

芴烯一哌啶加合物的紫外光谱研究及其应用^{*}

陈向明, 陈河如

(汕头大学理学院化学系, 广东 汕头 515063)

摘要: 研究了芴烯一哌啶加合物的紫外光谱特性并将其应用于定量测定 Fmoc 锁定的树脂容量 (capacity) 和 Fmoc 保护的树脂肽含量。该法的灵敏度为 0.000 1 mmol/g 树脂。利用该法可在不损失树脂肽的情况下定量测定基于 Fmoc 的多肽固相合成法中各步反应的偶合产率。

关键词: 芴烯一哌啶加合物; Fmoc 固相多肽合成法; 紫外吸收; 定量检测

中图分类号: O657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0061-03

基于 9-芴烯甲氧羰基 (Fmoc) 的多肽固相合成法 (Fmoc SPPS) 已经发展成为合成多肽化合物的标准途径^[1]。要成功完成目标多肽的合成, 要求在固相法中各步偶合反应的产率最好达到 100%。否则, 当目标多肽是长链大肽时, 即使每一步的偶合产率在 98%~99% 之间, 不均一性 (heterogeneity) 的问题也将变得十分突出^[2]。保证每一步反应的产率实际上达到 99.9% 或以上显得十分重要。

因此, 获得每一步偶合反应的定量信息对于有效的合成是相当有用的。实际上, 已经有两个可应用于 Fmoc 固相合成的定量分析方法, 但都各有缺点。第一个方法来自 Sarin 等的研究^[3]。该法基于小心控制条件下自由氨基与水合茚三酮的反应产生生色基化合物的溶液, 然后测定该溶液在 570 nm 下的吸收。该法的缺点是: ①破坏保护树脂肽 (resin link peptide) 的自由氨基, 使得树脂肽不能重返反应; ②实验中所用的吡啶有可能破坏 Fmoc 基团^[4], 引发实验误差, 使结果偏高。另一种办法是苦味酸测定光谱法^[5], 该法已实现自动化测定。这个方法是用苦味酸滴定碱性氨基, 再用光谱法测定所形成的生色加合物的含量。该法的缺点是苦味酸可能引起对酸不稳定的边链保护基团的脱落^[3], 需要对边链再保护。

用哌啶脱除 Fmoc 基团时, 将形成芴烯一哌啶加合物, 该加合物在 267、290 和 301 nm 有最大的紫外吸收^[6,7], 并有一定的稳定性。这一特性将可能成为定量测定的基础^[8]。本文将详细讨论我们在这方面的研究。

1 方法和材料

N-Fmoc 保护氨基酸购自 Bachem (Switzerland); 哌啶 (piperidine) 购自 ACROS (美国新泽西州), 使用前经 KOH 干燥重蒸; 二甲基甲酰胺 (DMF) 购自 Fisher, 为多肽合成专用溶剂, 使用前经 0.4 μm 分子筛干燥。

所用的紫外光谱仪型号为 Milton ROY 3000。

1.1 芴烯一哌啶加合物的制备及紫外光谱

芴烯一哌啶加合物目前没有现成试剂, 通过用 φ=25% 哌啶的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液脱除稳定的 Fmoc 保护氨基酸来制备。在本研究中我们选择采用 Fmoc 保护的亮氨酸 (Fmoc Leu OH)。这个选择的理由有: ① Fmoc Leu OH 在脱保护后所得到的亮氨酸 (H Leu OH) 在哌啶-DMF 中溶解度很低, 形成沉淀, 可以过滤除去; ② 根据实验结果, 即使少量的亮氨酸存在于工作溶液中, 对于芴烯一哌啶加合物的紫外吸收性质, 特别是对它在 267、290 和 301 nm 处的吸收几乎没有影响或影响可以忽略。

图 1 是芴烯一哌啶加合物的紫外吸收光谱。从中可以看出该化合物的最大吸收峰, 并由浓度—吸收关系获得相应的消光系数。它们分别为: 267 nm ($\epsilon=17\,670.7\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); 289 nm ($\epsilon=6\,414.2\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); 300.5 nm ($\epsilon=7\,926.8\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。实验结果与文献 [7] 同。我们选择 300.5 nm 作为工作波长, 因为在该波长处, 溶剂 DMF 和哌啶对测定结果的影响最小。

* 收稿日期: 2005-05-10

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (000779); 汕头大学校级基金资助项目 (130-071010)

作者简介: 陈向明 (1961年生), 男, 教授, 通讯联系人: 陈河如; E-mail: hrchen@stu.edu.cn

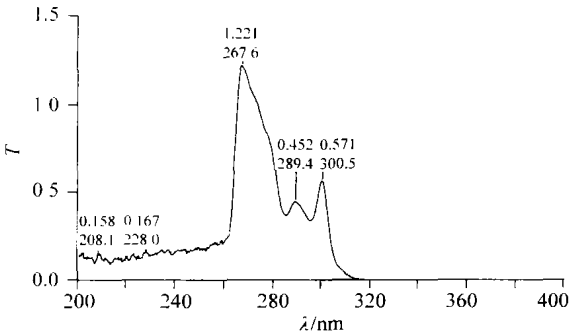


图 1 茆烯—哌啶加合物的紫外光谱

Fig 1 UV Spectrum of the fulvene piperidine adduct
介质: $\varphi=0.5\%$ 哌啶—DMF 溶液;
 $c=0.069\text{ mmol/L}$

1.2 工作曲线

准确称取 35.34 mg (0.1 mmol) Fmoc-Leu-OH, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 含 $\varphi=25\%$ 哌啶的 DMF 溶液, 搅拌反应 25 min. 过滤, 残留物用新鲜 DMF 洗涤 3 次, 每次 3 mL. 将滤出液和所有的洗涤液合并于 25 mL 容量瓶中, 用新鲜 DMF 准确稀释至刻度, 该溶液即为储备液, 其浓度为 4.0 mmol/L.

上述储备液用 DMF 按 2 倍稀释法稀释成各种浓度的溶液并测定各自的紫外吸收. 结果发现, 当茆烯—哌啶加合物的浓度在 $5\times 10^{-3} \sim 0.1\text{ mmol/L}$ 时, 浓度 (c) 与吸光度 (A) 的关系很好地符合朗伯—比耳定律 (见图 2). 其关系为

$$c = 0.1293A - 0.0014$$

线性相关性很好 ($R^2 = 0.9998$). 这个浓度范围将被应用于定量测定.

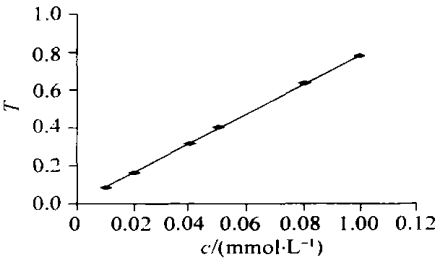


图 2 定量测定茆烯—哌啶加合物的工作曲线

Fig 2 Working curve for quantitative determination of fulvene piperidine adducts
标准物质: Fmoc-Leu-OH;
介质: $\varphi=0.5\%$ 哌啶—DMF 溶液;
工作波长: 300.5 nm

1.3 测定步骤

本法可直接应用于测定 Fmoc 锁定的树脂容量

的测定以及 Fmoc 保护的树脂肽含量的测定; 并可间接用于测定固相法多肽合成中各步反应的偶合产率. 具体步骤如下.

可用泡浸法或连续流法脱去 Fmoc 锁定的树脂或 Fmoc 保护的树脂肽中的 Fmoc 基团, 所用试剂为 $\varphi=25\%$ 哌啶的 N,N -二甲基甲酰胺溶液. 不管用那一种方式, 都用紫外检测的办法监测反应的进程, 直到指示已经 100% 的脱除. 过滤, 用新鲜 DMF 洗涤树脂. 合并滤出液和所有的洗涤液, 将之准确定容至 50 mL. 然后用移液管准确移取一定量的该溶液, 准确稀释至 5 mL, 使待测溶液的浓度落在 $5\times 10^{-3} \sim 0.1\text{ mmol/L}$ 的范围内, 测定该溶液在 300.5 nm 处的紫外吸收. 根据图 2 的工作曲线, 可求出其浓度; 按照稀释的倍数关系, 即可求出所测定的树脂容量或保护的树脂肽含量.

将此步骤应用于固相法多肽合成过程, 由此可获得经偶合反应后各步中树脂肽的含量, 并经如下公式将之转化为该步反应的偶合产率:

$$y = \frac{A_n}{A_{n-1}} \times 100\%, \quad y = \frac{c_n}{c_{n-1}} \times 100\%$$

其中, n 为步骤, A 为吸光度, c 为浓度. 实验中, 要求每一步的稀释倍数相同.

2 结果与讨论

2.1 Fmoc 锁定的树脂容量的测定

本方法首先应用于 Fmoc 锁定的树脂容量的测定, 对几种商用树脂的容量进行了测定, 结果见表 1. 由表 1 可见, 测定结果与厂家声明的容量值一致. 为了进一步评估本方法的准确性, 采用苦味酸滴定光谱法做平行测定. 从表 1 的结果可见, 三者相当一致.

表 1 树脂容量的测定
Tab 1 Detemination of the capacity of resins

树脂	容量值/(mmol·g ⁻¹)		
	厂家	苦味酸法	本文法
TentaGel	No. SG63S01/	0.24	0.23
	9.4/10.34(1)		
S RAM	No. SG63S01/13.12	0.22	0.23
	No. AG63S01/8.3		
Polystyrene AM-RAM	No. S2939.02/1	0.78	0.77

本方法可用于测定低至 0.0001 mmol/g Fmoc 锁定的树脂含量, 这使得该法有足够的灵敏度用于分辨少于 0.1% 反应产率的差异.

2.2 Fmoc—固相合成法多步合成 loloatins 中各步反应产率的测定

Loloatins 是新近发现的具有显著抗菌活性的一类化合物^[9]，有希望发展成为新型的抗生素，因而引起我们的兴趣。我们已经发展一个有效的合成途径来合成这一类化合物^[10]。本方法首先被应用于 loloatins 合成路线的研究中，对合理路线的建立有很大的帮助。表 2 列出用本方法测定的合成 loloatins 过程中各步反应的偶合产率。由测定结果可决定某一步的偶合是否该进行第 2 次的偶合，以确保多肽的均一性。

表 2 合成 loloatins 中各步偶合反应的酰化效率
Tab 2 Acylation efficiencies in each coupling step of the synthesis of loloatins

步骤	Loloatin A		Loloatin B		Loloatin C	
	$n_1:n_2^{1)}$	$y/\%$	$n_1:n_2$	$y/\%$	$n_1:n_2$	$y/\%$
1	1:2.47	100	1:2.45	98.5	1:1.70	93.0
2	1:2.47	98.5	1:3.12	100	1:1.85	96.0
3	1:3.09	96.3	1:3.12	99.3	1:2.38	89.5
4	1:3.09	96.8	1:3.43	98.7	1:2.66	100
5	1:3.39	100	1:3.48	98.3	1:2.66	100
6	1:3.39	99.3	1:3.54	100	1:2.66	93.4
7	1:3.39	96.9	1:3.54	96.8	1:2.66	96.7
8	1:3.48	100	1:3.65	97.7	1:2.76	99.7
9	1:3.48	100	1:3.74	100	1:2.76	97.9
10	1:3.48	96.2	1:3.74	99.3	1:2.82	100

1) $n_1:n_2$ 为 n (自由氨基): n (偶合试剂)

本方法很容易实现自动化，而且所使用的试剂是在合成过程中用过的，无需额外的试剂。另外，在本实验条件下不会破坏多肽的结构。

参考文献:

[1] FIELDS G B, NOBLE R L. Solid phase peptide synthesis

utilizing 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino acids [J] . Int J Peptide Protein Res, 1990, 35: 161—214.
[2] BARANY G, MERRIFIELD R B. The Peptides[M] . New York: Academic Press, 1979: 1—284.
[3] SARIN V K, KENT B H, TAM J P, et al. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction [J] . Analytical Biochemistry, 1981, 117: 147—157.
[4] OTTESON K M. Applied biosystems user bulletin, peptid synthesizer, applied biosystems[M] . Foster City, CA: 1989: 29.
[5] HODGES R S, MERRIFIELD R B. Monitoring of solid phase peptide synthesis by an automated spectrophotometric picrate method [J] . Anal Biochem, 1975, 117: 241—272.
[6] CHANG C D, WAKIM, AHMAD M, et al. Preparation and properties of Nα-9-fluorenyl methyloxy carbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection[J] . Int J Peptide Protein Res, 1980, 15: 59—66.
[7] MEIENHOFER J, WAKI M, HEIMER E B, et al. Solid phase synthesis without repetitive acidolysis [J] . Int J Peptide Protein Res, 1979, 13: 35—42.
[8] SHEPPARD R C. True automation of peptide synthesis [J] . Chem Britain, 1988: 557—562.
[9] GERARD J M, HADEN P, KELLY M T, et al. Loloatins A—D, cyclic deca-peptide antibiotics produced in culture by a tropical marine bacterium[J] . J Nat Prod, 1999, 62: 80—85.
[10] SCHERKENBECK J, CHEN H R, HAYNES R K. Solid phase synthesis of loloatins A—C[J] . Eur J Org Chem, 2002: 2350—2355.

Study on the Fulvene Piperidine Adducts
by UV Spectrophotometry and Its Application

CHEN Xiang ming, CHEN He ru

(School of Sciences, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: The ultra violet property of fulvene piperidine adduct were studied by UV spectrophotometry. This was further applied to determine the capacity of Fmoc capped resins and the quantity of Fmoc protected resin linked peptides. The sensitivity is 0.0001 mmol per gram resins. The method has also been used for quantitative determination of the coupling efficiencies in each step of the process of Fmoc based solid phase peptide synthesis without loss of peptide linked resins.

Key words: fulvene piperidine adduct; Fmoc SPSS; UV absorption; quantitative determination