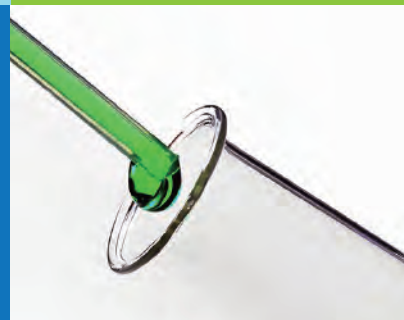


应用指南

肽合成

使用PlateExpress和expression TLC/CMS
对液相肽合成进行实时反应监测



介绍

结合了薄层层析法 (TLC) 和紧凑型质谱法 (CMS) 的实时反应监测, 是现代实验室中化学家克服合成难题、优化化学反应的一种简单、快捷的方法。基于Fmoc保护的氨基酸构建模块, 遵循快速、连续的液相合成策略, 可以很容易地合成药用肽。这种反应的一个简单模型是对脂肪酸合成通路组分酰基载体蛋白 (ACP) 的类似物进行培养。



图1: expression CMS和Plate Express TLC/CMS

方法

反应过程将 Fmoc-Asn-(Trt)-OH (1.0 mM, 600 mg) 和 O-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU, 1.0 mM, 400 mg) 溶解在50 mL圆底烧瓶内的10 mL二氯甲烷 (DCM) 中并搅拌。加入*N,N,N'*-二异丙基乙胺 (DIEA, 2.65 mM, 465 μ L), 激活氨基酸构建模块, 并搅拌5分钟。加入甘氨酸叔丁基酯盐酸盐 (H-Gly-OtBu, 0.65 mM, 109 mg), 在室温下开始反应, 反应时间持续1小时。

用10 mL DCM稀释反应混合物, 依次使用10 mL的水、10 mL的体积比10%碳酸钠、10 mL的水和10 mL的盐水进行洗涤。DCM用硫酸镁干燥过滤, 加入三(2-氨基乙基)胺 (TAEA, 3.5 mL) 将产物解决。将该混合物搅拌5分钟, 分别用7 mL盐水、磷酸盐缓冲液 (1.76 mol/L, pH值5.5) 和盐水洗涤。洗涤后的有机层含有第一步的二肽产物。

反应可以持续, 直至达到最终的氨基酸链长度。

TLC板的样品收集和培养 在1小时反应过程的不同时间点, 取1 μ L 反应混合物并置于TLC板 (薄层层析板) (Merck EMD, 5534-3硅胶60 F254, 5 \times 20 cm, 0.2 mm) 的原点上。使用DCM/甲醇/乙酸 (9:1:0.1) 混合物在TLC板上对反应混合物进行展开实验。然后可在254 nm的短波紫外光下标记TLC显色斑点。

TLC/CMS分析 TLC斑点用自动TLC提取装置 (PlateExpress, Advion公司) 进行进一步处理。将TLC板移动到提取头下方, 并用激光光斑照射目标区域进行定位。提取斑点区域呈现2 \times 4 mm大小的椭圆形状。接触压力选择为280 Nm, 溶剂流速200 μ L/min, 溶剂比例为体积比80/20 ACN/水含0.1%的甲酸, 通过电喷雾电离, 将提取的分析物输送至质谱仪。设置expression紧凑型质谱仪 (CMS-L) (Advion) 从m/z 100到m/z 1200进行扫描, TLC/CMS实验的采集时间可设为30秒。

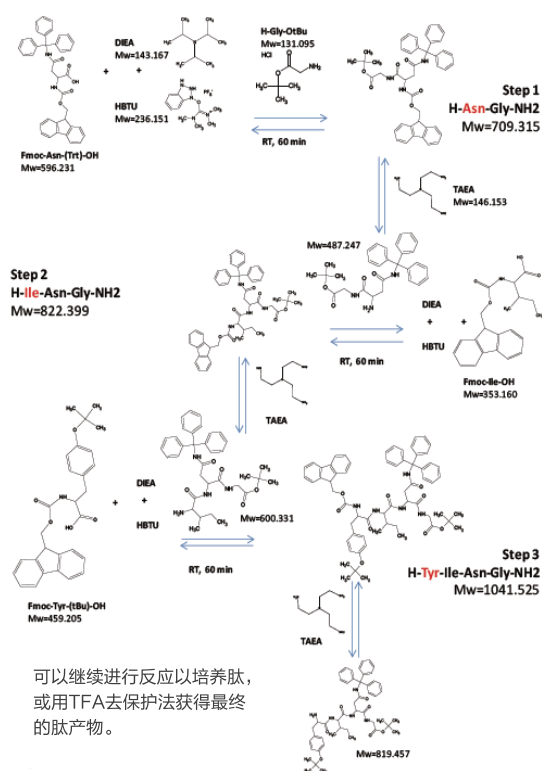


图2: 在均相阶段遵循Fmoc构建模块策略, 持续培养药用肽的反应方案 (如Carpino等人所述[1])

结果

TLC/CMS可实现直接反应监测

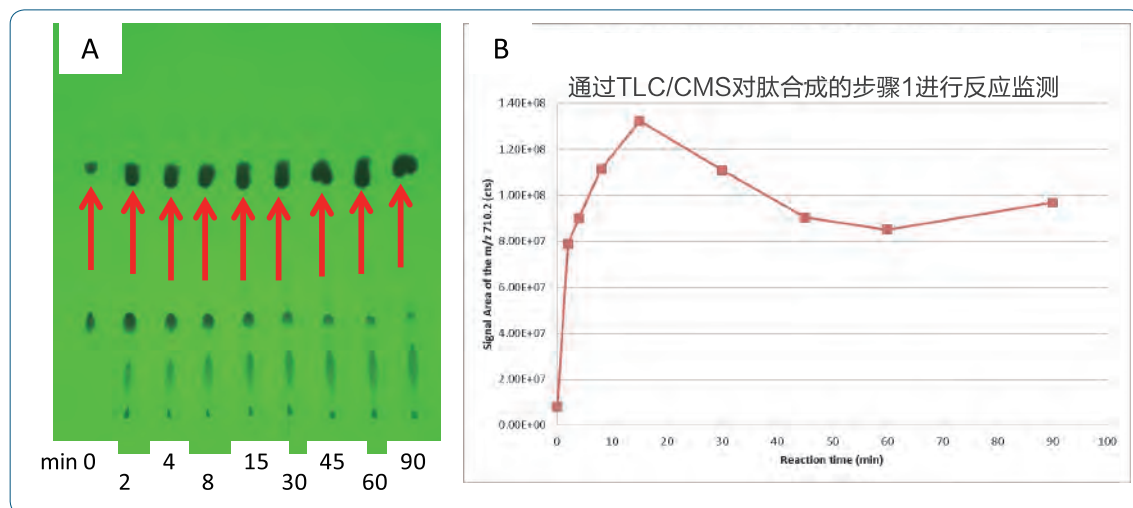


图3: 将1 μL 反应混合物置于二氧化硅TLC板上,并在反应时间结束时显影该板,从而监测肽合成的第一个反应步骤。荧光灯显示在TLC板上分离出大量化合物(A)。沿着15分钟路线,对斑点进行后续TLC/CMS分析(数据未显示,有关示例请参照图5),结果表明斑点4代表目标产物(红色箭头)。在 m/z 732.20时,受阻产物检测为 $(M+Na)^+$ 信号。各点的检测信号面积强度表明,强度-时间曲线与~20分钟时的完成反应一致,随后产物逐渐损失。相反,文献指明的反应时间为60分钟。

适用于各种化合物,包括受保护和非保护的肽

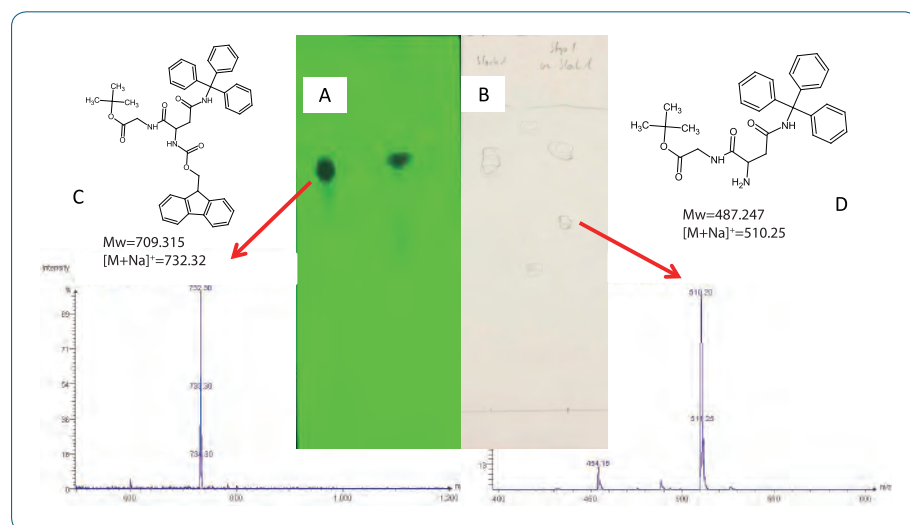


图4: 清除反应溶剂后的TLC分离显示来自反应步骤1的fmoc阻断(左)以及非阻断(右)二肽产物,(A)表示荧光响应,(B)表示经TLC采样装置提取后的薄层板。TLC/CMS分析可以保留在两种产物各自的 $(M+Na)^+$ 离子 m/z 732.21 (C)和 m/z 510.15 (D)确认产物。

通过TLC/CMS识别反应物和化学反应产物

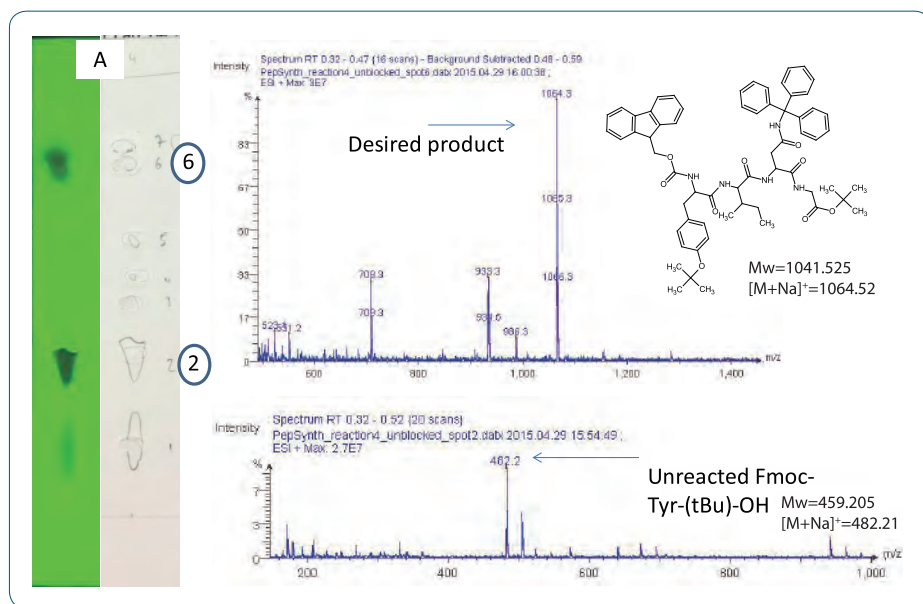


图5: TLC/CMS可以识别在硅胶TLC板上分离的复杂混合物中相关产物斑点。(A)显示在紫外光下(左)板上7个斑点以及经过TLC提取(右)之后显影的TLC板。斑点2显示反应物(下方图)的m/z预期信号,斑点6显示目标Fmoc阻断4个氨基酸的m/z信号。两种分析物经检测均为(M+Na)⁺离子。

贯穿连续液相肽合成反应多个步骤的反应过程控制

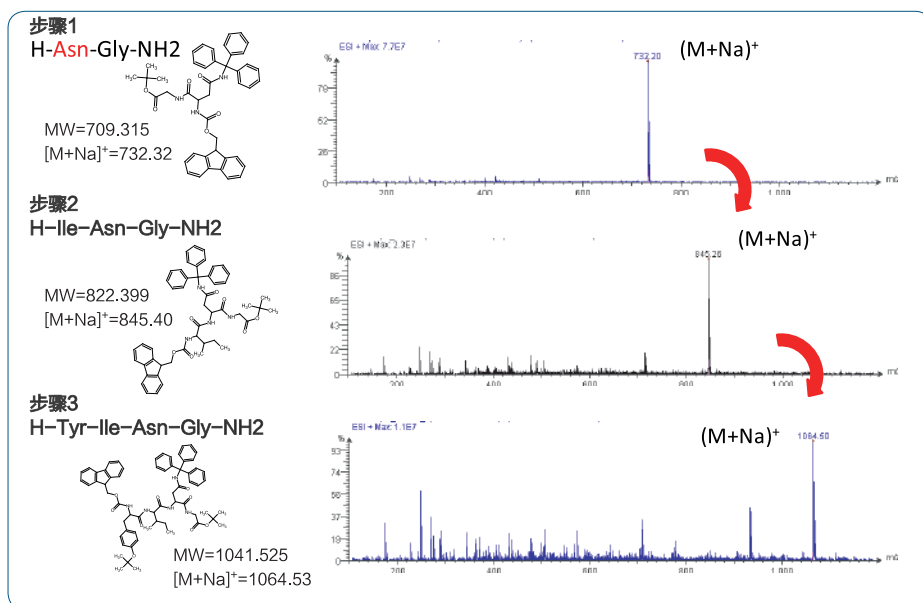


图6: 在用TLC/FIA/MS分析正在培养中的Fmoc保护肽后,确认在反应序列最初三个步骤期间产生了正确的产物。

综述

- TLC/CMS能够识别化学肽合成反应的反应物、产物和副产物。
- 可以监测到Fmoc阻断和非阻断肽以及最终4个氨基酸。
- TLC/CMS可以监测肽合成的化学反应,并表明反应确实是在15分钟后完成,而不是预期的以及文献报道的60分钟。
- TLC/CMS既可以实现灵活简便的样品制备,又能对分析物进行详尽的分析测试。对于化学合成检测来说,无疑是一个非常理想的组合。

文献和鸣谢

[1] Carpino LA, Ghassemi S, Ionescu D, Ismail M, Sadat-Aalae D, Truran GA, Mansour EME, Siwruk GA, Eynon JS and Morgan B: Rapid, continuous solution-phase peptide synthesis: Application to Peptides of pharmaceutical interest. *Organic Process Research and Development* 2003, 1(7), 28-37

我们非常感谢Synpure的LLC的Shahnaz Ghassemi在多肽合成方面提供的技术援助。

Advion

www.expressioncms.com
info@advion.com

Advion是质谱与合成解决方案的领导者。expression CMS是一种高性能、紧凑、价格合理的单四极质谱仪。其大小紧凑,适用于空间有限的实验室,可供化学家直接获取质量确认、反应监测、质量控制和纯度分析所需的结果。