



【コラム vol.33】 Wang 樹脂(Wang Resin)のアミノ酸をロードした時の定量方法について

October 27, 2017

Elizabeth Denton

Wang 樹脂は標準的なアミノ酸をあらかじめロードされた状態で購入できますが、最初のアミノ酸を手作業で Wang 樹脂にカップリングが必要な場合もあります。

私が合成したい配列は、C 末端に非天然アミノ酸が必要だったため、市販されているものがありました。

このカップリング反応にはそれなりの課題があり、そのため多くのペプチド合成に携わる人はプレロードされた樹脂の大規模なバッチ調製を行います。しかし、これについては後述します。

今回の記事では、別のことを取り上げたいと思います。樹脂にロードされたアミノ酸はどのように定量するのでしょうか？

確かに、最初のアミノ酸を樹脂へカップリングして、そのまま次のアミノ酸のカップリング操作へペプチド合成に移行するグループに出会ったことがあります。この方法で進めることができます。

非天然アミノ酸、時には非常に高価なアミノ酸の使用が増える中、試薬の無駄や合成コストを削減するためには、樹脂への正確なアミノ酸ローディングを知ることが重要になります。

樹脂のローディングを正確に決定するには、高度な測定精度が要求されます。この方法の説明は難しくありませんが、正確な定量を得るためには、確かな分析技術が必要です。通常、アミノ酸のローディング反応が終了し、樹脂にキャップをした後に実施しますが、反応の進行状況を把握するためにも利用できます。

Fmoc 基とピペリジン付加物が紫外線照射により約 300 nm で強く吸収されることを利用して、その Fmoc 除去量を Beer の法則、分光測定にて定量します (式 1)。

$$A_x = \epsilon_x * l * c$$

式1：UV 吸収量と溶液濃度の相関を示す Beer-Lambert の法則になります。A = ある波長 (x) における UV 吸光度、 ϵ = ある波長 (x) におけるモル分光係数、l = サンプルを通る経路長 (UV セルの幅)、c = サンプル濃度、単位は mol/L になります。

Wang リンカーにうまく結合したアミノ酸の量を決定するために、以下の一般的なステップを実行する必要があります。各ステップで強調されている内容には特に注意してください。これらの詳細は、定量の成功に大きく貢献します。

1. [これらの文献などで](#)紹介されているアミノ酸ローディングプロトコルを実行します。
2. 反応容器から少量の樹脂を、あらかじめ用意したバイアルに取り出します。
3. 取り出した樹脂を十分に洗浄します。ここでの目的は、樹脂マトリックスに捕捉された可能性のある残留 DMF を除去することです。DMF を完全に除去するために、しばしば異なる溶媒を用いた洗浄サイクルを行います（例えば、PEG 系樹脂を使用する場合は、DCM とジエチルエーテルを交互に使用することもあります）。
4. 樹脂を完全に乾燥させます（通常は真空引きで）。正確な定量を行うためには、樹脂は非常に乾燥していなければなりません。残留溶媒の重量が定量に影響してはいけません!
5. 乾燥した樹脂を秤量します。
6. 樹脂は、20%ピペリジン DMF 溶液（既知量）に懸濁させます。Fmoc 脱保護溶液を正確に供給することは、レジンの正確な定量に不可欠です。
7. 標準的な方法で Fmoc 脱保護プロトコルを実行します。
8. Fmoc 脱保護溶液を全量回収します。ステップ 6 で送液量の正確さが重要だったように、ここでも回収量の正確さが同様に重要です。
9. 調整した 20%ピペリジン DMF 溶液で UV スペクトルをゼロにします。これらの測定には、吸光度ピークとそれに対応する最大吸収波長を完全に可視化するために、波長スキャン機能を使用することを推奨いたします。あるいは、301 nm の吸光度値を直接測定することもできます。
10. 回収した脱保護溶液は、20%ピペリジン DMF 溶液で希釈します。希釈量は、今回の分析に用いた樹脂の量や、Fmoc 脱保護に用いた脱保護溶液量に依存します。Beer の法則は、吸光度が約 0.1~1AU の範囲でのみ線形であることを忘れないでください。

11. 希釈した脱保護液の波長（～301 nm）の吸光度を測定します。
12. 脱保護反応中に放出される Fmoc のモル数を Beer の法則を用いて計算します。この希釈法で Fmoc 基とピペリジン負荷物のモル吸光係数は $6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ と報告されています。この計算では、希釈倍率を補正することを忘れないでください。希釈した濃度ではなく、実際の溶液の濃度が必要です。

脱保護液に放出される Fmoc 基のモル数は、Wang 樹脂に担持されたアミノ酸の量に正比例します。この量を用いて、上記工程で使用した乾燥樹脂の質量で単純に割ることで、アミノ酸の担持量を決定することができます。

Wang 樹脂に最初のアミノ酸をロードするための戦略について知りたいですか？ 以下の[リンク](#)から詳細をご覧ください。

About Biotage

Biotage is a global Life Science company that develops innovative and effective solutions for separation within organic and analytical chemistry, as well as for industrial applications.

[Go To Biotage Japan Web site ...Click here](#)



元の記事：

<https://www.biotage.com/blog/how-to-quantify-your-first-amino-acid-loading-onto-wang-resins>

