

研究简报 ·

五氯化磷辅助下氨基酸的自组装成肽反应研究

卢奎^{a, b} 刘艳^c 周宁^d 陈益^a 冯玉萍^a
郭祥峰^a 陈玮^d 屈凌波^c 赵玉芬^{*, a, c, d}

(^a 清华大学生命科学与工程研究院 化学系 生命有机磷化学教育部重点实验室 北京 100084)

(^b 郑州工程学院化学化工系 郑州 450052) (^c 郑州大学化学系 郑州 450052)

(^d 厦门大学化学化工学院 厦门 361005)

摘要 *L*-氨基酸和 *D*-氨基酸可与五氯化磷直接发生磷酸化反应,随后自组装成多肽,但 α -氨基酸不能成肽,*DL*-氨基酸成肽困难;在 SOCl_2 存在下, α -氨基酸也不能成肽.用电喷雾质谱研究了氨基酸的自组装反应.反应过程中有五元环状的氨基酸五配位磷中间体生成,使用硅烷基保护的氨基酸,在 ^{31}P NMR 中可观察到五配位磷中间体.

关键词 氨基酸,五氯化磷,自组装,多肽,电喷雾质谱

Studies on the Self-assembly of Amino Acids into Peptides Mediated by Phosphorus Pentachloride

LU, Kui^{a, b} LIU, Yan^c ZHOU, Ning^d CHEN, Yi^a FENG, Yu-Ping^a
GUO, Xiang-Feng^a CHEN, Wei^d QU, Ling-Bo^c ZHAO, Yu-Fen^{*, a, c, d}

(^a Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry of Ministry of Education, Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084;

^b Department of Chemistry and Chemical Engineering, Zhengzhou Institute of Technology, Zhengzhou 450052;

^c Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052;

^d Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract *L*-Amino acids and *D*-amino acids, mediated by phosphorus pentachloride, could take place the phosphorylation and then assembled into polypeptides. However, α -amino acids could not assemble into polypeptides, and the self-assembly of *DL*-amino acids into peptides were difficult. α -Amino acids could not assemble into peptides mediated by thionyl chloride. The self-assembly reactions were studied by positive ion electrospray ionization mass spectrometry, and the five-membered cyclic penta-coordinated phosphoryl amino acid intermediates were found in the course of self-assembly into peptides. The intermediates could be trapped by ^{31}P NMR spectroscopy after amino acids were trimethylsilylized to *N*, *O*-bis(trimethylsilyl) amino acids.

Key words amino acids, phosphorus pentachloride, self-assembly, peptide, ESI mass spectrometry

在生命化学中,磷和氨基酸具有重要地位.尽管已有许多有关化学进化过程中成肽反应的报导^[1-5],但关于早期地球上蛋白质的形成以及磷和

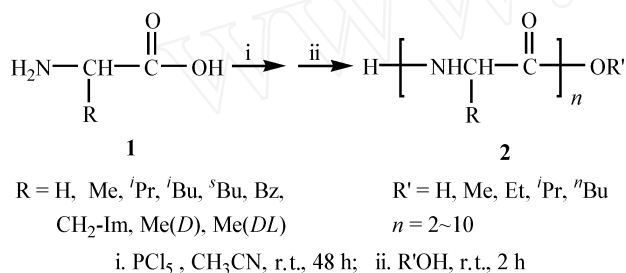
氨基酸的内在联系的研究并不多,天然蛋白质的骨架为什么仅由 α -氨基酸组成也未得到很好解释.本实验室多年的研究结果发现, α -氨基酸在水-醇体

* E-mail: yfzhao@tsinghua.edu.cn, lucky Luke @263.net

Received June 19, 2001; revised September 26, 2001; accepted October 23, 2001.

国家自然科学基金(No. 39870415)资助项目.

系中磷酸化为 *N*-磷酸-氨基酸后,可以发生许多生物有机反应,如成肽反应^[6]、成酯反应^[7]、磷上酯交换反应^[8]和磷上的分子内 *N*-*O* 迁移^[9]等. 这些结果表明,生命起源可能与 *N*-磷酸-氨基酸的进化有关^[10,11]. 我们曾报道^[12], *N*, *O*-二(三甲基硅基)-氨基酸与 *O*, *O*-亚苯基磷酰氯反应生成 *N*-磷酸-氨基酸后,可以发生自组装反应,得到七肽或八肽自组装产物. 通常,这些 *N*-磷酸-氨基酸是由二烷氧基磷酸(如二异丙氧基磷酸, DIPP)与-氨基酸^[13]或二烷(芳)氧基磷酰氯(如 *O*, *O*-亚苯基磷酰氯)与 *N*, *O*-二(三甲基硅基)-氨基酸反应得到的^[14]. 本文用五氯化磷与-氨基酸直接进行磷酸化反应, 48 h 后对反应混合物进行水解或醇解, 经电喷雾质谱(ESFMS)分析, 发现也得到了氨基酸的自组装产物多肽或多肽酯(Scheme 1). 这一结果为氨基酸的自组装成肽反应提供了新的简便方法.



Scheme 1

1 实验

³¹P NMR 用 Bruker AC 200P 核磁共振仪测定, CH₂Cl₂ 或 CH₃CN 为溶剂, 85% H₃PO₄ 为外标. 正离子电喷雾质谱(ESFMS)和电喷雾多级质谱(ESFMS/MS)用 Bruker Esquire 2000 离子阱液相色谱质谱仪测定. 试剂为分析纯或生化试剂, 溶剂均经标准方法干燥.

1.1 五氯化磷与氨基酸的反应

一般方法: 10.0 mmol 氨基酸与 10.0 mmol (2.09 g) 五氯化磷的 30 mL 乙腈溶液, 室温搅拌 48 h. 以水或醇分解反应混合物, 进行电喷雾质谱分析.

L-丙氨酸与五氯化磷的反应: 2.0 mmol (0.18 g) *L*-丙氨酸与 2.0 mmol (0.42 g) 五氯化磷的 10 mL 乙腈溶液, 室温搅拌 0.5 h, 对反应混合物进行电喷雾质谱分析. ESFMS *m/z*: 224 (226), 241 (243). 反

应混合物用异丙醇分解后, 进行³¹P NMR 和正离子电喷雾质谱分析. ³¹P NMR 6.1. ESFMS *m/z* (%): 367 (26.5, 磷酸化二肽), 296 (100), 254 (43.9), 212 (95.5), 170 (55.9). ESFMS/MS (296) *m/z* (%): 296 (6.0), 254 (100), 212 (40.5), 170 (5.6). ESFMS/MS (296/254) *m/z* (%): 254 (21.5), 212 (100), 170 (5.6). ESFMS/MS (296/254/212) *m/z* (%): 212 (22.9), 170 (100), 152 (3.7), 124 (7.7). ESFMS/MS (296/254/212/170) *m/z* (%): 170 (30.7), 152 (36.1), 124 (100). ESFMS/MS (296/254/212/170/124) *m/z* (%): 124 (100), 106 (93.0).

1.2 氯化亚砷与 *L*-丙氨酸的反应

10.0 mmol (0.89 g) *L*-丙氨酸与 10.0 mmol (1.19 g) 氯化亚砷的 25 mL 乙腈溶液, 室温搅拌 48 h. 以甲醇分解反应混合物, 进行电喷雾质谱分析. ESFMS *m/z*: 104 (*L*-Ala-OMe).

1.3 *N*, *O*-二(三甲基硅基)-*L*-丙氨酸与五氯化磷的反应

氮气保护下, 将按文献[15]方法新制的 6.0 mmol (2.33 g) *N*, *O*-二(三甲基硅基)-*L*-丙氨酸的 10 mL 无水 CH₂Cl₂ 溶液滴加到 6.0 mmol (1.25 g) 五氯化磷的 15 mL 无水 CH₂Cl₂ 溶液中. 室温搅拌反应混合物, 并用³¹P NMR 跟踪反应. 五配位磷中间体的信号出现在 -52.6 和 -51.4 处.

2 结果与讨论

氨基酸与 PCl₅ 的反应混合物经醇解或水解后, 进行 ESFMS/MS 分析, 发现生成了长度不同的多肽(表 1). 以缬氨酸与 PCl₅ 反应混合物的甲醇分解物为代表, 其正离子 ESFMS 给出了一系列 *m/z* 132 + 99*n* 的质量峰(图 1), 分别对应从缬氨酸甲酯到九肽甲酯.

从表 1 可以看出, 在 PCl₅ 辅助下, *L*-Ala、*D*-Ala、*L*-Val、*L*-Leu 和 *L*-Ile 一般可自组装到 8~10 肽, 但 *L*-Phe 和 *L*-His 只自组装到 3~4 肽, 这可能与它们的体积较大、空间阻碍较强、自组装速率较慢有关; 对于 Gly 来说, 虽然体积最小, 但已发现其磷酸化反应的活性是最低的^[14], 这里得到的也仅是磷酸化二肽、三肽; *D*-丙氨酸、*L*-丙氨酸在自组装成肽时几乎没有差别, 但 *DL*-丙氨酸的自组装却很困难, 仅有二肽和三肽生成, 这可能与自组装反应的手性选择有关.

表 1 五氯化磷辅助下氨基酸自组装 (48 h) 产物的正离子电喷雾质谱数据

Table 1 ESFMS data of oligomers from amino acids self-assembly mediated by phosphorus pentachloride for 48 h

氨基酸	产物	m/z (%)									
		单体	二肽	三肽	四肽	五肽	六肽	七肽	八肽	九肽	十肽
<i>L</i> -Ala	(Ala) _n OH	90(13)	161(100)	232(8.5)	303(12)	374(16)	445(32)	516(36)	587(37)	658(32)	729(16)
	(Ala) _n OMe	104(91)	175(100)	246(8.7)	317(16)	388(29)	459(35)	530(24)	601(8.8)	672(3.0)	743(2.3)
	(Ala) _n OEt	118(98)	189(100)	260(10)	331(21)	402(32)	473(53)	544(38)	615(20)	686(15)	757(3.6)
	(Ala) _n OPr ⁱ	132(71)	203(100)	274(9.2)	345(15)	416(32)	487(27)	558(17)	629(11)	700(7.8)	771(1.3)
	(Ala) _n OBu ⁿ	146(88)	217(100)	288(12)	359(11)	430(17)	501(19)	572(21)	643(13)	714(7.0)	785(6.9)
<i>L</i> -Val	(Val) _n OH	118(40)	217(100)	316(40)	415(64)	514(73)	613(90)	712(89)	811(71)	910(56)	
	(Val) _n OMe	132(56)	231(100)	330(14)	429(35)	528(60)	627(72)	726(40)	825(34)	924(9.6)	
<i>L</i> -Leu	(Leu) _n OMe	146(80)	259(100)	372(17)	485(18)	598(22)	711(39)	824(28)	937(16)		
<i>L</i> -Ile	(Ile) _n OMe	146(30)	259(100)	372(11)	485(12)	598(18)	711(16)	824(17)	937(5.4)	1050(2.7)	
Gly	(MeO) ₂ PO(Gly) _n OMe	198(100)	255(17)	312(21)							
<i>L</i> -Phe	(Phe) _n OMe	180(100)	327(71)	474(31)							
<i>L</i> -His	(His) _n OMe	170(100)	307(84)	444(88)	581(37)						
<i>D</i> -Ala	(Ala) _n OMe	104(25)	175(48)	246(22)	317(6.2)	388(18)	459(33)	530(50)	601(81)	672(100)	743(42)
<i>DL</i> -Ala	(Ala) _n OMe	104(69)	175(100)	246(16)							
-Ala	(-Ala) _n OMe	104									

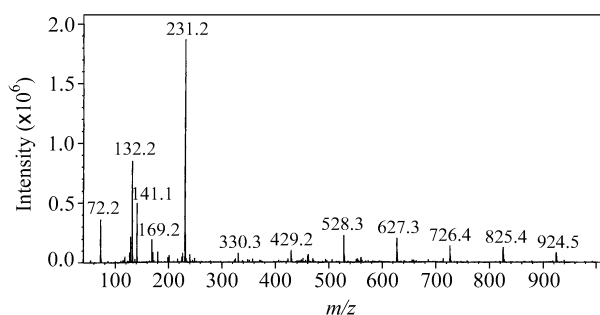


图 1 五氯化磷辅助下缬氨酸自组装 (48 h) 产物的正离子电喷雾质谱图

Figure 1 ESFMS of oligomers from *L*-valine self-assembly mediated by PCl_5 for 48 h

实验发现,随着反应时间的延长,所形成的肽的长度也会增加。例如,图 2 为 *L*-Val 与 PCl_5 的反应混合物在放置数周后甲醇分解产物的 ESFMS 图,与图 1 相比可知,最长的肽由九肽增大到十四肽,且 8~11 肽的丰度较高,七肽以下的丰度较小,而氨基酸单体基本消失。这表明反应混合物在放置的过程中继续进行着自组装反应,且向着形成更大肽的方向进行。

固然, PCl_5 与氨基酸可以生成酰氯,但由 SOCl_2

与 *L*-丙氨酸的反应不能成肽可以看出,氨基酰氯在酸性条件下是不能发生自组装反应形成多肽的。由此可见,氨基酸的自组装成肽反应与磷的存在有密切关系,这同时也说明磷可能与生命活动的调控中心有关。

在 PCl_5 辅助下,氨基酸分子中羧基和氨基的两个活泼氢原子首先与五氯化磷反应,脱去两分子 HCl ,形成具有五元环结构的氨基酸五配位磷化合物中间体;然后,该活化的中间体接受氨基酸的进攻,自组装而形成肽。氨基酸的自组装成肽反应可被水、醇等终止,当氨基酸五配位磷化合物中间体受到醇的进攻时,则形成磷酸化氨基酸酯 (Scheme 2)。如 *L*-丙氨酸与 PCl_5 反应 0.5 h 后,用异丙醇分解反应混合物,其正离子 ESFMS 在 m/z 296 给出一个强度很高的质量峰,经多级 ESFMS/MS 分析,证实该质量峰为 *N*-(*O*, *O*-二异丙基磷酰)-*L*-丙氨酸异丙酯;在 m/z 254、212、170 给出的质量峰,则分别对应磷酸-*L*-丙氨酸未完全酯化的产物或者是 m/z 296 的质量峰分别脱去 1~3 个丙烯分子的碎片峰。另外,该异丙醇分解物的 ^{31}P NMR 在 δ 6.1 处给出四配位磷酸化氨基酸酯的共振信号,也证实生成了磷酸化氨基酸酯。磷酸化氨基酸酯的生成,表明五氯化磷可直接与氨基酸发生磷酸化反应。

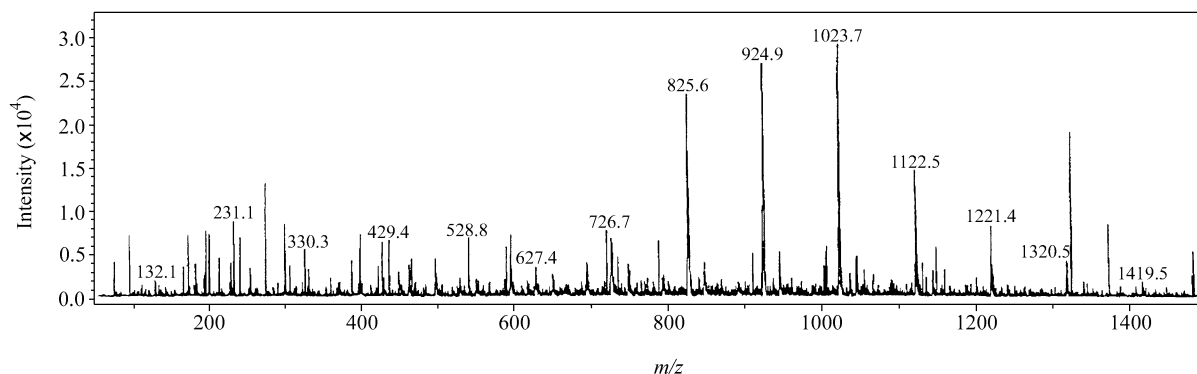
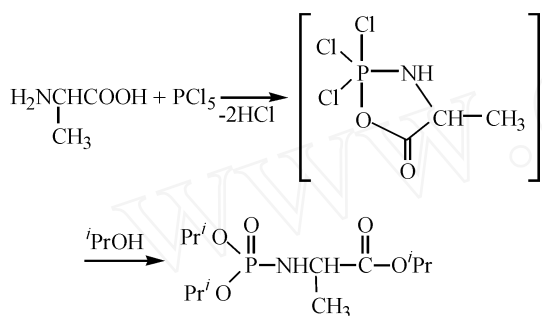
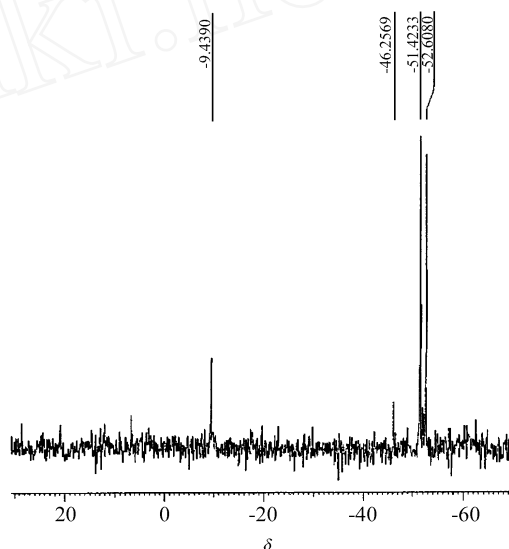
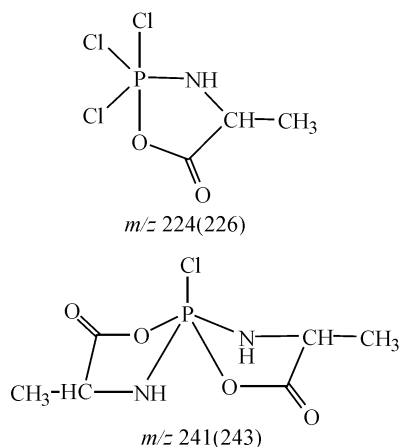


图2 五氯化磷辅助下缬氨酸自组装(8周)产物的正离子电喷雾质谱图

Figure 2 ESFMS of oligomers from *L*-valine self-assembly mediated by PCl_5 for eight weeks

对于磷化合物反应过程的监测, ^{31}P NMR 是最常用的手段. 尽管四配位磷化合物在 ^{31}P NMR 中给出了非常强的信号,但遗憾的是因为反应体系中存在活泼氢原子,使得五配位磷中间体很不稳定而无法被检测到. 为了观察五配位磷中间体,我们以 *L*-丙氨酸为代表,首先进行硅烷基化保护,然后让其与 PCl_5 在无水 CH_2Cl_2 中反应,并用 ^{31}P NMR 谱进行跟踪,结果在 -52.6 和 -51.4 处观察到了它们所形成的五配位磷中间体的信号^[14](图3). *L*-丙氨酸与等摩尔的五氯化磷在无水乙腈中反应 0.5 h 后,对反应混合物直接进行正离子 ESFMS 分析,结果给出了 m/z 224 (226) 和 241 (243) 的质量峰,它们分别对应环状和螺环丙氨酸五配位磷化合物中间体(Scheme 3). 这些结果表明,五氯化磷与氨基酸可以发生磷酸化反应生成氨基酸五配位磷化合物. 这同时也为氨基酸的自组装成肽反应经历氨基酸五配位磷化合物中间体的可能机理提供了证据.

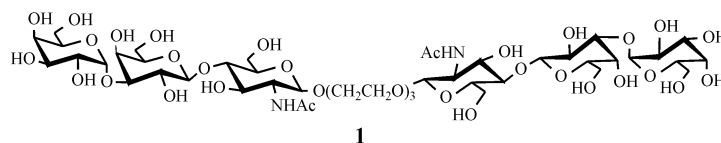
α -氨基酸与 PCl_5 经历五元环状五配位磷中间体自组装成肽的反应,说明了磷在多肽的前生命合成及蛋白质的生物合成方面的重要意义,同时为大自然根据磷酸氨基酸的五元环特性选择 α -氨基酸提供了依据.

图3 BTMS-*L*-Ala 与 PCl_5 生成五配位磷中间体的 ^{31}P NMR 谱图Figure 3 ^{31}P NMR spectrum of pentar-coordinated phosphorus intermediates formed by PCl_5 with BTMS-*L*-Ala

References

- 1 Bailey, J. J. *Chem. Soc.* **1950**, 3461.
- 2 Kovacs, J. ; Nagy, H. *Nature* **1961**, 190, 531.
- 3 Miller, S. L. ; Orgel, L. E. *The Origins of Life on the Earth*, Prentice Hall Inc. , Englewood Cliffs, New Jersey, U. S. A. , **1974**.
- 4 Fox, S. W. ; Dose, K. *Molecular Evolution and the Origins of Life*, 2nd Edn. , Marcel Dekker, New York, **1977**.
- 5 Munegumi, T. ; Suzuki, N. ; Tanikawa, N. ; Hanada, K. *Chem. Lett.* **1992**, 1679.
- 6 Zhao, Y.-F. ; Ju, Y. ; Li, Y.-M. ; Wang, Q. ; Yin, Y.-W. ; Tan, B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, 45, 514.
- 7 Li, Y.-M. ; Zhao, Y.-F. *Phosphorus, Sulfur Silicon* **1993**, 78, 15.
- 8 Tan, B. ; Zhao, Y.-F. *Chin. J. Org. Chem.* **1995**, 15, 30 (in Chinese).
(谭波, 赵玉芬, 有机化学, **1995**, 15, 30.)
- 9 Yin, Y.-W. ; Zhang, B.-Z. ; Chen, Y. ; Zhao, Y.-F. *Chin. Sci. Bull.* **1994**, 39, 333 (in Chinese).
(尹应武, 张保忠, 陈益, 赵玉芬, 科学通报, **1994**, 39, 333.)
- 10 Zhao, Y.-F. ; Cao, P.-S. *J. Biol. Phys.* **1994**, 20, 283.
- 11 Zhao, Y.-F. ; Cao, P.-S. *Chemical Evolution: Physics of the Origin and Evolution of Life*, Eds. : Chela-Flores, J. ; Raulin, F. , Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **1996**, p. 279.
- 12 Fu, H. ; Li, Z.-L. ; Zhao, Y.-F. ; Tu, G.-Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 291.
- 13 Ji, G.-J. ; Xue, C.-B. ; Zeng, J.-N. ; Li, L.-P. ; Chai, W.-G. ; Zhao, Y.-F. *Synthesis* **1988**, 444.
- 14 Wang, Q. ; Zhao, Y.-F. ; An, F.-L. ; Mao, Y.-Q. ; Wang, Q.-Z. *Sci. China, Ser. B* **1995**, 25, 683 (in Chinese).
(王倩, 赵玉芬, 安逢龙, 毛应群, 王芹珠, 中国科学(B辑), **1995**, 25, 683.)
- 15 Smith, E. D. ; Sheppard, H. *Nature* **1965**, 208, 878.
(A0106194 PAN, B. F. ; DONG, H. Z.)

Synthesis of a Divalent O-glycoside of Related Trisaccharide Epitope Involved in the Hyperacute Rejection of Xenotransplantation

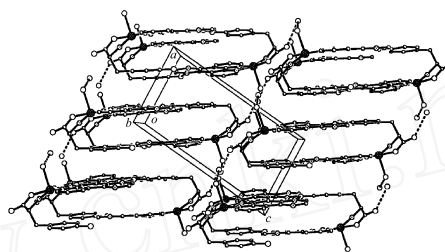


3,6-Dioxaoctylene 1,8-di-O-(4-O-[(3-O-D-galactopyranosyl)-D-galactopyranosyl]-2-deoxy-2-acetamino-D-glucopyranoside) (1), useful in the research of hyperacute rejection of xenotransplantation, was synthesized for the first time.

LU, Yi-Pin; SU, Bin; LI, Qing; LI, Hui; CAI, Meng-Shen; LI, Zhong-Jun

Acta Chimica Sinica 2002, 60(2), 360

Synthesis, Crystal Structure and Aromatic-ring Stacking Interaction of Ternary Complex [Cu(L-tyr)(TATP)(H₂O)]ClO₄·H₂O

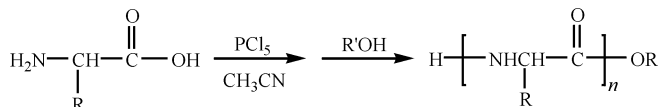


Ternary complex [Cu(L-tyr)(TATP)(H₂O)]ClO₄·H₂O was synthesized and characterized by IR, ESR and X-ray diffraction, where there are intermolecular and intramolecular aromatic-ring stacking between the TATP ring and the phenyl-ring of L-tyr.

LE, Xue-Yi; TONG, Ming-Liang; FU, Yir-Lian; JI, Liang-Nian

Acta Chimica Sinica 2002, 60(2), 367

Studies on the Self-assembly of Amino Acids into Peptides Mediated by Phosphorus Pentachloride



R' = H, Me, Et, ^tPr, ⁿBu
n = 2-10

LU, Kui; LIU, Yan; ZHOU, Ning; CHEN, Yi; FENG, Yu-Ping; GUO, Xiang-Feng; CHEN, Wei; QU, Ling-Bo; ZHAO, Yir-Fen

Acta Chimica Sinica 2002, 60(2), 372

-Amino acids could be phosphorylated and then assembled into oligo-peptides mediated by phosphorus pentachloride. Under the same condition, -amino acids could not be assembled into peptides at all.

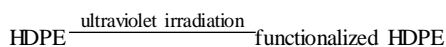
Investigation of -Amylase Self-assembled Films on the Negatively Charged PET by AFM

HE, Lin; LIN, Xian-Fu; CHEN, Zhi-Chun; LI, Yang-Mei; XU, Li-Heng

Acta Chimica Sinica 2002, 60(2), 377

Driven by electrostatic attraction, positive molecules of -amylase self-assemble on the negative PET substrate, resulting in the formation of -amylase/PET self-assembled layer, whose topographies are investigated by AFM. The pH value of -amylase solution and the charge density of substrate are two important factors during the processing of self-assembly.

Effect of Environmental Temperature on Chemical Structure and Properties of Ultraviolet Irradiated HDPE



The such as oxygen-containing groups C—O, C=O and C(=O)O are introduced onto HDPE molecular chain through ultraviolet irradiation in air. Amount of the oxygen-containing groups of the irradiated HDPE and its compatibilization in HDPE/PVA blend increase with environmental temperature under ultraviolet irradiation.

WU, Shi-Shan

Acta Chimica Sinica 2002, 60(2), 382