

Boc-*L*-甲基苯丙氨酸的合成与拆分

李晓晖^{1,2}, 王 贯¹, 李建勋¹, 修志龙¹, 西野宪和²

(1. 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024;

2. 日本九州工业大学生命科学与系统工程学院, 北九州 808-0196)

摘要 利用 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯和甲基苄溴为原料, 合成邻位、间位、对位甲基取代的 Boc-苯丙氨酸乙酯, 经枯草杆菌蛋白酶拆分得到对应的 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸. 通过红外光谱、核磁共振、质谱及旋光度分析对 3 种物质的结构进行了表征.

关键词 非天然氨基酸; Boc-*L*-甲基苯丙氨酸; 拆分

中图分类号 O629. 71

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)07-1363-04

随着多肽、蛋白质类药物研究的发展, 非天然氨基酸已经广泛地用于物质结构与功能研究方面, 因此, 非天然氨基酸的化学合成吸引着众多研究者的注意. 尽管有关非天然氨基酸的化学合成研究已有一些报道^[1~3], 但合成方法均存在产物难以分离、反应路线冗长及收率低等问题. 目前在非天然氨基酸合成中苯丙氨酸类似物的合成研究较多, 种类达 100 多种, 通常由 F, Cl, Br, I, NO₂ 及 CH₃ 等原子或基团以不同组合形式对苯环的邻位、间位、对位进行修饰^[4~7]. 合成方法常采用乙酰氨基丙二酸二乙酯路线^[8,9]、重氮化路线^[5,6]和手性合成路线^[10]等. 其中乙酰氨基丙二酸二乙酯路线是先合成混旋非天然氨基酸, 再利用酶法(如氨基酰化酶)进行 *L*-和 *D*-构型拆分, 得到不同光学异构体. 这些方法是比较成熟的工艺, 可以直接得到游离的氨基酸.

我们要合成的非天然氨基酸是 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸. 甲基苯丙氨酸作为苯丙氨酸的类似物, 在很多药物研究中起重要作用, 例如可用于合成抗高血压药物^[11]、合成脑啡肽类似物^[12]、内皮素受体拮抗剂以及荷尔蒙激素类似物^[13]等. Boc 保护策略是多肽合成过程中经常采取的氨基保护方法, 具有稳定性高、容易被酸性物质脱掉, 便于下一步反应等优点. 本研究利用 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯为原料^[14], 分别合成了邻位、间位、对位甲基取代的 Boc-甲基苯丙氨酸乙酯, 经枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)拆分后, 直接得到邻位、间位、对位甲基取代的 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸, 减少了多肽合成中氨基酸 *N*-端保护步骤. 同时, 以乙酰氨基丙二酸二乙酯为原料, 用氨基酰化酶(Acylase)拆分合成了 *L*-2-甲基苯丙氨酸, 进一步进行了 *N*-端的 Boc 保护. 两种方法的比较结果表明, Boc-2-氨基丙二酸二乙酯合成路线不仅简化了反应步骤, 直接得到 *N*-端 Boc 保护的氨基酸, 而且产物的收率也有较大提高.

1 实验部分

1.1 仪器与药品

美国 Agilent 1100 型反相高效液相色谱仪; 美国惠普公司 HP1100 LC/MSD 质谱仪; 美国 Varian 公司 Varian INOVA 40 ~ 400 MHz 型核磁共振仪; 日本 JASCO 公司 FT/IR-430 红外光谱仪; 日本 JASCO 公司 P-1010 旋光仪; 上海康华生化仪器厂 HD21C-A 紫外检测仪; 上海亚荣生化仪器厂 RE-52A 旋转蒸发仪.

甲基苄溴、枯草杆菌蛋白酶(8 Unit/mg solid)等购自 Sigma 公司; 氨基酰化酶(3.0×10^4 Unit/g)购自日本东京化成株式会社; 其它试剂均为分析纯以上纯度.

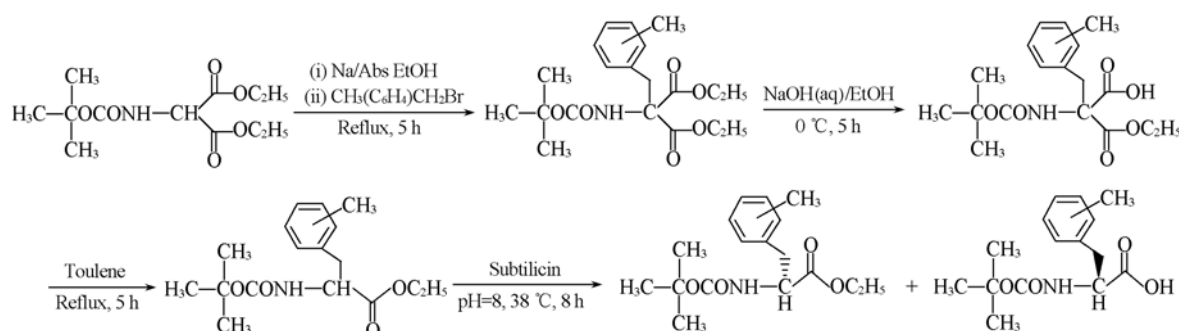
收稿日期: 2007-11-27.

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(批准号: 2005226008)资助.

联系人简介: 李晓晖, 女, 博士, 副教授, 主要从事多肽药物化学研究. E-mail: lxhxh@dlut.edu.cn

1.2 实验方法

Boc-*L*-甲基苯丙氨酸的合成以 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯和 3 种不同的甲基苄溴为原料, 合成路线见 Scheme 1.



Scheme 1 Synthetic routes of Boc-*L*-methylphenylalanine with diethyl Boc-2-aminomalonate and methyl benzylbromides as the starting materials

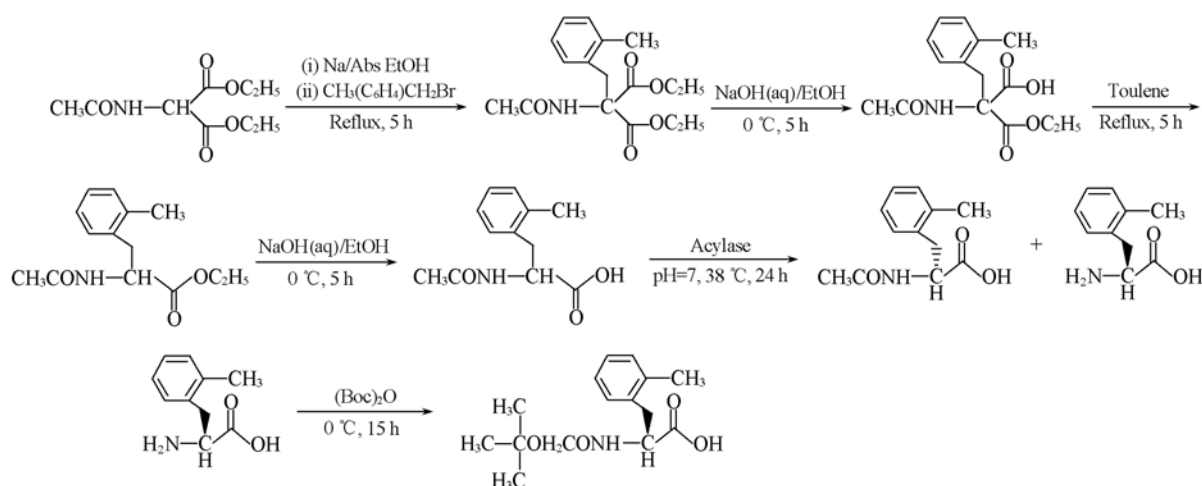
1.2.1 Boc-甲基取代苯甲基丙二酸二乙酯的合成 将金属钠溶解在无水乙醇中, 加入 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯, 在 110 °C 油浴加热下反应 30 min. 加入甲基苄溴, 反应 5 h, 得到 Boc-甲基取代苯甲基丙二酸二乙酯.

1.2.2 Boc-甲基取代苯甲基丙二酸乙酯的合成 在上述反应液中加入氢氧化钠溶液, 于 0 °C 反应 5 h 后, 添加质量分数为 4% 的碳酸氢钠溶液, 用乙醚萃取除去原料, 用乙酸乙酯萃取产物, 得到无色油状物 Boc-甲基取代苯甲基丙二酸乙酯.

1.2.3 Boc-*D,L*-甲基苯丙氨酸乙酯的合成 将得到的 Boc-苯甲基丙二酸乙酯溶于甲苯中, 于 110 °C 反应 5 h. 用硅胶柱层析进行精制, 得到 Boc-*D,L*-甲基苯丙氨酸乙酯纯品.

1.2.4 Boc-*L*-或 *D*-甲基苯丙氨酸的制备 将 Boc-*D,L*-甲基苯丙氨酸乙酯溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺和水中, 在 37 °C 用氨水调 pH 值到 8, 添加枯草杆菌蛋白酶, 反应 8 h. 用乙醚萃取, 得到 Boc-*D*-甲基苯丙氨酸乙酯. 水相用乙酸乙酯萃取, 经浓缩干燥后得到无色透明油状物 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸.

以乙酰氨基丙二酸二乙酯和 2-甲基苄溴为原料合成 Boc-*L*-2-甲基苯丙氨酸的路线见 Scheme 2.



Scheme 2 Synthetic routes of Boc-*L*-Phe(Me)-OH with diethyl acetamidomalonate and 2-methyl benzylbromides as the starting materials

2 结果与讨论

2.1 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸合成路线比较

以 3 种不同的甲基苄溴和 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯为原料, 合成的中间产物 Boc-甲基取代苯甲基

丙二酸二乙酯的收率为 85%~91% ; Boc-甲基取代苯甲基丙二酸乙酯的合成收率为 79%~90% ; Boc-*D,L*-甲基苯丙氨酸乙酯的收率为 78%~90% ; 经枯草杆菌蛋白酶拆分, 得到邻位、间位、对位 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸的收率为 79%~84% .

由乙酰氨基丙二酸二乙酯和 2-甲基苄溴合成 Ac-甲基取代苯甲基丙二酸二乙酯, 合成收率为 85%~91% ; Ac-甲基取代苯甲基丙二酸乙酯的合成收率为 78%~88% ; Ac-甲基苯丙氨酸乙酯的收率为 78%~90% ; Ac-*D,L*-甲基苯丙氨酸的收率为 78%~88% ; 经氨基酰化酶拆分得到 *L*-2-甲基苯丙氨酸的收率为 75%~80% ; 对 *L*-2-甲基苯丙氨酸的 *N*-端进行了 Boc 保护, 最终合成了 Boc-*L*-2-甲基苯丙氨酸. 两种方法的产物收率列于表 1, 采用 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯合成路线, 不仅产物的收率明显增加, 而且简化了反应步骤, 可以直接得到 Boc 保护的氨基酸, 便于进一步进行多肽合成.

Table 1 Yields of different synthesis routes

Amino acid	Enzyme	Yield(%)	t_R /min
Boc- <i>L</i> -Phe(2-Me)-OH	Acylase	34.8	6.865
Boc- <i>L</i> -Phe(2-Me)-OH	Subtilisin	42.5	6.853
Boc- <i>L</i> -Phe(3-Me)-OH	Subtilisin	47.7	6.987
Boc- <i>L</i> -Phe(4-Me)-OH	Subtilisin	64.5	7.024

2.2 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸结果分析

对合成的邻位、间位、对位 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸产物, 通过高效液相色谱、质谱、红外光谱、核磁共振谱及旋光度进行了结构确定, 结果列于表 2.

Table 2 Structure analysis of Boc-*L*-Phe(Me)-OH

Compd.	$[\alpha]_D^{20}$ (<i>c</i> 0.1, MeOH)	MS(API-ES), m/z		$^1\text{H NMR}$, δ (DMSO)	IR, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ (Neat)
		Calcd.	Exp.		
Boc- <i>L</i> -Phe(2-Me)-OH	-7.92	279.33	278.0[M - H] ⁻	1.33(s, 9H) 2.26(s, 3H) 3.01(m, 1H) 3.60(s, 1H) 4.12(s, 1H) 7.05(m, 4H)	3333(NH) 3023, 2980(CH) 1707(C=O, COOH) 1659(NH, CONH) 1591, 1494(C=C, Ar) 1169, 1049(CN)
Boc- <i>L</i> -Phe(3-Me)-OH	+4.58	279.33	314.0[M + Cl] ⁻	1.31(s, 9H) 2.28(s, 3H) 2.83(m, 1H) 3.36(s, 1H) 4.11(s, 1H) 7.14(m, 4H)	3342(NH) 2978, 2934(CH) 1716(C=O, COOH) 1610(NH, CONH) 1591, 1506(C=C, Ar) 1166, 1057(CN)
Boc- <i>L</i> -Phe(4-Me)-OH	+7.31	279.33	314.1[M + Cl] ⁻	1.30(s, 9H) 2.20(s, 3H) 2.78(m, 1H) 3.52(s, 1H) 4.02(s, 1H) 7.05(m, 4H)	3331(NH) 2978, 2930(CH) 1716(C=O, COOH) 1620(NH, CONH) 1515, 1484(C=C, Ar) 1166, 1056(CN)

利用 Boc-2-氨基丙二酸二乙酯为原料, 合成了邻位、间位、对位甲基取代的 Boc-*D,L*-苯丙氨酸乙酯, 经枯草杆菌蛋白酶拆分后得到邻位、间位、对位 Boc-*L*-甲基苯丙氨酸; 同时, 还利用乙酰氨基丙二酸二乙酯为起始原料, 合成 *L*-2-甲基苯丙氨酸并对其 *N*-端进行 Boc 保护, 最终合成了 Boc-*L*-2-甲基苯丙氨酸. 两种方法相比, Boc-2-氨基丙二酸二乙酯合成方法工艺路线简便, 收率较高, 成本低, 适合于工业化生产和实验室级别的制备.

参 考 文 献

- [1] Hruby V. J., Soloshonok V. A.. Tetrahedron[J], 2001, 57: 6329—6650
- [2] Nollet A. J. H., Huting C. M., Pandit U. K.. Tetrahedron[J], 1969, 25: 5971—5981
- [3] Nishino N., Arai T., Ueno Y., et al.. Chem. Pharm. Bull. [J], 1996, 44: 212—214
- [4] MA Shi-Zhong(马士忠), ZUO Mei-Lin(左美林), GAO Yang-Zhe(高仰哲), et al.. Amino Acids & Biotic Resources(氨基酸和生物

- 资源)[J], 2005, **27**(3): 52—54
- [5] YU Wen-Sheng(于文胜), LIANG Yuan-Jun(梁远军), LIU Ke-Liang(刘克良), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(7): 1314—1317
- [6] LIANG Yuan-Jun(梁远军), YU Wen-Sheng(于文胜), LIU Ke-Liang(刘克良), *et al.*. Amino Acids & Biotic Resources(氨基酸和生物资源)[J], 2001, **23**(2): 36—40
- [7] Redman J. E., Ghadiri M. R.. Org. Lett. [J], 2002, **4**: 4467—4469
- [8] Taylor D. C., Wightman R. H., Wightman F., *et al.*. Bioorganic Chem. [J], 1987, **15**(4): 335—341
- [9] Kubota M., Kojima H., Nagase O., *et al.*. Chem. Pharm. Bull. [J], 1982, **30**(7): 2447—2452
- [10] HU Ai-Guo(胡爱国), WANG Shan-Wei(王善韦), HAN Jun(韩军), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(3): 421—430
- [11] Fugita T., Nose T., Matsuhima A., *et al.*. Tetrahedron Lett. [J], 2000, **41**: 923—927
- [12] Rogers L. M. A., Rouden J., Lecomte L., *et al.*. Tetrahedron Lett. [J], 2003, **44**: 3047—3050
- [13] Atkinson J. G., Rooney C. S., Girard Y., *et al.*. Substitute Alanine Derivatives, DE 2705816[P], 1977-08-18
- [14] Watanabe L. A., Jose B., Kato T., *et al.*. Tetrahedron Lett. [J], 2004, **45**: 491—494

Synthesis and Resolution of Boc-*L*-Methylphenylalanines

LI Xiao-Hui^{1,2*}, WANG Guan¹, LI Jian-Xun¹, XIU Zhi-Long¹, NISHINO Norikazu²

(1. College of Environment and Life Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu 808-0196, Japan)

Abstract Synthetic chemists paid great attention on the synthesis of non-natural amino acids due to the improvement in the binding potency, chemical and biological stability and pharmacokinetic characteristics upon introduction of functional groups into peptide based compounds. The methylphenylalanines, the analogs of phenylalanine, play an important role in drug research, such as the drug of anti-hypertension, analogs of enkephalin, the endothelin peptide receptor antagonists and the analogs of hormone. In this paper, *o*-, *m*- and *p*-Boc-*L*-methylphenylalanines were synthesized using Boc-diethyl malonate and methyl benzylbromide as the starting materials. The racemic amino acids were separated into optical isomers Boc-*L*-amino acids and Boc-*D*-amino acid ester by subtilisin. The yields are 42.5%, 47.7% and 64.5%, respectively. In addition, *m*-*L*-methylphenylalanine was also prepared using diethyl acetamidomalonate and 2-methyl benzylbromide as the starting materials and the racemic amino acids were separated into optical isomers *L*-amino acids and Ac-*D*-amino acids by acylase. The yield is 34.8%. The chemical structures of Boc-*L*-methylphenylalanines were confirmed by IR, ¹H NMR, MS and optical rotation. In comparison of the two methods, the former is simpler, with a higher yield and lower cost. Therefore, it is suitable for industrial application and laboratory preparation.

Keywords Non-natural amino acids; Boc-*L*-methylphenylalanine; Resolution

(Ed.: H, J, Z)