

APLICACIÓ DE LA RMN DE ^{13}C A L'ESTUDI DE SUPPORTS POLIMÈRICS EMPRATS EN SÍNTESE DE PÈPTIDS

per

JOSEP RIZO I REY

Departament de Química Orgànica. Facultat de Química
Universitat de Barcelona

1. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS

En la metodologia de la síntesi de pèptids en fase sòlida introduïda per R. B. Merrifield el 1963, un dels problemes més importants és la manca d'un mètode ràpid i fiable de caracterització dels productes intermedis que es formen en anar creixent la cadena peptídica. En el treball rutinari hom empra diversos assaigs analítics per a detectar amines primàries (ninhidrina, fluorescamina) o secundàries (cloranil) per a assegurar que les etapes d'acoblament són quantitatives; en canvi, hom no acostuma a comprovar l'eliminació dels grups protectors N-terminals. Freqüentment, les reaccions secundàries no són detectades fins a la caracterització final del pèptid, un cop separat de la resina que ha estat emprada com a suport. Manca, en definitiva, una eina d'anàlisi rutinària tan útil com és la ressonància magnètica nuclear (RMN), entre altres mètodes espectroscòpics, en la síntesi orgànica en solució.

La possibilitat d'aplicar la ressonància magnètica nuclear de carboni-13 amb transformada de Fourier (RMN de ^{13}C amb TF) a tota aquesta problemàtica, és atractiva per diverses raons:

- és un mètode no destructiu,
- dóna molta informació (en general, poden ésser assignats inequívocament la major part dels senyals dels espectres de RMN de ^{13}C de pèptids bastant complexos),
- l'amplada de la zona de ressonància dels nuclis de carboni-13, unes cinc vegades més gran que la dels nuclis de ^1H , és adequada per a caracteritzar molècules que poden donar un nombre elevat de senyals (que, a més, poden ésser bastant amples).

El fet de treballar amb mostres sòlides insolubles faria que, en un principi, se'ns planteessin tots els problemes propis de la RMN de sòlids,¹ es a dir: amplades de banda excessives degudes a les interaccions dipol-dipol ^1H - ^{13}C , anisotropia de desplaçaments químics a causa de les moltes orientacions que les molècules en estat amorf prenen en estar sotmeses a un camp magnètic i temps de relaxació longitudinal molt llargs que obliguen a augmentar considerablement la durada dels temps de repetició de pulsació amb la conseqüent pèrdua de sensibilitat. No obstant això, les matrius polimèriques que hom empra en síntesi de pèptids en fase sòlida s'inflen en determinats dissolvents formant gels. La formació d'aquests gels implica una interacció important entre les molècules de dissolvent i la resina; aquesta interacció ens pot aproximar a la situació d'una solució, on el moviment normal de les molècules amitjana les interaccions dipolars a zero, redueix l'anisotropia de desplaçaments químics al seu valor isotròpic i proporciona un mecanisme de relaxació que disminueix considerablement el temps de relaxació longitudinal. Sembla lògic, doncs, de considerar la possibilitat d'aplicar la metodologia corrent de la RMN de ^{13}C en líquids a l'estudi de polímers reticulats en fase gel.

Tot i que al 1971 Sternlicht *et al.*² demostraren que les tècniques convencionals de RMN de ^{13}C podien ésser aplicades a l'estudi de polímers reticulats inflats per dissolvents, tan sols hi ha posteriorment alguns articles aïllats en els quals hom utilitza la "RMN de ^{13}C en fase gel".³⁻⁸ Hi ha alguns treballs recents on hom estudia per RMN de ^{13}C reaccions que tenen lloc sobre polímers.^{9,10} En relació amb la síntesi de pèptids en fase sòlida, W. T. Ford determina l'origen de poliestirè clorometilat per RMN de ^{13}C .¹¹ S. L. Manatt utilitza la tècnica per a determinar el grau de funcionalització en aquest tipus de polímers;¹² tanmateix, aplica la RMN de ^{19}F al seguiment de síntesis de pèptids en fase sòlida pel mètode de Merrifield, utilitzant grups protectors fluorats.¹³ Finalment, R. Epton *et al.* segueixen per RMN de ^{13}C la síntesi d'un pentapèptid sobre una matriu de poli (acriloïl-morfolina) fenòlica O-acetilada.¹⁴ Segons els autors, la utilització d'aquesta matriu és avantatjosa perquè s'infla en dissolvents polars (bons dissolvents per als pèptids), tant des del punt de vista de la síntesi com de la RMN.

Tot i que l'anàlisi bibliogràfica realitzada evidencia que diferents autors s'han interessat per les propietats magnètiques de suports polimèrics en fase gel, la RMN resta molt lluny d'ésser una eina de treball habitual als laboratoris de síntesi de pèptids. D'una banda, els dos únics grups que s'han interessat per l'aspecte de la síntesi de pèptids en fase sòlida,^{13,14} fan servir tècniques de síntesi poc convencionals que resulten avantatjoses per al seu estudi per RMN (resines de poli (acriloil-

morfolina) fenòlica O-acetilada o grups protectors fluorats). D'altra banda, no hi ha un estudi sistemàtic d'optimització de les condicions de registre dels espectres per a reduir tant com sigui possible el temps d'acumulació (R. Epton *et al.*¹⁴ hi empren entre 6 i 30 hores).

El nostre objectiu fonamental és d'estudiar les possibilitats d'aplicar la RMN de ^{13}C al seguiment de síntesis de pèptids en fase sòlida segons el mètode de Merrifield, sobre resines derivades del copoli (estirè-1%-divinilbenzè), les més emprades en aquest tipus de síntesis. L'estudi és dividit en tres parts:

1. Estudi de l'espectre de RMN de ^{13}C del copoli (estirè-1%-divinilbenzè) en diferents tipus de condicions per tal d'optimitzar la tècnica.
2. Anàlisi de diferents resines derivades de la primera per a veure la utilitat de la RMN de ^{13}C en llur caracterització.
3. Síntesi del tripèptid Asn-(N-Me)Ala-Thr seguida per RMN de ^{13}C .

Fora d'aquesta línia fonamental, han estat fets alguns estudis puntuals, directament relacionats amb la RMN i amb la seva aplicació a l'anàlisi de polímers, que són inclosos en el context general.

2. ESTUDI DE L'ESPECTRE DE RMN DE ^{13}C DEL COPOLI (ESTIRÈ-1%-DIVINILBENZÈ)^a

En la síntesi de pèptids en fase sòlida segons el mètode de Merrifield hom treballa, generalment, amb un suport polimèric derivat del copoli (estirè-1%-divinilbenzè) (abreujat, Pst.). En general, hom funcionalitza l'anell aromàtic i els aminoàcids són ancorats covalentment al polímer mitjançant aquesta funció. El grau de funcionalització f varia segons l'estratègia que cal seguir; acostuma a haver-hi entre un 3% i un 25% dels anells funcionalitzats. Es clar, doncs, que en un espectre de RMN de ^{13}C d'un d'aquests suports polimèrics, els senyals propis del poliestirè han d'ésser dels més importants. Ens ha semblat important, per aquesta raó, de començar estudiant l'espectre de RMN de ^{13}C del Pst. amb el propòsit de conèixer-lo perfectament, veure les condicions òptimes per a treure'n informació i familiaritzar-nos amb la tècnica. A més a més, ens han interessat alguns aspectes teòrics de la RMN amb TF que cal considerar inevitablement en intentar optimitzar la seva aplicació a l'anàlisi de polímers en fase gel, car són sistemes diferents dels normalment estudiats per RMN.

^a En tots els casos, si no ho indiquem especialment, emprem desacoblament total dels nuclis de H. Per a simplificar, posem RMN de ^{13}C en lloc de RMN de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$.

2.1. Espectre i assignacions. Optimització

Per a obtenir un espectre de RMN de ^{13}C del Pst. cal formar un gel amb un dissolvent apolar i aconseguir la màxima homogeneïtat per tal d'evitar problemes d'anisotropia de desplaçaments químics. Així, l'espectre obtingut equilibrant el sistema sòlid-líquid per agitació mecànica i ultrasònica, seguida d'una estona de repòs (una mitja hora) (fig. 1), millora considerablement, quant a sensibilitat i resolució. En la figura 1 hom pot observar que els senyals de l'espectre són amples; a la zona aromàtica hi ha "cues" considerables degudes a l'esmentada anisotropia de desplaçaments químics. No obstant això, l'espectre és més semblant als típics de RMN d'alta resolució en líquids que als espectres de bandes amples propis de sòlids. L'amplada de banda observada ens indica que el temps de relaxació transversal és petit i que, per tant, estem en un sistema de mobilitat una mica restringida.

A partir d'aquí, altres autors^{2, 5, 6, 7, 8} treuen més informació sobre la dinàmica i característiques estructurals del polímer gelificat; dedueixen, així, models més o menys aproximats sobre la distribució de les cadenes "lliures" i la reticulació en la matriu polimèrica. Com ja ha estat dit, el

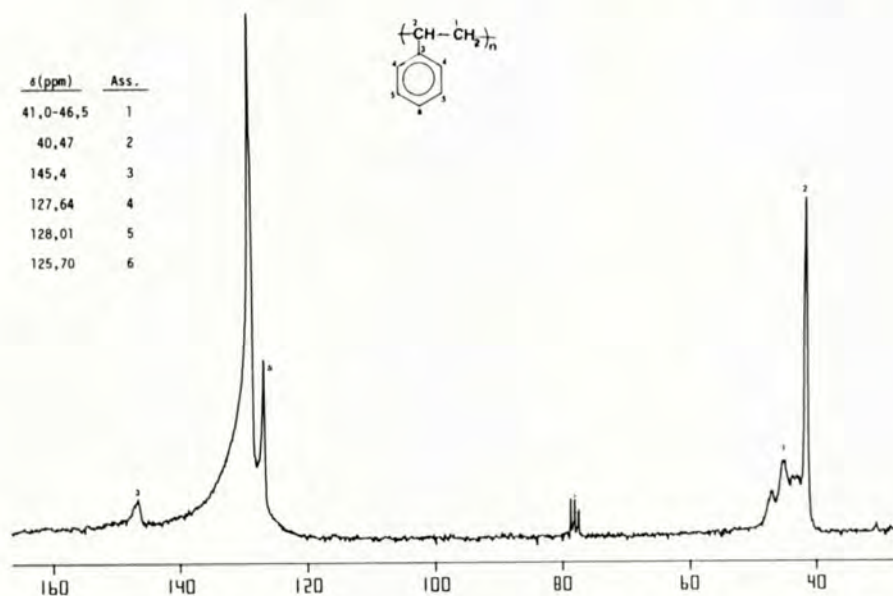


Fig. 1. Espectre de RMN de ^{13}C del copoli (estirè-1%-divinilbenzè) en CDCl_3 . AT = 0,7 s; PW = 12,0 μs ; NT = 10.000; LB = 0.796.

nostre interès se centra més sobre l'assignació de l'espectre i la seva optimització, quant a sensibilitat i resolució. Val a dir, tan mateix, que el tipus de consideracions anteriors ens pot ésser útil; de fet, una de les raons que ens fa pensar en la possibilitat d'obtenir espectres satisfactoris d'intermedis de síntesi de pèptids en fase sòlida, és l'augment de mobilitat esperat per a la cadena peptídica en creixement, a mesura que s'allunya de la matriu polimèrica ("efecte flagell"); aleshores, ha d'augmentar el temps de relaxació transversal i els senyals corresponents han d'ésser més estrets facilitant la seva resolució i assignació.

L'assignació de l'espectre de RMN de ^{13}C del Pst. en CDCl_3 (fig. 1) és basada en els espectres prèviament descrits (15-18, entre altres, per al polímer lineal; 5, 8, 12, per al polímer amb diferents graus de reticulació). Els senyals més afectats per la tacticitat són els del carboni aromàtic-ipso (^{13}C -3) i, especialment, els del metilè de la cadena polimèrica (^{13}C -1) que presenta absorció entre 41,0 i 46,5 ppm segons l'estereoquímica relativa dels anells més propers.^a

Han estat fets quatre espectres en diferents condicions d'adquisició (taula I) a tall de prova, per veure quines permeten d'obtenir la millor sensibilitat. Les relacions senyal/soroll (S:N) obtingudes demostren que no hi ha problemes de saturació en baixar el temps d'adquisició, tot i que treballem amb una pulsació de quasi 90° . L'increment de relació S:N en reduir l'AT indica que la part final del FID (*Free Induction Decay*, Senyal de Precessió Lliure) és pràcticament soroll de fons. El senyal que queda afectat en treballar amb temps d'adquisició més baixos (0,35 s) és el del ^{13}C -3, com hom podia esperar pel fet d'ésser quaternari. Aquestes consideracions poden ésser racionalitzades teòricament sabent els temps de relaxació longitudinal dels nuclis a observar. No obstant això,

TAULA I

Condicions d'adquisició de quatre espectres de RMN de ^{13}C del Pst. per a optimitzar la sensibilitat i relacions S: N obtingudes pels ^{13}C -2 i 3. Relació d'entre la del primer i la del segon

Espectre	AT (s)	PW (μs)	NT	S: N ^{13}C -2	S: N ^{13}C -3	d
A	1,454	6,0	10.000	19,3	5,0	3,9
B	1,454	12,0	10.000	32,9	5,9	5,6
C	0,700	12,0	10.000	52,5	6,9	7,6
D	0,350	12,0	10.000	60,0	5,7	10,6

^a Els senyals del ^{13}C -3 estan estudiats en termes de pèntades i els del ^{13}C -1 en termes d'hèxades i tètades per a un poliestirè radicalari lineal.¹⁵

ja veiem que hom pot obtenir espectres satisfactoris en un temps prou curt si no hi ha un interès especial a observar els carbonis quaternaris.

Per tal d'augmentar la informació que podem obtenir d'un espectre, hom pot manipular matemàticament el FID abans de fer la transformació de Fourier (L-3, L-4).

El senyal de precessió lliure (FID) que hom obté per a un nucli que té una freqüència de ressonància de $\nu_a + \nu_0$ (ν_0 freqüència d'observació) i temps de relaxació transversal T_2 ($\approx T_2^*$ per aquest tipus de substàncies), és una funció del temps de la forma:

$$f(t) = A e^{-t/T_2} e^{i2\pi\nu_a t}$$

La transformació de Fourier ens dóna una funció de la freqüència (espectre) de forma lorentziana:

$$F(\nu) = A \frac{T_2 - i2\pi(\nu - \nu_a) T_2^2}{1 + (2\pi(\nu - \nu_a) T_2)^2}$$

Allò que veiem normalment representat és la part real d'ambdues funcions (fig. 2 a) i b)). L'amplada de banda a l'alçada de la meitat del senyal en l'espectre és donada per $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2$. Es evident, doncs, que multiplicant el FID per una funció $M(t) = \exp(t/B)$ l'amplada del senyal a l'espectre variarà en un valor de $-1/\pi B$. Cal veure ara com apliquem aquestes idees a un espectre de diferents senyals, que no és sinó la suma de diverses funcions $F(\nu)$ que són transformades de Fourier de diverses funcions $f(t)$ (la linealitat de la TF permet, a més, conservar la intensitat relativa de cada funció $f(t)$).

Emprant valors de B negatius, el que fem és multiplicar el FID per una exponencial decreixent de manera que augmenta l'amplitud de la zona inicial del FID (que ens dóna la intensitat del senyal a l'espectre), respecte a la zona final; aquesta darrera zona contribueix a la resolució de senyals amb poca diferència de freqüència de ressonància i conté, comparativament, més soroll de fons (fig. 2 c). Hom aconsegueix, així, una millora de la relació senyal/soroll en contraposició a una pèrdua de resolució. El millorament de sensibilitat és determinat pel paràmetre $SE (= -B)$ que implica un augment en l'amplada de banda de LB Hz. ($LB = 1/\pi SE$).

Utilitzant valors de B positius, l'efecte és invers i guanyem resolució a càrrec de la sensibilitat (fig. 2 d). El paràmetre característic és $RE (= B)$. En el cas $RE = T_2$, obtindríem un senyal simple (d'amplada 0, com la funció δ de Dirac; valors de RE menors que T_2 fan divergir la transformació de Fourier). Hi ha problemes quan hom empra valors de RE

pròxims a T_2 (que permeten d'obtenir molt bona resolució) perquè, per a valors de t prou grans, el soroll de fons té una intensitat molt més gran que li correspon a $f(t)$; així, en multiplicar el FID per l'exponencial creixent, la funció resultant divergeix (fig. 2 e); aleshores, els senyals en l'espectre es perden sota el soroll de fons. Hi ha també el problema (general en la RMN amb TF però més accentuat aquí) que la funció $f(t)$ "s'escapça" bruscament a $t = AT$ i això produeix uns lòbuls en la

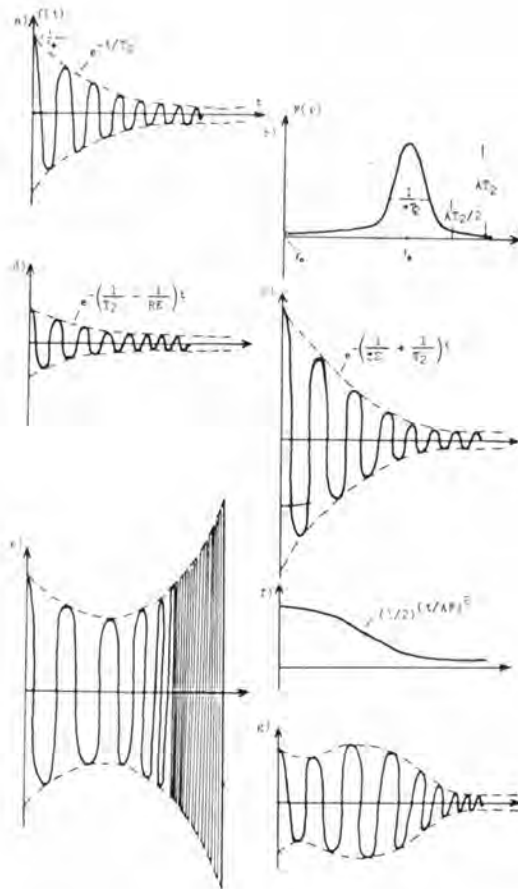


Fig. 2. Formes i transformacions del FID. a) FID per a un nucli que ressona a $\nu_a + \nu_0$ i té un temps de relaxació T_2 . b) Espectre resultant de la transformació de Fourier del FID. c) Millorament de sensibilitat. d) Millorament de resolució teòric. e) Millorament de resolució real. f) Funció d'apodització. g) Millorament de resolució amb apodització.

línia de base de l'espectre que augmenten com més brusc és el truncament. Per tal d'evitar aquest problema i la divergència esmentada, multipliquem per una funció d'apodització (gaussiana) $G(t) = \exp[-0,693(t/AF)^2]$. Aquesta funció val 1 per a $t = 0$ i 0,5 per a $t = AF$; després tendeix ràpidament a zero (fig. 2 f). Això permet "d'aprofitar", en part, la informació que obtenim amb l'exponencial creixent ($\exp(t/RE)$) fins aproximadament $t = AF$, eliminant la divergència i l'escapçament final del FID (fig. 2 g). La forma del senyal queda una mica afectada (la TF d'una gaussiana és una gaussiana), però no la informació que en traiem.

Una manera alternativa de guanyar resolució és multiplicant el FID per una funció de diferència de convolució $C(t) = (1 - \text{CCD} \exp(-t/CD))$. CCD pren valors entre 0 i 1, essent CD positiu. Hom resta al FID una part proporcional d'ell mateix (donada pel coeficient de diferència de convolució, CCD) multiplicada per una exponencial decreixent (CD fa les funcions de SE). En definitiva, restem al FID més contribució de la zona inicial que de la final, la qual cosa respon a la "filosofia" de l'augment de resolució. Cal afegir que les funcions de millora de resolució ens permeten de diferenciar senyals corresponents a nuclis amb diferent T_2 , car en incrementar la "severitat" de la millora de resolució ha de disminuir la intensitat relativa dels senyals més amples.

Per a millorar la sensibilitat a l'espectre de RMN de ^{13}C del Pst., han estat utilitzats valors de LB de 0 fins a 4 a l'espectre A (taula I), passant d'una relació S:N 19,3 a un valor de 77,5 (pel senyal del ^{13}C -2). Hom comprova que, essencialment, la pèrdua de resolució no és significativa donada l'amplada del senyal quan $LB = 0$ (~ 27 Hz.). En la figura 3 (a i b) hom pot veure l'efecte d'emprar $LB = 4$ en la zona alifàtica. La utilització de valors de $LB = 4$ o més grans ens pot ésser molt útil per a detectar o confirmar senyals que es confonguin amb el soroll.

El fet de poder millorar la resolució té interès per a poder distingir senyals que puguin estar encavalcats. A l'espectre del Pst. no estan resolts els senyals corresponents als ^{13}C -4 i 5, però és evident una espalla a la zona de camps alts del senyal conjunt. Hom ha intentat de resoldre els dos possibles senyals optimitzant els paràmetres RE i AF, CD i CCD. Han estat emprats valors de RE entre 0,01 i 3, combinats amb valors de AF entre 0,03 i 0,5 a l'espectre D (taula I); l'òptim s'obté per a $RE = 0,015$ $AF = 0,05$ (fig. 3 c i d). Per diferència de convolució hom ha treballat amb valors de CCD des de 0,7 fins a 0,999 i de CD desde 0,01 fins a 0,3. També han estat combinats alguns valors de AF. L'òptim ha estat trobat per a $CD = 0,03$ $CCD = 0,9$ (fig. 3 e). Hom resol perfectament el senyal inicial en dos senyals amb 19 Hz (0,04 ppm) de diferència. La resolució dels senyals sense manipular el FID ja és observada a l'espectre del Pst. en CDCl_3 a 75 MHz.⁸ Atenent els desplaçaments químics observats per diversos alquilbenzens i per

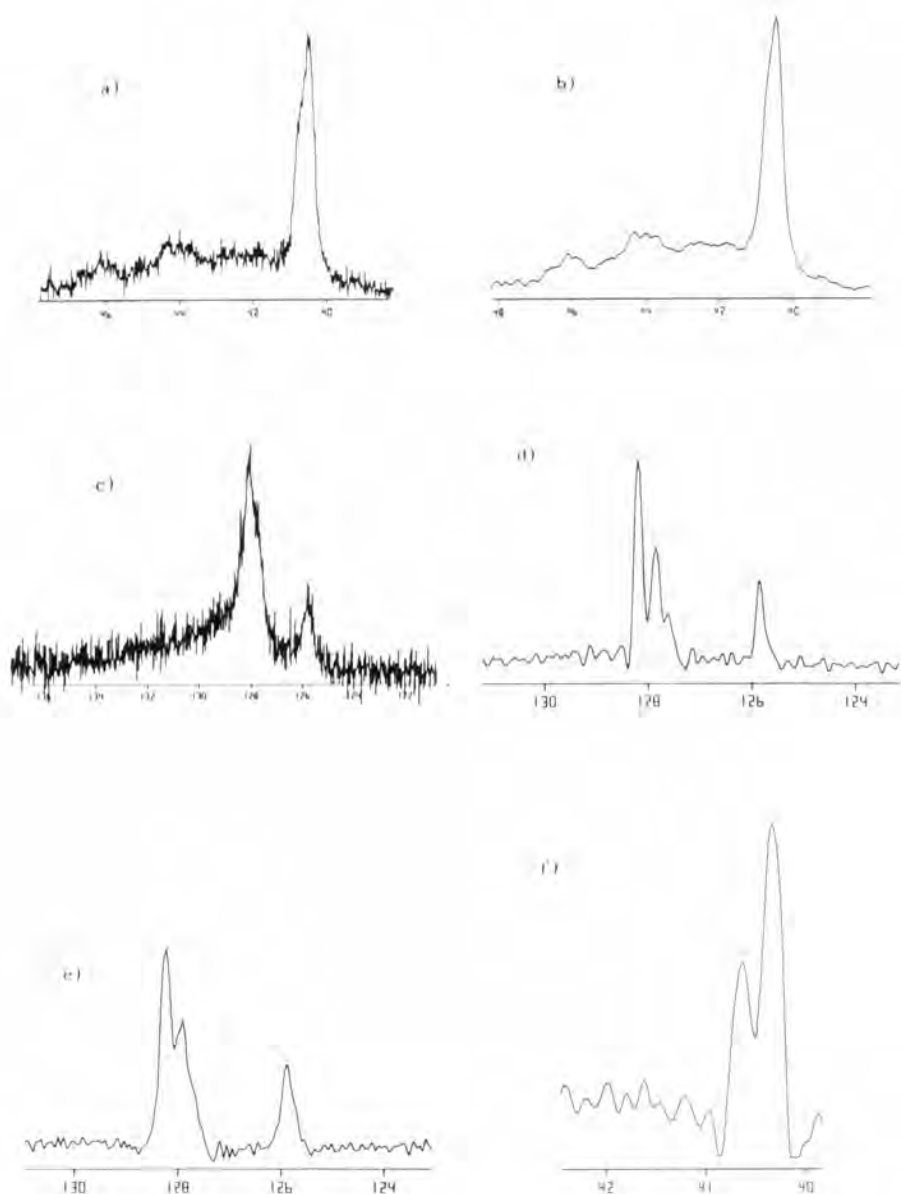


Fig. 3. a) Zona alifàtica de l'espectre A (taula I) amb $\text{LB} = 0$; b) amb $\text{LB} = 4$ c) Millora de resolució a l'espectre D (taula I). Zona aromàtica, espectre normal; d) Zona aromàtica amb $\text{RE} = 0,015$ $\text{AF} = 0,050$; e) Zona aromàtica amb $\text{CD} = 0,03$ $\text{CCD} = 0,9$; f) Zona alifàtica amb $\text{RE} = 0,015$ $\text{AF} = 0,050$.

l'hetero-2,4,6-trifenilheptà (B-14.937),^a podem assignar el senyal de camps alts al ^{13}C -4 i el de camps baixos al ^{13}C -5.

Finalment, hom ha observat una espatlla al senyal del ^{13}C -2 al cantó de camps baixos que es pot resoldre en dos senyals, un a 40,40 ppm i un altre a 40,67 ppm (fig. 3 f). L'explicació a l'aparició d'aquests dos senyals possiblement cal cercar-la en qüestions de taticitat, però això cau fora dels objectius del present treball.

2.2. Mesura dels temps de relaxació longitudinals

El temps de relaxació longitudinal (T_1) està directament relacionat amb la dinàmica i estructura moleculars. Per aquesta raó, els experiments de mesura de T_1 són molt útils a l'espectroscopista de RMN; així, darrerament s'han desenvolupat un gran nombre d'aplicacions, des de la simple assignació de senyals, fins a l'estudi de la microdinàmica de molècules en solució. Els autors que han aplicat la RMN de ^{13}C a l'estudi dinàmic i estructural de polímers en fase gel,^{2,4,6,7,8} han tingut en la mesura de T_1 una de les fonts més importants d'informació. A nosaltres, el coneixement dels temps de relaxació longitudinal del Pst. ens ha d'ajudar, a més, a seleccionar els paràmetres d'adquisició que optimitzen la sensibilitat.

Dels mètodes més coneguts i emprats per a la mesura de T_1 , ha estat escollit el de "Recobrament de la Magnetització" ("*Inversion Recovery*") atenent, especialment, que els temps de relaxació longitudinal a mesurar són bastant curts (hom deixa fora de consideració el carboni quaternari).

L'experiment de mesura de T_1 ha estat dut a terme atenent les consideracions que fan al cas.¹⁹ Els espectres obtinguts són presentats a la fig. 4. L'ajust numèric, en general, és molt exacte. L'error real de les mesures és estimat en un 10%, però pot ésser bastant menor. Per als senyals metilènics han estat obtinguts diversos valors corresponents a diferents màxims de la corresponent zona de ressonàncies; llur valor de NT_1 és concordant amb els dels altres carbonis. La menor alçada dels senyals justifica l'error numèric més alt. Per als carbonis 4 i 5 hom dóna el valor conjunt, obtingut en les mateixes condicions que els altres ($LB = 0,796$) i el valor respectiu obtingut amb $CD = 0,03$, $CCD = 0,9$; la diferència no pot ésser significativa.

^a B-número indica que les dades són extretes de " *^{13}C -NMR Spectral Data*", Bremser, Ernst, Franke, Gerthards & Hardt, Verlag Chemie 3rd Ed; el número és el de referència.

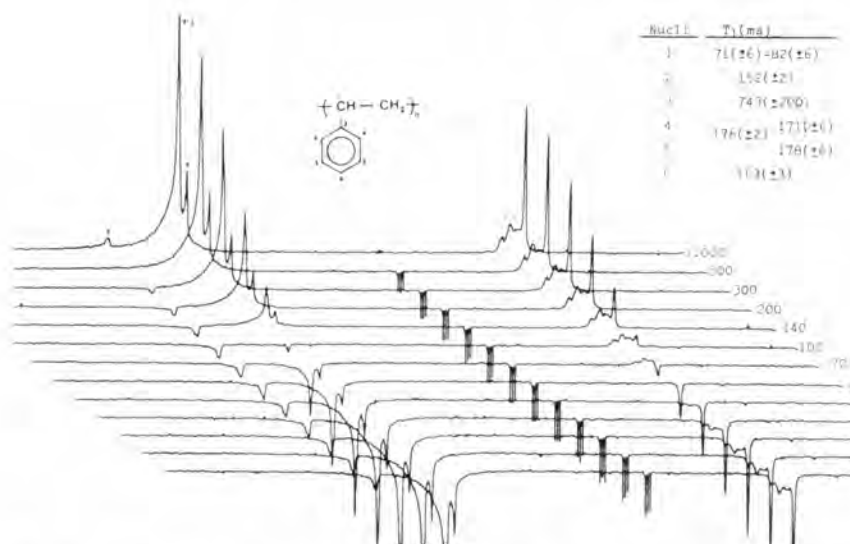


Fig. 4. Mesurament de T_1 dels nuclis del Pst. en CDCl_3 a 50,3 MHz. Espectres obtinguts en funció del temps de recobrament de magnetització τ .

La comparació dels temps de relaxació mesurats amb els que apareixen a la literatura a altres freqüències, indica una bona concordança.^{5,6,8} Els valors de T_1 obtinguts estan mesurats mitjançant els màxims dels senyals corresponents, la qual cosa vol dir que estem mesurant el T_1 dels nuclis amb major mobilitat. Sense entrar en la discussió de la distribució de la mobilitat de les cadenes en diferents zones del polímer,^{6,8} podem afirmar que ens movem en temps de correlació (τ_c) mínims de menys de 10^{-8} s (prenent el temps de correlació com a paràmetre inversament proporcional a la mobilitat). En la figura 5 observem que és lògic de trobar una dependència de T_1 amb la freqüència en aquesta zona de temps de correlació. A 50,31 MHz, som a la zona on el T_1 és mínim i menys sensible a τ_c (s'entén a temperatura ambient). A freqüències més baixes, en canvi, som a la zona on el T_1 disminueix en augmentar τ_c (disminueix la mobilitat).⁵ La mobilitat de les cadenes en el gel és molt semblant a la que tenen les del poliestirè lineal en solució.⁸

Tenint en comte la variació del NOE amb τ_c (fig. 5 b), podem esperar que s'incrementi en elevar moderadament la temperatura sense que hi hagi un augment important de T_1 ; la conseqüència és que, en pujar la temperatura, podem guanyar sensibilitat. Un avantatge addicional de treballar a temperatures més elevades és que ha d'augmentar T_2 (fig. 5 a), amb la qual cosa podem guanyar resolució i relació senyal/soroll.

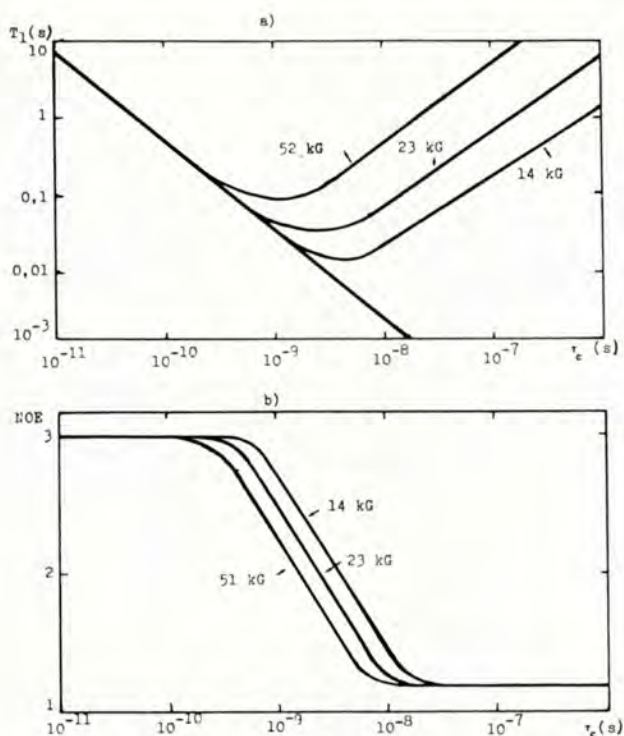


Fig. 5. a) Variació teòrica de T_1 i T_2 amb el temps de correlació τ_c a diferents camps (freqüències).⁵¹ b) Variació del NOE amb τ_c .⁵²

2.3. Espectre del Pst. augmentant la temperatura. Estimació dels temps de relaxació transversal. Mesurament de NOE

Han estat obtinguts dos espectres del Pst. en d_6 -DMSO/dioxà (1: 4), un a 25°C i l'altre a 90°C. La primera cosa que hom observa és una disminució del soroll de fons i un estrenyiment dels senyals a l'espectre fet a temperatura més elevada. El senyal del ^{13}C -2 passa, d'una amplada de banda de 27,3 Hz a 25°C, a 22,6 Hz. a 90°C. El corresponent als ^{13}C -4 i 5, passa de 48,2 Hz a 38,1 Hz. És difícil de deduir d'aquí els valors dels temps de relaxació transversal, puix que ambdós són dobles. No obstant això, podem fer una estimació aproximada del T_2 mínim, tenint en compte la separació dels màxims d'ambdós senyals; per al ^{13}C -2 passem de 23 ms. a 25°C a 35 ms. a 90°C, i per als carbonis 4 i 5 passem de 12 ms. a 19 ms. Aquests valors d'amplada de banda i T_2 concorden amb els que apareixen a la literatura^{5,6,8} i esperables per a la zona de temps de correlació en què ens movem (fig. 5 a).

TAULA II

Mesurament de NOE per al Pst. a 25°C i 90°C en dioxà. Relació r entre el NOE a 90°C i a 25°C

Nucli:	1	2	4-5
25°C	1,69	1,64	1,65
90°C	2,08	2,16	2,00
r	1,21	1,31	1,23

Abans d'analitzar l'increment de sensibilitat observat, cal fer una mesura de NOE. Per a fer-ho hom registra un espectre totalment desacoblat (amb NOE) i un altre amb "Gated Decoupling" (desacoblat però sense NOE). El NOE per a un senyal donat l'obtenim per la relació d'intensitats del mateix NOE al primer espectre i al segon.

Han estat obtingudes mesures de NOE per al Pst. en dioxà a 25°C i 90°C (taula II), concordants amb les que apareixen a la literatura^{5,6,8} si hom té en compte els efectes de dissolvent i de freqüència. L'augment de NOE amb la temperatura és considerable i pot ésser quantificat per la relació r entre el valor a 90°C i a 25°C .

L'increment de sensibilitat en els espectres inicials a 25°C i 90°C , pot ésser obtingut per la divisió entre les relacions S:N respectives (per a cada senyal) i també per la relació d'integrals. Pel primer mètode obtenim una relació de 2,2 per al ^{13}C -2 i de 2 per als carbonis 4 i 5; pel segon mètode, la relació d'integrals de la zona alifàtica és 1,7, i per a la zona aromàtica 1,4. L'estrenyiment dels senyals explica que sigui major l'increment de relació senyal/soroll que el de les integrals, però ja es comprèn que les dades tan sols són orientatives. Els resultats concorden amb el fet que hi hagi una contribució de l'augment de NOE a l'increment de sensibilitat dins les consideracions qualitatives que podem fer. Sembla clar, a més, que no hi ha un increment important de T_1 en passar de 25°C a 90°C , car en les condicions d'adquisició emprades comportaria una pèrdua de sensibilitat. Treballar a temperatures de l'ordre dels 90°C o inferiors ofereix, en definitiva, uns avantatges, quant a sensibilitat i resolució, que cal tenir en compte en el treball posterior. Els resultats globals concorden amb la zona de temps de correlació proposada.

2.4. Experiment teòric

Coneguts els temps de relaxació transversal i longitudinal dels nuclis de ^{13}C del Pst., hom pot deduir teòricament quins són els parà-

metres d'adquisició que permeten d'obtenir una sensibilitat màxima per a un temps total de registre donat T . Fixem l'atenció en un dels tipus de nuclis de ^{13}C del Pst., amb temps de relaxació longitudinal de T_1 s i transversal de T_2 s. Designarem $\vec{M}$ la magnetització, resultant macroscòpica dels moments dels nuclis, i, considerant-los sotmesos a un camp magnètic $\vec{H}_0$, situarem uns eixos de coordenades fixes x, y, z , fent coincidir z amb la direcció de $\vec{H}_0$. En donar una pulsació de PW μs i registrar el FID, la sensibilitat és directament relacionada amb la component de M en el pla perpendicular a $\vec{H}_0$ després de donar la pulsació ($t = 0$ pel FID): M_{xy} . En una seqüència de NT pulsacions, amb un temps d'espera d'A seg. entre pulsació i pulsació, hom arriba a un estat estacionari,²⁰ on l'efecte de la pulsació és compensat, durant el temps d'espera, amb la relaxació dels nuclis. Podem suposar, així, que M_{xy} serà igual per a cada acumulació; tenint en compte que la sensibilitat augmenta en un factor $\sqrt{NT}$ per a NT acumulacions, prendrem com a funció sensibilitat a maximitzar:

$$S = \sqrt{NT} M_{xy} \quad (1.1)$$

Atès que $NT = T/A$, S tan sols dependrà d'A i PW; ens cal trobar la funció $M_{xy}(A, PW)$, per la qual cosa hem d'analitzar l'estat estacionari. En fer-ho, acceptant les equacions de Bloch completes i integrant-les convenientment, hom arriba a l'equació:

$$M_{xy}(A, PW) = \frac{M_0 [1 - \exp(-A/T_1)]}{1 - \cos(\gamma H_1 PW) \exp(-A/T_1)} \sin(\gamma H_1 PW) \quad (1.2)$$

on suposem que la relaxació transversal és total i el camp de radiofreqüència $\vec{H}_1$ amb què irradiem és prou intens. γ és la constant giro-magnètica dels nuclis, l'angle θ que gira el vector magnetització en donar la pulsació és $\gamma H_1 PW$ i M és el valor màxim de $|\vec{M}|$. Emprant l'angle θ com a variable, obtenim que la funció sensibilitat a maximitzar és:

$$S(A, \theta) = \frac{T}{A} \frac{M_0 [1 - \exp(-A/T_1)]}{1 - \cos \theta \exp(-A/T_1)} \sin \theta \quad \begin{matrix} 0 \leq \theta \leq \pi/2 \\ A \geq 0 \end{matrix} \quad (1.3)$$

L'anàlisi d'aquesta funció dona un màxim absolut per a $\theta = 0$, $A = 0$. Emprant A com a paràmetre tenim un màxim per a cada A en el valor de θ que compleix:

$$\cos \theta = \exp(-A/T_1) \quad (1.4)$$

Aquesta és la fórmula de l'angle d'Ernst (21), l'òptim per a un A donat. Utilitzant aquesta igualtat i fent el canvi $x = A/T_1$ obtenim:

$$S(x) = \frac{1 - \exp(-x)}{x [1 - \exp(-2x)]^{1/2}} K \quad (1.5)$$

on $K = M_0 (T/T_1)^{1/2}$. Aquesta funció pren un valor màxim per a $x = 0$:

$$S(0) = \frac{K}{\sqrt{2}} \quad (1.6)$$

La conclusió és que hem d'emprar els valors més petits de A (de x) que les exigències de resolució permetin i el valor corresponent de PW (de θ), d'acord amb l'equació (1.4), per a tenir la màxima sensibilitat.

Per a tenir una imatge més real o pràctica d'allò que ens indica l'equació (1.5), hom ha cregut interessant de fer una sèrie d'espectres del Pst. per a diversos valors de x, suposant $T_1 = 150$ ms, i comprovar que s'acompleix la mateixa.

Els paràmetres emprats en els espectres són indicats a la taula III. La utilització de temps d'adquisició (AT) diferents permet de comparar les amplades de banda obtingudes (taula III). Tot i emprant temps d'adquisició curts, obtenim amplades de banda molt concordants amb les que s'obtenen amb valors d'AT més llargs, en emprar "zero filling".^a

Per a comparar les previsions teòriques de sensibilitat amb els resultats pràctics obtinguts (taula IV), hom troba el tant per 1 de sensibilitat $S(x)$ respecte a la sensibilitat màxima $S(0)$. Els valors teòrics de $S(x)/S(0)$ són obtinguts mitjançant les equacions (1.5) i (1.6). Els valors experimentals són obtinguts amb la relació S:N del ^{13}C -2 (el que té un valor de T_1 més proper a 150 ms); per a fer-ho, hom accepta el valor teòric de $S(x)/S(0)$ per a un dels espectres com a patró i dedueix el valor de $S(0)$, amb el qual calculem $S(x)/S(0)_{\text{exp}}$ per als altres espectres.

Els resultats experimentals concorden qualitativament amb els teòrics. Les diferències de sensibilitat estan accentuades perquè la utilització de temps d'adquisició diferents introdueix el soroll de fons com a variable. L'efecte del soroll pot ésser disminuït emprant valors creixents de LB, com hom pot observar per als valors de $S(x)/S(0)$ obtin-

^a La resolució digital (DR) corresponent a un temps d'adquisició donat en què obtenim un FID de N punts, és $DR = 1/AT$. El valor de DR pot disminuir (augmentar la resolució) afegint N (o un múltiple de N) zeros al FID abans de fer la transformació de Fourier ("zero filling"). Hom obté, així, una millor definició dels senyals i pot mesurar millor llur intensitat, amplada de banda i posició. No obstant això, no es guanya resolució real i no es pot pretendre la resolució de senyals amb una diferència de freqüència de ressonància inferior a $1/AT$.

TAULA III

Paràmetres emprats en els espectres realitzats per tal de comprovar les previsions teòriques respecte la sensibilitat en l'espectre del Pst. Amplades de banda del senyal del $^{13}\text{C-2}$

Espectre	$A \text{ (ms)}^a$	x^b	$PW \text{ (}\mu\text{s)}$	$\theta(^{\circ})$	$DR \text{ (Hz)}^c$	NT	$\Delta \gamma_{\%} (^{13}\text{C-2}) \text{ (Hz)}$
1	150	1	9,5	68,4	6,67	40.000	27,7
2	300	2	11,4	82,2	3,33	20.000	27,4
3	450	3	12,1	87,1	2,22	13.333	----
4	600	4	12,4	89,3	1,67	10.000	----
5	750	5	12,4	89,3	1,33	8.000	27,6

^aEn tots els casos $A = AT$. Suposant $T_1 = 150 \text{ ms}$. Resolució digital corresponent a l'AT emprat ($DR = 1/AT$); en tots els casos ha estat disminuït RD emprant "zero filling" ($DR = 0,67 \text{ Hz}$).

TAULA IV

Comparació de les previsions de sensibilitat teòriques amb els resultats experimentals. Per als valors experimentals de $S(x)/S(0)$ i M_{xy}/M_0 escollim com a patró l'espectre que facilita més la comparació dels resultats

$S(x)/S(0) (^{13}\text{C-2})^a$				M_{xy}/M_0^b			
Espectre	Teor.	Exp. LB = 0	Exp. LB = 1	Teor. ($^{13}\text{C-2}$)	Exp. ($^{13}\text{C-2}$)	Teor. ($^{13}\text{C-4,5}$)	Exp. ($^{13}\text{C-4,5}$)
1	0,96	1,36	1,14	0,680	0,663	0,633	0,635
2	0,87	0,87	0,87	0,873	0,857	0,831	0,835
3	0,78	0,64	0,72	0,951	0,934	0,925	0,926
4	0,69	0,46	0,62	0,982	0,982	0,967	0,967
5	0,63	----	0,58	0,993	0,980	0,986	0,980

^aPrenent com a patró l'espectre 2.

^bPrenent com a patró l'espectre 4. LB = 1.

guts amb $LB = 1$ (taula IV). Observant l'increment de relació S:N a causa de la disminució d'AT descrit a l'apartat 2.1, i sense intentar de fer correccions numèriques que podrien ésser molt dubtoses, podem concloure que la comprovació de les previsions teòriques és acceptable.

Una comprovació addicional de l'acord entre la teoria i la pràctica, es pot fer a partir de les intensitats i integrals absolutes; ambdues estan relacionades directament amb la component M_{xy} del vector magne-

tització després de la pulsació. Aplicant l'equació (1.2), hom pot deduir els valors teòrics de M_{xy}/M_0 per als paràmetres utilitzats. Els valors experimentals poden ésser deduïts d'una manera anàloga als de $S(x)/S(0)$, emprant intensitats o integrals en comptes de relacions S:N. Com pot ésser observat a la taula IV, on han estat emprades intensitats absolutes, la concordança entre les prediccions teòriques i els resultats experimentals és molt bona, especialment per als ^{13}C -4 i 5; per a aquests carbonis hem emprat el valor de T_1 que hem determinat ($T_1 = 176$ ms). Amb càlculs equivalents obtenim una coincidència entre els valors teòrics i experimentals per al carboni 6 quasi tan bona com per als ^{13}C -4 i 5. Hom observa que el valor de LB emprat no afecta els resultats, cosa que està d'acord amb allò que podíem esperar. Càlculs similars amb integrals absolutes donen, per a la zona aromàtica, resultats igualment coherents (d'acord amb el fet que la poca contribució del senyal del ^{13}C -3 a la integral no ha de produir interferències sensibles); per a la zona alifàtica, els valors experimentals són una mica superiors als teòrics, com correspon a la contribució important dels senyals del ^{13}C -1 a la integral, car tenen un T_1 considerablement més baix de 150 ms.

La coincidència d'aquestes darreres dades demostra que les mesures de T_1 són més exactes que no podíem assegurar; així, veiem que disminueix lleugerament $(M_{xy}/M_0)_{\text{exp}}$ en augmentar una mica T_1 , tal com podíem esperar si les mesures eren correctes. Acceptant l'equació (1.1) i els darrers resultats, podem obtenir la mateixa concordança per a $S(x)/S(0)$ que tenim per a M_{xy}/M_0 ; tenim, doncs, una major certesa de l'acompliment prou exacte de les equacions teòriques descrites.

L'aplicació dels resultats descrits en aquest apartat al registre d'espectres de RMN de ^{13}C de resines derivades del Pst., ha d'ésser posada en funció de les intensitats i amplades de banda que hom vagi observant per a cada una de les mostres objectes d'estudi. En el cas del Pst., podem treballar amb temps d'adquisició de l'ordre dels 200 ms (i la pulsació òptima corresponent, Eq. 1.4), conservant un 90% de la sensibilitat màxima. Hom pot preveure, tanmateix, que els nuclis vagin guanyant mobilitat a mesura que siguin més lluny de la trama polimèrica; això implicaria que les bandes corresponents fossin més estretes i, potser, que els T_1 fossin més llargs (les intensitats relatives ens ho poden indicar sense haver-los de mesurar). Llavors, les exigències de resolució poden fer convenient de treballar amb temps d'adquisició superiors (e. g., 700 ms); la sensibilitat per als nuclis del Pst. baixaria a un 70% del valor màxim, però no per als nuclis més allunyats de la trama polimèrica, que són, en general, els que més ens interessa d'observar.

Podem triar, del conjunt de resultats i idees d'aquest capítol, un

conjunt de conclusions que cal tenir en compte en emprendre l'anàlisi d'estructures més complexes derivades del Pst.:

- La manipulació matemàtica del FID, per a obtenir més informació quant a sensibilitat i resolució, és especialment útil en aquest tipus d'espectres.

- Poden emprar seqüències de pulsacions més ràpides que les típiques de RMN de ^{13}C en líquids, cosa que compensa, en part, els problemes de sensibilitat que són deguts a l'amplada de banda dels senyals.

- El treball a temperatures superiors a l'ambient pot ajudar a resoldre problemes de sensibilitat i resolució.

- El mesurament de T_1 ens ajuda a escollir els paràmetres òptims per a registrar els espectres. La informació que ens dona referent a la mobilitat dels nuclis en el gel, té un interès teòric, però també pràctic, tant per a la RMN en ella mateixa com per a la síntesi de pèptids.

3. ANÀLISI PER RMN DE ^{13}C DE RESINES DERIVADES DEL COPOLI (ESTIRÈ-1%-DIVINILBENZÈ)

S'han analitzat per RMN de ^{13}C algunes resines derivades del Pst. que s'empren en síntesi de pèptids, per tal d'intentar determinar llur funcionalització i puresa. Han estat aplicades i desenvolupades en aquest estudi les idees del primer capítol.

3.1. Resines clorometilades

Els clorometil poliestirens reticulats (resines clorometilades, 1) són potser les resines més emprades en síntesi de pèptids. Aquestes resines han estat anteriorment objecte de diferents tipus d'estudis per RMN de ^{13}C .^{6, 11, 12} La principal característica de l'espectre d'una resina clorometilada (comercial; 0,89 meq CH_2Cl /gr. resina $\equiv$ 10% dels anells aromàtics funcionalitzats) (fig. 6) és el senyal de $^{13}\text{CH}_2\text{Cl}$ a 46,3 ppm; aquest senyal és el més agut dels del polímer (amplada de banda: 11,5 Hz), la qual cosa implica una major mobilitat dels nuclis corresponents. La regió del metilè poliestirènic tan sols queda una mica afectada respecte al Pst. Els senyals que corresponen als anells aromàtics funcionalitzats es perden sota els dels anells no funcionalitzats. A 65,3 ppm hom pot observar un senyal que correspon a grups hidroximetil com ja havien observat abans Manatt *et al.*¹³

Hom disposa de resines clorometilades de diferents lots i procedències (taula V); han estat fets diversos espectres d'alguna d'elles i han

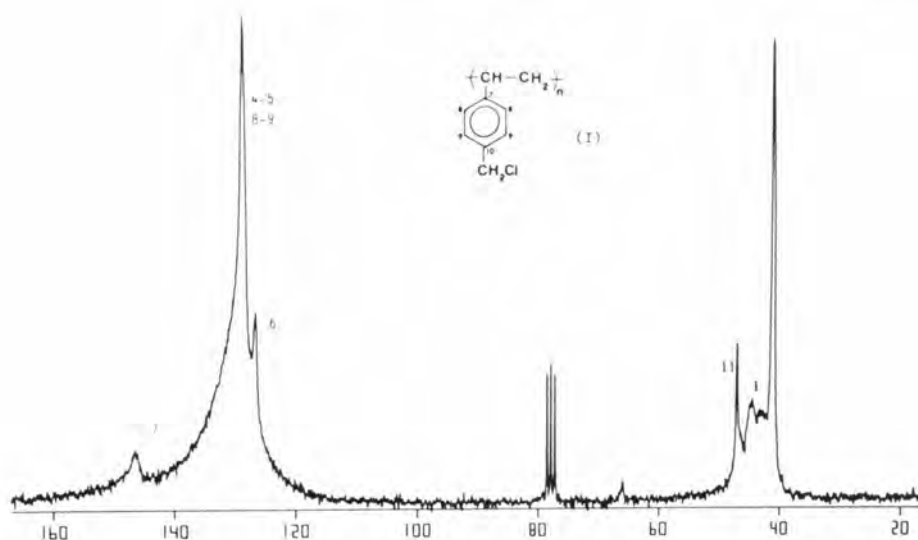


Fig. 6. Espectre de RMN de ^{13}C d'una resina clorometilada comercial (BIO BEADS S-X-1, 200-400 mesh; $f = 0.89$ mmol Cl/g de resina). $AT = 0,7$ s $NT = 10.000$ $PW = 12,0$ μs $LB = 0,796$.

TAULA V

Relació de resines clorometilades analitzades; hi és indicada l'amplada de banda del ^{13}C -2, i hom compara la funcionalització f (mmol Cl/g resina) obtinguda per RMN de ^{13}C amb l'esperada

Resina ^a	$\Delta \nu_{1/2}^{13}\text{C-2}$ (Hz)	f esperada ^b	f RMN ^{13}C ^c
P1	28,0	0,65 ¹ - 0,54 ²	0,65
P2	27,6	0,45 ¹ - 0,38 ²	0,50
P3	27,3	0,55 ¹ - 0,27 ²	0,45
P4	28,6	----	0,68
BIO-BEADS-1	28,1	0,89	1,02
BIO-BEADS-2	29,1	0,89	1,00
BIO-BEADS-3	29,1	1,25	1,25
Pierce	31,6	1-2	1,29
UCD	32,0	0,74	0,86

^a Les quatre primeres han estat obtingudes al nostre laboratori, i les altres són comercials.

^b Funcionalitzacions esperades; 1-Anàlisi elemental de clor; 2-Acoblament de Boc-L-Pro i assaig de Gisin. En les resines comercials hom indica la funcionalització que dóna la firma.

^c Obtingudes per comparació d'intensitats prenent la resina P1 com a patró.

estat escollides les condicions d'adquisició de l'espectre presentat (fig. 6) per tal de fer una anàlisi comparativa de totes. A totes les resines de la firma BIO-RAD (BIO-BEADS) hom observa la presència de grups hidroximetil. A les altres dues resines comercials hom no detecta aquests grups, però sí que hi ha un senyal ample i poc intens a 69,0 ppm que no ha pogut ésser identificat. Tal com observen altres autors,¹¹ hi ha un increment de l'amplada de banda del senyal del ^{13}C -2 respecte a l'observada en el Pst. Les resines més funcionalitzades tenen un increment major, però no es poden establir relacions directes entre aquestes dos temes. Possiblement, aquest efecte és degut a un augment de la reticulació produït durant la síntesi.¹¹

Les resines sintetitzades al nostre laboratori són obtingudes a partir del Pst., clorometil metil èter i un àcid de Lewis (SnCl_4) que és emprat com a catalitzador.²⁸ En cap d'elles no ha estat detectada la presència de grups hidroximetil, molt perjudicial per a la síntesi de pèptids. Per a determinar llur funcionalització han estat emprats dos mètodes (a part l'anàlisi per RMN de ^{13}C): anàlisi elemental de clor i acoblament a la resina de Boc-L-Prolina seguint el mètode proposat per B.F. Gisin²² i posterior anàlisi d'amines per l'assaig del mateix autor²³ (aquest darrer mètode és descrit a la part experimental).

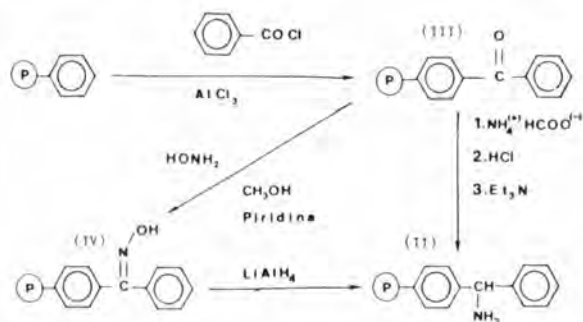
La mesura de la funcionalització de resines clorometilades per RMN de ^{13}C es veu dificultada per l'encavalcament del senyal de clorometil amb la zona alifàtica del Pst. L'intent d'aplicar el mètode d'integració descrit per Manatt *et al.*¹² (per a mesurar funcionalitzacions de resines clorometilades amb més de 1 mmol Cl/g resina) ha donat resultats incoherents, possiblement per la baixa funcionalització de les resines analitzades. Millors resultats han estat obtinguts en emprar mesures d'intensitat. El que hom fa és comparar les intensitats dels senyals dels ^{13}C -2 i 11, restant de la intensitat del senyal del darrer carboni un valor mitjà de la corresponent als senyals del ^{13}C -1 del Pst. a la zona entre 46,0 i 46,5 ppm; hom empra, a més, un dels espectres com a patró. Els resultats de la taula V han estat obtinguts emprant com a patró la funcionalització de la mostra P1, que ha estat utilitzada anteriorment en nombroses síntesis al nostre laboratori i ha estat comprovada la fiabilitat de la seva anàlisi elemental de clor. Sembla que les mesures realitzades per RMN de ^{13}C donen una idea bastant aproximada de la funcionalització de les resines clorometilades estudiades, però no hi ha resultats de referència prou fiables per a veure l'exactitud de les mesures, car l'anàlisi elemental de clor ha donat posteriorment uns resultats totalment contradictoris i el mètode de la Boc-L-Prolina dona valors de f més baixos del normal, possiblement perquè l'acoblament de l'aminoàcid sobre la resina és incomplet.

Malgrat els problemes que hi han estat trobats, l'anàlisi per RMN

de ^{13}C de resines clorometilades realitzada demostra la utilitat de la tècnica per a detectar impureses i quantificar funcionalitzacions. Tant l'un com l'altre aspecte s'han de veure afavorits si no hi ha encavalcament de senyals. Veiem, a més, que el senyal d'un carboni unit a l'anell aromàtic *per un sol enllaç*, és notablement més agut que els de la resta del polímer a causa de la seva major mobilitat.

3.2. Resina benzhidrilamina

Els α -aminobenzilpoliestirens (resines benzhidrilamines, II), introduïts per Pietta et Marshall, són suports d'utilització general en síntesi de pèptids en forma de carboxamida C-terminal. Pitta *et al.*²⁷ són partidaris de la síntesi d'aquestes resines via el derivat (IV) com és descrit a l'esquema. Després ha estat demostrat^{24, 26} que aquest mètode porta a la formació d'un gran percentatge d'amines secundàries a causa d'una transposició típica en la reducció d'ariloximes amb tetrahidrur d'alumini i liti;²⁹⁻³² el mètode d'elecció és el basat en una reducció de Leuckart de la diarilcetona (III).



Hem aplicat la RMN de ^{13}C en fase gel per a caracteritzar resines benzhidrilamines sintetitzades al nostre laboratori per les dues vies, i també els derivats intermedis (III) i (IV). Han estat utilitzades, en general, pulsacions inferiors a 90° i temps d'adquisició de 0,7 s amb acumulacions una mica llargues per tal d'intentar de veure els senyals corresponents a carbonis quaternaris. L'assignació de l'espectre de RMN de ^{13}C de la benzoïlresina (III) (fig. 7) és basada en els desplaçaments químics de la benzofenona (L-2). Els senyals corresponents als anells aromàtics no poliestirènics (que pegen) sobresurten dels altres a causa de la seva major mobilitat i el conseqüent estrenyiment de banda i augment de NOE. En canvi, hom no pot distingir pràcticament cap senyal dels anells poliestirènics funcionalitzats.

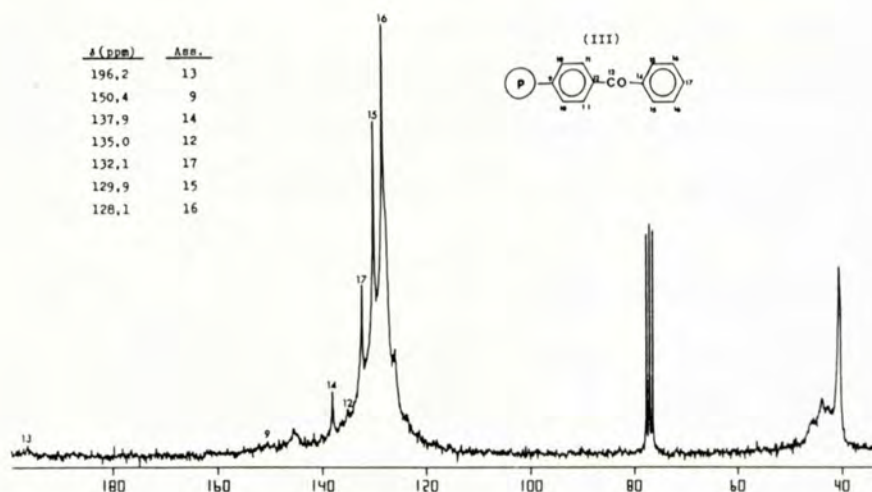


Fig. 7. Espectre de RMN de ^{13}C de la benzoilresina (III) en CDCl_3 . Funcionalització estimada per diferència de pesada: 1,9 mmol cetona/g resina. AT = 0,7 s PW = 9,0 μs NT = 12.000 LB = 1.

A l'espectre de RMN de ^{13}C d'una resina benzhidrilamina obtinguda per reducció de Leuckart (fig. 8) també hi podem veure principalment els senyals que corresponen a la funció unida a l'anell poliestirènic (α -aminobenzil), a part els de la cetona (III) que queda sense reduir. El

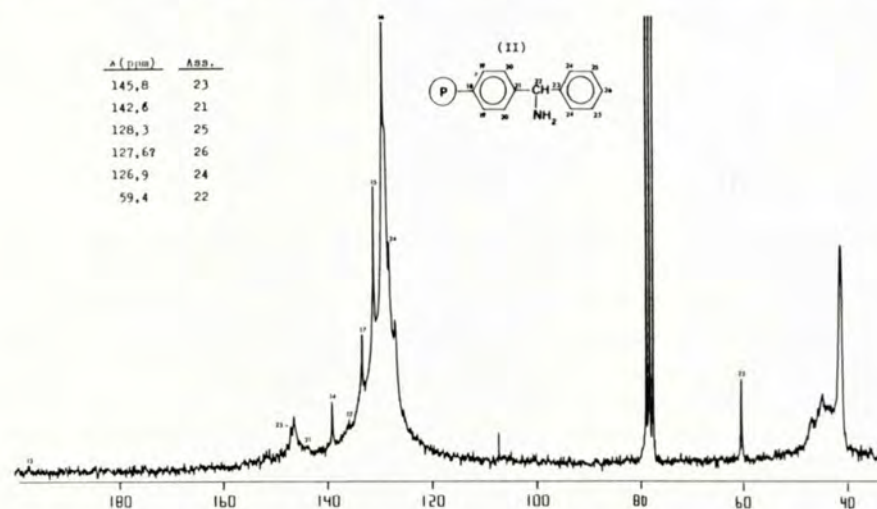
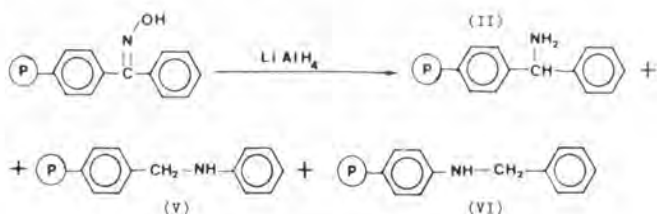


Fig. 8. Espectre de RMN de ^{13}C d'una resina benzhidrilamina obtinguda per reducció de Leuckart de la cetona (III), en CDCl_3 . AT = 0,7 s PW = 6,0 μs NT = 53.300 LB = 1.

senyal del carboni benzhidril a 59,4 ppm és el més característic de l'espectre i pot ésser utilitzat per a determinar la funcionalització de la resina. Ha estat emprat millorament de resolució per a assignar la zona aromàtica (comparant-lo amb l'espectre en les mateixes condicions de la cetona (III), fig. 9 a i b) i s'han atès els desplaçaments químics observats pel difenilmetanol i la 1-difenilmetil-4-piperazina (B-842 i 17.052 respectivament). Tant en l'espectre resolt de la cetona (III) com de la resina benzhidrilamina podem observar que els senyals corresponents a anells aromàtics poliestirèncis (de relaxació més ràpida) han estat pràcticament eliminats per la millora de resolució.

Com ja ha estat dit, en la reducció de l'oxima (IV) amb tetrahidrur d'alumini i liti pot produir-se una transposició típica d'ariloximes bo i formant amines secundàries (V i VI):



L'espectre de RMN de ^{13}C de l'oxima (IV) és idèntic al de la benzoilresina (III), com podem esperar en comparar els desplaçaments químics de la benzofenona i la benzofenona oxima (B-6.139). En l'espectre d'una resina benzhidrilamina sintetitzada via l'oxima (IV) podem veure tres senyals alifàtics que indiquen la formació de dos productes de transposició (V i VI), mentre que el producte correcte es forma en poca quantitat (fig. 10). El gran nombre d'estructures semblants fa difícil la interpretació de l'espectre, i la que presentem es basa en l'aplicació progressiva de les funcions de millora de resolució, atenent acuradament a les intensitats dels senyals i als desplaçaments químics observats per a la N-metilanilina (L-2), 1',1,2-difeniletà (B-5.690), l'etilbenzè (L-2), la benzilamina (B-660) i la N-benzil-2-toluïdina (B-20.213). La zona aromàtica parcialment resolta pot ésser observada en la figura 9 c. Sembla que hi ha més percentatge de l'isòmer V que no indica la relació d'intensitats dels senyals de 48,8 i 48,2 ppm. L'observació acurada del segon d'aquests senyals indica que és més ample que el primer, possiblement perquè el $^{13}\text{C-31}$ és un enllaç més a la vora de la trama polimèrica que el $^{13}\text{C-40}$. Veiem, doncs, la dificultat de comparar intensitats de senyals corresponents a nuclis amb diferent relaxació i mobilitat, i, en aquest sentit, encara és més problemàtica la comparació amb el senyal del $^{13}\text{C-22}$. La integració d'espectres compa-

rables i la mesura dels NOE dels senyals d'interès pot donar quantificacions igualment que per a mesurar funcionalitzacions, però això cau fora de les pretensions d'aquest treball. La obtenció majoritària del producte de transposició del grup "poliestiril" està d'acord amb els resultats obtinguts en la reducció d'ariloximes alquils substituïdes amb LiAlH_4 .³⁰

Ha estat comprovada la utilitat de la RMN de ^{13}C per a detectar reaccions anòmales, a part la caracterització de la resina. Hom ha vist, també, la utilitat d'algunes de les idees exposades al segon capítol.

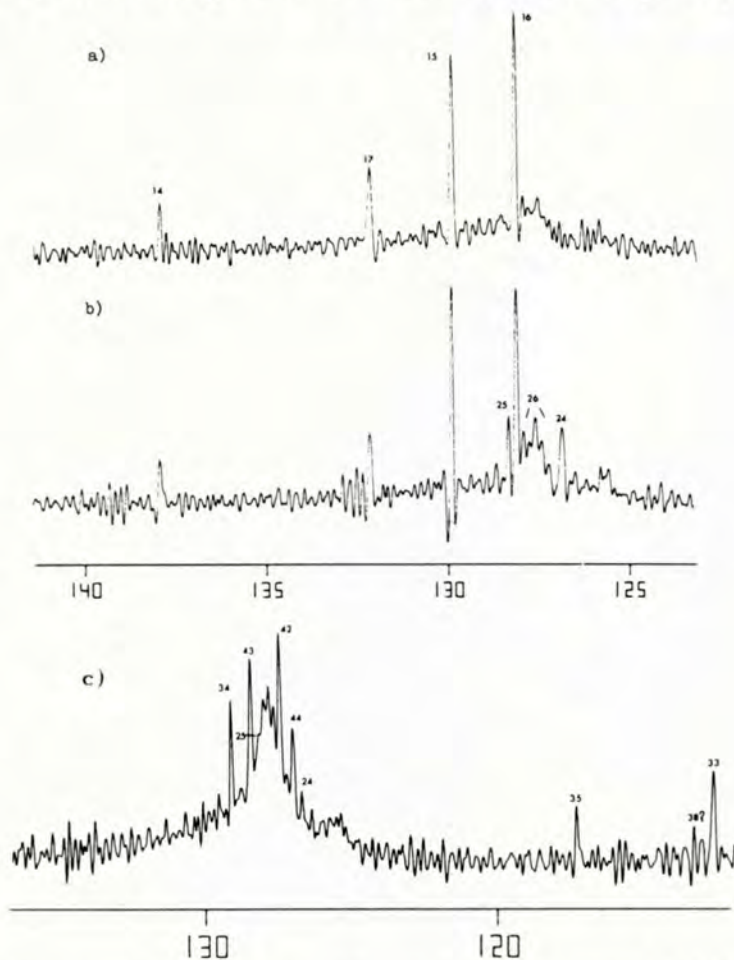


Fig. 9. Comparació de la zona aromàtica resolta dels espectres de RMN de ^{13}C de: a) la benzoilresina III RE = 0,018 AF = 0.062 b) resina benzhidrilamina (II) obtinguda per reducció de Leuckart de benzoilresina (III) RE = 0,018 AF = 0.062 c) resina benzhidrilamina obtinguda via l'oxima (IV) RE = 0,019 AF = 0.057.

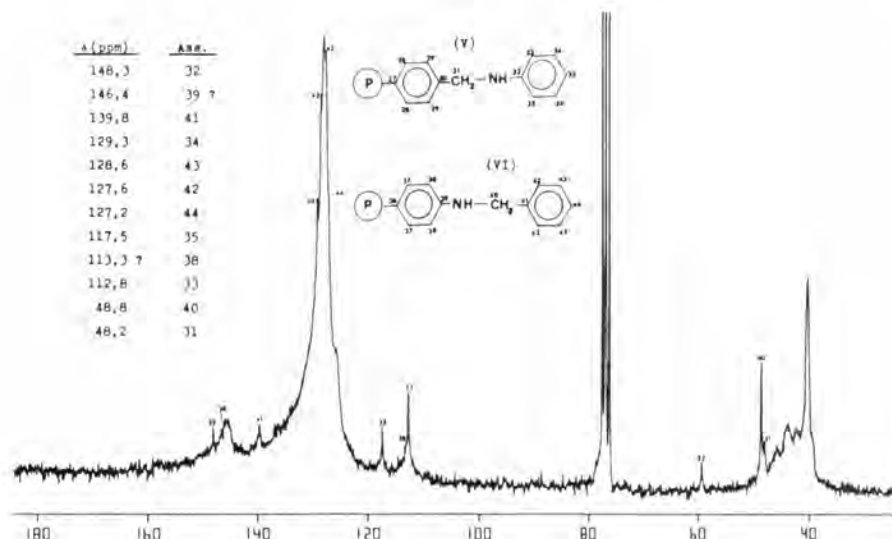
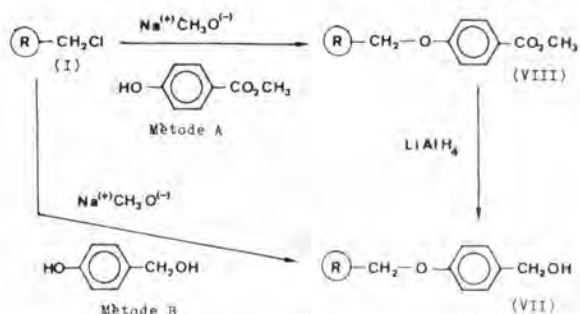


Fig. 10. Espectre de RMN de ^{13}C d'una resina benzhidrilamina obtinguda per formació de l'oxima (IV) i reducció amb LiAlH_4 , en CDCl_3 . AT = 0,7 s PW = 5,2 μs NT = 96.000 LB = 1.

3.3. 4-hidroximetilfenoximetilresines

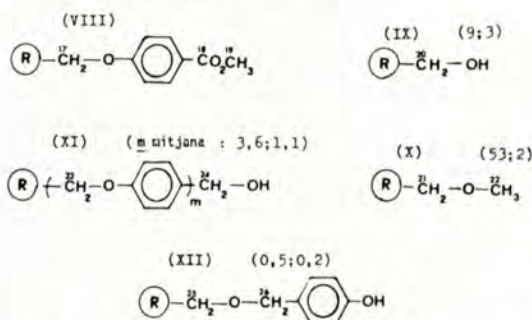
Ha estat demostrada recentment la gran aplicació del 4-hidroximetilfenoximetil-Pst. (VII) (descriu per Wang el 1975)³³ a la síntesi de pèptids en fase sòlida, per les condicions suaus en què es trenca l'enllaç pèptid-resina.³⁴⁻³⁷ Wang descriu la síntesi d'aquests suports per dues vies diferents, partint del clorometil-Pst. (a l'esquema vies A i B).³³ Merrifield ha trobat recentment³⁸ que la síntesi en les condicions B1 porta a resines molt heterogènies i dona les condicions B2 com a les millors per a minimitzar les diverses reaccions secundàries que poden tenir lloc.



B1 1,3 eq. 4-hidroximetilfenol (4HMP), NaCH_3O ; 24 h. 80°C.

B2 3 eq. 4HMP, NaCH_3O ; 8 h. 50°C.

Les principals impureses que podem trobar en la síntesi per mètode A són: l'ester VIII sense reduir, grups clorometil sense substituir i els productes de la seva hidròlisi (IX) o de substitució pel metòxid (X). Pels mètodes B1 i B2 no podem tenir ester VIII però sí que podem tenir, a més, productes de polimerització XI o d'atac invers del 4-HMP (XII). Indiquem entre parèntesis els percentatges que descriu Merrifield¹³⁸ per a la síntesi en condicions B1 (primer) i B2.



El rendiment de 4-hidroximetilfenoximetilresina (VII) el situa Merrifield en un 25% pel mètode B1 i en un 93% pel mètode B2; queden un 8% de clorometils en el primer cas i un 0-0,5% en el segon.

L'espectre de RMN de ¹³C en fase gel d'un 4-hidroximetilfenoximetil-Pst. obtingut pel mètode A al nostre laboratori (fig. 11) té les

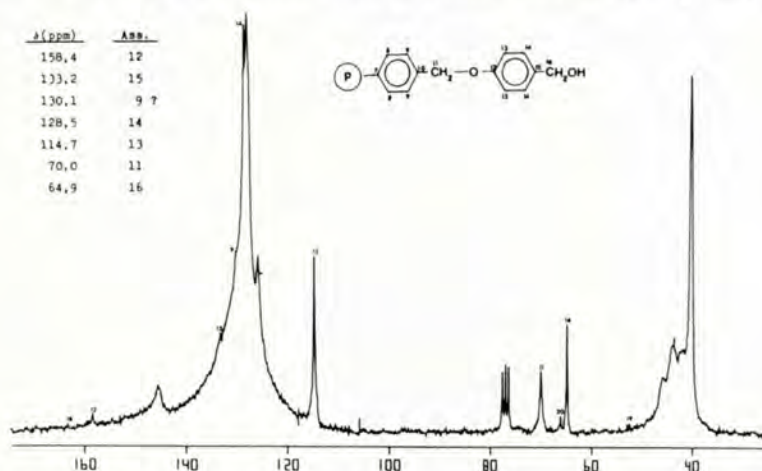


Fig. 11. Espectre de -RMN de ¹³C d'una 4-hidroximetilfenoximetilresina (obtinguda pel mètode A) en CDCl₃. AT = 0,7 s PW = 12,0 μs NT = 30.000 LB = 1. Desplaçaments químics determinats pel 4-HMP (δ (ppm)-Ass.): 156, 4-12; 132, 8-15; 128, 2-14; 115, 0-13; 63, 2-16. La numeració coincideix amb la corresponent en VII.

mateixes característiques que hem anat observant: els senyals d'anells aromàtics no poliestirènics (que pengen) són més fàcilment observables que els dels anells poliestirènics funcionalitzats; el senyal del ^{13}C -16 (hidroximetil) pot ésser utilitzat per a mesurar la funcionalització de les resines; aquest senyal és més estret que el del ^{13}C -11 perquè és més lluny de la trama polimèrica. A més, aquest darrer senyal és més ample que el de clorometil (fig. 6) a causa d'una immobilització produïda per l'estructura ancorada sobre el carboni corresponent. Hom pot observar un senyal addicional d'hidroximetil (^{13}C -20) que prové de la resina clorometilada de partida. Petits senyals a 163,3 i 52,5 ppm semblen indicar una petita impuresa d'ester metílic VIII sense reduir.

Per a detectar impureses per RMN de ^{13}C en 4-hidroximetilfenoximetilresines obtingudes pel mètode Bens, hem de fixar-nos en la zona alifàtica de l'espectre. A la figura 12 podem observar les característiques principals de la zona alifàtica de l'espectre de RMN de ^{13}C d'una resina (VII) molt impura. La relació d'integrals dels senyals de 70,0 i 64,9 ppm (atenent a la relació observada per les resines obtingudes pel mètode A) dóna el valor mitjà de m per als productes de polimerització (XI). Senyals a 57,8 i 74,5 ppm corresponen a metoximetilresina (X).

L'espectre de RMN de ^{13}C en fase gel d'una 4-hidroximetilfenoximetilresina comercial (de la firma BACHEM) indica la formació, tan sols, d'un 20% de productes de polimerització (m mitjà 1,2). Per a una resina VII obtinguda pel mètode B1 al nostre laboratori podem estimar

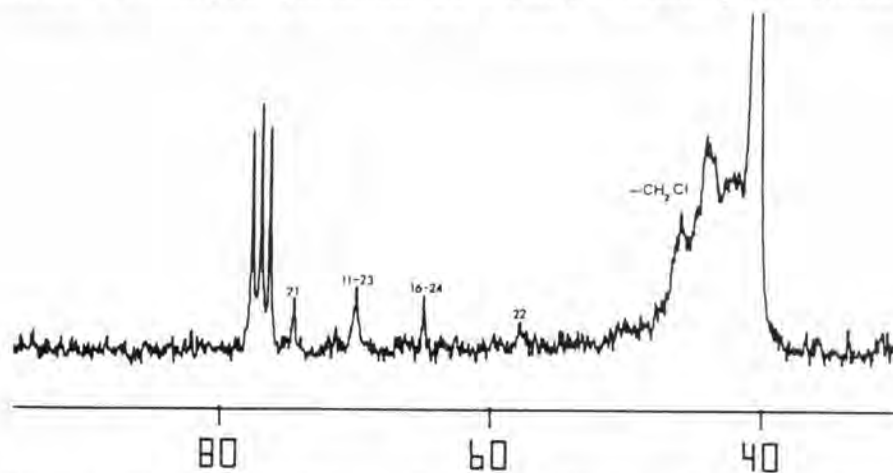


Fig. 12. Zona alifàtica de l'espectre de ^{13}C en CDCl_3 d'una 4-hidroximetilfenoximetilresina molt impura obtinguda pel mètode B2; permet d'observar alguns dels senyals que cal esperar quan existeixen les impureses descrites en el text. AT=0,7 s PW=12,0 μs NT=10.000 LB=1.

per RMN de ^{13}C en fase gel que el valor mitjà de m és entre 1,2 i 1,3 i la relació entre producte correcte VII i metoximetilresina (X) és aproximadament de 3 a 1, la qual cosa contrasta notablement amb les dades descrites per Merrifield. Hom no hi detecta senyals d'altres grups hidroximetil (IX). Per a diverses resines obtingudes al nostre laboratori en les condicions donades per Merrifield (B2), hom no hi ha observat cap impuresa, a part una excessiva polimerització (m mitjà entre 1,3 i 1,8).

Podem veure que la RMN de ^{13}C en fase gel dóna una bona estimació de la qualitat de les 4-hidroximetilfenoximetilresines, encara que no és una tècnica amb una sensibilitat molt elevada. Cal assenyalar que possiblement no observem senyals de grups clorometil sense substituir que estiguin en relativament poca quantitat. Per a una resina amb una funcionalització de 0,8 meq. VII/g resina podem estimar que impureses del 3% han d'ésser detectades si tenim en compte que emprem valors de LB de 4 ó 5 sempre que cal confirmar senyals (cal que no hi hagi encauclament de senyals).

3.4. Espectres de RMN de ^{13}C de la bromometil-Nbb resina i la clorometil-Pab resina

Presentem aquí els espectres de RMN de ^{13}C en fase gel de dos suports més elaborats que són emprats en síntesi de pèptids i han estat desenvolupats en anys recents al nostre laboratori (43-46): 1' α -(4-bromometil-3-nitrobenzamido) benzil-Pst. (bromometil-Nbb resina, XIII) i 1' α -[4-(clorometil) fenilacetamido] benzil-Pst. (clorometil-Pab resina, XIV) (figures 13 i 14, respectivament). Els dos suports se sintetitzen a partir de la resina benzhidrilamina (III). En ambdós espectres podem observar la restricció de mobilitat produïda en el carboni benzhidril (^{13}C -22) respecte a la resina benzhidrilamina (fig. 8). L'efecte és anàleg a l'observat pel clorometil a l'apartat anterior. Hom comprova una altra vegada la utilitat de la millora de resolució matemàticament. El pobre inflament de la clorometil-Pab resina en el dissolvent és reflectit clarament en l'espectre de la fig. 14; el bon inflament de la resina és fonamental per a obtenir un espectre de RMN de ^{13}C en fase gel satisfactori.

Les conclusions globals de l'anàlisi duta a terme per RMN de ^{13}C d'algunes resines emprades en síntesi de pèptids poden ésser resumides en els punts següents:

- La RMN de ^{13}C permet de caracteritzar les resines i ens pot ajudar a determinar-ne la funcionalització.
- Els senyals que hom observa amb més facilitat són els dels carbonis més allunyats de la trama polimèrica. . .

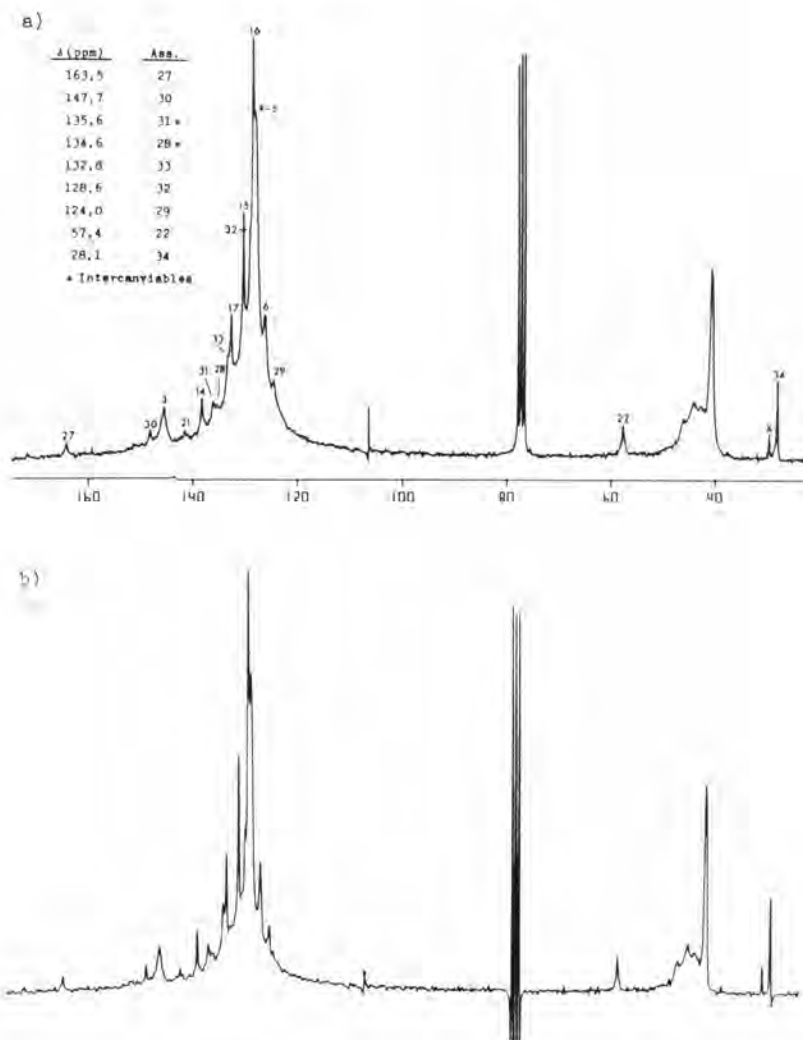
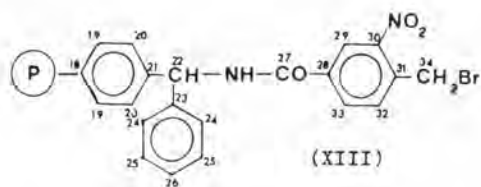


Fig. 13. Espectre de RMN de ^{13}C de la bromometil-Nbb resina (XIII) en CDCl_3 . AT = 0,7 s PW = 6,0 μs NT = 220.000. a) LB = 1 b) RE = 0.016 AF = 0,030. Ha estat conservada la numeració per a la benzoilresina (III).

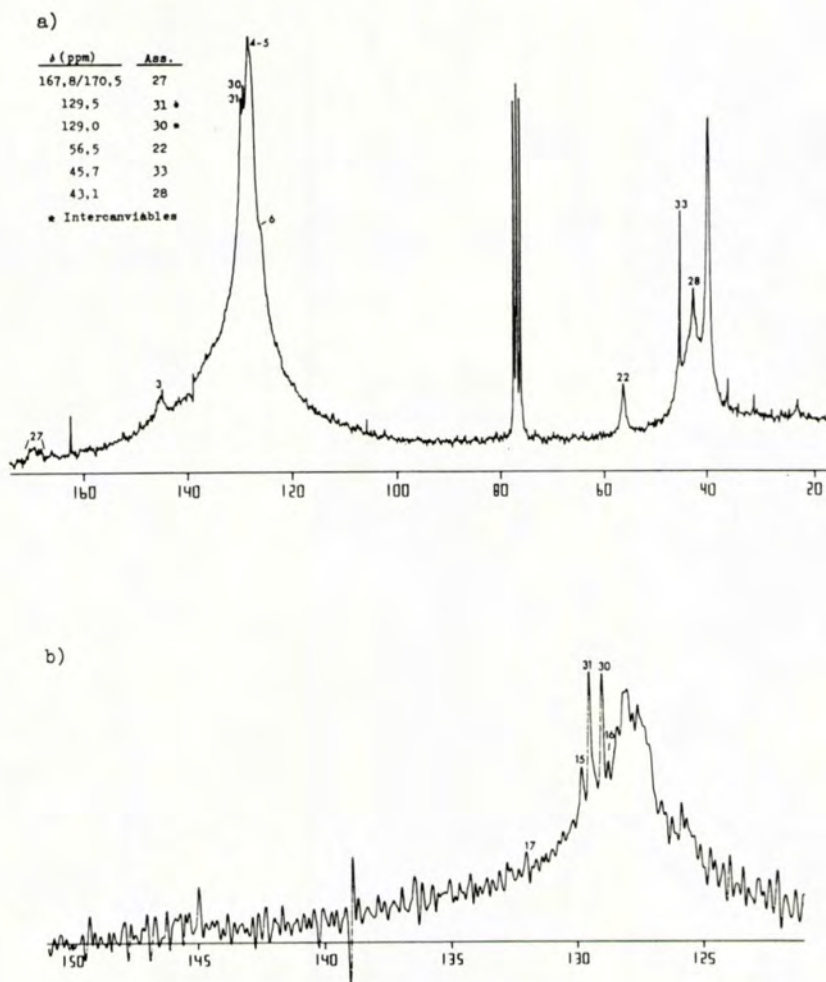
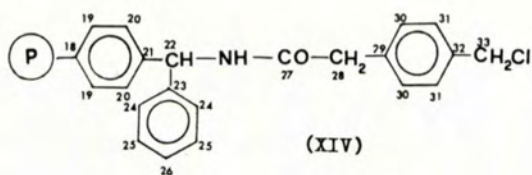


Fig. 14. Espectre de RMN de ^{13}C de la clorometil-Pab-resina (XIV) en CDCl_3 . AT = 0,700 s PW = 6,0 μs NT = 54.964. a) LB = 1; b) zona aromàtica emprant RE = 0.019 AF = 0,053.

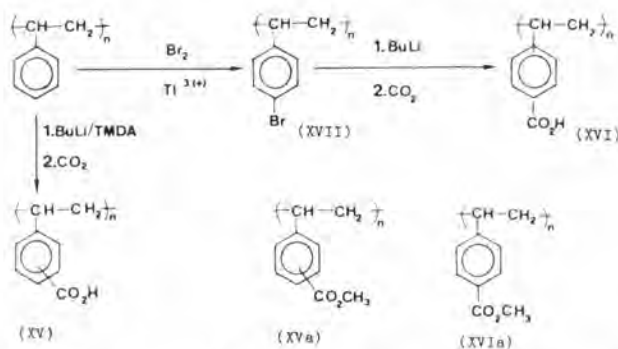
— La manipulació matemàtica del FID ha resultat especialment útil en aquest tipus d'espectres que presenten senyals encavalcats i amb diferents amplades de banda; també ajuda a resoldre problemes de sensibilitat per a detectar carbonis quaternaris o impureses.

— S'obre el camí al seguiment de síntesis de pèptids en fase sòlida per RMN de ^{13}C .

Hom inclou, finalment, en aquest capítol, l'intent de resoldre un problema de determinació estructural en polímers, que permet de veure les limitacions de la RMN de ^{13}C en fase gel quan augmenta el grau de reticulació.

3.5. Determinació de la posició de litiació del poliestirè

Un problema interessant de determinació estructural a polímers es presenta en la litiació del poliestirè amb butil litio (en presència de N,N,N',N'-tetrametilendiamina). En un treball recent amb productes de carbonatació del copoli (estirè-2%-divinilbenzè) litiat,⁴⁰ hom demostra la formació de productes meta- i para- substituïts en proporció estadística (2: 1), confirmant els resultats obtinguts per RMN de ^{13}C per a la litiació del poliestirè lineal.⁴¹ En un treball anterior hom proposa, en canvi, la litiació preferent en para-.⁴² Hom disposa de les mostres emprades en el primer treball esmentat;⁴⁰ els productes de carbonatació prèvia litiació directa (XV) o amb bromació intermèdia (XVI), els corresponents esters metàlics (XVa i XVIa) i el producte de bromació (XVII).



Els espectres que hom obté per a aquesta polímers, reticulats en un 2%, demostren la disminució de la mobilitat a les cadenes determinada per un pobre inflament de la resina en el dissolvent. No han pogut ésser obtinguts espectres satisfactoris de les carboxilresines (XV i XVI) després de fer proves d'inflament en CHCl_3 , DMSO , CH_2Cl_2 , MeOH i

dioxan. Sí que hom pot treure informació, en canvi, dels espectres de RMN de ^{13}C dels derivats metilesterificats XVa i XVIa (fig. 15). Si bé no han pogut ésser detectats clarament dos senyals de carbonil en di-

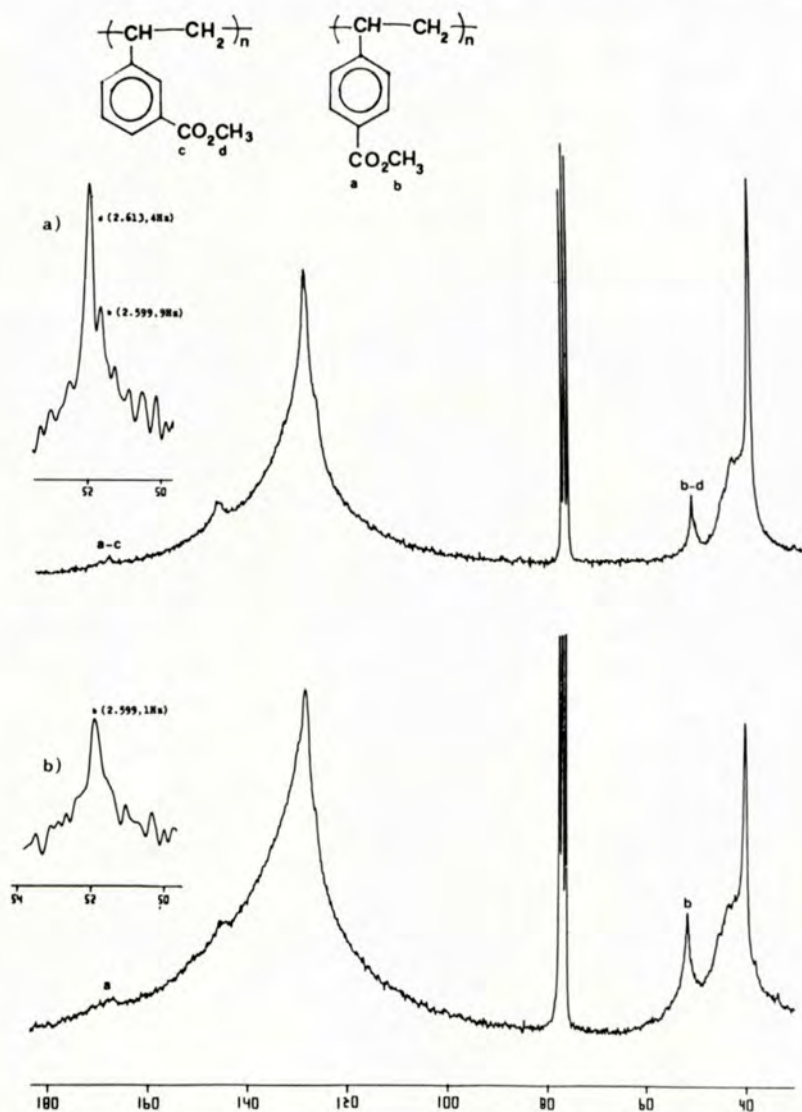


Fig. 15. Espectres de RMN de ^{13}C dels derivats esterificats amb ampliació dels senyals de metil resolts. a) XVa AT = 0,350 s PW = 12,0 μs D1 = 2,350 s NT = 30.000 LB = 0,796. Ampliació: RE = 0,027 AF = 0.050. b) XVIa AT = 0,350 s PW = 12,0 μs D1 = 2,350 s NT = 83.224 LB = 2. Ampliació RE = 0.027 AF = 0.050.

versos espectres realitzats de la mostra obtinguda per litiació directa (XVa), sí que hom pot resoldre matemàticament el senyal de metil, contràriament a allò que s'esdevenia amb la mostra obtinguda per bromació prèvia (XVIa). Els desplaçaments químics observats indiquen que l'isòmer majoritari en la mostra XVa és el de substitució en meta-confirmando els resultats esperats;⁴⁰ ja es comprèn que hom no poden fer quantificacions.

Ha estat registrat també un espectre de RMN de ^{13}C en CDCl_3 del producte de bromació XVII on hom pot resoldre els senyals corresponents als anells aromàtics funcionalitzats; el nombre de senyals observats i els corresponents desplaçaments químics confirmen que la bromació és en para-.

Veiem que l'aplicació de la RMN de ^{13}C en fase gel a l'anàlisi de polímers més reticulats és molt més problemàtica, però la tècnica pot ajudar a resoldre algun tipus de problema determinant i el seu desenvolupament pot ampliar el nombre d'aplicacions.

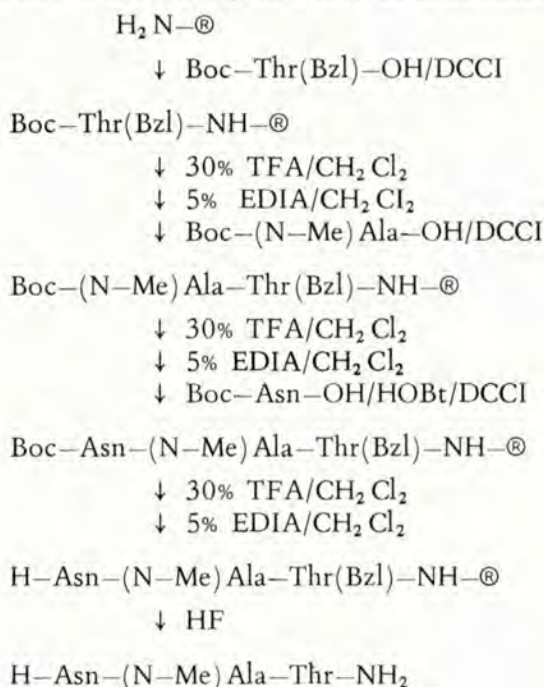
4. SEGUIMENT DE LA SÍNTESI DEL TRIPEPTID H-Asn-(N-Me)Ala-Thr-NH₂ PER RMN DE ^{13}C EN FASE GEL

Vistes les possibilitats de la RMN de ^{13}C en fase gel per a analitzar alguns dels suports sòlids més emprats en síntesi de pèptids, el pas següent, dins l'estudi que hom està fent, és l'aplicació de la tècnica al seguiment d'una síntesi peptídica. Hom ha cregut convenient, per a fer un primer seguiment, d'abordar la síntesi d'un pèptid curt. Ha estat escollida, així, la síntesi tripeptid H-Asn-(N-Me)Ala-Thr-NH₂ que té interès en estudis que estem duent a terme al nostre laboratori sobre els mecanismes de N-glicosilació.

4.1. Síntesi del tripeptid H-Asn-(N-Me)Ala-Thr-NH₂

Per sintetitzar el tripeptid H-Asn-(N-Me)Ala-Thr-NH₂ ha estat seguit el procediment general de síntesi de pèptids en fase sòlida. El suport sòlid emprat ha estat la resina benzhidrilamina (II). Hem utilitzat el grup *tert*-butoxicarbonil (Boc) com a protector de la funció α -amino i el grup benzil, làbil al fluorur d'hidrogen, per a protegir la cadena lateral de la treonina. La cadena lateral de l'asparagina no ha estat protegida. El trencament de l'enllaç pèptid-resina ha estat obtingut amb fluorur d'hidrogen, i el pèptid ha estat obtingut en forma de carboxamida C-terminal.

L'esquema general de la síntesi queda, així, de la manera següent:



Hom ha emprat una resina benzhidrilamina obtinguda per benzoilació del Pst. i reducció aminativa de Leuckart, de funcionalització 0,86 mmol NH_2 /g resina. L'acoblament de cada aminoàcid fou dut a terme en tres passos: 1) desprotecció de la funció α -amino en què volem ancorar el nou aminoàcid; 2) neutralització de la mateixa funció, i 3) acoblament del nou aminoàcid emprant un agent activador.

Les etapes de desprotecció són dutes a terme amb àcid trifluoroacètic al 30% en clorur de metilè, durant mitja hora. La neutralització és feta amb etildiisopropilamina al 5% en clorur de metilè. Per a acoblar el primer aminoàcid hom empra el mateix tractament amb base sobre la resina benzhidrilamina, car normalment és emmagatzemat en forma de clorhidrat; hom duu a terme l'acoblament pròpiament dit seguint els mètodes convencionals, en dues etapes de dues hores, emprant en cada una 2,5 vegades d'excés de Boc-Thr(Bzl)-OH i diciclohexilcarbodiimida que fa d'agent activador. Per a comprovar que la incorporació ha estat completa, hom empra l'assaig quantitatiu de la nihidrina per a detectar amines primàries.⁵⁴ El resultat és negatiu i indicant que el grau d'acoblament és superior al 99,6%.

La incorporació del segon aminoàcid ha estat duta a terme pel mateix procediment, després de les corresponents etapes de despro-

tecció i neutralització. En aquest cas, la disponibilitat de Boc-(N-Me)Ala-OH tan sols ha permès d'emprar 1,5 vegades d'excés en la segona etapa d'acoblament. L'assaig quantitatiu de la ninhidrina demostra que l'extensió de l'acoblament ha estat satisfactòria.

Per a introduir el tercer aminoàcid, ha calgut variar l'estratègia sintètica. D'una banda, hi ha problemes estèrics per a acoblar aminoàcids sobre (N-metil)peptidilresines; de l'altra, s'agreuja el problema en haver d'emprar Boc-Asn-OH en forma d'ester actiu (de 4-nitrofenol o de benzotriazole), menys reactiu que l'aminoàcid activat per DCCI (aquest tipus de dificultats han estat descrites anteriorment per altres autors.^{47, 48} La utilització de DCCI com a activador facilita diverses reaccions secundàries de la Boc-Asn-OH que es poden produir abans de l'acoblament. La principal d'aquestes reaccions és la formació de nitril (a la cadena lateral de l'asparagina) que reverteix a amida quan es trenca l'enllaç peptid-resina amb HF; tanmateix, cal evitar la formació d'altres productes secundaris com la β -aspartamidino-N-metilpeptidilresina.⁴⁹

Hom ha emprat un dels mètodes descrits per S. Mojsov *et al.* en un treball recent on són estudiades les condicions òptimes per a acoblar l'asparagina.⁴⁹ Després de les etapes de desprotecció i neutralització, de la manera convencional, hom ha dut a terme una primera etapa d'acoblament emprant 4 vegades d'excés de Boc-Asn-OH, DCCI i 1-hidroxibenzotriazole, de dues hores de durada. L'assaig del cloranil per a detectar amines secundàries⁵⁰ demostra que l'acoblament ha estat incomplet. Això mateix deduïm de l'espectre de RMN de ^{13}C (apartat 4.2) que indica, a més, la formació d'una quantitat considerable de nitril a la cadena lateral de l'asparagina. Després d'una segona etapa d'acoblament de 14 hores de durada, en les mateixes condicions que la primera, l'assaig del cloranil dona una coloració molt dèbil que sembla indicar que estem en els límits de detecció del mètode (2-5 μmol amina/g resina). L'espectre de RMN de ^{13}C en fase gel demostra que ha augmentat la incorporació de Boc-Asn-OH, i no s'hi observen senyals de dipeptidilresina sense reaccionar.

Hom ha dut a terme una tercera etapa d'acoblament de 14 hores de durada, en les mateixes condicions, per tal d'intentar de completar la incorporació del tercer aminoàcid. El resultat de l'assaig del cloranil és negatiu i l'espectre de RMN de ^{13}C en fase gel indica una petita incorporació addicional, si bé l'intent de quantificar-lo pot ésser dubtós.

Al final d'aquestes tres etapes d'acoblament, la quantitat de nitril a la cadena lateral de l'asparagina és superior a la de carboxamida, però no s'hi detecten altres productes secundaris indesitjables. Una absorció molt dèbil a l'IR a 2.250 cm^{-1} presta suport a l'existència de grups nitril a la resina. La formació important de nitril no està d'acord amb els resultats obtinguts per Mojsov *et al.* per a l'acoblament de Boc-Asn-OH

sobre amines primàries terminals;⁴⁹ cal atribuir-la a la menor reactivitat de les amines secundàries quant a l'acoblament d'un aminoàcid, que facilita la competència de reaccions secundàries prèvies a l'acoblament.

Per tal de facilitar la separació, posterior al trencament de l'enllaç pèptid-resina) de la dipeptidil resina que pugui restar, hom duu a terme una acetilació abans d'eliminar el Boc de la Boc-tripeptidilresina. Per a acetilar cal fer un tractament amb gran excés d'anhidrid acètic (5 vegades respecte a la funcionalització total). Posteriorment hom desprotegeix el grup -amino terminal amb TFA al 30% en clorur de metilè. El trencament de l'enllaç pèptid-resina és dut a terme amb HF anhidre durant una hora en presència d'anisole. L'HF lliura la cadena lateral de la treonina, i l'anisole evita les reaccions secundàries que es poden produir a causa dels cations benzil lliurats. A partir d'1,2 g de peptidil-resina hom obté ca. 120 mg de pèptid cru. Després d'una extracció amb èter anhidre (per a eliminar l'anisole), el cru és solubilitzat amb àcid acètic i aigua i hom procedeix a liofilitzar. En l'actualitat hom està realitzant la purificació del tripèptid per cromatografia d'exclusió molecular sobre una columna reblerta amb poliacrilamida (BIO-GEL P2), seguida d'una cromatografia de bescanvi catiònic sobre carboximetilcelulosa (CM-52). El tripèptid ha estat caracteritzat per Ressonància Magnètica Nuclear de ^1H d'alt camp, però hom no disposa de cap quantificació del producte pur.

4.2. Espectre de RMN de ^{13}C dels productes intermedis de la síntesi del tripèptid H-Asn(N-Me)Ala-Thr-NH₂

Ham estat registrats espectres de RMN de ^{13}C després de cada acoblament i cada etapa de desprotecció per tal de seguir la síntesi del tripèptid H-Asn(N-Me)Ala-Thr-NH₂ (fig. 16). Per a assignar els espectres, hom ha utilitzat en alguns casos taules de desplaçaments químics esperats per a determinades subestructures.⁵³ Les característiques generals dels espectres són les esperades: els senyals més aguts són els que corresponen als carbonis més allunyats de la trama polimèrica, i hi ha un eixamplament dels senyals de la cadena peptídica segons va avançant la síntesi. De fet, aquesta situació ens és favorable perquè les diferents reaccions de la síntesi tenen lloc a la part final de la cadena peptídica. Com és típic, hom ha emprat millora de sensibilitat (LB = 4 ó 5) per a confirmar o descartar senyals que es confonguin amb el soroll de fons. Podem comprovar que les reaccions de desprotecció poden ésser verificades perfectament per RMN de ^{13}C en fase gel gràcies als senyals dels metils del Boc (^{13}C -20). Hi ha una tendència general en els desplaçaments químics dels carbonis dels aminoàcids, que és un moviment cap a camps alts que hom enllaça

una estructura als grups α -amino (e.g. un aminoàcid) i un correntment invers a camps baixos quan hom elimina una d'aquestes estructures (e.g. Boc). Aquest efecte és degut probablement a efectes estèrics, car és molt més accentuat a la (N-Me) alanina en la qual la funció α -amino és secundària.

A la figura 16 c observem que el senyal corresponent al ^{13}C -11 és més ample que hom no podria esperar. Això és probablement ocasionat per la isomeria Z-E deguda a la rigidesa de l'enllaç amida (com passa en realitat a la Boc-(N-Me)Ala-OH; quan s'elimina el grup Bloc els senyals corresponents als ^{13}C -11 i 13 es tornen més aguts (fig. 16 d)).

Després del primer acoblament d'asparagina, l'espectre de RMN de ^{13}C en fase gel demostra que l'acoblament ha estat incomplet, car apareixen senyals de dipeptidilresina i Boc-tripeptidilresina. Després de la segona etapa d'acoblament, hom no observa cap senyal de dipeptidilresina a l'espectre de RMN de ^{13}C (fig. 16 e)). Dos senyals, a 117,0 i 21,4 ppm, indiquen la formació d'una gran quantitat de grups nitril (més del 50%) a la cadena lateral de l'asparagina. Sembla que aquest fet i la possibilitat d'isomeria deguda a l'enllaç peptídic format, originen la complexitat i poca sensibilitat de l'espectre.

Després de la tercera etapa d'acoblament, el senyal del Boc (^{13}C -20) és lleugerament més intens que després de la segona etapa, la qual cosa sembla indicar que hi ha hagut una petita incorporació addicional d'aminoàcid. Després d'acetilar, han estat fets tres espectres de RMN de ^{13}C en fase gel variant la temperatura (a 22°C, 55°C i 90°C) en d_6 -DMSO/dioxà (1:4), per tal d'intentar d'interpretar l'espectre de la Boc-tripeptidilresina. El senyal del Boc (^{13}C -20) apareix sempre com un doblet, cosa que pot ésser degut a la presència de dos grups diferents (CONH_2 i CN) a la cadena lateral de l'asparagina. No obstant això, els senyals corresponents als ^{13}C -14 i 15 no es resolen com a doblets, i això és difícilment explicable pel fet que aquests senyals siguin més amples. A la fig. 16 f podem observar que l'augment de temperatura simplifica considerablement l'espectre, però això no és degut únicament a un estrenyiment dels senyals. El senyal corresponent al ^{13}C -15 apareix en d_6 -DMSO-dioxà (1:4) a 22°C dividit en un senyal ample i poc intens i un altre de més agut, que s'acosten a 55°C i ja han arribat a la coalescència a 90°C. També és remarcable l'estrany aspecte del senyal del ^{13}C -3 a l'espectre de la fig. 16 e comparat amb l'espectre de la fig. 16 f. Aquests i altres detalls fan pensar que hi ha un factor addicional que complica l'espectre; sembla que les interaccions entre les zones polars de la cadena peptídica afavoreixin unes determinades conformacions i que hi ha equilibris lents entre elles. A part aquesta complexitat espectral, podem afirmar que hom no hi detecta senyals de β -aspartamides.

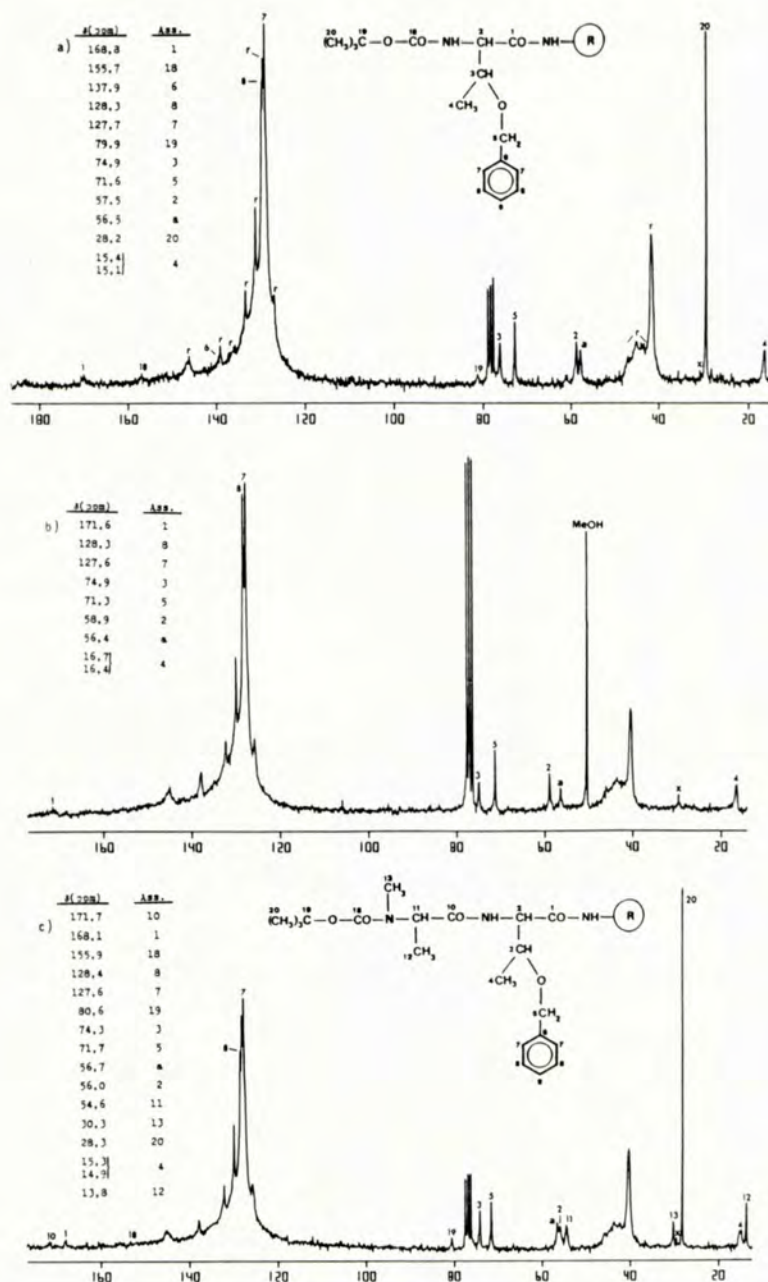
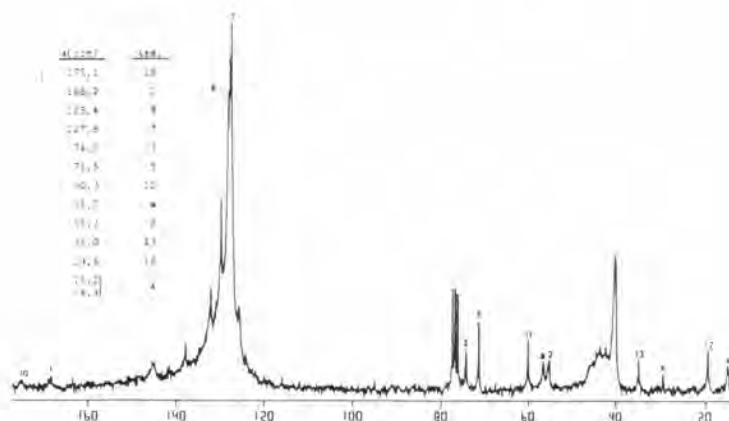
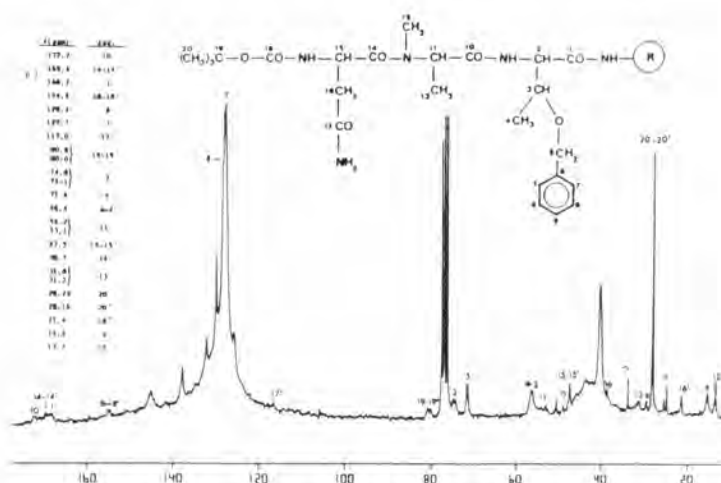


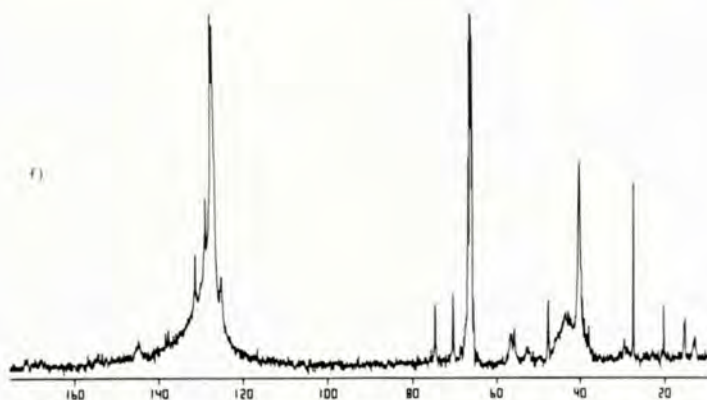
Fig. 16. Espectres de RMN de ^{13}C en fase gel dels intermedis de la síntesi del tripeptid H-Asn(N-Me)Ala-Thr-NH₂. AT = 0,7 s LB = 1. a) Boc-Thr(Bzl)-resina PW = 12,0 μs NT = 10.000. b) H-Thr(Bzl)-resina PW = 6,0 μs NT = 56.200. c) Boc-(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina PW = 12,0 μs NT = 10.000.



d) H-(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina PW = 12,0 μ s 12,0 μ s NT = 10.000.



e) Boc-Asn(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina després de la segona etapa d'acoblament de l'asparagina. Els senyals marcats amb número' corresponen a la formació de nitril a la cadena lateral de l'asparagina. Els senyals marcats amb ? corresponen a molècules petites que no han estat eliminades en rentar la resina. PW = 6,0 μ s NT = 169.685. Tots aquests espectres són a temperatura ambient en CDCl_3 .



f) Boc-Asn-(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina després de l'acetilació. PW = 12,0 μ s
NT = 13.000. En d_6 -DMSO/dioxà (1:4) a 90°C.

Desplaçaments químics determinats per a la Boc-Thr(Bzl)-OH en $CDCl_3$ (δ (ppm)-Ass.): 176, 1-1; 156, 2-18; 137, 5-6; 128, 3-8; 127, 8-9; 127, 7-7; 80, 2-19; 74, 3-3; 71, 1-5; 58, 0-2; 28, 2-20; 16, 1-4. Boc-(N-Me)Ala-OH en $CDCl_3$ (δ (ppm)-Ass.): 177, 9-10; 177, 8-10; 156, 2-18; 155, 4-18; 80, 6-19; 80, 5-19; 55, 0-11; 53, 5-11; 31, 2-13; 30, 6-13; 28, 3-20; 15, 0-12; 14, 6-12. Boc-Asn-OH en $CDCl_3/d_6$ -DMSO (1:1) (δ (ppm)-Ass.): 174, 1-17; 173, 9-14; 156, 5-18; 80, 2-19; 50, 5-15; 37, 2-16; 28, 2-20.

L'amplada de banda del senyal del Boc (^{13}C -20) als espectres de les figs: 16 a, c i e és 8,6 Hz, 5,3 Hz i 5 Hz (estimació), respectivament. Això indica que, probablement, la relaxació transversal comença a estar dominada per les inhomogeneïtats dels camps per als ^{13}C -20 en la Boc-tripeptidilresina. Comparant la intensitat del senyal dels ^{13}C -20 a un espectre registrat amb pulsacions de 90° amb un altre obtingut amb pulsacions de 45°; podem concloure que hi ha alguns problemes de relaxació longitudinal (saturació) en les primeres condicions (i AT = 0,7 s) en la Boc-dipeptidilresina, que són evidents en la Boc-tripeptidilresina a 90°C (compareu els espectres de les figs. 6 e) i f)). Per a altres nuclis no sembla que hi hagi problemes de relaxació longitudinal en augmentar la temperatura. A l'apartat 4.4 insistirem sobre aquesta qüestió.

4.3. Seguiment de la desprotecció de la funció α -amino de l'asparagina

El grup protector més emprat en síntesi de pèptids en fase sòlida, és el Boc. Per a alliberar les amines protegides per aquest grup, hom acostuma a fer un tractament de 30 minuts amb àcid trifluoroacètic al 30% en clorur de metilè i, habitualment, hom no comprova que la desprotecció hagi estat completa; d'altra banda, no hi ha gaires dades de la

cinètica del procés de desprotecció. Hem vist que la RMN de ^{13}C és un bon mètode per a detectar la presència de grups Boc, car el senyal corresponent als tres metils magnèticament equivalents acostuma a ésser prou intens i agut. Hem cregut interessant, per tant, de seguir la reacció de desprotecció per RMN de ^{13}C en fase gel.

Hom ha dut a terme, d'una banda, la desprotecció de la major part de la Boc-tripeptidilresina de la manera convencional. L'espectre de la tripeptidilresina resultant presenta la mateixa complexitat que el de la BOc-tripeptidilresina, però hom pot comprovar que l'eliminació del Boc ha estat total. D'altra banda, ha estat dut a terme, sobre la resta de la Boc-tripeptidilresina, un primer tractament de 2 minuts amb TFA al 30% en CH_2Cl_2 . Per RMN de ^{13}C observem que resta un 64% de grups Boc sense eliminar. Després d'un tractament de 5 minuts resta el 28% dels grups Boc inicials. Finalment, observem que després de dos tractaments addicionals de 2 i 10 minuts encara resta un 7% de grups Boc sense eliminar. L'experiment és concloent respecte a la importància de prolongar el tractament amb TFA per un temps d'almenys 30 minuts per tal de desprotegir totalment la funció α -amino de l'asparagina. Si bé cal anar amb precaució a l'hora d'extrapolar resultats, queda clar que, en general, tractaments més curts tenen el risc que la desprotecció sigui parcial.

4.4. Mesura dels temps de relaxació longitudinal de la Boc-Asn-(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina

Per tal de tenir una idea de la distribució de mobilitats de la cadena peptídica al gel, hom ha dut a terme un mesurament de T_1 per la Boc-Tripeptidil-resina (taula VI a)). A fi de poder comparar aquests valors de T_1 amb els d'una molècula comparable en solució, han estat mesurats els T_1 d'una dissolució concentrada de Boc-(Bzl)Thr-OH en CDCl_3 (taula VI b)). Algunes dades per a la Boc-tripeptidil-resina tan sols són orientatives, car la poca intensitat dels senyals corresponents i llur encavalcament impedeix de poder fer mesures més acurades.

Com ja hom podia esperar, els carbonis metílics són els més mòbils de la molècula. En canvi, no hi ha una gradació clara de T_1 des dels carbonis de la treonina fins als carbonis de l'asparagina, potser perquè les interaccions entre les zones polars de la cadena peptídica li donen una estructura replegada i una mica rígida; de fet, l'inflament de la resina al dissolvent és bastant pobre. No obstant això, els metils del Boc estan sens dubte ben solvatats pel dissolvent, i veiem que no hi ha gaire diferència entre llur T_1 i el dels metils del Boc de la Boc-Thr(Bzl)-OH en solució de CDCl_3 . Això dona una verificació directa del fet que

la solvatació en aquests gels en què es realitzen les síntesis de pèptids en fase sòlida, pot ésser quasi tan eficient com la solvatació en dissolució. Així, és lògic que el treball amb aquests suports insolubles no impliqui una davallada molt important en les velocitats de reacció. Veiem, a més, que la informació que ens dona la RMN de ^{13}C en fase gel en relació amb la síntesi de pèptids en fase sòlida és molt directa en el sentit que ambdues són dutes a terme en condicions perfectament comparables.

TAULA VI

Mesurament de T_1 a 50,3 MHz a) Boc-Asn-(N-Me)Ala-Thr(Bzl)-resina en CDCl_3 . També es donen els valors de NT_1 . Els senyals del suport polimèric son indicats amb una r i el número que correspon a la numeració donada a les figures 1 i 7. LB = 3. b) Boc-Thr(Bzl)-OH en CDCl_3 (1 g/2,5 cc) LB = 1

a)	Nucli	T_1 (s)	NT_1 (s)	b)	Nucli	T_1 (s)
	2-a	$0,19 \pm 0,05$	0,19		1	$3,08 \pm 0,04$
	3	$0,09 \pm 0,03$	0,09		2	$0,312 \pm 0,004$
	4	$0,26 \pm 0,03$	0,78		3	$0,303 \pm 0,005$
	5	$0,25 \pm 0,05$	0,48		4	$0,551 \pm 0,007$
	7	$0,28 \pm 0,03$	0,28		5	$0,548 \pm 0,007$
	8	$0,29 \pm 0,03$	0,29		6	$8,8 \pm 0,7$
	11	$0,3 \pm 0,1$	0,3		7	$1,36 \pm 0,06$
	12	$0,34 \pm 0,06$	1,02		9	
	13	$0,7 \pm 0,3$	2,1		8	$1,562 \pm 0,005$
	15-15'	$0,21 \pm 0,02$	0,21		18	$5,1 \pm 0,1$
	16	$0,07 \pm 0,03$	0,14		19	$5,4 \pm 0,2$
	16'	$0,25 \pm 0,05$	0,50		20	$0,699 \pm 0,002$
	20-20'	$0,52 \pm 0,02$	1,56			
	r1	$0,05/0,07 \pm 0,05$	0,10/0,14			
	r2	$0,130 \pm 0,004$	0,130			
	r3	$0,84 \pm 0,08$				
	r6	$0,14 \pm 0,01$	0,14			
	r14	$1,3 \pm 0,1$				
	r15	$0,29 \pm 0,02$	0,29			
	r16	$0,27 \pm 0,03$	0,27			
	r17	$0,22 \pm 0,01$	0,22			

5. METODOLOGIA GENERAL

5.1. Instrumentació

Els espectres de RMN han estat enregistrats en un instrument VARIAN XL-200 (200,6 MHz per a ^1H i 50,31 MHz per a ^{13}C) en la modalitat d'impulsos i transformada de Fourier i amb quadratura de fase. Els espectres IR han estat obtinguts en aparells PERKIN-ELMER 457 i PERKIN-ELMER 681. Els espectres UV han estat enregistrats en un espectròmetre PERKIN-ELMER 124. Per a sonicar, hom ha emprat un aparell ULTRASONS P-SELECTA. Les mesures de pH han estat fetes en un instrument RADIO-METER model PHM-51. La reacció amb HF ha estat duta a terme en una instal·lació de Teflon i Kel-F de la casa Toho-Kaesi (Tòquio, Japó). Hom ha liofilitzat en un sistema Afora-Edwards.

5.2. Preparació de les mostres per a registrar espectres de RMN de ^{13}C

Hom pesa 300 mg de mostra seca dins el tub de RMN (de 10 mm de diàmetre), i hi afegeix una quantitat suficient de dissolvent (2-4 cc) per a inflar la mostra; cal agitar-lo tres minuts amb un agitador GRICEL model 30 i deixar-lo reposar 30 minuts (temps en què l'alçada del dissolvent en excés, que queda a sobre o a sota del gel, s'ha estabilitzat; per a mostres amb problemes d'inflament cal deixar més estona d'equilibració). Si hi ha massa excés de dissolvent, cal eliminar-lo amb una pipeta "Pasteur". Si la mostra no queda ben homogènia, hom la sotmet durant 30 minuts a l'acció d'ultrasons. Poden aparèixer cúmuls de polímer més reticulat o bombolles d'aire que hom pot fer pujar a la superfície amb una mica més d'agitació per tal d'evitar que afectin l'espectre. Els ultrasons contribueixen també a desgasar la mostra.

5.3. Adquisició dels espectres de RMN de ^{13}C

La seqüència de pulsacions utilitzada per a registrar tots els espectres consta dels següents intervals de temps a determinar: D_1 , P_1 , D_2 , PW i AT en ordre dins un cicle que es repeteix NT vegades. Generalment, D_1 , P_1 i D_2 són 0. El FID és recollit en l'espai de temps AT. L'oscil·lador és en funcionament durant els espais de temps P_1 i PW.

Per a donar una pulsació de 90° cal que PW sigui $12,5 \mu\text{s}$. En general, hom utilitza desacoblament de banda ample sobre tots els nuclis de ^1H en tota la seqüència. Les condicions particulars de cada espectre són indicades a la part teòrica. L'amplada d'espectre és de $11.001,1 \text{ Hz}$. L'aparell empra el senyal de deuteri del dissolvent com a *lock* de freqüència. En general, hom empra com a referència interna el senyal de RMN de ^{13}C del dissolvent.

Hom pot obtenir alternativament diversos espectres on tan sols variï un paràmetre; això vol dir que hom pot fer un cert nombre d'acumulacions (BS) d'un dels espectres, després el mateix nombre d'acumulacions d'un altre i així rotativament fins a acabar cada un d'ells. També hom pot treballar amb dos i tres paràmetres variables.

La integració dona un valor absolut de l'àrea dels senyals observats i pot ésser emprada per a fer mesures quantitatives aproximades sense utilitzar referència interna.

5.4. Mesura de la relació senyal/soroll als espectres de RMN de ^{13}C

El paràmetre més característic de la sensibilitat d'un espectre és la relació senyal/soroll (S:N). Per a un senyal donat, la relació S:N és definida com $S:N = 2,5 I_s/I_n$ on I_s és la intensitat del senyal i I_n és la intensitat màxima del soroll de fons en una zona suficientment representativa i ample de l'espectre (uns 1.500 Hz). La mesura pot ésser feta manualment o electrònica. Les dades electròniques (que dona l'aparell) acostumen a ésser menys fiables per la dificultat de determinar una línia de base correcta. En el tipus d'espectres que obtenim, això és especialment greu i cal fer sempre la mesura manual.

5.5. Assaigs analítics

Determinació del contingut en amines lliures d'un polímer. Assaig de Gisin.²³

Hom pesa $15\text{--}25 \text{ mg}$ de resina seca a pes constant en una xeringa de polipropilè de 10 ml proveïda d'una placa filtrant de polietilè porós, i hom duu a terme els rentats següents: 1. $2 \times 2 \text{ min CH}_2\text{Cl}_2$. 2. $1 \times 2 \text{ min TFA/CH}_2\text{Cl}_2 \text{ } 30\%$. 3. $1 \times 30 \text{ min TFA/CH}_2\text{Cl}_2 \text{ } 30\%$. 4. $4 \times 2 \text{ min CH}_2\text{Cl}_2$. 5. $4 \times 3 \text{ min DIEA/CH}_2\text{Cl}_2 \text{ } 5\%$. 6. $4 \times 2 \text{ min CH}_2\text{Cl}_2$. 7. — Acid pícric en CH_2Cl_2 ($0,01 \text{ M}$). 8. $6/8 \times 2 \text{ min CH}_2\text{Cl}_2$. 9. $3/4 \times 3 \text{ min DIEA/CH}_2\text{Cl}_2 \text{ } 5\%$. 10. $4 \times 2 \text{ min CH}_2\text{Cl}_2$. Les etapes 1 a 3 tan sols són emprades per a valorar amines protegides amb

el grup Boc i no formen part pròpiament de l'assaig de Gisin. Els rentats de les etapes 9 i 10, que contenen el picrat desplaçat, són recollits amb un matràs aforat i enrasats amb etanol. De l'absorbància a l'UV a 358 nm ($\epsilon = 14.500$) de la solució obtinguda, en dedueim la quantitat d'amines a la resina. En aforar, cal que el volum dels rentats recollits sigui el menor possible perquè la mesura sigui més exacta, però el volum dels rentats recollits no pot ésser més gran del 20% del volum total perquè la ϵ_{358} considerada sigui correcta.

Avaluació de l'extensió dels acoblaments sobre amines primàries. Assaig quantitatiu de la ninhidrina.⁵⁴

L'assaig ha estat emprat com a mètode qualitatiu. Hom hi utilitza dos reactius: A. D'una banda, hom dissol 40 g de fenol (reactiu) en 10 cc d'etanol absolut (cal escalfar-lo). D'una altra banda, hom prepara una solució de 65 mg de cianur potàssic en 100 cc d'aigua; hom dissol 2 cc de la darrera solució en 100 cc de piridina (acabada de destil·lar sobre ninhidrina). Hom agita ambdues solucions amb 4 g de resina Amberlita MB-3 durant 45 minuts i les filtra (per separat). Hom barreja les dues solucions obtingudes. B. Dissolució de 2,5 g de ninhidrina en 50 cc d'etanol absolut; cal desar-la sota N_2 i a les fosques.

Una petita quantitat de resina (2-5 mg) és rentada diverses vegades amb EtOH/AcOH (1:1) i EtOH en un tub de mostra, bo i centrifugant cada vegada per tal d'eliminar el sobrenedant. Hom hi afegeix 10 gotes (uns 100 μl) del reactiu A i tres gotes (uns 25 μl) del reactiu B, i ho escalfa a 100°C durant 10 minuts a l'estufa. Coloració blava a la resina o la solució sobrenedant indica presència d'amines primàries. L'assaig arriba a detectar quantitats de 0,3 μmol amina/g resina.

Avaluació de l'extensió dels acoblaments sobre amines secundàries. Assaig del clorantil.⁵⁰

Hom prepara una dissolució saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranil) en toluè (aprox. 0,75 g de cloranil en 25 cc de toluè), disposa una mostra d'aproximadament 1 mg de resina en un tub de mostra i hi afegeix 20 gotes (uns 200 μl) d'acetona i 5 gotes (uns 50 μl) de la solució anterior; cal agitar el tub durant 5 minuts a temperatura ambient. La presència de quantitats superiors a 2-5 mol amina/g resina dona coloració blava o verda.

6.1. Trencament de l'enllaç pèptid-resina amb HF

El trencament de l'enllaç pèptid-resina amb HF és dut a terme en una instal·lació de tefló i Kel-F que consta bàsicament d'un vas de reserva i dos vasos de reacció comunicables. Hom col·loca 1,2 mg de resina en un vas de reacció juntament amb 4 ml d'anisole. Cal reduir la pressió de tot el sistema a 20 torr, aïllar el vas de reserva de la resta del sistema i condensar-hi 45 ml d'HF; per aconseguir-ho cal submergir el vas de reserva en un bany de CO₂-acetona a - 78°C. A continuació hom passa en comunicació el vas de reserva i el de reacció i destil·la l'HF amb agitació magnètica, i ho escalfa amb un secador de cabell; l'HF és col·lectat en el vas de reacció, immersit en un bany de CO₂-acetona a - 78°C. Destil·lat l'HF en el vas de reacció on tenim la resina, cal mantenir-lo durant una hora amb agitació magnètica i a 0°C (mitjançant un bany de gel). A continuació, hom atura la reacció submergint el vas de reacció també en un bany de CO₂-acetona, i elimina l'HF amb ajuda del buit. El contingut del vas de reacció és filtrat sobre una xeringa de 50 ml amb ajuda d'uns 100 ml d'èter, que elimina l'anisole. Cal dissoldre el pèptid amb àcid acètic i aigua i liofilitzar-lo. Hom n'obté 120 mg de cru.

7. CONCLUSIONS

1. Han estat optimitzades les condicions experimentals per a registrar espectres de RMN de ¹³C (¹H) en fase gel del copoli (estirè-1%-divinilbenzè) (Pst.). Hom ha trobat que es poden emprar seqüències d'adquisició dels espectres més ràpides que les habituals en RMN de ¹³C en solució, podent-se obtenir espectres satisfactoris en temps raonables. Hom ha vist que la manipulació matemàtica del FID per a millorar la resolució i la sensibilitat és especialment útil per a treure informació dels espectres de RMN de ¹³C en fase gel. També ajuda a treure informació el registre d'espectres a temperatures elevades.

2. Han estat analitzats per RMN de ¹³C en fase gel diversos suports polimèrics emprats en síntesi de pèptids: clorometil-Pst., α-aminobenzil-Pst., 4-hidroximetilfenoximetil-Pst., α-(4-bromometil-3-nitrobenzamido) benzil-Pst. i α-[4-(clorometil) fenilacetamido] benzil-Pst. Ha estat comprovada la utilitat d'aquesta tècnica per a llur caracterització, avaluació del grau de puresa i determinació del grau de funcionalització.

3. Ha estat controlada per RMN de ¹³C en fase gel la síntesi del tripèptid H-Asn-(N-Me)Ala-Thr-NH₂ sobre el suport polimèric α-amino-

benzil-Pst. Aquests experiments han permès la caracterització dels productes intermedis de la síntesi i han palesat la utilitat de la tècnica esmentada com a eina analítica auxiliar en síntesi de pèptids en fase sòlida, al menys per a cadenes peptídiques de petita longitud.

4. De les mesures de temps de relaxació efectuades en aquest estudi, deduïm que, en les condicions experimentals emprades per nosaltres, l'ancoratge sobre el suport polimèric insoluble no provoca una disminució espectacular de la mobilitat de la cadena peptídica. Aquesta conclusió probablement pugui fer-se extensiva a altres processos de síntesis orgànica sobre suport polimèric insoluble.

ABREVIATURES

FID	Senyal de precessió lliure
LB-SE	Augment de sensibilitat
RE	Augment de resolució
AF	Funció d'apodització
CD	Diferència de convolució
CCD	Coefficient de diferència de convolució
NT	Nombre d'acumulacions
AT	Temps d'adquisició
PW	Durada de la pulsació
Pst.	Copoli (estirè-1%-divinilbenzè)
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
DCCI	Diciclohexilcarbodiimida
TFA	Àcid trifluoroacètic
EDIA	Etildiisopropilamina
HOBt	l-hidroxibenzotriazole
DMF	Dimetilformamida
TMS	Tetrametilsilà
DMSO	Dimetilsulfòxid
4-HMP	4-hidroximetilfenol

BIBLIOGRAFIA

1. B. P. MIKNIS, V. J. BATURSKA, G. E. MACIEL; International Laboratory, 9-23 (1981).
2. H. STERNLICHT, G. L. KENYON, E. L. PACKER, J. SINCLAIR; J. Am. Chem. Soc., 93, 199 (1971).
3. J. SCHAEFER; Macromolecules, 4, 110 (1971).
4. K. YOKOTA, A. ABE, S. HOSOKA, I. SAKAI, H. SAITO; Macromolecules, 11, 95 (1978).

5. D. DOSKOČILOVA, B. SCHNEIDER, J. JAKES; *J. Mag. Res.*, **29**, 79 (1978).
6. W. T. FORD, T. BALAKRISHNAN; *Macromolecules*, **14**, 284 (1981).
7. P. STILBS, M. E. MOSELEY; *Polymer*, **22** (3), 321 (1981).
8. D. LIVE, S. B. H. KENT; Comunicació privada.
9. D. LEIBFRITZ, W. MAYR, R. OEKNOMOPULOS, G. JUNG; *Tetrahedron*, **34**, 2.045 (1978).
10. J. H. HODGKIN, R. I. WILLING, R. EIBL; *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **19**, 1.239 (1981).
11. W. T. FORD, S. A. YACOB; *J. Org. Chem.*, **46** (4), 819 (1981).
12. S. L. MANATT, D. HOROWITZ, R. HOROWITZ, R. P. PINNELL; *Anal. Chem.*, **52**, 1.529 (1980).
13. S. L. MANATT, C. F. AMSDEN, C. A. BETTISON, W. T. FRAZER, J. T. GUDMAN, B. E. LENK, J. F. LUBETICH, E. A. MCNELLY, S. C. SMITH, D. J. TEMPLETON, R. P. PINNELL; *Tetrahedron Letters*, **21**, 1397 (1980).
14. R. EPTON, P. GODDARD, K. J. IVIN; *Polymer*, **21**, 1.367 (1980).
15. S. SUPARNO, J. LACOSTE, S. RAYNAL, J. F. REGNIER, F. SCHUE, R. SEMPERE, J. SLEDZ; *Analisis*, **9** (4), 155 (1981).
16. L. F. JOHSON, F. HEATLEY, F. A. BOVEY; *Macromolecules*, **3**, 175 (1970).
17. Y. INOUE, A. NISHIOKA, R. CHUJO; *Makromol. Chem.*, **156**, 207 (1972).
18. K. MATSUZAKI, T. URYU, T. SEKI, K. OSADA, T. KAWAMURA; *Makromol. Chem.*, **176**, 3.051 (1975).
19. F. W. WEHRLY; VARIAN Application Note.
20. R. FREEMAN, H. D. W. HILL; *J. Chem. Phys.*, **54** (8), 3.367 (1971).
21. R. R. ERNST, W. A. ANDERSON; *Rev. Sci. Instr.*, **37** (1), 93 (1966).
22. B. F. GISIN; *Helv. Chim. Acta*, **56**, 1476 (1973).
23. B. F. GISIN; *Anal. Chim. Acta*, **58**, 248 (1972).
24. E. GIRALT, F. ALBERICIO; *An. Quim.*, **77**, 134 (1981).
25. P. RIVAILLE, A. ROBINSON, M. KAMEN, G. MILHAND; *Helv. Chim. Acta*, **54**, 296 (1971).
26. R. C. ORLOWSKI, R. WALTER, D. WINKLER; *J. Org. Chem.*, **41**, 3701 (1976).
27. P. G. PIETTA, P. F. CAVALLO, K. TAKAMASHI, G. R. MARSHALL; *J. Org. Chem.*, **39**, 44 (1974).
28. R. B. MERRIFIELD; *Biochemistry*, **3**, 1.385 (1964).
29. S. H. GRAHAM, A. J. S. WILLIAMS; *Tetrahedron*, **21**, 3.263 (1965).
30. M. W. RERICK, C. H. TROTHIER, R. A. DARGNAULT, J. D. DEFOE; *Tetrahedron Letters*, 629 (1963).
31. A. E. PETRARCA, E. M. EMERY; *Tetrahedron Letters*, 635 (1963).
32. D. R. SMITH, M. MAIENTHALL, J. TIPTON; *J. Org. Chem.*, **17**, 294 (1952).
33. S. S. WANG; *J. Org. Chem.*, **40**, 1.235 (1975).
34. S. MOJSOV, R. B. MERRIFIELD; *Biochemistry*, **20**, 2.950 (1981).
35. C. D. CHANG, J. MEIENHOFER; *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **11**, 246 (1978).
36. E. ATHERTON, H. FOX, D. HORNISS, C. J. LOGAN, R. C. SHEPPARD, B. J. WILLIAMS; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 537 (1978).
37. J. P. TAM, R. D. DIMARCHI, R. S. MERRIFIELD; *Int. J. Peptides Prot. Res.*, **16**, 412 (1980).
38. G. LU, S. MOJSOV, J. P. TAM, R. B. MERRIFIELD; *J. Org. Chem.*, **46**, 3.433 (1981).

39. G. G. EBERHARDT, W. A. BATTE; *J. Org. Chem.*, **29**, 2.928 (1964).
40. J. M. VILA; Tesi de Llicenciatura, Univ. de Barcelona (1979).
41. D. C. EVANS, L. PHILLIPS, J. A. BARRIE, M. H. GEORGE; *J. Polym. Sci. Polymer Letter Edition*, **12**, 199 (1974).
42. A. J. CHALK; *J. Polym. Sci. B*, **6**, 649 (1968).
43. E. GIRALT, D. ANDREU, LL. RAFCAS; *Tetrahedron Letters*, **37**, 3.587 (1979).
44. E. GIRALT, D. ANDREU, F. ALBERICIO, E. PEDROSO; *Peptides*, **315** (1980).
45. E. GIRALT, D. ANDREU, M. PONS, E. PEDROSO; *Tetrahedron*, **37**, 2.007 (1981).
46. E. GIRALT, F. ALBERICIO, E. PEDROSO, C. GRANIER, J. VAN RIETSCHOTEN; *Tetrahedron*, **38**, 1.193 (1982).
47. C. GRANIER; Thèse pour obtenir le Grade de Docteur ès Sciences Physiques, Université de Provence (1981).
48. J. RIVIER, M. BROWN, C. RIVIER, N. LING, W. VAE; *Peptides* **76**, 427 (1976).
49. S. MOJISOV, A. R. MITCHELL, R. B. MERRIFIELD; *J. Org. Chem.*, **45**, 555 (1980).
50. T. CHRISTENSEN; *Acta Chem. Scand. B* **33**, 763 (1979).
51. J. R. LYERLA, Jr. & G. C. LEVY; "*Topics in Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*" (Ed. G. C. LEVY), Vol. 1, Chap. 3, Wiley-Interscience, Nova York (1974).
52. D. DODDRELL, V. GLUSHKO, A. ALLERHAND; *J. Chem. Phys.*, **56**, 3.683 (1972).
53. W. BREMSER, B. FRANKE, H. WAGNER; "*Chemical Shifts en Carbon-13 NMR Spectroscopy*", Verlag Chemie, (1982).
54. V. K. SARIN, S. B. H. KENT, J. P. TAM, R. B. MERRIFIELD; *Annal. Biochem.*, **117**, 147 (1981).
55. STEWART J. M., YOUNG J. D.; "*Solid Phase Peptide Synthesis*". W. H. Freeman W Co., San Francisco (1969).

Textos

- L-1 F. W. WEHRLI, T. WIRTHLIN; "*Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*", Heyden & Son Ltd. (1976).
- L-2 E. BREITMAIER, W. VOELTER; " *^{13}C -NMR Spectroscopy*", 2^a Ed., Verlag Chemie (1978).
- L-3 M. L. MARTIN, J. J. DELPUECH, G. J. MARTIN; "*Practical NMR Spectroscopy*", Heyden & Son (1980).
- L-4 E. FUKUSHIMA, S. B. W. ROEDER; "*Experimental Pulse NMR. A Nuts and Bolt Approach*", Addison-Wesley Publishing Company (1981).
- L-5 J. B. STOTHERS; "*Carbon-13 NMR Spectroscopy*", Academic Press (1972).
- L-6 F. A. BOVEY; "*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*", Academic Press (1969).