

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Hynek Mácha

**VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ LOADINGU
AMINOKYSELIN PŘI SYNTÉZE PEPTIDŮ NA PEVNÉ
FÁZI**

Development of method for determining
aminoacid loading in solid phase peptide synthesis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Konzultant: Ing. Marek Kořínek

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2018

Poděkování

Rád bych poděkoval mému konzultantovi Ing. Marku Kořínkovi za odborné rady a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce a za všechny předané zkušenosti. Dále děkuji svému školiteli docentu Karlu Nesměrákovi za vedení práce. Největší dík, ale patří mým rodičům, kteří mi umožnili studovat a dělat tak v životě to co mě skutečně baví.

Abstrakt

Byla vyvinuta jednoduchá metoda pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi. Metoda je aplikovatelná na nejběžnější typ syntézy využívající chránicí skupiny FMOC a piperidinu jakožto deprotekčního činidla. Oba produkty deprotektce jsou separovány metodou HPLC a stanoveny pomocí UV detektoru za použití interního standardu. Metoda poskytuje pravdivé hodnoty, které byly ověřeny nezávislou metodou. Relativní směrodatná odchylka metody je 1,52 %. Metoda je výrazně přesnější než metody dosud publikované a umožňuje stanovení z odpadu syntézy. Díky použití interního standardu neklade nároky na přesnost ředění nebo známé objemy.

Klíčová slova: FMOC, kapalinová chromatografie, loading aminokyselin, metoda vnitřního standardu

Abstract

A simple method has been developed to determine amino acid loading in solid phase peptide synthesis. The method is applicable for the most common type of synthesis, which use FMOC as protective group and piperidine as a deprotecting agent. Both products of deprotection reaction are separated by HPLC and determined using an UV detector; an internal standard is added. The method gives true values that have been verified by an independent method. The *RSD* is 1.52%. The method is more accurate than the published methods and allows the determination from the waste of synthesis. The employing of the internal standard eliminated the necessity of dilution accuracy or known volumes.

Key words: FMOC, HPLC, aminoacid loading, internal standard method

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod a teoretická část | 8 |
| 1.1 | Cíl práce | 8 |
| 1.2 | Polypeptidy..... | 8 |
| 1.2.1 | Chemická příprava peptidů..... | 8 |
| 1.3 | Syntéza peptidů na pevné fázi | 9 |
| 1.3.1 | Polymerní nosiče pro syntézu peptidů na pevné fázi..... | 9 |
| 1.3.2 | Používaná rozpouštědla..... | 10 |
| 1.3.3 | Linkery | 10 |
| 1.3.4 | Odštěpování a chránicí skupiny | 10 |
| 1.3.5 | Vznik peptidové vazby..... | 11 |
| 1.3.6 | Praktické provedení syntézy | 12 |
| 1.4 | Fluorenylmethoxykarbonyl..... | 13 |
| 1.4.1 | Syntéza fluorenylmethoxykarbonylu a chráněné aminokyseliny | 14 |
| 1.4.2 | Produkty při deprotekcí Fmoc skupiny piperidinem | 15 |
| 1.4.3 | Stabilita deprotekcí činidla | 17 |
| 1.5 | Syntéza dibenzofulvenu | 17 |
| 1.6 | Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu..... | 17 |
| 1.7 | Analytické metody pro stanovení loadingu | 18 |
| 2 | Experimentální část..... | 20 |
| 2.1 | Použité chemikálie | 20 |
| 2.2 | Syntéza dibenzofulvenu a příprava zásobních roztoků..... | 20 |
| 2.3 | Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu a příprava zásobních roztoků | 21 |
| 2.4 | Vývoj metody pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi | 23 |
| 2.5 | Určení korekčních faktorů..... | 24 |
| 2.6 | Příprava autentických vzorků a jejich analýza | 25 |
| 2.6.1 | Analyzované polymerní nosiče..... | 25 |
| 2.6.2 | Příprava vzorku obecně..... | 26 |
| 2.6.3 | Analýza vzorků..... | 26 |
| 2.6.4 | Pozorování rozpadu dimethylformamidu | 27 |
| 2.7 | Srovnávací metoda..... | 27 |
| 2.8 | Statistické zpracování naměřených dat..... | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3 | Výsledky a diskuse | 29 |
| 3.1 | Syntéza dibenzofulvenu | 29 |
| 3.2 | Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu..... | 30 |
| 3.3 | Vývoj metody pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi | 32 |
| 3.4 | Sestavení rovnice pro stanovení deprotektované Fmoc skupiny..... | 36 |
| 3.5 | Korekční faktory | 37 |
| 3.6 | Analýza polymerních nosičů | 39 |
| 3.6.1 | Pozorování rozpadu dimethylformamidu | 42 |
| 3.7 | Srovnávací metoda..... | 43 |
| 3.8 | Přehled výsledků..... | 45 |
| 4 | Závěr | 46 |
| | Literatura..... | 47 |

Seznam použitých zkratek a symbolů

| | |
|----------|--|
| <i>A</i> | absorbance |
| BOC | <i>tert</i> -butyloxykarbonyl |
| <i>c</i> | molární koncentrace [mol dm^{-3}] |
| <i>F</i> | korekční faktor |
| Fmoc | fluorenylmethoxykarbonyl |
| <i>m</i> | hmotnost [g] |
| <i>M</i> | molární hmotnost [g mol^{-1}] |
| <i>n</i> | látkové množství [mol] |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |
| <i>V</i> | objem [dm^3] |

1 ÚVOD A TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo vyvinout univerzálně použitelnou a zároveň jednoduchou metodu pro stanovení loadingu, tedy míry navázání, aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi za použití chránicí skupiny fluorenylmethyloxykarbonylu (Fmoc). Metoda by měla být použitelná jak v laboratorním, tak poloprovozním měřítku. Stanovení loadingu je založeno na kvantifikaci množství odštěpené aminokyselinové chránicí skupiny Fmoc působením roztoku piperidinu. Štěpné produkty jsou stanovovány metodou HPLC za použití vnitřního standardu.

1.2 Polypeptidy

Proteiny neboli polypeptidy, jsou biologické polymery tvořené z monomerních jednotek [1]. Skládají se z dvaceti různých aminokyselin. Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny peptidovou vazbou, tvořenou mezi karboxylovým koncem jedné aminokyseliny a aminokoncem druhé aminokyseliny. Podle počtu aminokyselin v řetězci se dělí do di-, tri-, oligo- (3–10) a polypeptidů (10<). Souhrnně se pak označují jako peptidy. Jako proteiny se pak označují velké makromolekuly tvořené jedním, nebo více polypeptidovými řetězci. V organismech jsou peptidy syntetizovány z genetického kódu [2]. Genetická informace je z DNA transkripcí přenesena na RNA. V ribosomech je pak procesem translace z RNA syntetizován specifický řetězec aminokyselin, tedy peptid.

1.2.1 Chemická příprava peptidů

Chemická syntéza peptidů se dá dělit podle homogenity (roztok) a heterogenity (kapalná/pevná fáze) systému, ve kterém se provádí a v současné době máme tři

přístupy [3, 4]. Klasická metoda, zahrnující čisticí kroky, a metoda s použitím rozpustných polymerních nosičů se řadí do roztokové syntézy. V případě použití nerozpustných polymerních nosičů se pak jedná o syntézu na pevné fázi. Klasická syntéza peptidů v roztoku zahrnuje kromě čištění tři kroky: (1) syntéza prvních dvou aminokyselin, (2) odštěpení chránicí skupiny z aminoskupiny jedné z aminokyselin a (3) navázání další aminokyseliny. Pokud je použit polymerní nosič, přidají se další dva kroky, a to navázání první aminokyseliny na polymer a odštěpení hotového peptidu z nosiče. Problémy, jako nízké výtěžky finálního produktu v klasické syntéze u delších peptidových řetězců, způsobené izolací a čištěním po každém reakčním kroku klasické syntézy, nebo špatná rozpustnost větších peptidů, byly vyřešeny právě vyvinutím syntézy peptidů na pevné fázi [1, 5], které se věnuje tato práce. Co se týče roztokové syntézy za použití rozpustných polymerů, díky použití nových rozpustných nosičů dochází v poslední době k jejímu rozkvětu [6].

1.3 Syntéza peptidů na pevné fázi

Syntéza peptidů na pevné fázi je zjednodušeně krokové přidávání *N*-chráněné aminokyseliny na aminoskupinu peptidového řetězce, nebo aminokyseliny [5]. Vznikající peptid je kovalentně vázán karboxylovou skupinou na částice pevného nerozpustného polymerního nosiče. Po navázání aminokyseliny na peptid následuje odštěpení chránicí skupiny a opakování těchto dvou kroků až do okamžiku kdy je požadovaný peptidový řetězec hotov. Poté následuje jeho odštěpení od polymerního nosiče. Navázání peptidového řetězce na nerozpustné částice umožňuje jednoduché zbavení se nadbytečných reagentů, nebo vedlejších produktů pomocí obyčejné filtrace po každém syntetickém kroku.

1.3.1 Polymerní nosiče pro syntézu peptidů na pevné fázi

V počátcích peptidové syntézy na pevné fázi bylo zkoušeno mnoho nerozpustných polymerních nosičů, neboli resinů [5]. Nejlepším z nich se ukázal kopolymer zesíťovaného polystyrenu a divinylbenzenu. Jako vhodný se ukázal kopolymer

s obsahem 1 % divinylbenzenu [7]. Další polymer, který je hojně používán jako nosič je polyakrylamid [8].

1.3.2 Používaná rozpouštědla

Mezi nejpoužívanější rozpouštědla využívaná při syntéze peptidů na pevné fázi patří dimethylformamid a dichlormethan [9]. Vedle rozpustnosti reagentů a aminokyselin je dobrá solvatace nerozpustného nosiče důležitou součástí celé syntézy. Díky rozdílné polaritě nosiče a rostoucího peptidového řetězce se liší i použití rozpouštědel [10]. Pro rostoucí peptidový řetězec je vhodné polárnější rozpouštědlo, tedy dimethylformamid. Při složitějších syntézách se pak mohou použít směsi rozpouštědel [11].

1.3.3 Linkery

Polymerní nosič musí obsahovat funkční skupinu, na kterou se naváže kovalentní vazbou první aminokyselina [5]. Tato funkční skupina se označuje jako linker. Vůbec první použitý linker při vzniku této metody byl chlormethyl. Od té doby vznikla celá řada linkerů s různým využitím. V této diplomové práci se jich objevuje více. Je mezi nimi velice populární hydroxymethylphenoxy linker, označovaný jako Wang [12]. Dále pak aminomethyl [13], a linkery označované jako Rink amid a Peptid amid linker (PAL) [14]. Pro příklad se dá uvést ještě hojně používaný tritylchlorid linker [15].

Na linker se pak musí navázat první aminokyselina. Tomuto procesu se říká anchoring, neboli kotvení, a je zřejmé, že z podoby moderních linkerů bude vycházet i různá podoba vazby, tedy buď amidová, nebo esterová [16]. Pro navázání na amin se používá běžná metoda peptidového couplingu, která je používána i v této diplomové práci. Navázání esterovou vazbou bývá složitější a tak jsou nosiče s těmito linkery často dostupné již s navázanou aminokyselinou.

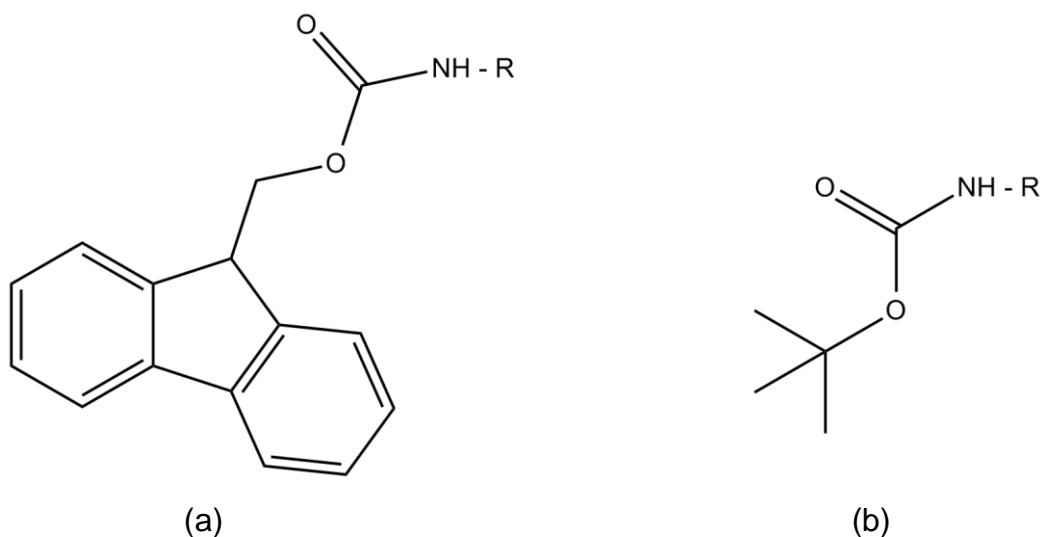
1.3.4 Odštěpování a chránicí skupiny

Chránicí skupiny α -aminoskupin jsou zřejmě nejdůležitější součástí peptidové syntézy, neboť brání polymerizaci aktivovaných aminokyselin [17]. V současnosti se nejčastěji

používají dvě chránící skupiny, a to 9-fluorenylmethoxykarbonyl (FMOC) (obr 1.1a) a *tert*-butyloxykarbonyl (BOC) (obr 1.1b). Od těchto dvou chránících skupin se pak odvíjejí dvě poněkud odlišné syntetické strategie a to FMOC/*tert*-butyl a BOC/benzyl.

Strategie BOC/benzyl využívá k odštěpování BOC chránící skupiny kyseliny. Nejčastěji je používána trifluoroctová kyselina v koncentraci 25–50 % v dichlormethanu. Strategie BOC/benzyl se však příliš nevyužívá kvůli nutnosti použití toxického flourovodíku při koncovém odštěpování hotového peptidu [18].

Širší užití pak má strategie FMOC/*tert*-butyl. Ta využívá ke koncovému odštěpení organické kyseliny, převážně trifluoroctovou kyselinu. Pro odštěpení chránící skupiny FMOC pak používá organických bází [17]. Nejčastěji se používá 20% piperidin v dimethylformamidu, nebo 1–5% 1,8-diazabicyklo(5.4.0)udek-7-en v dimethylformamidu.



Obr. 1.1 Chemické struktury (a) 9-fluorenylmethoxykarbonylu, (b) *tert*-butyloxykarbonylu.

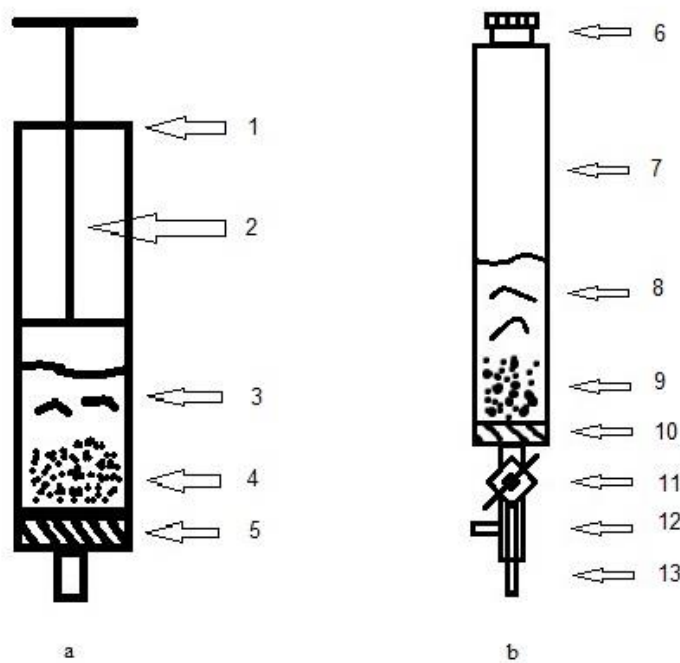
1.3.5 Vznik peptidové vazby

Peptidová vazba nemůže za normálních podmínek spontánně vzniknout a je nutné nejdříve aktivovat karboxylovou skupinu [19]. Aktivačních činidel existuje celá řada. V současnosti se využívající směsi karbodiimidů a aditiv [20]. Mezi používané karbodiimidy patří například diisopropylkarbodiimid, nebo dicyklohexylkarbodiimid [21, 22]. Aditiva mají za cíl zabránit racemizaci a patří mezi ně látky benzotriazolického

charakteru jako například 1-hydroxy-7-azabenzotriazol, nebo 1-hydroxybenzotriazol a dále *N*-hydroxylamin deriváty jako ethyl(hydroxyimino)kyanoacetát (OxymaPure) nebo 5-(hydroxyimino)1,3-dimethylpyrimidin-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)trion (Oxyma-B) [20]. Velice často je používána směs diisopropylkarbodiimidu a ethyl(hydroxyimino)-kyanoacetátu.

1.3.6 Praktické provedení syntézy

Syntézu lze provádět jak v laboratorním měřítku v obyčejné stříkačce (obr 1.2a), tak v provozním měřítku ve velkých, či malých reaktorech (obr 1.2b). Pro ilustraci bude popsáno schéma práce tak, jak je prováděna ve společnosti Apigenex.



Obr. 1.2 Schéma syntézy na pevné fázi (a) v injekční stříkačce a (b) v malém reaktoru: (1) injekční stříkačka, (2) píst stříkačky, (3) rozpouštědlo, (4) polymerní nosič, (5) frit, (6) uzávěr, (7) reaktor, (8) rozpouštědlo, (9) polymerní nosič, (10) frit, (11) otočný ventil, (12) odsávací rourka, (13) odpadní rourka

Postup syntézy peptidů na pevné fázi prováděný v této práci začíná naplněním reaktoru, nebo stříkačky opatřené fritou požadovaným množstvím polymerního nosiče. Nejprve se polymerní nosič za stálého třepání ponechá nabobtnat v nadbytku dichlormethanu po dobu patnácti až dvaceti minut. Přebytek dichlormethanu se poté odstraní. Po tomto kroku následuje buď, navázání chráněné aminokyseliny na nosič, nebo deprotektce polymerního nosiče v závislosti na jeho typu. Deprotektce nosiče probíhá stejně jako u aminokyselin. Pro navázání aminokyseliny se připraví chráněná aminokyselina, ethyl(hydroxyimino)kyanoacetát a diisopropylkarbodiimid v molárním poměru 1:3 ku množství vazebných míst na polymerním nosiči. Tyto tři složky se smíchají v dimethylformamidu v množství asi 15 ml na gram polymeru. Směs je míchána po dobu deseti minut a poté se přidá k nabobtnalému polymeru a nechá se hodinu třepat. Následuje odsátí přebytečného roztoku a promytí dvakrát dichlormethanem a dvakrát dimethylformamidem. Po této reakci se často provádí Kaiserův test [23] pro ověření, zda reakce proběhla. Test využívá ninhydrinové reagentie k barevné indikaci terminální aminoskupiny. Následuje deprotektce, k nosiči se přidá 20% roztok piperidinu v dimethylformamidu v množství asi 20 ml na gram polymeru a nechá se působit po dobu deseti minut. Deprotektce se pak ještě jednou opakuje. Následuje jedno minutové a jedno desetiminutové promytí dimethylformamidem. Na takto odchráněnou aminokyselinu se pak stejným postupem navazují další aminokyseliny, až je pak peptid odštěpen roztokem trifluoroctové kyseliny.

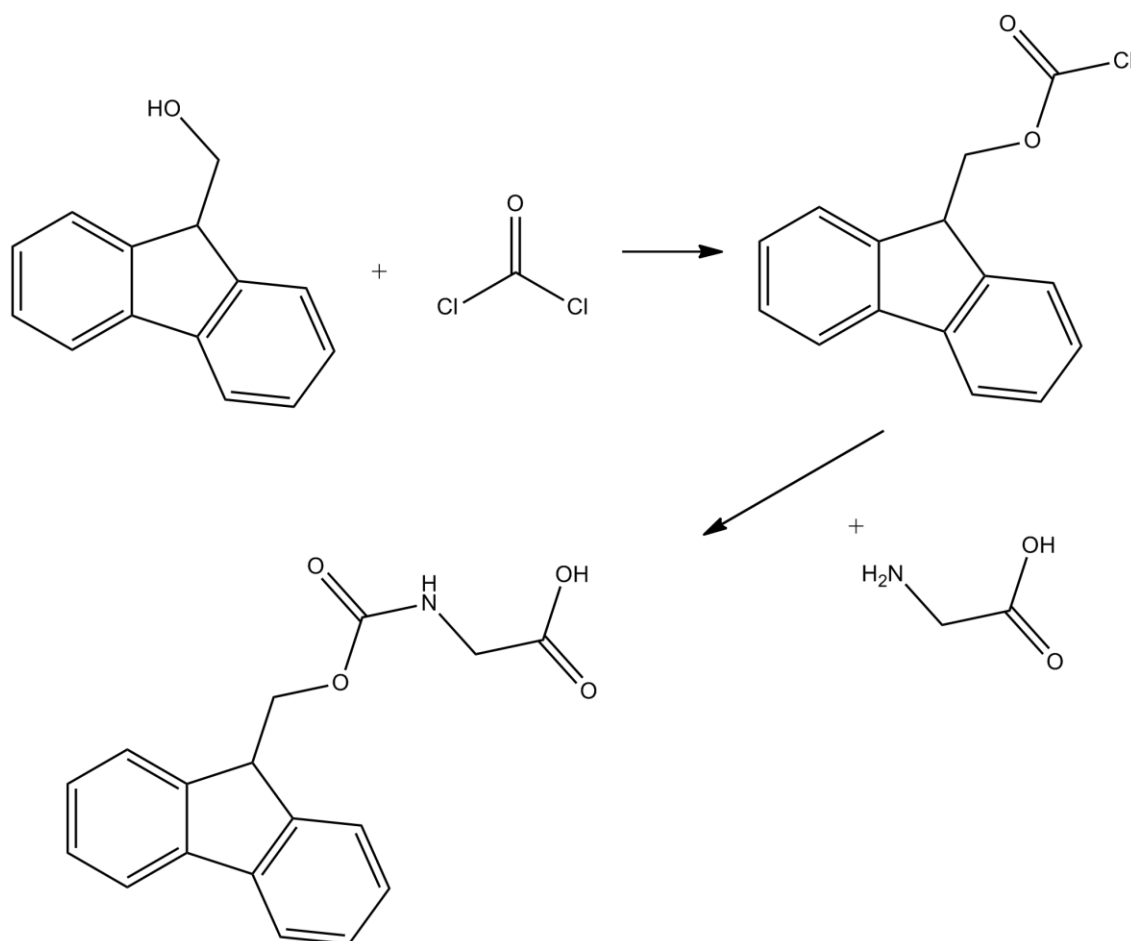
1.4 Fluorenylmethyloxykarbonyl

Fluorenylmethyloxykarbonyl jakožto chránicí skupina pro aminokyseliny byl poprvé publikován v roce 1970 [24]. Tato skupina využívá štěpení za bazických podmínek, zatímco valná většina v té době používaných štěpících metod, využívala štěpení kyselinami různé síly. Díky použití bazického štěpení hlavní *N*-chránicí skupiny pak bylo možné, vyvinout linkery a chránicí skupiny pro vedlejší peptidovou kostru tak, aby byly štěpitelné slabšími kyselinami a odpadla tak nutnost použití toxického fluorovodíku jako tomu je u BOC strategie [25]. Jak už bylo zmíněno výše, pro

odštěpení z nosiče se používá trifluoroctová kyselina a pro samotnou deprotekcí nejčastěji piperidin.

1.4.1 Syntéza fluorenylmethoxykarbonylu a chráněné aminokyseliny

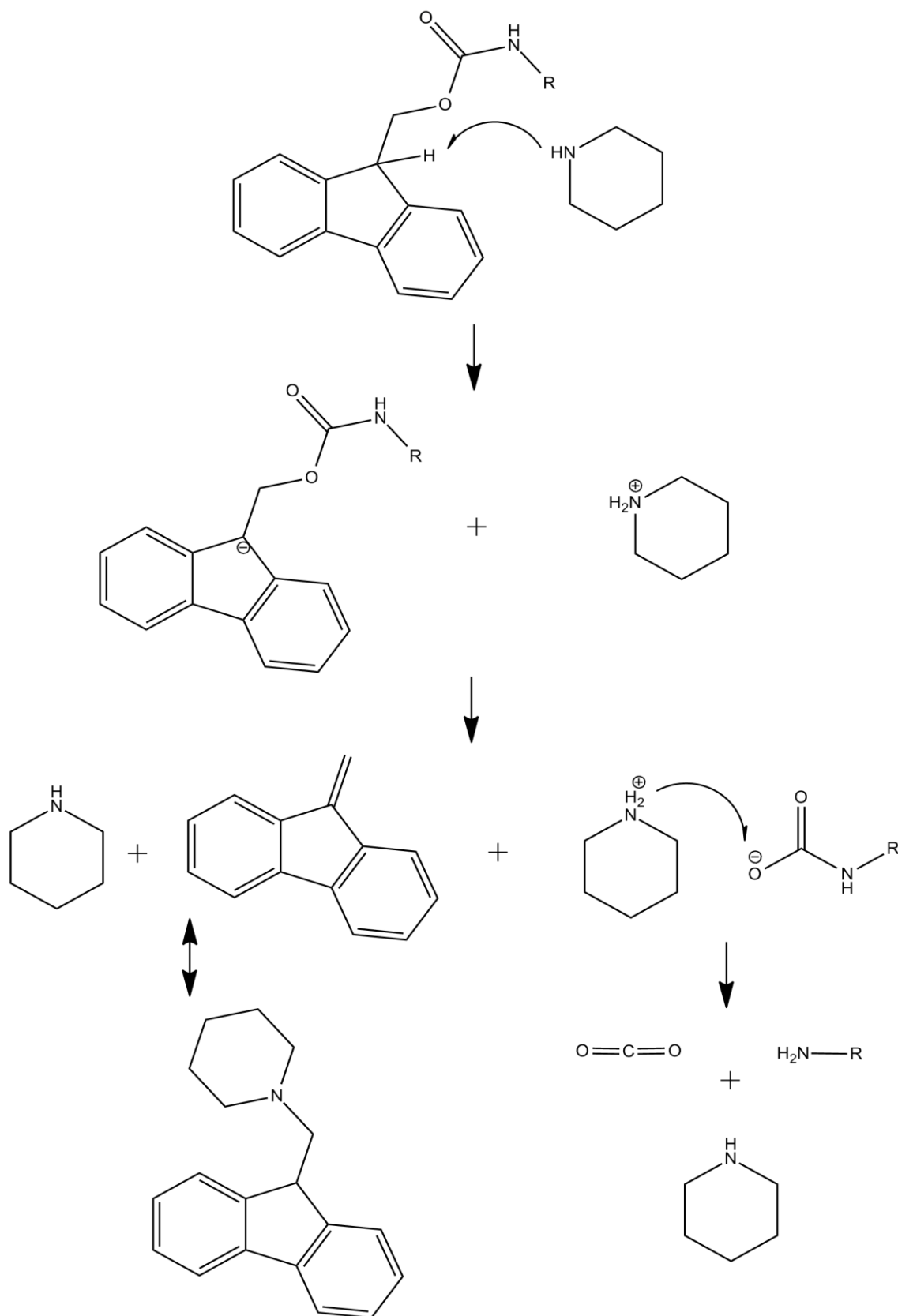
Schéma reakce lze vidět na obr.1.3. Výchozí látka pro syntézu fluorenylmethoxykarbonylu je 9-fluorenylmethanol [26]. Reakcí s fosgenem pak vzniká fluorenylmethoxykarbonyl chlorid. Ten pak reakcí s aminoskupinou, například aminokyselinou, poskytuje karbamát příslušného aminu a fluorenylmethylu.



Obr. 1.3 Syntéza chráněné aminokyseliny

1.4.2 Produkty při deprotekcii FMOC skupiny piperidinem

Fluorenový systém FMOC skupiny odčerpává elektrony a způsobuje tak velkou kyselost osamoceného β -vodíku na špičce pětičlenného kruhu, ten je pak velice náchylný k odštěpení slabou bází [27]. Po odštěpení β -vodíku pak z FMOC skupiny vzniká dibenzofulven. Po této β -eliminaci je dibenzofulven atakován aminem z deprotekcího činidla za vzniku příslušného aduktu. FMOC skupina je velice rychle odštěpena primárními, a sekundárními (např. piperidin, piperazin) aminy a pomalu terciálními. Tato reakce pak probíhá rychleji v polárním rozpouštědle (dimethylformamid) na rozdíl od nepolárního (dichlormethan). Na obr. 1.4 je znázorněno schéma reakce za použití nadbytku piperidinu, kterému se tato práce věnuje. Vznik piperidinového aduktu je v tomto případě silně upřednostňován díky velkému nadbytku piperidinu [28].



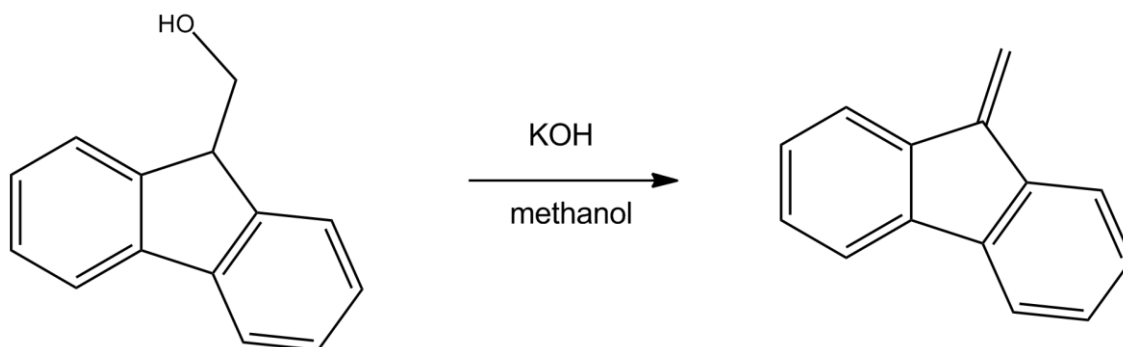
Obr. 1.4 Schéma deprotekcce Fmoc skupiny nadbytkem piperidinu

1.4.3 Stabilita deprotekčního činidla

Jak už bylo popsáno výše, nejběžněji používaným deprotekčním činidlem je 20% piperidin v dimethylformamidu. Při deprotekcí se pak piperidin (sekundární amin) aduje na fluorenylovou kostru, což je hlavní produkt deprotekce a také hlavní stanovovaná látka. Dimethylformamid se, ale v bazickém prostředí rozpadá za vzniku oxidu uhelnatého a dimethylaminu [29]. V roztoku deprotekčního činidla tím vzniká druhý sekundární amin, který se může analogicky adovat na fluorenylovou kostru a tím zkreslovat stanovení.

1.5 Syntéza dibenzofulvenu

Pro vývoj analytické metody pro stanovení loadingu bylo třeba nejprve syntetizovat štěpné produkty popsané v kap. 1.4.2. Syntéza dibenzofulvenu vychází z 9-fluorenyl-methanolu (obr. 1.5). Ten podléhá β -eliminaci v methanolickém roztoku vlivem hydroxidu draselného [30]. Čistý dibenzofulven je pak extrahován do hexanu. Dibenzofulven je velice náchylný na polymerizaci a to dokonce i v pevném stavu [31].

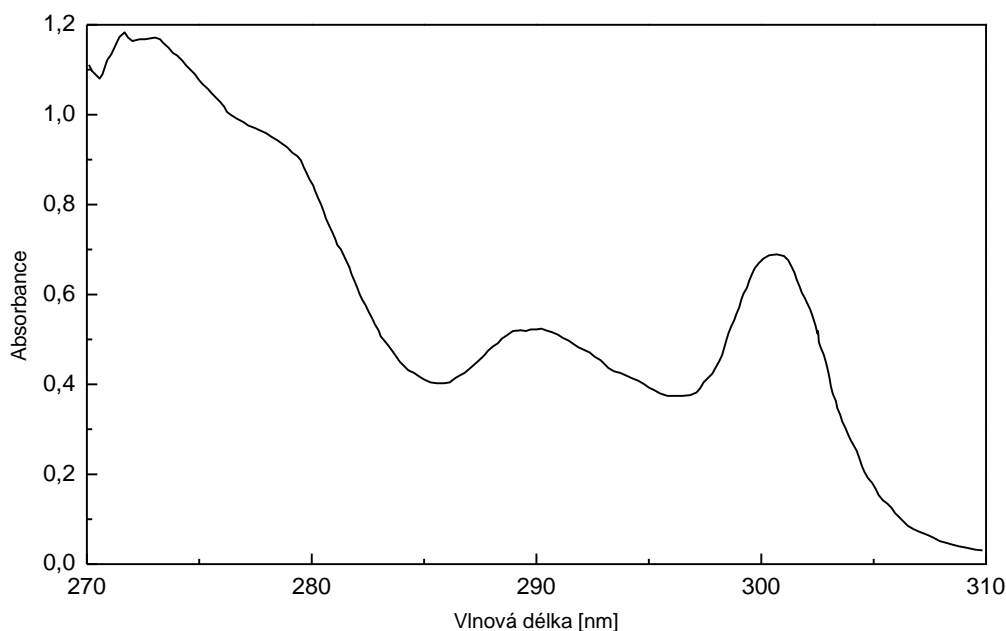


Obr. 1.5 Syntéza dibenzofulvenu

1.6 Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu

Jelikož k syntéze piperidin-fluorenylového aduktu nebyla nalezena literatura, byl vyvinut vlastní postup přípravy vycházející ze známého průběhu reakce při deprotekcí

FMOC skupiny piperidinem, který je detailně popsán v experimentální části. Jako cíl byla určena shoda UV spektra (obr. 1.6) nalezeného v literatuře [28].



Obr. 1.6 UV spektrum piperidin-fluorenylového aduktu o koncentraci $8,515 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ve 20% piperidinu v dimethylformamidu (převzato a upraveno podle [28]).

1.7 Analytické metody pro stanovení loadingu

Většina používaných metod pro stanovení loadingu využívá absorbance UV záření buď piperidinového aduktu, nebo dibenzofulvenu. Jakožto základní stanovení loadingu, které se objevuje v různých variacích především ve starší a obecné literatuře [32, 33] je metoda měřící absorbanci piperidinového aduktu při 301 nm. Tato metoda byla roku 2017 popsána podrobně a zdokonalena. Je při ní měřena absorbance UV záření piperidinového aduktu při charakteristickém píku 301 a 290 nm [28]. Ihned po deprotekcii je v roztoku výrazný nadbytek aduktu oproti dibenzofulvenu a jeho přítomnost je pro stanovení zanedbatelná. Toto stanovení také využívá tato diplomová práce jako nezávislou ověřovací metodu.

Další hojně rozšířenou metodou je stanovení, kdy se FMOC skupina deprotekuje 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enem, který jakožto terciální amin netvoří adukt

s dibenzofulvenem a ten zůstává v roztoku zachován [34]. Měří se pak UV absorbance při charakteristickém píku o vlnové délce 294 nm, nebo 304 nm. Derotekci pomocí 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-enu využívají i další metody. Dvě metody využívají kapalinové chromatografie a používají různé interní standardy pro samotné stanovení dibenzofulvenu [35, 36]. První zmíněná metoda provádí stanovení na koloně Spherclone ODS (2) C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm) od výrobce Phenomenex. Mobilní fáze je 70% acetonitril ve vodě s 0,1% přídavkem trifluoroctové kyseliny. Jako vnitřní standard je zde anthracen a *RSD* metody je 8,1 %. Druhá metoda v pořadí probíhá na koloně Zorbax Rapid Resolution SB-C8 (50 × 4,6 mm; 3,5 μm). Gradientová eluce stoupá od 15% acetonitrilu ve vodě s přídavkem 0,1 % trifluoroctové kyseliny do 95% acetonitrilu. Vnitřní standard je zde nitrobenzoová kyselina. Třetí separační metoda využívá plynovou chromatografii [37]. Opět využívá interního standardu anthracenu a je prováděna na fenylmethylsilikonové kapilární koloně.

Poněkud stranou od těchto přístupů pak stojí metoda využívající stanovení nukleární magnetickou rezonancí pomocí interního standardu, methylantranilátu [38]. Její výhodou je, že není náročná na změnu standardně používaného piperidinu a je možné provést stanovení z odpadu syntézy. U předchozích metod je nutné vždy část polymeru odebrat a analýzu provést separátně na odebraném vzorku. Navíc se jako jediná ze všech známých metod zaměřuje na oba produkty piperidinové derotekce. Stanovuje jak dibenzofulven, tak piperidinový adukt, pomocí integrace píků v jejich charakteristických posunech.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly analytické čistoty (pokud není uvedeno jinak): 9-fluorenylmethanol 98% (Combi-Blocks, USA), hydroxid draselný (Lachner), methanol (Brenntag), hexan pro HPLC (Lachner), deuterovaný chloroform 99,8% (Armar), tetrahydrofuran pro HPLC (Lachner), aminomethyl resin (Hencheng, Čína), FMOC-Gly-OH (Novabiochem) diisopropylkarbodiimid (Massivechem, Čína), ethyl(hydroxyimino)kyanoacetát (Massivechem, Čína), dimethylformamid (Brenntag), dichlormethan (Brenntag), piperidin (Sigma Aldrich), TLC silika gel desky (Merck), cyklohexan (Brenntag), ethylacetát (Brenntag), silikagel (Merck), *N,N*-diisopropylethylamin (Sigma Aldrich), fosgen (Fluka), acetonitril pro HPLC (Fisher), trifluoroctová kyselina pro HPLC (Alfa Aesar), dimethylamin 40% vodný roztok (Merck), bifenyl (Sigma-Aldrich).

2.2 Syntéza dibenzofulvenu a příprava zásobních roztoků

Dibenzofulven byl syntetizován dle návodu v literatuře [30], výchozí látkou byl 9-fluorenylmethanol. Pro reakci byl odvážen asi 1 gram fluorenylmethanolu, přenesen do 100ml varné baňky a rozpuštěn v 50 ml metanolu. Do tohoto roztoku bylo přidáno asi půl gramu hydroxidu draselného a reakční směs byla ponechána reagovat po dobu dvou týdnů za stálého míchání z důvodu úplného zreagování fluorenylmethanolu. Bylo totiž pozorováno, že i fluorenylmethanol je schopen v nezanedbatelné míře přecházet do hexanu. Dva týdny byly stanoveny pozorováním reakční směsi pomocí TLC, byla brána v potaz i časová rezerva. Reakce byla sledována pomocí TLC s mobilní fází cyklohexan:ethylacetát v poměru 9:1. Reakční směs se poté nechala zfiltrout přes filtrační papír a dibenzofulven byl z reakční směsi extrahován v děličce, dvakrát do

40 ml hexanu. Kvůli snadné polymerizaci dibenzofulvenu, jak v kapalném, tak pevném stavu, bylo s dibenzofulvenem pracováno v hexanovém extraktu. Získání krystalů dibenzofulvenu a následné rozpuštění definovaného množství se ukázalo jako nemožné, neboť krystalky dibenzofulvenu se nikdy dokonale nerozpustily. Bylo obtížné získat i NMR spektrum. Přesná koncentrace roztoku pro přípravu standardu byla získána odpařením 25 ml extraktu přesně, na vakuové odparce ve vytárované baňce, s následným dosušením pod vakuem a zvážením pevného zbytku, nažloutlých krystalků. Pro identifikaci bylo naměřeno vodíkové NMR spektrum v deuterovaném chloroformu na přístroji Bruker Avance 300 o síle magnetu 300 MHz. Bylo naměřeno také UV spektrum v rozsahu 200–400 nm na UV–VIS spektrofotometru Hewlett Packard – 8453.

Syntéza dibenzofulvenu byla provedena dvakrát a byly připraveny dva zásobní roztoky o koncentraci $10 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. První syntéza poskytla 0,1722 g dibenzofulvenu v 25 ml hexanového extraktu. Koncentrace dibenzofulvenu byla tedy $38,64 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Zásobní roztok byl připraven odpipetováním 2,6 ml extraktu do 10ml odměrné baňky, která byla po rysku doplněna tetrahydrofuranem. Druhá syntéza poskytla 0,1906 g dibenzofulvenu v 25 ml a koncentrace extraktu byla tedy $42,78 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Do druhé 10ml odměrné baňky pak bylo pipetováno 2,4 ml extraktu a doplněno tetrahydrofuranem po rysku. Vznikly tak dva zásobní roztoky, první o koncentraci $10,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a druhý o koncentraci $10,27 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Rozpouštědlo tetrahydrofuran bylo vybráno kvůli mísitelnosti s hexanem a zároveň vodnou fází chromatografického systému.

2.2 Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu a příprava zásobních roztoků

Pro syntézu aduktu byl, jakožto nerozpustný nosič, použit zesíťovaný polystyren s 1 % divinylbenzenu s aminomethyl linkerem o koncentraci 1,5 mmol vazebných míst na gram. Byly odváženy 4 gramy tohoto nosiče a převedeny do 100ml reaktoru pro syntézu na pevné fázi. Polymerní nosič se nechal bobtnat na třepačce po dobu 20 minut v 50 ml dichlormethanu, který byl poté odsán. Byl připraven roztok couplingového činidla v molárním poměru 1:3 proti vazebným místům. 5,42 g Fmoc-Gly-OH, 2,61 g ethyl(hydroxyimino)kyanoacetátu a 2,8 ml diisopropylkarbodiimidu bylo smícháno

v 60 ml dimethylformamidu a mícháno po dobu 10 minut. Tato směs byla poté smíchána v reaktoru s nabobtnalým polymerem a 1 hodinu se třepala. Poté byl polymer dvakrát promyt dimethylformamidem a dvakrát dichlormethanem. Byl proveden Kaiserův test pro potvrzení úplné konverze. K malému vzorku polymeru byly nadávkovány zhruba 3 kapky všech tří reagensů a vzorek byl porovnán s pozitivním testem.

Po vysušení bylo naváženo 1,3 gramy polymeru, ten se nechal 10 minut bobtnat v 25 ml dichlormethanu, který byl následně odsán. Tento Fmoc glycinový polymerní nosič byl poté deprotekován po dobu třiceti minut v 30 ml dichlormethanu s přidavkem 2 ml piperidinu, což odpovídá deseti molárním ekvivalentům oproti Fmoc skupině. Odsátá směs pak byla odpařena na vakuové odparce, přičemž odpaření piperidinu nebylo kompletní a směs byla znovu rozpuštěna v dichlormethanu. Druhé odpaření už odstranilo veškeré, okem pozorovatelné, množství piperidinu. Zbytky piperidinu pak byly vymyty vodou na fritě a bílé křídovité krystaly pak byly dosušeny pod vakuem. Pro identifikaci bylo naměřeno vodíkové NMR spektrum v deuterovaném chloroformu na přístroji Bruker Avance 300 o síle magnetu 300 MHz. Bylo naměřeno také UV spektrum v rozsahu 200–400nm na UV–VIS spektrofotometru Hewlett Packard – 8453.

Z takto syntetizovaného aduktu byly poté připraveny dva zásobní roztoky o koncentraci $10 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Bylo naváženo 13,22 a 13,02 mg aduktu a převedeno do 5ml odměrné baňky. Baňky byly doplněny tetrahydrofuranem po rysku. Vznikly tak dva zásobní roztoky, první o koncentraci $10,04 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a druhý o koncentraci $9,89 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Bylo zkoušeno více postupů pro izolaci čistého aduktu. Běžné dělení pomocí chromatografického sloupce naplněného silikagelem s mobilní fází ethylacetát:cyklohexan. Dále postup, kdy byl piperidin vycytán isokyanátovým scavengerem, chyceným na polymerním nosiči.

Ten byl připraven z 2 gramů pevné fáze, která se nechala 20 minut bobtnat v 50 ml dichlormethanu s následným odsátím. K pevné fázi pak bylo přilito 50 ml dichlormethanu a 4,2 ml *N,N*-diisopropylethylamin (8 molárních ekvivalentů) a následně bylo přidáno 4,7 ml fosgenu (3 molární ekvivalenty). Tato směs se nechala míchat dvě hodiny. Přes takto připravený polymer se poté nechala zfiltrovat směs po deprotekcii. Dalším vyzkoušeným postupem byly preparativní TLC desky.

2.4 Vývoj metody pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi

Vzhledem k nutnosti stanovení dvou látek byla vybrána separační metoda HPLC. Detekce pomocí UV detektoru byla vybrána vzhledem k strukturní povaze obou látek. Pro vyhodnocování byla zvolena metoda interního standardu, která nevyžaduje používání standardu nestálého dibenzofulvenu. Jako interní standard byl zvolen bifenyl.

Pro vývoj metody byl připraven zásobní roztok všech tří složek o koncentracích jednotlivých složek zhruba 1 mM. Bifenyl a adukt byly rozpouštěny v tetrahydrofuranu z důvodu kompatibility s hexanovým extraktem dibenzofulvenu a vodnou fází separačního systému.

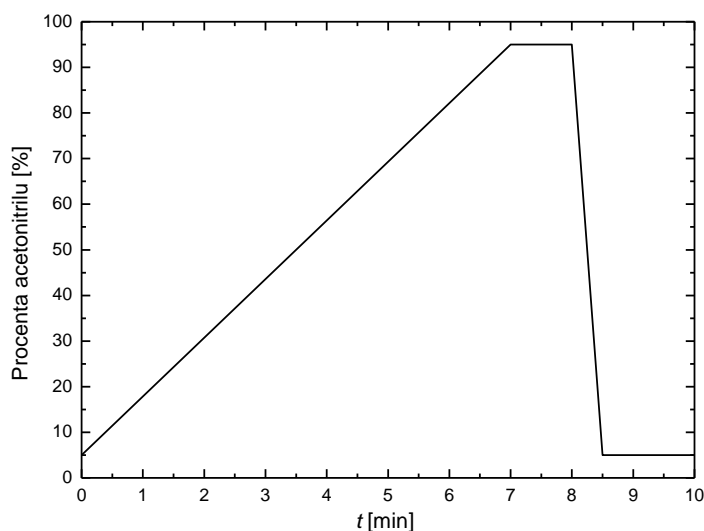
Pro dělení těchto tří látek byla vyvinuta desetiminutová metoda s lineární gradientovou elucí od 0 do 7 minuty, od 5 do 95 % acetonitrilu s mobilními fázemi voda (0,1 % trifluoroctová kyselina) a acetonitril (0,1 % trifluoroctová kyselina) o průtoku $1,1 \text{ ml min}^{-1}$ a s teplotou $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Procento acetonitrilu stoupá od nulté minuty po sedmou lineárně, do osmé minuty pak zůstává na 95 % a poté lineárně klesne zpět na 5 % během půl minuty. Na pěti procentech se pak drží do konce analýzy. Schéma gradientu můžeme vidět na obr. 2.1. Jako stacionární fáze byla použita kolona značky Phenomenex LUNA C18 o délce 75 mm, šířce 4,6 mm a velikostí částic 3 mikrometry. Detekce probíhala ve dvou vlnových délkách kvůli rozdílným UV spektrům stanovovaných látek. V oblasti eluce bifenyly se měří absorbance při 248 nm, což je jeho charakteristické maximum. Ve zbytku chromatogramu pak při 266 nm. Při této vlnové délce má maximální absorbanci piperidin-fluorenylový adukt, a protože vzniká při deprotekcii v nadbytku, byla tato vlnová délka vybrána kvůli maximální citlivosti metody. Dibenzofulven má při 266 nm v podstatě konstantní absorbanci v rozsahu asi $\pm 2 \text{ nm}$. Dávkovací objem pro tyto vzorky standardů byl 5 μl .

Touto metodou byly poté analyzovány jednotlivé složky samostatně, pro určení retenčních časů. Rovněž o koncentraci asi 1 mM a dávkovacím objemem 5 μl .

U vyvinuté metody bylo vypočítáno *RSD* systému a to z deseti ploch píků bifenyly z jednoho vzorku, dávkovaného desetkrát o dávkovacím objemu 5 μl a 10 μl . Pro

dávkovací objem 5 μl bylo naváženo 7,58 mg bifenyly a rozpuštěno v tetrahydrofuranu v 5ml odměrné baňce. 0,5 ml tohoto roztoku pak bylo převedeno do 5ml odměrné baňky a doplněno tetrahydrofuranem po rysku. Pro dávkovací objem 10 μl bylo naváženo 8,04 mg bifenyly a rozpuštěno v acetonitrilu v 5ml odměrné baňce. 0,5 ml tohoto roztoku pak bylo převedeno do 10ml odměrné baňky a doplněno tetrahydrofuranem po rysku. Různé dávkovací objemy a rozpouštědla byla zvolena v závislosti na vzorcích pro získání korekčních faktorů a na vzorcích pro stanovení autentických vzorků.

Pro samotné stanovení množství deprotektované Fmoc skupiny pak byla sestavena rovnice vycházející ze dvou rovnic pro stanovení pomocí interního standardu právě kvůli stanovování dvou látek vedle sebe. K této rovnici musely být zjištěny korekční faktory.



Obr. 2.1 Schéma gradientu použitého při HPLC separaci produktů deprotektace pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi. Mobilní fáze acetonitril:voda (vždy s přidavkem 0,1 % trifluoroctové kyseliny).

2.5 Určení korekčních faktorů

Pro získání hodnoty korekčních faktorů byly analyzovány známé koncentrace interního standardu, vždy se známou koncentrací jedné ze stanovovaných látek. U obou látek byly provedeny čtyři analýzy a to o dvou různých koncentracích, ze dvou paralelně

připravených standardních roztoků. Zásobní roztoky bifenyly byly připraveny odvážením 77,52 a 15,64 mg bifenyly do 50ml a 10ml odměrné baňky a doplněny po rysku tetrahydrofuranem čímž vznikly dva zásobní roztoky, první o koncentraci $10,05 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a druhý o koncentraci $10,14 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Z každého zásobního roztoku byly připraveny směsi, vždy standardu a jedné ze stanovovaných látek, o koncentraci $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Pro přípravu první dvojice aduktů s bifenyly bylo pipetováno vždy 0,5 ml prvního zásobního roztoku obou látek do 5ml a 10ml odměrné baňky, ty byly poté doplněny po rysku tetrahydrofuranem. Stejně bylo postupováno při přípravě dvojice dibenzofulven a bifenyly. Stejný postup byl opakován při přípravě druhých dvojic, z druhých zásobních roztoků.

Takto připravené směsi byly analyzovány s dávkovacím objemem 5 μl a zjištěné plochy píků byly dosazeny do upravené rovnice pro výpočet za použití interního standardu [39]

$$\frac{A_x}{c_x} \cdot \frac{c_{st}}{A_{st}} = F_{st} \quad (2.1)$$

kde A_x plocha píku analyzované látky, c_x je koncentrace analyzované látky, F_{st} je korekční faktor interního standardu, A_{st} je plocha píku standardu a c_{st} je koncentrace standardu. Z této podoby rovnice pak byly zjištěny korekční faktory pro obě stanovované látky, dibenzofulven a piperidinový adukt.

2.6 Příprava autentických vzorků a jejich analýza

2.6.1 Analyzované polymerní nosiče

Pro ověření metody byly analyzovány čtyři polymerní nosiče obsahující Fmoc skupinu, o různých hodnotách loadingu.

- RINK AMIDE AM-II, udaný loading $0,36 \text{ mmol g}^{-1}$, výrobce Matrix, číslo šarže: 14J29-600-1310
- Fmoc-ILE-WANG, udaný loading $0,32 \text{ mmol g}^{-1}$, výrobce Merck, číslo šarže: S6931111433

- Fmoc–GLY–WANG, udaný loading $0,32 \text{ mmol g}^{-1}$, výrobce Merck, číslo šarže: S7090710541
- Fmoc–PAL AM, udaný loading $0,64 \text{ mmol g}^{-1}$, výrobce Merck, číslo šarže: S7373133710

2.6.2 Příprava vzorku obecně

Tento postup byl vyvinut pro univerzální použití při stanovování hodnoty loadingu. Nosiče byly naváženy do reaktorů, nebo do injekčních stříkaček opatřených fritou podle množství analytu. Polymer byl poté bobtnán v nadbytečném množství dichlormethanu po dobu 15 minut a dichlormethan byl odsát. K nabobtnalému nosiči byly poté přidány postupně čtyři roztoky v množství zhruba 20 ml g^{-1} jejichž odpad se shromažďoval do baňky. První a druhý roztok byl 20% piperidin v dimethylformamidu, a polymer byl s nimi třepán po dobu 10 minut. Třetí a čtvrtý byl dimethylformamid a třepán byl po dobu 1 minuty a 10 minut.

Do tohoto společného odpadu byl poté přidán bifenylyl, a to diferenčním vážením, tak, aby koncentrace bifenylylu v celkovém objemu odpadu byla zhruba pod koncentrací $3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Velice zjednodušeně se dá použít následující rovnice:

$$m_{BF} [mg] = 100 \cdot n_{FMOC} [mmol] \quad (2.2)$$

kde m_{BF} je hmotnost přídatku standardu bifenylylu a n_{FMOC} je předpokládané molární množství Fmoc skupiny v odpadu syntézy. Výsledné ředění vzorku pro nadávkování do chromatografického systému, o dávkovacím objemu $10 \mu\text{l}$, je na koncentraci celkové Fmoc skupiny ve vzorku asi $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Vzorky se ředí acetonitrilem.

2.6.3 Analýza vzorků

Glycinový, Isoleucinový a Rink amidový nosič byly analyzovány v tripletu, přičemž první dva vzorky měly přibližnou hmotnost $0,1 \text{ g}$ a třetí 1 g . Pro zjištění *RSD* vyvíjené metody bylo připraveno celkem 9 vzorků PAL nosiče. Osm o přibližné hmotnosti $0,1 \text{ g}$ a poslední o hmotnosti 1 g , u kterého byl nástřikový objem kromě $10 \mu\text{l}$ také $5 \mu\text{l}$. Pro

zjištění stability připraveného vzorku, bylo po týdnu stání v karuselu chromatografu, ve tmě při laboratorní teplotě, opět analyzováno osm 0,1g vzorků PAL nosiče. Vzorky byly připravovány dle návodu výše a zpracovány vyvinutou rovnicí 3.7. U gramových vzorků bylo ředěno pětkrát acetonitrem a dávkovací objem 5 μ l. U PAL nosiče bylo ředěno pětkrát a desetkrát. Vzorky navážky 0,1 g byly ředěny desetkrát, PAL resin dvacetkrát, a dávkovací objem 10 μ l.

2.6.4 Pozorování rozpadu dimethylformamidu

Roztok 20% piperidinu v dimethylformamidu byl připraven do uzavíratelné skleněné nádoby. Roztok se nechal stát za laboratorní teploty, za přístupu světla po dobu 42 dnů a průběžně, z něj byly odebírány vzorky, kterými byl deprotekován a analyzován polymerní nosič, dle návodu výše. Byl pozorován nárůst nového neznámého píku a jeho hmota byla určena na přístroji UPLS-MS Waters ACQUITY s kvadrupólem Waters Micromass ZQ. Z analýzy PAL nosiče byl určen retenční čas nového píku. Byl sledován nárůst píku v čase, přes poměry ploch píků, vůči piperidin-fluorenylovému aduktu. Byla určena chyba stanovení, pokud se plochy píků obou aduktů sečtou a v rovnici budou vystupovat jako piperidin-fluorenylový adukt. Analyzován byl PAL nosič a to pětkrát, připravenou směsí piperidin:dimethylamin v poměru 15%:5% v dimethylformamidu. Pět analýz bylo také provedeno odstátým deprotekčním činidlem

2.7 Srovnávací metoda

Jako srovnávací metoda byla použita metoda od Eisslera a kol. [28]. Do 10ml odměrné baňky bylo naváženo 10–20 mg analyzovaného nosiče. Baňka byla po rysku doplněna 20% roztokem piperidinu v dimethylformadmidu. Po 30ti minutách byl pipetován 1 ml roztoku do 10ml odměrné baňky a opět doplněn po rysku 20% roztokem piperidinu v dimethylformadmidu. Takto připravený roztok se proměřil na spektrofotometru Hewlett Packard–8453 proti slepému pokusu, kterým byl 20% piperidin v dimethylformadmidu. Odečítala se absorbance v píku při 301 nm. Absorbance a hmotnost analyzovaného polymeru byly dosazeny do následujícího vzorce.

$$\text{loading [mmol} \cdot \text{g}^{-1}] = \frac{10^5 \cdot A_{301}}{8021 \cdot m[\text{mg}]} \quad (2.3)$$

Značka m vyjadřuje hmotnost polymerního nosiče a A_{301} odečtenou absorbanci. Srovnávací metodou byly analyzovány stejné nosiče jako metodou vyvíjenou. Analýzou PAL nosiče bylo vypočítáno *RSD* metody.

2.8 Statistické zpracování naměřených dat

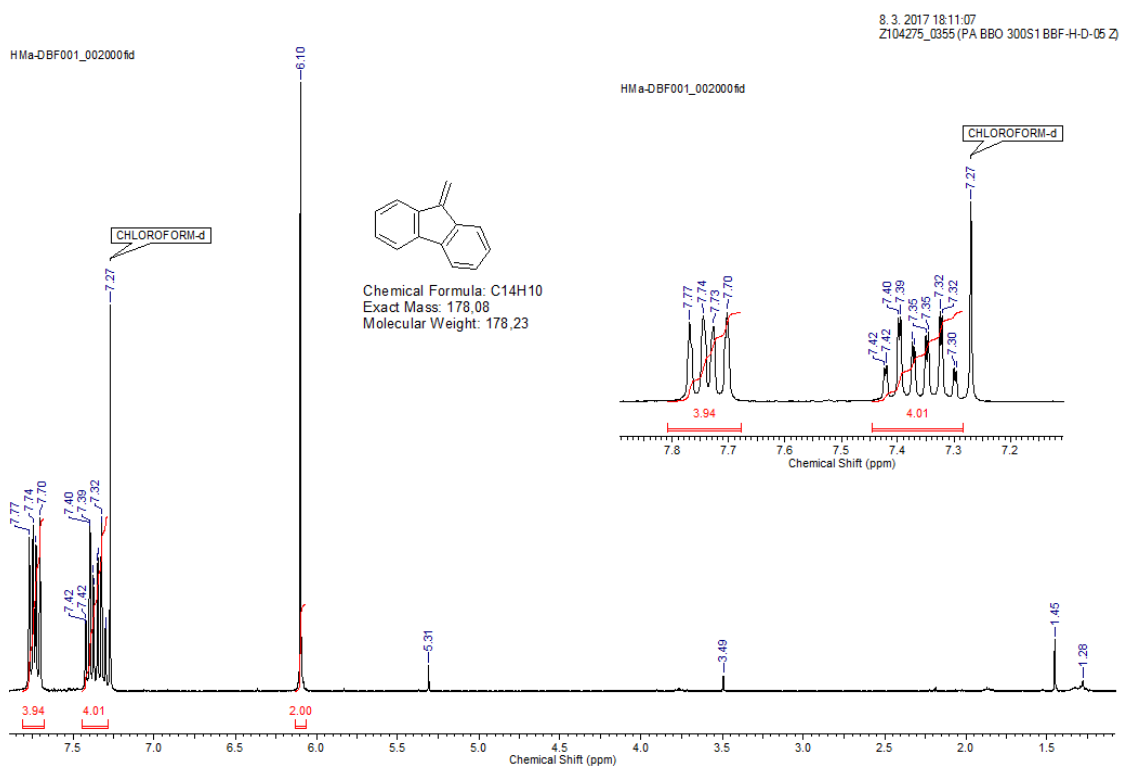
Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy [39]. Výsledná data byla vyjádřena jako průměr s intervalem spolehlivosti a relativní směrodatnou odchylkou.

Tvorba grafů byla prováděna prostřednictvím programu OriginPro 6.0 (Microcal Software, USA). Výpočty byly prováděny v programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

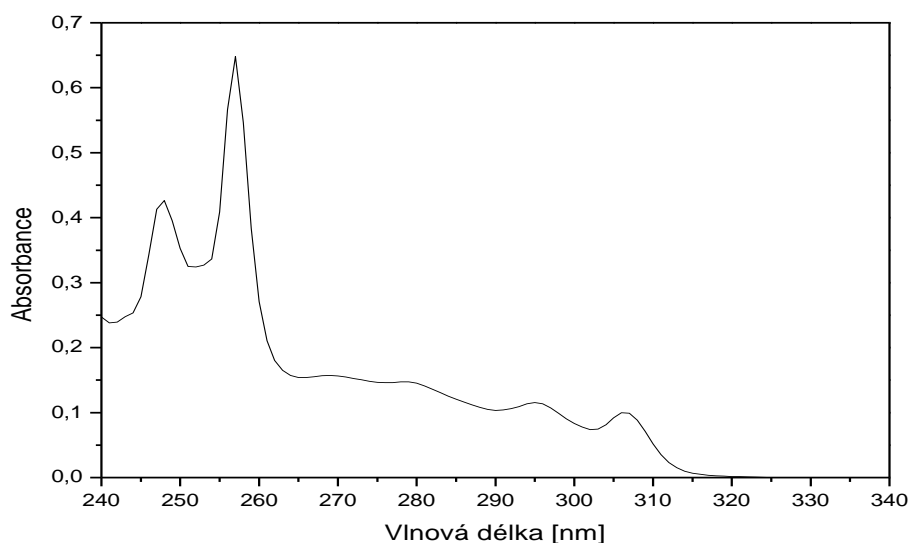
3 Výsledky a diskuse

3.1 Syntéza dibenzofulvenu

Dibenzofulven byl dle literatury úspěšně syntetizován. Bylo naměřeno vodíkové NMR spektrum (obr. 3.1) a UV spektrum v rozsahu 240 až 340 nm (obr. 3.2)



Obr. 3.1 Vodíkové NMR spektrum syntetizovaného dibenzofulvenu v deuterovaném chloroformu

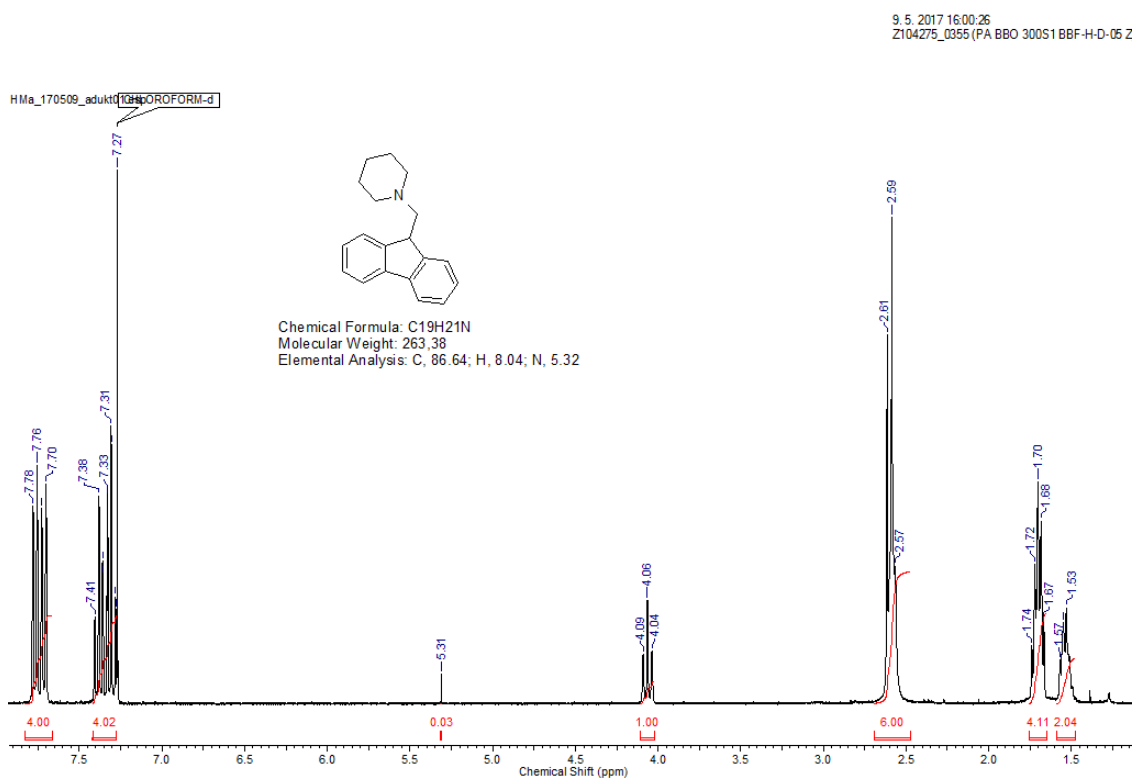


Obr. 3.2 UV spektrum syntetizovaného dibenzofulvenu v intervalu od 240 do 340 nm o koncentraci $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v rozpouštědle tetrahydrofuran, v křemenné kvetě o délce 1 cm.

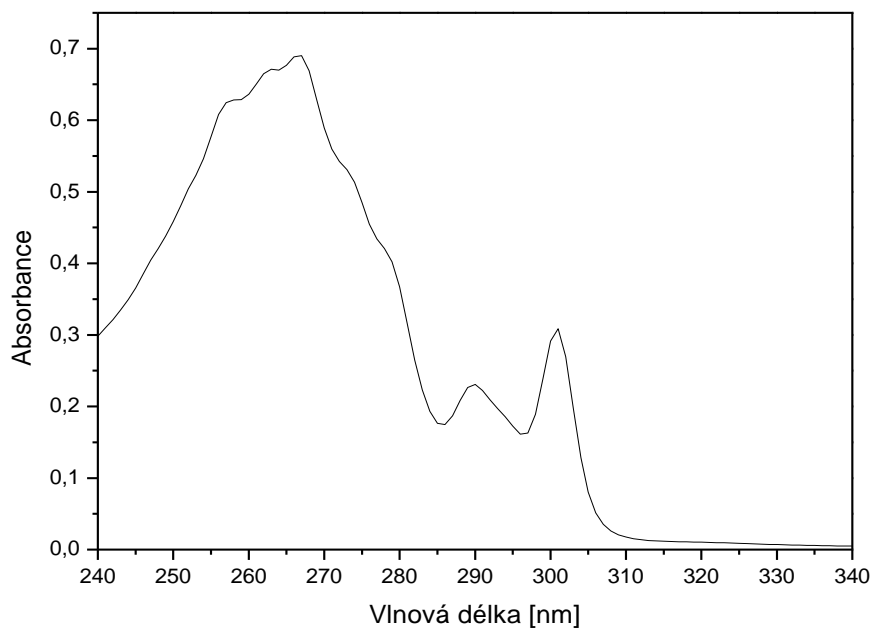
Podle literatury [31] je polymerizace dibenzofulvenu v pevném stavu způsobena přítomným kyslíkem, proto byla testována syntéza dibenzofulvenu v degasovaných rozpouštědlech pod inertní dusíkatou atmosférou. Výsledky však byly řádově horší než standardní syntéza bez použití inertů. Reakční směs se skutečně silně zakalila už po pár dnech vlivem vypadávajícího polymeru a nebylo s ní možné pracovat. Naproti tomu v nedegasovaných rozpouštědlech polymer také lehce vypadával, ale běžnou filtrací bylo možné ho z roztoku oddělit a s roztokem dál pracovat.

3.2 Syntéza piperidin-fluorenylového aduktu

Piperidinfluorenylový adukt byl úspěšně syntetizován a vyčištěn vyvinutou metodou. Bylo naměřeno vodíkové NMR spektrum (3.3) a UV spektrum (3.4) v intervalu od 240 do 340 nm.



Obr. 3.3 Vodíkové NMR spektrum syntetizovaného piperidin-fluorenylového aduktu v deuterovaném chloroformu



Obr. 3.4 UV spektrum syntetizovaného piperidin-fluorenylového aduktu v intervalu od 240 do 340 nm o koncentraci $4,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ v rozpouštědle tetrahydrofuran v křemenné kytvě o délce 1 cm

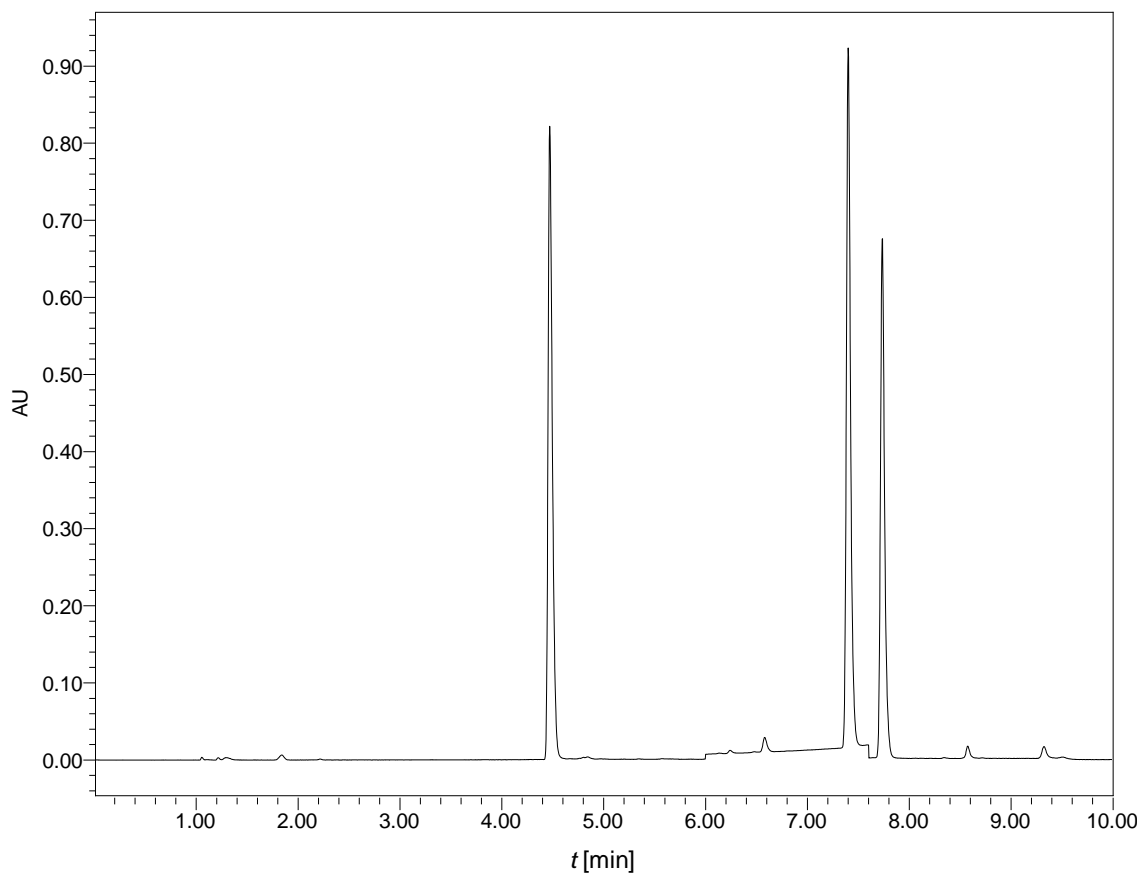
Ostatní pokusy o izolaci čistého aduktu byly neúspěšné. Při dělení na chromatografické koloně kvůli piperidinu. Velký nadbytek piperidinu (bazické prostředí) zřejmě brání separaci, což prokázal i pokus s TLC. Adukt se objevoval společně s dibenzofulvenem v několika frakcích a v podstatě ve stejném množství. Při běžné TLC docházelo k bezproblémové separaci, ale pokud byla TLC deska nasycená paramoniakem, k separaci v podstatě nedošlo.

Postup s isokyanátovým nosičem se také ukázal jako neúčinný, protože by tohoto nosiče bylo potřeba obrovské množství na vyláčení piperidinu, kterého je potřeba velký nadbytek. Nadbytek piperidinu je nutné použít, protože bylo pozorováno, že při použití pouze jednoho molárního ekvivalentu vzniká čistý dibenzofulven.

Stejně neúčinná byla i preparativní TLC, která měla velice malý výtěžek. Při této metodě byl, ale poprvé izolován čistý adukt a odpadly obavy o možné nestabilitě aduktu v roztoku a jeho okamžitým rozpadem na dibenzofulven.

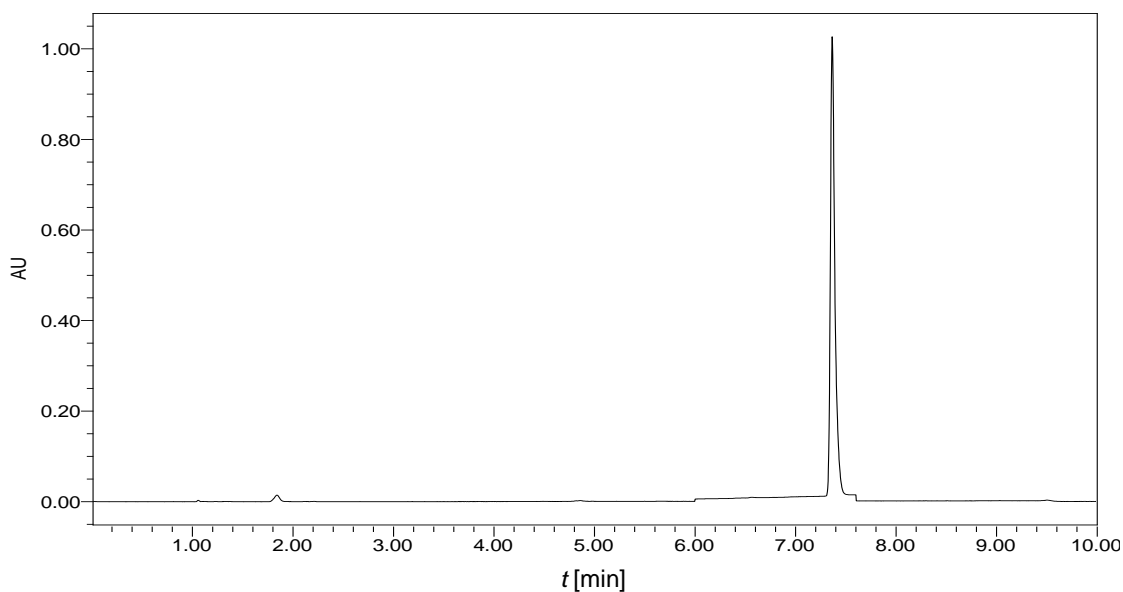
3.3 Vývoj metody pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi

Vyvinutá metoda dobře separovala směsný vzorek standardů o přibližné koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, v rozpouštědle tetrahydrofuran (obr. 3.5).

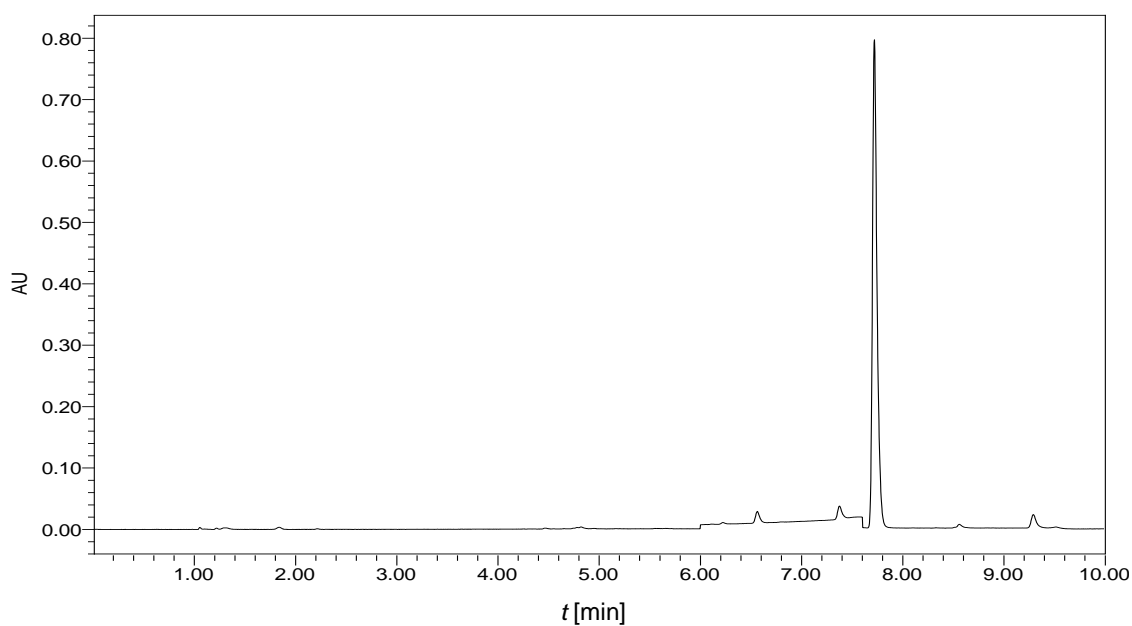


Obr. 3.5 HPLC-UV chromatogram směsného vzorku standardů o přibližné koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na koloně LUNA C18 ($75 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 266 a 248 nm, nástřik vzorku $5 \mu\text{l}$.

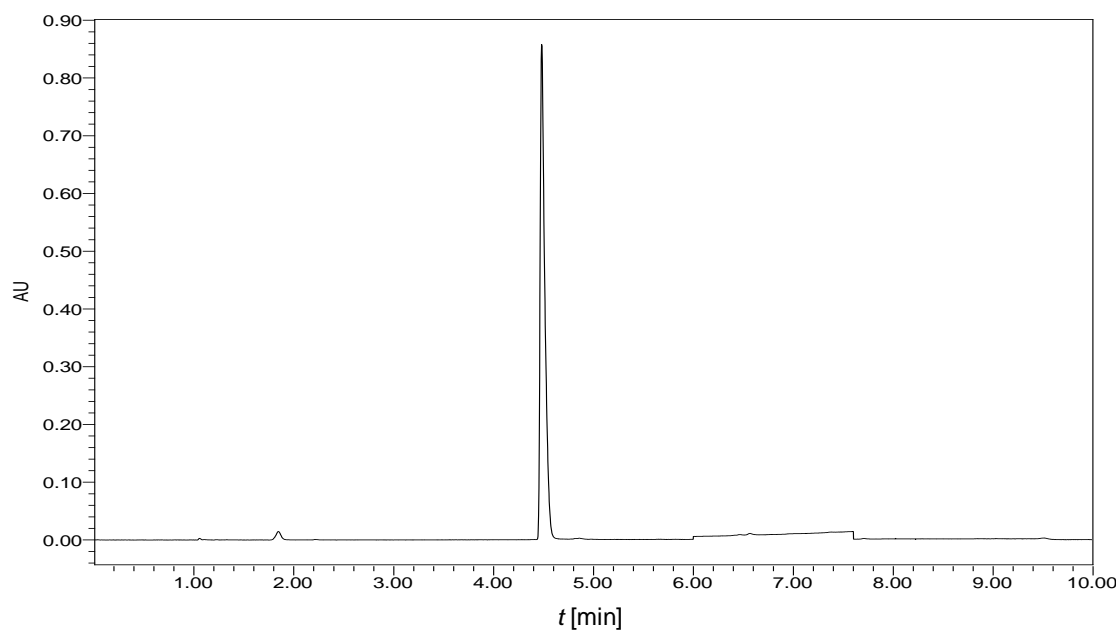
Následně byly proměřeny standardy látek samostatně pro identifikaci a určení retenčních časů. Retenční čas pro bifenyl je 7,3 minuty (obr. 3.6), pro dibenzofulven 7,7 minuty (obr. 3.7) a pro fluorenyl-piperidinový adukt 4,8 minut (obr. 3.8).



Obr. 3.6 HPLC-UV chromatogram standardu bifenylu o přibližné koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na koloně LUNA C18 (75×4,6 mm, 3 μm) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 266 a 248 nm, nástřik vzorku 5 μl .



Obr. 3.7 HPLC-UV chromatogram standardu dibenzofulvenu o přibližné koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na koloně LUNA C18 (75×4,6 mm, 3 μm) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 266 a 248 nm, nástřik vzorku 5 μl .



Obr. 3.8 HPLC-UV chromatogram standardu fluorenyl-piperidinového aduktu o přibližné koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na koloně LUNA C18 (75×4,6 mm, 3 μm) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 266 a 248 nm, nástřik vzorku 5 μl .

U standardních vzorků a u vzorků pro zjištění korekčních faktorů bylo použito rozpouštědlo tetrahydrofuran kvůli mísitelnosti s hexanovým extraktem dibenzofulvenu. Dávkovací objem 5 μl byl použit proto, že při vyšších dávkovacích objemech bylo pozorováno dělení píku aduktu.

U stanovení autentických vzorků pak byl použit acetonitril z ekonomických a ekologických důvodů. Dávkovací objem byl zvednut na 10 μl , v tomto rozpouštědle již nedocházelo k dělení píku aduktu a pro tento HPLC systém je 10 μl vhodnější nástřik jak dokazuje následující tabulka 3.1.

Tab. 3.1 Plochy píku [$\mu\text{V s}$] při opakovaných měřeních standardu bifenyly na koloně LUNA C18 ($75 \times 4,6$ mm, $3 \mu\text{m}$) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, stanovené RSD pro dva různé dávkovací objemy a rozpouštědla.

| měření | dávkovací objem a použité rozpouštědlo | |
|---------|--|--------------------------------|
| | 5 μl , tetrahydrofuran | 10 μl , acetonitril |
| 1 | 4113245 | 4453079 |
| 2 | 4125452 | 4372910 |
| 3 | 3915156 | 4454332 |
| 4 | 3910805 | 4453189 |
| 5 | 4141153 | 4462690 |
| 6 | 4163391 | 4466318 |
| 7 | 4168647 | 4470535 |
| 8 | 4188975 | 4463528 |
| 9 | 4168231 | 4466310 |
| 10 | 4201581 | 4454492 |
| RSD [%] | 2,61 | 0,64 |

3.4 Sestavení rovnice pro stanovení množství deprotektované FMOC skupiny

Rovnice pro stanovení množství deprotektované FMOC skupiny byla sestavena ze dvou sloučených rovnic pro výpočet za použití interního standardu

$$\frac{A_x}{c_x} = F_{st} \cdot \frac{A_{st}}{c_{st}} \quad (3.1)$$

kde A_x plocha píku analyzované látky, c_x je koncentrace analyzované látky, F_{st} je korekční faktor standardu, A_{st} je plocha píku standardu a c_{st} je koncentrace standardu. Po zjednodušení a dosazení pak rovnice vypadá takto.

$$c_{AD/DBF} = \frac{A_{AD/DBF}}{A_{BF}} \cdot \frac{c_{BF}}{F_{AD/DBF}} \quad (3.2)$$

Dolní index AD značí fluorenyl-piperidinový adukt, DBF značí dibenzofulven a BF používaný interní standard bifenylyl. Obě rovnice se vztahují k jednomu internímu standardu, a tak je lze matematicky sloučit a následně zjednodušit.

$$c_{AD} + c_{DBF} = \frac{A_{AD}}{A_{RF}} \cdot \frac{c_{BF}}{F_{AD}} + \frac{A_{DBF}}{A_{RF}} \cdot \frac{c_{BF}}{F_{DRF}} \quad (3.3)$$

$$c_{AD} + c_{DBF} = \frac{c_{BF}}{A_{RF}} \cdot \left(\frac{A_{AD}}{F_{AD}} + \frac{A_{DBF}}{F_{DRF}} \right) \quad (3.4)$$

Pokud pak přidáme bifenylyl přímo do analyzovaného odpadu syntézy, jako první ze všech operací, můžeme rovnici zjednodušit výměnou koncentrací za molární množství.

$$n_{AD} + n_{DBF} = \frac{n_{BF}}{A_{RF}} \cdot \left(\frac{A_{AD}}{F_{AD}} + \frac{A_{DBF}}{F_{DRF}} \right) \quad (3.5)$$

Tato suma molárních množství aduktu a dibenzofulvenu poskytuje údaj o množství deprotektované Fmoc skupiny.

$$n_{FMOC} = \frac{c_{BF}}{A_{RF}} \cdot \left(\frac{A_{AD}}{F_{AD}} + \frac{A_{DBF}}{F_{DRF}} \right) \quad (3.6)$$

Tento výsledek pak může být vztažen na známou výchozí hmotnost polymerního nosiče, z čehož získáme hodnotu loadingu.

3.5 Korekční faktory

Naměřené hodnoty byly zpracovány podle rovnice 2.1 a z průměru byl stanoven korekční faktor. Výsledky analýz pro adukt jsou uvedeny v tabulce 3.2 a pro dibenzofulven v tabulce 3.3.

Tab. 3.2 Výsledky stanovení pro získání korekčního faktoru pro fluorenyl-piperidinový adukt

| Použité zásobní roztoky | Standard | Koncentrace [10 ⁻³ mol dm ⁻³] | Plocha píku [μV s] | Zjištěný faktor | Průměr faktorů |
|-------------------------|----------|--|--------------------|-----------------|----------------|
| První sada | adukt | 0,5020 | 2194844 | 1,08 | 1,07 |
| | bifenyl | 0,5025 | 2027797 | | |
| | adukt | 1,0040 | 4382018 | 1,06 | |
| | bifenyl | 1,0050 | 4194195 | | |
| Druhá sada | adukt | 0,4945 | 2286959 | 1,04 | |
| | bifenyl | 0,5070 | 2247351 | | |
| | adukt | 0,9890 | 4582263 | 1,11 | |
| | bifenyl | 1,0140 | 4235429 | | |

Tab. 3.3 Výsledky stanovení pro získání korekčního faktoru pro dibenzofulven

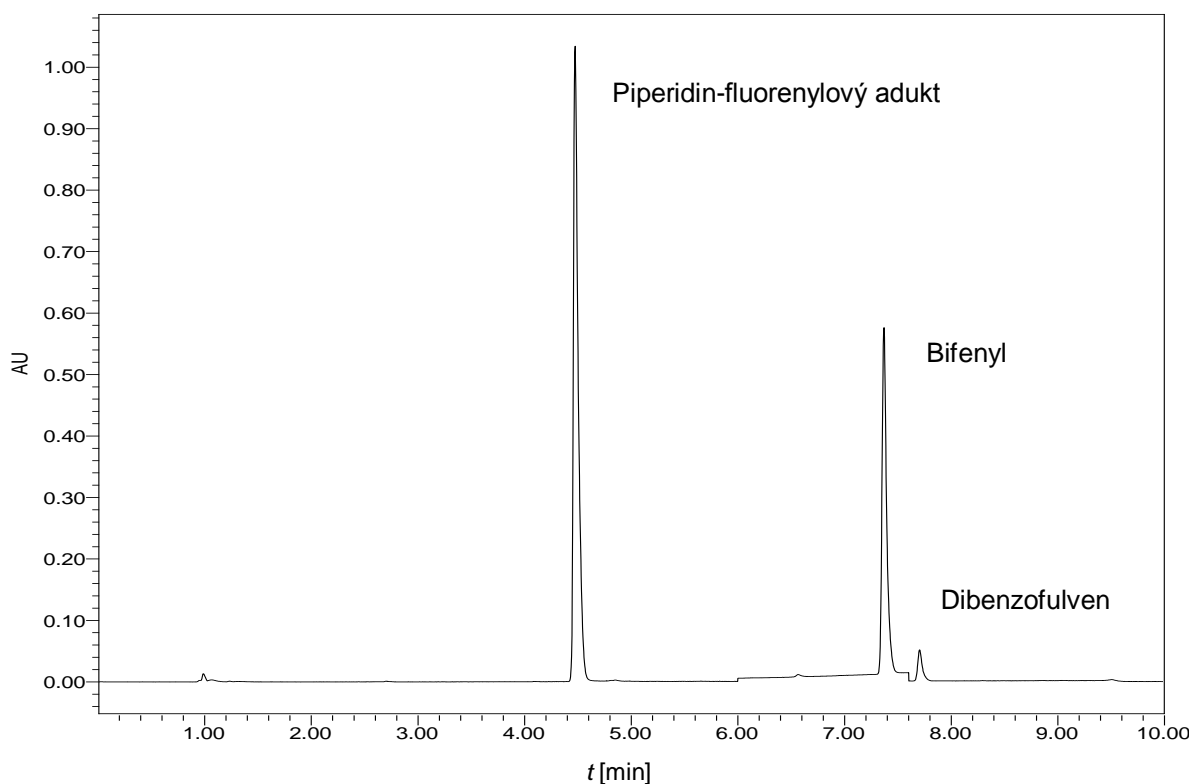
| Použité zásobní roztoky | Standard | Koncentrace [10 ⁻³ mol dm ⁻³] | Plocha píku [μV s] | Zjištěný faktor | Průměr faktorů |
|-------------------------|---------------|--|--------------------|-----------------|----------------|
| První sada | dibenzofulven | 0,5025 | 1257366 | 0,59 | 0,59 |
| | bifenyl | 0,5025 | 2144775 | | |
| | dibenzofulven | 1,0050 | 2393829 | 0,57 | |
| | bifenyl | 1,0050 | 4168660 | | |
| Druhá sada | dibenzofulven | 0,5135 | 1448011 | 0,60 | |
| | bifenyl | 0,5070 | 2383406 | | |
| | dibenzofulven | 1,0270 | 2805752 | 0,61 | |
| | bifenyl | 1,0140 | 4531872 | | |

Výsledná rovnice pro stanovení loadingu aminokyselin při syntéze peptidů na pevné fázi se započtením známých korekčních faktorů tedy vypadá takto.

$$n_{FMOC} = \frac{c_{BF}}{A_{BF}} \cdot \left(\frac{A_{AD}}{1,07} + \frac{A_{DBF}}{0,59} \right) \quad (3.7)$$

3.6 Analýza polymerních nosičů

Analyzovány byly celkem čtyři polymerní nosiče s navázanou FMOC skupinou. Reálný chromatogram deprotektovaného PAL nosiče, ředěného dvacetkrát acetonitrilem s přidavkem interního standardu, můžeme vidět na obr. 3.9. Výsledky pro deset stanovení PAL nosiče jsou uvedeny v tabulce 3.4. Průměrná hodnota loadingu byla stanovena na $0,645 \text{ mmol g}^{-1}$ s intervalem spolehlivosti $\pm 0,008$ a *RSD* 1,52 %.



Obr. 3.9 HPLC-UV chromatogram vzorku PAL resinu o zjištěném loadingu $0,65 \text{ mmol g}^{-1}$ na koloně LUNA C18 ($75 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) v mobilní fázi acetonitril:voda-0,1% trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí, průtok mobilní fáze $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, detekce při 266 a 248 nm, nástřik vzorku $10 \mu\text{l}$.

Tab. 3.4 Výsledky deseti stanovení PAL nosiče, u kterého bylo vypočítáno *RSD* vyvíjené metody.

| Stanovení | Navážka standardu [mg] | Navážka nosiče | Plocha píku [$\mu\text{V s}$] | | | Molární množství FMOC skupiny ve vzorku [mmol] | Loading [mmol g^{-1}] |
|-----------|------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|---------------|--|-------------------------------------|
| | | | standard | adukt | dibenzofulven | | |
| 1 | 64,30 | 0,98111 | 2444677 | 3353344 | 303156 | 0,6222 | 0,634 |
| 2 | 64,30 | 0,98111 | 4848433 | 6584952 | 622951 | 0,6201 | 0,632 |
| 3 | 5,45 | 0,09313 | 1563719 | 2672264 | 143411 | 0,0619 | 0,665 |
| 4 | 5,66 | 0,10858 | 1684652 | 3196197 | 144808 | 0,0704 | 0,649 |
| 5 | 8,03 | 0,11704 | 2553134 | 3699013 | 183259 | 0,0768 | 0,657 |
| 6 | 5,30 | 0,09669 | 1547702 | 2715954 | 165254 | 0,0626 | 0,647 |
| 7 | 6,46 | 0,11249 | 2102132 | 3489335 | 219548 | 0,0724 | 0,644 |
| 8 | 9,84 | 0,09915 | 2887660 | 2752563 | 181017 | 0,0636 | 0,642 |
| 9 | 7,68 | 0,10823 | 2525934 | 3347899 | 237821 | 0,0696 | 0,643 |
| 10 | 7,50 | 0,10470 | 2399286 | 3136090 | 225939 | 0,0672 | 0,642 |

Na vzorcích 3–10 pak byla testována časová stálost porovnáním zjištěného molárního množství FMOC skupiny ve vzorku. Vzorky stály 6 dní v karuselu chromatogramu při laboratorní teplotě, bez přístupu světla. Výsledky se lišily v průměru pouze o 0,28% vzhledem k původním výsledkům. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 3.5.

Tab. 3.5 Výsledky porovnání osmi stabilitních vzorků.

| Stanovení | Molární množství FMOC skupiny ve vzorku ihned po deprotekcí [mmol] | Molární množství FMOC skupiny ve vzorku po 6 dnech [mmol] | Procentuální odchylka obou stanovení [%] |
|-----------|---|--|--|
| 3 | 0,0619 | 0,0619 | -0,03 |
| 4 | 0,0704 | 0,0706 | 0,19 |
| 5 | 0,0768 | 0,0771 | 0,39 |
| 6 | 0,0626 | 0,0628 | 0,32 |
| 7 | 0,0724 | 0,0724 | 0,06 |
| 8 | 0,0636 | 0,0637 | 0,18 |
| 9 | 0,0696 | 0,0700 | 0,59 |
| 10 | 0,0672 | 0,0676 | 0,57 |

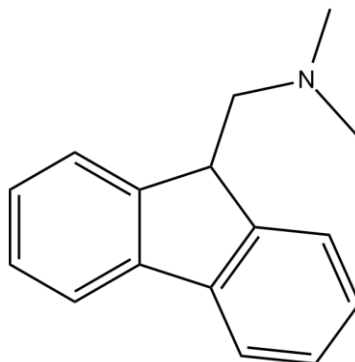
Zbylé tři polymerní nosiče byly analyzovány v tripletech. Hodnoty, které můžeme vidět v tabulce 3.6, se velice dobře shodovaly i v případě různých navážek polymeru.

Tab. 3.6 Výsledky pro zbylé tři nosiče

| Polymerní nosiče | Stanovení | | | Průměr loadingu [mmol g ⁻¹] | Interval spolehlivosti | RSD [%] |
|---------------------|-----------|-------|-------|---|---------------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| RINK amid | 0,341 | 0,341 | 0,347 | 0,343 | 0,008 | 1,03 |
| GLY WANG | 0,321 | 0,319 | 0,323 | 0,321 | 0,005 | 0,60 |
| ILE WANG | 0,310 | 0,308 | 0,310 | 0,309 | 0,003 | 0,39 |

3.6.1 Pozorování rozpadu dimethylformamidu

Domněnka o analogickém vzniku aduktu byla potvrzena přes určení hmoty neznámého píku, která odpovídala dimethylamin-fluorenylovému aduktu (obr. 3.10).



Obr. 3.10. Předpokládaná struktura dimethylamin-fluorenylového aduktu

Nárůst píku dimethylamin aduktu se ukázal jako nijak velký, nicméně byl pozorován. Retenční čas byl stanoven na 4,1 minutu. U připraveného deprotekčního činidla s 5% obsahem dimethylaminu a 15% piperidinu můžeme v tabulce 3.7 pozorovat poměr ploch píků obou aduktů. Tyto plochy jsou k sobě v poměru zhruba 1:7, zatímco aminy jsou v poměru 1:3. To může ukazovat na nižší reaktivitu dimethylaminu, nebo jeho nižší extinkční koeficient při odečítané vlnové délce. U deprotekčního činidla odstátého byla průměrná hodnota loadingu $0,640 \text{ mmol g}^{-1}$ s intervalem spolehlivosti $\pm 0,005$. U připraveného deprotekčního činidla byl loading $0,641 \text{ mmol g}^{-1}$ s intervalem spolehlivosti $\pm 0,015$.

Tab. 3.7 Výsledky pěti stanovení PAL nosiče dvěma různými deprotekcními činidly obsahující dimethylamin.

| Stanovení | Navážka standardu [mg] | Navážka nosiče | Plocha píku [$\mu\text{V s}$] | | | | n FMOC skupiny [mmol] | Loading [mmol g^{-1}] |
|------------|------------------------|----------------|---------------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|
| | | | standard | hlavní adukt | vedlejší adukt | dibenzofulven | | |
| Odstátý | | | | | | | | |
| 1 | 5,44 | 0,1005 | 1852125 | 3303838 | 46924 | 135846 | 0,0640 | 0,637 |
| 2 | 5,77 | 0,1079 | 1791298 | 3216960 | 44323 | 143257 | 0,0687 | 0,637 |
| 3 | 7,14 | 0,1013 | 2433151 | 3320401 | 47556 | 161116 | 0,0651 | 0,643 |
| 4 | 6,55 | 0,1039 | 2207671 | 3365557 | 54062 | 170644 | 0,0671 | 0,645 |
| 5 | 6,10 | 0,0965 | 2206553 | 3287474 | 50338 | 178328 | 0,0613 | 0,636 |
| Připravený | | | | | | | | |
| 1 | 9,69 | 0,0986 | 3151196 | 2684073 | 363398 | 190334 | 0,0632 | 0,641 |
| 2 | 9,51 | 0,0972 | 3247465 | 2778658 | 377414 | 216593 | 0,0630 | 0,648 |
| 3 | 6,15 | 0,1017 | 2384737 | 3152693 | 422909 | 268277 | 0,0635 | 0,624 |
| 4 | 6,52 | 0,0989 | 2237896 | 2836390 | 380984 | 244731 | 0,0646 | 0,654 |
| 5 | 6,29 | 0,1018 | 2259141 | 2974920 | 396601 | 270254 | 0,0652 | 0,640 |

U obou výsledků je vidět velice mírné podhodnocení oproti stanovení PAL nosiče čerstvým deprotekcčním činidlem, které ale může být způsobeno chybou metody. S dimethylamin aduktem se tedy, pro účely stanovené, dá bez problému operovat jako s piperidinovým aduktem

3.7 Srovnávací metoda

Srovnávací metodou byly analyzovány všechny polymerní nosiče. PAL resin byl opět analyzován v deseti vzorcích a bylo u něj zjištěno *RSD*. U ověřovací metody je pozorována výrazně větší relativní směrodatná odchylka než u vyvinuté metody jak můžeme vidět v tabulkách 3.8 a 3.9. Analýza PAL nosiče udala průměrnou hodnotu loadingu na $0,657 \text{ mmol g}^{-1}$ s intervalem spolehlivosti $\pm 0,026$ a *RSD* 5,94 %.

Tab. 3.8 Výsledky stanovení pro PAL resin

| Stanovení | Hmotnost analyzovaného polymeru [mg] | Absorbance při 301 nm | Loading [mmol g ⁻¹] |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1 | 19,82 | 0,97032 | 0,610 |
| 2 | 15,94 | 0,77369 | 0,605 |
| 3 | 12,69 | 0,6431 | 0,632 |
| 4 | 11,16 | 0,58162 | 0,650 |
| 5 | 15,77 | 0,79664 | 0,630 |
| 6 | 12,21 | 0,6503 | 0,664 |
| 7 | 13,54 | 0,72432 | 0,667 |
| 8 | 10,19 | 0,58049 | 0,710 |
| 9 | 11,20 | 0,61431 | 0,684 |
| 10 | 11,80 | 0,6796 | 0,718 |

Tab. 3.9 Výsledky stanovení pro zbylé tři polymerní nosiče

| Polymerní nosiče | Průměr loadingu [mmol g ⁻¹] | Interval spolehlivosti | RSD [%] |
|------------------|---|------------------------|---------|
| RINK amid | 0,353 | 0,018 | 2,13 |
| GLY WANG | 0,308 | 0,050 | 15,50 |
| ILE WANG | 0,312 | 0,057 | 7,50 |

3.8 Přehled výsledků

V přehledné tab. 3.10 jsou výsledné hodnoty uvedeny na dvě platné číslice, protože ani sám výrobce větší přesnost neuvádí. Za zmínku stojí i fakt, že nelze koupit polymerní nosič s garantovaným/certifikovaným loadingem.

Jako velikou výhodou vyvinuté metody vidím to, že jedinou přesně známou hodnotou musí být hmotnost navážky interního standardu bifenyly. Není v ní potřeba přesného ředění, nebo znalosti objemu získaného odpadu.

Tab. 3.10 Přehled výsledků loadingu získaných pomocí vyvinuté metody v porovnání s výsledky metody ověřovací a hodnotou udanou výrobcem

| Polymerní nosič | Loading [mmol g ⁻¹] | | |
|------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|
| | udaný výrobcem | vyvinutá metoda | ověřovací metoda |
| FMOC – PAL resin | 0,64 | 0,65 | 0,66 |
| FMOC – ILE WANG | 0,32 | 0,31 | 0,31 |
| FMOC – GLY WANG | 0,32 | 0,32 | 0,31 |
| FMOC RING AMID | 0,36 | 0,34 | 0,35 |

4 Závěr

Byla vyvinuta metoda, která poskytuje pravdivé hodnoty, které byly ověřeny nezávislou metodou. Metoda udává výsledky se směrodatnou odchylkou 1,52 %. Metoda je tak výrazně přesnější oproti metodě ověřovací, nebo metodám publikovaným. Vzorky pro stanovení touto metodou jsou stále s časem. Po 6 dnech stání za laboratorní teploty ve tmě je odchylka dvou po sobě jdoucích stanovení v průměru +0,28%. Metoda je jednoduchá a použitelná v poloprovozním měřítku, jedinou hodnotou, kterou je zde potřeba znát je hmotnost přídatku interního standardu a je tak vhodná i pro analyticky nezkušeného pracovníka. Umožňuje stanovit loading pouze z odpadu couplingové syntézy bez jakéhokoli zásahu do procesu. Zároveň neklade nárok na změnu standardně používané chránicí skupiny a deprotekčního činidla. Výjimečná je svým stanovením obou produktů deprotekce.

Literatura

1. Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemistry*. 4th ed. Kendallville, Wiley 2011
2. Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C. W.: *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 4th ed. Kendallville, Wiley 2015
3. Fridkin, M.; Patchornik, A.: Peptide synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **43**, 419–443 (1974)
4. Geckeler, K.E.: Soluble polymer supports for liquid-phase synthesis. In: *Advances in Polymer Science. Vol. 121*. Abe, A. et al. (Ed.). Berlin, Springer 1995, p. 31–79
5. Merrifield, R. B.: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149–2154 (1963)
6. Takahashi, D.; Yano, T.; Fukui, T.: Novel diphenylmethyl-derived amide protecting group for efficient liquid-phase peptide synthesis. *Organic Letters* **14**, 4514–4517 (2012)
7. Chen, WY.; Foutch, G.: The role of polymer support crosslinking on reaction rates for solid-phase peptide synthesis. *Chemical Engineering Science* **44**, 2760–2762 (1989)
8. Merrifield, R. B.: The role of the support in solid phase peptide synthesis. *British Polymer Journal* **16**, 173–178 (1984)
9. Stahl, G.L.; Smith, C. W.; Walter, R.: Superior swelling properties of resins of poly-*N*-acrylyldalkylamines over polystyrene in solvents for peptides-synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **15**, 331–334 (1980)
10. Fields, C.G.; Fields, G. B.: Solvents for solid-phase peptide synthesis. In: *Methods in Molecular Biology, Vol 35. Peptide Synthesis Protocol*. Pennington, M. W.; Dunn, B. M. (Ed.). Humana Press, Totowa 1994, p. 29–40
11. Westall, F. C.; Robinson, B. A.: Solvent modification in Merrifield solid-phase peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **35**, 2842–2844 (1970)

12. Ganesan, A.: Wang Resin. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (2003). doi:10.1002/047084289X.rn00168
13. Harris, P. W. R.; Yang, S. H.; Brimble, M. A.: An improved procedure for the preparation of aminomethyl polystyrene resin and its use in solid phase (peptide) synthesis. *Tetrahedron Letters* **52**, 6024–6026 (2011)
14. Yraola, F.; Ventura, R.; Vendrell, M.; Colombo, A.; Fernández, J.C.; de la Figuera, N.; Fernández-Forner, D.; Royo, M.; Forns, P.; Albericio, F.: A re-evaluation of the use of Rink, BAL, and PAL resins and linkers. *QSAR Combinatorial Science* **23**, 145–152 (2004)
15. Harre, M.; Nickisch, K.; Tilstam, U.: An efficient method for activation and recycling of trityl resins. *Reactice and Functional Polymer* **41**, 111–114 (1999)
16. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G.: Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology* **33**, 239–254 (2006)
17. Isidro-Llobet, A.; Álvaret, M.; Albericio, F.: Amino acid-protecting groups. *Chemical Reviews* **109**, 2455–2504 (2009)
18. Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.: A comparison of BOC and Fmoc SPPS strategies for the preparation of C-terminal peptide α -thioesters: NY-ESO-1 ^{36}Cys - ^{64}Ala -COSR. *Biopolymers* **100**, 356–365 (2013)
19. Valeur, E.; Bradley, M.: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **38**, 606–631 (2009)
20. Jad, Y. E.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F.: Oxyma-T, expanding the arsenal of coupling reagents. *Tetrahedron Letters* **57**, 3523–3525 (2016)
21. Klausner, Y.S.; Bodnasky, M.: Coupling reagents in peptides synthesis. *Synthesis – Journal of Methods in Synthetic Organic Chemistry*, 453–463 (1972)
22. Verma, A.: Diisopropylcarbodiimide. *Synlett* **23**, 1099–1100 (2012)
23. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossiger, C. D.; Cook, P. I.: Color tests for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **34**, 595–598 (1970)

-
24. Carpino, L. A.; Han, G. Y.: The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society* **92**, 5748–5749 (1970)
 25. Penke, B.; Rivier, J.: Solid-phase synthesis of peptide amides on a polystyrene support using fluorenylmethoxycarbonyl protecting groups. *The Journal of Organic Chemistry* **52**, 1197–1200 (1987)
 26. Carpino, L. A.; Han, G. Y.: The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry* **37**, 3404–3409 (1972)
 27. Fields, G. B.; Noble, R. L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **35**, 161–214 (1990)
 28. Eissler, S.; Kley, M.; Bachle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D.: Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths. *Journal of Peptide Science* **23**, 757–762 (2017)
 29. Comins, D. L.; Joseph, S. P.: *N,N*-Dimethylformamide. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (2001) doi: 10.1002/047084289X.rd335
 30. Nakano, T.; Takewaki, K.; Yade, T.; Okamoto, Y.: Dibenzofulvene, a 1,1-diphenylethylene analogue, gives a π -stacked polymer by anionic, free-radical, and cationic catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 9182–9183 (2001)
 31. Nakano, T.; Nakagawa, O.; Yade, T.; Okamoto, Y.: Solid-state polymerization of dibenzofulvene leading to a copolymer with oxygen. *Macromolecules* **36**, 1433–1435 (2003)
 32. Sewald, N.; Jakubke, H.: *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim, Wiley 2009
 33. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E.P.; Lambros, T.J.; Makofske, R.C.; Chang, C.D.: Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **13**, 35–42 (1979)
 34. Gude, M.; Ryf, J.; White, P. D.: An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Letters in Peptide Science* **9**, 203–206 (2002)

-
35. Freeman, C. E.; Howard, A. G.: Measurement of the Fmoc loading of protected amine-functionalised polymer beads. *Talanta* **65**, 574–577 (2005)
 36. Várady, L.; Rajur, S. B.; Nicewonger, R. B.; Guo, M.; Ditto, L.: Fast and quantitative high-performance liquid chromatography method for the determination of 9-fluorenylmethoxycarbonyl release from solid-phase synthesis resins. *Journal of Chromatography A* **869**, 171–179 (2000)
 37. Newcomb, W. S.; Deegan, T. L.; Miller, W.; Porco, J. A.: Analysis of 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) loading of solid-phase synthesis resins by gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **61**, 55–60 (1998)
 38. Rahali, H.; Ghanem, N.; Griffe, L.; Rahali, R.; Stien, D.: A general approach to the quantification of resin-bound functional groups by NMR. *New Journal of Chemistry* **28**, 1344–1346 (2004)
 39. Miller, J.N.; Miller, J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th Ed. Harlow, Pearson Education 2005.