

DL-苯丙氨酸类似物的合成及其拆分

刘金春, 宋博文, 马玉, 蔡俊, 厉廷有*

(南京医科大学药学院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:采用酶拆分法合成 L-2,6-二甲基苯丙氨酸和 L-2,4,6-三甲基苯丙氨酸。方法:通过乙酰氨基丙二酸二乙酯氨基酸合成法合成外消旋 N-乙酰-2,6-二甲基苯丙氨酸和 N-乙酰-2,4,6-三甲基苯丙氨酸,再以 L-氨基酰化酶拆分,制备 L-2,6-二甲基苯丙氨酸和 L-2,4,6-三甲基苯丙氨酸。结果:以乙酰氨基丙二酸二乙酯为起始原料,分别以 87.9%和 86.0%的收率合成了外消旋的 2,6-二甲基苯丙氨酸和 2,4,6-三甲基苯丙氨酸。氨基酰化酶能拆分 DL-N-乙酰-2,6-二甲基苯丙氨酸得到 L-2,6-二甲基苯丙氨酸,但对 N-乙酰-2,4,6-三甲基苯丙氨酸没有水解活性。结论:L-氨基酰化酶能用于 2,6-二甲基苯丙氨酸的拆分,不能用于 2,4,6-三甲基苯丙氨酸的拆分。

[关键词] 2,6-二甲基苯丙氨酸;2,4,6-三甲基苯丙氨酸;氨基酰化酶

[中图分类号] R962

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-412-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130328

Synthesis and resolution of DL-phenylalanine analogues

Liu Jinchun, Song Bowen, Ma Yu, Cai Jun, Li Tingyou*

(School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: Synthesis of L-2,6-dimethylphenylalanine and L-2,4,6-trimethylphenylalanine through enzymatic resolution. **Methods:** Racemic 2,6-dimethylphenylalanine and 2,4,6-trimethylphenylalanine were synthesized through reaction of diethyl acetamidomalonate with 2,6-dimethylbenzyl bromide or 2,4,6-trimethylbenzyl bromide, respectively. The DL-amino acids were then enzymatically resolved by L-amino acylase. **Results:** Racemic 2,6-dimethylphenylalanine and 2,4,6-trimethylphenylalanine were synthesized through reaction of diethyl acetamidomalonate with 2,6-dimethylbenzyl bromide and 2,4,6-trimethylbenzyl bromide in yield of 87.9% and 86.0% respectively; DL-2,6-dimethylphenylalanine was successfully resolved by L-amino acylase, but it was failed in the resolution of 2,4,6-trimethylphenylalanine. **Conclusion:** L-amino acylase can be used in the resolution of DL-2,6-dimethylphenylalanine, but it is ineffective in the resolution of 2,4,6-trimethylphenylalanine.

[Key words] 2,6-dimethylphenylalanine; 2,4,6-trimethylphenylalanine; L-amino acylase

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 412-415]

非天然氨基酸在肽类药物的构效关系研究中应用广泛,非天然氨基酸的引入,可以提高肽类药物的生物活性,增强药物对水解酶的稳定性,提高通过肠系膜和血脑屏障的能力。

在内啡肽的构效关系研究中发现 2,6-二甲

基苯丙氨酸 (2,6-dimethylphenylalanine, Dmp) 和 2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (2,4,6-trimethylphenylalanine, Tmp) 是苯丙氨酸的良好替代物^[1-2]。这些非天然氨基酸的使用,提高了阿片肽和受体的亲和性和生物活性^[1-2]。研究表明,用 Dmp 或 Tmp 和酪氨酸的良好替代物 2,6-二甲基酪氨酸 (2,6-dimethyltyrosine, Dmt)^[3-4] 分别替代内啡肽-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) 序列中 3 位和 1 位的氨基酸生成的阿片肽是具有 μ -阿片受体激动活性和 δ -受体拮抗活性的阿片分子^[1-2]。药理学研究表明,具有这种性质的阿片配体具有弱的耐受性和依赖性^[5]。为进一步研究 Dmp 和 Tmp 在阿片肽中的构效关系,本课题组先前

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08EJB-350002); 南京医科大学科技发展基金重点项目(08NMUZ-011)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: l_tingyou@njmu.edu.cn

报道了手性铈试剂催化氢化的 Dmp、Tmp 合成法^[6]和手性镍络合物(S)-BPB-Ni-Gly (BPB:(S)-2-[N-(苄基脯氨酰基)-氨基]-二苯甲酮;Gly: 甘氨酸)介导的 Tmp 合成法^[7]。在这些合成法中,手性铈试剂催化氢化法方便高效,但铈试剂非常昂贵;手性镍络合物原料虽价廉,但本身合成不便,且其中还存在非对应异构中间体的分离问题^[7]。近年来,酶法拆分由于其成本低廉、反应简单易行^[8]、收率高^[9]等优点,在国内外都得到了广泛的应用^[10-11]。在此,本文报道用氨基酰化酶拆分法合成 Dmp 和 Tmp。

1 材料和方法

1.1 材料

XT4 型熔点仪, 温度计未经校正;Varian INOVA-400 核磁共振仪, TMS 为内标;薄层层析用硅胶板为青岛海洋化工研究所生产,用紫外灯或碘显色。L-氨基酰化酶(上海瀚鸿化工科技有限公司), 2,4,6-三甲基苄基溴(2b)^[7]按文献方法合成,所用试剂除特殊说明外,均为市售化学试剂。

1.2 方法

1.2.1 化合物合成路线

化合物合成路线见图 1、2。

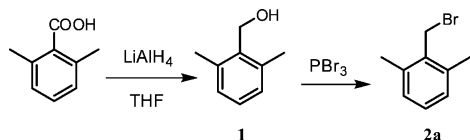


图 1 2,6-二甲基苄基溴的合成

Figure 1 Synthesis of 2,6-dimethylbenzyl bromide

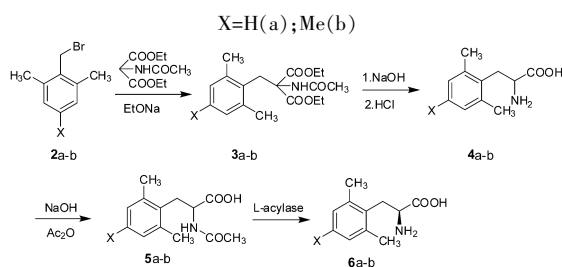


图 2 DL-氨基酸的合成与拆分

Figure 2 Synthesis and resolution of DL-amino acids

1.2.2 化合物合成方法

1.2.2.1 2,6-二甲基苄醇(1)的合成

2,6-二甲基苯甲酸 25 g (0.17 mmol) 溶于 100 ml 四氢呋喃的溶液缓慢滴加到氢化锂铝 7.7 g (0.20 mmol) 在 100 ml THF 的溶液中,滴毕 70℃回流 5 h。TLC 检测反应完全后,冰水浴冷却,缓慢滴加 3 mol/L HCl 水溶液至溶液显酸性。反应液用乙

酸乙酯萃取,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液浓缩至小体积析出白色片状结晶,干燥后得产物 21 g, 产率 92%。mp 80~81℃。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.45 (s, 1H), 2.41 (s, 6H), 4.71 (s, 2H), 7.01~7.23 (m, 3H)。

1.2.2.2 2,6-二甲基苄基溴(2a)的合成

2,6-二甲基苄醇(1) 6.0 g (44.4 mmol) 溶于 120 ml 二氯甲烷中。冰水浴下,用恒压漏斗滴入三溴化磷 12 g (44.4 mmol)。滴完后升温至 25℃搅拌 4 h。TLC 检测反应完全后,停止反应,将溶剂减压蒸干,再加入二氯甲烷 80 ml,蒸干,如此重复 3 次以尽可能除去过量的三溴化磷。蒸干后的浓缩液呈淡黄色,冷却后析出浅黄色针状结晶 8.07 g, 收率 90.5%。mp 32~33℃。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.42 (s, 6H), 4.57 (s, 2H), 7.01~7.04 (m, 2H), 7.08~7.13 (m, 1H)。

1.2.2.3 2-(N-乙酰氨基)-2-(2',6'-二甲基苄基)-丙二酸二乙酯(3a)的合成

将 Na 1.45 g (63.1 mmol) 溶于 50 ml 乙醇中,加入乙酰氨基丙二酸二乙酯 12.5 g (57.4 mmol), 常温搅拌 30 min。加入 2,6-二甲基苄基溴 12.0 g (60.3 mmol), KI 0.964 g (0.574 mmol), 80℃回流 12 h。TLC 检测反应完全后(乙酸乙酯:石油醚 = 1:4, R_f = 0.65), 将反应液浓缩至小体积,加入水 100 ml, 搅拌,慢慢析出固体,过滤干燥,得白色固体 18.4 g, 产率 95.5%。mp 77~79℃。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.22 (q, 6H, J₁ = 11.7 Hz, J₂ = 7.1 Hz), 1.98 (s, 3H), 2.29 (s, 6H), 3.81 (s, 2H), 4.06~4.09 (m, 2H), 4.16~4.52 (m, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.95~6.99 (m, 2H), 7.01~7.03 (m, 1H)。

1.2.2.4 2-(N-乙酰氨基)-2-(2',4',6'-三甲基苄基)-丙二酸二乙酯(3b)的合成

将 Na 3.3 g (145 mmol) 溶于 250 ml 乙醇中,加入乙酰氨基丙二酸二乙酯 28.7 g (132 mmol), 常温搅拌 30 min。加入 2,4,6-三甲基苄基溴 30 g (140 mmol), KI 2.22 g (13.2 mmol), 80℃回流 12 h。TLC 检测反应完全后(乙酸乙酯:石油醚 = 1:4, R_f = 0.6), 将反应液浓缩至小体积,加入 100 ml 水, 搅拌,慢慢析出固体,过滤干燥,得白色固体 45.5 g, 产率 98.9%。mp 73~76℃。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.19~1.26 (m, 6H), 1.92 (s, 3H), 2.23 (d, 9H, J = 11.5 Hz), 3.84 (s, 2H), 4.04~4.10 (m, 2H), 4.18~4.24 (m, 2H), 6.63 (s, 2H), 6.79 (s, 2H)。

1.2.2.5 DL-2,6-二甲基苄基丙氨酸(4a)的合成

在烧瓶中加入 2-(N-乙酰氨基)-2-(2',6'-二甲

基苄基)-丙二酸二乙酯(3a) 14.4 g (47.8 mmol), 再加入 2 mol/L NaOH 溶液 60 ml (120 mmol), 反应液加热回流 8 h。冷至室温后, 缓慢滴入浓盐酸 32 ml (385.7 mmol), 加完后继续回流 5 h。TLC 检测反应完全 (正丁醇:醋酸:吡啶:水 = 4:1:1:2, $R_f = 0.5$) 后, 将反应液浓缩至小体积, 冷却结晶、过滤、干燥, 将干燥后的固体溶于适量水中, 调 pH 值至 5.5~6.0, 析出固体, 过滤、干燥得白色固体 8.5 g, 收率 92.1%。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.60 (s, 1H), 8.64 (s, 2H), 6.98~7.07 (m, 3H), 3.85 (t, 1H, $J = 7.41$ Hz), 3.16 (d, 2H, $J = 8.07$ Hz), 2.28 (s, 6H)。

1.2.2.6 DL-2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (4b) 的合成

在烧瓶中加入 2-(N-乙酰氨基)-2-(2',4',6'-三甲基苄基)-丙二酸二乙酯(3b) 17.5 g (50 mmol), 再加入 2 mol/L NaOH 70 ml (140 mmol), 反应液加热回流 8 h。冷至室温后加入浓盐酸 37.5 ml (450 mmol), 升温回流 5 h。TLC 检测反应完全 (正丁醇:醋酸:吡啶:水 = 4:1:1:2, $R_f = 0.58$), 将反应液浓缩至小体积, 冷却结晶, 过滤干燥, 将干燥后的固体溶于适量水中, 调 pH 到 5.5~6.0, 析出固体, 过滤、干燥得白色固体 9.0 g, 收率 87%。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.78 (s, 3H), 2.28~2.50 (m, 6H), 2.87~2.91 (m, 1H), 3.05~3.29 (m, 1H), 4.3~4.44 (m, 1H), 6.95~6.97 (m, 2H), 8.24 (d, 2H, $J = 10$ Hz), 12.51 (s, 1H)。

1.2.2.7 DL-N-乙酰基-2,6-二甲基苯丙氨酸 (5a) 的合成

在三颈瓶中加入 DL-2,6-二甲基苯丙氨酸 (4a) 7.5 g (38.8 mmol), 然后加入 2 mol/L NaOH 溶液 68 ml (136 mmol), 搅拌使溶解。往上述溶液中缓慢滴入醋酸酐 5.1 ml (54 mmol), 滴完后, 常温反应 3 h。TLC 检测反应完全后 (石油醚:乙酸乙酯:冰醋酸 = 20:10:1, $R_f = 0.55$), 用浓盐酸调反应液 pH 值到 3.0。冷却结晶, 过滤、干燥得白色固体 8.7 g, 产率 95.5%。mp 193~195°C。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.78 (d, 3H, $J = 1.5$ Hz), 2.29 (s, 6H), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 13.98$ Hz, $J_2 = 7.28$ Hz), 3.05 (dd, 1H, $J_1 = 13.98$ Hz, $J_2 = 6.93$ Hz), 4.41 (dd, 1H, $J_1 = 15.33$ Hz, $J_2 = 8.25$ Hz), 6.94~7.05 (m, 3H), 8.28 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 12.55 (s, 1H)。

1.2.2.8 DL-N-乙酰基-2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (5b) 的合成

在三颈瓶中加入 DL-2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (4b) 5.0 g (24.6 mmol), 然后加入 2 mol/L NaOH 溶液 43 ml (86 mmol), 搅拌使溶解。往反应液中缓慢

滴入醋酸酐 3.25 ml (34.4 mmol), 滴完后常温反应 3 h。TLC 检测反应完全后 (正丁醇:醋酸:吡啶:水 = 4:1:1:2, $R_f = 0.85$), 用浓盐酸调反应液 pH 到 3.0, 冷却结晶, 过滤、干燥得白色固体 5.68 g, 产率 92.8%。mp 186~188°C。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.78 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.24 (s, 6H), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 14.05$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz), 3.02 (dd, 1H, $J_1 = 14.05$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 4.38 (dd, 1H, $J_1 = 15.35$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz), 6.77 (s, 2H), 8.22 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 12.5 (s, 1H)。

1.2.2.9 L-2,6-二甲基苯丙氨酸 (6a) 的合成

在烧瓶中加入 DL-N-乙酰基-2,6-二甲基苯丙氨酸 (5a) 5.5 g (23.4 mmol), 用 450 ml 水溶解, 加入 50 mg L-氨基酰化酶, 用 0.5 mol/L NaOH 溶液调 pH 7.0~7.2, 在 37°C 下进行反应。反应过程中用 pH 计不断检测 pH 变化, 用 NaOH 溶液调节反应溶液使 pH 维持在 7.0~7.2 之间。反应 24 h 后, 补加 L-氨基酰化酶 25 mg, 继续反应 48 h。反应结束后, 反应液用冰醋酸调 pH 到等电点, 浓缩至 50 ml, 加入 200 ml 无水乙醇, 0°C 冷却结晶, 过滤干燥, 得白色粉末状固体 1.15 g, 产率 51.0%。m.p 256~259°C。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.36 (s, 6H), 3.17 (dd, 1H, $J_1 = 14.35$ Hz, $J_2 = 7.75$ Hz), 3.38~3.45 (m, 1H), 4.06 (t, 1H, $J = 7.95$ Hz), 7.04~7.08 (m, 3H)。

1.2.2.10 L-2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (6b) 的合成

DL-N-乙酰基-2,4,6-三甲基苯丙氨酸 (5b) 6.7 g (26.9 mmol) 用 200 ml 水溶解, 加入 30 mg 氨基酰化酶, 37°C 下维持溶液 pH 7.0~7.2 反应 24 h, 之后补加 15 mg 氨基酰化酶, 继续反应 48 h。TLC 检测 (正丁醇:醋酸:吡啶:水 = 4:1:1:2) 表明, 反应没有进行。

2 结果

本文以乙酰氨基丙二酸二乙酯为起始原料, 分别以 87.9% 和 86.0% 的收率合成了外消旋的 2,6-二甲基苯丙氨酸和 2,4,6-三甲基苯丙氨酸。氨基酰化酶能拆分 DL-N-乙酰基-2,6-二甲基苯丙氨酸得到 L-2,6-二甲基苯丙氨酸, 但氨基酰化酶由于对 N-乙酰基-2,4,6-三甲基苯丙氨酸没有水解活性而未能实现对 DL-N-乙酰基-2,4,6-三甲基苯丙氨酸的拆分。

3 讨论

3.1 3a 和 3b 的合成

由于乙酰氨基丙二酸二乙酯、2,6-二甲基溴苄 (2a) 和 2,4,6-三甲基苄基溴 (2b) 都有较大的空间

位阻,为使反应顺利进行,在反应中加入了 0.1 eq 的KI。在不加入碘化钾的实验中,即使延长反应时间,提高反应温度,反应也不完全。

3.2 5a 和 5b 的合成

氨基酸的乙酰化反应我们使用了两种不同的方法:乙酸酐(3.5 eq)-乙酸^[12]法和乙酸酐(1.4 eq)-氢氧化钠(3.5 eq)法^[13]。实验结果表明,前者产率偏低(60~80%),而且以冰醋酸做溶剂后处理比较麻烦;后者产率在 90%以上,而且酸酐用量大大减少,后处理简单,所以本文采用了氢氧化钠-乙酸酐法进行氨基的酰化反应。

3.3 反应温度和 pH

参考文献的方法^[12-13],反应温度设定为对酶活性最适合的 37℃,pH 为 7.0~7.2 之间。由于在水解过程中有乙酸生成,导致 pH 值下降,而 pH 过低会影响酶的活性,因此,在反应过程中,不断检测并调节溶液的 pH 值,使 pH 值始终维持在 7.0~7.2 之间进行水解反应。

3.4 酶拆分

研究表明,氨基酰化酶能用于苯丙氨酸^[13-14]及苯环上有一个甲基取代的苯丙氨酸类似物的拆分^[12]。在试验中,发现 N-乙酰-2,6-二甲基苯丙氨酸(5a)能被氨基酰化酶水解,但水解速度很慢,反应 3 d 后才得到 51%的氨基酸收率。这可能和氨基酸苯环 2,6 位 2 个甲基的存在有关,甲基的存在使底物和酶的结合变得困难,使反应速度下降。N-乙酰-2,4,6-三甲基苯丙氨酸(5b)由于苯环上有 3 个甲基基团,实验结果表明,即使反应 3 d 后,TLC 点板也不见有对茚三酮显色的氨基酸生成,因此,可以判定氨基酰化酶不能水解 5b。其原因可能是苯环上的甲基太多,阻碍了底物和酶的结合,致使反应根本不能发生^[15]。

[参考文献]

[1] Li TY,Shiotani K,Miyazaki A,et al. Bifunctional[2',6'-dimethyl-L-tyrosine1]endomorphin-2 analogues substituted at position 3 with alkylated phenylalanine derivatives yield potent mixed μ -agonist/ δ -antagonist and dual μ -agonist/ δ -agonist opioid ligands[J]. J Med Chem,2007,

50(12):2753-2766

- [2] Zhang L,Chang L,Yu LL,et al. Endomorphin analogues with balanced affinity for both μ -and δ -opioid receptors [J]. Chin Chem Lett,2011,22(8):907-910
- [3] Li TY,Fujita Y,Tsuda Y,et al. Development of potent μ -opioid receptor ligands using unique tyrosine analogues of endomorphin-2[J]. J Med Chem,2005,48(2):586-592
- [4] 郁蕾蕾,陈佳佳,刘金春,等. 手性镍络合物介导的 2,6-二甲基-L-酪氨酸的合成[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(3):420-423
- [5] Ananthan S. Opioid ligands with mixed μ/δ opioid receptor interactions:an emerging approach to novel analgesics[J]. AAPS J,2006,8(1):E118-E125
- [6] Li TY,Tsuda Y,Minoura K,et al. Enantioselective synthesis of a phenylalanine library containing alkyl groups on the aromatic moiety:confirmation of stereostructure by X-ray analysis[J]. Chem Pharm Bull,2006,54(6):873-877
- [7] 李晓闻,郁蕾蕾,刘金春,等. (S)-2,4,6-三甲基苯丙氨酸的立体选择性合成[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(3):424-427
- [8] 胡建强,黄志平,李晶. 氨基酸手性拆分研究进展[J]. 食品与药品,2012,14(1):60-64
- [9] 王玉婷,吴刘洋. 酶法拆分制备 D-异亮氨酸的工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源,2011,33(4):36-37
- [10] Scott B,Sylvain R,Gideon G,et al. An improved racemase/acylase biotransformation for the preparation of enantiomerically pure amino acids[J]. J Am Chem Soc,2012,134(47):19310-19313
- [11] Javier M,Susana GC,Oscar F,et al. Robust enzymatic resolution of 3-fluoromandelic acid with lipase PS supported on celite[J]. Org Process Res Dev,2012,16(7):1312-1316
- [12] 马士忠,左美林,高仰哲,等. 甲基苯丙氨酸的合成与拆分[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(3):52-54
- [13] 何仕国,俞一军,许文松. DL-苯丙氨酸的酶法拆分研究[J]. 化学反应工程与工艺,2004,20(1):64-69
- [14] 闫博,朱占峰. D-氨基酰化酶拆分 D,L-苯丙氨酸制备 D-苯丙氨酸[J]. 氨基酸和生物资源,2008,30(1):36-38
- [15] 解宝玥,金利群,郑裕国,等. 酰胺酶催化底物特异性的研究进展[J]. 农药,2012,51(7):473-477

[收稿日期] 2012-11-23