精来讲, H_3 将处于屏蔽区与去屏蔽区的交界处附近,决定它的化学位移将变化不明显,而顶部氢 H_6 正逐步进入苯环的去屏蔽区,产生相应的低场位移。这些都充分证明,苯丙氨酸由环糊精的大口插入,插入程度正比于 H_3 位移值的大小。

从结构来看phe.可以采用3种方式与环糊精包和:a以苯基为头插入环糊精;b以丙氨酸基为头插入环糊精;c苯丙氨酸横向进入。根据 β -CD内径的大小,首先可把第三种情况排除。因为环糊精内部的相对疏水性,包和后溶剂效应的存在,分子由极性进入非极性环

境时碳谱会产生明显的高场位移, 特别是有氢键或其他作用力存在的条件下^[11]。多方面的研究已确认, 对于单取代或对位双取代分子, 进入环糊精内部的部分其碳谱产生高场位移, 未进入部分因电场作用产生低场位移。这种改变主要产生于 phe. 由自由态水合环境转入到包和态非极性环境所诱发的电场环境效应。 $\beta\text{-CD}$ 的包和使得 Phe. 的苯基对位产生明显高场位移, 而羧基碳和 α 碳有明显的低场位移, 说明氨基酸采用苯基为前导插入环糊精内部, 其进入程度是有限的。与此相反, BCD 的包和引起羧基碳的高场位移, 同时整个苯环由于包和程度较前者强, 所有各碳均产生一定的高场位移, 相比之下对位碳基本无明显改变。证明苯丙氨酸以丙氨酸基为头插入 BCD 环内, 并且几乎整个分子都已被包和。 α 碳的微小变化可能是包和作用及氨基形成氢键的综合效果。因为 phe. 以苯基与羧基成反式构象时最稳定, 已有证明包和后这种构象更占具主导地位^[12]。 BCD 与 phe. 包和后, 苯基必然与中心轴平行, 而 C_6 也平行于此轴, 为保持反式交叉构象 phe. 的羧基将与 C_6 构成一定夹角, 使得 H_6 处于它的去屏蔽区内, 导致 BCD 中 H_6 的低场位移。这从另一个侧面旁证苯丙氨酸采用完全不同的结合方式与 $\beta\text{-CD}$ 和 BCD 结合, 根本原因是为了充分发挥各种可能存在的作用力的效果。

综合以上论述, 可以证明苯丙氨酸与 $\beta\text{-CD}$ 的结合以苯环为前导, 由二级羟基口插入并结合, 琥珀酰化将有利于 α 碳为前导的插入结合, 并加强了结合深度, 这主要归功于离子键的存在, 说明琥珀酰化改变了包和过程的结合状态和强度。

参 考 文 献

- 1 Bergeron R J, J Chem, 1977; 54, 204
- 2 Bendes M L, et al. Reactivity and Structures Concepts in Organic Chemistry, New York, 1978: 1
- 3 Saenger W. Angew Chem. Engl, 1980: 19, 344
- 4 芮海风. 生物化学与生物物理进展. 1984: 27
- 5 Inoue Y, et al. Bull Chem Soc Jpn, 1979; 52, 1692
- 6 Inoue Y, et al. Bull Chem Soc Jpn, 1981; 54, 809
- 7 Benesi H A, et al. J Am Chem Soc, 1949; 2703
- 8 Bergeron R J, et al. J Am Chem Soc, 1977; 99, 1735
- 9 Sanemasa I, et al. Bull Chem Soc Jpn, 1987; 60, 2051
- 10 Bergeron R J, et al. J Am Chem Soc, 1986; 108, 309
- 11 Lickter R J, et al. Org Chem, 1983; 53, 2023
- 12 Inoue Y, et al. J Am Chem Soc, 1981; 103, 7393

Study of the Inclusion Processes for β -cyclodextrin and Derivation With L-phenylalanine by NMR

Cao Ningjun Lun Shiyi Tao Guanjun Ding Shaodong Zhu Yaochu

(Dept. of Fermentation Eng.)

Abstract The formation capability and dynamics of the host-guest inclusion complexes in aqueous solution have been studied for hosts β -cyclodextrin and its succinylated derivative, and guest phenylalanine by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. These results indicate that the inclusion complex formation of phenylalanine with the β -cyclodextrins are induced by the insertion of aromatic side chain into a cavity of β -cyclodextrin through the wider rim crowning secondary hydroxyl groups; and that the succinylation of β -cyclodextrin not only raises inclusion capability of β -cyclodextrin with phenylalanine, but also total changes the combining pattern of inclusion complex, so that phenylalanine can take α carbon as a head inserting into a cavity of β -cyclodextrin.

Keywords β -cyclodextrin; Phenylalanine; Inclusion process