

## 氟标签衍生化联合氟固相萃取法在多肽纯化中的应用

尤淞涛, 徐莉莉\*, 狄斌\* (中国药科大学药物分析系, 蛋白质化学与结构生物学重点实验室, 南京 210009)

**摘要:** 氟固相萃取(fluorous solid-phase extraction, FSPE)是一项基于氟-氟相互作用的固相萃取技术, 它依靠高氟化目标化合物和高氟化固定相之间的亲和力, 将目标化合物保留在固定相上, 然后通过亲氟试剂将目标化合物洗脱下来, 实现对目标化合物的分离和纯化。近年来, FSPE 被广泛应用于多肽的富集和纯化。但由于多肽中一般不含有高氟化官能团, 所以在多肽分子上连接此类高氟化的标签成为了 FSPE 应用于多肽纯化的关键。本文对氟亲和和标签引入多肽的方式、种类以及其在多肽合成、纯化和富集中的应用和相关技术进行总结和阐述。

**关键词:** 氟固相萃取; 氟标签; 多肽纯化

中图分类号: R914.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)01-0108-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.01.018

引用本文: 尤淞涛, 徐莉莉, 狄斌. 氟标签衍生化联合氟固相萃取法在多肽纯化中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(1): 108-114.

### Application of Fluorinated Affinity Tags and Fluorous Solid-phase Extraction in Peptides Purification

YOU Songtao, XU Lili\*, DI Bin\* (Department of Pharmaceutical Analysis, Key Laboratory on Protein Chemistry and Structural Biology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT:** Fluorous solid-phase extraction(FSPE) is a solid-phase extraction technology based on fluorine-fluorine interactions. Retaining on the perfluoroalkyl-functionalized stationary phase, and then eluted with a fluorophilic reagent, the perfluoroalkyl-containing target compound is separated and purified. In recent years, FSPE has been widely used in the enrichment and purification of peptides. However, because peptides normally do not contain highly fluorinated functional groups, attaching such highly fluorinated tags to peptide molecules has become the key to the application of FSPE to peptide analysis. This review summarized and elaborated the strategies and types of introduction of fluorinated affinity tags into peptides, their applications and related technologies in peptide synthesis, purification and enrichment.

**KEYWORDS:** fluorous solid-phase extraction(FSPE); fluorinated affinity tags; peptides purification

随着多肽合成技术的发展, 越来越多的多肽药物出现在了市场上。相对于绝大部分传统小分子药物来说, 多肽药物具有活性高、毒性低、选择性高等优势<sup>[1-2]</sup>, 吸引了许多药物科学家的关注。但是多肽类药物具有易降解、在血浆中不稳定、基质干扰大、离子化效率低等缺点, 给多肽分析造成了巨大困难。

目前多肽的化学合成主要依靠固相合成方法, 这种方法操作较为简单, 但是随着肽链的延长, 副产物在树脂上逐步积聚, 导致目标多肽纯度显著降低, 给终产物的分离和纯化带来巨大的困难。为了有效地纯化多肽, 超滤法、凝胶过滤法、等电点沉淀法、HPLC<sup>[3-4]</sup>等方法被相继开发出来。但是这些分离纯化的方法大多都是基于多肽

的分子量大小、等电点、极性大小等性质来实现多肽和其他杂质的分离, 选择性不高, 尤其当目标多肽和杂质性质相似时(比如只比目标多肽短了一个氨基酸残基的序列), 这些方法的纯化效率就会大大降低。

利用亲和力进行纯化的方法具有很高的选择性, 例如固定化金属亲和层析法纯化磷酸化多肽<sup>[5]</sup>、凝集素与糖蛋白结合进行细胞识别和黏着<sup>[6]</sup>、利用镍柱中的氯化镍与含 6 个组氨酸标签(His<sub>6</sub>)的蛋白之间的亲和力来纯化带 His<sub>6</sub> 标签的蛋白<sup>[7]</sup>、生物素亲和层析法提纯链霉亲和素等。但是这些传统的亲和力方法具有明显的局限性, 比如会出现目标分子洗脱不完全、回收率低、使质谱图谱复杂化、亲和力方法所用试剂对价格昂贵等问题。近

基金项目: 国家自然科学基金项目(81773693, 81803354)

作者简介: 尤淞涛, 男, 硕士 Tel: 13656187191 E-mail: 15189807833@163.com \*通信作者: 徐莉莉, 女, 博士, 讲师 Tel: (025)83271269 E-mail: 1620174420@cpu.edu.cn 狄斌, 男, 博士, 教授 Tel: (025)83271269 E-mail: dibin@cpu.edu.cn

年来,一种基于氟亲和力的分析方法——氟亲和技术逐渐发展起来,该方法已被用于催化剂的回收和再利用<sup>[8]</sup>、反应中间体的去除、平行合成产物的共纯化以及各种基质中全氟化合物的检测和去除<sup>[9-12]</sup>等,基于此技术,最近有科学家还合成了氟化探针,用于识别和分离生物蛋白<sup>[13]</sup>。含有全氟烷烃链的物质具有高电负性、低极性、高热稳定性<sup>[14]</sup>、高化学稳定性以及强疏水性<sup>[15]</sup>和疏油性<sup>[16]</sup>等性质,由于其强疏水性,引入含全氟烷烃链残基的抗菌肽呈现出更强的抗菌活性<sup>[17]</sup>。此类物质与水和不含氟的有机溶剂均不互溶,但是彼此间却有良好的互溶性,这是因为氟原子之间存在一种专属的相互作用力,称之为“氟亲和力”。也正是因为这种只有氟原子间才具有的非共价相互作用,使得氟亲和技术具有高度的选择性。目前基于氟亲和原理的含氟固定相液相色谱和氟固相萃取(fluorous solid-phase extraction, FSPE)<sup>[18]</sup>被认为是复杂基质中分离纯化目标化合物最具潜力的方法之一。

将 FSPE 引入多肽合成能极大简化多肽的纯化过程,引入氟标签的思路,大致分为 2 种:第 1 种是将氟标签连至反应终产物上,最后通过 FSPE 纯化以及除去氟标签得到目标产物;第 2 种是将氟标签试剂作为封端剂,使氟标签与未反应完全的裸露氨基连接,防止杂质参与后续的肽链增长反应,最后仅通过 FSPE 纯化即可得到目标产物,可省去去除氟标签的步骤<sup>[19]</sup>,这 2 种思路各有利弊,第 1 种更加直观,第 2 种则可简化纯化步骤。

要将 FSPE 运用于多肽纯化,必须在多肽链上引入一个氟标签。氟标签由全氟烷烃链和连接臂两部分组成,全氟烷烃链是将普通烷烃链中所有氢原子用氟原子取代而成的基团<sup>[20]</sup>,连接臂通常由若干个亚甲基构成,目的是将全氟烷烃链对修饰过后分子的反应活性的影响降至最低。氟标签的引入会显著增加衍生化肽或蛋白分子的大小,并可能在接下来的串联质谱分析中进一步使其谱图复杂化。为避免此问题,在 LC-MS 分析之前,将全氟烷烃链和连接臂切除,会对接下来的分析有极大帮助。本文分别就基于 FSPE 原理的相关技术、氟标签的种类以及 FSPE 富集特殊肽的应用进行总结和阐述。

## 1 基于 FSPE 原理的相关技术

### 1.1 标准 FSPE

FSPE 的基本步骤是先将含高氟化目标分析物

的混合物上样至高氟化固定相[此处的“高氟化”,是指将烷烃基团中相应数量的氢原子(通常为 7~20)替换为氟原子<sup>[21]</sup>,目前使用的高氟化固定相一般为键合全氟烷烃链的硅胶],利用氟亲和力将高氟化物质保留在固定相上,然后再用疏氟溶剂(如甲醇水溶液)洗去杂质、用亲氟溶剂(如甲醇、乙腈、四氢呋喃)洗脱目标分析物<sup>[22]</sup>,实现对目标分析物的分离和纯化。由于 FSPE 的洗脱条件是高浓度有机相或纯有机相,与样品进质谱前的除盐过程十分匹配<sup>[23-24]</sup>;且氟标签自身的疏水性和稳定性能提高含氟标签化合物的质谱响应和其碎片离子的稳定性。所以氟标签的引入十分有利于后续的质谱分析,再加上其操作简便,纯化过程耗时短且高效,受到了化学家的广泛青睐。

### 1.2 反向 FSPE

“反向 FSPE”就是和“标准 FSPE”相反,通过将亲氟固定相变为极性固定相、疏氟洗涤液变为亲氟溶剂,首先从色谱柱上洗下含氟标签的化合物,同时保留其余物质。Matsugi 等<sup>[25]</sup>将反向 FSPE 运用于异吡啶酸的酰胺偶联反应中,异吡啶酸分别与含 C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>、C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>、C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>的试剂偶联,生成的产物都能通过反向 FSPE 得到很好的分离。值得注意的是,含 C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>的物质由于含氟量较低,在标准 FSPE 中很难得到理想的分离效果,但是在反向 FSPE 中分离效果良好。另外,与标准 FSPE 相比,反向 FSPE 的优势在于该技术使用廉价的硅胶作为固定相以及能够被常规回收和再循环利用的含氟溶剂作为洗脱液,且当含氟化合物是待纯化的目标分析物时,由于其会首先流出,此时该方法会比标准 FSPE 更加快捷。

### 1.3 氟硅烷化多孔硅表面的激光解吸离子化质谱

多孔硅表面的解吸离子化质谱(desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry, DIOS-MS)是由 Buriak 等于 1999 年提出的一种新的生物质谱分析方法,即利用多孔硅的特殊结构来吸收和传递能量,在分析样品时不需要加入基体<sup>[26]</sup>,只需将样品直接点多孔硅表面即可,消除了基体引入的背景干扰。近年来,报道了用适当的疏水性硅烷对氧化的多孔硅进行表面修饰<sup>[27]</sup>,能使分析物通过疏水相互作用吸收到表面,从而直接从复杂的基质中提取分析物。

2007 年,Go 等<sup>[28]</sup>用氟化试剂来修饰存在于臭氧氧化的多孔硅表面的羟基,生成了全氟烷基化

的多孔硅 DIOS 表面,在用高比例有机溶剂洗去不含氟物质之后,直接进行 DIOS-MS 分析。结果表明,这种基于氟亲和力的 DIOS-MS 方法能够实现含氟标签小分子、多肽以及蛋白质的选择性富集和分析。

## 2 氟标签种类

氨基和羧基这 2 个官能团是氨基酸的主要特征基团,所以在诸多氨基酸保护基中,针对氨基和羧基的保护基的研究尤为透彻。

### 2.1 与氨基相连的氟标签

2001 年, Luo 等<sup>[29]</sup>成功地合成了一系列类似于叔丁氧羰基的氟化基团——氟化叔丁氧羰基,并且成功将此类试剂应用于氨基酸的氨基保护基,结构见图 1。此类衍生化试剂是由氟标签取代甲基上的氢原子衍生化而成。实验表明,当连接臂由 3 个亚甲基组成时,具有更好的分离效果。

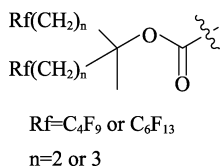


图 1 氟化叔丁氧羰基的结构

Fig. 1 Structure of fluorinated tert-butyl oxycarbonyl

2002 年, Filipov 等<sup>[30]</sup>以苄氧羰基氯 (benzyloxycarbonyl chloride, Z-Cl) 为模板,在其苯环对位的位置取代上氟标签,合成了氟化苄氧羰基氯 (fluorous benzyloxycarbonyl chloride, FZ-Cl); 在 FZ-Cl 的邻位连上甲基,合成了 FMZ-Cl; 在 FZ-Cl 的结构基础上,将亚乙基连接臂替换为亚乙烯基,合成了 FEZ-Cl (FZ-Cl、FMZ-Cl、FEZ-Cl 的结构见图 2)。苄氧羰基类保护基是酸不稳定性保护基,根据脱除保护基所需条件的不同,确定对酸稳定性顺序为 FEZ>Z>FZ>FMZ。

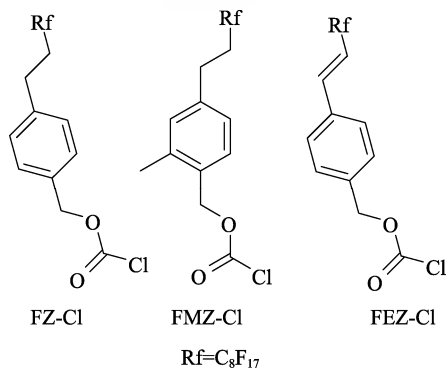


图 2 FZ-Cl、FMZ-Cl 和 FEZ-Cl 的结构

Fig. 2 Structure of FZ-Cl, FMZ-Cl and FEZ-Cl

2003 年, Curran 等<sup>[31]</sup>合成了另一类苄氧羰基类的氟化试剂——氟化苄氧羰基羧基琥珀酰亚胺酯,结构见图 3。与 Filipov 等所合成的氟化试剂不同的是, Curran 等将羰基氯的结构替换成了琥珀酰亚胺酯的结构,作为一个更容易发生取代反应的离去基团。Curran 等用此类氟化试剂对 20 个天然氨基酸中的 18 个(精氨酸和组氨酸未成功)进行了衍生化,结果显示,衍生化产物拥有极好的纯度和产量。引入这些氟化氨基酸合成的多肽,可以顺利通过氟亲和色谱法实现简便有效的纯化。Curran 等还对氟标签中全氟烷烃链的长度进行了考察,结果显示, C<sub>6</sub>F<sub>13</sub> 在含氟填料上的保留时间较 C<sub>8</sub>F<sub>17</sub> 更短,所以 C<sub>8</sub>F<sub>17</sub> 成为了氟标签的首选。

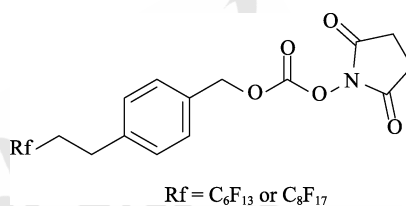


图 3 氟化苄氧羰基羧基琥珀酰亚胺酯的结构

Fig. 3 Structure of fluorinated benzyloxycarbonyl hydroxy-succinimide ester

2003 年, Visser 等<sup>[32]</sup>将保护基甲基磺酰基乙氧基羰基的甲基部分替换为 8 个碳的氟标签,合成了新型氟化试剂——氟化甲基磺酰基乙氧基羰基氯,结构见图 4。用含氟固定相液相色谱法和 FSPE 纯化所得的 FMsc-多肽均有很高的纯度。值得注意的是, FMsc 和 Msc 都是碱不稳定的保护基,例如 FMsc 能在 2% 氨水溶液中完全脱除, Msc 能在二恶烷-甲醇氢氧化钠混合物中完全脱除。这使得 FMsc 和 Msc 能用于含 Boc、tBu 等酸不稳定性保护基的多肽的合成。

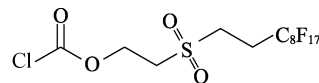


图 4 氟化甲基磺酰基乙氧基羰基氯的结构

Fig. 4 Structure of fluorinated methylsulfonyl ethoxycarbonyl chloride

2006 年, Manzoni 等<sup>[33]</sup>将三氯乙氧基羰基氯的 3 个氯原子全部去除,换上 8 碳的全氟烷烃链,然后在临近的亚甲基上连上 1 个溴原子,合成了新的氟化试剂——氟化乙氧基羰基氯,结构见图 5。它可以与多肽和寡糖的氨基发生反应,使得合成过程更简便、更快速。

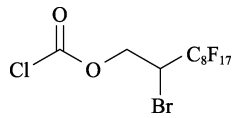


图5 氟化乙氧基羰基氯的结构  
Fig. 5 Structure of fluorinated ethoxycarbonyl chloride

9-苄基甲氧基羰基是现今多肽固相合成中使用最多的氨基保护基, 在它的基础上, Matsugi 等<sup>[34]</sup>于2006年首次合成了氟化9-苄基甲氧基羰基羟基琥珀酰亚胺酯, 结构见图6。该合成以2,7-二硝基苄为初始原料, 将硝基还原为氨基, 再经过 Heck 反应, 在2和7号位连上含C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>或C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>的氟标签。2013年, Sugiyama 等<sup>[35]</sup>对此方法进行改进, 发明了合成氟化9-苄基甲氧基羰基羟基琥珀酰亚胺酯(f-FMOC)的一锅法策略。2017年, Matsugi 等<sup>[36]</sup>将 f-FMOC 试剂作为氨基的保护基和氨基酸结构的编码标签, 制备了几种在血管紧张素转换酶抑制试验中显示出高活性的三肽和五肽。

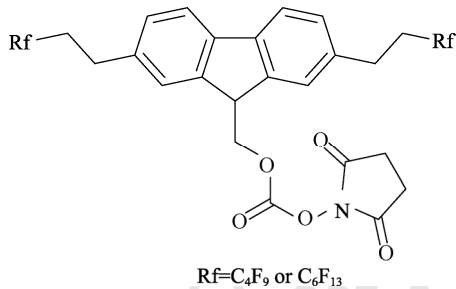


图6 氟化9-苄基甲氧基羰基羟基琥珀酰亚胺酯的结构  
Fig. 6 Structure of fluorinated 9-benzyloxycarbonyl hydroxysuccinimide ester

由于氟标签具有极强的疏水性, 所有含氟标签的多肽在亲水溶剂中的溶解度都很差, 当需要维持生理环境时(例如在磷酸盐缓冲溶液中), 这种疏水性就限制了氟化合物在生物系统中的应用, 并且这种疏水性可能导致与氟标签结合的蛋白质聚集。因此, 水溶性氟标签的发现引起了化学家们的关注。2011年, Qian 等<sup>[37]</sup>开发了一种新型的水溶性氟标记试剂——磺基-NHS-(OEG)<sub>3</sub>-全氟辛烷, 其包含磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯基团(作为与多肽或蛋白的氨基部分反应时的离去基团)、酸不稳定的叔氨基甲酸酯基团、低聚乙二醇连接臂以及全氟烷烃链 C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>, 结构见图7。其中, 将低聚乙二醇作为连接臂, 由于其具有很强的极性和亲水性, 使得经衍生化后的多肽或者蛋白的溶解度出现不同程度的增加, 并且能够有效减少衍生化

蛋白质的聚集。为进一步证明磺基-NHS-(OEG)<sub>3</sub>-全氟辛烷在蛋白质/肽衍生化中的潜力, 将其用于衍生化牛血清白蛋白。整个衍生化反应在磷酸盐缓冲溶液中进行, 未观察到沉淀, 这表明衍生化反应可以在水溶液中进行而无需引入任何有机溶剂。

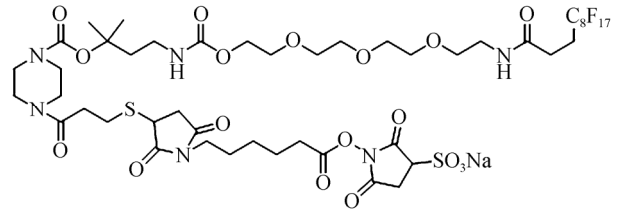


图7 水溶性氟化试剂的结构  
Fig. 7 Structure of the water-soluble fluorinated labeling reagent

以上都是直接与目标产物连接的氟标签, 还有一种氟标签是作为封端剂来使用的。2004年, Montanari 等<sup>[38]</sup>合成了一种三价氟碘鎓盐, 结构见图8, 在氨基酸脱保护和最后裂解的反应条件下都有很好的稳定性, 且一旦游离氨基被这种试剂烷基化, 它们在进一步的多肽偶联步骤中将不发生反应。实验结果表明, 利用此封端剂合成多肽后, 经过 FSPE 纯化, 合成过程中产生的缺失序列杂质被完全去除。

除了以上介绍的这些氟标签, 还有一些氟标签也是连接在氨基处的, 但是由于没有报道将其应用于多肽纯化中, 而是应用于别种化合物的合成和分析(例如寡糖<sup>[39-40]</sup>、氨基酸<sup>[41]</sup>), 所以在此处就不予赘述。

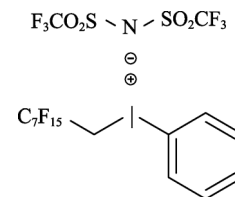


图8 三价氟碘鎓盐的结构  
Fig. 8 Structure of the fluorinated trivalent iodonium salt

## 2.2 与羧基相连的氟标签

与氨基相比, 连接在羧基上的氟标签较少。2001年, Pardo 等<sup>[42]</sup>合成了一系列叔丁醇类的氟化试剂——氟化叔丁醇, 结构见图9。这些试剂是由对应的含全氟烷烃链的格氏试剂和丙酮或乙酸乙酯反应生成。和叔丁氧羰基类氟化试剂相似, 这些氟化试剂含有2条全氟烷烃链。

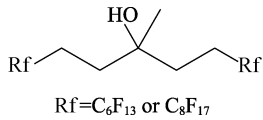


图9 氟化叔丁醇的结构  
Fig. 9 Structure of fluorinated tert-butyl alcohol

2006年, Fustero等<sup>[43]</sup>以2-(三甲基硅烷基)乙醇为模板, 制备了一种新型的氟代醇——氟化2-(三甲基硅烷基)乙醇, 结构见图10。这个氟化试剂的特点在于去除氟化2-(三甲基硅烷基)乙醇基团仅需要温和的反应条件(四丁基氟化铵), 即能发生酯交换反应, 达到去除氟标签的目的。这使得其在多肽和逆肽的合成中具有重要潜力, 即使在易于发生差向异构化的多肽上也是如此。

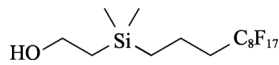


图10 氟化2-(三甲基硅烷基)乙醇的结构  
Fig. 10 Structure of fluorinated 2-(trimethylsilyl)ethanol

氟标签作为辅助纯化的工具, 对其进行回收和再利用是一种既能降低成本, 又能对环境有利的做法, 例如在利用氟标签辅助合成寡糖的过程中, 苄基型氟标签便是一种可回收的氟标签<sup>[44]</sup>。然而在多肽合成中, 大部分氟标签的回收存在一定难度, 因为在用强酸去除氟标签的同时, 氟标签会被部分分解。2005年, Goto等<sup>[45]</sup>合成了能通过简便方式回收的氟化试剂, 它是一个含有6条全氟烷基链的醇, 与氨基酸残基的羧基基团发生反应而使之带上氟标签, 结构见图11。在利用此氟标签进行多肽合成的过程中, 只需通过在FC<sub>72</sub>[一种市售的碳氟化合物溶剂, 主要由全氟己烷(C<sub>6</sub>F<sub>14</sub>)异构体组成]和有机溶剂(例如甲醇或乙腈)之间进行简单萃取即可直接获得每个含氟标签的中间体。最后通过两步裂解反应: 第一步在强酸性条件下将目标多肽切割下来; 第二步将FC<sub>72</sub>层中的氟标签经过甲醇钠的处理, 实现氟化试剂的回收和重复利用。

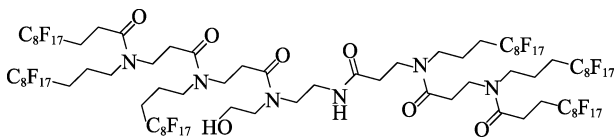


图11 可回收氟化试剂的结构  
Fig. 11 Structure of recyclable fluorinated labeling reagent

### 3 特殊肽的富集

#### 3.1 硝化肽的富集

硝化肽是在酪氨酸残基酚羟基的邻位引入硝基形成的多肽。蛋白质酪氨酸残基的硝化通常会

影响蛋白原本的功能<sup>[46]</sup>。但是由于蛋白质硝化是一种低丰度的翻译后修饰, 硝化酪氨酸残基的浓度水平极低, 因此开发有效的硝化蛋白质富集方法具有重要意义。目前大多数可用的方法都基于免疫化学富集方法, 然后进行质谱分析, 然而有效抗体的缺乏限制了蛋白质组学水平上硝化蛋白的研究。

2011年, Kim等<sup>[47]</sup>开发了基于氟亲和力的纯化富集硝化肽的方法。该方法通过三步反应, 在硝基部分连上氟标签: ①乙酰化, 此步骤用来保护N末端胺基和赖氨酸残基的ε-胺结构; ②还原反应, 将硝基还原为伯氨基; ③氟化, 将氟标签连接至生成的伯氨基处。在衍生化完成后, 通过FSPE富集得到带有氟标签的硝化肽, 质谱结果显示, 反应转化完全, 并且能有效富集硝化肽。

#### 3.2 磷酸化肽的富集

磷酸化是活细胞中蛋白质最重要的翻译后修饰之一<sup>[48]</sup>, 因此选择性富集磷酸化肽具有极其重要的意义。

2016年, Zhao等<sup>[49]</sup>首次设计并合成了全氟化的磁性介孔微球(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>)。磷酸化多肽经过β-消除和迈克尔加成反应, 生成含有氟标签的磷酸化多肽。然后, 通过Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>富集含氟标签的磷酸化多肽, 并与未标记的多肽磁性分离, 随后将其洗脱进行质谱检测。实验结果显示, 这种全氟化磁性介孔微球具有出色的分散性, 对含氟标签的多肽具有良好的富集能力以及特异性。

不仅如此, 这种全氟化的磁性介孔微球还可以通过类似的机制富集经过不同翻译后修饰的多肽、聚糖<sup>[50]</sup>和水中的有毒全氟物质<sup>[51]</sup>。

#### 3.3 4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)修饰肽的富集

细胞蛋白的4-HNE修饰被认为是心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病和肿瘤等多种疾病的病理生理学特征<sup>[52]</sup>。然而, 由于这种修饰的丰度较低, 所以需经过富集, 才能进行后续分析。传统的富集方法包括固相酰肼法和生物素-亲和素亲和力法, 但是它们都具有富集过程耗时长、洗脱条件苛刻等缺点。

2017年, Yuan等<sup>[53]</sup>开发了一种基于氟衍生化和FSPE的新方法来富集4-HNE修饰的多肽。在这种方法中, 多肽首先通过4-HNE中的醛基与氟

化试剂的氨基氧基之间发生点击化学反应,使多肽连上氟标签;随后,通过 FSPE 进行纯化和富集。实验结果表明,这种方法十分快速以及有效,使用这种新颖的方法成功鉴定了 432 种蛋白质上的 661 个 4-HNE 修饰肽上的 673 个 4-HNE 修饰位点。

#### 4 总结与展望

基于氟亲和原理的 FSPE 因其高特异性、普适性以及操作的简便性,得到了很多科学家的关注和研究。本文综述了多肽氟标签的种类、FSPE 在多肽合成、纯化和富集中的应用以及相关技术。这些方法尽可能多地简化了合成纯化步骤,对复杂反应体系中的目标产物进行有效的选择性富集;并且与多种分析方法兼容,有利于对目标产物的后续分析。FSPE 在多肽纯化方面的应用还有很大的发展空间,目前应用于多肽纯化的氟标签基本都集中于氨基和羧基上,即使是富集一些特殊肽,也是将其中的特殊基团转化为氨基之后再进一步富集,所以发明更多样化的氟标签设计和含氟固定相,以满足不同反应体系和富集不同翻译后修饰肽的需求是今后拓展其在多肽领域应用的关键。但目前已有的研究结果足以证明这个技术多肽研究领域的独特优势和潜力。

#### REFERENCES

- [1] VILAS BOAS L C P, CAMPOS M L, BERLANDA R L A, et al. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(18): 3525-3542.
- [2] DUAN H M. Biologically active cyclotides and their pharmaceutical progress[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(5): 633-638.
- [3] AGYEI D, ONGKUDON C M, WEI C Y, et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides[J]. *Food Bioprod Process*, 2016(98): 244-256.
- [4] NIE C P, WU D, YANG J, et al. Preparation of parishin B reference substance by preparative HPLC[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(9): 1055-1058.
- [5] BISWAS S, SARKAR A, MISRA R. Iron affinity gel and gallium immobilized metal affinity chromatographic technique for phosphopeptide enrichment: A comparative study[J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2017, 31(3): 639-646.
- [6] LASTOVICKOVA M, STROUHALOVA D, BOBALOVA J. Use of lectin-based affinity techniques in breast cancer glycoproteomics: A review[J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(5): 1885-1899.
- [7] İLGÜ H, SÜRMEİ Y, ŞANLI-MOHAMED G. A thermophilic  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus vulcani* GS90: Heterologous expression, biochemical characterization, and its synergistic action in fruit juice enrichment[J]. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244(9): 1627-1636.
- [8] HUANG X, LIU M, JASINSKI J P, et al. Recyclable organocatalysts for a one-pot asymmetric synthesis of 2-fluorocyclohexanols bearing six contiguous stereocenters[J]. *Adv Synth Catal*, 2017, 359(11): 1919-1926.
- [9] HE X W, HE Y, HUANG S, et al. Fluoro-functionalized paper-based solid-phase extraction for analysis of perfluorinated compounds by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2019(1601): 79-85.
- [10] RAO KADIYALA C S, MULLANGI V, ZHOU X, et al. Rapid and effective removal of perfluorooctanoic acid from proteomics samples[J]. *Proteomics*, 2012, 12(14): 2271-2275.
- [11] WANG J, SHI Y L, CAI Y Q. A highly selective dispersive liquid-liquid microextraction approach based on the unique fluorophilic affinity for the extraction and detection of per- and polyfluoroalkyl substances coupled with high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2018(154): 1-7.
- [12] HUANG Y F, ZHANG W H, BAI M D, et al. One-pot fabrication of magnetic fluorinated carbon nanotubes adsorbent for efficient extraction of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkyl sulfonic acids in environmental water samples[J]. *Chem Eng J*, 2020(380): 122392.
- [13] BASSANINI I, GALLI C, FERRANDI E E, et al. Perfluorinated probes for noncovalent protein recognition and isolation[J]. *Bioconjugate Chem*, 2020, 31(3): 513-519.
- [14] MARSH E N G. Peptide, Protein and Enzyme Design[M]. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2016(580): 251-278.
- [15] DALVI V H, ROSSKY P J. Molecular origins of fluorocarbon hydrophobicity[J]. *PNAS*, 2010, 107(31): 13603-13607.
- [16] CAMETTI M, CROUSSE B, METRANGOLO P, et al. The fluorophilic effect in biomolecular applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(1): 31-42.
- [17] MOLCHANOVA N, HANSEN P R, DAMBORG P, et al. Lysine-based  $\alpha$ -peptide/ $\beta$ -peptoid peptidomimetics: Influence of hydrophobicity, fluorination, and distribution of cationic charge on antimicrobial activity and cytotoxicity[J]. *ChemMedChem*, 2017, 12(4): 312-318.
- [18] HAYAMA T, YOSHIDA H, YAMAGUCHI M, et al. Fluorophilic affinity-based separation techniques for the analysis of biogenic and related molecules[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014(101): 151-160.
- [19] MENG H, KALSANI V, KUMAR K. Fluorinated Amino Acids and Reagents in Protein Design and Biomolecule Separation[M]. *Current Fluoroorganic Chemistry*. Washington, DC: American Chemical Society, 2007: 487-499.
- [20] ZHANG C, YAN T Y, CHEN C, et al. Fluorophilic solid-phase extraction assisted new methods for analysis of biomolecules with mass spectrometry[J]. *Chin J Analyt Chem(分析化学评述与进展)*, 2017, 45(12): 1857-1864.
- [21] CATANI M, GUZZINATI R, MARCHETTI N, et al. Exploring fluorophilic affinity by liquid chromatography[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(13): 6854-6860.
- [22] XU C, ZHU J J, LI Y, et al. Fluorophilic solid-phase extraction (F-SPE) as a pilot tool for quantitative determination of perfluorochemicals in water samples coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *RSC Adv*, 2015, 5(17): 13192-13199.
- [23] LI L L, JIAO J, CAI Y, et al. Fluorinated carbon tag derivatization combined with fluorophilic solid-phase extraction:

- A new method for the highly sensitive and selective mass spectrometric analysis of glycans[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(10): 5125-5131.
- [24] ZHANG C, TAO T, YUAN W J, et al. Fluorous solid-phase extraction technique based on nanographite fluoride[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(8): 4566-4572.
- [25] MATSUGI M, CURRAN D P. Reverse fluorous solid-phase extraction: A new technique for rapid separation of fluorous compounds[J]. *Org Lett*, 2004, 6(16): 2717-2720.
- [26] TSAO C W, YANG Z J. High sensitivity and high detection specificity of gold-nanoparticle-grafted nanostructured silicon mass spectrometry for glucose analysis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(40): 22630-22637.
- [27] RIIKONEN J, NISSINEN T, ALANNE A, et al. Stable surface functionalization of carbonized mesoporous silicon[J]. *Inorg Chem Front*, 2020, 7(3): 631-641.
- [28] GO E P, URITBOONTHAI W, APON J V, et al. Selective metabolite and peptide capture/mass detection using fluorous affinity tags[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(4): 1492-1499.
- [29] LUO Z, WILLIAMS J, READ R W, et al. Fluorous Boc(F Boc) carbamates: New amine protecting groups for use in fluorous synthesis[J]. *J Org Chem*, 2001, 66(12): 4261-4266.
- [30] FILIPPOV D V, VAN ZOELLEN D J, OLDFIELD S P, et al. Use of benzyloxycarbonyl (Z)-based fluorophilic tagging reagents in the purification of synthetic peptides[J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(43): 7809-7812.
- [31] CURRAN D P, AMATORE M, GUTHRIE D, et al. Synthesis and reactions of fluorous carbobenzyloxy(F Cbz) derivatives of alpha-amino acids[J]. *J Org Chem*, 2003, 68(12): 4643-4647.
- [32] VISSER P C D, HELDEN M V, FILIPPOV D V, et al. A novel, base-labile fluorous amine protecting group: Synthesis and use as a tag in the purification of synthetic peptides[J]. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44(50): 9013-9016.
- [33] MANZONI L, CASTELLI R. Froc: A new fluorous protective group for peptide and oligosaccharide synthesis[J]. *Org Lett*, 2006, 8(5): 955-957.
- [34] MATSUGI M, YAMANAKA K, INOMATA I, et al. Synthesis of fluorous-FMOC reagents and purification of protected dipeptides with fluorous solid phase extraction[J]. *QSAR Comb Sci*, 2006, 25(8/9): 713-715.
- [35] SUGIYAMA Y, ISHIHARA K, MASUDA Y, et al. Fluorous mixture synthesis of fluorous-Fmoc reagents using a one-pot double tagging strategy[J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(16): 2060-2062.
- [36] MATSUGI M, SUGIYAMA Y, SHIRAI R, et al. Fluorous mixture synthesis of tripeptides and pentapeptides using a fluorous-fmoc protection strategy[J]. *Synthesis*, 2017, 49(10): 2187-2204.
- [37] QIAN J, COLE R B, CAI Y. Synthesis and characterization of a 'fluorous'(fluorinated alkyl) affinity reagent that labels primary amine groups in proteins/peptides[J]. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(1): 1-11.
- [38] MONTANARI V, KUMAR K. Just add water: A new fluorous capping reagent for facile purification of peptides synthesized on the solid phase[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(31): 9528-9529.
- [39] ROYCHOUDHURY R, POHL N L. Synthesis of fluorous photolabile aldehyde and carbamate and alkyl carbamate protecting groups for carbohydrate-associated amines[J]. *Org Lett*, 2014, 16(4): 1156-1159.
- [40] WANG L M, YANG L J, ZHANG Y, et al. Dual isotopic labeling combined with fluorous solid-phase extraction for simultaneous discovery of neutral/sialylated N-glycans as biomarkers for gastric cancer[J]. *Anal Chim Acta*, 2020(1104): 87-94.
- [41] TAMASHIMA E, HAYAMA T, YOSHIDA H, et al. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in plasma using fluorous derivatization and monolithic solid-phase purification[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015(115): 201-207.
- [42] PARDO J, COBAS A, GUITIÁN E, et al. Fluorinated analogues of tert-butyl alcohol as novel protecting groups for use in fluorous synthesis[J]. *Org Lett*, 2001, 3(23): 3711-3714.
- [43] FUSTERO S, SANCHO A G, CHIVA G, et al. Fluorous (trimethylsilyl)ethanol: A new reagent for carboxylic acid tagging and protection in peptide synthesis[J]. *J Org Chem*, 2006, 71(8): 3299-3302.
- [44] CHAI Y H, FENG Y L, WU J J, et al. Recyclable benzyl-type fluorous tags: Preparation and application in oligosaccharide synthesis[J]. *Chin Chem Lett*, 2017, 28(8): 1693-1700.
- [45] GOTO K, MIURA T, MIZUNO M. Synthesis of peptides and oligosaccharides by using a recyclable fluorous tag[J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(48): 8293-8297.
- [46] SABADASHKA M, NAGALIEVSKA M, SYBIRNA N. Tyrosine nitration as a key event of signal transduction that regulates functional state of the cell[J]. *Cell Biol Int*, 2020. Doi: 10.1002/cbin.11301.
- [47] KIM J K, LEE J R, KANG J W, et al. Selective enrichment and mass spectrometric identification of nitrated peptides using fluorinated carbon tags[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(1): 157-163.
- [48] WANG Z G, LV N, BI W Z, et al. Development of the affinity materials for phosphorylated proteins/peptides enrichment in phosphoproteomics analysis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(16): 8377-8392.
- [49] ZHAO M, DENG C H. Designed synthesis of fluorous-functionalized magnetic mesoporous microspheres for specific enrichment of phosphopeptides with fluorous derivatization[J]. *Proteomics*, 2016, 16(7): 1051-1058.
- [50] ZHAO M, DENG C H. Fluorous modified magnetic mesoporous silica composites-incorporated fluorous solid-phase extraction for the specific enrichment of N-linked glycans with simultaneous exclusion of proteins[J]. *Talanta*, 2016(159): 111-116.
- [51] YANG L, YU W, YAN X, et al. Decyl-perfluorinated magnetic mesoporous microspheres for extraction and analysis perfluorinated compounds in water using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(19): 2629-2636.
- [52] FANG X, FU Y, LONG M J, et al. Temporally controlled targeting of 4-hydroxynonenal to specific proteins in living cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(39): 14496-14499.
- [53] YUAN W J, ZHANG Y, XIONG Y, et al. Highly selective and large scale mass spectrometric analysis of 4-hydroxynonenal modification via fluorous derivatization and fluorous solid-phase extraction[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(5): 3093-3100.

收稿日期: 2020-03-24  
(本文责编: 沈倩)