

微波照射在多肽化学合成领域的应用

杨 频 宋宇飞

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

摘 要 介绍了微波仪的原理及其在化学合成领域的应用, 论述了在多肽链的耦合过程中, 使用不同的耦合方法, 从反应时间、产品的产率等因素考虑, 对多种不同的耦合试剂在什么样的条件下使用进行了比较、分析。并将微波照射结合固相合成仪用于多肽合成这一近年来发展起来的新的研究手段作了简介。

关键词 微波照射 微波效应 偶极 固相合成仪 耦合 多肽 困难序列

Progress of Application of Microwave Irradiation in Polypeptide Synthesis

Yang Pin, Song Yufei

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The principle and effect of the microwave irradiation, and its application in chemical synthesis are introduced in this paper. The new research method combining microwave irradiation with solid-phase synthetic instrument to synthesize polypeptides is described.

Key words Microwave irradiation, Microwave effect, Dipole, Solid-phase synthetic instrument, Coupling, Polypeptides, Difficulty sequence

从 Curtius 人工合成第一个多肽到今天, 已经走过一个多世纪。在过去 20 年里, 随着多肽合成领域中分离、纯化技术的不断更新, 加上分析、检测手段的日益现代化, 大大加快了对于活性多肽的发现速度。作为药物化学的重要分支, 多肽化学已经形成并得到迅速发展。科学家大量的研究结果证实活性多肽具有很多优越性, 从天然产物中提取分离得到的活性多肽或者人工合成的多肽药物更适于人体和大自然, 这种协调和统一性, 使得对多肽化学的研究日新月异。随着学科全方位、多角度、深入性的发展态势, 在生物无机化学的领域, 我们不应该也不能忽视多肽化学在其中的位置, 而应该将这一方向融入到生物无机化学当中, 不断扩大和丰富这一领域与生物无机化学的交叉、渗透, 因为多肽药物化学本身就是药理学、化学、生物学(细胞层次、分子层次)、计算机模拟科学等领域相结合的产物。本文中, 笔者将就多肽的一个新的合成手段——微波照射结合固相合成仪器的组合装置用于合成多肽作一介绍。

国内、外将微波照射应用到化学合成领域的工作开展的较多, 这一手段已经成为化学合成领域中的一个重要分支并极大地推动了有机合成化学的发展。然而, 将微波照射与固相合成仪器合并使用, 用于专门研究多肽合成的工作可以说是近十余年才有一定的发展的, 国内这一

杨 频 男, 69 岁, 教授, 从事生物无机化学及结构无机化学的研究。*联系人: E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

2002-09-23 收稿, 2003-04-29 修回

方面的研究报道相对很少,这与仪器、设备及反应过程中的消耗花费比较昂贵有关。

1 微波的原理及微波效应

微波是指频率大于无线电波而小于红外光的电磁波,其频率范围在 300MHz~30GHz,相应的波长 1m~1cm 范围。微波较宽的频率范围使其被广泛应用于雷达、通讯等高科技领域。为了避免干扰,家庭或商业用的微波仪器多使用频率为 2.45GHz 的微波。

通常,当分子受到微波照射时,分子会尽可能使自身的旋转频率去配合改变的电磁场,并且吸收微波的能量。当分子吸收了电磁能之后将其转换为热能,使分子的温度上升。从理论上讲,微波所造成的加热效应主要和分子的极性有关。带有电偶极的分子受微波照射的影响,会改变自旋频率,吸收微波的能量并转换为热能。一般介电常数越大的物质越容易受到微波照射影响而被加热,所以水、乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺等具有偶极的溶剂受微波照射时会有加热效应的出现,而己烷、四氯化碳等不具有偶极的溶剂受微波照射时就不会产生这一效应。

大量的实验研究结果表明,微波照射可以使许多反应很快完成,在有些例子中明显地改善了目标化合物的产率。一些科学家将微波在化学反应上造成的这些影响解释为微波效应,但仍然没有一种确切的理论解释和统一的意见。所以,微波照射在合成上产生这些影响的原因及作用机制还有待于进一步阐明。

单从理论的角度考虑,当反应物在微波炉中受到照射时,频率为 2.45GHz 的微波只对具有偶极的分子有加热效应,但并不能活化特定的化学键。这说明微波照射在合成上的影响似乎是由加热效应引起的。然而从动力学的观点看,微波加热的形式和其它形式的加热方法在动力学上的影响是相同的^[1],所以有报道指出所谓特殊的微波效应不过是热效应的影响而已^[2]。也有研究指出反应速率的加快是由于微波照射下溶剂可以加热到高于沸点所造成的结果^[3]。

如果以加热效应来解释微波照射的影响,那么当直接测量溶液的温度来作理论计算时,并不能很好地解释由微波照射所造成的反应速率数千倍乃至更多的大幅度提高的实验事实。这里需要指出的是,微波照射时,分子内的实际温度并不容易测定,而且参与反应的分子的数量分布并不均匀,甚至在非均相反应时有可能产生热点^[4],所以目前还无法用热效应的理论计算来有效地解释微波照射时加快反应速率甚至改善产率的实验结果。因此,由微波照射在化学反应上造成的影响不仅与热效应有关,是否还存在其它特殊的微波效应,仍然是一个非常值得探索 and 关注的研究课题。

2 微波照射在化学合成上的应用

微波炉在日常生活中被广泛用于食品的煮食及加热,这是因为微波炉加热省时、便利。从实验科学的思维考虑这个问题,是否可以利用微波炉所产生的这些表面的现象及其内在的一些功能并将其应用在科学研究上呢?这一问题引起了科学家们的兴趣。早在 1975 年就有应用微波照射来加速样品溶解的报道^[5],而现在微波加热更被广泛地应用到分析样品的制备^[6]、聚合物技术^[7]、烃类裂解^[8]等方面。当然更多的例子是有机合成上的应用^[9]。

最早报道微波照射在有机合成上的应用是在 1986 年分别由两个研究小组独立完成的研究结果^[10,11],随后大量相关研究被发表见刊。总结这些研究结果表明,经由微波照射可以大幅度提

升许多反应的反应速率,大大缩短反应时间,产率也有所提高。目前研究涉及的反应包括 Diels-Alder 反应、Claisen 重排、氧化反应、酯化反应、自由基反应、水解反应、亲核取代反应等液相反应。

此外,微波照射应用在固相合成反应和酶催化的反应上,也可以很好地促进反应的进行^[12,13]。

3 多肽合成中的困难序列

自从 Merrifield 发明固相合成仪之后,近些年来新的多肽序列不断被分离、提纯,使得多肽合成发生了巨大的变革。科学家可以利用仪器自动、准确地完成多肽的合成,包括很多以前不敢想象的较长的、较难的序列,此时都得到了很好的解决。然而这一方法也存在一些问题,最主要的是胺基端的保护基去保护不完全及耦合反应不完全^[14]。这个问题是和多肽的结构^[15, 16]以及随着合成过程中多肽链的延长而使得溶解度降低^[17]两个因素有关。存在这类问题的氨基酸序列被称之为“困难序列”。

基于困难序列与氨基酸的组成及序列有关,多肽领域的科学家利用一些特殊的计算机软件结合量子化学方法、分子模拟手段从理论上预测多肽链合成上的情况。例如, Milton 等^[15]提出了“与多肽键形成任意回旋结构有关的参数”; Narita 等^[18]发展出来一些“多肽链的构型参数”; Van Woerkon 等^[19]分析了“数百次耦合反应的实验数据后整理出的经验结论”; Krchnak 等^[16]提出“与氨基酸聚集能力有关的凝集参数”。在大量理论和实验结果的基础上,如何解决困难序列的合成成为问题的焦点,相应产生了如下的一些解决方式:(1)加热^[20];(2)延长反应时间,增加耦合的次数;(3)改变合成过程中使用的溶剂,尽可能增加多肽的溶解度^[21];(4)加入溴化锂、过氯酸钠等,依靠改变溶液的极性来影响溶解度;(5)使用新的氨基酸衍生物,例如将赖氨酸支链上的 Boc 保护基团换为 Trifluoroacetyl 保护基^[22];(6)使用 Fmoc-*N*-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)的氨基酸衍生物来合成^[23],希望由不同的衍生物能改变多肽的溶解度或减少多肽链凝集现象的发生;(7)使用新的耦合试剂,例如, PyBrOP(Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate)^[24]等以增加耦合反应时的效率等一些方法。

尽管提出了许多改善多肽合成的途径,但大多数的方法都有一定的局限性。比如,增加耦合次数需要消耗大量的氨基酸;使用新的耦合试剂通常是相当昂贵的;改变溶剂或者加入由液相序列高的阴离子组成的盐则效果相对有限;而使用不同的氨基酸衍生物合成肽链只适用于特定的氨基酸序列。因此,对困难序列的合成的解决方法仍然是在多肽合成领域中所瞩目的一个方向。

正是在这样的背景下,微波照射仪器与固相合成仪器的连接装置被用于多肽合成领域以解决很多困难序列的合成工作。在实验过程中发现,这一方法对于常规序列的合成也非常有利,既省时又减少了繁重的操作过程,并提高了产率。所以,这一新设计的仪器对常规多肽和困难序列的多肽链具有明显的合成上的优势。

4 微波照射在多肽合成中的应用

固相合成仪应用于合成多肽是多肽合成领域的一个变革性的里程碑。也正是由于它具备比液相合成多肽法有更多的优越性,所以广大的研究人员才尽可能的使用这一方法从事多肽研究。

首先, 固相合成仪的出现使得多肽合成反应过程中省去了很多繁冗的纯化步骤, 这是仪器自动化的结果; 其次, 在使用固相合成多肽时, 仪器的自动化也使得合成操作大大简化, 并可以很准确地检测反应是否完全, 从而导致产率大大提高。

然而, 在使用固相合成仪器合成多肽时, 自动延伸一个氨基酸仍然需要 2h 或更长的反应时间。尤其对一些难以合成的序列而言, 在通常条件下, 合成会有相当难度且反应时间长、产率也不一定理想。如何解决多肽合成的耗时、低产率等问题? 正是在这样的研究背景下, 微波照射与固相合成仪器被联合使用, 这就针对目前面临的一些多肽困难序列及其它化学合成提供了一种解决办法, 实验结果证实这一手段是可行的^[20]。

Wang 等^[25]的研究指出, 在使用微波照射的条件下, 使用固相合成仪器合成目标多肽, 一方面使耦合反应的时间缩短在 6min 内(常规的液相合成这一多肽大约需要 3h); 另一方面耦合效率也大大提高(比液相合成法大约提高了 16%)。Tam 等^[26]的研究报道的结果证实, 在耦合反应的步骤中, 温度在 50°C 或者更高时, 有助于一些困难序列的耦合。

目前, 微波照射应用在多肽的研究, 比如在不同的序列、在耦合的反应条件(温度、反应时间、耦合试剂等方面)上, 都有待于进一步的深入研究。这对于从事多肽合成(包括多肽提取、分离、纯化)、多肽药物研究、天然产物(包括活性多肽)如何有效、高产地制备等生物无机和生物有机的研究者都是非常值得关注的研究方向, 而且在方法上也仍然有良好的开发、应用前景。

在上述的一些研究背景和条件下, 将固相合成仪与微波炉连接成一具有微波照射功能的自动多肽合成系统, 加入紫外仪器, 作为多肽耦合效率的检测系统^[27]。这样的设计一方面利用了微波照射的加热效应或者说特殊的微波效应, 同时又结合了固相合成仪的方便性, 配合紫外仪检测耦合效率, 不但保持了合成仪的自动化的特点, 且能减少耦合反应时间, 并可能解决一些困难序列的耦合不完全的现象, 从而提高多肽合成的产率。这样就建立了一套方便、快速合成多肽的仪器。

由于固相合成仪器没有发射微波的装置, 所以需要外接一台微波炉, 如果合成仪本身有检测系统, 则不必在加紫外检测装置; 如果没有, 则在合成仪的废液排出的管路中加入紫外检测器, 用于检测多肽合成中去保护步骤中切下的保护基团的浓度, 以此作为计算耦合效率的依据。在这一连接过程中, 需要注意的是, 首先, 微波炉与合成仪连接时的空隙要尽可能密封, 以防止微波照射时能量的外漏。合成仪器与微波连接的线路要尽量短, 否则线路太长会导致固相合成仪没有足够的压力将试剂压入反应瓶或将反应瓶中的试剂排出。其次, 要用石英制的反应瓶进行反应。再有, 如果要接紫外检测体系, 可在合成仪的废液排出管路先接一圆底烧瓶, 然后利用虹吸的原理使排出的溶液经过紫外仪器, 从而可以检测耦合效率。同时接圆底烧瓶可将和溶液混合的气体排出, 避免在通过紫外仪器时存在气泡的干扰。

耦合效率的检测有定性和定量两种方式。定性的可以用 Kaiser test, 定量的可以用检测排出液体的紫外吸收值来确定耦合反应的完成比例。

Wang 和 Chen^[25]领导的研究小组多年从事这一方面的研究, 他们使用自制的微波照射结合固相合成仪器的组合装置, 研究对多肽产物合成的影响, 结果表明, 对于常规的多肽链, 使用微波与固相合成仪的组合装置后, 耦合产率为 100%, 反应时间为 5min(常规需要 1~2h)。对于

合成的一些困难序列, 每一步的耦合效率都在 90%左右, 而常规方法效率只有 53%, 60%。他们指出, 当微波照射对耦合效率改善的程度较差时, 可以配合改变耦合试剂等方法, 提高耦合效率, 甚至可以改变微波照射的次数, 以提高耦合产率。

大量的实验结果总结表明, 当微波照射应用于非困难序列时, 在不影响耦合效率及产物的纯度的前提下, 可以缩短耦合反应的时间。当应用于困难序列时, 不但可以缩短反应时间, 而且对于耦合效率及产品的纯度都有所改善。当微波照射应用于含 *N*-甲基的多肽链的合成时, 使用较好的耦合试剂仍然不能改善耦合效率, 以微波仪进行重复多次照射, 可以发现耦合效率及产物都有所改善。

6 结语

将微波引入固相合成仪, 联合使用具有方便、快速、简单而高效的优点。大量的研究表明这样的结合是卓有成效的。对实验数据进行定量研究并动态监测反应的各个环节从而阐明微波效应的作用机制的研究、开发这样高精尖的仪器提供给广大科技人员的应用项目, 是我国今后非常值得投入的两个方向, 尤其是后者在化学合成领域以及由此产生的在药物开发、生物工程、药检等重要领域的辐射效应及推动作用将不可限量。然而需要注意的是, 虽然微波照射应用于化学方面的研究报道近年来陆续增多^[28,29], 但是其在多肽合成领域的应用及报道相对较少, 尤其是国内在这一分支领域的研究报道相当少。之所以出现这样的局面不仅是由于国内从事这方面的科研力量较少, 也与我国的支持力度不足、各个研究单位力量分散及研究成果无法实现深入突破有关。

国内上海有机所^[30~32]、北京大学、清华大学^[33]、南开大学、兰州大学等一群研究者在多肽合成领域做了不懈努力。上海有机所的徐杰诚教授领导的课题组在生物活性肽, 如 P 物质(SP) 促黄体激素释放激素(LHRH)、促眠肽(DSIP)、胞壁酰肽(MDP)、血管紧张素抑制剂(ACEI)等的合成和结构与活性关系的研究以及新型高效多肽缩合剂的合成等方面取得重要研究成果。北京大学叶蕴华教授领导的课题组^[34], 合成并得到了耦合效率较高的多种耦合试剂, 在与常规的耦合剂相比, 具有很多优越性。同时, 该课题组也从许多天然产物中提取分离并纯化了许多多肽产物, 并从活性肽的角度对产品进行了详细的性质研究。笔者课题组近年来一直开展了多肽抗癌药物设计^[35~40], 先后选择多肽链作为有效的抗癌药物 DMQ-MA 的载体, 将多肽链与药物耦合得到复合物, 并研究了药物的作用过程和作用机理, 取得了富有成效的结果。在多肽链的耦合过程中, 尝试了使用不同的耦合方法, 从反应时间、产品的产率等因素考虑, 对几种不同的耦合试剂在什么样的条件下使用进行了比较、分析。兰州大学王锐教授的课题组也在活性多肽及其受体的相互作用方面做了相当深入的研究^[41]。

多肽药物以其与人体的良好相容性而具有优势。它在体内如何转运、依赖什么机制发挥药效, 以及多肽药物结构与功能之间的关系有待深入研究。根据外源性小分子在体内转运、吸收及分布以及它与生物大分子相互作用的状态, 可以设计出选择性高、毒副作用小的靶向药物。希望在今后的无机和有机药物的发展中, 更加重视多肽药物领域, 并结合已有的基础, 使多肽化学有更广阔的发展空间。

参考文献

- [1] K D Raner, C R Strauss, F Vyskoc et al. *J. Org. Chem.*, 1993, 58: 950.
[2] J Berlan, P Giboreau, S Lefeuvre et al. *Tetra. Lett.*, 1991, 32: 2363.
[3] R A Abramovitch, A Bulman. *Syn. Lett.*, 1992: 795.
[4] T D Coperlan, E M Wondrak, J Tozser et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 169: 310.
[5] A Abusamra, J S Morris, S R Koirtiyohann. *Anal. Chem.*, 1975, 47: 1475.
[6] K L Mahan, T A Foderaro, T L Garza et al. *Anal. Chem.*, 1987, 59: 938.
[7] M Murray, D Charlesworth, L Swire et al. *Chem. Soc. Faraday. Trans.*, 1994, 90: 1990.
[8] M Y Tse, M C Depew, J K Wan. *Res. Chem. Inter.*, 1990, 13: 221.
[9] S Caddick. *Tetrahedron.*, 1995, 51: 10403.
[10] R N Gedye, F E Smith, K C Westaway et al. *Tetra. Lett.*, 1986, 26: 279.
[11] R J Giguere, T L Bray, S M Duncan et al. *Tetra. Lett.*, 1986, 27: 4945.
[12] J Z Carrillo-Munoz, D Bouvet, E Guibe-Jampel et al. *J. Org. Chem.*, 1996, 61: 7746.
[13] M C Parker, T Besson, S Lamare et al. *Tetra. Lett.*, 1996, 37: 8383.
[14] S B H Kent. *Annu. Rev. Biochem.*, 1988, 57: 957.
[15] R C L Milton, S C F Miton, P A Adams. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112: 6039.
[16] V Krchnak, Z Flegelova, J Vagner. *Int. Pep. Pro. Res.*, 1993, 42: 450.
[17] R C Sheppard. in *Peptides*. Ed. By H Nesvadba. North Holland, Amsterdam, Netherlands.
[18] M Narita, Y Kojima. *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 1984, 24: 580.
[19] W J Van-Workom, J W Van-Nispen. *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 1991, 38: 300.
[20] J P Tam. *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 1987, 29: 421.
[21] M Beyermann, M Bienert. *Tetra. Lett.*, 1992, 33: 3745.
[22] E Atherton, V Woolley, R Csheppard. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1980: 971.
[23] W Zeng, P O Regamey, K Rose et al. *Int. J. Pep. Pro. Res.*, 1997, 49: 273.
[24] J Coste, M N Dufour, A Pantaloni et al. *Tetra. Lett.*, 1990, 31: 669.
[25] H M Yu, S T Chen, K T Wang. *J. Org. Chem.*, 1992, 57: 1781.
[26] J P Tam. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, 1987, 29: 421.
[27] P H Tseng. Master Thesis., July, 1998.
[28] X Wang, Z Li, Y Da. *Syn. Comm.*, 2001, 31: 19.
[29] M Gupta, S Paul, R Gupta. *Syn. Comm.*, 2001, 31: 53.
[30] P Li, J C Xu. *Chin. J. Chem.*, 2000, 18: 456.
[31] P Li, J C Xu. *Tetra.Lett.*, 2000, 41: 721.
[32] P Li, J C Xu. *J. Pet. Res.*, 2000, 55: 110.
[33] R Wang, N Wang, Y F Zhao. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2001, 22: 598.
[34] A X Yan, G L Tian, Y H Ye. *Chin. J. Org. Chem.*, 2000, 20: 299.
[35] Y F Song, P Yang, L Sheh. *Chinese Chemical letter.*, 2000, 11(8): 667.
[36] Y F Song, P Yang. *Preparative Biochemistry and Biotechnology.*, 2001, 31: 4.
[37] Y F Song, P Yang. *Chinese Chemical Letter.*, 2001, 12(8): 697.
[38] Y F Song, P Yang. *Aus. J. Chem.*, 2001, 54(4): 253.
[39] P Yang, Y F Song. *Progress of Chemistry.*, 2000, 12: 32.
[40] P Yang, Y F Song. *Preparative Biochemisry & Biotechnology*, 2002, 32(4):381.
[41] J M Ni, R Wang, Z P Jia. *Chem. J. Chin. Univ.*, 1998, 19: 243.