中 文 摘 要

蛋白分子是生命的主要基础物质。在组成蛋白分子的20种天然氨基酸中，属于芳香氨基酸的色氨酸和酪氨酸，其侧链取代基团不仅具有较强的提供pi电子的能力，而且是很好的金属配体。研究它们与金属离子的作用机理，有助于我们更好地理解金属离子在蛋白分子结构和功能中的作用。

各种类型的分子间非共价作用，在蛋白分子结构和功能上具有重要的意义。因此，对非共价作用的研究，在认识生命过程和设计功能分子等方面具有重要含意。

本工作合成了以吡啶环桥联的含有色氨酸单元的小分子类肽PW_2，X-射线衍射对其晶体结构的研究表明，pi-pi相互作用和N-H···O型氢键在稳定结构中具有重要作用。此外，通过圆二色谱和质谱等技术对溶液中PW_2与金属离子的识别作用做了初步的研究，发现其可以选择性的对Cu^{2+}离子进行识别。

同时，我们以氨羧配体EDTA、DTPA作为二价模板框架，合成含酪氨酸的开链结构的分子EY_2和DY_2，利用荧光光谱、核磁共振和质谱等多种分析手段，间接检测到了溶液中metal ion–phenol环的作用，并发现多种金属离子可以与phenol环之间发生不同强度的作用，模板链的增长不利于金属离子与phenol环发生作用。

关键词：芳香氨基酸 类肽 离子识别 荧光光谱 圆二色谱 核磁共振 质谱

Abstract

Protein is the major building block for biomolecules. Among the 20 essential amino acids composing the protein, side chains of tryptophan and tyrosine, which are the aromatic amino acids, are anticipated to serve as pi-donors and good metal-ion ligands.

Many types of noncovalent interactions have been found to play important roles in this field. The research on noncovalent interactions is thought to be very important to the understanding of life processes and the design of functional supramolecules.

Here we report the synthesis of a pyridine-bridged pseudopeptide PW_2 with the unit of Tryptophan, single-crystal X-ray diffraction experiments indicated that the crystal structure is stabilized by noncovalent interactions, such as the intermolecular hydrogen bonding of N–H···O and π-π interaction. In addition, using CD detection and ESI-MS, we estimated that it had high selectivity for Cu^{2+} in solution.

Another part of my work is to investigate the interaction between metal ions and XY_2 (EY_2 and DY_2), which is prepared by using available multidentate amino-carboxylate, EDTA and DTPA, respectively, as divalent template for presenting peptidyl Tyr phenol. A combined NMR, ESI-MS and fluorescence spectroscopic study reveals the roles of metal ion–phenol interaction. It is shown that the magnitude of this interaction is different for metal ions and the metal ion–phenol interaction decreases when increasing the number of aminocarboxylates.

Key words: Aromatic amino acid, Pseudopeptide, Fluorescence spectra, CD spectra, NMR, ESI-MS, Molecular recogniziton

第一章　前　言

§1.1 氨基酸与疾病

1.1.1 神经退行性疾病中的蛋白化学

蛋白质是具有长链结构的大分子，长链缠绕成特殊的形状以发挥其功能。正常状况下，蛋白质的亲水基在外部，而疏水基在内部。如果这种结构遭到破坏，蛋白质就不能溶于水，而在细胞或组织里形成团块，干扰正常生理功能，因此结构被破坏的蛋白质是有毒性的，蛋白质结构的改变导致了疾病。神经退行性疾病（如 Prion 疾病[1]、Huntington 病、Alzheimei's 病和 Parkinson 病[2]等）发病的关键问题是脑组织中异常蛋白的结构破坏和聚集。虽然各种疾病与不同蛋白的结构破坏有关，但导致结构破坏的分子途径和神经细胞死亡的机制似乎是相似的。

我们的研究课题就是设计合成能模拟生物体内复杂蛋白的化学小分子模型，并通过对这些结构简单，具有代表性的小分子模型结构和性质的研究来了解生命科学的分子化学基础。

天然氨基酸中，酪氨酸（Tyr）、色氨酸（Trp）和组氨酸（His）的侧链取代基团不仅具有强还原能力，而且还是很好的亲核配体，分析 Prion 蛋白、Huntington 蛋白和β-淀粉状蛋白的一级结构，在一些重要的片断中，每隔三个较稳定的氨基酸就有一个不稳定的氨基酸存在，即存在重复的“i-4，i，i+4”的“还原性/碱性/亲核性”拉链片断，例如：人、牛、鼠、羊等的 N-端 Prion 蛋白序列的特征片断[3]为：

$$PQGGGGW^{57}GQ\ (PH^{i-4}GGGW^{i}GQ)\ (PH^{i+4}GGGWGQ)_{3}\cdots\cdots AGAAAAGA\cdots\cdots$$

以上序列编号为人类的 Prion 蛋白序列。类似的“i-4，i，i+4”的“还原性”拉链片断也存在于需氧生命体的细胞色素 c 氧化酶的活性部位，已知细胞色素 c 氧化酶是通过与含氧小分子之间的电子转移反应来代谢氧气的。因而，这些拉链

的存在启示我们与含氧小分子有关的化学过程在蛋白病变过程中起着重要作用。理论分析也表明“i-4，i，i+4”的“还原性”拉链片断易于引发氧化损伤从而产生氨基酸自由基，这些侧联不稳定的氨基酸并列在一起，距离很近，它们之间的协同作用使得本来不稳定的氨基酸更易于遭到氧化破坏，引发氧化损伤的蛋白自由基过程。同时，这些并列的不稳定氨基酸形成了一个电荷的通道，氧化损伤很容易由引发部位传递到其它的部位。

1.1.2 Prion 蛋白与金属离子的络合作用

在 Prion 疾病的研究中，人们发现许多金属离子参与其中，这些金属离子包括 Fe^{3+}、Cu^{2+}与 Zn^{2+}等，目前研究最多的是 Cu^{2+}。在人类 Prion 蛋白的 N-端 59-91 位有四个重复的八肽拉链序列，它是一个进化稳定的区域，良性状态时，八肽拉链可以选择性的络合金属离子，尤其是可以选择性的络合铜离子，并能作为铜离子进出细胞的载体，**Fig. 1-1** 是 Prion 蛋白与 Cu^{2+}及细胞膜作用的示意图。

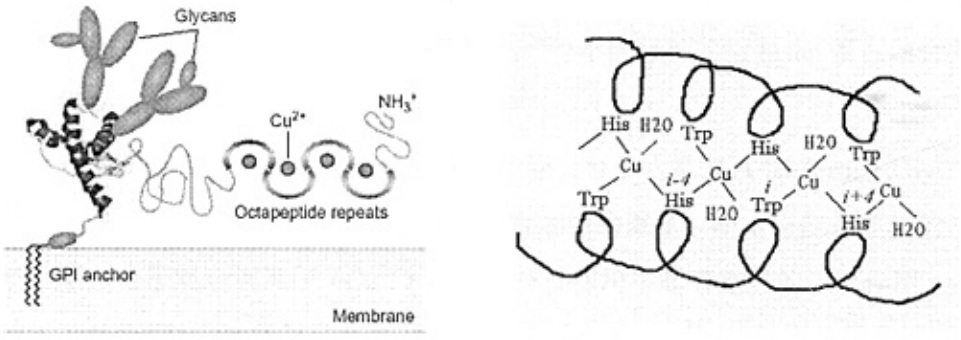


Fig. 1-1. Interaction of Prion Protein with Membrane and Cu^{2+}

进一步的研究表明，Cu^{2+}与 Prion 蛋白的相互作用能稳定 Prion 蛋白的致病形式 PrP^{Sc}，在患有 Prion 疾病的人的脑部蛋白聚集部位发现有大量的金属铜离子沉积。PrP^{Sc} 蛋白经胍处理变性后，可以被蛋白酶水解，同时会丧失感染能力，而变性后的 PrP^{Sc} 蛋白经 Cu^{2+}处理后可以促进 PrP^{Sc} 蛋白的复性[4]，这表明 Cu^{2+}与 Prion 蛋白的相互作用能稳定 Prion 蛋白的致病形式。基因研究的结果也支持这一观点，切除了 Prion 蛋白基因(*Prn-p*)的白鼠脑部铜离子的含量只是普通白鼠含量的 20%，并且只有铜离子的含量明显减少，其它的离子没有这种现象[5]。另外，*Prn-p* 的白

鼠抵抗铜中毒的能力大大降低，受 2 μM$CuSO_4$溶液的作用，*Prn-p* 的白鼠的神经传导能力明显减弱[6]，而普通白鼠则基本不受影响，这说明 Cu^{2+}与 Prion 蛋白能发生相互作用，同时也表明 Cu^{2+}与 Prion 蛋白在生物体神经系统中的起着重要作用。

铜离子不仅与良性 Prion 蛋白 PrP^{c} 作用，也与病变的 Prion 蛋白 PrP^{sc} 作用，铜离子的存在可以稳定病变的 Prion 蛋白。虽然 PrP^{sc} 的精确结构目前无法确定，人们发现铜离子的存在可以促进良性 Prion 蛋白的病变。对 PrP^{sc} 的变性和复性现象进行的研究表明，PrP^{sc} 能抑制蛋白酶 K（PK, Proteinase K）的降解作用，同时它能诱导良性蛋白病变，具有感染能力[7]。当加入 GdnHCl 时，可以使 PrP^{sc} 变性，变性后的 PrP^{sc} 可以被蛋白酶降解而失去感染能力[8,9]。稀释变性试剂，PrP^{sc} 又发生复性并恢复感染能力。不同的 PrP^{sc} 片段的复性程度是不同的。当加入 10 mM 的铜离子时，蛋白质的复性能力被大大增强，甚至一些用稀释方法无法复性的变性蛋白也被很大程度的复性了，但加入 Ca^{2+}和 Mg^{2+}并不能改变变性 PrP^{sc} 的复性。这说明铜离子与 Prion 蛋白之间存在络合作用，并且这种作用在 Prion 病变中起着至关重要的作用。除了 Cu^{2+}之外，Fe^{3+}与 Zn^{2+}也不同程度的与 Prion 蛋白结合并发生一些氧化还原反应。

我们预测，脑细胞表面都有的 Prion 蛋白分子内重复八肽 (ProHisGlyGlyGly-TrpGlyHis) 中的色氨酸支链残基这种很有规律的重复，不太可能是偶然的，很可能在蛋白分子对金属离子（Cu^{2+}）的高选择性作用中起着重要的识别作用。合成小肽的晶体结构显示，色氨酸支链残基与金属铜离子（Cu^{2+}）的外围靠得很近[10]。“i-4, i, i+4”的拉链片段很可能是 Prion 蛋白的氧化还原中心也是与金属离子作用的络合中心。

§1.2 非共价相互作用

化学键是指分子或晶体中相邻的两个或多个原子（离子）之间的强烈相互作用，其主要类型有离子键、共价键（包括配位键）和金属键等；与化学键不同，非共价作用力是指分子内或分子间的原子之间的吸引。

在非共价作用力中，尽管O—H…O和N—H…O等较强的氢键是人们研究和使用最广泛的分子间作用力，然而许多较弱的作用力包括C—H…O氢键[11-14]、C—H…π氢键[15]、π…π堆积作用[16-18]、静电作用、范德华力和疏水作用广泛存在于核酸和蛋白质等多种生命化合物中。

非共价作用力属于弱作用力，众所周知，共价键能量一般为 400 kJ/mol，而非共价作用力的强度比共价键要低一两个数量级，一般为 4-40 kJ/mol。这种弱相互作用力很难单独形成稳定的复合物。但若分子在空间的位置取得某种构象，使较多的弱相互作用力和较多的结合点相协调，则可以在分子间形成较强的结合力或选择性，这将会起到决定生物大分子构象的作用。因此，非共价相互作用是生物高层次结构的主要作用力，非共价作用力对生物体系意义重大。

各种非共价相互作用结合能的大小也有差别，在不同级别生物结构中的地位也有不同。结合能较大的氢键，在较低的结构级别(如蛋白质的二级结构)，较小的尺度间，把氢受体基团与氢供体基团结合起来。结合能较小的范德华力则主要在更高的结构级别，较大的尺度间，把分子的局部结构或不同分子结合起来。

最近新发现的一种非共价作用力是发生在阳离子与富电子体系之间的相互作用---Cation-pi Interaction，是数年前加州理工学院的 Dougherty 所提出[19]。现在，生物分子上的芳香环（如色氨酸的支链残基）对阳离子（包括季胺盐离子，金属离子等）的识别，已经被认为是很多神经细胞表面受体识别阳离子的分子科学基础。

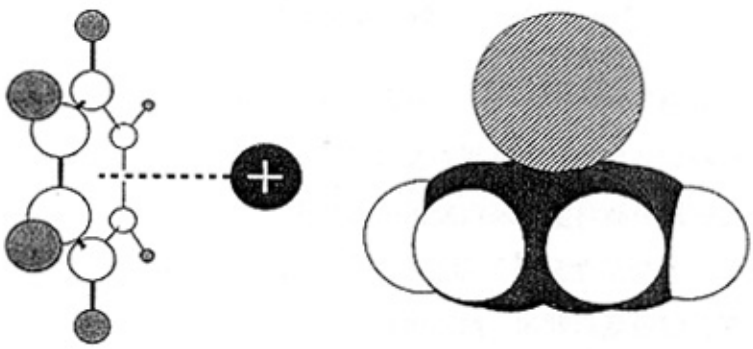
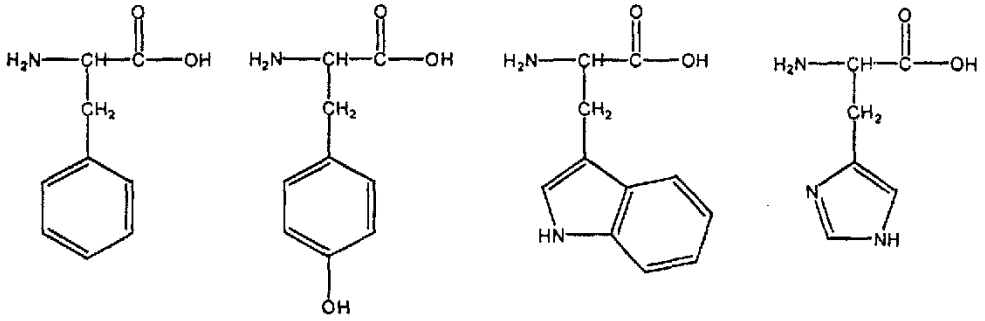


Fig. 1-2. K^+与苯环的相互作用示意图[20]

生命体系中大量的蛋白质分子均由 20 种天然氨基酸组成。这些氨基酸各带有不同的有机基团，其中可分为极性与非极性的；在中性介质中带正电和带负电的；疏水的和亲水的；带芳香基的和不带芳香基的。自然界里组成蛋白的结构单元是 20 种天然氨基酸以及基于这 20 种天然氨基酸而后修饰的一系列非天然氨基酸。其中除脯氨酸及其衍生物外，这些氨基酸在结构上的共同点是与羧基相连的碳原子上都有一个氨基，因此称为 α -氨基酸。连接在 α -碳上的还有一个氢原子和一个可变的侧链，称为 R 基团，各种氨基酸的区别就在于 R 基团的不同，这也是天然蛋白的种类和功能多样性的根本原因。在这 20 种的氨基酸中，只有 4 种氨基酸带有芳香性的基团，它们是苯环（benzene），酚环（phenol），吲哚环（indole）和咪唑环（imidazole），分别为苯丙氨酸（Phe, F），酪氨酸（Tyr, Y），色氨酸（Trp, W）以及组氨酸（His, H）的侧链。其中咪唑是 σ -donor，而其余三种为 π -donor。**Fig. 1-3** 是 4 种芳香氨基酸的具体说明。



Phe, F　　Tyr, Y　　Trp, W　　His, H

Fig. 1-3. 天然氨基酸中带芳香性的氨基酸

由于这四种氨基酸的 R 基团中含有芳香体系，因此这四种氨基酸在近紫外区（200～400 nm）有吸收。相关蛋白质由于含有这些氨基酸所以也有紫外吸收的能力，一般最大吸收在 280 nm 波长处，因此能利用这点来测定样品中蛋白的含量。芳香氨基酸在紫外区呈现比较弱的荧光，近来还证明了色氨酸呈现磷光（一种寿命较长的发射光）。这些荧光和磷光性质在研究蛋白质、多肽以及仿肽的结构和动力学中有着特别的作用。

§1.3 金属离子对于生命体的意义

在酶催化中广泛地存在着阳离子与芳香体系的相互作用。几乎三分之一的酶催化活性需要金属离子。

根据金属离子一蛋白质相互作用强度，可将需要金属离子的酶分为两类：（1）金属酶，含紧密结合的金属离子，多属于过渡金属离子，如 Fe^{2+}/Fe^{3+}、Cu^{+}/Cu^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}和 Co^{2+}等，这种金属离子通常以配价键的形式，与氨基酸残基的侧链基团相连，有时也与酶蛋白中的辅基，如血红素的卟啉环相连。金属酶中的金属离子，作为酶的辅助因子，在酶促反应中传递电子、原子或官能团。（2）金属一激活酶 金属激酶中的金属离子与酶的结合一般比较松散，在溶液中，酶与这类离子结合而被激活，这类金属离子主要是指碱金属离子和碱土金属离子，如 Na^{+}、K^{+}、Mg^{2+}和 Ca^{2+}等。

Table 1-1. 金属酶中的金属离子与配体

金属离子	配体	酶或蛋白
Mn^{2+}	咪唑	丙酮酸脱氢酶
Fe^{2+}/Fe^{3+}	卟啉环、咪唑、含硫配体	血红素氧化还原酶、过氧化氢酶
Cu^{+}/Cu^{2+}	咪唑、酰胺	细胞色素氧化酶
Co^{2+}	卟啉环	变位酶
Zn^{2+}	$-{}^{+}NH_3$，咪唑，$(-RS)_2$	碳酸酐酶，醇脱氢酶
Pb^{2+}	$-SH$	δ－氨基－γ－酮戊二酸脱水酶
Ni^{2+}	$-SH$	脲酶

金属离子以三种主要的途径参加反应过程，一是通过结合反应底物为反应定向，二是通过可逆地改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应，三是通过静电稳定和屏蔽负电荷。但无论是哪种类型，都存在着显著的阳离子与芳香体系的相互作用。这种弱相互作用的影响是深远的，甚至可以对酶或其它蛋白起到结构调控的作用。

§1.4 论文选题

在决定分子识别的众多因素中，非共价作用力是具有挑战性的难点之一。在许多金属蛋白和依赖于金属离子的氧化还原酶分子中，芳香氨基酸残基对其结构和功能具有重要意义。随着对分子识别更深层次的认识之一，即 Cation-pi 相互作用，作为一种新发现的非共价弱作用力，芳香氨基酸所提供的对阳离子的非共价弱作用，被认为在离子受体和神经疾病等诸多方面，都是不可忽视的重要弱作用力。

因而，我们设计合成了含有吡啶环结构单元和色氨酸支链的类肽分子，并成功检测到其三维结构，通过对此类简单模型自组装行为的详细研究，以期揭示在分子聚集中弱作用力所具有的重要意义。

此外，由于 EDTA 是一个很有价值的多价态分子识别设计模板，我们进一步研究了基于 EDTA 和 DTPA 设计模板的芳香氨基酸类肽的性质。

我们的工作，期望对生物分子非共价识别、离子受体模型设计及含有芳香氨基酸残基的多肽链功能的预测等方面的进一步研究有一定促进作用。

参 考 文 献

1. Chesebro, B. *Science* **1998**, *279*, 42.
2. Hardy, J., *et al. Science* **1998**, *282*, 1075.
3. Marcotte, E. M., *et al. Biochemistry* **1998**, *38*, 667.
4. Mckenzie, D.; Bartz, J.; Mirwald, J. D. O.; Marsh, R.; Aiken, J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25545-25547.
5. Brandner, S.; Raeber, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13148-13151.
6. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E. *Nature* **1997**, *390*, 684-687.
7. Diringer, H.; Gelderblom, H.; Hilmert, H.; Ozel, M.; Edelbluth, C.; Kimberlin, R. H. *Nature* **1983**, *306*, 476-478.
8. Huang, X.; Cuajungco, M. P.; Atwood, C. S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37111.
9. Cherny, R. A.; Legg, J. T.; Mclean, C. A.; Fairlie, D. P.; Huang, X. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23223-23228.
10. Millhauser, G. L. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37(2)*, 79-85.
11. Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991.**
12. Derewenda, Z. S.; Derewenda, U.; Kobos, P. M. *J. Mol. Biol.* **1994**, *241*, 83.
13. Derewenda, Z. S.; Lee, L.; Derewenda, U. *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 248.
14. Steiner, T. *Chem. Comm.* **1997**, 727.
15. Umezawa, Y.; Tsuboyama, S.; Honda, K.; Uzawa, J.; Nishi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 1207.
16. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525.
17. Hunter, C. A. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *101*.
18. Janiak, C. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3885.
19. Dougherty, D. A. *Science* **1996**, *271*, 163.
20. Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chem. Rev.* 1997, *97*, 1303.

第二章 含色氨酸类肽的研究

§2.1 引言

在20个标准氨基酸中，从分子结构和组成、化学和物理性质上看，色氨酸是一个最复杂的氨基酸。因其富含多种多样的化学性质，色氨酸残基常常在生物分子识别过程和功能发挥上，起到其他天然氨基酸所无法代替的独特作用。

晶体是研究非共价相互作用的几何和能量性质的最直接的方式。晶体中分子间的相互作用与分子在溶液中自组装过程中的相互作用是相同的。由于固体的结构可以通过 X-射线衍射分析精确确定结构，而溶液体系的结构只能通过谱学方法研究，无法得到精确的结构，所以对固体分子 3-D 结构的认知有助于较精确的研究固体分子间的相互作用。尽管弱相互作用不及共价键的 5-10 %，但在形成晶体体系时却具有非线性的累加作用。通常，以分子间弱相互作用力驱动的分子组装主要有以下几种作用模式：

1. 氢键

氢键 X—H…Y 是由于与电负性大的 X 原子形成共价键的 H 原子有剩余作用力，可与另一个电负性大的 Y 原子发生以静电相互作用为主的有方向性和饱和性的较强作用力。其键能介于一般共价键和范德华力之间[1,2]。氢键 X—H…Y 中的 X 和 Y 通常是电负性较大，半径较小的原子，如 F、O、N 等，后来发现 C、Cl、Br、I、P、S 等在某些特殊的环境中也能参与形成氢键[3,4]。氢键在分子识别、组装和分子晶体工程中占有非常重要的基础地位[5]。由于氢键的方向性（Directionality）和选择性（Selectivity），近年来普遍用来构筑超分子体系。氢键的方向性是指它有可能预知分子亚单元之间的排列方式，而选择性是指在具有多重氢键相互作用体系中，可以通过挑选精确互补的分子亚单元来对氢键驱动过程进行控制，得到期望结构的聚集体。单个氢键的相互作用力相对较弱（—10 kJ/mol），但多氢键的强度可达到—50 kJ/mol 或更高[6]。

2. CH-π 作用

CH-π作用是一种发生在CH基团（软酸）和π体系（软碱）之间的弱的氢键作用，具有通常氢键的一般特征[7]。它作为一种弱的分子间相互作用，不但影响有机化合物的构象、不对称光学性质、立体选择反应、手性识别及超分子体系的固态结构，而且在控制固态有机分子的晶体堆积、生物体系中蛋白质和DNA的结构和性质方面起着积极的作用[8]。

3. π－π作用

π－π作用是一种发生在π体系和π体系之间由于电荷分布不均匀引起的静电引力及诱导偶极作用力。由于它在生物学、化学、物理学和材料科学中的广泛存在并扮演着重要角色，因而得到了广泛的研究[9-16]。芳香环之间π－π堆积作用的强度在1～50 kJ/mol的范围内，且多数在10 kJ/mol左右和以下。

4. 阳离子-π作用

阳离子-π作用是一种发生在简单阳离子或复杂阳离子与芳香环π体系之间的强烈吸引作用。其本质归属于氢键作用[17]。

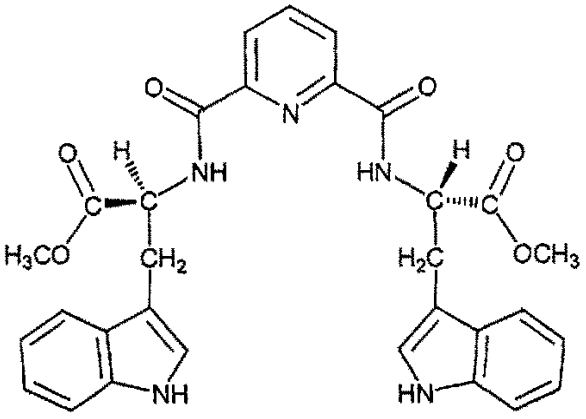
5. 疏水作用

在水溶液或极性溶液中，疏水作用会导致非极性分子趋向于聚集在一起。疏水作用是一种方向性很差的弱相互作用力，当两个疏水分子相互接近时，可造成体系的熵增加，促进了疏水区的稳定性。

6. 多点键合协同作用

在分子组装过程中，实际上往往几种作用力及多个作用位点同时起作用。在一个有限的空间，几种或多个非共价键的协同作用，使分子间的相互作用强度接近或达到共价键水平，转化为结合能。由于这一过程中不存在高的能量势垒，这种结合具有更多的动力学性质。

本文中我们以构象相对刚性的吡啶环为模板，设计合成了小分子类肽2，6-吡啶二色氨酸甲酯（abbr. **PW_2**，结构式见**Scheme 2-1**），培养并得到单晶后通过X-射线衍射对晶体结构进行分析，并初步研究其可能与金属离子的络合作用。



Scheme 2-1. Chemical structures of synthetic compound **PW_2**

§2.2 色氨酸衍生物的晶体结构分析

2.2.1 制备方法

由于 PW_2 不溶于水，但在一般的极性有机溶剂中有较好的溶解度，因此我们进行了广泛的有机溶剂试验来培养单晶。采用缓慢挥发溶剂的方法，从甲醇中我们得到片状透明的适合 X 射线衍射分析的单晶，晶体的形成约需要三周时间。

2.2.2 结构分析

晶体结构分析表明，该晶体属于正交晶系， **Fig. 2-1** 是单个分子的晶体结构示意图，分子具有高度对称性，分子中两个吲哚环几乎平行，所成的二面角小于 8°，吲哚环与吡啶环的夹角约为 41 °；PW_2 的晶体数据和结构精修列于 **Table 2-1**。

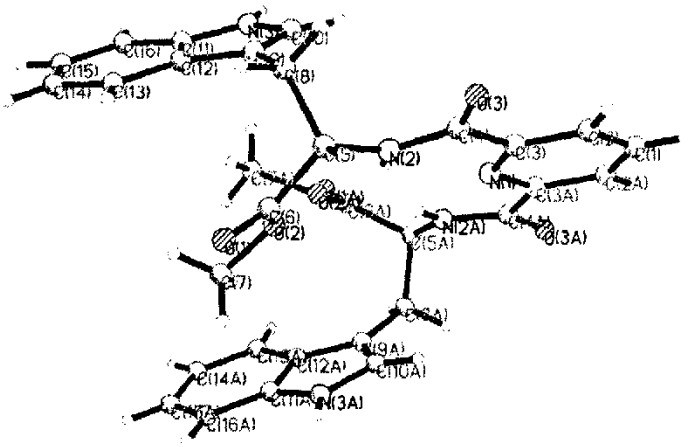


Fig. 2-1. Conformation of PW_2 with atomic numbering scheme.

Table 2-1. Crystal data and structure refinement for PW_2.

Empirical formula	$C_{31}H_{29}N_5O_6$
Formula weight	567.59
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system	Orthorhombic
Space group	P2(1)2(1)2
Unit cell dimensions	a = 10.928(4) A　alpha = 90 deg.
	b = 11.065(4) A　beta = 90 deg.
	c = 11.729(5) A　gamma = 90 deg.
Volume	1418.2(9) A^3
Z, Calculated density	2,　1.329 Mg/m^3
Absorption coefficient	0.094 mm^-1
F(000)	596
Crystal size	0.24 x 0.20 x 0.14 mm
Theta range for data collection	2.53 to 26.37 deg.
Limiting indices	-13<=h<=11, -13<=k<=11, -10<=l<=14
Reflections collected / unique	8142 / 2892 [R(int) = 0.0406]
Completeness to theta = 26.37	99.6 %
Absorption correction	NONE
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	2892 / 0 / 192
Goodness-of-fit on F^2	0.990
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0464, wR2 = 0.0877
R indices (all data)	R1 = 0.0965, wR2 = 0.1024
Absolute structure parameter	-0.2(17)
Largest diff. peak and hole	0.113 and -0.144 e.A^-3

Table 2-2 列出了非氢原子坐标和等当温度因子；**Table 2-3** 和 **2-4** 列出了晶体中的键长和部分键角数据；晶体的扭转角数据见 **Table 2-5**。

Table 2-2. Atomic coordinates (x 10^4) and equivalent isotropic displacement parameters (A^2 x 10^3) for PW_2
U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	-656(2)	6356(2)	6957(2)	105(1)
O(2)	-375(2)	8317(2)	6678(2)	63(1)
O(3)	905(2)	6969(1)	3020(2)	65(1)
N(1)	0	10000	3415(2)	44(1)
N(2)	460(2)	8003(2)	4620(2)	52(1)
N(3)	3330(2)	9522(2)	6897(2)	61(1)
C(1)	0	10000	1060(4)	76(1)
C(2)	288(2)	8970(2)	1657(2)	62(1)
C(3)	283(2)	9011(2)	2829(2)	45(1)
C(4)	583(2)	7897(2)	3497(2)	49(1)
C(5)	577(2)	6995(2)	5392(2)	53(1)
C(6)	-222(2)	7163(2)	6419(2)	60(1)
C(7)	-1009(3)	8571(3)	7732(3)	84(1)
C(8)	1902(2)	6764(2)	5759(2)	56(1)
C(9)	2459(2)	7770(2)	6434(2)	48(1)
C(10)	2918(2)	8815(2)	6023(2)	57(1)
C(11)	3131(2)	8942(2)	7904(3)	54(1)
C(12)	2570(2)	7829(2)	7640(2)	49(1)
C(13)	2258(2)	7065(2)	8544(3)	64(1)
C(14)	2514(3)	7424(3)	9633(3)	80(1)
C(15)	3083(3)	8515(3)	9866(3)	84(1)
C(16)	3401(2)	9289(3)	9011(3)	71(1)

Table 2-3. Bond lengths [A] for PW_2

O(1)-C(6)	1.192(3)	C(1)-H(1)	0.9300	C(9)-C(12)	1.421(3)
O(2)-C(6)	1.323(3)	C(2)-C(3)	1.375(3)	C(10)-H(10)	0.9300
O(2)-C(7)	1.445(3)	C(2)-H(2A)	0.9300	C(11)-C(16)	1.386(4)
O(3)-C(4)	1.221(3)	C(3)-C(4)	1.497(3)	C(11)-C(12)	1.410(3)
N(1)-C(3)#1	1.328(3)	C(5)-C(6)	1.499(4)	C(12)-C(13)	1.398(3)

续 Table 2-3

N(1)-C(3)	1.329(3)	C(5)-C(8)	1.531(3)	C(13)-C(14)	1.366(4)
N(2)-C(4)	1.330(3)	C(5)-H(5)	0.9800	C(13)-H(13)	0.9300
N(2)-C(5)	1.442(3)	C(7)-H(7A)	0.9600	C(14)-C(15)	1.385(4)
N(2)-H(2)	0.8600	C(7)-H(7B)	0.9600	C(14)-H(14)	0.9300
N(3)-C(11)	1.362(3)	C(7)-H(7C)	0.9600	C(15)-C(16)	1.364(4)
N(3)-C(10)	1.366(3)	C(8)-C(9)	1.496(3)	C(15)-H(15)	0.9300
N(3)-H(3)	0.8600	C(8)-H(8A)	0.9700	C(16)-H(16)	0.9300
C(1)-C(2)#1	1.374(3)	C(8)-H(8B)	0.9700		
C(1)-C(2)	1.374(3)	C(9)-C(10)	1.349(3)		

Table 2-4. Parts of bond angles [deg] for PW_2

C(6)-O(2)-C(7)	116.4(2)	C(6)-C(5)-C(8)	110.3(2)	C(9)-C(10)-N(3)	110.2(2)
C(3)#1-N(1)-C(3)	117.7(3)	N(2)-C(5)-H(5)	107.5	C(9)-C(10)-H(10)	124.9
C(4)-N(2)-C(5)	123.10(19)	C(6)-C(5)-H(5)	107.5	N(3)-C(10)-H(10)	124.9
C(4)-N(2)-H(2)	118.5	C(8)-C(5)-H(5)	107.5	N(3)-C(11)-C(16)	130.4(2)
C(5)-N(2)-H(2)	118.5	O(1)-C(6)-O(2)	123.4(3)	N(3)-C(11)-C(12)	106.9(2)
C(11)-N(3)-C(10)	109.1(2)	O(1)-C(6)-C(5)	124.4(2)	C(16)-C(11)-C(12)	122.7(3)
C(11)-N(3)-H(3)	125.4	O(2)-C(6)-C(5)	112.2(2)	C(13)-C(12)-C(11)	117.9(3)
C(10)-N(3)-H(3)	125.4	O(2)-C(7)-H(7A)	109.5	C(13)-C(12)-C(9)	135.0(2)
C(2)#1-C(1)-C(2)	118.7(4)	O(2)-C(7)-H(7B)	109.5	C(11)-C(12)-C(9)	107.2(2)
C(2)#1-C(1)-H(1)	120.6	H(7A)-C(7)-H(7B)	109.5	C(14)-C(13)-C(12)	118.9(2)
C(2)-C(1)-H(1)	120.6	O(2)-C(7)-H(7C)	109.5	C(14)-C(13)-H(13)	120.5
C(1)-C(2)-C(3)	118.7(3)	H(7A)-C(7)-H(7C)	109.5	C(12)-C(13)-H(13)	120.5
C(1)-C(2)-H(2A)	120.6	H(7B)-C(7)-H(7C)	109.5	C(13)-C(14)-C(15)	122.0(3)
C(3)-C(2)-H(2A)	120.6	C(9)-C(8)-C(5)	114.12(19)	C(13)-C(14)-H(14)	119.0
N(1)-C(3)-C(2)	123.0(2)	C(9)-C(8)-H(8A)	108.7	C(15)-C(14)-H(14)	119.0
N(1)-C(3)-C(4)	117.3(2)	C(5)-C(8)-H(8A)	108.7	C(16)-C(15)-C(14)	121.1(3)
C(2)-C(3)-C(4)	119.7(2)	C(9)-C(8)-H(8B)	108.7	C(16)-C(15)-H(15)	119.5
O(3)-C(4)-N(2)	123.8(2)	C(5)-C(8)-H(8B)	108.7	C(14)-C(15)-H(15)	119.5

Table 2-5. Torsion angles [deg] for PW_2

C(2)#1-C(1)-C(2)-C(3)	-0.34(16)	C(5)-C(8)-C(9)-C(12)	98.6(3)
C(3)#1-N(1)-C(3)-C(2)	-0.37(18)	C(12)-C(9)-C(10)-N(3)	0.9(3)
C(3)#1-N(1)-C(3)-C(4)	-179.2(2)	C(8)-C(9)-C(10)-N(3)	179.0(2)
C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	0.7(3)	C(11)-N(3)-C(10)-C(9)	-0.5(3)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	179.49(17)	C(10)-N(3)-C(11)-C(16)	179.3(3)
C(5)-N(2)-C(4)-O(3)	-6.3(3)	C(10)-N(3)-C(11)-C(12)	-0.1(2)
C(5)-N(2)-C(4)-C(3)	173.03(19)	N(3)-C(11)-C(12)-C(13)	-179.23(19)
N(1)-C(3)-C(4)-O(3)	-176.70(18)	C(16)-C(11)-C(12)-C(13)	1.3(3)
C(2)-C(3)-C(4)-O(3)	4.5(3)	N(3)-C(11)-C(12)-C(9)	0.7(2)
N(1)-C(3)-C(4)-N(2)	3.9(3)	C(16)-C(11)-C(12)-C(9)	-178.8(2)
C(2)-C(3)-C(4)-N(2)	-174.9(2)	C(10)-C(9)-C(12)-C(13)	178.9(2)
C(4)-N(2)-C(5)-C(6)	-149.0(2)	C(8)-C(9)-C(12)-C(13)	0.8(4)
C(4)-N(2)-C(5)-C(8)	86.7(3)	C(10)-C(9)-C(12)-C(11)	-1.0(3)
C(7)-O(2)-C(6)-O(1)	5.9(4)	C(8)-C(9)-C(12)-C(11)	-179.05(19)
C(7)-O(2)-C(6)-C(5)	-172.8(2)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-0.4(4)
N(2)-C(5)-C(6)-O(1)	151.1(3)	C(9)-C(12)-C(13)-C(14)	179.7(3)
C(8)-C(5)-C(6)-O(1)	-83.1(3)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-0.6(4)
N(2)-C(5)-C(6)-O(2)	-30.2(3)	C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	0.8(5)
C(8)-C(5)-C(6)-O(2)	95.6(2)	C(14)-C(15)-C(16)-C(11)	0.1(4)
N(2)-C(5)-C(8)-C(9)	64.2(3)	N(3)-C(11)-C(16)-C(15)	179.5(3)
C(6)-C(5)-C(8)-C(9)	-60.5(3)	C(12)-C(11)-C(16)-C(15)	-1.1(4)
C(5)-C(8)-C(9)-C(10)	-79.1(3)		

晶体是由 **Fig. 2-1** 所示的结构单元通过氢键等弱作用力连接形成的有序堆积，氢键的相关参数和对称码见 **Table 2-6**，晶体中只存在分子间氢键（如 **Fig. 2-2** 所示）：一个 PW_2 分子吲哚环上的 N-H 与另一个分子酰胺键的 C＝O 形成 N-H…O 氢键。由于单个 PW_2 分子含有两个酰胺键和两个吲哚环，因此一个 PW_2 分子可以同时与周围四个分子形成氢键（见 **Fig. 2-3a**）。

Table 2-6. Hydrogen bonds for PW_2 [A and deg.].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(3)-H(3)...O(3)#2	0.86	2.00	2.835(3)	164.2

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y+2,z　　#2 -x+1/2,y+1/2,-z+1

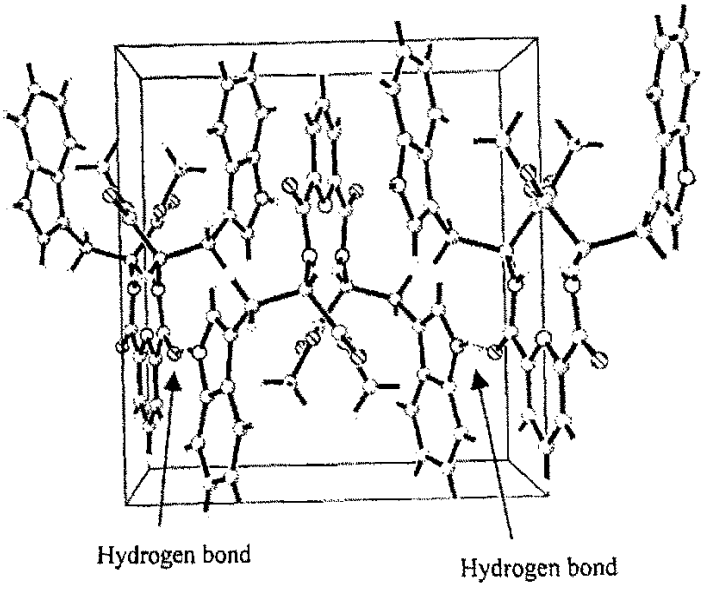


Fig. 2-2. Conformation of PW_2 with atomic numbering scheme.

Fig. 2-3a 是晶体的分子堆积图（沿 a 轴方向投影），为了更清楚地看出晶体的网络堆积结构，分子中氢原子没有画出。由图中可以看出，同层中一个分子同时与周围四个分子以氢键相连接，相邻的四个分子以氢键依次相连接形成封闭的稳定结构，**Fig. 2-3b** 是堆积图的侧面图。

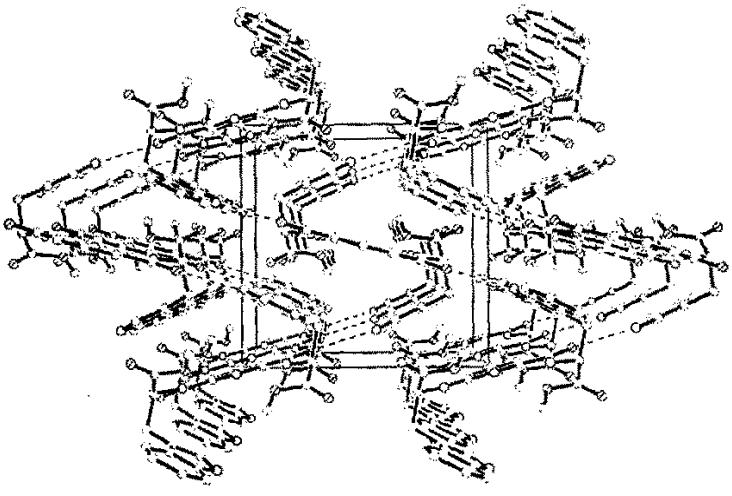


Fig. 2-3a. Top view of moleculer stacks, projected along a axis.

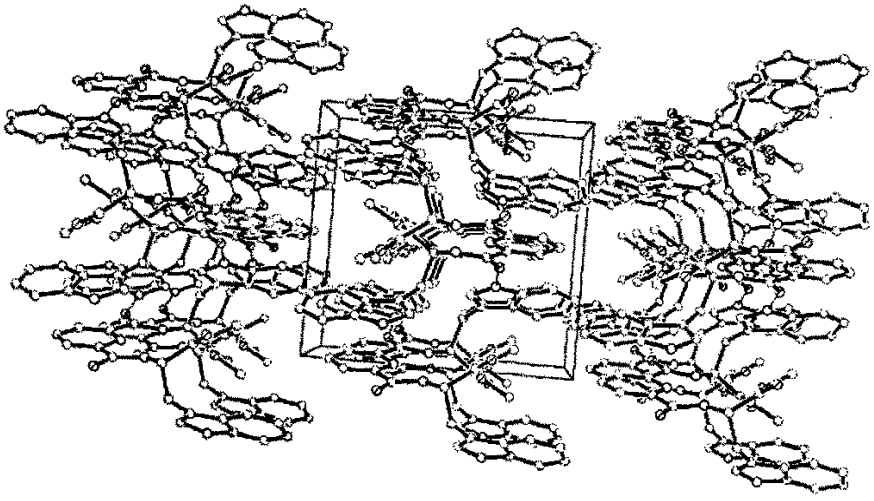


Fig. 2-3b. Side view of moleculer stacks.

为了研究 PW_2 在溶液中可能形成的氢键，我们采用不同的氘代试剂进行 ^1H NMR 测试。结果（核磁谱图及说明见附录）发现，在 DMSO-d_6 溶剂中，PW_2 分子酰胺键上的 H 的化学位移(δ)值为 9.5 ppm，比其在 $CDCl_3$ 中的δ值高约 1.1 ppm。一般来说，ArCONHR 的δ值在 6～8.2 ppm，ArCONHAr 的δ值在 7.8~9.4 ppm (梁晓天，核磁共振，高分辨氢谱的解析和应用，科学出版社，1976)，而 DMSO-d_6 中 PW_2 分子酰胺键上的 H 化学位移明显的向高场移动，很有可能是酰胺键中的 N-H 与溶剂分子中的 O 原子形成了 N－H…O 型分子间氢键。

除了培养单体的晶体外，我们也尝试过培养 PW_2 与金属离子可能形成的配合物的单晶，却未取得满意的结果，如 PW_2 与 Cu 离子可能形成的配合物在有机溶液中易发生变质，其溶液室温放置两到三天会生成褐色沉淀。

§2.3 PW_2与金属离子作用的光谱研究

2.3.1 PW_2的圆二色光谱研究

2.3.1.1 实验原理

圆二色（Circular Dichroism）（简称）是研究有机化合物立体构象的重要手段之一[18]。平面偏振光通过光学活性分子后，由于左、右偏振光的折射率不同，偏振面将旋转一定的角度。这种现象称为旋光（Optical Rotation）。光学活性分子不仅对左、右圆偏振光的折射率不同，对它们的吸收也不一样，从而使左、右圆偏振光透射后变成椭圆偏振光，这种现象称为圆二色性（Circular Dichroism, CD）。圆二色性可用左、右圆偏振光的摩尔吸光度差$\Delta\varepsilon$和摩尔椭圆度$[\theta]$来衡量。

$$\Delta\varepsilon=\varepsilon_L-\varepsilon_R\ ;\ [\theta]=3298\Delta\varepsilon$$

ε_L和ε_R分别为物质对左旋及右旋圆偏振光的吸收系数。

圆二色谱就是$\Delta\varepsilon$（或$[\theta]$）随波长变化的曲线。一般而言，产生圆二色效应需要两个条件：一、存在光学活性分子；二、光学活性分子的手性中心附近存在紫外可见吸收，并受到手性中心的诱导。圆二色光谱为钟型曲线，钟型即所谓的 Cotton 效应。一般而言，圆二色（CD）光谱和旋光谱（ORD）的 Cotton 效应与紫外可见光谱的吸收峰的位置基本一致。

通过圆二色光谱，一般可以用经验的方法推断化合物在溶液中的构象，这是圆二色光谱最普遍的应用。圆二色光谱中某一波长的摩尔椭圆度实际上是溶液中分子的各个构象的摩尔椭圆度的线性叠加[19]。

$$[\theta]=\alpha[\theta]_1+\beta[\theta]_2+\gamma[\theta]_3+\cdots\cdots$$

1969 年，Greenfield 最早用 CD 光谱数据估计了蛋白质的构象，相关的研究方法陆续有报道[20]。特别是近十几年来，用远紫外圆二色(Far-UV CD)数据分析蛋白质二级结构，不但在计算方法和拟合程序上有了极大地发展[21]，而且随着 X 射线晶体衍射与核磁共振技术的提高，越来越多的蛋白质的精确构象得到测定，

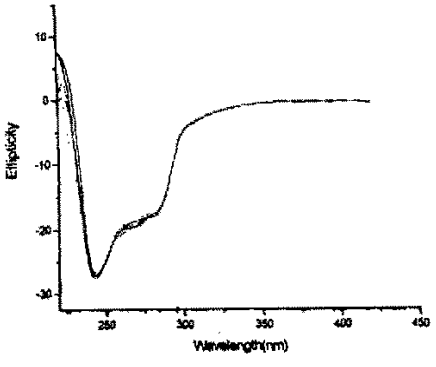
为 CD 数据的拟合提供了更精确的数据库[22]。研究者还发现用 CD 光谱研究蛋白质三级结构具有独特优点，发展了用远紫外 CD 光谱辨认蛋白质三级结构的方法及相关程序[22-24]；此外，近紫外圆二色(Near-UV CD)作为一种灵敏的光谱探针，可反映蛋白质中芳香氨基酸残基微环境的变化[25-27]。

蛋白质中芳香氨基酸残基，如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸处于不对称微环境时，在近紫外区 250～320 nm，表现出 CD 信号。研究表明：苯丙氨酸残基的 CD 信息表现在 255、261 和 268 nm 附近；酪氨酸残基的信息表现在 277 nm 左右；而在 279、284 和 291 nm 是色氨酸残基的信息。因此，近紫外 CD 谱可作为一种灵敏的光谱探针，反映芳香氨基酸所处微环境的扰动，能用来研究蛋白质三级结构精细变化。

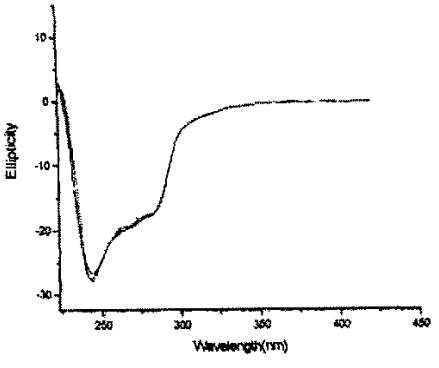
2.3.1.2 结果与讨论

配制 100 μM PW_2 的甲醇溶液（溶剂经无水处理），分别向其中滴加 Ca^{2+}、Zn^{2+} 和 Cu^{2+}，室温下进行 CD 测试，我们发现 Cu^{2+}使 PW_2 的 CD 谱图发生了非常明显的变化，而加入 Ca^{2+}和 Zn^{2+}的 CD 谱图则几乎没有发生改变。金属离子对 PW_2 的 CD 光谱滴定谱图如下：

(a) $CaCl_2$ Titration of PW_2



(b) $ZnCl_2$ Titration of PW_2



(c) $CuCl_2$ Titration of PW_2
Inset shows UV spectra of 20 μM PW_2 in MeOH.

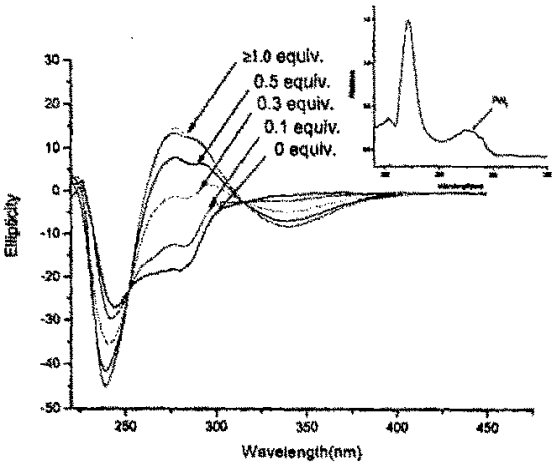


Fig. 2-4. CD-titration of 100 μM PW_2 with M^{2+} in MeOH.

色氨酸在 280nm 波长附近有最大的紫外吸收峰，因此我们认为 PW_2 的 CD 光谱中 280 nm 附近出现的负吸收谱带为 PW_2 的特征峰。向 PW_2 甲醇溶液中滴加 Cu^{2+}，在 280 nm 处原来的负峰逐渐变小，在原位置出现一个正的吸收谱带，同时 243 nm 处原有的负峰更负，而在 340 nm 处产生一个宽的负吸收谱带；当加入 Cu^{2+} 的量大于 1 倍摩尔当量的 PW_2 后，随着 Cu^{2+} 的增加，CD 谱图不再发生变化。我们推测，PW_2 和 Cu^{2+} 产生 1:1 的配合；加入 Cu^{2+} 后 PW_2 的 CD 信号的强烈变化表明络合过程中 Trp 残基的所处的微环境发生改变，Trp 残基可能参与络合，同时暗示在 PW_2-Cu^{II} 的构象中 Typ 残基处于确定的三维结构中。

3.3.2 其它光谱研究

配制 100 μM～1 mM PW_2 不同溶剂（甲醇，甲醇与水，二氯甲烷，丙酮等）的溶液进行荧光测试，均没有检测到明显的荧光发射信号。这可能是由于 PW_2 分子具有高度对称性，使荧光发生分子内猝灭所致。

此外，对 PW_2 及其与 Ca 离子和 Zn 离子在 DMSO-d_6 中的溶液进行 ^{13}C－NMR 测试，未观察到碳谱中的峰有明显的偏移和裂分现象。

§ 2.4 PW_2 的质谱分析

2.4.1 实验条件和方法

配制 1×10^{-3} M 的 PW_2 甲醇溶液，各取出 1 mL，向其中分别加入 11.0 μL 的 0.1 M $CuCl_2$, $ZnCl_2$,和 $CaCl_2$ 的甲醇溶液，振荡使混合均匀。

以上所得溶液直接用于 ESI-MS 进行分析。

2.4.2 结果和讨论

在 ESI-MS 谱图中，我们发现了 PW_2 与 Cu^{2+}形成 1:1 配合的分子离子峰，而加 Zn^{2+}和 Ca^{2+}的却没有。结果表明三种金属离子中只有 Cu^{2+}与 PW_2 形成了 1:1 的络合物，这与 CD 谱研究结果一致。

ESI-MS of PW_2: Calcd. for exact mass $C_{31}H_{29}N_5O_6$, m/z =567.2, Found 590.3 $[PW_2 + Na]^+$; ESI-MS of PW_2-metal ion complexes: Cu-PW_2, Calcd. for exact mass $C_{31}H_{29}N_5O_6Cu$, m/z = 630.1, Found 629.1 $[PW_2 + M - H]^+$（see **Fig. 2-5** ）

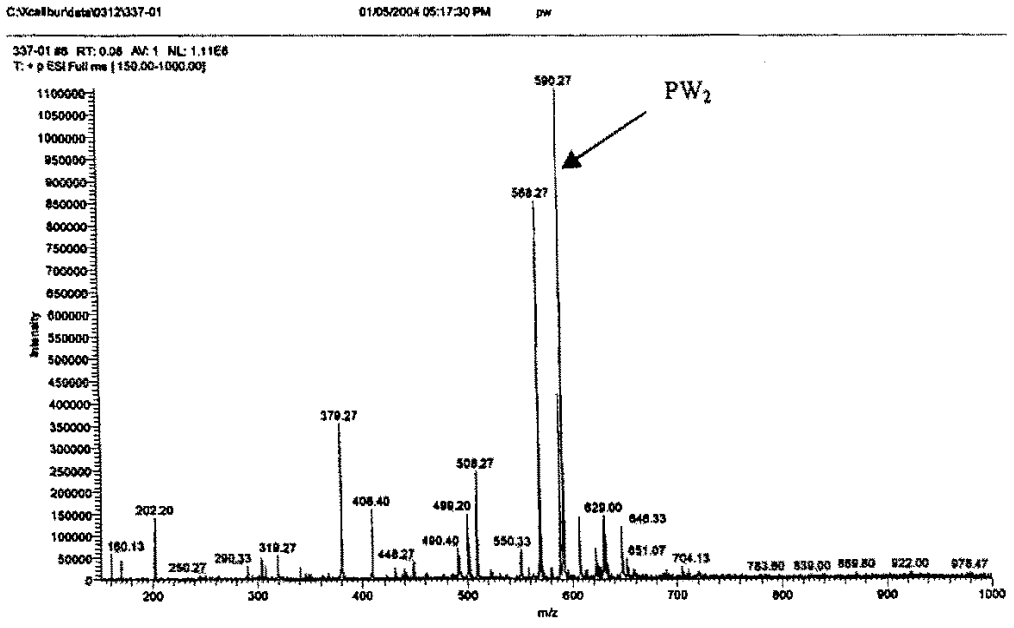


Fig. 2-5a ESI-MS spectrum of PW_2.

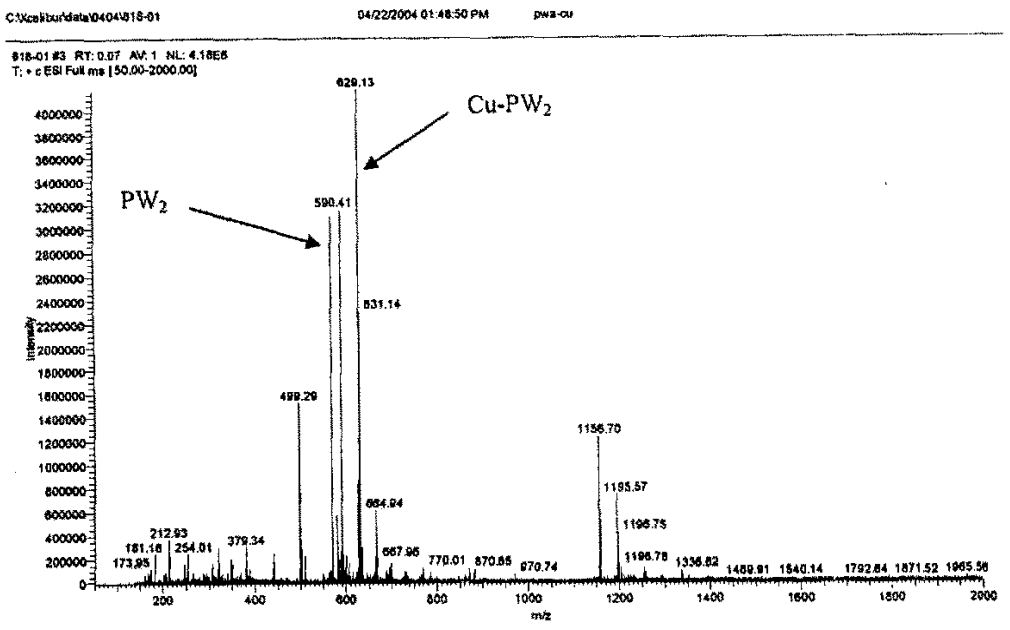


Fig. 2-5b ESI-MS spectrum of Cu-PW_2.

§2.5 本章结论

1. 我们以构象相对刚性的吡啶环为模板，设计合成了小分子类肽 2，6-吡啶二色氨酸甲酯，成功得到其单晶并通过 X-射线衍射对晶体结构进行分析。结果发现在具有高度对称性的 PW_2 分子中两个吲哚环几乎平行，所成的二面角小于 8°；晶体呈网络状堆积结构，其中只存在 N-H···O 型分子间氢键。

2. PW_2 溶液没有明显的荧光发射信号，很可能是由于 PW_2 分子具有高度对称性，分子中两个吲哚环几乎平行，使荧光发生分子内猝灭所致。对这方面进行深入研究，有助于我们更加了解化学结构和荧光强度的关系。

3. 初步研究了 PW_2 与金属离子可能的作用，通过圆二色光谱和 ESI-MS 检测到 PW_2 在甲醇溶液中与 Cu^{2+} 形成 1:1 的络合物，推测其可能的结构如下图：

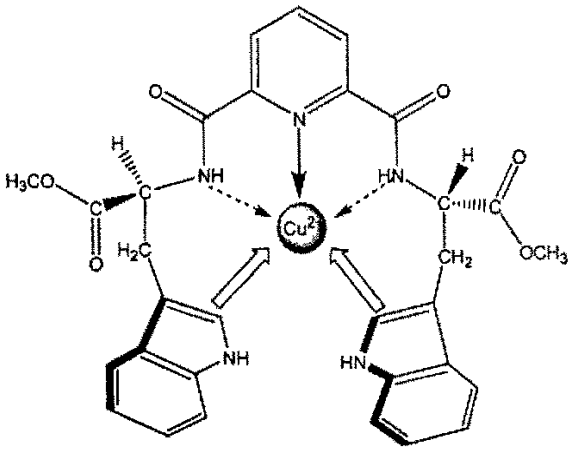


Fig. 2-1. Imaginabale conformation of **PW_2-Cu^{II}**.

没有发现 PW_2 与 Ca^{2+}和 Zn^{2+}间有明显的作用，这说明 PW_2 可以选择性的结合 Cu^{2+}，但这种络合物在溶液中不稳定，可能是由于 PW_2 与 Cu^{2+}作用使分子构象发生改变，导致吲哚环易被氧化。

4. 进一步修饰模型的结构，如适当增加吡啶环与氨基酸之间碳链的长度，以减弱整个分子的刚性，或许更有助于研究芳香环与金属离子之间的弱作用力。

参 考 文 献

1. Muller-Dethlefs, K.; Hobza, P., *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 143.
2. Alkorta, I.; Elguero, J., *J Phys. Chem.* **1999**, *103*, 272.
3. Salai Cheettu Ammal, S.; Venuvanalingam, P., *India J. Chem.* **2000**, *39A*, 80.
4. Salai Cheettu Ammal, S.; Venuvanalingam, P., *J. Phy. Chem.* A **2000**, *104*, 10859.
5. Aaker Y, C. B.; Seddon, K. R., *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 397.
6. Braga, D.; Grepioni, F., *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 601.
7. Schneider, H. J. et al., *Fronties in Supermolecular Organic Chemistry and Photochemistry*, VCH Publishers, **1991**, *29*.
8. Alkorta, I.; Rozas, I.; Elguero, J. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*. 163.
9. Takahashi, H.; Tsuboyama, S.; Umezawa, Y.; Honda, K.; Nishio, M., *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6185.
10. Burley, S. K.; Retsko, G. A., *Science* **1985**, *229*, 23.
11. Lewis, F. D.; Yang, J.-S.; Stern, C. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2772.
12. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525.
13. Jorgensen, W. L.; Severance, D. L., *J. Am Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4768.
14. Hunter, C.A., *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 101.
15. Hunter, C. A.; Singh, J.; Thornton, J. M., *J. mol. Biol.* **1991**, *218*, 837.
16. Hobza, P.; Selzle, H. L.; Schlag, E. W., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18790.
17. Hobza, P.; Selzle, H. L.; Schlag, E. W., *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1767.
18. a) Crabbe, P., *"ORD and CD in Chemistry and Biochemistry"*, **1972**. b) Legrand, M.; Rougier, M. J., *Sterochemistry*, vol. *2*, Edited by Kagan H. B., **1977**. 陈荣峰等译，*"旋光谱和圆二色光谱"*，**1988**.c) 叶秀林，*"立体化学"*，**1982**.
19. a) Madison, V.; Atreyi, M.; Blout, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 6725. b) Madison, V.; Deber, C. M.; Blout, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 4788. c). Boron, D.; Pease, L. G.; Blout, E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 8299.
20. a) Saxena V P, Wetlaufer D B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1971**, *68*, 969. b)

Brahms S, Brahm J. *J. Mol. Biol.*, **1980**, *138*, 149.

21. a) Compton L A, Johnson W C Jr. *Anal. Biochem.*, **1986**, *155*, 155. b) Tourmadje A, Alcorns W, Johnson W C Jr. *Anal. Biochem.*, **1992**, *200*, 321
22. Sreerama N, Venyaminov S Y, Woody R W. *Biophys. J.*, **2001**, *80*,321a
23. Venyaminov S Y, Vassilenko K S. *Anal. Biochem.*, **1994**, *222*, 176
24. Manavalan P, Johnson W C Jr. *Nature*, **1983**, *305*, 831
25. Kelly S M, Price N C. *Biochem. Biophys. Acta*, **1997**, *1338*, 161.
26. Price N C. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2000**, *31*, 29.
27. Dockal M, Carter D C,Ruker F. *The Journal Biological Chemistry*, **2000**, *275*, 3042.

第三章 含酪氨酸单元的类肽的设计与研究

§3.1 引言

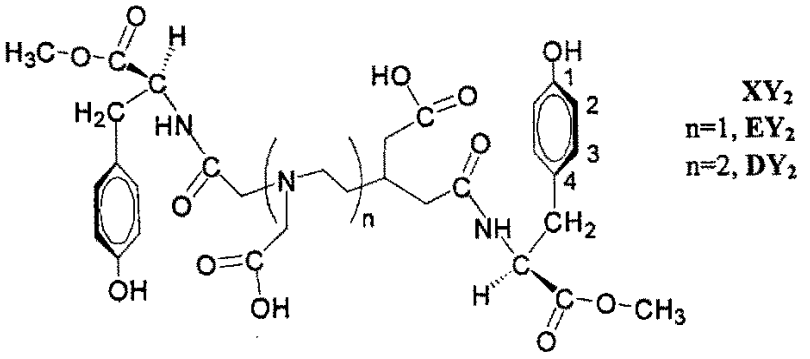
分子识别是依赖于分子形状、大小等因素的主体对客体的选择性键合并产生某种特定功能的过程，即受体(主体)对底物(客体)选择性结合。这一概念最初是由有机化学家和生物化学家们在分子水平研究生物体系中的化学问题而提出的[1-4]。分子识别不仅具有高度的选择性，而且具有信息的存储与输出，能量转移和能量传递等功能。因此分子识别是生物体系高度组织化过程赖以进行的一个基本作用方式[4-6]。

在决定分子识别的众多因素中，非共价作用力具有非常重要的作用。Cation-pi Interation 作为非共价作用力之一，发生在阳离子与富电子基团，如双键、三键和芳环之间。π电子体系可以是中性的或是带负电性的，但至今已知的，后者对生物体系的意义不大[7]。在天然氨基酸中，四种带有芳香性的氨基酸是：组氨酸，色氨酸，酪氨酸以及苯丙氨酸，其氨基酸残基分别为咪唑、吲哚、苯酚和苯。其中咪唑是很强的 σ-donor，而其余三种都是很强的 π-donor[8,9]。计算[10-13]表明 π 电子的提供能力大小顺序是 indole > phenol > benzene。因此，利用后三种氨基酸设计合类肽的研究可以更深入了解 Cation-pi 相互作用在生物体系的意义。

由于 Cation-pi 作用力属于非共价弱作用力，至多 5～6 kcal/mol, 所以，在水相中的实验观测技术，以往没有报道过；即使在有机溶液相，也没有成熟的观测手段。在我们的工作之前，对生物分子上的天然芳香环 pi 体系与阳离子的非共价作用方法，主要围绕天然氨基酸之冠醚模板连接物的晶体结构分析[14]。

本文中，我们以 ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）和 diethylenetriamine-penta acid（DTPA）为模板，利用酪氨酸残基为核心识别单元，设计合成了新型的开链式结构的类肽：EDTA-bis (L-tyrosine methyl ester) (abbr. **EY_2**) 和 DTPA-bis (L-tyrosine methyl ester) (abbr. **DY_2**)（具体结构见 **Scheme 3-1**），利用荧光光谱、核

磁共振（NMR）技术以及电喷雾离子化质谱（ESI－MS）等检测手段，对其与金属离子在溶液中的非共价作用识别进行系统的研究，深入的探索了在水溶液仿生体系中芳香氨基酸与金属离子的协同识别作用。



Scheme 3-1. Chemical structures of synthetic receptors **XY₂** (abbr. **EY₂** and **DY₂**)

§ 3.2 XY_2 与金属离子非共价作用的光谱检测研究

3.2.1 DY_2 的圆二色光谱研究

室温下，控制溶液 pH 值在 6.86（25 mM 的 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 缓冲溶液）左右，分别向 DY_2 水溶液中滴加 Cu^{2+}、Co^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}和 Mn^{2+}这六种过渡金属离子，同时记录 CD 谱。从谱图上看，只有 Cd^{2+}使 DY_2 的 CD 谱发生了微弱的有规律性的改变,见 **Fig. 3-1**。

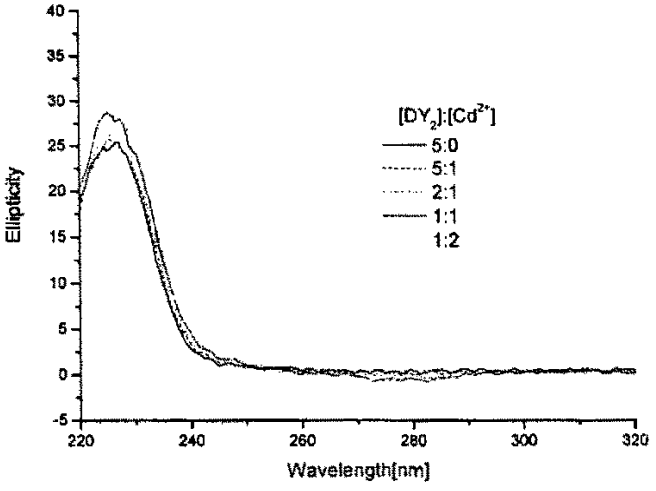


Fig. 3-1. CD-titration of 100 μM DY_2 with Cd^{2+} at pH 6.86±0.05

随着金属离子Cd的加入，在277 nm附近产生一个很弱的负Cotton效应，当[Cd^{2+}]与[DY_2]的比例大于1:1时，CD光谱不再随金属离子的加入而继续变化。酪氨酸的紫外吸收波长在275 nm，因此我们认为在277 nm处的宽峰为DY_2的特征峰。由此推测，DY_2和Cd^{2+}产生1:1的配合作用。这种诱导产生的CD信号及强度不仅暗示着络合物中Tyrosine phenol发色团参与了络合，同时可以认为在DY_2-M^{II}的构象中，phenol moieties处于一个明确的三维结构中。

金属离子与EY_2的CD光谱，本组过去已经做了相关的研究[15]，但结果并不理想。与EY_2的CD光谱比较，DY_2的CD谱的特征峰更不明显，因此无法确定DY_2与其它金属离子是否形成络合，如果有络合，与不同的金属离子作用的大小如何，在形成络合的过程中phenol moieties是否有贡献。为了解决以上问题，我们把研究的重点转移到其它的分析方法上。

3.2.2 XY_2 的荧光光谱研究

3. 2. 2. 1 实验原理

（一）荧光分析法简介

分子吸收光子后能量升高，从基态跃迁到激发态，当从激发态回复到基态时，可能以热或光辐射的形式释放能量。跃迁过程中分子内电子自旋多重性未发生变化时，产生荧光。通常所观察到的荧光现象是指物质吸收了波长较短的紫外光后发出波长较长的可见荧光。通过测量荧光的强度，可用于定量测定许多无机和有机物质，它已成为一种很有用的分析方法，特别在生物化学方面有着广泛的应用。荧光分析法具有下列优点：

1. 灵敏度高

测定下限比紫外-可见吸光光度法低 2～4 个数量级，在 10^{-6}～10^{-9} g 之间。因为荧光分析是在与激发光垂直的方向上观察光的强度，因此它不会受激发光强度的干扰。一旦荧光产生，就能辨别，所以有利于提高测定的灵敏度。

2. 选择性高

比紫外-可见吸光光度法的选择性好。因为凡是能发生荧光的物质，首先必须吸收一定频率的激发光，而吸收光的物质不一定会发生荧光。即使对于某一给定波长的激发光，不同的物质所发出的荧光波长也不尽相同。因此只要控制激发光的波长，并通过单色器分离出荧光发射波长，就不难得到选择性好的结果。

3. 方法简便、快速、重现性好、取样量少，甚至可直接将试样（不加任何试剂）在紫外光照射下进行测定。它既可作为定性鉴定，也可用于定量测定。

但是它的应用仍不如吸光光度法广泛，其原因在于有许多物质不会产生荧光，仅有限数量的物质能产生荧光。尤其是许多无机盐发生的荧光还在可见光的范围内。同时测定时干扰因素较多，如干扰化合物、溶剂、温度、溶液 pH 值放置时间等，它们影响了荧光的强度。因此在测定时，对这些因素都应严格控制。

（二）荧光分析条件的研究

1. 研究荧光与荧光体结构的关系以便能把非荧光物质转变为荧光物质，把弱荧光物质转变为强荧光物质。

2. 研究某荧光物质的激发光谱和发射光谱，荧光激发光谱是指通过测量荧光

物质的发光通量随激发光波长变化而获得的光谱，它反映了不同波长激发光引起荧光的相对效率。荧光发射光谱是在激发光波长和强度不变条件下，荧光物质所产生的荧光的强度与波长的关系，它可用于鉴别荧光物质，也是荧光分析中确定荧光波长的依据。

3. 溶剂的极性　荧光物质在不同的溶剂中，其荧光光谱和荧光强度都不同。因此应该研究溶剂极性对荧光的影响以确定测定的最佳溶剂。

4. 溶液的pH值　荧光物质是弱酸或弱碱，改变pH 值可能使荧光物物浓度或形态发生变化，故溶液的pH 值对荧光强度、波长可能有影响

5. 温度　般情况下升高温度可以加剧荧光分子之间的碰撞，使高能级分子的内能转换加快，以热辐射形式放出能量从而降低荧光强度。

6. 其他因素　大多情况下，共存物对荧光的产生以及荧光光谱可能有影响，这种影响是多方面的，最主要的是共存物对荧光的猝灭作用。

(三) 荧光分析法的应用

在具有荧光的化合物的水溶液中加入另外一种物质后，其荧光强度一般会增大或减小，这是形成包结配合物的标志之一[16]。荧光增强的原因一般解释为由于荧光分子被包结后，处于一个被屏蔽的疏水环境中，被光激发到第一或以上电子激发态的各振动能级之后，不易通过同类分子之间或与其他分子（特别是极性溶剂分子和溶解氧分子）碰撞而消耗相当于这一能级的能量，即单线态和三线态非放射衰变几率变小，因而发光衰变的几率增大。

荧光分析法在生物化学及生理学方面的应用极为广泛。主要是因为荧光分析法对于生物上许多重要的化合物具有很高的灵敏度和较好的特效性。因此，虽然生物液体的组成十分复杂，而其中许多化合物仍可不经分离进行分析。而且，荧光分析法为在分子水平上研究细胞过程，即研究生物活性物质之间的相互作用，以及研究蛋白质的结构和机能方面提供了一种极好的分析方法。最近报道的以荧光光谱与分子计算为联合手段可以进行分子识别方面的研究[17]。随着荧光分析法的不断研究、实践和发展，可用分子探针技术，并利用一些特殊基团（芳香氨基酸残基）与原来不能发射荧光的物质反应后生成具有荧光的受体分子，对其进行

荧光分析，这对于生物大分子的研究具有重要意义。

3.2.2.2 结果与讨论

(1) XY_2 与金属离子络合作用的定性分析

我们测定了碱土金属（Ca，Mg）和过渡金属（Cu，Co，Ni，Mn，Zn，Cd）离子浓度的增加（0～2 mM）对400 μM XY_2水溶液在室温下的荧光发射光谱的变化，控制pH值为4.6 (缓冲溶液为200 mM NaOAc + 200 mM HOAc)，固定荧光激发波长为274.00 nm，荧光发射谱图中最大发射波长为303.84 nm。为了更清楚地看出荧光强度变化，我们以最大发射波长处的荧光强度对金属离子浓度与金属离子和受体（EY_2和DY_2）浓度之和的比值作图，结果见**Fig. 3-2**。

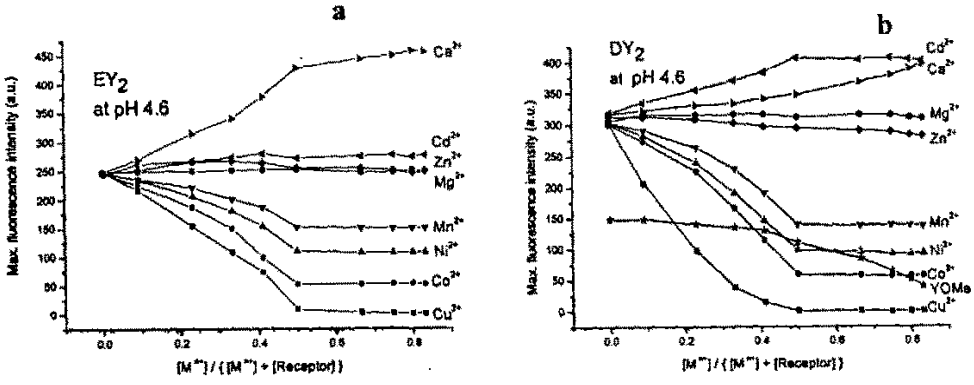


Fig. 3-2. (a) Metal ion concentration-dependence spectra of fluorescence intensity of 400 μM EY_2 at pH 4.6 with 200 mM NaAc buffer. (b) Metal ion concentration-dependence spectra of fluorescence intensity of 400 μM DY_2, compared with Cu(Ⅱ) ion-dependence of 800 mM NH_2-Tyr-OMe（YOMe）at pH 4.6 with 200 mM NaAc buffer.

加入金属离子后含酪氨酸单元的XY_2荧光猝灭表明分子之间有相互作用及分子构象发生改变，这是由于荧光发射波长和强度对于phenol发色团周围微观环境改变的敏感性所致。在25 ℃时，固定荧光激发波长为274 nm，在200 mM的NaAc/HAc缓冲溶液中，M(Ⅱ)（M＝Cu、Co、Ni、Mn）能使XY_2发生明显的荧光猝灭。浓度为400 μM的XY_2水溶液中，随着M(Ⅱ)浓度的增加，在最大发射波长303.84 nm处，

XY_2的荧光强度呈线性降低，但这种情况仅在金属离子浓度小于等于受体浓度时成立。当金属离子超过了1摩尔当量后，M(Ⅱ)的增加对XY_2的荧光光谱基本没有影响。从**Fig. 3-2**中可以看出，当加入的Cu(Ⅱ)大于1摩尔当量，XY_2的荧光强度几乎为零，即Cu(Ⅱ)能使XY_2的荧光完全淬灭。而其它的金属离子如Co^{2+}、Ni^{2+}和Mn^{2+}等对XY_2的荧光虽然也有明显的减弱作用，但却没能观察到完全的荧光猝灭。这说明XY_2同Co^{2+}或Ni^{2+}和Mn^{2+}之间的作用比与Cu^{2+}的作用要小的多。

由定量谱图（**Fig. 3-2**）分析中荧光强度呈线性变化可知，XY_2中均是只存在单一类型的phenol基团发生了荧光猝灭，而XY_2能与等量的金属离子发生络合作用，这说明XY_2与金属离子络合时XY_2中的phenol环参与了相互作用。**Table 3-1**为pH 4.6条件下Cu^{2+}，Co^{2+}，Ni^{2+}，Mn^{2+}对XY_2的最大荧光猝灭效率，由此可知，pH 4.6时金属离子对XY_2的猝灭能力均为：Cu^{2+}>Co^{2+}>Ni^{2+}> Mn^{2+}。不同金属离子的荧光猝灭效率同它们相应的EDTA络合物的稳定常数值并不一致（Stability constants (lgK_{MY}, t=20～25 ℃) of EDTA complexation with metal ions are: Cu^{2+} (18.8), Co^{2+} (16.3), Ni^{2+} (18.7), Mn^{2+} (14.0), Zn^{2+} (16.5), Cd^{2+} (16.5), Ca^{2+} (10.7), Mg^{2+}(8.7) and La^{3+}(15.4), respectively)，因此呈线性变化的荧光猝灭曲线可以反映金属离子与XY_2中酪氨酸残基之间的metal ion-phenol ring作用的强弱。

Table 3-1. The maximum fluorescence quench efficiencies (%) of XY_2 against metal ions at pH 4.6

	Cu^{II}	Co^{II}	Ni^{II}	Mn^{II}
EY_2	99.5	78.7	56.3	39.3
DY_2	99.8	81.0	69.2	54.6

由于Cu^{2+}的存在能够使XY_2的荧光几乎完全猝灭，我们做了在相同条件下Cu^{2+}对800 μM H_2N-Tyr-OMe(YOMe)的荧光滴定实验（见**Fig. 3-2b**），同样固定荧光激发波长为274 nm，随着Cu^{2+}的增加，在最大发射波长303.84 nm处，荧光强度降低，但是荧光猝灭并不是呈线性变化，而是发生曲线型的平缓的下降。这种强烈的反差表明在游离的H_2N-Tyr-OMe中不只存在一类Tyr基团，荧光猝灭不仅仅是metal

ion-phenol ring发生了相互作用，还受到其它因素的影响。

此外，从**Fig. 3-2**可以看出，在酸性条件下，Zn^{2+}和Mg^{2+}对XY_2的荧光没有显著的影响，向EY_2中加入Cd^{2+}荧光也没有发生明显变化，但是对于DY_2而言，随着Cd^{2+}浓度的增加，在最大发射波长303.84 nm处，DY_2的荧光强度呈线性上升，而当金属离子超过了1摩尔当量后，加入Cd^{2+}后DY_2的荧光强度几乎保持不变。Ca^{2+}则可以使XY_2荧光强度均升高，对于EY_2，在Ca^{2+}小于1摩尔当量时，荧光强度显著增加，当Ca^{2+}超过了1摩尔当量后，荧光强度保持稳定；对于DY_2，随着Ca^{2+}的增加，其荧光强度一直呈曲线型平稳上升，当Ca^{2+}超过了1摩尔当量后，这一增加趋于平缓。

为判断离子强度对XY_2荧光的影响以及XY_2与碱金属离子Na^+，K^+或者H^+间可能存在的相互作用，我们采用浓度同样为400 μM的XY_2，以pH值为4.6的200 mM NH_4Ac缓冲溶液替代NaAc缓冲溶液，研究与荧光发射的pH滴定，结果表明当Na^+或K^+浓度增加时，荧光发射强度几乎不发生改变，这暗示没有发生碰撞或络合的荧光猝灭。此外，我们做了XY_2对Li^+在NaAc/HAc和Tris-HCl缓冲体系的荧光滴定，同样没有发现荧光发射强度有明显的改变。但是，当保持离子强度不变改变缓冲溶液体系（pH值从3.5增加至7.0）时，XY_2荧光强度均有一定增加（**Fig. 3-3**）。

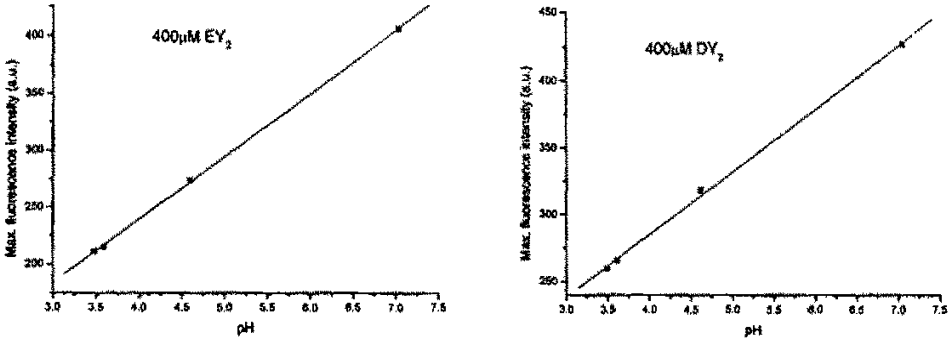


Fig. 3-3 Maximum fluorescence intensity of XY_2 versus pH.

生命体系的正常运作大都需要对pH值进行精确的调控，为了更好的模拟生命体系，我们选用了Tris-HCl缓冲溶液，这一缓冲体系具有无毒、无抑制性，不易水解，对酶不敏感和缓冲容量大等优点。

用同样的方法，我们测试了生理条件下各种金属离子对EY_2的荧光发射光谱。室温下，pH值为7.0 (200 mMTris-HCl缓冲溶液)，固定荧光激发波长为274.00 nm，荧光发射谱图中最大发射波长仍为303.84 nm。以最大发射波长处的荧光强度对金属离子浓度与金属离子和受体（EY_2和DY_2）浓度之和的比值作图，结果见**Fig. 3-4**。

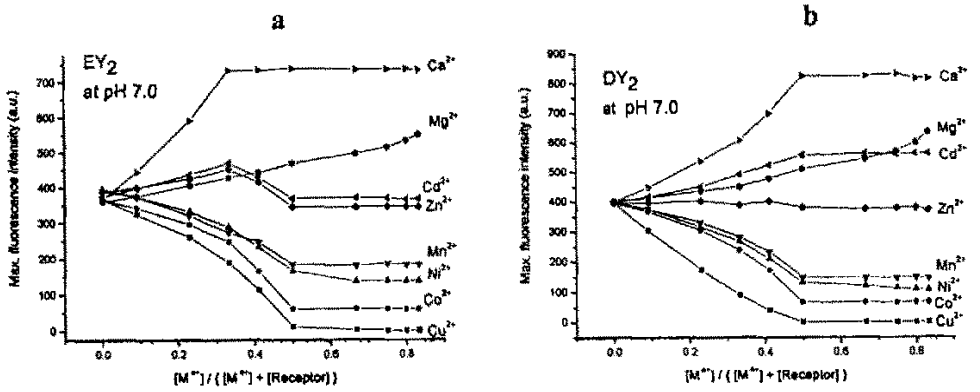


Fig. 3-4. (a) Metal ion concentration-dependence spectra of fluorescence intensity of 400 μM EY_2 at pH 7.0 with 200 mM Tris-HCl buffer. (b) Metal ion concentration-dependence spectra of fluorescence intensity of 400 μM DY_2 at pH 7.0 with 200 mM Tris-HCl buffer.

中性条件下，当加入金属离子Cu^{2+}，Co^{2+}，Ni^{2+}，Mn^{2+}后，XY_2荧光也发生了猝灭。金属离子与XY_2之间产生了1: 1的络合作用。这四种金属离子对XY_2的最大荧光猝灭效率见**Table 3-2**。

Table 3-2. The maximum fluorescence quench efficiencies (%) of XY_2 against metal ions at pH 7.0

	Cu^{II}	Co^{II}	Ni^{II}	Mn^{II}
EY_2	99.8	83.4	65.0	53.0
DY_2	99.9	83.2	73.3	63.4

然而对于另外四种金属离子，它们在pH 7.0条件下对XY_2的荧光光谱产生不同程度的影响。

EY_2中加入Zn^{2+}和Cd^{2+}，开始时荧光强度呈现线性增加，当加入的金属离子超过0.5倍摩尔当量后，荧光强度则表现为线性下降，至金属离子超过了1摩尔当量后，荧光强度不再发生明显变化，加入Zn^{2+}的荧光最终强度比起始荧光强度低一些，加入Cd^{2+}的荧光最终强度接近起始荧光强度，比起始强度略低。Zn^{2+}和Cd^{2+}的加入对DY_2的荧光影响与酸性条件下情况一样，即加入Zn^{2+}后DY_2的荧光没有显著的变化，加入Cd^{2+}使DY_2的荧光强度呈线性上升，超过了1摩尔当量后，荧光强度不再增加。

在pH为7.0时，Ca^{2+}的加入使XY_2的荧光强度均上升。对于EY_2，加入Ca^{2+}后荧光强度急剧线性上升，当Ca^{2+}超过了0.5倍摩尔当量后荧光强度不再发生明显变化；对于DY_2，开始时为线性上升，当Ca^{2+}超过了1倍摩尔当量后荧光强度保持稳定。Mg^{2+}的增加，则可以使XY_2的荧光强度均呈现曲线型平稳上升。

比较不同条件下Ca^{2+}对400 μM XY_2的荧光强度的增加，我们发现，在pH 4.6时，加入1倍当量的Ca^{2+}使EY_2的荧光强度增加72.3 %，使DY_2的增加9.6 %；而在pH 7.0时，使EY_2的荧光强度增加101.4 %，使DY_2的增加106.7 %。

鉴于加入Ca^{2+}的能够使XY_2的荧光均发生显著增强这种特殊现象，我们对比做了在相同条件下Ca^{2+}对不同pH值溶液中YOMe的荧光滴定实验，发现游离的YOMe的荧光强度几乎不会受到Ca^{2+}影响。生命体系中，Ca^{2+}作为细胞内第二信之一参与了多种重要细胞功能的调节，浓度的改变对细胞的结构和功能产生重大影响；XY_2作为一种有效的生物探针可以检测生物体内微量Ca^{2+}离子的变化，这就具有非常重要的生物学意义。

由八种金属离子（Cu^{2+}，Co^{2+}，Ni^{2+}，Mn^{2+}，Zn^{2+}，Cd^{2+}，Ca^{2+}，Mg^{2+}）对400 μM XY_2在不同缓冲体系的水溶液荧光发射强度的改变我们得出结论：

1. 在pH 4.6和pH7.0条件下，Cu^{2+}，Co^{2+}，Ni^{2+}，Mn^{2+}都可以使XY_2发生荧光猝灭，且金属离子对XY_2的猝灭能力均为：Cu^{2+} >Co^{2+}>Ni^{2+}> Mn^{2+}；XY_2与金属离子发生1:1的络合作用。

2. Mg^{2+}在pH 4.6时对XY_2的荧光影响不明显，中性条件则可以使XY_2的荧光强度均呈现曲线型平稳上升。Ca^{2+}的加入使XY_2的荧光强度增加，酸性条

件下EY_2与Ca^{2+}发生1:1的络合作用，DY_2没有发现一定比例的络合，中性时，EY_2与Ca^{2+}发生2:1的络合作用，DY_2与Ca^{2+}发生1:1的络合。

3. Cd^{2+}使DY_2的荧光强度增强，不同pH时DY_2与Cd^{2+}均可发生1:1的络合。Zn^{2+}对DY_2和pH 4.6时EY_2的荧光影响不大。在pH 7.0时，Zn^{2+}，Cd^{2+}均可使EY_2的荧光强度发生先上升后下降的变化。

为了更加直观地描述和观察金属离子（Ca^{2+}，Mg^{2+}，Zn^{2+}，Cd^{2+}）对XY_2的荧光变化并进行比较，我们做出了XY_2在最大发射波长303.84 nm处加入1倍当量金属离子荧光强度与起始荧光强度之比的柱状分析图（见**Fig. 3-5**）。

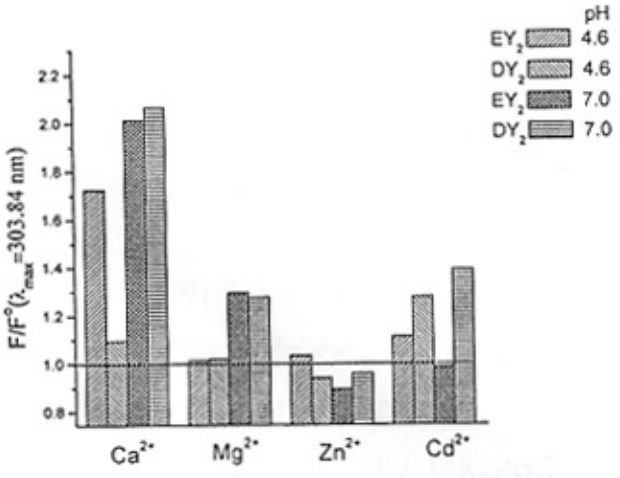


Fig. 3-5. Fluorescence response of XY_2 to 1 equiv of metal ions in buffered water.

由图知，酸性条件下，金属离子对EY_2的荧光均发生增强，作用大小为：Ca^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}；对DY_2的荧光增强作用顺序为：Cd^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}，Zn^{2+}使荧光发生猝灭。中性时，Ca^{2+}和Mg^{2+}均可以使XY_2的荧光增强，其中以Ca^{2+}影响最为显著，荧光增强约1倍左右。

（2）荧光数据的定量分析：

荧光猝灭是荧光发射强度减少的过程。当小分子在溶剂中或绑定到具有荧光的分子上与荧光发色团非常接近引起的猝灭能极大的降低的荧光量子产率。发生

猝灭的机理有以下几种：

- 碰撞引起的或动态的猝灭
- 静态淬灭
- 能量转移引起的猝灭
- 电荷转移反应

当金属离子加入 XY_2 溶液导致荧光猝灭的机理属于上述第一种类型时，我们可以通过 Stern-Volmer equation 对荧光光谱进行定量分析。

$$F_0/F = T_0/T = 1 + k_qT_0[Q] \qquad (1)$$

其中 F_0 和 F 分别是未加配体和加入配体之后的荧光强度，T_0 和 T 是未加配体和加入配体之后的荧光寿命，[Q]是配体的浓度，k_qT_0 的乘积可以用 K_{sv}（Stern-Volmer 常数）表示。在含多种芳香性氨基酸残基的蛋白质中，不同类型的氨基酸残基（暴露于表面的，a 或隐藏在三级结构中的，b）可以反映在 Stern-Volmer equation 中。

这时的荧光强度可以表示为：$F_0 = F_{0,a} + F_{0,b}$

加入配体即猝灭剂后根据 Stern-Volmer equation 荧光强度降低：

$$F = F_{0,a} / (1+K_{SV}[Q]) + F_{0,b,}$$

$$dF = F_0 - F = F_{0,a} K_{SV}[Q] / (1+K_{SV}[Q])$$

$$F_0/dF = 1 / (f_aK_{SV} [Q]) + 1/f_a \qquad (2)$$

所得公式（2）为改进的 Stern-Volmer equation，即 Lehrer equation，其中 f_a 表示起作用的荧光团占总荧光团的比例，对于本实验而言，假设所有酪氨酸残基均参与作用，f_a=1,公式（2）可简化为：

$$F_0/(F_0-F) = K_d (1/[M]) + 1 \qquad (3)$$

解离常数K_d为络合常数K_{sv}的倒数，[M]是配体金属离子的浓度，用$F_0/(F_0-F)$对$1/[M]$作图，得到一条直线，根据其斜率可求出XY_2和不同金属离子在不同条件下的络合常数k_{sv}。

由于

$$\Delta\Delta G = - RT \ln K_d \qquad (4)$$

据此可求出协同非共价作用的热力学自由能 ΔΔG。

我们作出 XY_2 和部分金属离子荧光滴定的 Lehrer plots（见 **Fig. 3-6**），通过线性拟和，计算得到金属离子络合物的表观解离常数 K_d 及自由能值见 **Table 3-3**。

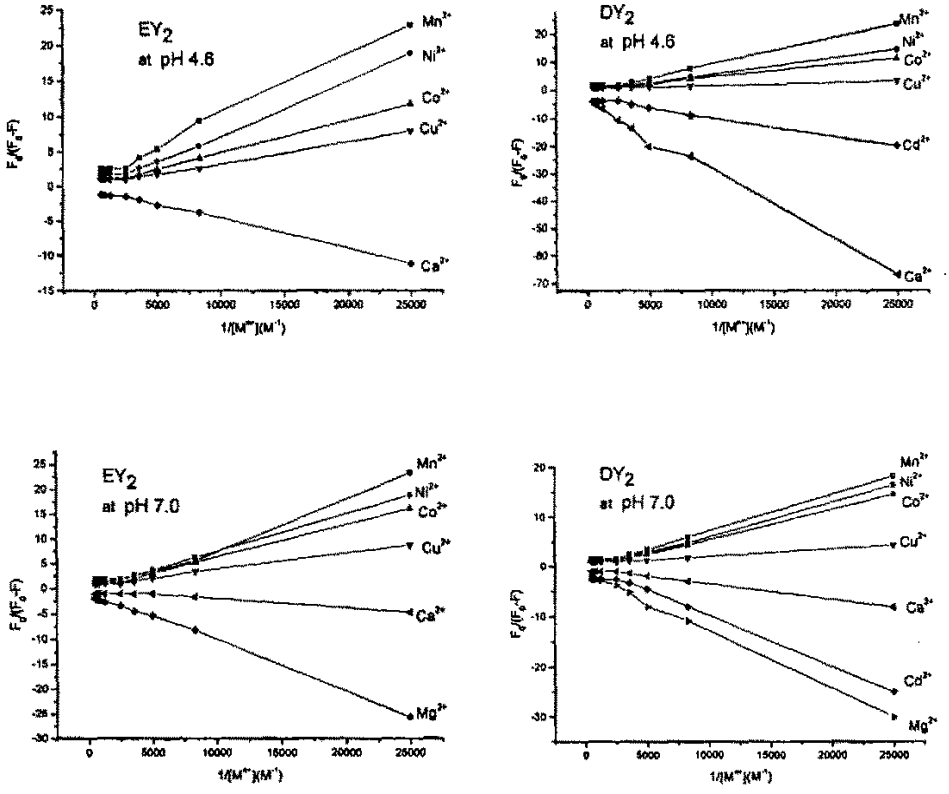


Fig. 3-6. Lehrer plots for the fluorescence quenching of the receptors by M^{n+} at pH 4.6 or 7.0, 25.0 ℃.

Mg^{2+}在中性 pH 值条件下虽然可以使 XY_2 的荧光强度有规律的增加，但由于没有发现一定比例的络合，所以没有计算其络合常数。

综合比较 **Table 3-3** 中的数据可知，对于能够使 XY_2 荧光发生猝灭的金属离子（Cu^{II}、Co^{II}、Ni^{II}、Mn^{II}），它们与 DY_2 之间的络合作用一般比与 EY_2 的作用要强一些，即同种金属离子与 EY_2 络合的解离常数 K_d 值一般比与 DY_2 的大，相应的 $-\Delta\Delta G_{298}$ 则较小，但这一差值并不很大。

Table 3-3. Apparent dissociation constants (K_d) and free energies of complexation ($\Delta\Delta G^{\circ}$) for the complexes of the receptors with M^{II} in buffered water (at pH 4.6 and 7.0; $T = 298$ K)

Metal ion	abs(K_d) (μM)				$-\Delta\Delta G_{298}$ (kcal mol^{-1})			
	pH 4.6		pH 7.0		pH 4.6		pH 7.0	
	EY_2	DY_2	EY_2	DY_2	EY_2	DY_2	EY_2	DY_2
Cu^{II}	309.0	99.3	321.8	148.4	4.8	5.5	4.8	5.2
Co^{II}	469.0	442.0	622.0	601.9	4.5	4.6	4.4	4.4
Ni^{II}	761.2	572.3	719.6	671.1	4.3	4.4	4.3	4.3
Mn^{II}	882.6	962.6	881.1	741.0	4.2	4.1	4.2	4.3
Ca^{II}	432.2	2470	184.7	314.4	4.6	3.5	5.1	4.8
Cd^{II}	n	696.5	n	1010	n	4.3	n	4.1

n: not applicable

3.2.3 EY_2和DY_2的^{13}C-NMR 谱研究

3.2.3.1 实验原理

核磁共振（Nuclear Magnetic Resonance，简称 NMR）波谱是吸收光谱的一种。在NMR中，是用频率为兆赫（MHz）或兆周（MC）的长波长电磁波，照射置于强磁场下的原子核，使其能级发生分裂，当吸收的能量与核能级差相等时，就会发生核能级的跃迁，从而产生一种吸收光谱—核磁共振波谱。

核磁共振碳谱的优点主要有：

1）碳原子构成有机化合物的骨架，掌握有关碳原子的信息在有机结构鉴定中具有重要意义。

2）常见有机化合物氢谱的化学位移（δ）值很少超过10 ppm，而其碳谱的变化范

围则可超过200 ppm。由于碳谱的化学位移变化范围比氢谱大十几倍，化合物结构上的细微变化渴望在碳谱上得到反映。

3）碳谱有多种多重共振方法，后来又发展了几种区别碳原子级数（伯、仲、叔、季）的方法，较之于氢谱的信息丰富、结论清楚。

4）碳原子的弛豫时间较长，能被准确测定，由此可帮助对碳原子进行指认，从而有助于推断结构。

核磁共振碳谱技术不仅应用于有机结构的鉴定，而且可以作为研究分子识别中非共价作用的有效的观测手段[18]。

3.2.3.2 结果与讨论

室温下，我们配制了XY_2（EY_2或DY_2）的D_2O/DMSO-d_6（体积比为1:1）溶液，分别向其中加入1倍当量的$CaCl_2$、$MgCl_2$、$ZnCl_2$或$CdCl_2$，待固体完全溶解后，进行^{13}C-NMR CPD (Composite Pulse Decoupling)测试，结果（见实验部分）发现^{13}C-NMR谱图中XY_2的羰基羧基及多数烷基部分的峰都发生裂峰，这说明所有的金属离子都与XY_2发生了络合，而芳香环部分则发生不同程度的变化（见**Fig. 3-7**）。加入金属离子后XY_2溶液pH值在4～5左右。

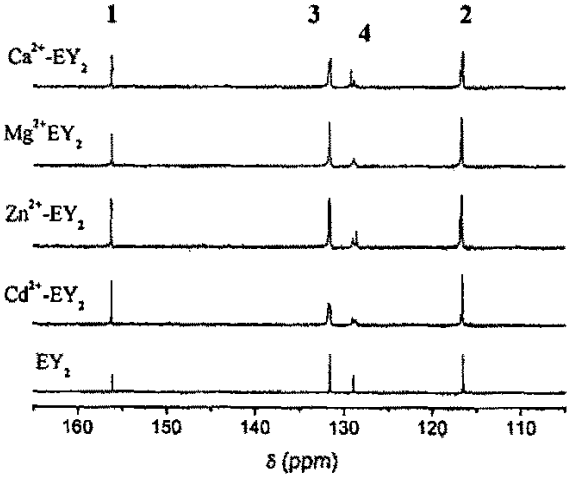


Fig. 3-7a. Aromatic region of ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM EY_2, with and without 1 equivalent Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} and Cd^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

Fig. 3-7a是EY_2的D_2O/DMSO-d_6溶液及其中分别加入Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}和Cd^{2+}的^{13}C-NMR谱图中phenol环部分，从图中可以看出，EY_2中加入Ca^{2+}后，phenol环中的C(4)峰变宽最强（±0.4 ppm），C(3)其次，C(2)变宽程度最小；加入Mg^{2+}，phenol环中仅C(4)峰发生微弱变宽；加入Zn^{2+}，phenol环中的C(4)峰变宽较强，C(2)发生弱的变宽；加入Cd^{2+}后，phenol环中的C(4)峰变宽较强，C(3)发生弱的变宽。由此看出，加入不同的金属离子后phenol环的C(4)峰均发生了不同程度的加宽，其加宽幅度为：Ca^{2+}＞Zn^{2+}～Cd^{2+}＞Mg^{2+}。

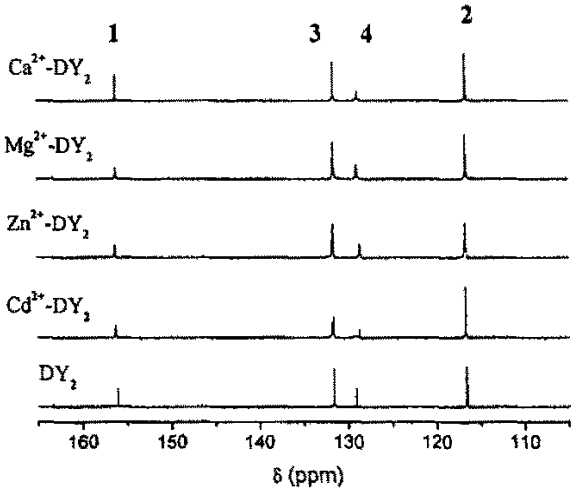


Fig. 3-7b. Aromatic region of ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM DY_2, with and without 1 equivalent Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} and Cd^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

同样向DY_2的D_2O/DMSO-d_6溶液及其中分别加入Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+} 和Cd^{2+}的phenol环部分^{13}C-NMR谱图见**Fig. 3-7b**，由图中可知，当DY_2中加入Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}后，phenol环部分的峰没有明显的变化，只是C(4)峰比原来未加入金属离子的峰小很多；只有加入Cd^{2+}后，phenol环中的C(4)峰发生较强变宽，C(3)和C(1)发生了弱的变宽。

由于Ca^{2+}可以使EY_2的^{13}C-NMR谱phenol环部分发生最为显著的变化，我们另外配制了 TyrOMe（YOMe）的D_2O/DMSO-d_6（体积比为1:1）混合氘代试剂溶液代替EY_2的溶液，并向其中加入同样份量$CaCl_2$，待固体完全溶解后，分别进行

^{13}C-NMR CPD 测试，结果（见**Fig. 3-8**）发现核磁谱图几乎没有任何变化，表明游离的YOMe与Ca^{2+}之间几乎没有发生作用。

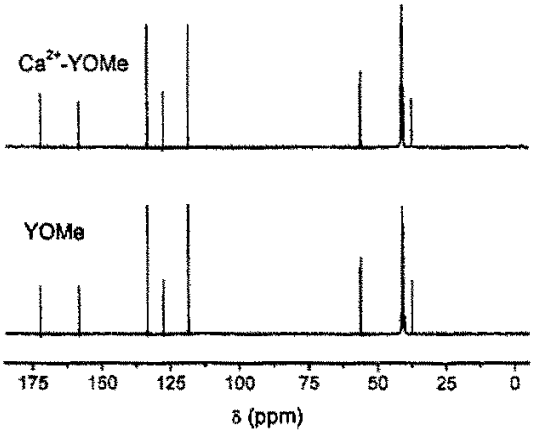


Fig. 3-8. ^{13}C-NMR CPD spectra of 140 mM Tyr-OCH3 (YOMe) in the presence and absences of 1 equiv Ca^{2+}. Solvent: 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

^{13}C-NMR 谱图中碳谱峰变宽，是由于等效 C 原子各向同性的化学位移分布变宽所致。对于金属离子与 XY_2 作用时 phenol 部分 C(4)峰变宽的本质原因，我们提出两种假设。下面以变化最为显著的 Ca^{2+}对 EY_2 为例进行说明。在 phenol 环参与的结构形成前，分子中氨基羧基部分与 Ca^{2+}先发生螯合，接着酪氨酸的 phenol 支链产生达到平衡状态的波动，使整个体系处于一定的构象，在这一构象中，被束缚的 Ca^{2+}与最为接近的 phenol 残基发生动态接触，由此导致酪氨酸 phenol 支链扭转角的内在的不确定性，最终使 phenol 环上的 C(4)峰发生共振分裂。另一种相关的可能性是：由于 phenol 环上 C(4)对亲电子的攻击反应灵敏，被绑定的 Ca^{2+}与 phenol 环 C(4)部位之间直接的静电相互作用导致 C(4)及其周围 C 的峰变宽。显然，以上两种设想都表明 phenol 与被绑定的金属离子之间存在着非共价相互作用。此外，在 EY_2 加入金属离子的 ^{1}H-NMR 谱图中，加入 Ca^{2+}的芳香环部分质子的峰发生一定变宽，而加入其它离子芳香环质子的峰变宽均不明显（见 **Fig. 3-9**）。

通过以上分析我们判断，在偏酸性条件下金属离子与 XY_2 均发生络合，对于

EY_2 而言，所有金属离子都与 phenol 环发生不同程度的作用，作用大小为：Ca^{2+} >Zn^{2+}～Cd^{2+}>Mg^{2+}。对于 DY_2，仅 Cd^{2+}的加入对 phenol 环部分改变明显，表明 Cd^{2+}与 DY_2 中 phenol 环的作用较强。而其它金属离子与 DY_2 中 phenol 环部分作用很弱，这可能是由于一方面 DY_2 的碳链较长（比 EY_2 多一个氨基羧酸基团），导致受体本身的配位能力增强，phenol 环作用减弱，另一方面 phenol 环体积较小，当链增长时，不利于 phenol 环与金属离子发生作用。

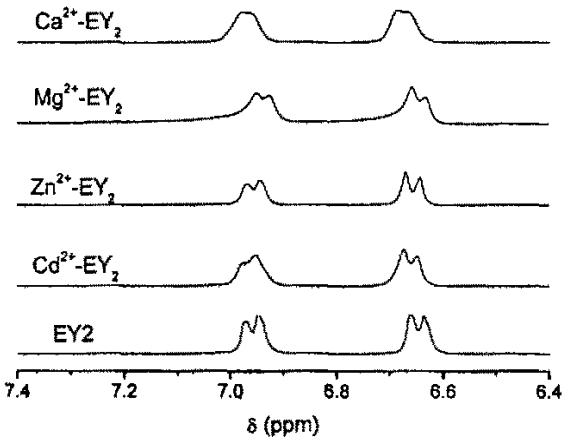


Fig. 3-9. Aromatic region of ^{1}H-NMR spectra of 70 mM EY_2, with and without 1 equivalent Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} and Cd^{2+}, respectively, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v). No loss of protons was observed in the aromatic region.

为了对XY_2分子中的碳进行归属，我们在室温下对同样浓度EY_2的 D_2O/DMSO-d_6（体积比为1:1）混合氘代试剂溶液进行^{13}C-NMR CPD (Composite Pulse Decoupling) 和^{13}C-NMR APT (Attached Proton Test) 测试，核磁谱图见**Fig. 3-10**，^{13}C-NMR APT图中，所连质子数为偶数（0，2）的碳原子出峰为负值。

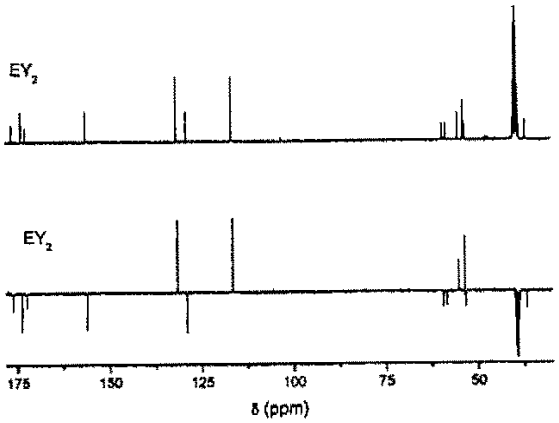
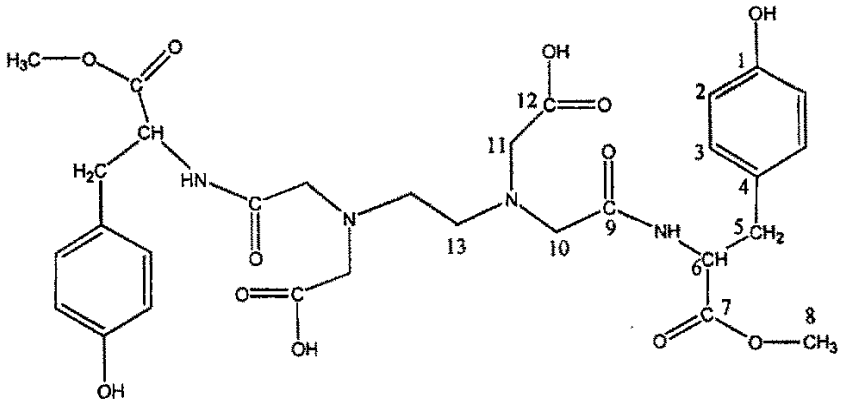


Fig. 3-10. ^{13}C-NMR CPD and APT spectra of 70 mM EY_2 in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).



Scheme 3-2. The chemical structure and atom numbering of EY_2.

为了更为清楚地表现 ^{13}C-NMR 谱中化学位移的变化及便于比较，我们选择性的列出了单个 YOMe 与 YOMe 加 Ca^{2+}，受体 EY_2 及其与 Ca^{2+}和 Zn^{2+}络合物的 ^{13}C-NMR 谱化学位移，见 **Table 3-4**。

综合核磁谱图及表中数据我们看出，YOMe 加 Ca^{2+}和不加 Ca^{2+}的 ^{13}C-NMR 谱图几乎完全一致。对于 EY_2，加入金属离子 Ca^{2+}和 Zn^{2+}后，分子主链上碳原子的峰（C(9), C(10), C(11), C(12),C(13)）完全变宽，谱图上表现为原来的单峰裂分变宽

Table 3-4. Carbon-13 chemical shifts (in ppm) for the YOMe monomer and its complex with Ca^{2+},sensor EY_2 and its complex with Ca^{2+} and Zn^{2+}; Atom numbering is shown in the structure in **Scheme 3-2**.

Tyr-derivative	*Tyr-OMe*	*Tyr-OMe* $+Ca^{2+}$	EY_2	EY_2 $+Ca^{2+}$	EY_2 $+Zn^{2+}$
CO_2H			176.2	b	d
CO_2CH_3	170.7	170.6	173.7	d	d
C(O)NH			172.5	b	d
C(1)	156.8	156.7	156.2	156.2	156.3
C(3)	132.0[a]	132.0[a]	131.6[a]	131.5[b]	131.7[a]
C(4)	126.1[a]	126.1[a]	129.0[a]	129.2[c]	129.0[b]
C(2)	117.0[a]	117.0[a]	116.6[a]	116.6[b]	116.6[b]
CH_2CO_2H			59.4	d	d
NCH_2CONH			58.5	d	d
α-CH	55.0	55.0	55.2	b	b
OCH_3	54.4	54.4	53.7	b	b
$(NCH_2)_2$			53.4	d	d
CH_2Ar	36.0	36.0	36.9	c	c

a. single peak; **b.** moderately broadening; **c.** severely broadening;
d. intensely broadening upon metal-ion binding of the sensor.

为一系列小的碎峰，甲酯基团中羰基（C(7)）的峰以及甲氧基中的碳（C(8)）峰发生中等强度加宽，CH_2Ar（C(5)）和α-CH（C(6)）的峰也均发生明显变宽现象，phenol 环上 C(4)峰变宽，C(2)和 C(3)有时也受到影响，C(1)峰不变化，仍为单峰。结果表明 EY_2 中加入金属离子后，金属离子与氨基羧基发生了螯合，酪氨酸中 phenol 环同时参与了与金属离子的作用，金属离子与 phenol C(4)作用最强，C(2)和 C(3) 也有可能受到影响，C(1)则基本不受影响，此外，最末端的甲酯基团在整个分子与金属离子络合中也起到一定的贡献。Mg^{2+}和 Cd^{2+}的作用方式也与此类似。

在 DY_2 中分别加入 Ca^{2+}和 Zn^{2+}后，$COOCH_3$ 的两个 C 的峰、α-CH、CH_2Ar 及 phenol 环上 C 峰均没有观察到变宽，其余峰都发生变宽；加入 Mg^{2+}后 $COOCH_3$ 的两个 C 和 phenol 环上 C 峰没有观察到变宽；而 Cd^{2+}的加入使 DY_2 的碳谱峰除 $COOCH_3$ 的两个 C 外其它均不同程度变宽。由此可知，DY_2 与金属离子的作用方式与 EY_2 略有不同，金属离子与氨基羧基发生螯合后，由于主链较长，整个酪氨酸残基与金属离子作用的程度都非常小，在四种金属离子中，我们只发现 Cd^{2+}与 phenol 环之间有较明显的相互作用。

§ 3.3 EY_2 和 DY_2 的相关质谱分析

3.3.1 实验条件和方法

取 1 mL 1×10^{-3} M 的 XY_2 水溶液于 1.5 mL 塑料离心管中,分别加入 11.0 μL 的 0.1 M $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 溶液，振荡使混合均匀。

以上所得溶液直接用于 ESI-MS 分析。**Fig. 3-12, 13** 表明所有金属离子都可以与 XY_2 形成 1:1 的络合物。

3.3.2 结果与讨论

XY_2 中分别加入 $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$，在± ESI-MS 谱图中，均发现金属离子与 XY_2 形成 1:1 的络合物的分子离子峰，只是在- ESI-MS 谱图中，Ca^{2+}和 Mg^{2+}与 XY_2 形成 1:1 的络合物的分子离子峰很小，这可能与其内部结构有关。

+ ESI-MS of EY_2-metal ion complexes: Cu-EY_2, Calcd for exact mass $C_{30}H_{38}N_4O_{12}Cu$, m/z = 709.2, Found 708.0 $[EY_2 + M - H]^+$; Zn-EY_2, Calcd for exact mass $C_{30}H_{38}N_4O_{12}Zn$, m/z = 710.2, Found 709.2 $[EY_2 + M - H]^+$; Cd-EY_2, Calcd for exact mass $C_{30}H_{38}N_4O_{12}Cd$, m/z = 760.2, Found 759.5 $[EY_2 + M - H]^+$; Ca-EY_2, Calcd for exact mass $C_{30}H_{38}N_4O_{12}Ca$, m/z = 686.2, Found 685.2 $[EY_2 + M - H]^+$; Mg-EY_2, Calcd for exact mass $C_{30}H_{38}N_4O_{12}Mg$, m/z = 670.2, Found 669.7 $[EY_2 + M - H]^+$

+ ESI-MS of DY_2-metal ion complexes: Cu-DY_2, Calcd for exact mass $C_{34}H_{45}N_5O_{14}Cu$, m/z = 810.2, Found 809.2 $[DY_2 + M - H]^+$; Zn-DY_2, Calcd for exact mass $C_{34}H_{45}N_5O_{14}Zn$, m/z = 811.2, Found 810.4 $[DY_2 + M - H]^+$; Cd-DY_2, Calcd for exact mass $C_{34}H_{45}N_5O_{14}Cd$, m/z = 861.2, Found 860.5 $[DY_2 + M - H]^+$; Ca-DY_2, Calcd for exact mass $C_{34}H_{45}N_5O_{14}Ca$, m/z = 787.3, Found 786.4 $[DY_2 + M - H]^+$; Mg-DY_2, Calcd for exact mass $C_{34}H_{45}N_5O_{14}Mg$, m/z = 771.3, Found 770.7 $[DY_2 + M - H]^+$

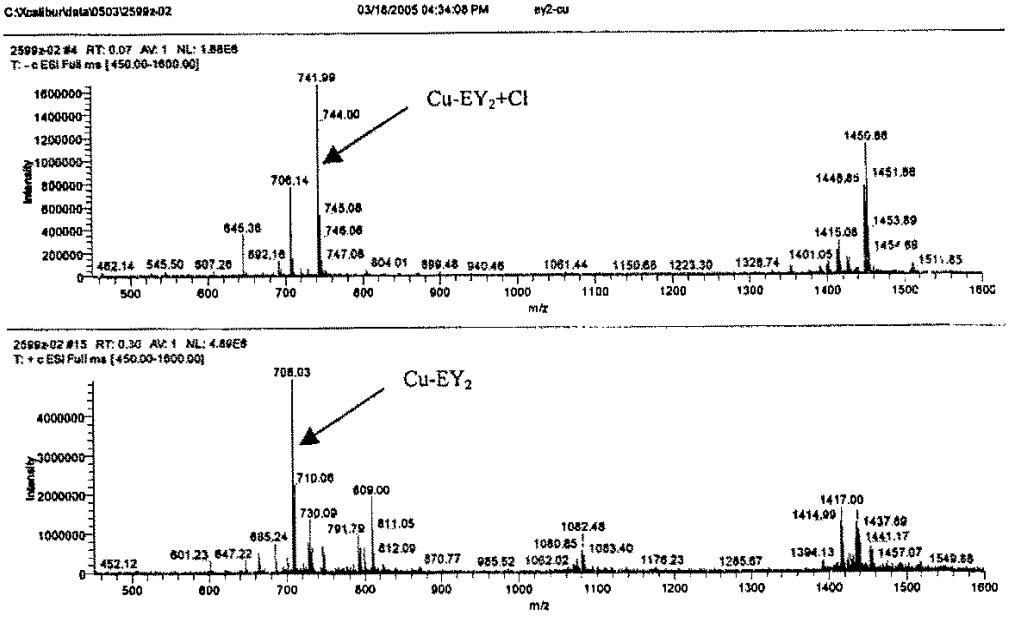


Fig. 3-11a. ESI-MS spectrum of Cu-EY_2.

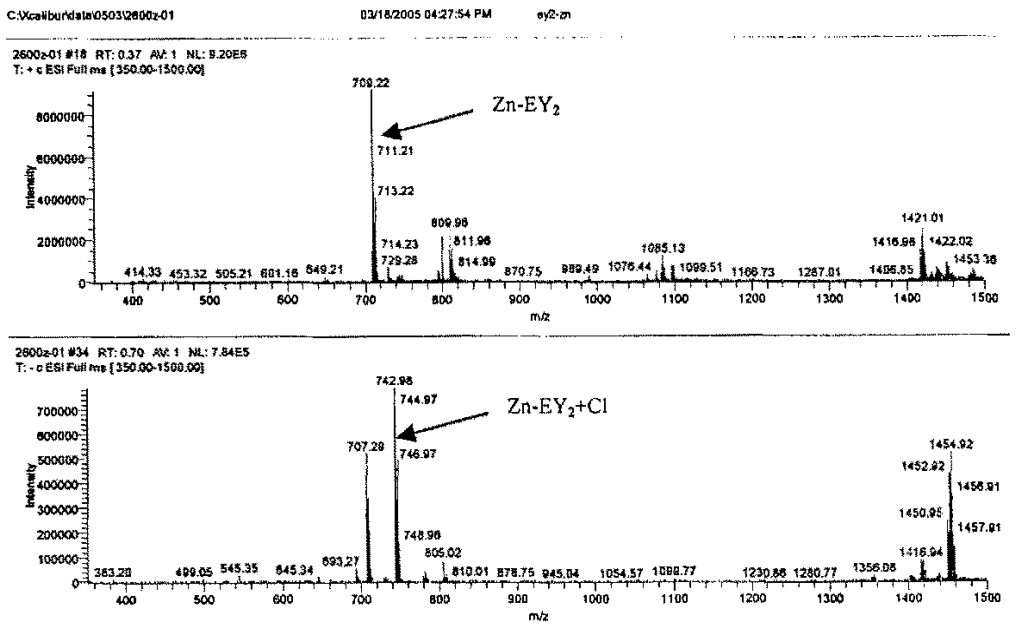


Fig. 3-11b. ESI-MS spectrum of Zn-EY_2.

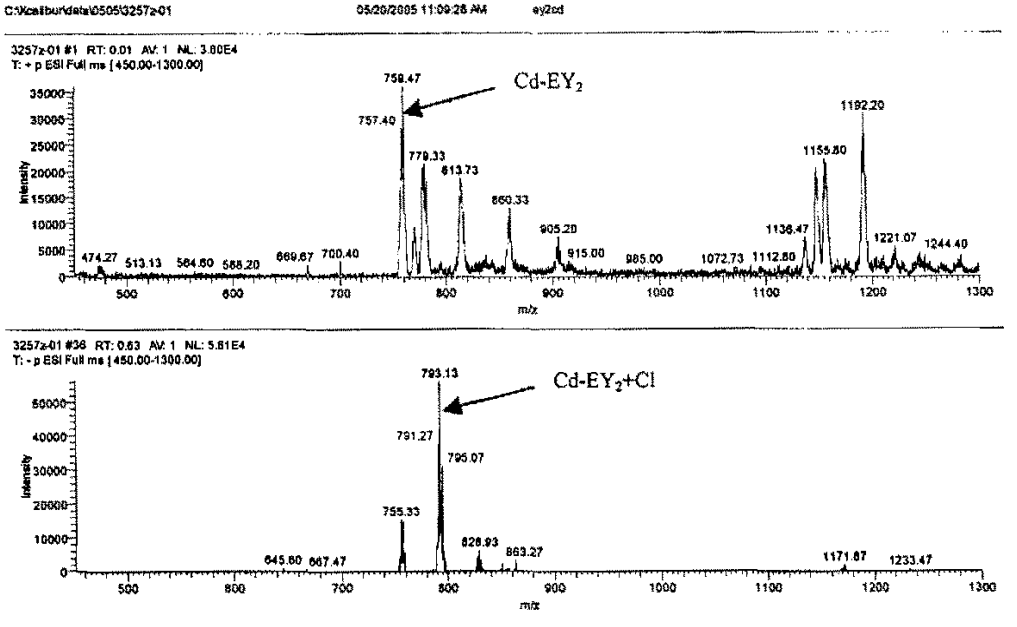


Fig. 3-11c. ESI-MS spectrum of Cd-EY_2.

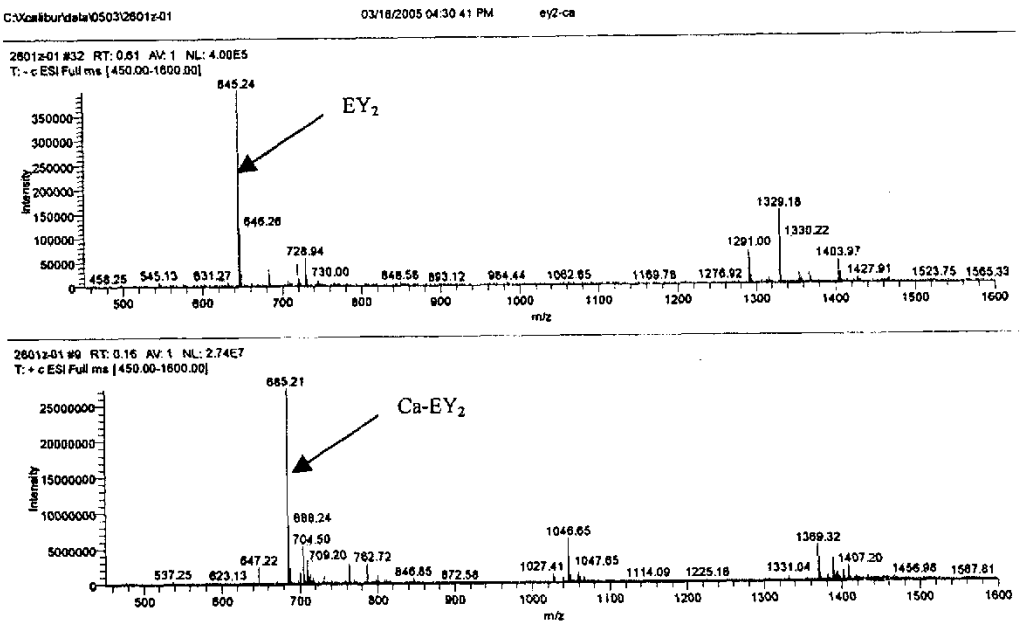


Fig. 3-11d. ESI-MS spectrum of Ca-EY_2.

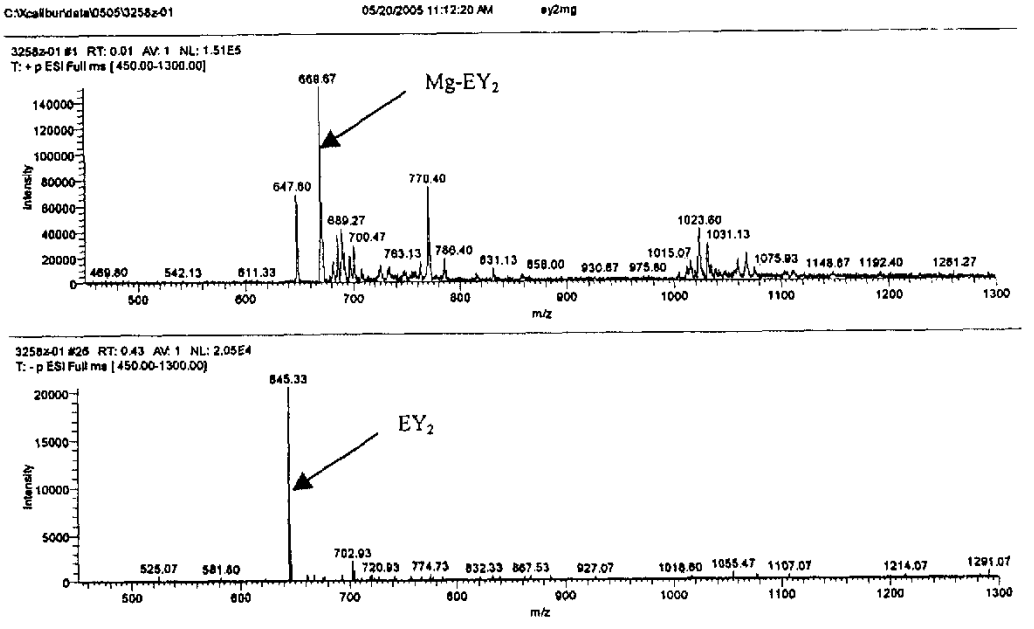


Fig. 3-11e. ESI-MS spectrum of Mg-EY_2.

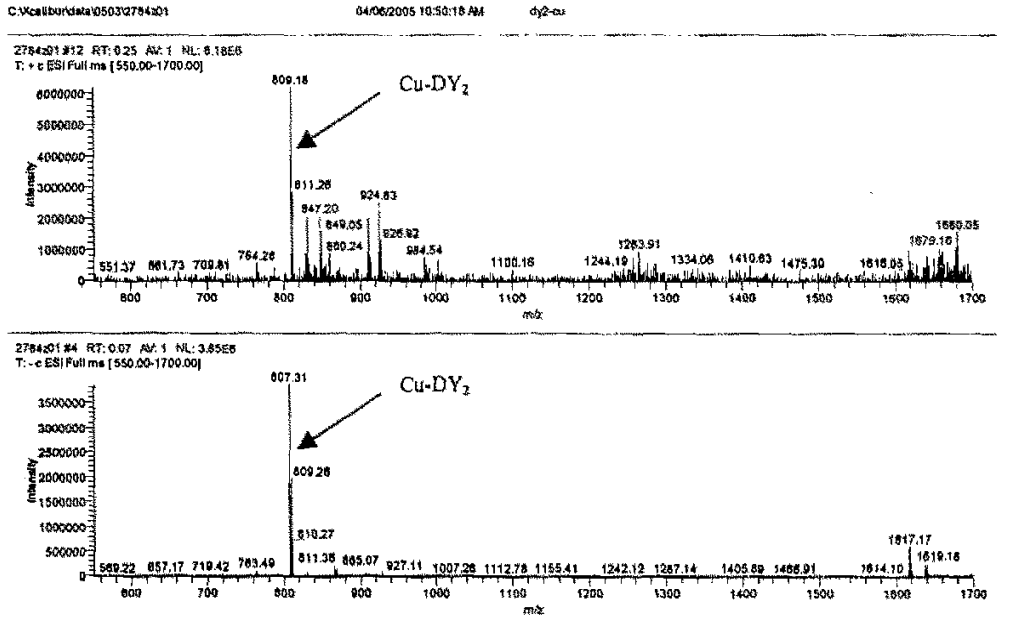


Fig. 3-12a. ESI-MS spectrum of Cu-DY_2.

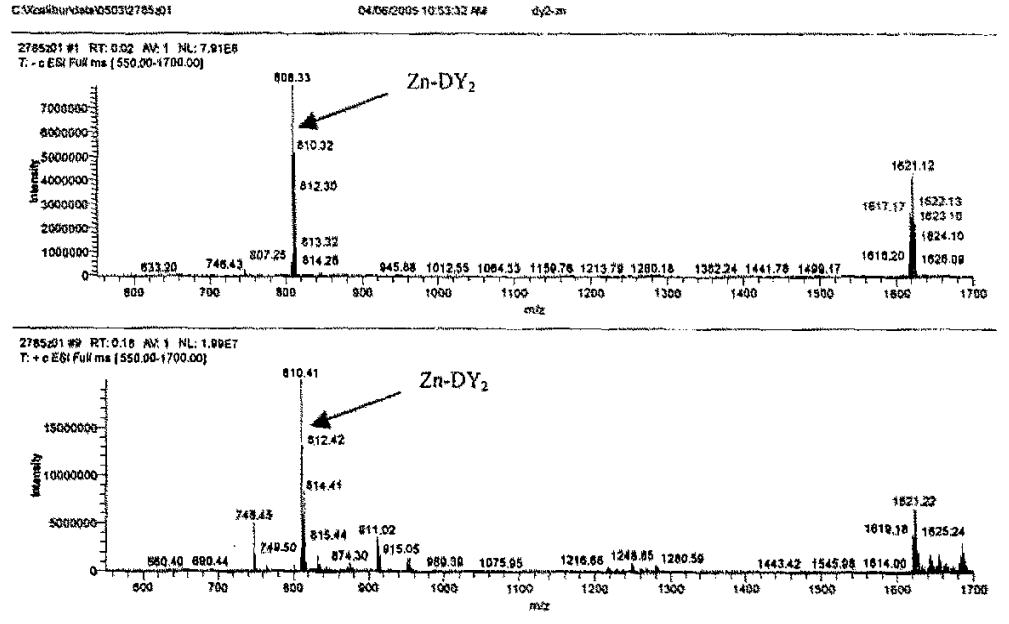


Fig.3-12b. ESI-MS spectrum of Zn-DY_2.

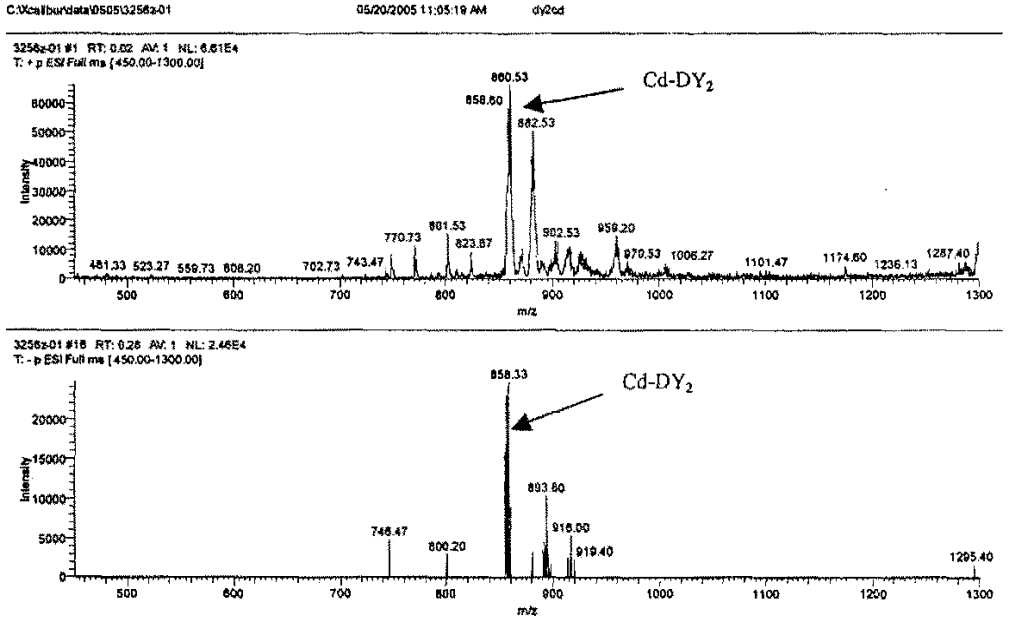


Fig. 3-12c. ESI-MS spectrum of Cd-DY_2.

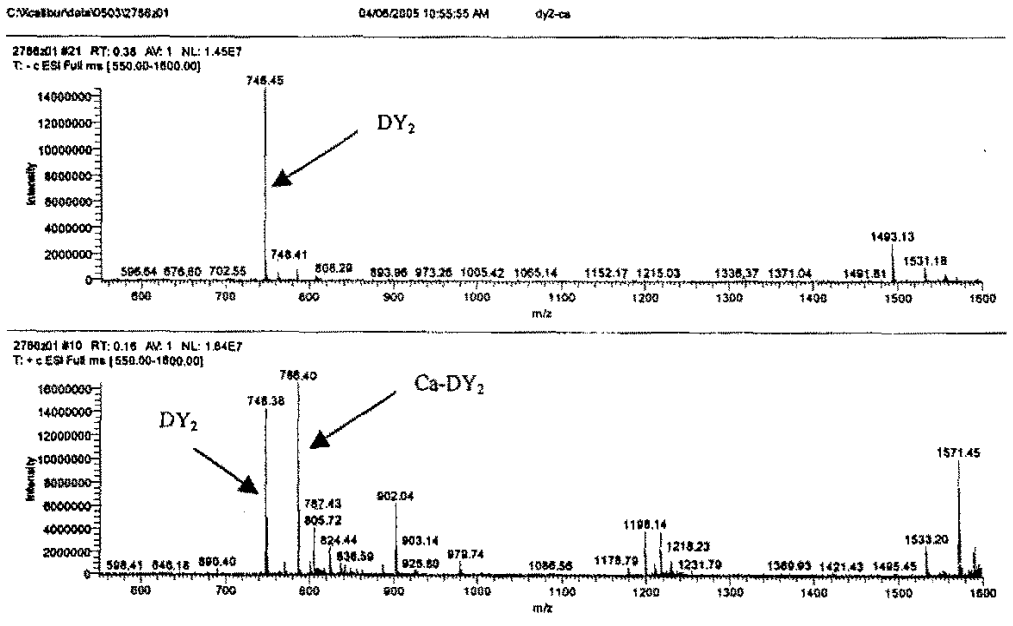


Fig. 3-12d ESI-MS spectrum of Ca-DY_2.

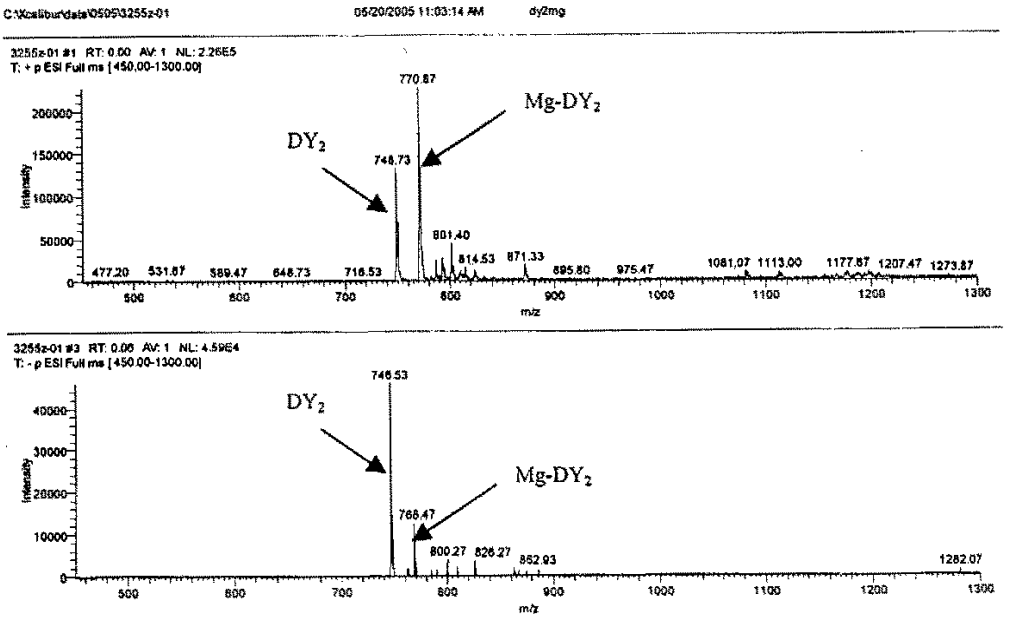
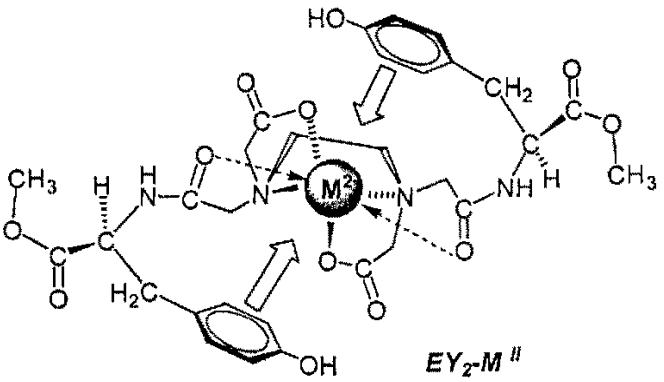


Fig. 3-12e. ESI-MS spectrum of Mg-DY_2.

§3.4 本章结论

1. 我们以模拟生物体系内金属离子参与的一些特殊化学过程为目标，利用 EDTA 和 DTPA 这类常见的多齿配体为模板，设计合成了以酪氨酸为核心识别单元的小分子类肽 XY_2，通过多种光谱及 ESI-MS 综合研究其与金属离子的相互作用，这将有助于人们揭示金属离子与生物体内活性物质的作用机理。

2. 根据荧光和 ESI-MS 检测分析，XY_2 可以与金属离子形成 1:1 的络合物，并通过 ^{13}C-NMR 谱图进一步确定 EY_2 与金属络合的可能构象如下：



位于较远处的甲酯基团与金属离子也有一定的作用，在图中没有再画出。

3. 利用 ^{13}C-NMR 谱技术，在液相中，间接地检测到酪氨酸 phenol 环与钙离子、镁离子、锌离子和镉离子之间不同强度的 Cation-pi 相互作用。发现在酸性条件下，金属离子与 EY_2 的 phenol 环作用大小为：$Ca^{2+}>Zn^{2+}\sim Cd^{2+}>Mg^{2+}$；几种金属离子中，$Cd^{2+}$对 DY_2 中 phenol 环的作用较强。这一结果与相同条件下荧光分析所得结论一致。

4. XY_2 分子中含酪氨酸单元能够产生荧光，其水溶液中加入不同的金属离子后荧光发射谱图中的荧光强度会发生相应的改变，如在不同 pH 值时加入 1 倍当量的 Cu^{2+}均可以使 XY_2 荧光完全猝灭，而在中性条件下加入 1 倍当量的 Ca^{2+}则可以使 XY_2 荧光强度增加 1 倍，因此 XY_2 可以作为一种有效的荧光探针，可以灵敏的检测溶液中微量的金属离子如 Cu^{2+} 和 Ca^{2+}。

参 考 文 献

1. Walsh, C., *"Enzymatic Reaction Mechanisms"*, Freeman, W. H. and Company, San Francisco, **1979**.
2. Johnson, L. N., *"Enzyme-Substrate interactions"* in *"Inclusions Compounds"*, Ed. By Atwood, J. L.; Davies, J. E. D. and Macnicol, D. D., Vol. *3*, 509-569, Academic Press, London, **1984.**
3. Fersht, A., *"Enzyme Structure and Mechanism"*, 2nd ed., Freeman, New York, **1985.**
4. Styer, L., *"Biochemistry"*, 3rd ed., Freeman, W. H., New York, **1988.**
5. Prenth, J., *et al.* (ed.), *"Enzymes: Structure and Function"*, Amsterdam, NorthHolland, **1972.**
6. 王夔主编，*《生命科学中的化学问题》*，北京大学出版社，北京，**1990.**
7. Gokel,G. W.; Barbour, L. J.; Ferdani R. J. and Jiaxing Hu., *Acc. Chem.res.* **2002**, *35*, 878-886.
8. Ma, J. C.; Dougherty, D. A., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303, and references therein.
9. Zaric, S. D., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2197.
10. Ryzhov, V.; Dunbar, R. C.; Cerda, B.; Wesdemiotis, C., *J. Am. Soc. Mass. Spectrum.* **2000**, *104*, 2238-2247.
11. Mecozzi, S.; West, A. P., Jr.; Dougherty, D. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**,*118*, 2307-2308.
12. Wouters, J., *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 847-855.
13. Ryzhov, V.; Dunbar, R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3092-3107.
14. Gokel, G. W. *Chem. Commun.* **2003**, 2847.
15. 李雪莹，*南开大学硕士论文*，**2004.**
16. Tabushi, I. *et al.*, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 545.
17. a) H. Neuweiler, A. Schulz, M. Bohmer, J. Enderlein, M.Sauer, *J. Am. Chem.Soc.* **2003**, *125*, 5324; b) A. C. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M.Sauer, *J. Am. Chem.Soc.* **2003**, *125*, 14564.
18. Li, Y. T. and Yang, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127(10)*, 3527-3530.

第四章　实验部分

§4.1 仪器和试剂

4.1.1 主要仪器

本工作中所用的主要仪器有：德国 VEB 公司的微量熔点仪；美国 BP211D 全自动分析天平；美国 SP－300 红外光谱仪；HP-5988 四极矩质谱分析仪；日本 Jasco-715 圆二色分析仪；瑞士 Bruker 公司 AVANCE 300 超导核磁共振仪；Varian Cary eclipse fluorescence spectrophotometer。

4.1.2 试剂及部分溶剂处理

本文中所用的 L-氨基酸均为生化试剂，购自北京欣经科生物技术公司；EDTA dianhydride (ethylenediaminetetraacetic dianhydride) 和 DTPA dianhydride (diethylenetriaminepentaacetic dianhydride) 购自 Aldrich 公司；2, 6-Pyridine-dicarboxylic acid 购自 Acros organics 公司。除以上特别指出之外，本文所用其它试剂均为分析纯，购自天津、上海及北京等地。光谱滴定和质谱分析中所用的金属盐均为氯化物。部分溶剂的处理方法如下：

(1) 二氯甲烷(DCM)

分析纯的二氯甲烷用无水碳酸钠浸泡三天，然后加 CaH_2 加热回流两小时后蒸出，收集 40 ℃的馏分。

(2) 氯仿（$CHCl_3$）

将氯仿用一半体积的水振荡数次，分出下层氯仿，用无水氯化钙干燥数小时后蒸馏。

(3) 三乙胺(TEA)

加 1 %水合茚三酮(W/V)加热回流二小时，蒸出 89-95 ℃馏分，用适量 KOH 干燥后，精馏收集 90 ℃的馏分。

(4) 甲醇（MeOH）

在圆底烧瓶中放置 0.6 g 镁屑和 10 mL 无水甲醇，加入几滴碘，加热即开始放出氢气，当全部镁条反应完全后，加入 100 mL 无水甲醇和几粒沸石，回流 1 小时后蒸馏，收集 65 ℃左右的馏分，接受器连接装有无水氯化钙的干燥管或用氮气进行保护。

(5) 乙醇（EtOH）

处理方法同甲醇。

(6) 无水乙醚（Et_2O）

先加无水碳酸钠干燥过夜，过滤后加入钠屑和少许二苯甲酮，回流至试剂变蓝，蒸馏收集 34.0-36.0 ℃的馏分。

(7) 乙腈（MeCN）

色谱纯试剂可直接使用，如用分析纯乙腈，则用以下方法处理：800 mL 乙腈加入 32 g 高锰酸钾和 28 g 无水碳酸钾，在氮气保护下回流 8 小时，蒸出。然后在五氧化二磷存在、氩气保护下回流 3 小时后蒸出，收集温度恒定的馏分。再在五氧化二磷存在下精馏，收集沸点在 80-82 ℃的馏分。

(8) 二甲亚砜（DMSO）

分析纯的 DMSO 先用活化的 4 Å 分子筛浸泡至少一周后，再在 CaH_2 存在下减压精馏，收集温度恒定的馏分。

(9) 二氯亚砜（$SOCl_2$）

加入升华硫回流后再分馏两次，使二氯亚砜粗品中的硫酰氯、一氯化硫和二氯化硫转化为二氧化硫和氯化硫除去。

(10)N,N-二甲基甲酰胺（DMF）

用硫酸钙、硫酸镁、氧化钡、硅胶或分子筛干燥，然后减压蒸馏，收集 76 ℃/36 mmHg 的馏分。

(11)丙酮

于 1000 mL 丙酮中加入 5 g 高锰酸钾回流，以除去还原性杂质，若高锰酸钾紫色很快消失则需要加入少量高锰酸钾继续回流，直至紫色不再消失为止。蒸出丙酮，用无水碳酸钙或无水硫酸钙干燥，过滤，蒸馏收集 55－56.5 ℃的馏分。

(12)乙酸乙酯（EtOAc）

于 1000 mL 乙酸乙酯中加入 100 mL 乙酸酐和 10 滴浓硫酸，加热回流四小时，然后分馏，分馏液用 20～30 g 无水碳酸钾振荡，再蒸馏。

(13)正己烷

与金属钠和二苯甲酮回流至蓝色，蒸馏，收集 69 ℃的馏分。

(14)环己烷

处理方法同正己烷。

4.1.3 部分原料的制备

4.1.3.1 氨基酸的羧基保护

(1) L-TrpOMe•HCl 的制备

氮气保护下将 L-色氨酸 (3.5 g, 17.1 mmol) 悬浮于 50 mL 甲醇中，用冰盐浴冷却，控制 $SOCl_2$ (6 mL, 80 mmol) 在 1.5 小时左右滴加完，混合物继续搅拌，自然升温至室温，再搅拌 12 小时，蒸馏除去过量的甲醇和 $SOCl_2$，所得残渣加少量甲醇后减压旋蒸除去溶剂，用甲醇－乙醚重结晶，得到白色粉末状固体，即为色氨酸甲酯盐酸盐，3.7 g，产率 85 %。

(2) L-TyrOCH_3 • HCl 的制备

将 10 g L-酪氨酸悬浮于 100 mL 无水甲醇中，室温下通入干燥的氯化氢气体至饱和（经常摇动以加快酪氨酸的溶解）。放置过夜，减压浓缩至干。将沉淀用少量无水甲醇溶解，再减压蒸干并反复操作两次以除尽多余的氯化氢，否则产物容易发粘。最后将沉淀再溶于少量温热的无水甲醇中，加入无水乙醚直至不再析出结

晶为止。于冰箱中放置数小时后，过滤，收集固体，用甲醇－乙醚 (1:2) 混合液洗涤、干燥后，得 11.3 g $TyrOCH_3 \cdot HCl$，产率 83 %，m.p.166－168 ℃。

4.1.3.2 2, 6－吡啶－二酰氯的制备

称取固体 2, 6-Pyridine-dicarboxylic acid 1.2 g (7.2 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中，加入二氯亚砜（分馏处理后的）5 mL，混合物加热搅拌回流 8 h，减压蒸馏除去过量的二氯亚砜，即析出大量白色针状固体，将所得固体用二氯甲烷－正己烷 (1:4 V/V) 重结晶得到 2，6－吡啶－二酰氯（1.4 g，产率 95 %），为白色针状晶体；m.p. 57~59 ℃(文献值 m.p. 56～58 ℃)。

§4.2 其他化合物的制备和一般表征

4.2.1 2, 6-吡啶二色氨酸甲酯（abbr. PW_2）

(1) PW_2 的合成

称取2，6－吡啶二酰氯（自制）0.20 g（1 mmol），加入二氯甲烷20 mL搅拌溶解后，转移至恒压滴液漏斗中，在氮气保护下缓缓滴加到0 ℃，0.56 g（2.2 mmol）$TrpOCH_3 \cdot HCl$, 含三乙胺（2 mL）的50 mL二氯甲烷溶液中，0.5 h加完，自然升温至室温，再搅拌24 h，加入1 mL冰醋酸，中和过量的三乙胺。TLC监测反应进程。

(2) 纯化

反应液水洗（2×100 mL）后收集有机层，用无水硫酸钠干燥后将溶液减压旋蒸，以硅胶（200－300目）柱色谱纯化，洗脱剂为$CHCl_3$:MeOH（15:1 V/V）或EtOAc:DCM(1:1 V/V)，洗出并收集产物，将溶液旋干后得到无色油状物，用氯仿－环己烷重结晶得到白色粉末状固体PW_2 0.40 g(产率 70.4%)；m.p. 185－187 ℃。

(3) PW_2 的表征

^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 3.316~3.425 (m, 4H, $-CH_2-$), 3.855 (s, 6H, OCH3), 5.217~5.245 (m, 2H, chiral -CH-) , 6.640~6.646 (d, 2H, indolyl), 6.953~6.984 (m, 2H,

indolyl), 7.086~7.116 (m, 4H, indolyl), 7.488~7.518 (t, 2H, indolyl), 8.051~ 8.104 (t, 3H, PyH);

ESI-MS: Calcd for $C_{31}H_{29}N_5O_6$ m/z: 567.2 $(M+H)^+$, Found 568.3 ($[M+H]^+$).

4.2.2 EDTA-bis (L-tyrosine methyl ester) (abbr. EY_2)

(1) EY_2 的合成

称取 3.3 mmol 的 $TyrOCH_3 \cdot HCl$，将其溶于 100 mL 二氯甲烷 (dichloromethane) 中，加入 3 mL 三乙胺 (triethylamine)，电磁搅拌使之充分溶解，转移至 100 mL 恒压滴液漏斗中备用。

另称取 1.5 mmol EDTA dianhydride，将其悬浮于 50 mL 二氯甲烷中，室温下电磁搅拌半小时，将 $TyrOCH_3$ 的二氯甲烷溶液在一小时内滴加入，室温下再搅拌 4-5 小时，待溶液完全澄清后，加入 2 mL 冰醋酸搅拌片刻，中和过量的三乙胺。

(2) 纯化

向反应液中加入少量的硅胶（200-300 目），旋干后得到的固体通过色谱柱（200-300 目硅胶）纯化。首先用 DCM:MeOH＝4:1 (V/V) 的洗脱剂将过量的 $TyrOCH_3$ 完全除去，然后增加洗脱剂极性，洗出并收集 EY_2，溶液旋干后得到微黄色油状物，用乙醇－乙酸乙酯重结晶得到白色固体，即为产物 EY_2（0.52 g，产率 53.6 %）。

(3) EY_2 的表征

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 2.481 (4H, NCH_2CH_2N), 2.770~3.208 (12H, all $-CH_2-$), 3.527 (6H, OCH_3), 4.866~4.914 (2H, chiral -CH-), 6.633~6.662 (4H, phenol), 6.947~6.975 (4H, phenol);

ESI-MS: Calcd for $C_{30}H_{38}N_4O_{12}$: m/z = 646.2, Found 647.2 ($[EY_2+H]^+$) .

4.2.3 DTPA-bis (L-tyrosine methyl ester) (abbr. DY_2)

(1) DY_2的合成

称取 3.3 mmol 的 $TyrOCH_3 \cdot HCl$，将其溶于 100 mL 二氯甲烷中，加入 3 mL 三乙胺(triethylamine)，电磁搅拌使之充分溶解，转移至 100 mL 恒压滴液漏斗中备用。

另称取 1 mmol DTPA dianhydride，将其悬浮于 50 mL 二氯甲烷中，室温下电磁搅拌半小时，将 $TyrOCH_3$ 的二氯甲烷溶液在一个小时内滴入其中，室温下再搅拌 2-3 小时，待溶液完全澄清后，加入 2.5 mL 冰醋酸搅拌片刻，中和过量的三乙胺。

(2) 纯化

向反应液中加入少量的硅胶（200-300 目），旋干后所得固体通过色谱柱（200-300 目硅胶）纯化。用 DCM:MeOH＝4:1 (V/V) 的洗脱剂将过量的 $TyrOCH_3$ 完全除去，然后增加洗脱剂极性，洗出并收集 DY_2，溶液旋干后所得残余物通过冷冻干燥，得到产物 DY_2（0.72 g，产率 63.3 %）。

(3) DY_2的表征

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ2.775~2.928 (8H, NCH_2CH_2N), 2.987~3.525 (14H, all $-CH_2-$), 3.641 (6H, OCH_3), 4.551~4.600 (2H, chiral -CH-), 6.730~6.757 (4H, phenol), 7.032~7.059 (4H, phenol);

ESI-MS: Calcd for $C_{34}H_{45}N_5O_{14}$: m/z = 747.3, Found 748.3 ($[DY_2+H]^+$) .

§4.3 EY_2和 DY_2与金属离子作用的光谱检测实验

4.3.1 DY_2圆二色光谱研究

4.3.1.1 实验仪器及参数

Circular Dichroism apparatus: JASCO J-715 Spectropolarimeter

Metal-Ion Dependence measurement parameter:

Data mode : CD

Resolution : 0.2 nm

Band width : 1.0 nm

Sensitivity : 20 mdeg

Response : 4 sec

Speed : 50 nm/min

Accumulation : 1

4.3.1.2 实验方法和条件

pH 6.86 的 PBS 缓冲溶液（phosphate Buffer），配制方法如下：

称取 KH_2PO_4 0.8505 g，Na_2HPO_4 0.8873 g，用去离子水溶解后转移至 250 mL 容量瓶中，稀释至刻度，得到 25 mM KH_2PO_4 /Na_2HPO_4，pH 值用 pH 计校正。

配制 pH 为 6.86 的 100 μ M 的 DY_2 溶液，其中缓冲溶液浓度为 12.5 mM KH_2PO_4 /Na_2HPO_4。

固定主体 DY_2 浓度为 100 μM，逐渐增加客体金属离子的浓度（0～300 μM），混合均匀后测圆二色谱。

4.3.2 荧光滴定研究

4.3.2.1 实验仪器及参数

Instrumental parameter:

Fluorescent apparatus: Varian Cary eclipse fluorescence spectrophotometer

Water bath: Cary single cell Peltier accessory

Fixed excitation: at 274nm

Scan emission mode

PMT Detector Voltage: 600 V

Slit:	5 nm
Scan rate:	600 nm/min
Averaging time:	0.1000 s
Data interval:	1.0000 nm
Emission Slit Width:	5 nm
Excitation Slit Width:	5 nm
Excitation filter:	Auto
Emission filter:	Open
Set temperature:	25.0 ℃

4.3.2.2 荧光滴定实验

1. **EY_2和DY_2在pH为4.6的荧光滴定实验**

控制溶液pH值在4.60 (NaOAc/ HOAc缓冲体系)左右，固定主体XY_2浓度为400 μM，逐渐增加客体金属离子的浓度（0～2 mM），每次混合均匀后扫描荧光发射光谱（最大发射波长为303.84 nm），利用循环水浴控制温度在25.0 ℃，固定激发波长为274.00 nm。由于加入金属离子溶液的体积（< 50 μL）远远小余XY_2溶液体积（3 mL），可以忽略稀释效应，为方便描述和比较，我们假设加入金属离子后溶液体积不变，做出曲线见**Fig. 4-1**。

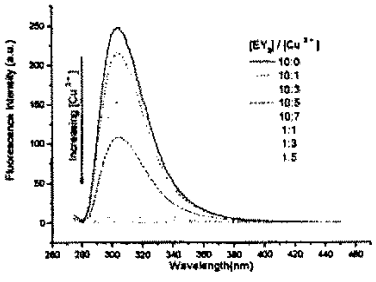


Fig. 4-1a. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Cu^{2+} at pH 4.60±0.05.

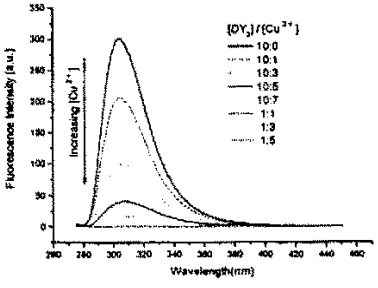


Fig. 4-1b. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Cu^{2+} at pH 4.60±0.05.

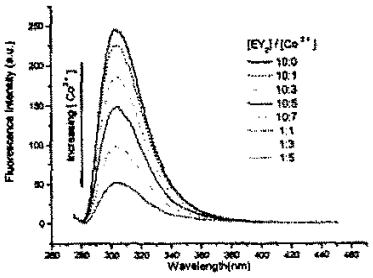


Fig. 4-1c. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Co^{2+} at pH 4.60±0.05.

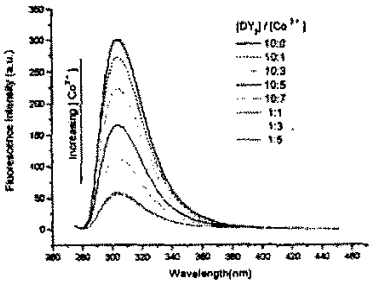


Fig. 4-1d. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Co^{2+} at pH 4.60±0.05.

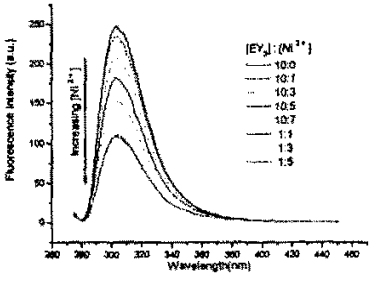


Fig. 4-1e. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Ni^{2+} at pH 4.60±0.05.

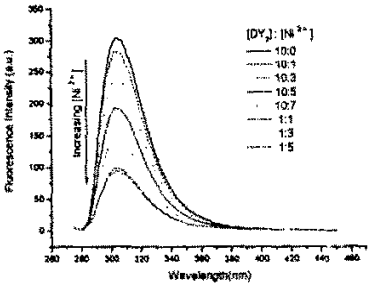


Fig. 4-1f. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Ni^{2+} at pH 4.60±0.05.

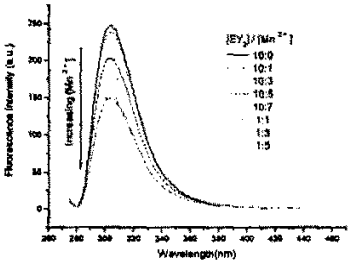


Fig. 4-1g. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Mn^{2+} at pH 4.60±0.05.

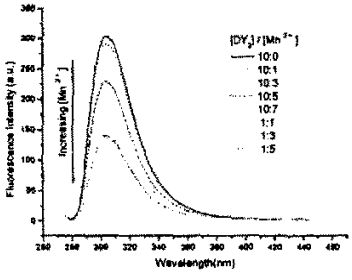


Fig. 4-1h. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Mn^{2+} at pH 4.60±0.05.

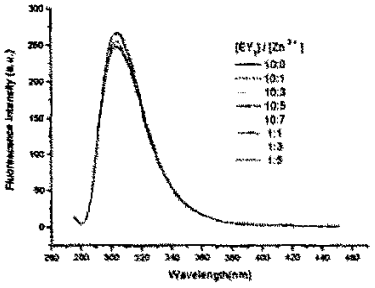


Fig. 4-1i. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Zn^{2+} at pH 4.60±0.05.

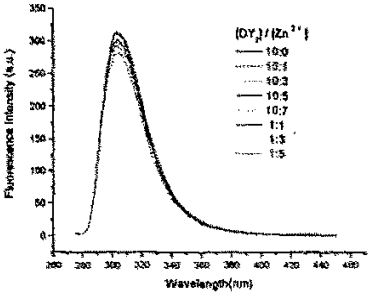


Fig. 4-1j. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Zn^{2+} at pH 4.60±0.05.

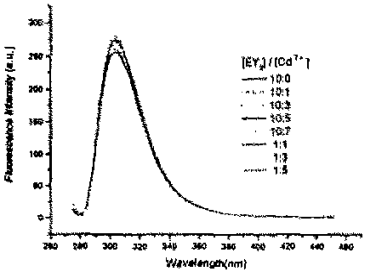


Fig. 4-1k. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Cd^{2+} at pH 4.60±0.05.

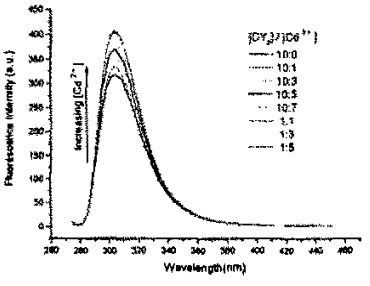


Fig. 4-1l. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Cd^{2+} at pH 4.60±0.05.

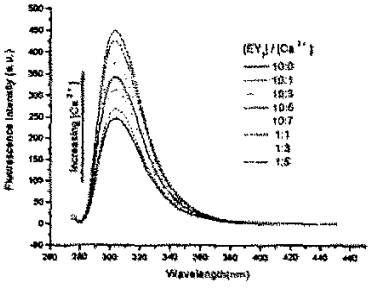


Fig. 4-1m. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Ca^{2+} at pH 4.60±0.05.

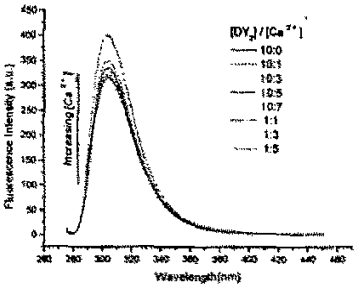


Fig. 4-1n. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Ca^{2+} at pH 4.60±0.05.

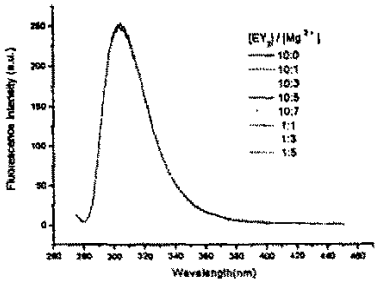


Fig. 4-1o. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Mg^{2+} at pH 4.60±0.05.

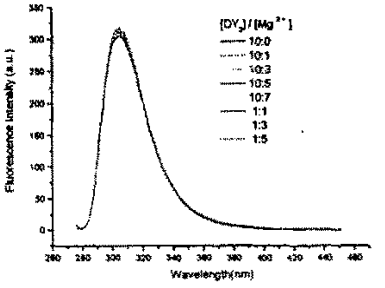


Fig. 4-1p. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Mg^{2+} at pH 4.60±0.05.

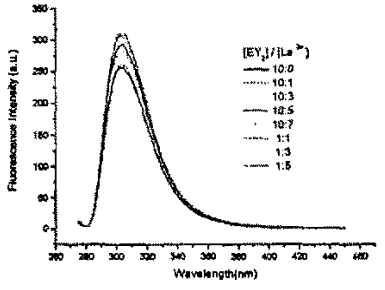


Fig. 4-1q. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with La^{3+} at pH 4.60±0.05.

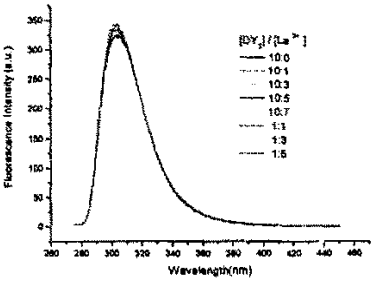


Fig. 4-1r. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with La^{3+} at pH 4.60±0.05.

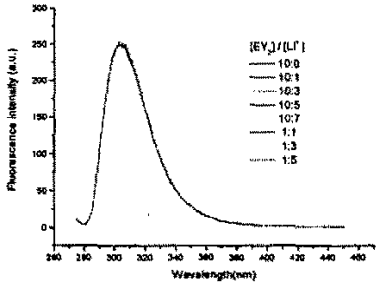


Fig. 4-1s. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Li^{+} at pH 4.60±0.05.

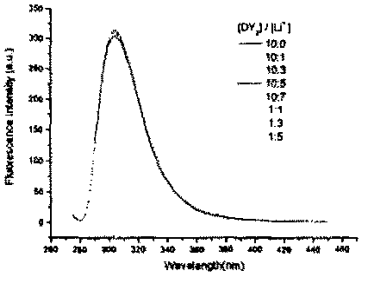


Fig. 4-1t. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Li^{+} at pH 4.60±0.05.

Fig. 4-1：水溶液中，主体 EY_2 或 DY_2 的浓度固定为 400 μM，向其中分别滴加 Cu^{2+}、 Co^{2+}、Ni^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ca^{2+} 、Mg^{2+}、La^{3+} 和 Li^{+}（阴离子均为 Cl^{-}），得到荧光滴定谱图（最大发射波长为 303.84 nm），控制溶液 pH 在 4.60 ±0.05 (缓冲溶液为 200 mM NaOAc + 200 mM HOAc)，温度在 25.0 ℃。固定荧光激发波长为 274.00 nm。选择 pH 值为 4.6 的溶液进行实验是出于两方面考虑：为避免过渡金属离子在较高 pH 下生成沉淀，同时为避免主体分子在较低 pH 值即酸性条件下发生荧光猝灭。

$[MCl_n]$ = 0, 40 μM, 120 μM, 200 μM, 280 μM, 400 μM, 1200 μM, 2000 μM; Molar ratios of $[XY_2]$: $[M^{n+}]$ = 10:0 (solid ——), 10:1 (dash ----), 10:3 (dot ·····), 10:5 (dash dot -·-·-), 10:7 (dash dot dot -··-··-), 1:1 (short dash ------), 1:3 (short dot ·····), 1:5 (short dash dot -·-·-).

2. EY_2 和 DY_2 在 pH 为 7.0 的荧光滴定实验

控制溶液 pH 值在 7.00 左右，固定主体 XY_2 浓度为 400 μM，逐渐增加客体金属离子的浓度（0～2 mM），每次混合均匀后扫描荧光发射光谱（最大发射波长为 303.84 nm），循环水浴控制温度在 25.0 ℃，固定激发波长为 274.00 nm。假设加入金属离子后溶液体积不变，做出曲线见 **Fig. 4-2**。

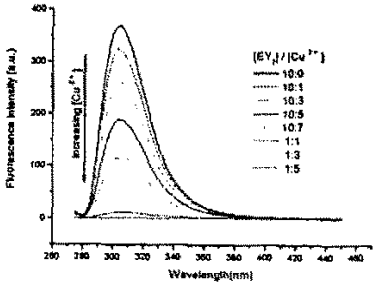


Fig. 4-2a. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Cu^{2+} at pH 7.00±0.05.

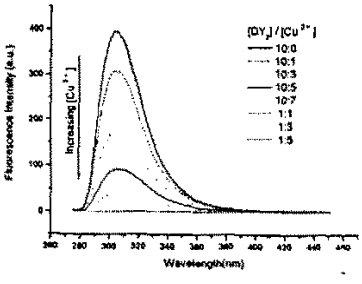


Fig. 4-2b. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Cu^{2+} at pH 7.00±0.05.

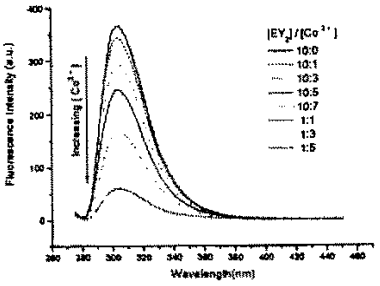


Fig. 4-2c. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Co^{2+} at pH 7.00±0.05.

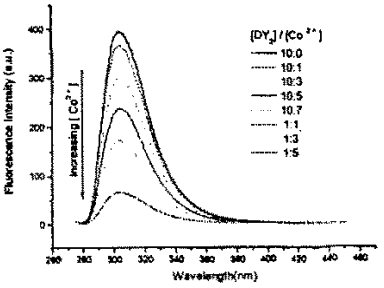


Fig. 4-2d. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Co^{2+} at pH 7.00±0.05.

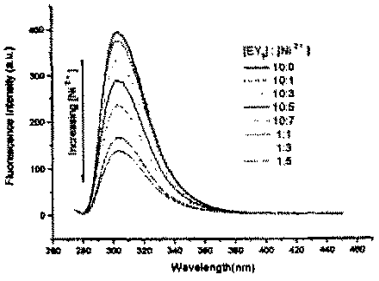


Fig. 4-2e. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Ni^{2+} at pH 7.00±0.05.

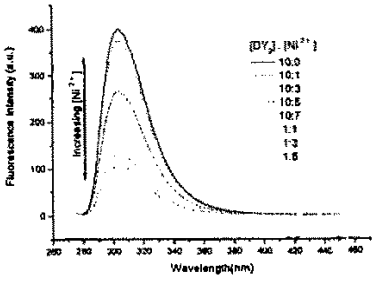


Fig. 4-2f. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Ni^{2+} at pH 7.00±0.05.

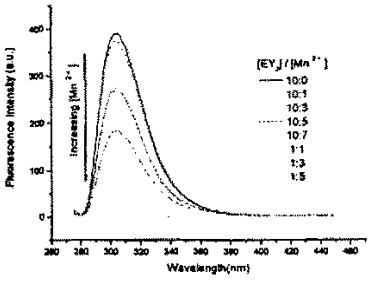


Fig. 4-2g. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Mn^{2+} at pH 7.00±0.05.

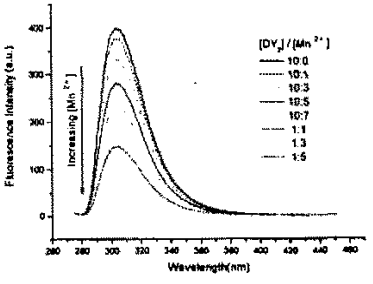


Fig. 4-2h. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Mn^{2+} at pH 7.00±0.05.

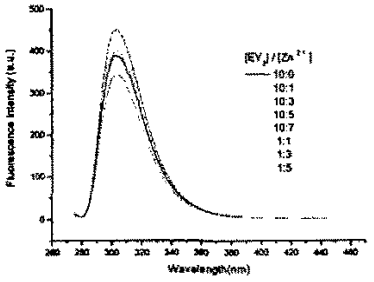


Fig. 4-2i. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Zn^{2+} at pH 7.00±0.05.

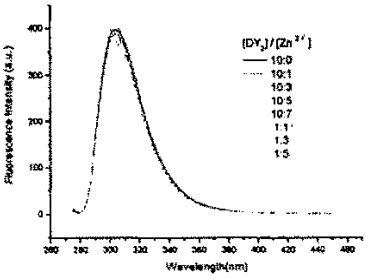


Fig. 4-2j. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Zn^{2+} at pH 7.00±0.05.

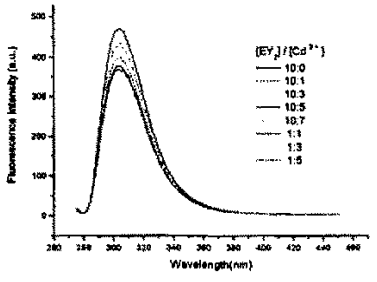


Fig. 4-2k. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Cd^{2+} at pH7.00±0.05.

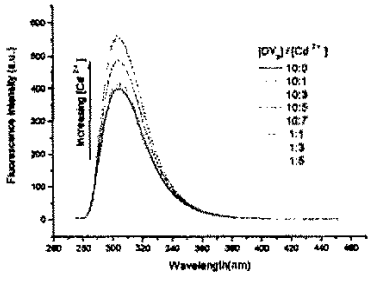


Fig. 4-2l. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Cd^{2+} at pH 7.00±0.05.

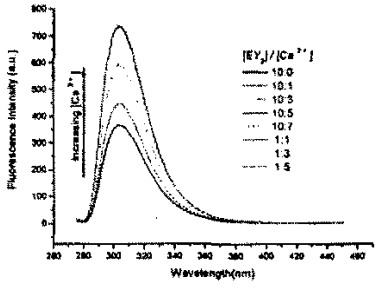


Fig. 4-2m. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Ca^{2+} at pH7.00±0.05.

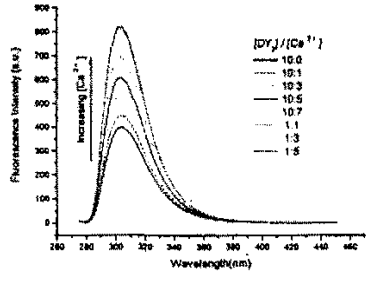


Fig. 4-2n. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Ca^{2+} at pH 7.00±0.05.

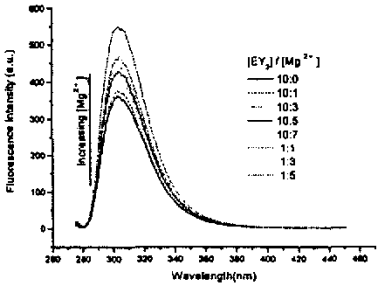


Fig. 4-2o. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Mg^{2+} at pH 7.00±0.05.

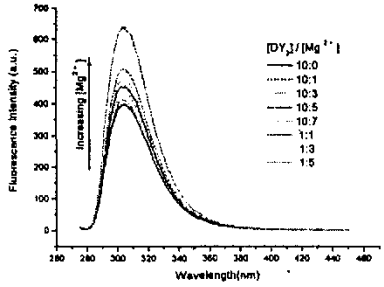


Fig. 4-2p. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Mg^{2+} at pH 7.00±0.05.

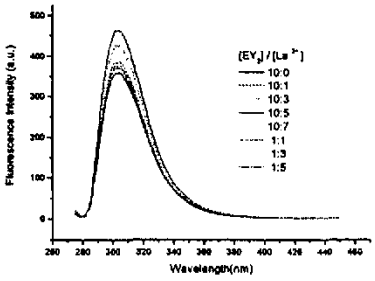


Fig. 4-2q. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with La^{3+} at pH 7.00±0.05.

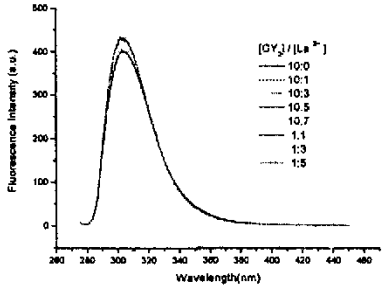


Fig. 4-2r. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with La^{3+} at pH 7.00±0.05.

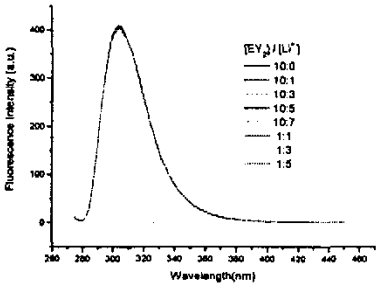


Fig. 4-2s. Fluorescence titration of 400 μM EY_2 with Li^{+} at pH 7.00±0.05.

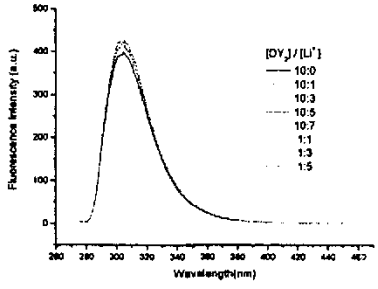


Fig. 4-2t. Fluorescence titration of 400 μM DY_2 with Li^{+} at pH 7.00±0.05.

Fig. 4-2：水溶液中，固定主体 EY_2 或 DY_2 的浓度为 400 μM，向其中分别滴加 Cu^{2+}、 Co^{2+}、Ni^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cd^{2+}、Ca^{2+} 、Mg^{2+}、La^{3+} 和 Li^{+}（阴离子均为 Cl^{-}），得到荧光滴定谱图（最大发射波长为 303.84 nm），控制溶液 pH 在 7.00±0.05 (缓冲溶液为 200 mM Tris-HCl)，温度在 25.0 ℃。固定荧光激发波长为 274.00 nm。

$[MCl_n]$ = 0, 40 μM, 120 μM, 200 μM, 280 μM, 400 μM, 1200 μM, 2000 μM; Molar ratios of $[XY_2]$: $[M^{n+}]$ = 10:0 (solid ——), 10:1 (dash ----), 10:3 (dot ···), 10:5 (dash dot -·-·), 10:7 (dash dot dot -··-··), 1:1 (short dash ·····), 1:3 (short dot ····), 1:5 (short dash dot -·-·).

3. pH dependence of fluorescence emission of EY_2 and DY_2

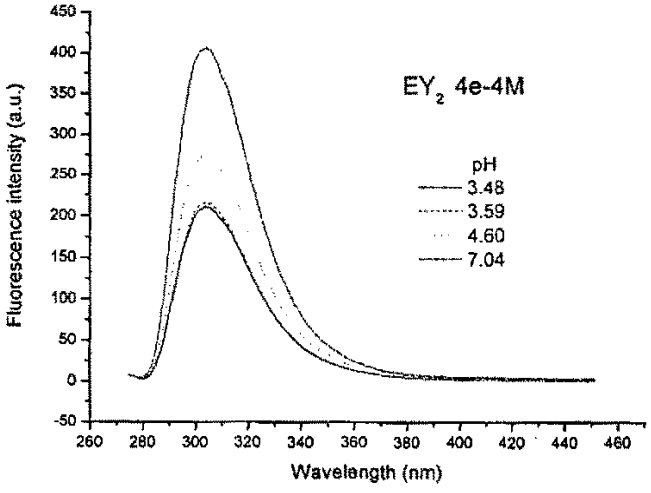


Fig. 4-3a. pH dependent change in fluorescence emission of 400 μM EY_2.

Fig. 4-3a. 25.0 ℃的水溶液中，固定 EY_2 的浓度为 400 μM，改变 pH 值扫描荧光发射谱图（固定荧光激发波长为 274.00 nm），得到 EY_2 的荧光 pH 滴定曲线。缓冲溶液为： 200 mM $CH_2ClCOOH$ + 200 mM NaOAc, pH = 3.48 (solid——); 200 mM $CH_2ClCOOH$ + 200 mM NaOH, pH = 3.59 (dash----); 200 mM NH_4Ac + 200 mM HAc, pH = 4.60 (dot ····); 200 mM Tris + HCl, pH = 7.04 (dash dot -·-·)。

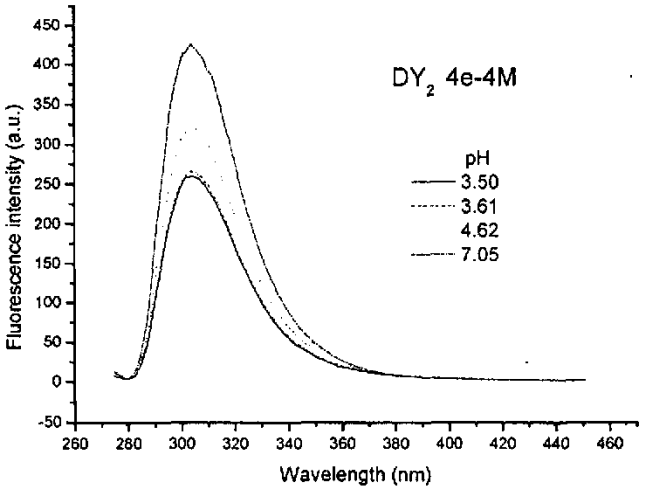


Fig. 4-3b. pH dependent change in fluorescence emission of 400 μM DY_2.

Fig. 4-3b. 25.0 ℃的水溶液中，固定 DY_2 的浓度为 400 μM，改变 pH 值扫描荧光发射谱图（固定荧光激发波长为 274.00 nm），得到 DY_2 的荧光 pH 滴定曲线。缓冲溶液为： 200 mM $CH_2ClCOOH$ + 200 mM NaOAc, pH = 3.50 (solid—); 200 mM $CH_2ClCOOH$ + 200 mM NaOH, pH = 3.61 (dash····); 200 mM NH_4Ac + 200 mM HAc, pH = 4.62 (dot ··); 200 mM Tris + HCl, pH = 7.05 (dash dot -·-·-)。

§4.4 EY_2 和 DY_2 的 ^{13}C-NMR 波谱滴定研究

4.4.1 实验仪器及部分参数

Instrument:　BRUKER AVANCE 300
Probe:　5 mm BBO BB-1H Z-G
Solvent:　DMSO
Exp Type:　C13CPD

4.4.2 核磁碳谱滴定实验

1. 配制 140 mM L-TrpOMe•HCl 的混合氘代试剂（1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v)）溶液约 0.5 mL，加入 1 倍当量的 $ZnCl_2$，待金属离子完全溶解后用于核磁碳谱测试

（谱图见 **Fig. 4-4**）。

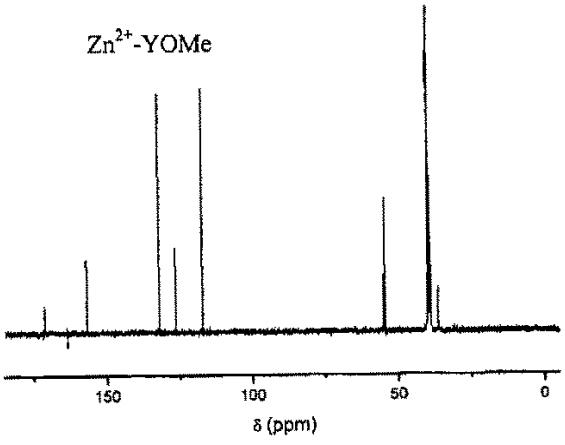


Fig. 4-4. ^{13}C-NMR CPD spectra of 140 mM Tyr-OCH_3 (YOMe) in the presence of 1 equiv Zn^{2+} .Solvent: 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

2. 分别配制 70 mM EY_2 的混合氘代试剂(1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v))溶液约 0.5 mL，向其中各自加入 1 倍当量的 $CaCl_2$、$MgCl_2$、$ZnCl_2$ 和 $CdCl_2$，待金属离子完全溶解后用于核磁碳谱测试（所得谱图见 **Fig. 4-5**）。

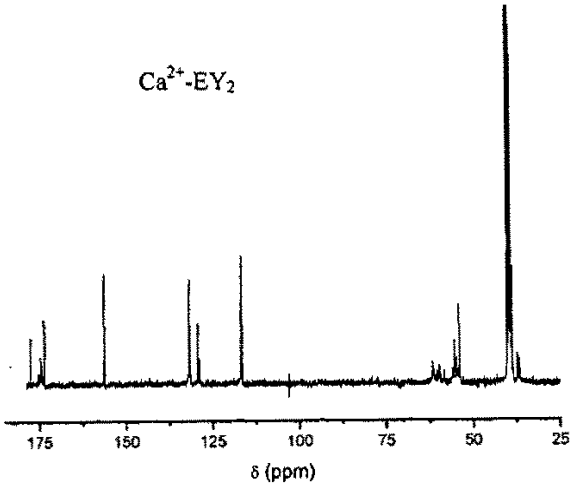


Fig. 4-5a. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM EY_2 with 1 equivalent Ca^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

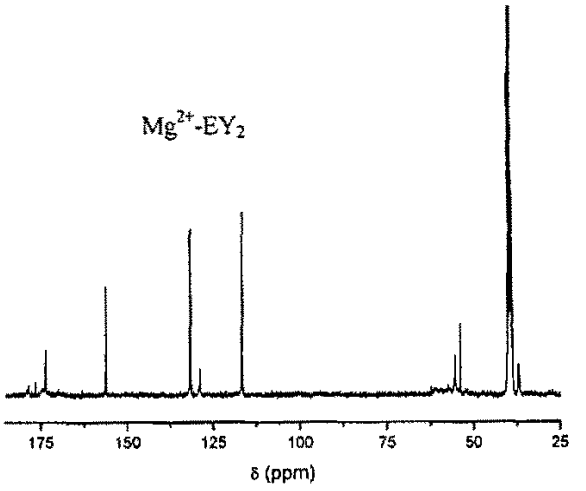


Fig. 4-5b. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM EY_2 with 1 equivalent Mg^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

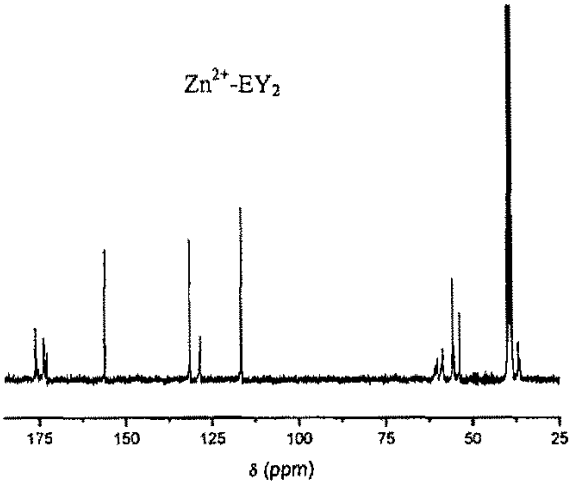


Fig. 4-5c. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM EY_2 with 1 equivalent Zn^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

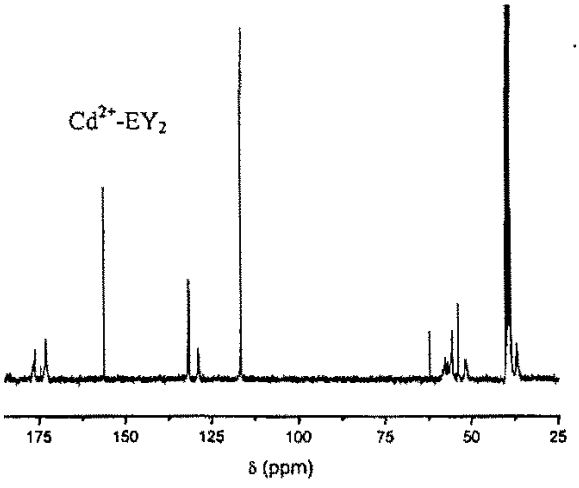


Fig. 4-5d. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM EY_2 with 1 equivalent Cd^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

3. 分别配制 70 mM DY_2 的混合氘代试剂(1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v))溶液约 0.5 mL，向其中各自加入 1 倍当量的 $CaCl_2$、$MgCl_2$、$ZnCl_2$ 和 $CdCl_2$，待金属离子完全溶解后用于核磁碳谱测试 （所得谱图见 **Fig. 4-6**）。

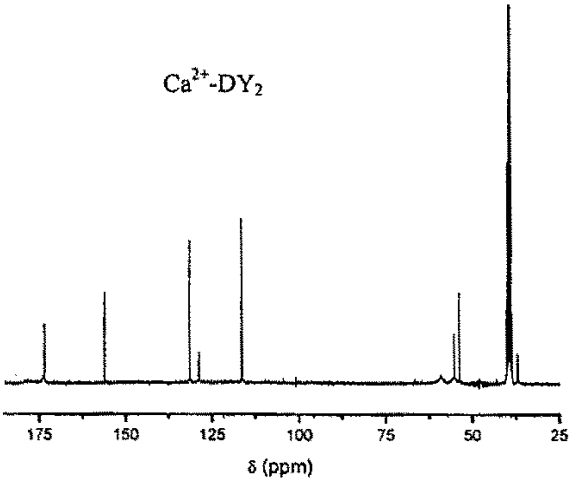


Fig. 4-6a. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM DY_2 with 1 equivalent Ca^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

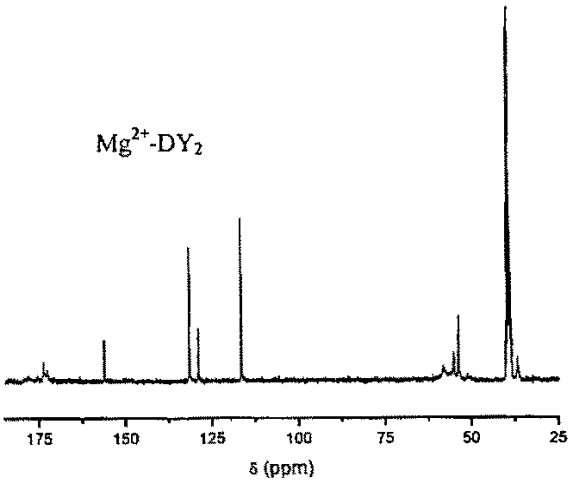


Fig. 4-6b. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM DY_2 with 1 equivalent Mg^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

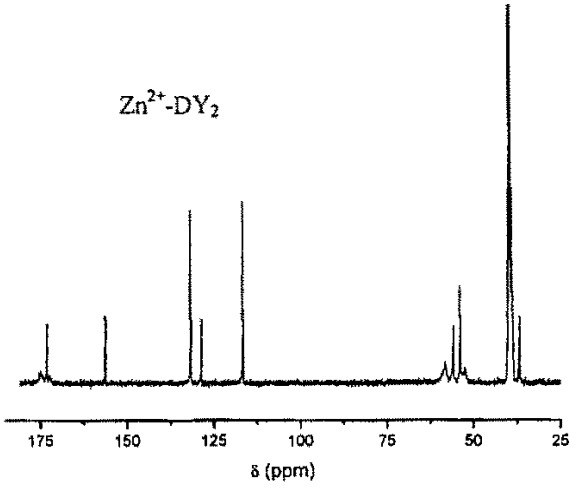


Fig. 4-6c. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM DY_2 with 1 equivalent Zn^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

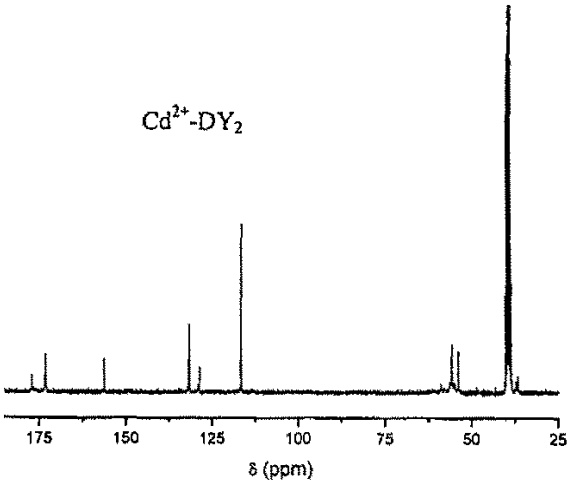


Fig. 4-6d. ^{13}C-NMR CPD spectra of 70 mM DY_2 with 1 equivalent Cd^{2+}, in 1:1 D_2O/DMSO-d_6 (v/v).

附 录

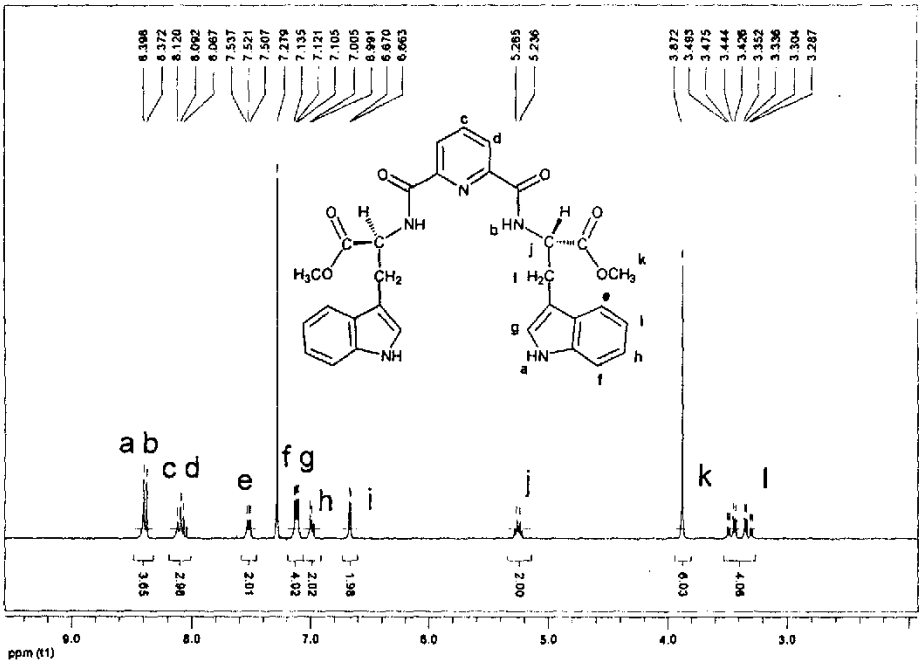


Fig. a. ^{1}H-NMR spectra of PW_2 in $CDCl_3$

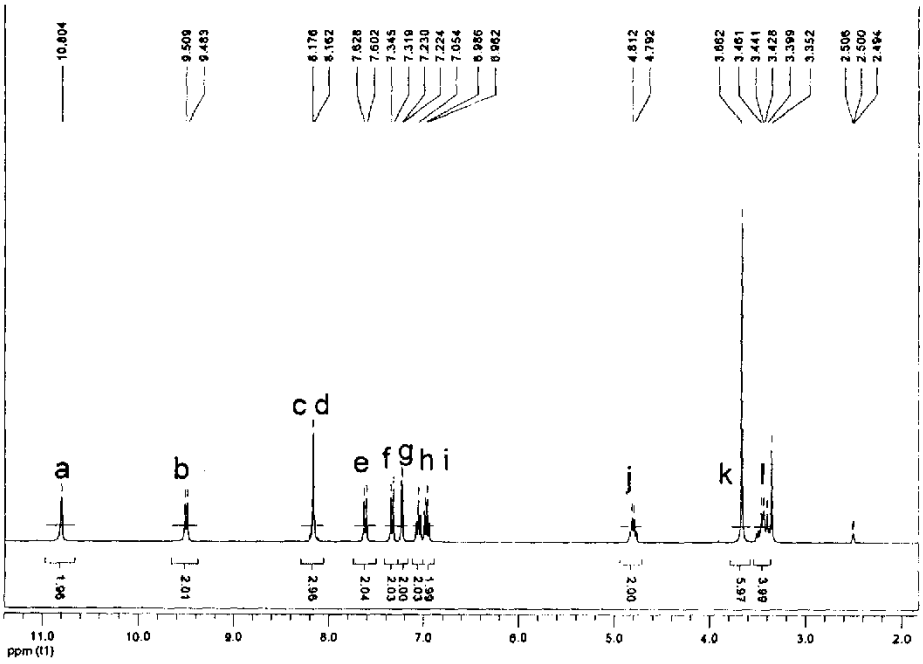


Fig. b. ^{1}H-NMR spectra of PW_2 in DMSO-d_6

致 谢

本论文是在杨池明教授的指导下完成的。从论文的选题、设计到工作的开展直至论文的撰写与完成，杨老师始终悉心指导，付出了极大的心血。杨老师在学术上严谨细致而富于创新、在育人上严肃认真而又平易待人；其渊博的学识，睿智的见地、严谨的作风和忘我的工作精神对我的潜移默化将使我终生受益。在此，对杨老师的辛勤培养和和悉心关怀谨致以诚挚的感谢和真诚的敬意！

十分感谢本组的李毅彤、艾兵和韩国利师弟，他们对本工作的完成给予了无私的支持和帮助，同时，感谢王秋实、黄承韫、朱金伟、汪亭、张捷以及已经离开本组的师姐李雪莹和段振娟，是他们给我创造了一个团结友爱、融洽和睦的学习和科研环境，在实验遇到问题时，各位同学耐心地与我讨论，提出有益的建议，令我受益匪浅。

最后，特别感谢我的家人和朋友们以及所有关心和帮助过我的人，是他们的关心和支持使我完成了这份学业。

魏 薇

2005 年 5 月于南开园