高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

利用脂溶性硅基载体连续流动液相合成维洛斯肽

刘　豪[1]，刘冬梅[2]，孙浩田[1]，夏　超[2]，苏贤斌[2]
（1. 青岛科技大学化工学院，青岛 266042；
2. 南京工业大学化工学院，南京 210009）

摘要　提出了一种新型脂溶性硅基载体4,4-二(叔丁基二苯基硅氧基)二苯甲胺(BPPM)，可在微反应器中连续流动条件下快速液相合成多肽．所设计的连续流动装置由偶联单元(微通道反应器)、脱保护单元(填充床反应器)和水洗单元(微通道混合器)组成．该过程中使用绿色溶剂(以乙酸乙酯代替*N*,*N*-二甲基甲酰胺)和Cbz保护氨基酸(清洁的脱保护代替哌啶脱Fmoc保护)，以环境友好的方式合成了高纯度(粗品>95%)的维洛斯肽，合成效率高(每偶联一个氨基酸<5 min)．该研究成果易于工业化放大生产，为大规模绿色高效合成多肽提供了新方案．

关键词　脂溶性硅基载体；连续流动；液相多肽合成
中图分类号　O629.72　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20240024

Continuous Flow Liquid-phase Vialox Peptide Synthesis Using Hydrophobic Silyl Tag

LIU Hao[1], LIU Dongmei[2], SUN Haotian[1], XIA Chao[2], SU Xianbin[2*]
(*1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao* 266042, *China*;
2. College of Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, *China*)

Abstract　A novel hydrophobic silyl tag bis{4-[(tert-butyldiphenylsilyl)oxy]phenyl}methanamine (BPPM) was proposed for rapid liquid-phase peptide synthesis under continuous flow in a microreactor. The designed continuous flow device consists of a coupling unit (micro-channel reactor), a deprotection unit (packed-bed reactor) and a washing unit (micro-channel mixer). In this process, a green solvent (ethyl acetate instead of *N*, *N*-dimethylacetamide) and Cbz-protected amino acids (clean deprotection instead of piperidine Fmoc-deprotection) were used. Vialox peptide with high purity (>95% crude) was synthesized in an environmentally friendly way, with high synthesis efficiency (each amino acid per coupling<5 min). The results are easy to scale up and provide a new strategy for large-scale green and efficient synthesis of peptides.

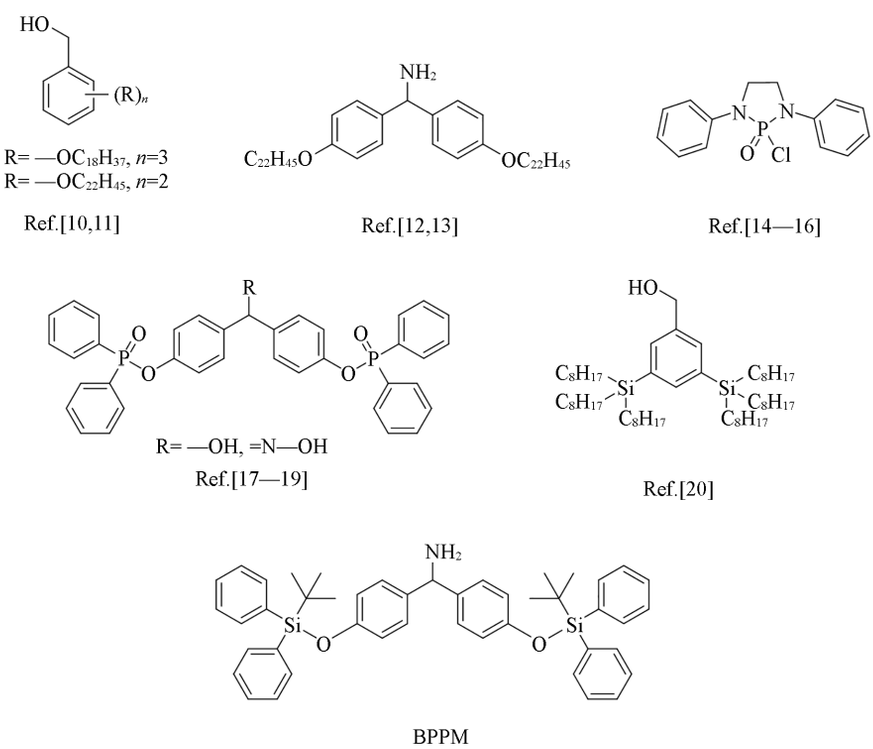
Keywords　Hydrophobic silyl tag; Continuous flow; Liquid-phase peptide synthesis

多肽药物具有生物同源性以及高效、安全、高选择性和不在体内蓄积等特点，目前被市场广泛接受，已有近80种多肽药物进入市场并应用于各种疾病的治疗[1,2]．因此，开发快速、高效且可靠的多肽合成方法至关重要．通常，多肽合成方法分为化学合成法和生物合成法[3]．与耗时且复杂的生物合成法相比，化学合成法不仅合成时间短、操作简单，而且合成的多肽具有序列多样性，尤其是具有特殊氨

收稿日期: 2024-01-15. 网络首发日期: 2024-03-20.
联系人简介: 苏贤斌, 男, 博士, 教授, 主要从事多肽合成和绿色化学方面的研究．E-mail: davidsu@njtech.edu.cn
基金项目: 省部共建生态化工协同创新中心人才基金(批准号: 1203042904001419)资助．
Supported by the Talents Fund of the Provincial and Provincial Cooperative Innovation Center for Ecological Chemical Industry, China (No.1203042904001419).

基酸序列的长链肽[4].

固相多肽合成(SPPS)和液相多肽合成(LPPS)均为多肽化学合成的常规方法[5,6]. Merrifield[5]开发的SPPS是多肽合成的主要方法. 然而, SPPS作为非均相反应存在合成过程中需要使用大过量的试剂和溶剂及原子经济性低等缺点. 从绿色化学的角度来看, 该方法是不环保的. 相比之下, LPPS是均相反应, 仅需要等摩尔比投料, 原子经济效益高, 成本更低且可以使用更加绿色的溶剂. 然而, 中间肽的物理化学性质主要取决于其序列, 对于高度亲脂性和严重不溶性的肽中间体会导致合成过程中反应动力学下降、后处理困难等问题. 因此, LPPS更适合于短肽合成, 在长链肽的偶联反应中常用的有机溶剂存在显著的溶解性问题[7]. 为了解决这些问题, 研究人员开发了新型脂溶性载体来代替固相合成中的树脂载体用于多肽的液相合成[8](Scheme 1). Bayer等[9]首次将SPPS和LPPS的优势结合起来, 使用疏水性聚合物(PEG)代替固体树脂载体, 在均相有机溶液中进行多肽合成. 然而, 这些疏水性聚合物载体仍然表现出较低的负载值. 为此, 基于小分子的疏水性载体被开发出来. Chiba等[10,11]设计了一种基于简单疏水基团——苯甲醇的疏水性载体, 通过沉降的后处理方式进行多肽合成. Takahashi等[12,13]开发的支链烷烃可溶性载体实现了通过水洗的后处理方式进行多肽合成, 与沉降的后处理方式相比更加简便. 此外, Li等[14~16]通过设计*N*-磷酰基化合物提出了基团辅助纯化(GAP)的概念, 简化了多肽后处理的纯化过程. Qin等[17~19]在GAP基础上开发了一系列新的含磷载体作为氨基酸的C端保护基团和可回收载体, 实现了合成多肽之后载体的再回收利用. Yamamoto等[20]开发的几种新型含硅载体为疏水性载体的设计提供了新的思路.

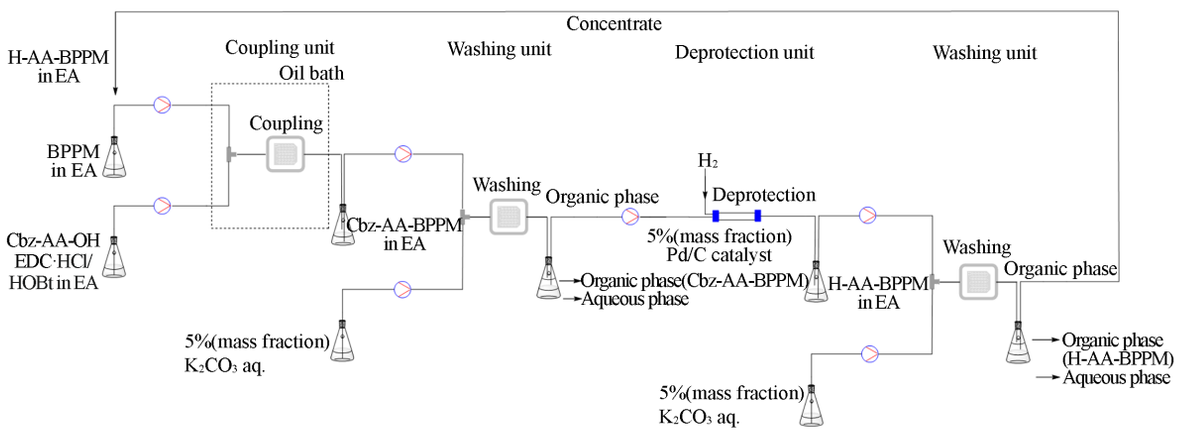


Scheme 1 Representative structures of Tags and BPPM

近年来, 连续流动化学合成方法因具有传质传热迅速、反应选择性好、时空效率高及容易自动化控制等特点而成为化学化工领域研究的新热点[21]. 从经济性、产品质量、安全性和环境友好性来看, 连续流动生产方式优于釜式生产[22]. 在过去二十年中, 连续流动多肽合成研究取得了显著进展. Fuse等[23]采用三光气活化羧基形成的酸性氯化物与过量的亲核试剂(另一个氨基酸的氨基)反应生成酰胺, 利用氨基酸的活化态(NCA)进行连续化多肽合成. Pentelute等[24]研发了一种自动化快速流动固相多肽合成装置, 并制备了含164个氨基酸的长链多肽. 该方法虽然可在短时间内快速合成长肽, 但仍需使用过量的氨基酸、偶联试剂及溶剂. 最近, Fuse等[25]开发了制备C端游离肽的自动化连续流动

液相多肽合成仪. 从所需成本和产生废料来看，连续流液相多肽合成比固相多肽合成更适合大规模生产.

基于脂溶性载体和连续流动合成方法的优势，针对传统固相和液相多肽合成的缺点，本文设计合成了全新的硅基脂溶性载体4,4-二(叔丁基二苯基硅氧基)二苯甲胺(BPPM)作为氨基酸的C端保护基团(Scheme 1)，并且开发了全新的连续流动多肽合成装置，包含偶联单元、脱保护单元以及水洗单元(Scheme 2). 该方法选择Cbz保护氨基酸策略进行多肽合成，使用H_2和可循环使用的Pd/C催化剂脱除Cbz保护基，避免了脱除Fmoc或Boc保护基时哌啶或强酸等管制化学品的使用. 脱保护后产生的甲苯可通过减压浓缩去除，后处理简单. 通过优化连续流动偶联和脱保护条件，将脂溶性载体BPPM与连续流动合成相结合，实现了多肽的快速绿色合成.



Scheme 2　Continuous flow liquid-phase peptide synthesis using hydrophobic silyl tag

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

4,4-二羟基二苯甲酮、叔丁基二苯基氯硅烷、吡啶、乙酸铵、三氟乙酸(TFA)和5%(质量分数)钯碳催化剂，分析纯，上海阿拉丁试剂有限公司；三异丙基硅烷(TIS)、咪唑和盐酸羟胺，分析纯，上海迈瑞尔化学技术有限公司；锌粉、氨水、氯化钠、无水硫酸镁、无水碳酸钾、浓盐酸、乙酸乙酯(EA)、乙醇、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷(DCM)和石油醚，分析纯，国药集团化学试剂有限公司；Cbz保护氨基酸，分析纯，上海吉尔生化有限公司；1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和1-羟基苯并三唑(HOBt)，分析纯，苏州昊帆生物科技有限公司.

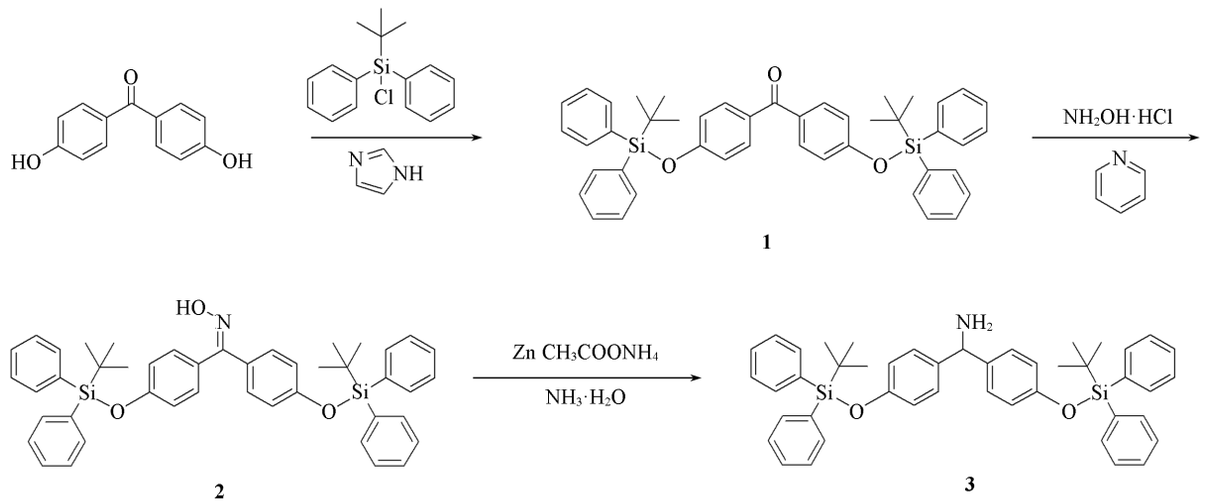
DRX500 400 MHz型核磁共振波谱仪(NMR)，德国Bruker公司；Agilent 1260型液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)和Agilent 1260型高效液相色谱仪(HPLC)，美国安捷伦公司；Wooking K2025型高效液相色谱仪(HPLC)，济南海能未来技术集团股份有限公司；RE-201D型旋转蒸发仪，上海东玺制冷仪器有限公司；YZFLAB系列流动合成仪，上海岩征实验仪器有限公司.

1.2　实验过程

1.2.1　可溶性疏水硅基载体BPPM的合成　以4,4-二羟基二苯甲酮为反应底物合成BPPM载体的路线如Scheme 3所示.

化合物**1**的合成：将5.28 g(24.6 mmol)4,4-二羟基二苯甲酮溶解于200 mL二氯甲烷中，加入7.03 g(103.3 mmol)咪唑后，滴加20.37 g(74.1 mmol)叔丁基二苯基氯硅烷，室温下搅拌反应12 h. 待反应完成后，将反应液用质量分数为5%的碳酸钾水溶液洗涤3次，收集分液漏斗中的有机相，用无水硫酸镁干燥. 随后，使用砂芯漏斗过滤除去硫酸镁，滤液经减压浓缩和柱层析纯化($V_{乙酸乙酯}$∶$V_{石油醚}$=1∶15)，得到16.51 g淡黄色固体产物**1**，产率97%.

化合物**2**的合成：将14.94 g(21.6 mmol)化合物**1**溶解于200 mL乙醇中，加入4.73 g(68.1 mmol)盐酸羟胺和7.01 g(88.6 mmol)吡啶，于85 ℃搅拌回流反应8 h. 待反应完成后，将反应液减压浓缩除

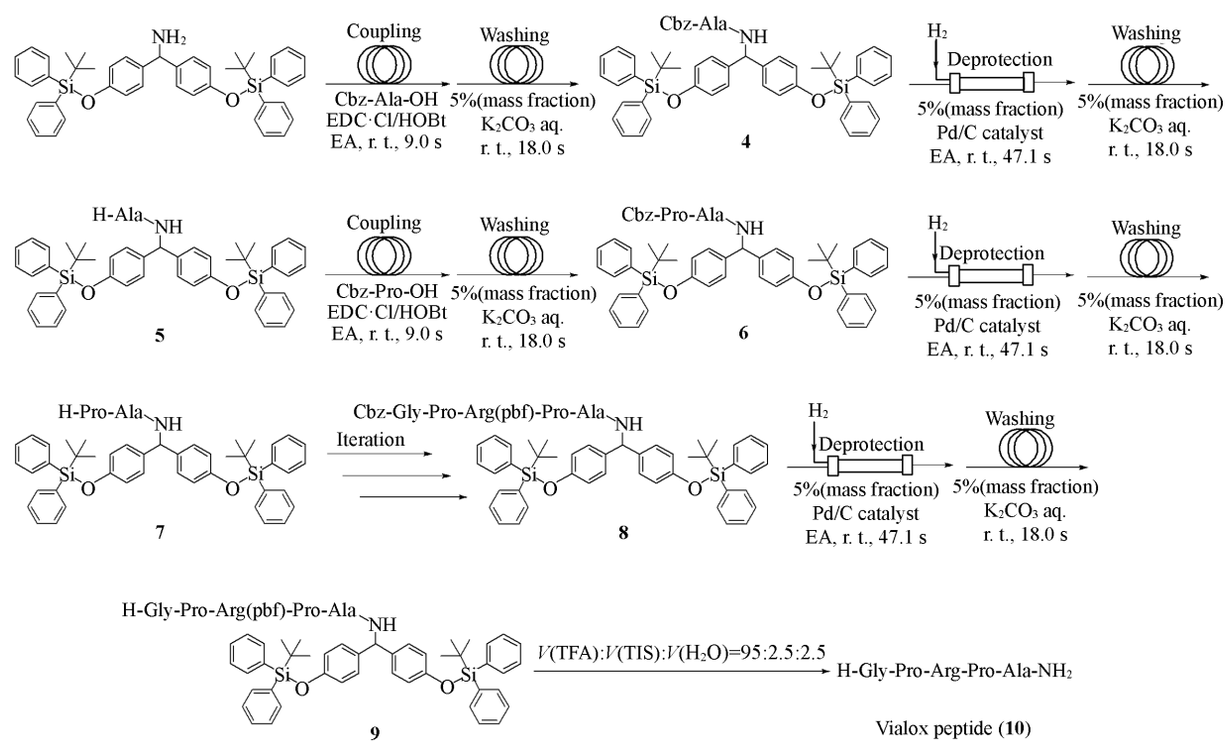


Scheme 3　Syntheis route of BPPM

去乙醇，再加入200 mL乙酸乙酯，用饱和氯化钠水溶液洗涤3次，收集分液漏斗中的有机相，用无水硫酸镁干燥. 随后，使用砂芯漏斗过滤除去硫酸镁，有机相经减压浓缩和柱层析纯化($V_{乙酸乙酯}$∶$V_{石油醚}$=1∶10)，得到14. 33 g淡黄色固体产物**2**，产率94%.

化合物**3**(BPPM)的合成：将13. 98 g(19. 8 mmol)化合物**2**溶解于200 mL乙醇中，加入4. 27 g(55. 4 mmol)乙酸铵、6. 81 g(104. 1 mmol)锌粉和30 mL氨水，于85 ℃搅拌回流反应8 h. 待反应完成后，将反应液减压浓缩除去乙醇，再加入200 mL乙酸乙酯，用质量分数为5%的碳酸钾水溶液洗涤3次，收集分液漏斗中的有机相，用无水硫酸镁干燥. 随后，使用砂芯漏斗过滤除去硫酸镁，有机相经减压浓缩和柱层析纯化($V_{乙酸乙酯}$∶$V_{石油醚}$=体积比1∶6)，得到11. 78 g白色固体产物**3**，产率86%.

1.2.2　利用BPPM连续流液相合成维洛斯肽　维洛斯肽又名五胜肽-3，其氨基酸序列为H-Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-NH_2，具有抗皱和光滑皮肤的作用[26]. 以可溶性疏水硅基载体BPPM结合连续流动合成维洛斯肽的路线如Scheme 4示.



Scheme 4　Continuous flow liquid-phase synthesis of Vialox peptide by BPPM

氨基酸的预活化：将0.49 g(2.2 mmol)Cbz-Ala-OH溶解于20 mL乙酸乙酯中，加入0.46 g(2.4 mmol)EDC·HCl和0.34 g(2.5 mmol)HOBt，室温下搅拌反应30 min，对氨基酸进行预活化处理，备用．维洛斯肽序列中其它4种氨基酸采用相同方法进行预活化处理并备用．

维洛斯肽的合成：将1.21 g(2.0 mmol)BPPM溶解于20 mL乙酸乙酯中作为反应液A．将预活化的氨基酸溶液作为反应液B．室温下，将反应液A和反应液B分别通过偶联单元的恒流泵A和B以10 mL/min的流速注入微通道反应器中，在其中混合并进行偶联反应，反应器内的反应时间为9 s，待反应混合溶液经过微通道反应器后，即完成偶联反应，得到产物Cbz-Ala-BPPM(**4**)．之后，将反应后的混合溶液通过水洗单元，控制流速为10 mL/min，使用质量分数为5%的碳酸钾水溶液洗除去过量的氨基酸和偶联试剂，得到有机相和水相混合物．将有机相溶液通过脱保护单元进行脱保护，控制脱保护单元体系中的氢气压力为1.0 MPa．开启脱保护单元中的恒流泵，设置流速为10 mL/min，将反应液注入气液混合器中与氢气混合，之后气液混合物再通过恒流泵注入装有3 g 5%(质量分数)钯碳催化剂的填充床反应器中进行脱保护，得到产物H-Ala-BPPM(**5**)，制备柱中的脱保护时间仅为47.1 s．然后，将反应后的溶液再次通过水洗单元，控制流速为10 mL/min，使用质量分数为5%的碳酸钾水溶液洗涤除去偶联过程可能未完全水洗除去的过量氨基酸和偶联试剂，确保在下一步偶联反应之前过量的氨基酸已完全消失，得到有机相和水相混合物．将有机相通过减压浓缩除去脱保护副产物甲苯，再次溶解于20 mL乙酸乙酯中，之后将H-Ala-BPPM(**5**)溶液和提前预活化好的0.55 g(2.2 mmol)Cbz-Pro-OH进行下一步偶联反应．两种反应液再次通过恒流泵注入偶联单元中，在微通道反应器中反应得到Cbz-Pro-Gly-BPPM(**6**)，通过水洗单元除去过量氨基酸后，再经过脱保护单元脱保护得到H-Pro-Gly-BPPM(**7**)．

肽链延长过程继续重复上述步骤．偶联第3个氨基酸Cbz-Arg(pbf)-OH(1.34 g，2.4 mmol)时，由于该氨基酸存在自身偶联现象，为保证偶联反应转化完全，其投料量增加为1.2倍摩尔量．在脱保护过程后的水洗阶段，需要将质量分数为5%的碳酸钾水溶液换为质量分数为3%的盐酸水溶液，以保证脱保护后所有精氨酸及其自身偶联产物完全去除，从而不影响后续反应．重复以上偶联和脱保护反应，继续连接第4个氨基酸Cbz-Pro-OH(0.55 g，2.2 mmol)和最后一个氨基酸Cbz-Gly-OH(0.46 g，2.2 mmol)，最终得到带有BPPM载体的全保护维洛斯肽Cbz-Gly-Pro-Arg(pbf)-Pro-Ala-BPPM(**8**)．然后，将化合物**8**通过脱保护单元脱保护得到产物**9**，使用TFA/TIS/H_2O(体积比95∶2.5∶2.5)裂解液对BPPM和侧链保护基进行裂解，随后使用冰乙醚沉降，沉降完毕经离心和N_2气吹干，得到0.85 g白色固体维洛斯肽裸肽产物**10**，产率为85%，HPLC纯度为95%．化合物**1**~**10**的核磁共振波谱及质谱数据列于表1，相关谱图见本文支持信息图S4~S29.

Table 1　^{1}H NMR, ^{13}C NMR and ESI-MS data for compounds 1—10

Compd.	^{1}H NMR, δ	^{13}C NMR, δ	ESI-MS, *m/z*
1	7.70(dd, *J*=8.0, 1.4 Hz, 8H), 7.53(d, *J*=8.7 Hz, 4H), 7.39(dt, *J*=25.0, 7.1 Hz, 12H), 6.77(d, *J*=8.7 Hz, 4H), 1.10(s, 18H)	194.67, 159.28, 135.45, 132.27, 131.97, 131.04, 130.16, 127.95, 119.35, 26.46, 19.50.	691.1985[M+H]$^+$
2	11.02(s, 1H), 7.71—7.63(m, 8H), 7.51—7.38(m, 12H), 7.04(dd, *J*=17.9, 8.7 Hz, 4H), 6.72(dd, *J*=29.7, 8.7 Hz, 4H), 1.04(d, *J*=8.4 Hz, 18H)	156.01, 155.32, 154.53, 135.52, 135.47, 132.44, 132.35, 130.91, 130.71, 128.77, 128.54, 128.51, 126.84, 119.56, 119.37, 26.77, 26.74, 19.43, 19.40	706.2079[M+H]$^+$
3	7.69(dd, *J*=7.9, 1.3 Hz, 8H), 7.36(dt, *J*=24.3, 7.1 Hz, 12H), 6.97(d, *J*=8.5 Hz, 4H), 6.66(d, *J*=8.6 Hz, 4H), 4.93(s, 1H), 1.66(s, 2H), 1.08(s, 18H)	154.38, 138.34, 135.57, 133.02, 129.88, 127.77, 119.47, 58.46, 26.57, 19.49	675.3272[M−NH_2]
4	7.68(d, *J*=7.6 Hz, 8H), 7.47—7.19(m, 17H), 6.78(d, *J*=8.4 Hz, 4H), 6.64(t, *J*=8.6 Hz, 4H), 5.94(d, *J*=8.2 Hz, 1H), 5.30(d, *J*=6.5 Hz, 1H), 4.98(s, 2H), 4.21(s, 1H), 1.31(d, *J*=7.0 Hz, 3H), 1.08(s, 18H)	170.88, 155.99, 154.83, 136.11, 135.53, 133.85, 132.84, 129.93, 128.57, 128.24, 128.17, 128.08, 127.78, 119.67, 67.03, 55.65, 50.48, 26.53, 19.46, 18.50, 14.24	468.1925[M+H+K]$^{2+}$

Continued

Compd.	^{1}H NMR, δ	^{13}C NMR, δ	ESI-MS, *m/z*
5	7.75(d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.73—7.64(m, 8H), 7.37(dt, *J*=14.9, 7.2 Hz, 12H), 6.85(dd, *J*=8.5, 5.1 Hz, 4H), 6.66(d, *J*=8.6 Hz, 4H), 5.98(d, *J*=8.8 Hz, 1H), 3.47(q, *J*=6.9 Hz, 1H), 1.54(s, 2H), 1.29(d, *J*=7.0 Hz, 3H), 1.08(s, 18H)	174.41, 154.73, 154.68, 135.56, 134.53, 134.49, 132.86, 129.94, 128.32, 128.15, 127.81, 119.59, 54.84, 50.77, 26.53, 21.78, 19.48	785.3571[M+Na]$^+$
6	7.77—7.57(m, 8H), 7.46—7.11(m, 18H), 6.88—6.76(m, 4H), 6.63(dd, *J*=16.5, 8.2 Hz, 4H), 5.96(dd, *J*=20.7, 8.3 Hz, 1H), 4.96(dd, *J*=45.6, 12.4 Hz, 2H), 4.48—4.29(m, 1H), 4.20—4.01(m, 1H), 3.55—3.33(m, 2H), 2.07—1.65(m, 5H), 1.36—1.20(m, 3H), 1.10(dd, *J*=26.8, 6.3 Hz, 18H)	1.86, 170.79, 155.93, 154.70, 136.27, 135.55, 135.52, 134.37, 134.08, 132.84, 129.91, 128.55, 128.24, 128.03, 127.79, 119.60, 119.49, 67.43, 60.76, 60.50, 55.52, 49.08, 47.10, 29.17, 26.53, 24.58, 19.47, 19.46, 17.49, 14.26	1016.4466[M+Na]$^+$
7	8.13(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.75—7.61(m, 8H), 7.50(d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.36(dtd, *J*=9.2, 6.8, 1.7 Hz, 12H), 6.84(dd, *J*=16.1, 8.6 Hz, 4H), 6.63(dd, *J*=13.9, 8.6 Hz, 4H), 5.96(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 4.47(p, *J*=7.0 Hz, 1H), 3.50(dd, *J*=9.1, 5.3 Hz, 1H), 2.87(dtd, *J*=12.4, 10.2, 6.5 Hz, 2H), 1.96(ddd, *J*=16.4, 12.9, 7.6 Hz, 1H), 1.74(td, *J*=12.4, 6.6 Hz, 1H), 1.65—1.54(m, 2H), 1.28(d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.07(d, *J*=3.5 Hz, 18H)	5.16, 171.07, 154.70, 154.64, 135.55, 134.34, 132.87, 129.94, 128.31, 128.25, 127.81, 119.60, 119.48, 60.09, 55.48, 48.47, 47.15, 30.62, 26.54, 26.05, 19.49, 19.47, 17.86	882.4098[M+Na]$^+$
8	7.66(d, *J*=6.1 Hz, 8H), 7.31(dt, *J*=24.6, 9.7 Hz, 17H), 6.77(d, *J*=8.1 Hz, 4H), 6.61(t, *J*=8.0 Hz, 4H), 6.35(s, 1H), 6.02(s, 1H), 5.88(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.09—4.89(m, 2H), 4.61(d, *J*=45.9 Hz, 2H), 4.34(d, *J*=26.8 Hz, 2H), 4.00—3.73(m, 2H), 3.54(d, *J*=42.7 Hz, 3H), 3.21(d, *J*=58.7 Hz, 3H), 2.87(d, *J*=27.8 Hz, 3H), 2.70(s, 2H), 2.51(d, *J*=26.0 Hz, 6H), 2.04(d, *J*=15.3 Hz, 4H), 1.81(dd, *J*=39.2, 32.5 Hz, 6H), 1.40(d, *J*=17.8 Hz, 8H), 1.27(d, *J*=11.1 Hz, 8H), 1.07(s, 18H)	171.99, 171.12, 170.88, 158.61, 156.79, 156.49, 154.81, 154.77, 139.34, 138.37, 136.27, 135.51, 134.00, 133.92, 132.75, 132.26, 129.98, 128.57, 128.27, 128.16, 127.82, 124.55, 119.63, 119.54, 117.43, 114.17, 86.35, 67.03, 60.17, 60.03, 55.60, 49.00, 47.52, 46.52, 43.25, 36.59, 33.90, 31.98, 31.72, 31.57, 31.50, 30.17, 29.76, 29.57, 29.43, 29.22, 28.99, 28.86, 28.66, 26.52, 25.00, 24.84, 22.76, 19.46, 19.41, 18.07, 17.72, 14.23, 12.58	798.3596[M+H+K]$^{2+}$
9	7.66(d, *J*=5.8 Hz, 8H), 7.34(dd, *J*=15.8, 6.2 Hz, 12H), 6.79(d, *J*=7.3 Hz, 4H), 6.65—6.58(m, 4H), 5.89(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 4.78—4.20(m, 4H), 3.72—3.40(m, 11H), 3.33(s, 5H), 3.15(s, 2H), 2.92(s, 3H), 2.51(d, *J*=28.5 Hz, 7H), 2.06(s, 4H), 1.74(dd, *J*=58.6, 36.0 Hz, 8H), 1.43(s, 8H), 1.07(s, 18H)	172.09, 171.35, 158.60, 156.57, 154.76, 154.72, 138.27, 135.50, 134.09, 133.98, 132.76, 132.18, 129.96, 128.28, 127.80, 124.56, 119.58, 119.52, 117.43, 86.38, 60.38, 60.00, 55.52, 50.29, 49.12, 47.53, 46.50, 43.24, 28.65, 26.52, 24.97, 19.45, 19.39, 18.05, 17.50, 12.58	1444.6672[M+Na]$^+$
10	9.01—7.83(m, 4H), 7.69—7.16(m, 4H), 7.00(s, 1H), 4.69—4.05(m, 3H), 4.00—2.71(m, 9H), 2.51(s, 1H), 2.45—1.27(m, 11H), 1.22—0.85(m, 4H)	174.99, 171.62, 170.49, 164.97, 157.35, 60.12, 59.76, 53.55, 50.75, 49.17, 48.60, 47.28, 29.84, 29.45, 27.24, 24.96, 24.60, 18.42	496.3113[M+H]$^+$

2 结果与讨论

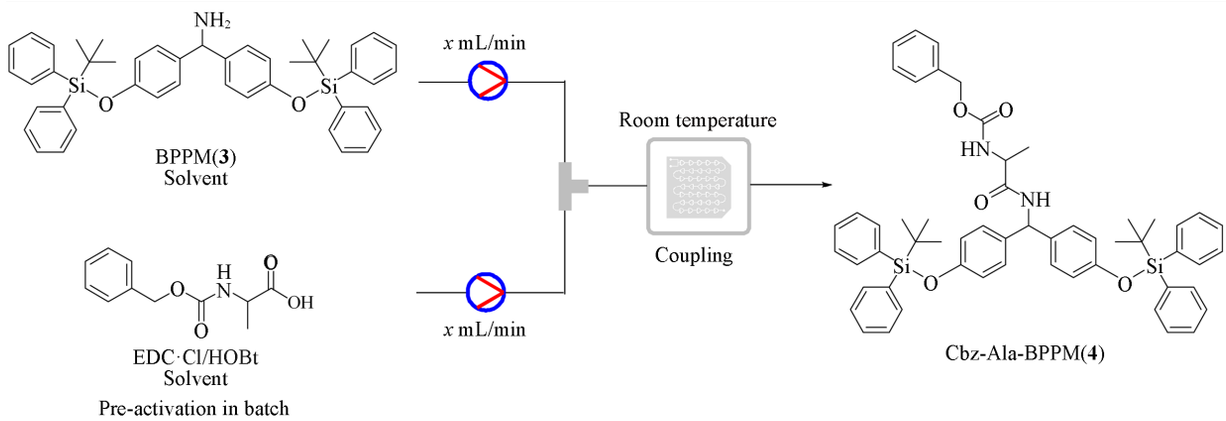
2.1 连续流动偶联反应条件的优化

以可溶性疏水硅基载体BPPM和Cbz-Ala-OH为标准底物合成Cbz-Ala-BPPM(**4**)作为模板反应，考察了室温条件下连续流动偶联反应条件的影响，结果如表2所示. 在相同恒流泵流速条件下，溶剂的选择对连续流动偶联反应的影响较大，偶联反应在DCM和THF中的转化率较低，可能是由于氨基酸在DCM和THF中的预活化效果较差所致(表2中Entries 3~5). 在EA中的反应效果最好，反应原料可以完全转化，产率为96%. 使用EA为反应溶剂，对恒流泵的流速进行了筛选. 结果表明，恒流泵流速的大

小对偶联反应几乎无影响，因此为提高反应效率可以选用更大的流速(表2中Entries 1~3)．综上，选择EA作为反应溶剂，控制恒流泵流速为10 mL/min作为连续流动偶联反应的最优条件，微通道反应器中偶联反应的时间仅仅为9.0 s(表2中Entry 3)．微通道反应器的详细参数列于表3.

Table 2　Optimization of continuous flow coupling conditions

Entry	Solvent	Flow rate, x/(mL·min^{-1})	Reaction time[a]/s	Conversion[b](%)	Yield[c](%)
1	EA	2.0	45.0	>99	97
2	EA	6.0	15.0	>99	96
3	EA	10.0	9.0	>99	96
4	DCM	10.0	9.0	84	80
5	THF	10.0	9.0	27	22



a. Residence time in microchannel reactor; *b*. conversion was determined by HPLC analysis; *c*. yield was determined by ^{1}H NMR analysis.

Table 3　Detailed parameters of microchannel reactor

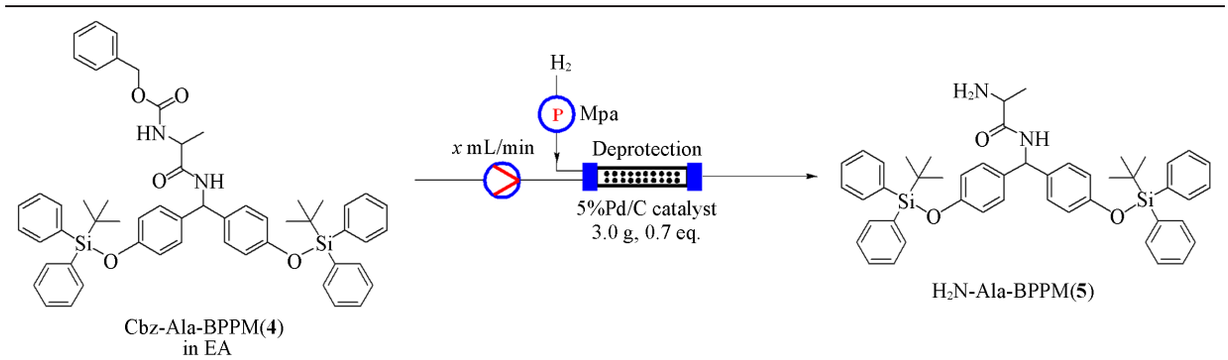
Material	External dimension/mm	Volume/mL	Maximum pressure/MPa	Suitable temperature/℃
Silicon glass	152.4×152.4×11.0	3.0	2.0	−25—200

2.2　连续流动脱保护反应条件的优化

以化合物Cbz-Ala-BPPM(**4**)为标准底物合成H-Ala-BPPM(**5**)作为模板反应，考察了室温条件下连续流动脱保护条件对反应的影响，结果如表4所示．为了实现整个连续流动合成系统的连续性，偶联和脱保护需要使用相同的溶剂，所以脱保护反应条件筛选过程中均使用乙酸乙酯作为溶剂．在相同的

Table 4　Optimization of continuous flow of Cbz-deprotection conditions

Entry	Flow rate, x/(mL/min)	Pressure/Mpa	Reaction time[a]/s	Conversion[b] (%)	Yield[c] (%)
1	2.0	0.5	235.5	81	78
2	6.0	0.5	78.5	73	67
3	10.0	0.5	47.1	48	43
4	10.0	0.3	47.1	37	30
5	6.0	1.0	78.5	>99	95
6	10.0	1.0	47.1	>99	96



a. Residence time in microchannel reactor; *b*. conversion was determined by HPLC analysis; *c*. yield was determined by ^{1}H NMR analysis.

氢气压力下，恒流泵的流速越大，越不利于脱保护反应的转化．这可能是流速过大，反应液和氢气在5%钯碳催化剂的填充床反应器中的混合效果较差所致(表4中Entries 1~3)．在相同的恒流泵流速条件下，氢气的压力越大，产物的转化率越高(表4中Entries 2，5和3，10)．当氢气压力达到1.0 MPa时，无论流速快慢反应液均可完全转化，产率为96%．其原因可能是当氢气压力足够大时，气液相在5%钯碳催化剂的填充床反应器中混合效果好，脱保护反应完全．综上，选择氢气压力为1.0 MPa，控制恒流泵流速为10 mL/min作为连续流动脱保护反应的最优条件，填充床反应器中脱保护反应的时间仅为47.1 s(表4中Entry 6)．填充床反应器的详细参数如表5所示．

Table 5　Detailed parameters of packed-bed reactor

Material	External dimension/mm	Volume/mL	Filling material
Stainless steel	100.0×10.0	7.85	5% Pd/C catalyst，3 g

2.3　固相合成与连续流液相合成对比

2.3.1　时间、纯度和产率对比　利用固相合成法合成了等量维洛斯肽，从时间、纯度和产率方面与连续流液相合成方法进行了对比，结果如表6所示．通常情况下，固相合成方法完成一个完整的偶联、脱保护和洗涤过程约需1.2 h，而连续流动液相合成则仅需5 min．固相和连续流动液相合成维洛斯肽的纯度和产率几乎相同．固相合成产率虽然略高于连续流动液相合成，但其纯度略低于液相合成以及连续流动液相合成．HPLC纯度对比如图1所示，固相合成维洛斯肽纯度为93%，连续流动液相合成维洛斯肽纯度为95%．

Table 6　Comparison of synthesis time, purity and yield of Vialox peptide

Synthesis method	Time/min	Purity(%)	Yield(%)
SPPS	360	93	92
Continuous flow LPPS	25	95	90

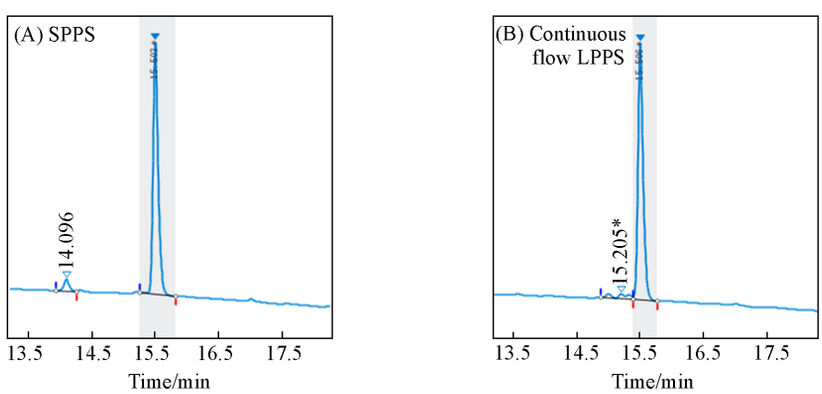


Fig. 1　Comparison of HPLC purity of Vialox peptide

Agilent 1260, ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm×100 mm, 3.5 μm, 30 ℃. Mobile phase A: H_2O+0.08% TFA; mobile phase B: MeOH+0.08% TFA. Ratio of mobile phase B: 0—20 min, 5%—95%; flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, 214 nm.

2.3.2　PMI对比　过程质量强度(PMI)是整个反应过程中投入的原料总质量与产出的产物质量之比，是基于质量的关键指标[27,28]．PMI作为用于评估制药行业可持续发展的指数已被广泛采纳．PMI指数越低，反应越绿色环保．根据维洛斯肽固相和连续流动液相合成投入总质量与产物的质量之比，计算得出PMI如图2示．可见，连续流动液相合成的PMI指数远低于传统固相合成，主要是因为固相合成非均相反应体系投料量远大于连续流动液相合成，所以连续流动液相合成具有更高的原子经济性和环境友好性．

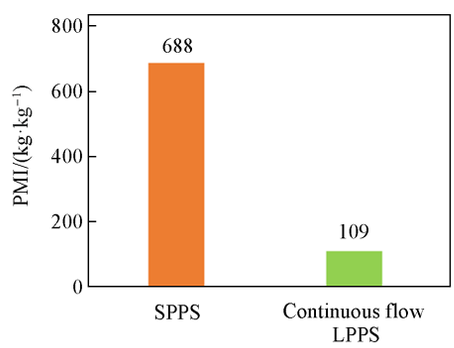


Fig. 2　PMI data for synthesis of Vialox peptide

3 结　论

基于脂溶性载体和连续流动合成方法的优势，开发了一种原子经济高效且快速的连续流动多肽合成策略．设计合成了脂溶性硅基载体BPPM代替固相合成中的树脂，结合连续流动多肽合成装置，实现了维洛斯肽的快速、绿色合成．通过优化连续流偶联和脱保护反应条件，使得偶联反应仅需要9.0 s，脱保护反应仅需要47.1 s，后处理过程水洗仅需要18.0 s，显著提升了肽合成的效率．这种环境友好的肽合成方法使得快速有效的绿色肽合成成为可能．研究成果为实现多肽药物的大规模快速绿色生产奠定了基础．

支持信息见http: //www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240024.

参　考　文　献

[1] Muttenthaler M., King G. E., Adams D. J., Alewood P. F., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2021**, *20*(4), 309—325
[2] Drucker D. J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2020**, *19*(4), 277—289
[3] Finking R., Marahiel M. A., *Annu. Rev. Microbiol.*, **2004**, *58*, 453—488
[4] Kawamata Y., Vantourout J. C., Hickey D. P., Bai P., Chen L. R., Hou Q. L., Qiao W. H., Barman K., Edwards M. A., Garrido-Castro A. F., deGruyter J. N., Nakamura H., Knouse K., Qin C. G., Clay K. J., Bao D. H., Li C., Starr J. T., Garcia-Irizarry C., Sach N., White H. S., Neurock M., Minteer S. D., Baran P. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(15), 6392—6402
[5] Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*(14), 2149—2154
[6] Vigneaud V. D., Ressler C., Swan C. J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G., Gordon S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*(19), 4879—4880
[7] Zompra A. A., Galanis A. S., Werbitzky O., Albericio F., *Future Med. Chem.*, **2009**, *1*(2), 361—377
[8] Sharma A., Kumar A., de la Torre B. G., Albericio F., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(16), 13516—13546
[9] Pillai V. N. R., Mutter M., Bayer E., Gatfield I., *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*(26), 5364—5370
[10] Okada Y., Suzuki H., Nakae T., Fujita S., Abe H., Nagano K., Yamada T., Ebata N., Kim S., Chiba K., *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*(2), 320—327
[11] Fujita Y., Fujita S., Okada Y., Chiba K., *Org. Lett.*, **2013**, *15*(6), 1155—1157
[12] Aihara K., Komiya C., Shigenaga A., Inokuma T., Takahashi D., Otaka A., *Org. Lett.*, **2015**, *17*(3), 696—699
[13] Takahashi D., Inomata T., Fukui T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(27), 7803—7807
[14] Kaur P., Wever W., Pindi S., Milles R., Gu P., Shi M., Li G. G., *Green Chem.*, **2011**, *13*(5), 1288—1292
[15] Wu J. B., An G. H., Lin S. Q., Xie J. B., Zhou W., Sun H., Pan Y., Li G. G., *Chem. Commun.*, **2014**, *50*(10), 1259—1261
[16] An G. H., Seifert C., Li G. G., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*(6), 1600—1617
[17] Li H. D., Chao J., Hasan J., Tian G., Jin Y. T., Zhang Z. X., Qin C. G., *J. Org. Chem.*, **2020**, *85*(10), 6271—6280
[18] Li H. D., Chao J., Tian G., Hasan J., Jin Y. T., Zhang Z. X., Qin C. G., *Org. Chem. Front.*, **2020**, *7*(4), 689—696
[19] Li H. D., Chao J., Zhang Z. X., Tian G., Li J., Chang N. H., Qin C. G., *Org. Lett.*, **2020**, *22*(9), 3323—3328
[20] Wu A., Ramakrishna I., Hattori T., Yamamoto H., *Org. Biomol. Chem.*, **2022**, *20*(44), 8685—8692
[21] Guidi M., Seeberger P. H., Gilmore K., *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, *49*(24), 8910—8932
[22] Movsisyan M., Delbeke E. I. P., Berton J. K. E. T., Battilocchio C., Ley S. V., Stevens C. V., *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, *45*(18), 4892—4928
[23] Fuse S., Mifune Y., Nakamura H., Tanaka H., *Nat. Commun.*, **2016**, *7*(1), 13491—13497
[24] Hartrampf N., Saebi A., Poskus M., Gates Z. P., Callahan A. J., Cowfer A. E., Hanna S., Antilla S., Schissel C. K., Quartararo A. J., Ye X., Mijalis A. J., Simon M. D., Loas A., Liu S., Jessen C., Nielsen T. E., Pentelute B. L., *Science*, **2020**, *368*(6494), 980—987
[25] Otake Y., Adachi K., Yamashita Y., Iwanaga N., Sunakawa H., Shamoto T., Ogawa J. I., Ito A., Kobayashi Y., Masuya K., Fuse S., Kuboa D., Itoha H., *React. Chem. Eng.*, **2023**, *8*(4), 863—870
[26] Fickenscher K., Aab A., Stüber W., *Thromb. Haemostasis*, **1991**, *65*(5), 535—540
[27] Erythropel H. C., Zimmerman J. B., de Winter T. M., Petitjean L., Melnikov F., Lam C. H., Lounsbury A. W., Mellor K. E., Janković N. Z., Tu Q. S., Pincus L. N., Falinski M. M., Shi W. B., Coish P., Plata D. L., Anastas P. T., *Green Chem.*, **2018**, *20*(9), 1929—1961
[28] Sabatini M. T., Boulton L. T., Sneddon H. F., Sheppard T. D., *Nat. Catal.*, **2019**, *2*(1), 10—17

(Ed.: L, W, K)