

# 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。

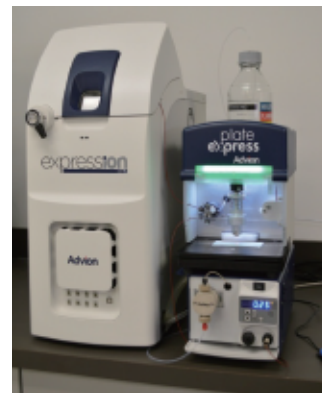


图1: expression CMS和Plate Express TLC/CMS

## 方法

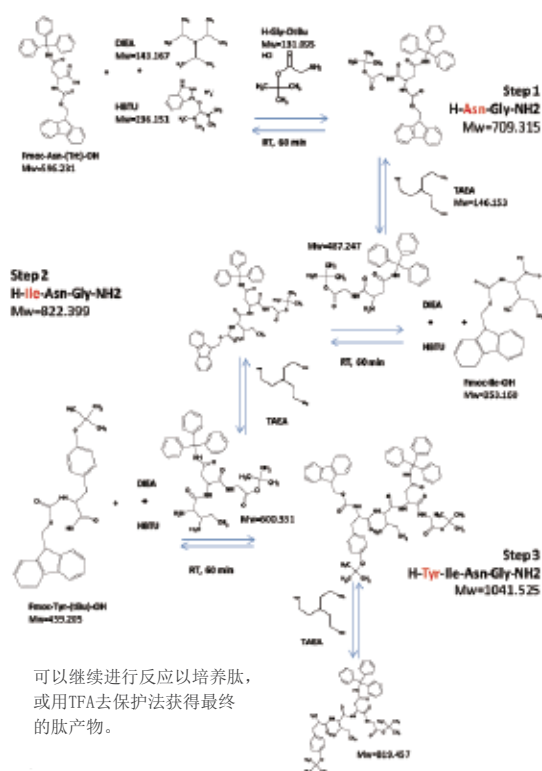
**反应过程**将 Fmoc-Asn-(Trt)-OH (1.0 mM, 600 mg) 和0-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐 (HBTU, 1.0 mM, 400 mg) 溶解在50 mL圆底烧瓶内的10 mL二氯甲烷 (DCM) 中并搅拌。加入N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 2.65 mM, 465  $\mu$ L), 激活氨基酸构建模块, 并搅拌5分钟。加入甘氨酸叔丁基酯盐酸盐 (H-Gly-OtBu, 0.65 mM, 109 mg), 在室温下开始反应, 反应时间持续1小时。

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7mL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。

反应持续, 直至达到最终的氨基酸链长度。

**TCL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  $\mu$ L 反应混合物并置于TLC板 (薄层色谱板) (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  $\mu$ L/min, 溶剂比例为体积比80/20 ACN/0.1%的甲酸水溶液, 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。



可以继续反应以培养肽, 或用TFA去保护法获得最终的肽产物。

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<sup>[1]</sup>)

## 结果

### TLC/CMS可实现直接反应监测

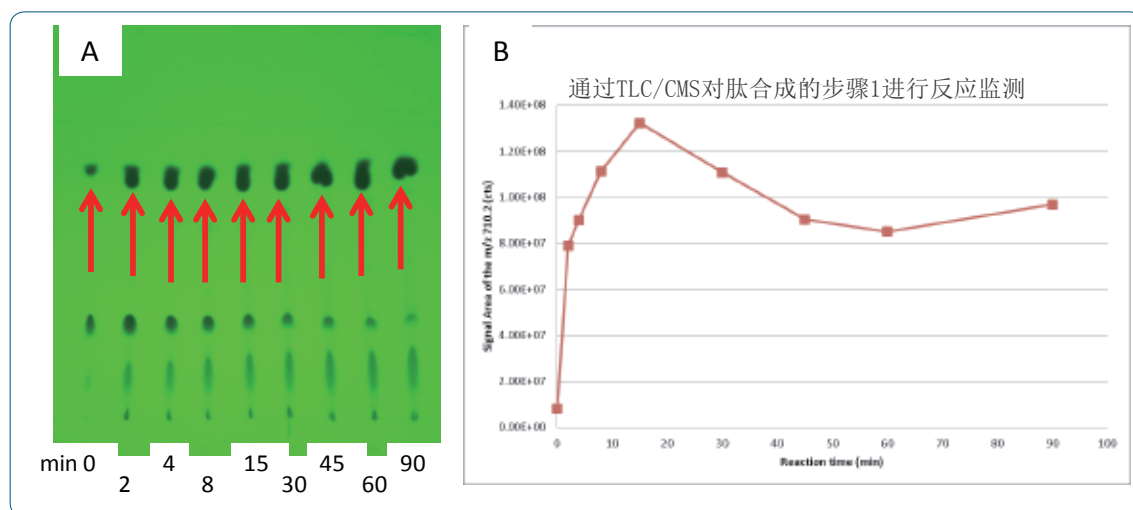


图3: 将1  $\mu\text{L}$ 反应混合物置于二氧化硅TLC板上,并在反应时间结束时显影该板,从而监测肽合成的第一个反应步骤。荧光灯显示在TLC板上分离出大量化合物(A)。沿着15分钟路线,对斑点进行后续TLC/CMS分析(数据未显示,有关示例请参照图5),结果表明斑点4代表目标产物(红色箭头)。在 $m/z$  732.20时,受阻产物检测为 $(\text{M}+\text{Na})^+$ 信号。各点的检测信号面积强度表明,强度-时间曲线与~20分钟时的完成反应一致,随后产物逐渐损失。相反,文献指明的反应时间为60分钟

### 适用于各种化合物,包括受保护和非保护的肽

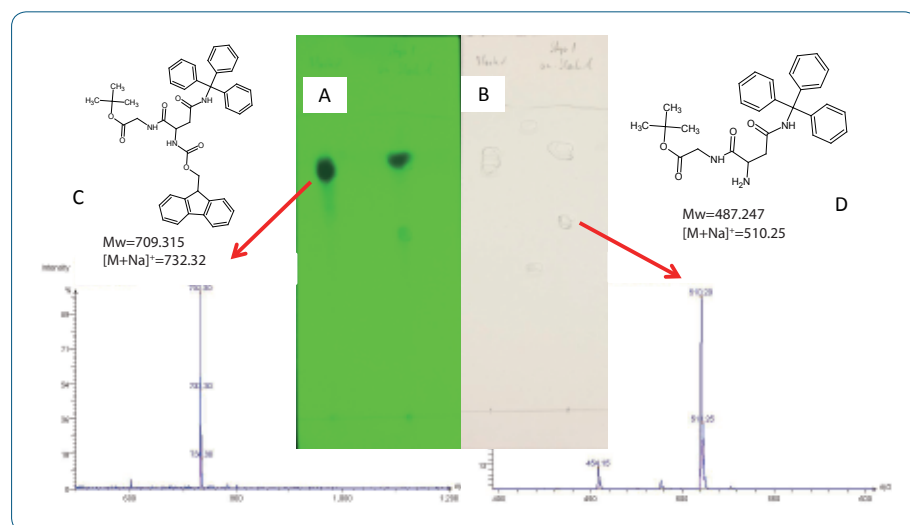


图4: 清除反应溶剂后的TLC分离显示来自反应步骤1的fmoc阻断(左)以及非阻断(右)二肽产物,(A)表示荧光响应,(B)表示经TLC采样装置提取后的薄层板。TLC/CMS分析可以保留在两种产物各自的 $(\text{M}+\text{Na})^+$ 离子 $m/z$  732.21(C)和 $m/z$  510.15(D)确认产物

## 通过TLC/CMS识别反应物和化学反应产物

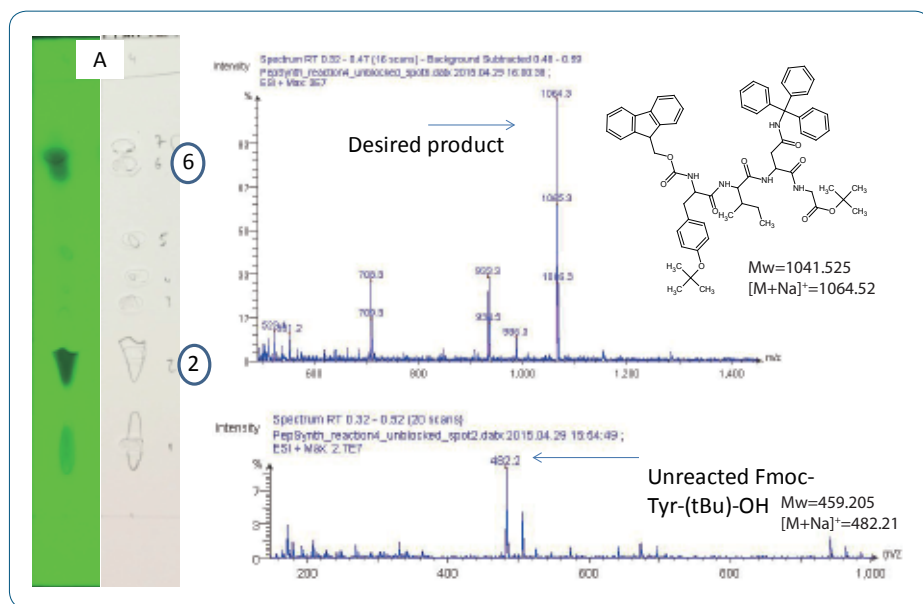


图5: TLC/CMS可以识别在TLC板上分离的复杂混合物中相关产物斑点。(A) 显示在紫外光下(左)板上7个斑点以及经过TLC提取(右)之后显影的TLC板。斑点2显示反应物(下方图)的 $m/z$ 预期信号, 斑点6显示目标Fmoc阻断4个氨基酸肽的 $m/z$ 信号。两种分析物经检测均为  $(M+Na)^+$  离子

## 贯穿连续液相肽合成反应多个步骤的反应过程控制

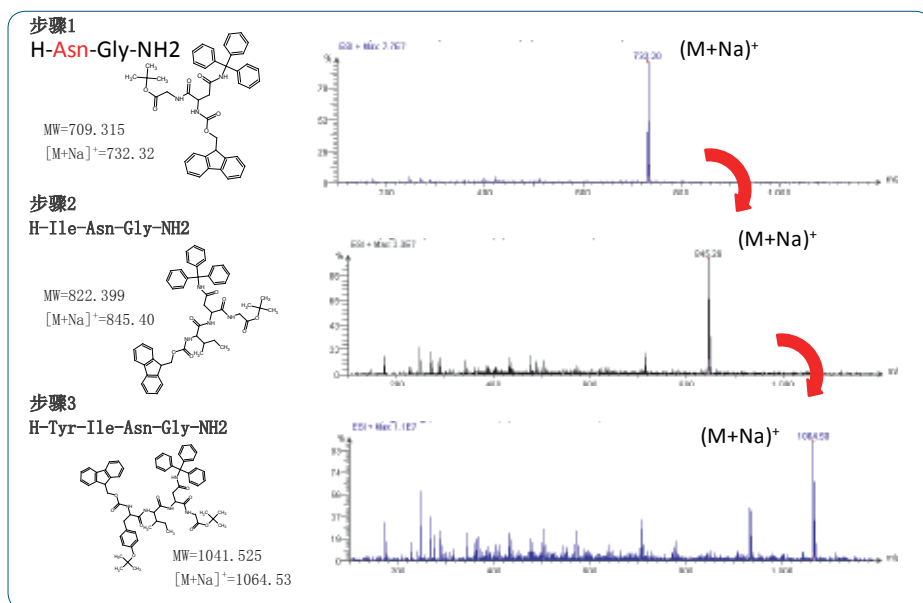


图6: 在用TLC/FIA/MS分析正在培养中的Fmoc保护肽后, 确认在反应序列最初三个步骤期间产生了正确的产物

## 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个氨基酸肽。
- TLC/CMS可以监测肽合成的化学反应, 并表明反应确实在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质谱与合成解决方案 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。