

• 实验研究 •

47 肽的微波辅助固相合成工艺研究

邵明香^{1,2}, 郑学敏¹, 曹政红^{1,3}, 龚珉¹, 汤立达^{1*}

1. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津医科大学 药学院, 天津 300080

3. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 合成一长链肽 47 肽。方法 采用 Fmoc/t-Bu 正交保护多肽固相合成策略, 使用 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 保护氨基酸的 α -氨基, 用 Liberty 微波多肽合成仪, 每个耦合循环用 20% 哌啶脱除 Fmoc 保护基团, 连续添加氨基酸, 并用茚三酮法检测反应终点, 有效检测反应的进度, 最后用 82.5% 的三氟乙酸将多肽从树脂上切割下来, 得到 47 肽粗品。经过反相高效液相制备系统纯化得到多肽纯品, 用反相高效液相色谱仪和傅里叶高分辨质谱仪验证该产物。结果 高分辨质谱仪验证了该产物, 纯品质量分数达 98%。结论 微波可促进多肽特别是长链肽的合成。

关键词: 47 肽; 微波; 固相合成

中图分类号: R914; R977.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0119-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.004

Synthesis of 47 peptide by microwave-assisted solid-phase technology

SHAO Ming-xiang^{1,2}, ZHENG Xue-min¹, CAO Zheng-hong^{1,3}, GONG Min¹, TANG Li-da¹

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmaceutics, Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300080, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300103, China

Abstract: **Objective** To synthesize a long-chain peptide—47 peptide. **Methods** Fmoc/t-Bu orthogonal protection solid phase synthesis strategy was used to synthesize the long-chain peptide, using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) to protect the α amino acid. With Liberty Microwave Peptide Synthesizer, 20% piperidine was used to remove Fmoc for each coupling cycle, amino acids were continuously added, and ninhydrin was used to detect the end point of reactions. The reaction progress was effectively detected, and finally 82.5% trifluoroacetic acid was used to cut off the peptide from resin, getting crude peptides. Finally, the crude peptide was purified by preparative RP-HPLC. The peptide was analyzed by analytical RP-HPLC and Fourier high-resolution mass spectrometer. **Results** The product has been validated High Resolution Mass Spectrometer and the purity of peptide is 98%. **Conclusion** Microwave could promote the synthesis of polypeptide, especially long-chain peptide.

Key words: 47 peptide; microwave; solid phase synthesis

多肽主要有液相和固相两种合成方法。液相合成时间长, 而且合成中间体必须纯化, 适合短链肽的合成。固相合成较液相合成表现出显著的优点, 简化并加速了多步骤的合成; 由于最初的反应物和产物都是连接在固相载体上, 因此可以在一个反应

容器内进行所有的反应, 避免了物料重复转移产生的损失; 使用过量反应物, 使个别反应完全, 以便最终产物得到高产率。本文主要采用固相合成法合成 1 个长链肽 47 肽。

1 仪器与试剂

收稿日期: 2012-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (2009ZX09301-008-P-05); 国家重大新药创制“十一五”科技重大专项 (2011ZX09041-009)

作者简介: 邵明香 (1988—), 女, 山东临沂人, 研究生, 研究方向为生物药合成及药理学。Tel: (022)23006858 E-mail: shaomingxiang1051@163.com

*通信作者 汤立达 E-mail: tangld@tjpr.com

1.1 仪器

Liberty 微波多肽合成仪(美国 CEM 公司); SSI3 300 色谱工作站(美国 SSI 公司); DHG—9023A 台式电热鼓风干燥箱(上海博翎仪器设备有限公司); FD—1D—50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); Eyela n1000 旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社); Sigma3k15 高速离心机、1—14 小型台式离心机(德国 Sigma 公司); HNY—恒温培养振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司); Sartorius BSA 224s—cw 电子天平(北京卓信伟业科技有限公司); 7.0T 瓦里安傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(美国 Ion Spec 公司), 离子源为基质辅助激光解析电离源。

1.2 试剂

氨基酸 Fmoc-X-OH, X = Ala、Glu(OtBu)、Gln(Trt)、Arg(Pbf)、Ser(tBu)、Tyr(tBu)、Val、Ile、Asp(OtBu)、Gly、Cys(Trt)、Phe、Thr(tBu)、His(Trt)、Lys(Boc)、Trp(Boc)(吉尔生化上海有限公司); Fmoc-Gly-Wang 树脂(替代度 0.24 meq/g, 购自南开和成科技有限公司); N,N' -二甲基甲酰胺(DMF)、 N -甲基吡咯烷酮(NMP)、茴香硫醚、三氟乙酸均购自百灵威科技有限公司, 分析纯; 1-羟基-苯并三氮唑(HOBT)、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑(HOAT)、 N,N' -二异丙基碳二亚胺(DIC)、苯并三氮唑- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、哌啶、无水乙醚、 N,N' -二异丙基乙胺(DIPEA)、1,2-乙二硫醇(EDT)、苯酚、二氯甲烷均为国产化学纯, 康科德化学试剂有限公司提供; 乙腈(色谱纯, 康科德化学试剂有限公司); 高纯氮气(天津市兴盛气体有限公司, 质量分数>99.999%)。

2 方法与结果

2.1 试剂的配制

47 肽(序列: NH_2 -HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLCKGRGGCGGGGGGGGGGGGGG-COOH, M_r 为 4 318.66) C 端和 N 端都不修饰。本实验的合成规模是 0.1 mmol, 每一个循环使用的脱保护剂量是 14 mL, 氨基酸 2.5 mL, 活化剂 1 mL, 活化剂碱 0.5 mL, 一个循环需要脱保护 2 次, 这样可保证脱保护完全。

2.1.1 树脂的溶胀 称取 Fmoc-Gly-Wang 树脂 0.417 g, 溶于 10 mL DMF 中, 溶胀 15 min, 待用。

2.1.2 活化剂的配制 本实验主要使用 3 种活化剂: 第一种是 0.45 mol/L HBTU 和 0.45 mol/L

HOBT, 溶在 DMF 中^[1]; 第二种活化剂是 0.3 mol/L DIC 和 0.2 mol/L HOBT, 溶在 DMF 中^[2]; 第三种活化剂是 0.45 mol/L HATU 和 0.45 mol/L HOBT, 溶在 DMF 中^[3]。首选第一种活化剂。准确称取 9.383 g HBTU 和 3.338 5 g HOBT, 加入 49.5 mL DMF, 超声加速溶解, 得到 55 mL 第一种活化剂; 准确量取 1.17 mL DIC, 用 DMF 定容至 10 mL, 称取 0.338 g HOBT, 用 DMF 定容至 5 mL, 得到第二种活化剂; 称取 0.853 g HATU 和 0.303 5 g HOBT, 加入 4.5 mL DMF, 得到第三种活化剂。

2.1.3 活化剂碱的配制 量取 DIEA 1.44 mL, 加入 NMP 19.56 mL, 得到 30 mL 活化剂碱。

2.1.4 脱保护剂的配制 量取 150 mL 哌啶, 用 DMF 定容至 750 mL, 得到 750 mL 20%哌啶的脱保护溶液。

2.1.5 氨基酸的配制 氨基酸的浓度为 2 mol/L, 氨基酸量使用 5 倍量过剩, 防止反应不完全^[4]。称取 Fmoc-Gly-OH 3.39 g, 用少量 DMF 溶解, 然后再用 DMF 定容至 57 mL。同理称取 Fmoc-Ala-OH 0.81 g, 用 DMF 定容至 13 mL。分别称取 Fmoc-Asp(OtBu)-OH 0.41 g、Fmoc-Gln(Trt)-OH 0.61 g、Fmoc-Glu(OtBu)-OH 0.85 g、Fmoc-His(Trt)-OH 0.62 g、Fmoc-Ile-OH 0.35 g、Fmoc-Leu-OH 0.35 g、Fmoc-Ser(tBu)-OH 0.77 g、Fmoc-Trp(Boc)-OH 0.53 g、Fmoc-Tyr(tBu)-OH 0.46 g、Fmoc-Val-OH 0.34 g, 用 DMF 定容至 10 mL。分别称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 0.91 g、Fmoc-Cys(Trt)-OH 0.82 g、Fmoc-Lys(Boc)-OH 0.66 g、Fmoc-Phe-OH 0.54 g、Fmoc-Thr(tBu)-OH 0.56 g, 用 DMF 定容至 7 mL。

2.2 合成操作

2.2.1 Pepdriver 软件操作 所有的试剂配好之后, 拧紧反应瓶, 打开微波和 Liberty 主机, 拧开氮气罐的压力到 0.3 MPa, 启动 Pepdriver 软件, 反应之前需要检测一下系统的压力, 低压控制在 2~3 Pa, 高压控制在 15~17 Pa。将 47 肽序列输入到软件中, C 端 acid, 合成规模 0.1 mmol, 最后需要脱保护及树脂替代度是 0.24 meq/g。方法编辑好之后可开始反应, 由软件控制以下操作, 各别步骤需要人工操作。由于使用的树脂上已连有一个 Gly, 且树脂已溶胀, 所以第一步可跳过, 直接从第二步开始, 连接第二个氨基酸到树脂上。反应过程是首先用 7 mL DMF 洗反应瓶顶部, 然后用氮气吹走 DMF。加入 7 mL 20%哌啶的脱保护剂, 微波反应 30 s; 用 DMF 洗反

应瓶顶部,接着加入 7 mL 20%哌啶的脱保护剂,微波反应 3 min。吹走脱保护剂,用 DMF 来回洗反应瓶底部和顶部各 2 次,吹走 DMF。接着加入 2.5 mL 氨基酸,1 mL 活化剂和 0.5 mL 活化剂碱,微波加热 6 min。然后用 DMF 洗脱反应瓶的底部和顶部各 2 次,完成一个循环。洗完之后可以连接下一个氨基酸。所有这些步骤都是软件控制的。合成基本流程见图 1。

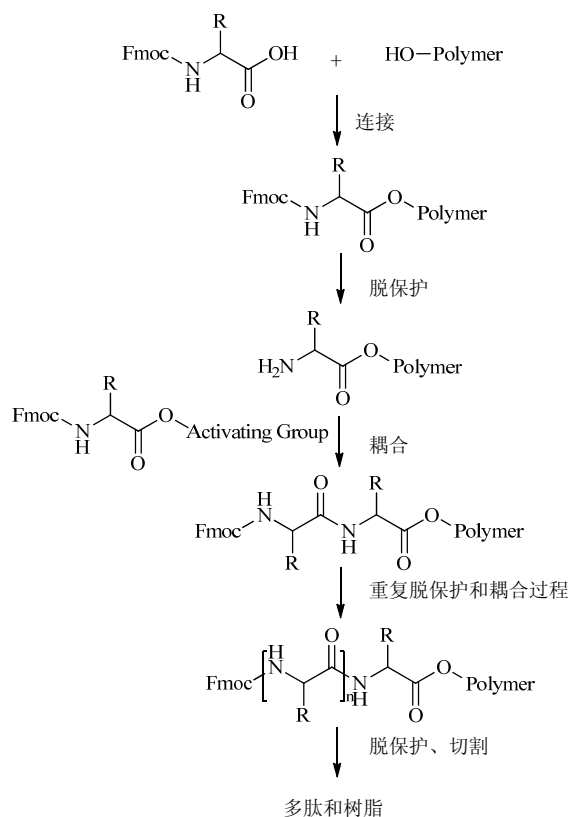


图 1 固相多肽合成基本流程

Fig. 1 Basic process of polypeptide synthesis by solid phase

除 Cys、His 耦合微波功率 25 W,耦合温度 50 °C^[5],其余氨基酸耦合时微波功率 28 W,耦合温度 75 °C。这主要是由于高温容易使 Cys、His 发生消旋。活化剂中加入 HOBT 也是为了防止氨基酸消旋,减少副反应的发生。脱保护微波功率 40 W,温度 75 °C。

2.2.2 反应终点的检测 固相合成中,主要是通过检测树脂上游离的氨基来判断反应终点和连接效率。氨基酸与茚三酮的反应是一个检测氨基酸的重要反应。茚三酮在弱酸性溶液中与氨基酸在 120 °C 共热 2~5 min,如果具有游离氨基会生成蓝色化合物,而脯氨酸由于含有亚氨基会生成红褐色化合物。如果没有游离的氨基,树脂不会变色。第一次合成这个多肽时,这一步需要手动实现。第一次合

成完之后可以知道每一个氨基酸的耦合方式。以后合成可以适当选择氨基酸的耦合方式实现全自动。耦合结束,取出大约 5 粒树脂于小炮弹中,加一滴 0.05 g/mL 茚三酮乙醇溶液和一滴 0.8 g/mL 苯酚乙醇溶液,放入 120 °C 加热 5 min,判断颜色是否变化。如果出现蓝色或者黄色,说明反应不完全,需要重新耦合一次。此时就不需要从脱保护开始,重新加氨基酸和活化剂及活化剂碱,此时活化剂需要使用第二种。如果仍然有颜色,需要再耦合一次,换用第三种活化剂。用同样的方法进行检测。使用不同的活化剂 3 次之后如果仍然有颜色,就需要加盖帽剂。

2.2.3 盖帽原理 选择的盖帽剂是 20%乙酸酐的 DMF 溶液。伯胺可与乙酸酐发生乙酰化反应。反应之后可再用茚三酮溶液进行检测,如果有颜色可再进行一次盖帽。一般情况下,没有颜色变化,乙酸酐与伯胺反应很灵敏,效果很好。盖帽微波功率 25 W,温度 65 °C,反应 2 min。依次反应到第 47 个氨基酸结束。

2.2.4 裂解 反应结束,将连有多肽的树脂从反应瓶中取出,用砂芯漏斗抽滤,用二氯甲烷洗去 DMF,称质量 0.79 g。配制切割液 TFA - 茴香硫醚 - H₂O - 苯酚 - EDT (82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5) 8 mL^[6]。加入切割液,在反应瓶中充入氮气,置恒温摇床,设定时间 2.5 h,温度 24 °C,转速 150 r/min。

2.2.5 乙醚沉淀 裂解完成之后,用砂芯漏斗滤过,树脂用 TFA 洗涤 3 次。将滤液转移至 50 mL 离心管中,加入 40 mL 预先在 -20 °C 预冻的无水乙醚。在 -20 °C 静置 30 min,取出用高速离心机 3 500 r/min,离心 3 min。倒掉上清液,加入冰乙醚,重复 2 次,保证沉淀完全。倒掉上清液,用高纯氮气快速吹干。称质量 0.277 4 g,粗肽产率 64.2%。

2.2.6 粗品的纯化 色谱条件: C₁₈ 反相制备柱 Juipiter Proteo 90A (100 mm×21.2 mm, 4 μm),流动相 A 为乙腈 (含 0.1% TFA),流动相 B 为水 (含 0.1% TFA),梯度 20%~50%流动相 A 30 min,体积流量为 8 mL/min,检测波长为 214 nm,柱温为 25 °C。

将粗肽用 20% DMSO-H₂O 溶解成 10 mg/mL,用 0.22 μm 滤膜滤过,使用 SSI 反相高效液相色谱仪进行纯化。将收集到的样品溶液减压蒸馏,温度控制在 50 °C 以内,蒸去有机溶剂。将剩余的液体转移至西林瓶中,放 -80 °C 冻一夜。第二天用真空冷

冻干燥机干燥, 得纯品, 称质量 74 mg, 纯化收率 26.7%。通过傅里叶高分辨质谱仪, 使用 maldi-TOF 离子源, 验证了该物质, Mr 为 4 320.017 0。

2.2.7 RP-HPLC 液相分析 色谱条件: C₁₈ 反相分析柱 Juipiter Proteo 90A (250×4.6mm, 4 μm), 流动相 A 为乙腈 (含 0.1% TFA), 流动相 B 为水 (含 0.1% TFA), 梯度洗脱 0~60 min, 20%~80% A, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 214 nm^[7]。

取粗肽、纯品各 1 mg, 用 5% DMSO-H₂O 完全溶解至 1 mg/mL, 用 SSI 反相高效液相色谱仪分析。质量分数分别为 43.44%、98.00%。

3 讨论

对于长肽链的多肽合成, 位于 C 端的氨基酸相对来说合成困难小一些, 因为肽链还没有形成空间结构, 但是对于超过 5 个相同的氨基酸连在一起时, 合成难度就加大了。此 47 肽前两个 Gly 连在树脂上之后, 用茚三酮检测皆没有颜色, 耦合到第 4 个 Gly 时, 用茚三酮检测就会出现蓝色, 换用不同的活化剂和活化剂碱可以增加反应效率。整个序列, 困难合成的氨基酸是 C 端的第 15 Cys、第 18 Arg、第 21 Cys、第 33 Glu、第 35 Tyr 和第 47 His。在遇到困难肽序列时, 使用不同的活化剂和活化剂碱以及加入盖帽剂的方法有效解决了耦合效率低, 降低副反应的发生。随着肽链的延长, 多肽容易形成高级结构, 一些氨基会包埋在里面, 必要时可以使用 30% 哌啶的脱保护剂。但是一般情况下, 20% 哌啶就可以, 因为 CEM 公司研发的专利环形聚焦单模微波技术, 提供一种特殊的环形电磁场, 多肽链在这种环形电磁场的作用下可以充分的伸展开, 因此可以非常方便的在头部的氨基酸进行去保护、缩合和切割, 大大节省了反应时间以及提高了产率。

根据多肽序列选择不同的切割液, 对于大部分

多肽可选择切割液 TFA - TIS - H₂O (95 : 2.5 : 2.3); 如果多肽序列中含有 Cys、Met、Trp、Arg 时, 需要选择使用切割液 TFA - 茴香硫醚 - H₂O - 苯酚 - EDT (82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5)。1 g 连有多肽的湿树脂需要用 10 mL 切割液。由于该 47 肽序列中含有 Cys、Trp、Arg, 所以需要使用第二种切割液。

固相合成的主要存在问题是固相载体上中间体杂肽无法分离, 使最终产物的纯度不如液相合成物, 必需通过可靠的分离手段纯化。但在反应时间和产率上, 固相合成表现出更好的优势。

参考文献

- [1] 符友伟, 吴 蕾. 多肽固相合成法中的 3 个关键点 [J]. 化学工业与工程, 2010, 27(4): 370-375.
- [2] Bacsá B, Bosze S, Kappe C O. Direct solid-phase synthesis of the beta-amyloid (1-42) peptide using controlled microwave heating [J]. *J Org Chem*, 2010, 75(6): 2103-2106.
- [3] Ananda K, Reddy K, Reddy M B, *et al.* An improved process for the preparation of enfuvirtide [P]. WO: 2011095989, 2011-11-08.
- [4] Tofteng A P, Pedersen S L, Staerk D, *et al.* Effect of residual water and microwave heating on the half-life of the reagents and reactive intermediates in peptide synthesis [J]. *Chemistry*, 2012, 18(29): 9024-9031.
- [5] Aguilar M I. *HPLC of Peptide and Proteins: Methods and Protocols* [M]. Totowa: Humana Press Inc, 2004: 10-19.
- [6] Chan W C, White P D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* [M]. New York: Oxford University Press, 2000: 61-68, 268-270.
- [7] Bacsá B, Horvati K, Bosze S, *et al.* Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: a critical comparison of microwave and conventional heating technologies [J]. *J Org Chem*, 2008, 73(19): 7532-7542.