

微液滴质谱法促进的酰胺键构建及其 在小分子和蛋白偶联中的应用

姜 雪^{1,2}, 杨黄丽^{2,3}, 刘晓燕^{1,2}, 肖 伟^{2,4}, 邱 萌²,
程志刚^{2,4}, 周 振³, 涂其冬¹, 高校飞²

(1. 江西科技师范大学药学院, 江西省药物分子设计与评价重点实验室, 江西 南昌 330013; 2. 东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013; 3. 暨南大学, 质谱仪器与大气环境研究所, 广东 广州 510630;
4. 武汉百科药物开发有限公司, 湖北 武汉 430056)

摘要: 酰胺键的构建在小分子药物合成、高分子材料合成和修饰、抗体药物偶联物的制备中具有重要作用。本研究探讨了电喷雾微液滴质谱技术促进酯氨解形成酰胺键的优势, 以及在小分子-蛋白共价偶联复合物制备方面的应用。以 4-硝基苯基-2-((苄氧基)羰基)氨基)乙酸酯(Z-Gly-ONP)与溶菌酶的游离氨基氨解反应为模型, 研究电喷雾微液滴技术中样品流速、鞘气压力、电场强度、溶剂极性等对酰胺键偶联效率的影响。结果表明, 样品流速和鞘气压力在微液滴中酯氨解构建酰胺键反应过程中发挥着主要作用。这可能是由于在电喷雾过程中, 雾化气体气流大和样品流速低的情况下, 喷口处的样品溶液去溶剂化效率高, 导致样品的局部浓度提高, 促使样品分子之间发生碰撞的频率增大, 酰胺键形成反应的转化率提高。另外, 微液滴技术成功应用于肿瘤抗原多肽与模型蛋白的共价偶联, 蛋白偶联转化率达 89%, 且溶液相中反应剩余模型蛋白原料相对信号达 74%。同等条件下与溶液相比, 微液滴中 Z-Gly-ONP 与溶菌酶的游离氨基氨解形成酰胺键的转化率明显提高, 表明电喷雾微液滴技术在肿瘤抗原多肽-含 T 表位的载体蛋白共价偶联复合物的高效制备方面具有潜在的应用价值。

关键词: 电喷雾; 微液滴; 酰胺键形成; 氨解; 质谱

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)03-0277-09

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0135

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0135

Facilitated by Microdroplet Mass Spectrometry on Amide Bond Construction and its Application in Conjugation of Small Molecules and Proteins

JIANG Xue^{1,2}, YANG Huang-li^{2,3}, LIU Xiao-yan^{1,2}, XIAO Wei^{2,4}, QIU Meng²,
CHENG Zhi-gang^{2,4}, ZHOU Zhen³, TU Qi-dong¹, GAO Xiao-fei²

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Drug Design and Evaluation, School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013 China; 2. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang 330013, China;
3. Institute of Mass Spectrometry and Atmospheric Environment, Jinan University, Guangzhou 510630, China;
4. Wuhan Biocause Pharmaceutical Development Co., Ltd, Wuhan 430056, China)

Abstract: The construction of amide bonds plays a very important role in the production of small molecule drugs, preparation and modification of polymer materials, conjugation of proteins and

drugs, and the synthesis of vaccines, especially in the field of covalent coupling of tumor-associated antigens and carrier proteins. In this study, the advantages of electrospray microdroplet technology in promoting the aminolysis reaction between activated phenolic ester and the free amino groups in nature proteins for amide bond formation, and its application in the conjugation of small organic molecules with nature proteins were discussed. The effects of sample flow rate, sheath pressure, electric field strength and solvent polarity on the coupling efficiency of amide bonds in electrospray microdroplet technique were studied by using *N*-carbobenzoxycysteine 4-nitrophenyl ester (Z-Gly-ONP) and nature protein lysozyme as model substrates and employing an home-made device with two independent liquid channels for microdroplet generation. When the two kinds of microdroplets coming from the two liquid channels were fused, followed by the aminolysis reaction, and the mixtures of the microdroplet reaction were collected, dissolved, desalted, diluted and detected. The results after the optimization showed that, in the microdroplet system, although a certain amount of positive and high voltage will slightly improve the reaction conversion, the sample flow rate and sheath pressure play a major role in the amide bond formation reaction. Below a certain pressure of sheath gas, high pressure of the sheath gas and low flow rate of the sample will benefit for the desolvation efficiency of the sample solution at the nozzle, generating small particle size of the microdroplets and increasing of the local concentration of reactive substates and the frequency of collision between sample molecules, leading to the fast mass transfer between liquid containing active esters and liquid containing nature proteins. As a consequence, the conversion rate of protein covalent modification reaction in microdroplets is significantly higher than that in the bulk solution system under the same reactant conditions. Furthermore, the microdroplet chemistry has been successfully applied to the covalent coupling of tumor antigen peptides to nature protein lysozyme, with a conversion rate of 89%, which is much higher than that in the bulk solution system. The results of this study indicate that microdroplet chemistry has a potential in the efficient conjugation of tumor antigen polypeptides and T-epitope-containing carrier proteins.

Key words: electrospray; microdroplets; amide bond formation; aminolysis; mass spectrometry

酰胺键是重要的化学键, 是良好的氢键受体和氢键供体, 可以增加其所在分子的水溶性及其与靶点之间的相互作用, 如药物运载的肽树枝状大分子中的酰胺键能通过氢键作用模拟生物肽信号, 将药物分子运送至细胞内发挥作用^[1-2]。许多天然产物或者小分子药物中存在酰胺键结构。在售的小分子药物中有 25% 以上含有酰胺键结构, 且 2/3 以上化学合成的候选药物含有酰胺键结构。此外, 酰胺键还能够作为抗体药物偶联物的稳定连接子^[3], 保证有效载荷在细胞内的安全释放。同样, 在化学合成肿瘤疫苗领域, 不同功能的免疫活性组分通常也会以酰胺键形式共价偶联形成有效的疫苗结构^[4-5]。由此可见, 酰胺键的构建在小分子药物合成、高分子材料合成和修饰、抗体药物偶联物的制备中具有重要作用。

酰胺键的构建可以通过氨基 N 原子的酰化

来实现, 常用的酰化试剂包括酰卤、混合酸酐、活化酯以及酰基叠氮化物; 也可以利用缩合剂将羧酸与有机胺直接缩合构建酰胺键^[6-9]。其中, 酰卤法通常需要胺的用量至少超过化学计量的 1 倍; 酰基叠氮化物生成的叠氮酸具有毒性, 且中间体酰基叠氮稳定性较差, 极易分解; 酸酐法使羧酸先形成酸酐中间体, 再与氨基反应, 酸酐中间体极不稳定, 且反应过程中需要保持低温; 活化酯法是将羧酸转化为活泼酯, 然后通过氨解反应来实现酰胺键的构建。酯氨解形成肽键的策略在蛋白质化学修饰和合成领域有着重要应用^[4,10-11], 如利用硒酚酯氨解法实现 *N*-糖肽、肿瘤靶标抗原糖肽 MUC1 及抗原-蛋白偶联物的合成。虽然通过硒酚酯、五氟苯酚酯、琥珀酸酯等修饰的抗原分子氨解反应较快, 但其活性酯部位稳定性较差, 在偶联过程中易水解, 导致氨解

反应选择性低。一些活性较低的硫酚酯或氧酚酯^[12-13]稳定性好、水解副反应少,但反应速率慢、偶联效率低^[14]。因此,提高反应活性的同时实现良好的反应选择性是酚酯氨解形成酰胺键制备小分子-蛋白复合物的难点之一。

近几十年来,基于电喷雾质谱的微液滴化学已成为各种化学反应的便捷平台^[15-20]。电喷雾产生的微液滴具有独特的物理化学性质,如反应物在微液滴-气体界面附近的部分溶剂化、微液滴的极端pH值、溶剂的快速蒸发及原料局部浓度提升、界面附近的特殊电场以及增强的传质过程^[16]等。分子在液相和气相中反应速率的数量级差异归因于反应分子的溶剂化^[21],作为部分溶剂化典型代表的微液滴体系,其反应过程的能量显著低于本体溶液,反应速率显著高于本体溶液^[22]。据报道^[23-25],微液滴中的反应可被加速至本体溶液的 $10\sim 10^5$ 倍,反应产率大幅提高。例如,Cooks小组^[23]报道在碱催化的喷雾液滴条件下,克莱森-施密特缩合反应可在2.5 min内完成,而在本体溶液中通常需要几个小时。程和勇和刘金华等^[26]共同报道了酮肟通过贝克曼重排生成仲酰胺,在本体溶液中,几小时的回收率通常为10.1%~66.1%,而在微液滴体系中,几秒钟内的回收率高达78.7%~91.3%。在微液滴体系下实现加速的反应还有Suzuki偶联反应^[27]、Fisher吡啶合成反应^[28]、Eschenmoser偶联^[29]、Dakin反应^[30]、Baeyer-Villiger氧化^[30]、*N*-吡啶烷基化反应^[31]、Combes反应等^[32]。众多研究表明,电喷雾微液滴化学技术在提高反应速率和产率等方面有着巨大潜力。

本研究结合小分子酚酯衍生物氨解形成酰胺键的特点和电喷雾微液滴反应的技术优势,开发一种基于微液滴化学反应特性促进较低活性酯的快速氨解构建酰胺键的方法,以实现微液滴小分子-蛋白质的高效偶联,为蛋白质偶联复合物的制备提供有效的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

线性离子阱质谱仪:美国Thermo Fisher Scientific公司产品,配备Xcalibur程序;FA2204分析天平:上海良平仪器仪表有限公司产品;TG16.5台式高速离心机:上海卢湘仪离心机有限公司产

品;PHS-3E型pH计:上海雷磁仪器有限公司产品;VM-T1涡轮混匀仪:上海泰坦科技有限公司产品;JetSpinTM-15超滤管:广州洁特生物过滤有限公司产品;LSP01-1Y恒流泵:融柏恒流泵有限公司产品;同轴三通道型电喷雾喷头:由江西省质谱科学与仪器重点实验室自制;实验用水(高纯水):由7144型Thermo Scientific纯水仪制备;model-1000拉针仪:美国Sutter Instrument公司产品;高硼硅玻璃毛细管(1.2 mm×0.9 mm):世界精密仪器有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

溶菌酶($\sim 14\ 300$ u):北京索莱宝科技有限公司产品;4-硝基苯基-2-(((苄氧基)羰基)氨基)乙酸酯(Z-Gly-ONP,纯度 $\geq 97\%$):安耐吉化学试剂有限公司产品; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、*N,N*-二甲基甲酰胺:均为分析纯,上海泰坦科技有限公司产品;甲醇(色谱级 $\geq 99.9\%$):上海麦克林生化科技有限公司产品;熔融石英毛细管:美国安捷伦科技有限公司产品。

1.3 实验反应装置

电喷雾微液滴制备装置示于图1a,主要包括控制样品溶液流速的注射泵、调节雾化液滴表面电荷的高压电源、同轴三通道微液滴喷头(图1b)、收集反应产物的样品接收瓶。喷头的2个液路通道与固定在注射泵的2个样品注射器相连,气体通道通过peek管和固定接头与高压氮气相连,用以辅助液体通道中的样品溶剂雾化形成微小液滴,装置示意图示于图1c。同轴三通道喷头的管路是由L1(0.1 mm×0.19 mm)、L2(0.25 mm×0.35 mm)、L3(0.45 mm×0.65 mm)3层规格不同的熔融石英毛细管同轴组成,其中,L1和L2层套管分别流经样品溶液1和2,L3层套管流经氮气。由于3个管路是以同轴套管形式组装,管路中的物质在管内经过时互不接触,示于图1d,只在微液滴喷口处的三维空间内(样品接收瓶的空间)接触而发生物质交换,进行氨解得到共价偶联产物,其结构示于图1e。

1.4 实验条件

取27.2 mg溶菌酶于离心管中,加入3 mL 200 mmol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4),得到0.6 mmol/L蛋白溶液。取29.7 mg Z-Gly-ONP于离心管中,加入3 mL有机溶剂,得到30 mmol/L Z-Gly-ONP母液。将30 mmol/L Z-Gly-ONP母液

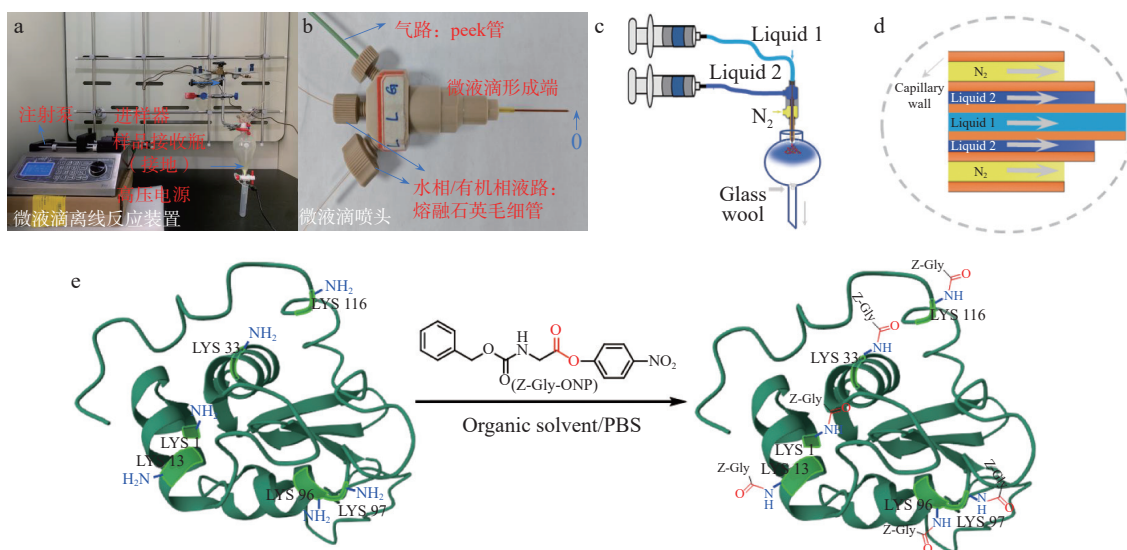


图1 微液滴离线反应装置(a)和三通道微液滴喷头(b)的实物图,微液滴离线反应装置示意图(c),喷头管道放大示意图(d)及模型蛋白和小分子酯反应示意图(e)

Fig. 1 Photos of a microdroplet reaction device (a) and a coaxial nozzle with three concentric capillaries (b), schematic diagram of a microdroplet offline reaction device (c), enlarged schematic diagram of nozzle tip (d) and reaction of model protein with ester (e)

稀释至 6.0 mmol/L, 用注射器分别吸取 1 mL 0.6 mmol/L 蛋白 PBS 溶液和 1 mL 6.0 mmol/L Z-Gly-ONP 有机溶液, 注射器针头通过管线及套管与三通喷头中 2 个液路相连, 气路通道与氮气钢瓶相连, 辅助液体雾化形成微液滴, 进行微液滴反应。雾化液滴反应出口与分液漏斗相连, 用以收集微液滴反应产物。反应结束后, 用 15 mL 甲醇-水-甲酸溶液 (49.9:49.9:0.2, $V/V/V$) 和 30 mL 水依次溶解漏斗中产物, 将所得溶液进行超滤浓缩除盐和质谱鉴定。另将 1 mL 0.6 mmol/L 蛋白 PBS 溶液和 1 mL 6.0 mmol/L Z-Gly-ONP 有机溶液于 10 mL 反应瓶中直接混合, 并在摇床均匀反应, 作为溶液相反应参照。与微液滴反应相同时间后, 加入 15 mL 甲醇-水-甲酸溶液 (49.9:49.9:0.2, $V/V/V$) 终止反应, 与微液滴反应产物进行相同的超滤、除盐、鉴定等操作。

在线性离子阱质谱仪上进行质谱测试, 在 Xcalibur 程序上进行数据采集及分析, 采用拉针仪将高硼硅玻璃毛细管拉制成纳升电喷雾喷嘴。微液滴相和溶液相反应的相对转化率通过原料与产物的质谱信号相对强度计算得到^[30,33], 示于式(1):

$$\text{Relative conversion} = \frac{I_{P1} + I_{P2} + \dots + I_{Pn}}{I_{P0} + I_{P1} + I_{P2} + \dots + I_{Pn}} \quad (1)$$

其中, I_{Pn} 为偶联上 n 个小分子的蛋白质谱信号强度 ($n=0, 1, 2, 3, \dots$)。

2 结果与讨论

2.1 电喷雾微液滴中酰胺键构建模型反应探究

首先, 将模型小分子酯 (Z-Gly-ONP, **Ea**) 的甲醇溶液和模型蛋白 (溶菌酶 **P**, ~14 ku) 的 PBS 溶液分别装入 2 个注射器中, 酯的甲醇溶液走雾化喷头中间的管道 (L1), 蛋白 PBS 溶液走旁边管道 (L2)。在 PBS 溶液的注射器针头处施加 4.0 kV 电压, 雾化喷头的气路氮气钢瓶输出压强为 0.8 MPa。在双通道注射泵的推进下 (5 $\mu\text{L}/\text{min}$), 两路液体缓慢地从雾化器喷口处流出, 两路样品溶液在高速氮气的辅助下雾化成微小液滴, 在喷口处三维空间内接触发生反应。

有趣的是, 在相同的反应时间, 质谱结果显示, 本体溶液中的产物形成程度与微液滴中明显不同。在本体溶液中, 收集到的产物在 +8、+9 和 +10 电荷处的最大丰度质荷比分别为 m/z 1 789、1 591 和 1 432, 其相对强度分别为 97%、100%、11%, 它们是模型蛋白 (**P**) 的信号, 示于图 2a。反应体系中仅发现 **Ea** 通过酰胺键与 **P** 偶联的产物 P1 (1 个 **Ea** 与蛋白偶联的产物) 和 P2 (2 个 **Ea** 与蛋白偶联的产物)。P1 在 +8、+9

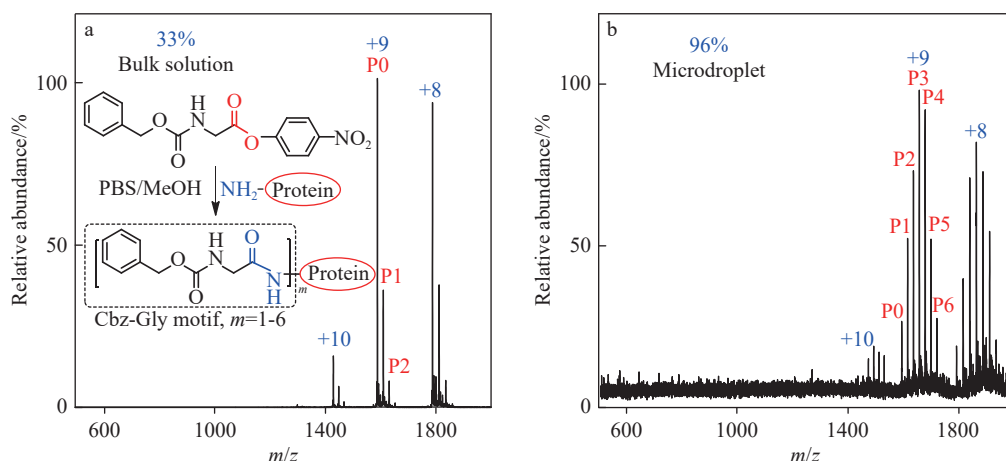


图2 溶液相(a)和微液滴相(b)体系中,小分子酯Ea与模型蛋白P氨解反应产物的质谱图
Fig. 2 Mass spectra of aminolysis reaction between activated ester Ea and model protein P in bulk solution (a) and microdroplet reaction (b)

和+10电荷处的质荷比分别为 m/z 1 813、1 612、1 451, 相对强度分别为 36%、37%、7%; P2 在+8、+9和+10电荷处的质荷比分别为 m/z 1 837、1 633、1 470, 相对强度分别为 8%、9%、2%。结果表明,在常规溶液相中还有大量的模型蛋白未参与反应,酰胺键偶联产物 P1 和 P2 的相对含量均较低,偶联反应效率不理想。

在微液滴反应中, P 的信号强度相对较低,示于图 2b。检测到 6 个 Ea 通过酰胺键与 P 偶联的产物,即 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6。6 个产物带+8、+9、+10 电荷的信号相对强度比分别为 52%、66%、16%(P1), 68%、80%、18%(P2), 70%、100%、20%(P3), 57%、89%、20%(P4), 36%、57%、11%(P5), 25%、33%、12%(P6)。从图 2 可见,微液滴体系中的 P2 带+8、+9、+10 电荷的信号强度(68%、80%、18%)明显高于本体溶液体系(8%、9%、2%)。此外,在微液滴反应中, P3~P6 表现出良好到优异的信号强度,这是本体反应体系中没有的。根据相对反应转化率公式计算出微液滴相中反应转化率为 96%;而本体溶液中有大量的原料未参与反应,其转化率只有 33%。从模型反应结果可以看出,微液滴中小分子与蛋白偶联效率明显高于溶液相。这一结果可能归因于微液滴技术通过湍流氮气将块状液-液体系分散为小气溶胶液滴,使两相之间的界面面积增加了许多数量级,从而改善了传质和产物转化率。

2.2 电喷雾微液滴中酰胺键构建反应条件优化

微液滴喷雾的产生受多种因素影响,如尺

寸、表面溶剂效应、表面电场、溶剂性质等。本文以 Z-Gly-ONP 和溶菌酶的反应为模型,考察相关参数对微液滴中酰胺键构建效率的影响,并根据文献^[30,33]中的方法计算相对转化率,评估 Ea 和 P 的反应结果。首先,探究了反应液流速对相对转化率的影响,结果示于图 3a。当反应液流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,小分子修饰蛋白转化率为 96%;随着反应液流速从 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 增加到 15 $\mu\text{L}/\text{min}$,转化率从 96%下降到 88%。在考察雾化气压对相对转化率的影响时,保持样品溶液流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$,外加电压+4 kV,雾化气体压强从 0.4 MPa 提高到 0.8 MPa 时,转化率从 80%上升到 93%,示于图 3b。这可能是因为样品溶液流速越低,喷口处初始液滴越小;雾化气流越大,喷口处的样品溶液去溶剂化效率越高,越有利于形成粒径更小的微液滴,从而提高样品的局部浓度,样品分子之间发生碰撞的频率增大,提高了反应转化率。

当对喷雾电压进行优化时,发现反应体系不外加高压电源(电压 0 kV,雾化气体 0.8 MPa,液体流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$)时,转化率能达到 88%;当外加正电压时,转化率可提高至 91%,示于图 3c。这是因为随着微液滴体系外加电压的增加,液滴表面电场强度增加,进而库仑排斥力逐渐增加,打破了液滴表面各种受力平衡,促使液滴破碎,形成更小尺寸的液滴。液滴尺寸变小,导致液-液界面比表面积增加,反应分子碰撞更充分,反应转化率更高。当外加负电压时,转化率却略微

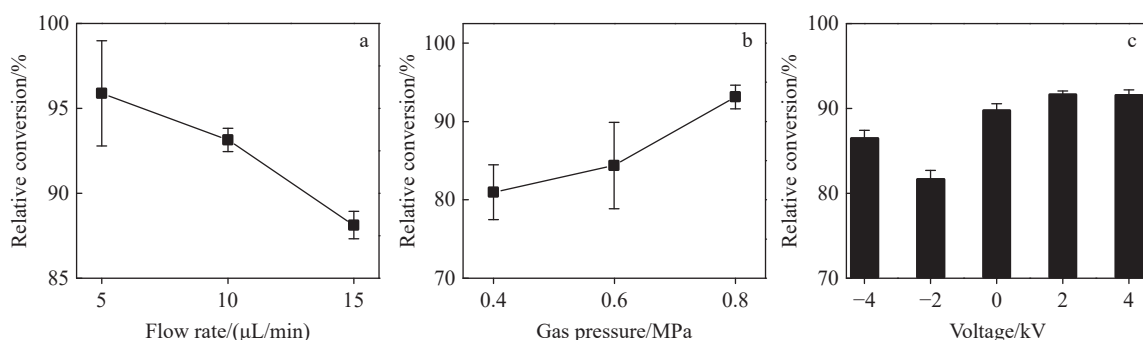


图3 微液滴体系中中小分子酯 Ea 与模型蛋白 P 氨解反应的溶液流速(a)、雾化气体压强(b)和电喷雾电压(c)条件的优化

Fig. 3 Optimization of flow rate (a), carrier gas pressure (b) and discharged voltage (c) for activated ester Ea and model protein P in microdroplet reaction

降低。这是因为在施加负电压时,磷酸根负离子优先于蛋白聚集于微液滴表面,导致蛋白与酯分子间的碰撞概率相对较低,从而使反应转化率略微下降。结果表明,微液滴反应转化率不依赖于喷雾电压,但在正电压情况下,反应转化率可以得到提升。

在微液滴反应中,微液滴尺寸对转化率有着重要影响。在微液滴飞行过程中,微液滴尺寸与溶剂性质息息相关。本研究选取甲醇(MeOH)、乙醇(EtOH)、叔丁醇(*t*-BuOH)、二氯甲烷(DCM)、乙腈(ACN)、甲苯(toluene)和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)等沸点不同的质子性和非质子性溶剂作为微液滴反应中溶解小分子酯的溶剂,结果示于图4。可见,在 MeOH、DMF、ACN、DCM、toluene、EtOH 和 *t*-BuOH 溶剂中,微液滴反应的转化率(分别为 96%、99%、59%、75%、81%、75%和 89%)均高于溶液相的转化率(分别为 31%、65%、34%、2%、10%、28%和 46%)。在与水互溶的极性溶剂中,偶极非质子溶剂 DMF 的蛋白质修饰转化率最高,可能是因为 DMF 上的氮原子略显碱性,而碱性体系更有利于小分子酯氨解。有趣的是,当溶解小分子酯的溶剂是与水不互溶的非质子性溶剂(DCM 和甲苯)时,在微液滴中也能获得较好的反应转化率(DCM、甲苯中的转化率分别为 75%、81%)。而在常规溶液相中,蛋白 PBS 溶液与 DCM 和甲苯不互溶,反应分子仅在 2 个液相分层处界面有接触,分子间碰撞频率较低,反应不充分,导致溶液相中转化率非常低。由此可见,在微液滴中,2 个不互溶的液相之间的反应主要发生在液-液界面,微小液滴的液-液比表面

积更大,更有利于反应分子间碰撞。因此,在不同的溶剂体系中,微液滴相较溶液相的反应有明显优势。通过优化微液滴反应条件,初步掌握了微液滴中小分子修饰溶菌酶化学反应的关键参数。从优化条件可知,采用同轴三通道喷头进行微液滴反应,电压 0 kV,雾化气体 0.8 MPa,液体流速 10 μL/min,溶解酯溶剂为 DMF 的微液滴反应转化率最优。

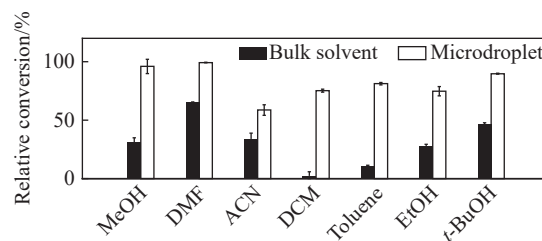


图4 微液滴体系中中小分子酯 Ea 与模型蛋白 P 氨解反应溶剂的优化

Fig. 4 Solvent optimization of activated ester Ea and model protein P in microdroplet reaction

2.3 电喷雾微液滴中酰胺键构建方法在多肽抗原-蛋白偶联中的应用研究

为了进一步探究微液滴中酰胺键构建方法在化学偶联中应用的可行性,本研究尝试将该方法用于制备肿瘤相关糖肽抗原-蛋白共价偶联复合物。首先,通过多肽固相合成技术合成侧链保护的多肽抗原 MUC19,直接在固相树脂上将己二酸连接臂以及 4-硝基苯酚通过缩合剂偶联到 MUC19 多肽 N 端^[4],合成以己二酸为连接臂的硝基苯酚酯修饰的多肽抗原 MUC19,其结构示于图 5a。然后,将树脂清洗干净,将多肽从树脂

上全脱保护切下来,使用质谱进行鉴定,发现了 m/z 903.36 信号峰,示于图 5b,这与 MUC19 硝基酯化物质 $[M+Na]^+$ 的理论计算值一致,表明获得了硝基苯酚酯修饰的抗原多肽 **M**。最后,用 DMF 溶解 6 mmol/L **M**, pH 7.4 的 PBS 溶解 0.6 mmol/L 溶菌酶,将 **M** 溶液和蛋白溶液各自分成 2 份,分别进行微液滴实验和常规溶液相反应。反应相同时间后,将微液滴反应产物和溶液相反应产物进行后处理和质谱鉴定。

在图 5c 中,可以观察到微液滴反应产物的质谱信号 m/z 1 673($P1_a$)、1 756($P2_a$)、1 839($P3_a$)、1 922($P4_a$),其相对丰度分别为 92%、100%、83%、47%,蛋白修饰反应转化率达 87%。在溶液相中,还能明显观察到模型蛋白原料信号 m/z 1 591($P0$),相对丰度 74%; $P1_a$ 和 $P2_a$ 的相对丰度分别

为 100%和 55%;另外, $P3_a$ 和 $P4_a$ 的相对丰度明显低于微液滴反应中 $P3_a$ 和 $P4_a$ 的相对丰度,示于图 5d。结果表明,在微液滴体系中,不仅多肽-蛋白共价偶联反应的转化率高,且偶联的多肽个数也多于溶液相。这可能是因为微液滴反应是一个去溶剂化过程,在辅助气的作用下,溶剂的快速蒸发促使液滴尺寸进一步缩小,单位体积内反应物分子浓度增大,酯修饰多肽与蛋白分子碰撞频率增大,两者之间氨解形成酰胺键的反应速率提高。另外,界面附近的特殊电场及增加的传质过程有利于反应的进一步进行。微液滴体系中,酯修饰多肽与蛋白的高效偶联证明了微液滴中氨解构建酰胺键的优势,为肿瘤相关糖抗原-蛋白偶联复合物的高效合成提供了潜在的方法。

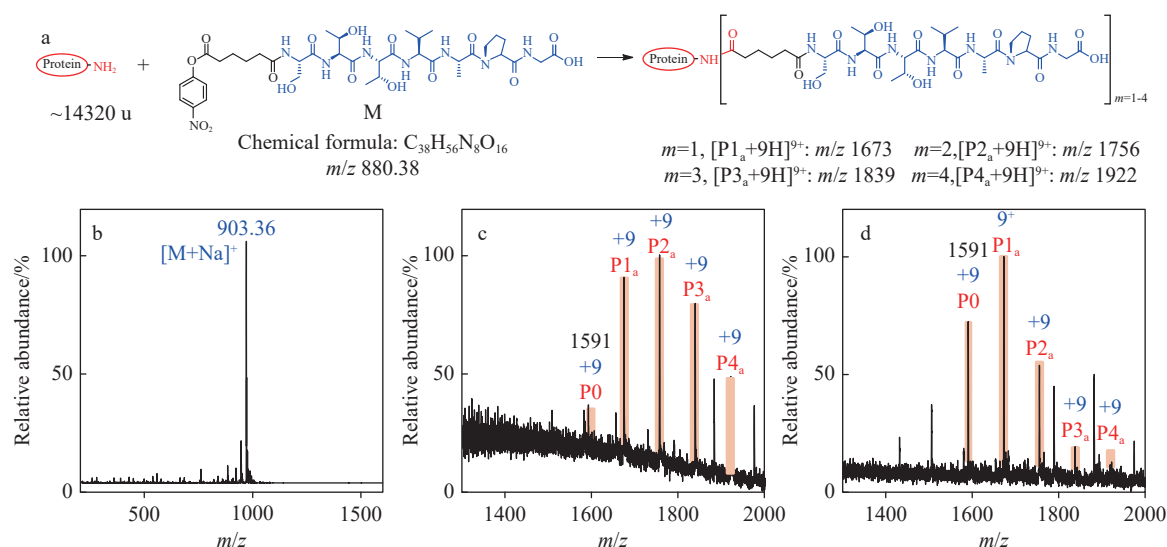


图5 酯修饰多肽 **M** 与蛋白 **P** 氨解反应式(a)、酯修饰多肽 **M** 的质谱图(b)及微液滴体系中(c)和溶液相体系中(d) **M** 与 **P** 氨解反应产物的质谱图

Fig. 5 Reaction scheme of aminolysis between **M** and protein **P** (a), mass spectrum of ester modified peptide **M** (b), mass spectra of reaction products in microdroplet reaction (c) and bulk reaction (d)

3 结论

微液滴反应是由液滴之间融合引发其中化合物之间发生反应。微液滴作为反应微容器具有明显的反应活性、试剂在微液滴表面聚集、溶剂蒸发、试剂局部浓度提升等优点。在酚酯氨解构建酰胺键的反应中,与本体溶液相比,电喷雾微液滴技术能够显著促进酚酯氨解与溶菌酶蛋白上的氨基形成酰胺键。反应效率得以显著提升的关键因素是样品流速和鞘气压强,尤其是高速鞘气能够给喷口处低流速液体强大的

剪切力,辅助液体撕裂形成细小液滴,增大液-液界面比表面积;同时,微液滴能够辅助溶剂挥发,提升样品局部浓度,显著提高反应效率。另外,在正电场作用下,蛋白分子优先聚集于微液滴表面,蛋白与酯修饰的分子碰撞概率增加,有利于转化率的提高。除模型小分子外,微液滴技术成功应用于肿瘤抗原多肽与模型蛋白的共价偶联表明其在肿瘤抗原多肽-含 T 表位的载体蛋白共价偶联复合物的高效制备上具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] YANG J, HUANG H, ZHAO J. Active ester-based peptide bond formation and its application in peptide synthesis[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2023, 10(7): 1 817-1 846.
- [2] LUNDBERG H, TINNIS F, SELANDER N, ADOLFS-SON H. Catalytic amide formation from non-activated carboxylic acids and amines[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(8): 2 714-2 742.
- [3] PATTABIRAMAN V R, BODE J W. Rethinking amide bond synthesis[J]. *Nature*, 2011, 480(7 378): 471-479.
- [4] DU J J, XIN L M, LEI Z, ZOU S Y, XU W B, WANG C W, ZHANG L, GAO X F, GUO J. Glycopeptide ligation *via* direct aminolysis of selenoester[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(7): 1 127-1 130.
- [5] DU J J, GAO X F, XIN L M, LEI Z, LIU Z, GUO J. Convergent synthesis of *N*-linked glycopeptides *via* aminolysis of ω -asp *p*-nitrophenyl thioesters in solution[J]. *Organic Letters*, 2016, 18(19): 4 828-4 831.
- [6] SABATINI M T, BOULTON L T, SNEDDON H F, SHEPPARD T D. A green chemistry perspective on catalytic amide bond formation[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(1): 10-17.
- [7] de FIGUEIREDO R M, SUPPO J S, CAMPAGNE J M. Nonclassical routes for amide bond formation[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(19): 12 029-12 122.
- [8] MONTALBETTI C A G N, FALQUE V. Amide bond formation and peptide coupling[J]. *Tetrahedron*, 2005, 61(46): 10 827-10 852.
- [9] VAUGHAN J R, OSATO R L. The preparation of peptides using mixed carbonic-carboxylic acid anhydrides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1952, 74(3): 676-678.
- [10] LAPS S, SATISH G, BRIK A. Harnessing the power of transition metals in solid-phase peptide synthesis and key steps in the (semi)synthesis of proteins[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(4): 2 367-2 387.
- [11] DU J J, ZHANG L, GAO X F, SUN H, GUO J. Peptidyl ω -asp selenoesters enable efficient synthesis of *N*-linked glycopeptides[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 396.
- [12] TUNG C L, WONG C T T, LI X. Peptide 2-formylthiophenol esters do not proceed through a Ser/Thr ligation pathway, but participate in a peptide aminolysis to enable peptide condensation and cyclization[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(25): 6 922-6 926.
- [13] RAJ M, WU H, BLOSSER S L, VITTORIA M A, ARORA P S. Aldehyde capture ligation for synthesis of native peptide bonds[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(21): 6 932-6 940.
- [14] TSUDA S, MOCHIZUKI M, SAKAMOTO K, DENDA M, NISHIO H, OTAKA A, YOSHIYA T. *N*-sulfanylethylaminooxybutyramide (SEAoxy): a cryptothioester compatible with fmoc solid-phase peptide synthesis[J]. *Organic Letters*, 2016, 18(22): 5 940-5 943.
- [15] WEI Z, LI Y, COOKS R G, YAN X. Accelerated reaction kinetics in microdroplets: overview and recent developments[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2020, 71: 31-51.
- [16] YANG Y, LIU J, CHEN Z, NIU W, LI R, NIU L, YANG P, MU X, TANG B. A high-throughput screening method for determining the optimized synthesis conditions of quinoxaline derivatives using microdroplet reaction[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 789.
- [17] COOKS R G, YAN X. Mass spectrometry for synthesis and analysis[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2018, 11: 1-28.
- [18] QIU L, COOKS R G. Spontaneous oxidation in aqueous microdroplets: water radical cation as primary oxidizing agent[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(17): 2 400 118.
- [19] HOLDEN D T, MORATO N M, COOKS R G. Aqueous microdroplets enable abiotic synthesis and chain extension of unique peptide isomers from free amino acids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(42): e2212642119.
- [20] QIU L, COOKS R G. Oxazolone mediated peptide chain extension and homochirality in aqueous microdroplets[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(2): e2309360120.
- [21] CHABINYC M L, CRAIG S L, REGAN C K, BRAUMAN J I. Gas-phase ionic reactions: dynamics and mechanism of nucleophilic displacements[J]. *Science*, 1998, 279(5 358): 1 882-1 886.
- [22] YAN X, BAIN R M, COOKS R G. Organic reactions in microdroplets: reaction acceleration revealed by mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(42): 12 960-12 972.
- [23] MÜLLER T, BADU-TAWIAH A, COOKS R G. Accelerated carbon-carbon bond-forming reactions in preparative electrospray[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(47): 11 832-11 835.
- [24] SAHOTA N, AbuSALIM D I, WANG M, BROWN C J, ZHANG Z, EL-BABA T J, COOK S P, CLEMMER D E. A microdroplet-accelerated Biginelli reaction: mecha-

- nisms and separation of isomers using IMS-MS[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(18): 4 822-4 827.
- [25] YAN X. Emerging microdroplet chemistry for synthesis and analysis[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2021, 468: 116 639.
- [26] ZHANG W, YANG S, LIN Q, CHENG H, LIU J. Microdroplets as microreactors for fast synthesis of ketoximes and amides[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2019, 84(2): 851-859.
- [27] FEDICK P W, IYER K, WEI Z, AVRAMOVA L, CAPEK G O, COOKS R G. Screening of the suzuki cross-coupling reaction using desorption electrospray ionization in high-throughput and in leidenfrost droplet experiments[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(10): 2 144-2 151.
- [28] BAIN R M, AYRTON S T, COOKS R G. Fischer indole synthesis in the gas phase, the solution phase, and at the electrospray droplet interface[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28(7): 1 359-1 364.
- [29] LIU C, LI J, CHEN H, ZARE R. Scale-up of microdroplet reactions by heated ultrasonic nebulization[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(40): 9 367-9 373.
- [30] GAO D, JIN F, LEE J K, ZARE R N. Aqueous microdroplets containing only ketones or aldehydes undergo Dakin and Baeyer-Villiger reactions[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(48): 10 974-10 978.
- [31] GNANAMANI E, YAN X, ZARE R N. Chemoselective *N*-alkylation of indoles in aqueous microdroplets[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(8): 3 069-3 072.
- [32] BANERJEE S, GNANAMANI E, YAN X, ZARE R N. Can all bulk-phase reactions be accelerated in microdroplets?[J]. *The Analyst*, 2017, 142(9): 1 399-1 402.
- [33] GAO X F, CHENG J C, YE C L, XIAO S, QIU Z M, ZHANG X. Water promoted 9-fluorenylmethoxycarbonyl detachment from amino acids in charged microdroplets[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2022, 20(35): 7 001-7 005.
- (收稿日期: 2024-08-05; 修回日期: 2024-11-05)