

· 研究简报 ·

## 玻璃珠表面修饰氨基的新型固相合成载体的制备

王洁颖<sup>1,2</sup>, 张首国<sup>2</sup>, 温晓雪<sup>2</sup>, 彭 涛<sup>2</sup>, 颜海燕<sup>2</sup>, 王 林<sup>2</sup>

(1. 北京工业大学 生命科学与生物工程学院, 北京 100022;

2. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 以玻璃珠为基质, 通过  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  处理, 完成表面羟基化修饰; 再采用氨丙基三乙氧基硅烷的甲苯溶液处理, 完成硅烷氨基化修饰羟基制得表面功能基团为氨基的新型固相合成载体(1), 其氨基含量为  $8.9 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。1 与连接分子 4-[4-(羟甲基)苯氧基]-甲基苯甲酸经过氨基与羧基缩合反应制得带连接臂的固相载体; 再与 Fmoc 保护的甘氨酸反应和脱保护, 成功地键合甘氨酸, 充分证明 1 作为新型载体的可行性。

**关键词:** 玻璃珠; 硅烷氨基化; 固相合成载体; 制备

中图分类号: O621.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-1511(2013)01-0066-04

## Preparation of a New Support for Solid Phase Synthesis of Glass Bead Surface with Amino

WANG Jie-ying<sup>1,2</sup>, Zhang Shou-guo<sup>2</sup>, WEN Xiao-xue<sup>2</sup>,  
PENG Tao<sup>2</sup>, YAN Hai-yan<sup>2</sup>, WANG Lin<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** A new support(1) for solid phase synthesis of glass beads surface with amino was prepared from glass beads by treating in  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  to fulfill surface hydroxylation, then in 3-aminopropyltriethoxysilane-toluene solution to accomplish aminosilanization modification. Amino-density of 1 was  $8.9 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ . The support with arms was obtained by condensation reaction between amino(in 1) and carboxyl of 4-[4-(hydroxymethyl) phenoxy] methyl benzoic acid(linked molecular), then reacted with glycine protected by Fmoc, and deprotected to successful attached glycine. The results showed that 1 was a new kind of support for solid phase synthesis.

**Keywords:** glass beads; aminosilanization; support for solid phase synthesis; preparation

固相合成自 20 世纪 60 年代问世以来, 经过半个多世纪的发展已经由最初的肽合成扩展到各类有机小分子及复杂的天然产物的合成, 并以其独特优势带动了组合化学技术的兴起<sup>[1]</sup>。固相

合成需要固相载体及连接固相和反应物的连接分子, 正确选择载体和连接分子决定着固相合成的成功<sup>[2]</sup>。固相合成的载体多以聚苯乙烯和聚丙烯酰胺为基质, 主要用于合成多肽<sup>[3]</sup>。但是, 这

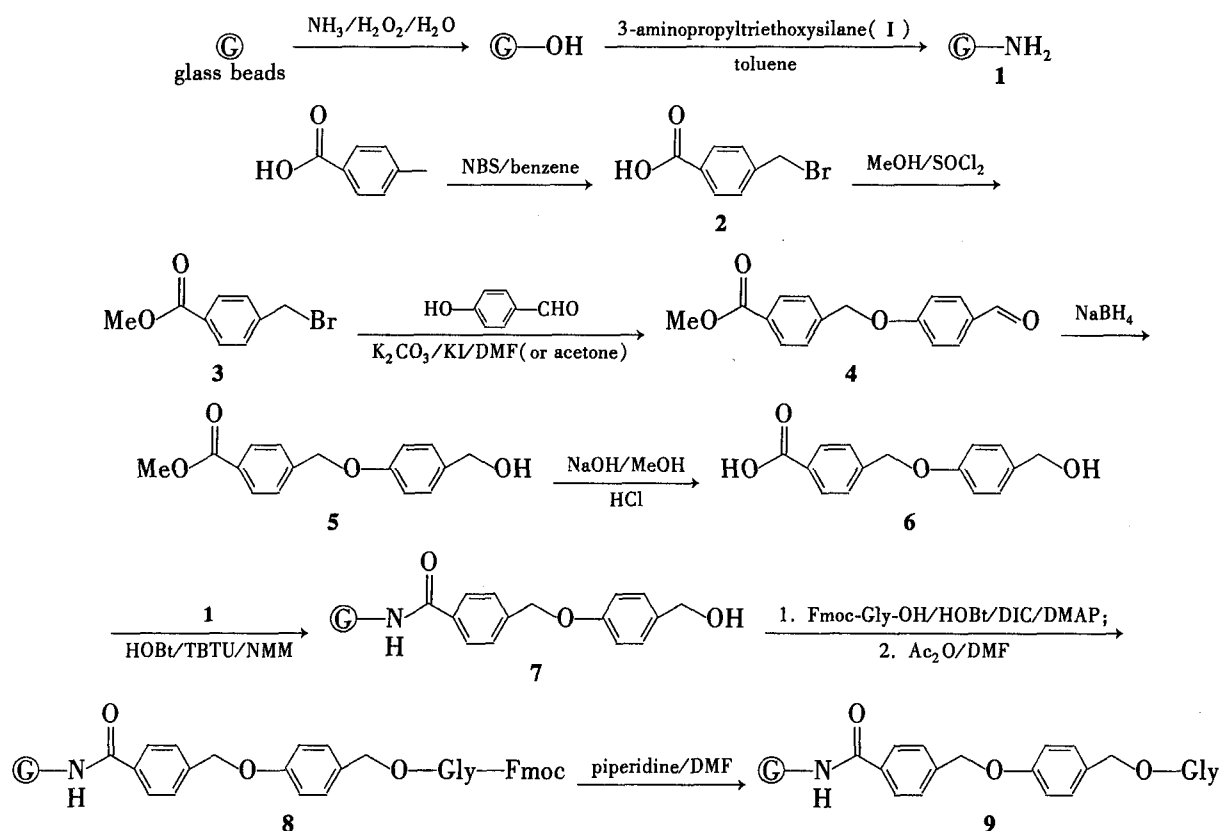
收稿日期: 2012-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072531, 30770655, 30472081, 21102176)

作者简介: 王洁颖(1987-), 女, 汉族, 河北定州人, 硕士研究生, 主要从事药物化学的研究。Tel. 010-66932239, E-mail:

wangjieying111@sina.com

通信联系人: 王林, 教授, 博士生导师, Tel. 010-66932239, E-mail: wanglin07@sina.com



Scheme 1

两类高聚物都缺乏结构上的刚性,在多种溶剂及反应物中都有一定的溶解度。于是,人们研究开发出了一系列新型固相载体以适应各种反应的需要,如可控孔度玻璃(CPG)<sup>[4]</sup>。其他用于固相有机合成载体的材料还有滤纸、塑料棒等,而 CPG 一般适用于寡核酸的合成。玻璃是一种价廉易得的材料,只需将其加工成特定粒度,加以修饰即可进行固相载体的应用。其优点是具有一定的化学稳定性,基本上不溶于有机溶剂,具有一定的机械强度,良好的抗挤压和抗研磨性能。最大的优点是来源广泛,价格低廉,而这些是高聚物和其他的材料所不具备的。因此,开发以玻璃珠为基质的载体进行固相合成具有一定的创新和探索意义。

随着以固相为支撑的蛋白芯片和生物传感器的发展,蛋白固定化的需求迅速增加。蛋白固定化在很大程度上依赖于基质表面的修饰<sup>[5]</sup>。由于玻璃能够耐高温和浸泡,可以负载微量样品并保持较低声噪,对于玻璃表面的修饰研究日渐深入<sup>[6]</sup>。其中,硅烷氨化是可以引入多种功能基团的最常用的修饰方法<sup>[7]</sup>。

以与 CPG 成分相同的玻璃珠(●)为基质,通过  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  处理,完成表面羟基化修饰;

再采用氨丙基三乙氧基硅烷(1)的甲苯溶液处理,完成硅烷氨基化修饰羟基制得表面功能基团为氨基的新型固相合成载体(1, Scheme 1)。用对硝基苯甲醛法<sup>[8]</sup>检测,1 的氨基含量为  $8.9 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1 与连接分子 4-[4-(羟甲基)苯氧基]-甲基苯甲酸(6)经过氨基与羧基缩合反应制得带连接臂的玻璃珠固相载体(7);7 与 Fmoc 保护的甘氨酸反应,再脱保护,成功地键合甘氨酸,充分证明 1 作为新型载体的可行性。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

RY-1 型熔点仪(温度计未经校正);岛津 UV-2501PC 型紫外分光光度计;日本电子 JNM-ECA-400 型超导核磁共振仪(DMSO- $d_6$  为溶剂,TMS 为内标)。

玻璃珠(150 目~200 目),北京天历创玻璃有限公司;其余所用试剂均为市售分析纯。

### 1.2 1 的制备<sup>[9,10]</sup>

在烧杯中加入纯净水 300 mL 和玻璃珠 30 g,

于 100 °C 充分搅拌 20 min; 抽滤, 玻璃珠依次在乙醇 (75 mL) 中于 50 °C, 二氯甲烷 (75 mL) 中于 35 °C 超声洗涤各 2 min; 置反应溶液 [175 mL,  $V(25\% \text{NH}_3) : V(30\% \text{H}_2\text{O}_2) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1 : 5$ ] 中搅拌下于 70 °C 反应 30 min。用大量水洗涤至中性, 置稀盐酸 105 mL [ $V(37\% \text{HCl}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 6$ ] 中搅拌 30 min; 用大量水洗涤至中性, 依次用甲醇、甲醇/甲苯 [ $V : V = 1 : 1$ ], 甲苯超声洗涤各 3 min, 真空干燥过夜制得表面羟基化的玻璃珠。

在烧杯中加入 **1** 3 mL 的甲苯 (300 mL) 溶液和表面羟基化的玻璃珠, 于室温搅拌 30 min。依次用甲醇、甲醇/甲苯、甲苯超声洗涤各 3 min, 于 120 °C 真空干燥 30 min, 缓慢降至室温制得 **1**, 真空保存备用。

### 1.3 连接分子 **6** 的制备

在反应瓶中加入对甲基苯甲酸 13.6 g (100 mmol) 的苯 (100 mL) 溶液, 搅拌下回流 (80 °C) 30 min; 加入 NBS (*N*-溴代丁二酰亚胺) 17.8 g (100 mmol), 过氧苯甲酰 0.2 g, 回流反应 24 h。蒸除溶剂, 残余物用沸水充分混悬, 抽滤, 滤饼用大量沸水洗涤, 甲醇重结晶得白色晶体对溴甲基苯甲酸 (**2**), 产率 57.9%, m. p. 233 °C ~ 235 °C。

在反应瓶中加入 **2** 2.15 g (10 mmol) 的无水甲醇 (60 mL) 溶液, 冰盐浴冷却, 搅拌下滴加氯化亚砷 2.06 g (17 mmol), 滴毕, 于室温反应过夜。蒸除溶剂, 残余物溶于乙酸乙酯, 用去离子水洗涤 3 次, 蒸除溶剂后经柱层析 [梯度洗脱剂: A = V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 12 : 1 ~ 10 : 1] 分离得白色固体对溴甲基苯甲酸甲酯 (**3**) 1.87 g, 产率 81.5%, m. p. 47 °C ~ 49 °C;  $^1\text{H NMR} (\text{CDCl}_3) \delta$ : 3.92 (s, 3H), 4.55 (s, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.02 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H)。

在反应瓶中加入对羟基苯甲醛 1.22 g (10 mmol) 的丙酮 (30 mL) 溶液和碳酸钾 1.38 g (10 mmol), 搅拌下回流 (60 °C) 反应 5 min; 缓慢滴加 **3** 2.1 g (9.17 mmol) 的丙酮 (15 mL) 溶液, 滴毕, 加入碘化钾 0.13 g, 回流反应 7 h。过滤, 滤液蒸干后用乙酸乙酯溶解, 去离子水洗涤, 蒸除溶剂后经柱层析 (梯度洗脱剂: A = 12 : 1 ~ 8 : 1) 分离得白色固体 4-[4-(甲酰基) 苯氧基] 甲基苯甲酸甲酯 (**4**), 产率 69.7%;  $^1\text{H NMR} \delta$ : 3.87 (s, 3H), 5.35 (s, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.62

(d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 9.89 (s, 1H)。

冰盐浴冷却, 在反应瓶中依次加入  $\text{NaBH}_4$  0.15 g (4 mmol) 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$  溶液 8 mL, 搅拌使其溶解, 加入 **4** 0.54 g (2 mmol) 的甲醇 (15 mL) 溶液, 反应 6 h。用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸调至 pH 1, 析出沉淀, 过滤, 滤饼烘干得白色固体 4-[4-(羟甲基) 苯氧基] 甲基苯甲酸甲酯 (**5**), 产率 98.7%。

在反应瓶中依次加入 **5** 0.54 g (2 mmol) 的甲醇 (15 mL) 溶液和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$  溶液 10 mL, 搅拌下回流 (90 °C) 反应 2 h。蒸除溶剂, 用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸调至 pH 2, 析出沉淀, 抽滤, 滤饼烘干得白色固体 **6** 0.39 g, 产率 74.8%, m. p. 212 °C ~ 214 °C;  $^1\text{H NMR} \delta$ : 4.41 (d, 2H), 5.06 (t, 1H), 5.19 (s, 2H), 6.97 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.55 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 12.98 (s, 1H)。

### 1.4 甘氨酸在 **1** 上的键合

在反应瓶中加入 **6** 0.26 g (1 mmol) 和混合溶剂 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10 mL + DMF 2 mL), 搅拌使其溶解, 依次加入 HOBt (1-羟基苯并三唑) 0.15 g (1.1 mmol), NMM (*N*-甲基吗啉) 0.30 g (3 mmol), TB-TU (*O*-苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸) 0.32 g (1 mmol), 充分搅拌 15 min 后加入 **1** 22.5 g (氨基含量 0.2 mmol), 搅拌下于室温反应 2 h (茚三酮检测玻璃珠不再显色)。抽滤, 玻璃珠依次用二氯甲烷、甲醇、乙醚洗涤, 烘干得 **7**。

在反应瓶中加入 Fmoc 保护的甘氨酸 0.30 g (1 mmol) 和混合溶剂 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10 mL + DMF 2 mL), 搅拌使其溶解, 依次加入 HOBt 0.15 g (1.1 mmol), DIC (*N,N*-二异丙基碳二亚胺) 0.13 g (1 mmol), 充分搅拌后加入 **7** 和少量 DMAP (4-二甲氨基吡啶), 于室温反应 18 h。抽滤, 玻璃珠依次用二氯甲烷、甲醇、乙醚洗涤; 置混合溶剂 [10 mL,  $V(\text{醋酐}) : V(\text{DMF}) = 1 : 4$ ] 中, 搅拌下反应 1 h。抽滤, 玻璃珠依次用二氯甲烷、甲醇、乙醚洗涤, 烘干得 **7** 连接 Fmoc 保护甘氨酸 (**8**)。

在反应瓶中加入 **8** 和混合溶剂 30 mL [ $V(\text{哌啶}) : V(\text{DMF}) = 1 : 4$ ], 搅拌下于室温反应 4 h (茚三酮检测玻璃珠不再显色)。依次用甲醇、二氯甲烷、乙醚洗涤, 烘干得 **7** 连接甘氨酸 (**9**)。

## 2 结果与讨论

按文献<sup>[8]</sup>方法测得 **1** 的氨基含量为  $8.9 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。赵剑英等<sup>[11]</sup>在测定不同硅烷氨化试剂修饰玻璃表面后,测定的单层膜氨基密度约为  $2.1 \times 10^{20} \text{ 个} \cdot \text{m}^{-2}$ 。**1** 的氨基密度为  $2.2 \times 10^{20} \text{ 个} \cdot \text{m}^{-2}$ ,与其它研究结果基本相当。

在 **1** 上连接侧链及氨基酸需要三步才能完成,中间步骤无法准确判断产率。脱去甘氨酸 Fmoc 保护后测定 **9** 的氨基含量为  $4.1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,由此计算产率为 46.2%,实为三步的总产率,因此可以推断出每步平均产率为 77.3%。

## 3 结论

**1** 的表面功能基团为氨基,可以与多种基团反应,因此可连接不同基团,从而制备所需要的连接臂,满足不同的合成需求。低负载量的 **1** 可以适用于高分子量化化合物的固相合成。

实验中采用的侧链类似于 wang 树脂侧链,氨基酸采用的是 Fmoc 保护策略。同样氨基酸也可以采用 Boc 保护策略,而侧链可以采用类似于 Merrifield 的侧链。在合成寡核酸时一般需要将 CPG 进一步衍生出氨基和引出合适的连接臂以便连接第一个核苷<sup>[12]</sup>。因此在玻璃珠进行氨基化之后,可以引入合适的连接臂,然后进行寡核酸的制备。

## 参考文献

- [1] 王德心. 固相有机合成[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [2] Zhang Z G, Cai H B, Bai L, *et al.* A comparison between the yield of the attachment of Boc-AA-O<sup>-</sup>Cs<sup>+</sup> to Merrifield resin and Fmoc-AA-OH to wang resin[J]. Chinese J Org Chem, 2000, **20**(3): 419.
- [3] Guillier F, Orain D, Bradley M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry[J]. Chemical Reviews, 2000, **100**(6): 2091–2158.
- [4] Köster H, Stumpe A, Wolter T. Polymer support oligonucleotide synthesis 13: Rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach[J]. Tetrahedron Letters, 1983, **24**: 747–750.
- [5] Catherine M H, Anthony E G. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces[J]. Anal Chem, 2001, **73**(11): 2476–2483.
- [6] Jaffar S, Belcher A. Layer-by-layer surface modification and patterned electrostatic deposition of quantum dots[J]. Nano Letters, 2004, **4**(8): 1421–1425.
- [7] Tillman N, Ulman A, Schildkraut J S, *et al.* Incorporation of phenoxy groups in self-assembled monolayers of trichlorosilane derivatives. Effects on film thickness, wettability, and molecular orientation[J]. J Am Chem Soc, 1988, **110**(18): 6136–6144.
- [8] 黄惟德, 陈常庆. 多肽合成[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [9] Zhao J Y, Li Y H. Relative surface density and stability of the amines on the biochip[J]. Chin J Anal Chem, 2006, **34**(9): 1235–1238.
- [10] Vincent K S, John R. Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-functionalized nanoporous polymeric gratings: Fabrication and application in biosensing[J]. J Mater Chem, 2007, **17**: 4896–4901.
- [11] 赵剑英, 李玉邯, 高连勋. 第三届全国微全分析系统学术会议[C]. 北京: 中国化学会, 2005.
- [12] Lautent A, Lambert B, Charreyre M T, *et al.* A one step derivatization of controlled pore glass for oligonucleotide solid-phase synthesis[J]. Tetrahedron Letters, 2004, **45**: 8883–8887.