

二茂铁-肽 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成和电化学性质

王芳斌, 谭月敏, 刘又年, 曾冬铭, 向娟

(中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙, 410083)

摘要: 以二茂铁二甲酸、甘氨酸、酪氨酸和精氨酸为原料, 通过多步反应, 合成新的二茂铁-肽衍生物 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe(7)(Fca 代表二茂铁氨基酸)和 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH(8), 对寡聚肽的合成进行研究; 对合成产物进行红外光谱和氢核磁共振谱表征, 并运用循环伏安(CV)方法对产物的电化学性能进行研究。研究表明: 产物(7)和(8)的产率分别为 83.5%和 80.2%; Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的循环伏安扫描结果是氧化峰和还原峰电位分别为 0.385 V 和 0.346 V, 峰电位之差 ΔE_p 为 41 mV, 峰电流密度之比 J_{pa}/J_{pc} 为 1.055; 对于 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH, 其氧化峰和还原峰电位分别为 0.532 V 和 0.453 V, 峰电位之差 ΔE_p 为 79 mV, 峰电流密度之比 J_{pa}/J_{pc} 为 0.928。

关键词: 二茂铁-肽; Gly-Gly-Tyr-Arg; 合成; 电化学特性

中图分类号: O062; O065

文献标识码: A

文章编号: 1672-7207(2007)06-1121-08

Synthesis and electrochemical properties of ferrocene-peptides Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe

WANG Fang-bin, TAN Yue-min, LIU You-nian, ZENG Dong-ming, XIANG Juan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: A novel kind of peptide-derived ferrocene compound Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe (7) (Fca is ferrocene amino acid) and Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH(8) were synthesized from ferrocene, glycine, tyrosine and arginine through several steps. The synthetic methods of the oligopeptides were emphasized. The compounds were characterized by IR and $^1\text{H-NMR}$. Furthermore, cyclic voltammetry (CV) was used to investigate the electrochemical properties of the compounds. The results show that the yields of compounds (7) and (8) are 83.5% and 80.2%, respectively. The oxidation potential (E_a) and reduction potential (E_c) of Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe(7) are observed at 0.385 V and 0.346 V, respectively. The ratio of J_{pa} and J_{pc} is 1.055. For Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH(8), the oxidation potential (E_a) and reduction potential (E_c) are observed at 0.532 V and 0.453 V, respectively. The ratio of J_{pa} and J_{pc} for compound (8) is 0.928.

Key words: ferrocene peptides; Gly-Gly-Tyr-Arg; synthesis; electrochemical properties

二茂铁具有夹心结构和高度富电子特性, 且易受环境影响的可逆氧化还原特点。许多多肽分子能与蛋白质和DNA分子相互作用, 它们之间的这种特异性相

互作用, 可用于生物分子的识别、疾病的诊断、靶向药物等方面。将电化学活性^[1-5]的二茂铁与氨基酸^[6]或肽^[6-9]结合形成的共扼化合物, 可作为电子转移中间

收稿日期: 2007-02-18; 修回日期: 2007-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20676153)

作者简介: 王芳斌(1965-), 男, 湖南衡阳人, 博士研究生, 从事生物传感的研究

通信作者: 刘又年, 男, 教授; 电话: 0731-8836964; E-mail: liuyoun@mail.csu.edu.cn

体^[10-13], 应用于特定序列DNA片断、蛋白质的识别、检测以及DNA的损伤与保护等^[14-15]的研究。因此, 近年来有关二茂铁与氨基酸、多肽及DNA的共扼化合物的研究成为生物电化学研究领域的热点之一。

四肽Gly-Gly-Tyr-Arg可通过氢键与蛋白质作用(如木瓜蛋白酶)结合, 可用于一些蛋白质的检测, Kraatz等^[11]通过模拟Gly-Gly-Tyr-Arg的氢键性质完成了对PAP的电化学检测。由于生物电化学方法具有快速、灵敏、简单的特点, 但Gly-Gly-Tyr-Arg不具有电化学活性, 合成二茂铁与Gly-Gly-Tyr-Arg的化合物, 可将其作为电化学探针, 用于蛋白质的检测。

多肽合成主要有固相和液相两大合成方法, 其中固相合成多用于合成氨基酸个数比较多的肽序列, 而液相则用于寡肽的合成。液相合成肽的方法中, 主要有DCC(或EDC)-HOBt缩合法、HBTU方法和EDC-NHS方法等, 其中以EDC-HOBt缩合法较多使用。

本文作者采用HBTU的方法合成Gly-Gly-Tyr-Arg, 以及它与二茂铁的化合物Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe和Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH, 并测试其电化学性能行为。

1 实验

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器为: 红外光谱仪(AVATAR360, 美国

Nicolet), 核磁共振仪(Varian INOVA400), 电化学工作站(CHI-440, 上海辰华仪器有限公司)。

主要试剂为: 无水三氯化铝(AR); 氯化乙酰(AR); 叔丁醇(AR); 叠氮化钠(AR); 氯甲酸乙酯(AR); O-苯并三唑-N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸酯HBTU(AR); 柱层析硅胶(20~50 μm); 甘氨酸、酪氨酸、精氨酸(AR)等。

1.2 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成路线

Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成路线如图 1 所示。

1.3 化合物的表征方法

1.3.1 红外光谱

运用 AVATAR360(美国 Nicolet)红外光谱仪器; 实验中采用 KBr 压片, 扫描均在(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 进行。

1.3.2 核磁共振谱

运用 Varian INOVA400 核磁共振仪器; 实验中采用 CDCl_3 溶剂, 以 TMS 为内标物, 扫描均在(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 进行。

1.3.3 电化学的实验条件

以金电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝(Pt)电极为对电极, 支持电解质为 0.1 mol/L 的高氯酸钠乙醇溶液, 测定前电解池通入 10 min 氮气除氧, 扫描速度为 10~100 mV/s, 扫描范围为 100~700 mV。循环伏安均在(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 进行。

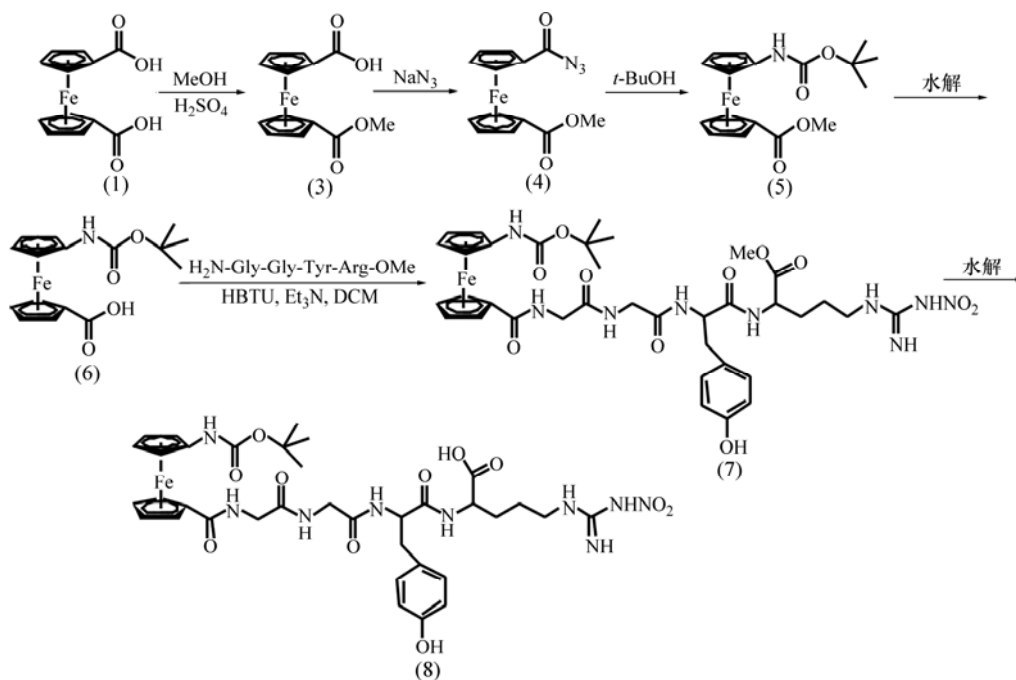


图 1 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成路线

Fig. 1 Synthesis of Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe

1.4 叔丁基氧-1'-甲酸-1-氨基二茂铁(6)的合成

1.4.1 1,1'-二茂铁二甲酸甲酯(2)的合成

量取 90 mL CH₃OH 于三口烧瓶中, 滴入 5~6 滴浓硫酸作为催化剂, 在 70 °C 搅拌, 回流。称取 5.7 g 1,1'-二茂铁二甲酸, 加入反应体系, 维持回流温度反应 24~48 h, 用 TLC 监测反应过程。反应完毕后, 将混合溶液抽滤, 滤去残渣, 将滤液蒸干。加入 30 mL CH₂Cl₂ 和水萃取 2~3 次, 取油相, 加入无水 Na₂SO₄ 干燥, 抽滤, 蒸干, 用 MeOH 重结晶, 抽滤, 将所得滤饼于空气中自然干燥。将产品溶于 EtOH 中, 以体积比为 2:1 的 hexane 和 EtOAc 的混合溶剂为淋洗液过层析柱。分离后蒸干, 得橘红色晶体(2) 4.5 g, 产率为 72.0%。

1.4.2 1'-甲酸甲酯-1-二茂铁甲酸(3)的合成

量取 40 mL 甲醇于三口烧瓶中, 加入 3 g 1,1'-二茂铁二甲酸甲酯, 用恒压滴液漏斗滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液 10 mL, 维持 80 °C 回流温度反应 24 h, 用 TLC 监视反应的进程。反应完毕后, 滤去残渣, 取液相, 蒸干后加入蒸馏水溶解, 并同时加入 30 mL CH₂Cl₂ 充分震荡后分液, 取水相, 油相再用蒸馏水洗 2~3 次。将所得水溶液转移至烧杯中, 搅拌下滴加 1 mol/L 的 HCl 溶液调 pH 值至 1~2, 有橘红色沉淀生成, 抽滤, 将滤饼在空气中自然干燥, 得橘红色固体。干燥后得产品(3) 2.3 g, 产率为 81.0%。

1.4.3 1'-甲酸甲酯-1-叠氮羰基二茂铁(4)的合成

称取 1.49 g 1'-甲酸甲酯-1-甲酸二茂铁, 溶于 5 mL 水和 28 mL 丙酮的混合溶液中, 冷却至 0 °C 后滴加由 2.9 mL Et₃N 和 30 mL 丙酮所组成的溶液, 维持此温度, 滴入由 2.2 mL 氯甲酸乙酯(ClCOOC₂H₅)和 12 mL 丙酮组成的混合溶液。搅拌 30 min 后, 将新配的 1.66 g NaN₃ 与 9 mL H₂O 的混合溶液滴入反应体系, 在 0 °C 搅拌 1 h。用 TLC 监视反应的进程。反应结束后将溶液倒入过量的冰水中, 并加入 20 mL CH₂Cl₂ 萃取 2~3 次, 有机相再分别用 5% NaHCO₃ 和饱和 NaCl 溶液洗涤, 分液, 在有机相中加入无水 Na₂SO₄ 以除去残留水分, 抽滤。将滤液在常温下蒸干, 在空气中干燥后得到红褐色晶体。将红褐色晶体溶解于 CH₂Cl₂ 中, 以体积比为 3:1 的 hexane 和 EtOAc 的混合溶剂为淋洗液过层析柱。分离后蒸干得红褐色晶体(4) 1.1 g, 产率为 67.5%。

1.4.4 叔丁基氧-1'-甲酸甲酯-1-氨基二茂铁(5)的合成

量取 50 mL 叔丁醇于圆底烧瓶中, 搅拌, 加热至 80 °C, 加入 973 mg 1'-甲酸甲酯-1-叠氮羰基二茂铁, 在回流温度下反应 1.5 h。反应完毕后取出溶液, 蒸干, 得红棕色固体。用体积比为 8:1:5 的 CH₂Cl₂, EtOAc

和 hexane 的混合溶剂为淋洗液过层析柱; 旋蒸干燥, 得橘红色固体(5) 730 mg, 产率为 73.4%。

1.4.5 叔丁基氧-1'-甲酸-1-氨基二茂铁(6)的合成

量取 70 mL 甲醇于三口烧瓶中, 于 70 °C 搅拌并回流, 称取 723 mg 叔丁基氧-1'-甲酸甲酯-1-氨基二茂铁并加入反应器, 滴加 5.8 mL 浓度为 1 mol/L NaOH 溶液, 维持回流温度反应 24 h, TLC 监视反应进程。反应完毕后, 滤去残渣, 取液相, 蒸干后加入水溶解, 同时加入 20 mL CH₂Cl₂ 充分震荡后分液, 取水相, 油相再用蒸馏水洗 2~3 次。将所得水溶液转移至烧杯中, 维持 0 °C, 搅拌下慢慢滴加 11 mol/L HCl 溶液调 pH 值至 1~2, 有橘红色沉淀生成, 抽滤, 将滤饼在空气中自然干燥即得棕色固体(6) 575 mg, 产率为 83.0%。

1.5 H₂N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成

1.5.1 Gly, Tyr 和 Arg 羧基的保护

称取 3.134 g Gly 于圆底烧瓶中, 加入 9 mL CH₃OH(无水), 在 -10 °C 缓慢加入 SOCl₂, 然后移入 20 °C 下反应 2 h(搅拌体系), 再放置 3 h, 减压蒸去 CH₃OH 等物就可得到产品, 产率为 90.42%。Tyr 和 Arg 羧基的酯化保护方法同上, 产率分别为 87.2% 和 84.7%。

1.5.2 Gly 氨基的 Boc 保护

参照文献[16]的方法, 取 16.8 g NaHCO₃ 于圆底烧瓶中, 在 5 °C 下用大约 120 mL 蒸馏水溶解, 另外称取 32.4 g (BOC)₂O, 将其溶解于大约 120 mL 二氧六环中, 将上述 2 种溶液混合; 然后称取 7.6 g (0.1 mol) Gly 分批少量多次加入以上混合液。反应过夜后, 用乙酸乙酯洗 2~3 次; 取水相用乙酸乙酯洗 2 次; 用饱和 NaHCO₃ 洗油相 2 次。然后混合所有的水相用 10% 盐酸调节水相的 pH=1~2, 再用乙酸乙酯洗水相 2 次。集中以上油相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸干即可得到产物。产率为 72.7%。

1.5.3 Boc-HN-Gly-Gly-OMe 二肽的合成

称取 3.54 g (0.02 mol) Boc-HN-Gly 于干燥的圆底烧瓶中, 用无水 CH₂Cl₂ 溶解。在 0 °C 下加入 Et₃N (三乙胺) 6.2 mL (4.4 g, 0.044 mol), 之后加入 Gly-OMe 1.78 g (0.02 mol), 再加入 HBTU 8.36 g (0.022 mol)。反应 2 h (0 °C) 而后移入室温反应, 反应过夜后处理, 先用饱和 NaHCO₃ 洗, 分液, 水相用 0.51 mol/L 的盐酸洗, 再用饱和 NaHCO₃ 洗, 最后用蒸馏水洗油相, 而后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸干即可得到产物。产率为 97.6%。

1.5.4 Boc-HN-Gly-Gly-OMe 二肽的水解

在圆底烧瓶里将 1.2 g Boc-HN-Gly-Gly-OMe 溶于 55 mL THF 中, 用 2.3 mL 蒸馏水溶解 0.194 g 的 NaOH

的溶液加入以上混合液。于 0 °C 反应 30 min, 然后在室温下反应 12 h。将反应物蒸干, 加水 50 mL, 然后用乙酸乙酯洗(3 次, 每次 20 mL), 之后再将水相冷却至 0 °C, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 1~2, 再用乙酸乙酯洗(3 次, 每次 20 mL), 油相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后蒸干的产品, 产率为 89.6%。

1.5.5 Boc-HN-Gly-Gly-Tyr-OMe 三肽的合成

合成方法与 1.5.3 节中的相同, 产率为 95.3%。

1.5.6 Boc-HN-Gly-Gly-Tyr-OMe 三肽的水解

合成方法与 1.5.4 节中的相同, 产率为 86.8%。

1.5.7 Arg(精氨酸)胍基保护

参照文献[17]方法, 在 0 °C 将 8 mL 发烟硝酸加入装有 5 mL(含 30%SO₃)发烟浓硫酸的烧瓶中, 在搅拌下, 加入 6 g Arg。反应 1 h 后倒入冰水中分解, 而后用饱和氨水调节 pH 值至 8~9; 再用冰醋酸调节 pH=6, 将溶液移入冰箱中放置 4 h。蒸干即得到产品, 产率为 70.5%。

1.5.8 Boc-HN-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成

合成方法与 1.5.3 节中的相同, 产率为 96.4%。

1.5.9 Boc-HN-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的 Boc 的去除

将 10 mmol 四肽溶于乙酸乙酯中, 在 0 °C 通入 HCl 气体 1 h, 然后搅拌 0.5 h, 而后移入室温搅拌 1 h。所得溶液减压除溶剂干燥, 用甲醇-乙醚重结晶, 产率为 75.5%。

1.6 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe(OH)的合成

1.6.1 合成

将 0.931 g H₂N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 溶解于干燥的乙酸乙酯中, 在 0 °C 加入 1.55 mL Et₃N 和 0.337 g 叔丁基氧-1'-甲酸-1-氨基二茂铁, 之后加入 0.537 g HBTU。反应在 0 °C 进行 2 h, 而后移入室温几天, TLC 跟踪反应进程。最后蒸干即得到产品, 产率为 83.5%。

1.6.2 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的水解

在圆底烧瓶里将 0.032 g Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 溶于 2 mL THF 中, 用 1.0 mL 蒸馏水溶解 2.0 mg 的 NaOH 的溶液加入以上混合液。在 0 °C 反应 30 min, 然后在室温下反应 12 h。将反应物蒸干, 加水 50 mL, 然后用乙酸乙酯洗(3 次, 每次 10 mL), 之后再将水相冷却至 0 °C, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 1~2, 再用乙酸乙酯洗(3 次, 每次 10 mL), 油相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后蒸干的产品, 产率为 80.2%。

1.7 电化学实验

将配好的 0.1 mmol/L 的 Boc-NH-Fc-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 溶液中抽取 3 mL 加入 15 mL 的培养皿

中, 再用注射器加入 3 mL 配好的 0.1 mol/L 的高氯酸钠溶液作为支持电解质, 轻微晃动至均匀, 静置 15 min 后进行 CV 测试。金电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝(Pt)电极为对电极, 支持电解质为 0.1 mol/L 的高氯酸钠溶液, 测定前电解池通入 10 min 氮气除氧, 扫描速度为 50 mV/s, 扫描范围为 100~700 mV。测试温度为(22±3) °C。

2 结果与讨论

2.1 化合物的表征

2.1.1 1, 1'-二茂铁二甲酸甲酯(2)

IR(cm⁻¹): 3 107、1 146、824 (ν_{FC}); 1 701 (ν_{C=O}, 酯基); 1 285, 1 146 (ν_{C-O-C}); 1 380 (ν_{C-H}, 烷基), 1 470 (δ_{C-H}, 烷基)。2 564 cm⁻¹ 和 1 398 cm⁻¹ 处 O—H 吸收峰消失, 1 380 cm⁻¹ (烷基 C—H 伸缩振动)和 1 470 cm⁻¹ (烷基 C—H 弯曲振动)处峰出现。1 285 cm⁻¹ 和 1 146 cm⁻¹ 处出现 C—O—C 的不对称和对称伸缩振动。¹H NMR(CDCl₃, 化学位移): 3.99(s, 6H, COOCH₃), 3.27(s, 2H, H-3', H-4', Fc), 4.28(s, 2H, H-3, H-4, Fc), 4.58(s, 2H, H-2', H-5', Fc), 4.78(s, 2H, H-2, H-5, Fc)。

2.1.2 1'-甲酸甲酯-1-二茂铁甲酸(3)

IR(cm⁻¹): 3 113、1 160、820 (ν_{FC}); 1 679, 1 708 (ν_{C=O}, 羧基, 酯基); 1 280, 1 160 (ν_{C-O-C}); 1 385 (ν_{C-H}, 烷基), 1 476 (δ_{C-H}, 烷基); 1 391 (δ_{OH})。1 679 cm⁻¹, 1 708 cm⁻¹ 并存羧基与酯基中的羰基吸收峰; 1 291 cm⁻¹ 出现 O—H 弯曲振动。¹H NMR(CDCl₃, 化学位移): 8.67(s, 1H, COOH), 3.87(s, 3H, COOCH₃), 3.97(s, 2H, H-3', H-4', Fc), 4.42(s, 2H, H-3, H-4, Fc), 4.58(s, 2H, H-2', H-5', Fc), 4.70(s, 2H, H-2, H-5, Fc)。

2.1.3 1'-甲酸甲酯-1-叠氮羰基二茂铁(4)

IR(cm⁻¹): 3 101、1 143、824 (ν_{FC}); 2 142 (ν_{N3}); 1 715 (ν_{C=O}, 酯基); 1 676 (ν_{C=O}, CON₃); 1 282, 1 181 (ν_{C-O-C}); 1 389 (ν_{C-H}, 烷基), 1 471 (δ_{C-H}, 烷基)。1 391 cm⁻¹ 处 O—H 弯曲振动消失, 1 676 cm⁻¹, 2 142 cm⁻¹ 处 CON₃ 中羰基和 N₃ 特征吸收峰出现。¹H NMR(CDCl₃, 化学位移): 3.83(s, 3H, COOCH₃), 4.45(s, 2H, H-3', H-4', Fc), 4.54(s, 2H, H-3, H-4, Fc), 4.87(s, 2H, H-2', H-5', Fc), 4.85(s, 2H, H-2, H-5, Fc)。

2.1.4 叔丁基氧-1'-甲酸甲酯-1-氨基二茂铁(5)

IR(cm⁻¹): 3 116、1 164、824 (ν_{FC}); 3 377 (ν_{N-H}), 1 544 (ν_{N-H}); 1 705 (ν_{C=O}, 酯基); 1 712, 1 247, 1 150 (ν_{C=O, C-C, C-H, Boc}); 1 285 (ν_{C-N}); 1 388 (ν_{C-H},

烷基), 1 467 (δ_{C-H} , 烷基)。2 142, 1 476 cm^{-1} CON_3 吸收峰消失, Boc 基团特征吸收峰在 1 712, 1 247, 1 150 cm^{-1} 处出现。1 285 cm^{-1} 处 C—N 伸缩振动出现。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{化学位移}): 5.91(\text{s}, 1\text{H}, \text{Cp-NH}), 3.81(\text{s}, 3\text{H}, \text{COOCH}_3), 3.99(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}', \text{H-4}', \text{Fc}), 4.39(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}, \text{H-4}, \text{Fc}), 4.51(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-2}', \text{H-5}', \text{Fc}), 4.81(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-2}, \text{H-5}, \text{Fc}), 1.50(\text{s}, 9\text{H}, \text{C}(\text{CH}_3)_3)$ 。

2.1.5 叔丁基氧-1'-甲酸-1-氨基二茂铁(6)

$\text{IR}(\text{cm}^{-1}): 3 150, 1 164, 811 (\nu_{\text{Fc}}); 3 251 (\nu_{\text{N-H}}), 1 541 (\delta_{\text{N-H}}); 1 671 (\nu_{\text{C=O}}, \text{羧基}); 1 701, 1 261, 1 164 (\nu_{\text{C=O}}, \text{C-C}, \text{C-H}, \text{Boc}); 1 289 (\nu_{\text{C-N}}); 1 394 (\nu_{\text{C-H}}, \text{烷基}), 1 488 (\delta_{\text{C-H}}, \text{烷基})$ 。显著的变化在于 1 705 cm^{-1} 处酯羰基消失, 羧基中羰基峰(1 671 cm^{-1})出现。此外在 2 555 cm^{-1} 处出现 O—H 伸缩振动峰。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \text{化学位移}): 8.67(\text{s}, 1\text{H}, \text{Cp-NH}), 8.77(\text{s}, 1\text{H}, \text{COOH}), 3.99(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}', \text{H-4}', \text{Fc}), 4.42(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}, \text{H-4}, \text{Fc}), 4.60(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-2}', \text{H-5}', \text{Fc}), 4.96(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-2}, \text{H-5}, \text{Fc}), 1.59(\text{s}, 9\text{H}, \text{C}(\text{CH}_3)_3)$ 。

2.1.6 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe(7)

如图 2 所示, $\text{IR}(\text{cm}^{-1}): 3 107 \text{cm}^{-1}, 1 146 \text{cm}^{-1}, 824 \text{cm}^{-1} (\nu_{\text{Fc}}); 1 701 \text{cm}^{-1} (\nu_{\text{C=O}}, \text{酯基}); 1 546 \text{cm}^{-1} (\text{N—H 的面内变形振动}); 3 402 \text{cm}^{-1} (\nu_{\text{N-H}}); 1 240 \text{cm}^{-1} (\text{叔丁基 C—C 单键伸缩振动谱}); 1 300 \text{cm}^{-1} (\text{C—N 伸缩振动谱}); 1 036 \text{cm}^{-1} (\text{C—O—C 的不对称伸缩振动谱带}); 1 637 \text{cm}^{-1} (\text{羰基的吸收峰}), 3 200\sim 2 500 \text{cm}^{-1} (\nu_{\text{OH}} \text{高低不平的宽峰})$ 。如图 3 所示, $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{化学位移}): 1.260(\text{溶剂 乙酸乙酯}), 1.346(\text{s}, 9\text{H}, \text{Boc}); 1.882(\text{s}, 2\text{H}, \text{Arg}); 3.89(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}', \text{H-4}', \text{Fc}); 4.29(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-3}, \text{H-4}, \text{Fc}); 4.39(\text{s}, 2\text{H}, \text{H-2}', \text{H-5}', \text{Fc}); 4.60(\text{s}, 2\text{H},$

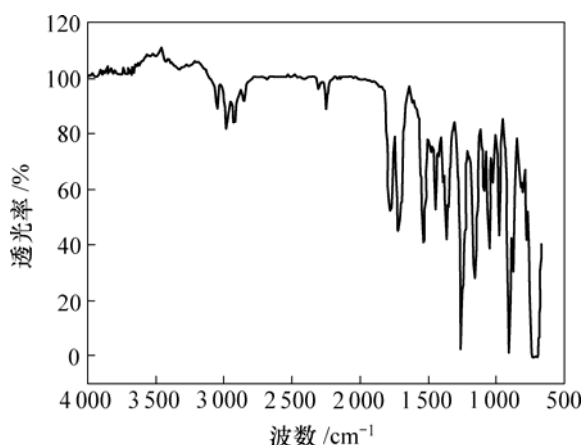


图 2 Boc-NH-Fc-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的红外光谱
Fig. 2 IR spectrum of Boc-NH-Fc-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe

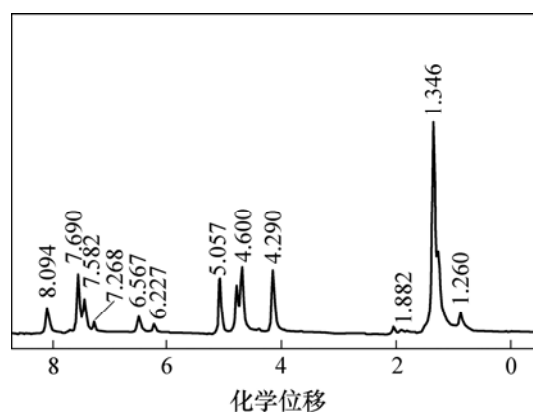


图 3 Boc-NH-Fc-CO-Gly-Gly-Tyr-Arg-NO₂ 的 $^1\text{H NMR}$ 谱
Fig.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Boc-NH-Fc-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe

H-2, H-5, Fc); 4.694(s, 4H, Tyr 上的苯环); 6.227(s, H-N, Tyr); 7.268(s, 1H, CDCl_3); 7.690(s, 2H, Gly); 8.094(s, 1H, HN-Fc)。

2.2 合成条件分析

以 HBTU 为缩合剂, 采用液相合成的方法合成了四肽及其二茂铁的化合物。肽的产率较高, 在 80% 以上, 反应时间均在 24 h 左右。二茂铁与 Boc-HN-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的合成中, 其产率达到 83.5%。说明 HBTU 可以作为二茂铁与氨基酸或多肽反应的缩合剂, 且反应效果较好。另外, 精氨酸中胍基的保护, 是合成中的一个难点, 实验中选用硝化方法保护胍基。

2.2.1 合成中主要产物叔丁基氧-1'-甲酸甲酯-1-氨基二茂铁(5)的合成条件分析

叔丁氧羰基(Boc)是目前多肽合成中广为采用是氨基保护基, 叔丁氧羰基具有以下优点: **a.** Boc-氨基酸容易得到晶体; **b.** 易于酸解除去, 但又具有一定的稳定性, Boc-氨基酸能较长期的保存而不分解; **c.** 酸解时产生的是叔丁基阳离子再分解为叔丁烯, 它不会带来副反应; **d.** 对碱水解和胍水解都稳定; **e.** 叔丁氧羰基对催化氢解稳定。

在叔丁基氧-1'-甲酸甲酯-1-氨基二茂铁的合成中和下一步的酸化过程中, 为防止氨基和酸发生反应, 采取叔丁氧羰基(Boc)作为氨基的保护基团。

这步反应中有一种容易生成的副产物二茂铁脲, 并且随着反应时间的增加, 副产物的量逐步增多, 产品(5)的产率随反应时间的变化如图 4 所示。

由图 4 可以看出, 当反应时间约为 1.5 h 时反应产率达到最高(73.4%), 继续延长反应时间, 产率下降。

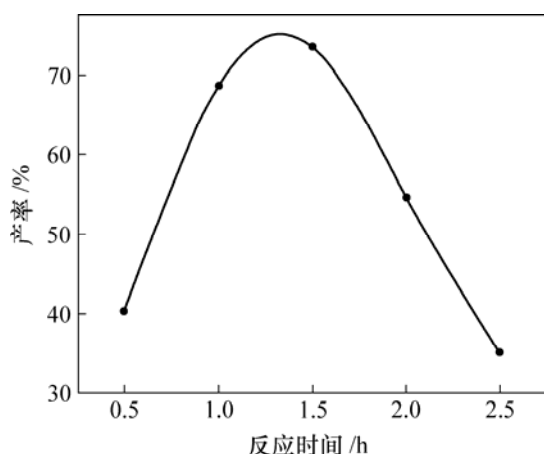


图 4 反应时间对产物(5)产率的影响

Fig.4 Influence of time on yield of compound (5)

2.2.2 产物(7)的合成条件分析

产物(7)是本实验中合成部分的最终产物,也是后期电化学测试以及表面化学重要原料。

肽的合成是把氨基连接到羧基上,而游离的羧基与氨基反应的活性并不高,这就需要一种试剂先与羧基反应使之活化,再与游离羧基进行结合,从而形成肽键。

从理论上说, Fc-OBt 与氨基酸的物质的量比应为 1:1 进行缩合,但在本实验中,二者以 1:1 进行缩合时的产率相当低,经实验,适当提高氨基酸的物质的量的比例对缩合反应起到促进作用。产率与二者物质的量比的关系如图 5 所示,其中, Fc-OBt 表示产物(5)与 HBTU 反应后的产物。

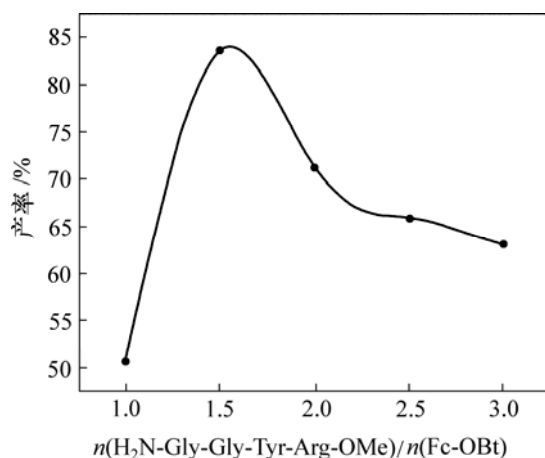
图 5 $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe}$ 与 Fc-OBt 的物质的量比对产物(7)产率的影响Fig.5 Influence of molar ratio of $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe}$ to Fc-OBt on yield of compound (7)

图 5 所示为 Fc-OBt 与 $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe}$ 的物质的量比对产物(7)产率的影响,当二者比例约为 1:1.5 时,产物(7)的产率最高,为 83.5%,随着 $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe}$ 的继续加入,产物(7)的产率开始下降并趋于平缓,这可能是过量的 $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe}$ 自身作用的结果。

2.3 电化学性质

通过循环伏安方法对合成的产物 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 和 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH 的电化学性能进行测试,结果如图 6 和图 7 所示。

由图 6 可知,CV 扫描结果(扫描速率为 50 mV/s),在 100~700 mV 范围内出现了一对可逆性较好的氧化还原峰,氧化峰和还原峰电位分别为 0.385 V 和 0.346 V, CV 中主要考察的参数峰电位之差 $\Delta E_p=41$ mV,峰电流密度之比 $J_{pa}/J_{pc}=1.055$,表明产物(7)在溶液中的

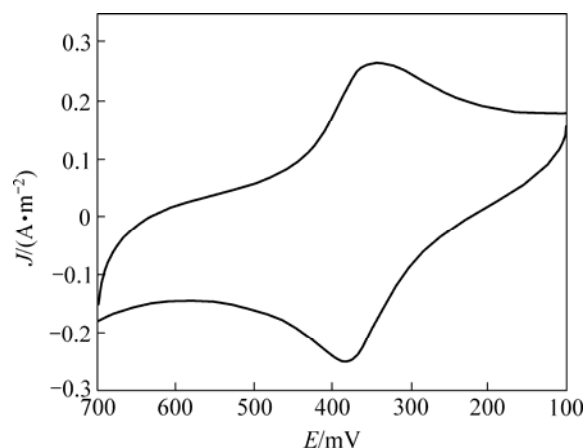


图 6 产物(7)的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammery of compound (7)

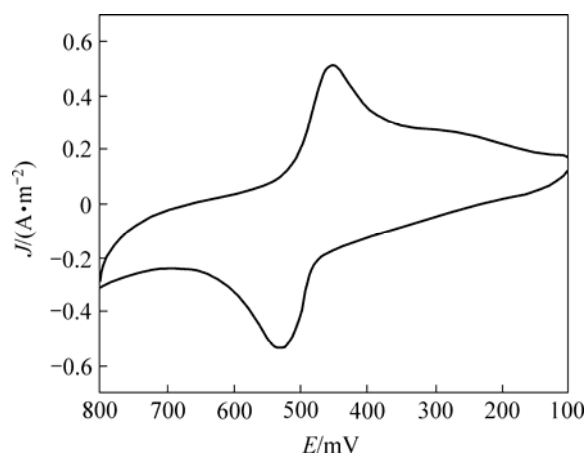


图 7 产物(8)的循环伏安图

Fig.7 Cyclic voltammery of compound (8)

良好的电子传递能力, 这种电化学特性是由于二茂铁中的铁离子在二价和三价之间变化时对应一个氧化还原过程。

产物Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe在溶液中多次扫描, 其峰电流密度随扫描速率的增加而增加, 且峰电流密度的平方根和扫描速率成线性关系, 说明此为扩散控制。

通过形成二硫键的方式, 采用自组装单分子膜(SAM)的方法将Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH通过EDC-NHS固定在金电极表面, 形成自组装单分子膜, 之后在0.1 mol/L的高氯酸钠电解质溶液中进行扫描。由图7可知, CV扫描结果(扫描速率为50 mV/s), 在100~800 mV范围内出现一对可逆性较好的氧化还原峰, 氧化峰和还原峰电位分别为0.532 V和0.453 V, CV中主要考察的参数峰电位之差 $\Delta E_p=79$ mV, 峰电流密度之比 $J_{pa}/J_{pc}=0.928$ 。经多次扫描, 无脱落现象, 氧化还原峰始终较好, 说明键合比较稳定。

二茂铁未被修饰前, CV扫描结果表明, 在400~500 mV范围内出现了一对可逆性较好的氧化还原峰, CV中峰电位之差 ΔE_p 较小, 峰电流较大。修饰后, 电活性中心离电极更远, 路径更长, 电子转移时所受的阻力更大, 所以其峰电流变小, 电位差变大。

利用线性扫描方程, 可导出准可逆单步骤单电子过程的 $J-E$ 曲线^[18]。这种情况下的波形, ΔE_p 是 ν 和 k^0 的函数, 这时候曲线是无量纲参数 α 和 φ 的函数, 其中 φ 定义为

$$\varphi = \frac{\left(\frac{D_O}{D_R}\right)^{\alpha/2}}{(\pi D_O \nu)^{1/2}} k^0 \quad (1)$$

式中: D_O 和 D_R 分别表示氧化态和还原态的扩散系数, 对于稀溶液, 一般取 $D_O=D_R=D=10^{-5}$ cm²/s; $f=F/(RT)$, F 为法拉第常数; ν 为扫描速度, mV/s; α 为无量纲参数, 取0.5; k^0 为Matsuda和Ayab所提出的区分过程是否可逆的参数^[18]。

25 °C时, ΔE_p 与 φ 的关系可由文献[19]查得, 本实验工作中所测得 ΔE_p 分别为41 mV和79 mV, 故根据文献[19]中 φ 数据, 代入式(1), 求得 k^0 。

根据Matsuda和Ayabe提出的可逆性区分标志^[18], 准可逆情况下的 $2 \times 10^{-5} \nu^{1/2} \leq k^0 \leq 0.3 \nu^{1/2}$, 根据本实验中扫描速度 ν 为50 mV/s, 即 $2.828 \times 10^{-4} \leq k^0 \leq 4.242$ 。而计算所得的 k^0 正是处于此区间范围内, 结合图形所表现出来的较为理想的对称氧化还原峰, 从而

可以确定本实验中的产物 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 和 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH 在溶液中的电化学反应是一个准可逆过程。

3 结 论

a. 合成了一种新的化合物 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe。对这种化合物进行了 IR 和 ¹H-NMR 表征。

b. 研究了 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 和 Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH 在溶液中的电化学性能。Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OMe 的 CV 扫描结果中, 氧化峰和还原峰电位分别为 0.385 V 和 0.346 V, 峰电位之差 ΔE_p 为 41 mV, 峰电流密度之比 J_{pa}/J_{pc} 为 1.055; Boc-HN-Fca-Gly-Gly-Tyr-Arg-OH 的 CV 扫描结果中, 氧化峰和还原峰电位分别为 0.532 V 和 0.453 V, 峰电位之差 ΔE_p 为 79 mV, 峰电流密度之比 J_{pa}/J_{pc} 为 0.928。

参考文献:

- [1] Liu B, Bard A J, Li C Z, Kraatz H B. Scanning electrochemical microscopy. 51. studies of self-assembled monolayers of DNA in the absence and presence of metal ions[J]. J Phys Chem B, 2005, 109(11): 5193-5198.
- [2] 徐 春, 蔡 宏, 何品刚. 二茂铁标记 DNA 电化学探针的研制及性质研究[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(9): 1492-1495.
XU Chun, CAI Hong, HE Pin-gang. Studies on the synthesis and characters of ferrocene labeled DNA probe[J]. Chemical Journal of Chinese University, 2001, 22(9): 1492-1495.
- [3] Long Y T, Li C Z, Sutherland T C, et al. A comparison of electron-transfer rates of ferrocenyl-linked DNA[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(29): 8724-8725.
- [4] Beer P D, Davis J J, Drillsma-Milgrom D A. Anion recognition and redox sensing amplification by self-assembled monolayers of 1,1'-bis(alkyl-N-amido)ferrocene[J]. Chem Commun, 2002, 16: 1716-1717.
- [5] Liu Y N, Orłowski G, Schatte G. 3-Ferrocenylamido-5-methylpyrazole: synthesis and metal coordination[J]. Inorg Chim Acta, 2005, 358(44): 1151-1161.
- [6] Barisic L, Rapic V, Kovac V. Ferrocene compounds. XXIX. efficient syntheses of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid derivatives[J]. Croatica Chem Acta, 2002, 75(1): 199-210.
- [7] Kraatz H B. Ferrocene-conjugates of amino acids, peptides and nucleic acids[J]. J Inorg Organometallic Polym Mater, 2005,

- 15(1): 83–106.
- [8] Sevirin K, Bergs R, Beck W. Bioorganometallic chemistry: transition metal complexes with α -amino acids and peptides[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37(12): 1634–1654.
- [9] Huang H, Mu L, Cheng J P. Ferrocenyl-bearing cyclopeptide as redox-switchable cation receptors[J]. *J Org Chem*, 2003, 68(20): 7605–7611.
- [10] Calleja G, Cerveau G. Electrochemistry: A tool for characterization of hybrid materials obtained by non-hydrolytic sol-gel route and containing ferrocene derivatives[J]. *J Sol-Gel Sci and Tech*, 2003, 26: 307–310.
- [11] Plumb K, Kraatz H B. Interaction of a ferrocenyl-modified peptide with papain: Toward protein-sensitive electrochemical probes[J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14(3): 601–606.
- [12] Barauskas J, Razumas V, Talaikyt Z. Towards redox active liquid crystalline phases of lipids: a monoolein/water system with entrapped derivatives of ferrocene[J]. *Chem Phys Lipids*, 2003, 123(1): 87–97.
- [13] Wang S F, Du D. Differential pulse voltammetry determination of ascorbic acid with ferrocene-L-cysteine self-assembled supramolecular film modified electrode[J]. *Sensors Actuators B: Chem*, 2004, 97: 373–378.
- [14] Anne A, Bouchardon A, Moiroux J. Ferrocene-labeled oligonucleotide chainsend-tethered to gold electrode surfaces: novel model systems for exploring flexibility of short DNA using cyclic voltammetry[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(5): 1112–1111.
- [15] Petka W A, Harden J L, McGrath K P, et al. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins[J]. *Science*, 1998, 281(17): 389–392.
- [16] Shendage D M, Froehlich R, Haufe G. Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α -amino acids[J]. *Org Lett*, 2004, 6(21): 3675–3678.
- [17] Hofmann K, Peckham W D, Rheiner A. Studies on polypeptides. VII. The synthesis of peptides containing arginine[J]. *Biochem*, 1955, 78(5): 238–242.
- [18] Bard A J, Faulker L R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*[M]. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2001: 236–240.
- [19] Nicholson R S. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics[J]. *Anal Chem*, 1965, 37(16): 1351–1355.