

· 研究论文 ·

β -甲基苯丙氨酸的合成与拆分

陶克美 洪镛裕 杨帆 丁志强 刘波 汤杰*

(华东师范大学化学系 上海 200062)

摘要 β -甲基苯丙氨酸是一种含有两个手性中心的非基本氨基酸,本文先合成外消旋的 β -甲基苯丙氨酸的衍生物,再通过酶促拆分,得到四种光学纯的异构体。

关键词 β -甲基苯丙氨酸,合成,拆分,酶

Synthesis and Resolution of Racemic β -Methyl Phenylalanine

TAO Ke-Mei, HONG Yong-Yu, YANG Fan, DING Zhi-Qiang, LIU Bo, TANG Jie*

(Department of Chemistry, East China Normal University, 200062 Shanghai)

Abstract Racemic derivatives of unnatural amino acid β -methyl phenylalanine were synthesized and enantioselectively hydrolyzed by enzyme to give four isomers.

Key words β -methyl phenylalanine, synthesis, resolution, enzyme

1 引言

合成光学纯的氨基酸及其衍生物已经成为生物化学、生物有机化学及药物化学中的一个重要研究领域。越来越多的事实证明^[1],在有些多肽分子中,分子的骨架只起着大的框架作用,而侧链上的基团则决定着多肽分子与受体之间的相互作用,侧链基团空间位置的不同将改变多肽分子的生理活性。 β -甲基苯丙氨酸是多肽抗菌素波卓酶素中一种 β -位有支链的非基本氨基酸,有四种异构体(Figure 1)。由于这四种异构体的侧链基团在空间所处的位置不同,因而表现出各自不同的生理活性。无论是先合成外消旋体再通过拆分^[2],还是采用不对称合成方法^[3]都已见报道。然而,由于不对称合成在技术上的困难,很难应用于大量生产。而合成外消旋体在技术上具有优势。但目前报道的化学拆分法^[2]过程冗长复杂,使其丧失合成上的优势。

酶是一种高效的生物催化剂,已广泛应用于 α -氨基酸衍生物的拆分。常用的拆分外消旋 α -氨基酸衍生物的酶有两种:一种是蛋白酶,它可以选择性水解 L - α -氨基酸衍生物的酯基,而 D - α -氨基酸衍生物

物的酯基被保留,凡具有 Figure 2 结构的 α -氨基酸衍生物理论上都可以用它进行拆分;另一种是乙酰

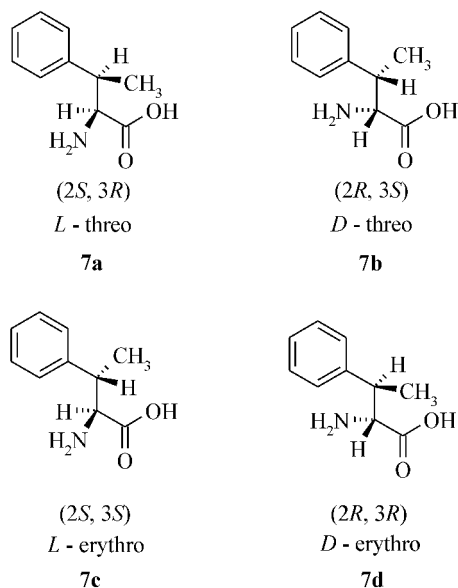


Figure 1

化酶,用于选择性地催化水解底物分子的乙酰基。其拆分机理与蛋白酶的机理类似,都是利用酶对 *D*、*L*- α -氨基酸衍生物的两种异构体水解速度的差异。乙酰化酶对 *L*-异构体的水解速度远大于 *D*-异构体,*L*-异构体优先水解,而 *D*-型保留。具有 Figure 3 结构的氨基酸衍生物都可以用乙酰化酶进行动力学拆分。

酶用于 β -甲基苯丙氨酸异构体的拆分未见文献报道。本文对 Kataoka 等人^[2]的合成方法进行改进,先合成外消旋的 β -甲基苯丙氨酸衍生物,利用重结晶的方法先将苏式和赤式分离,然后用乙酰化酶对氯乙酰基保护的 β -甲基苯丙氨酸成功地进行了拆分。

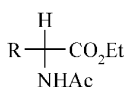


Figure 2

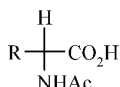
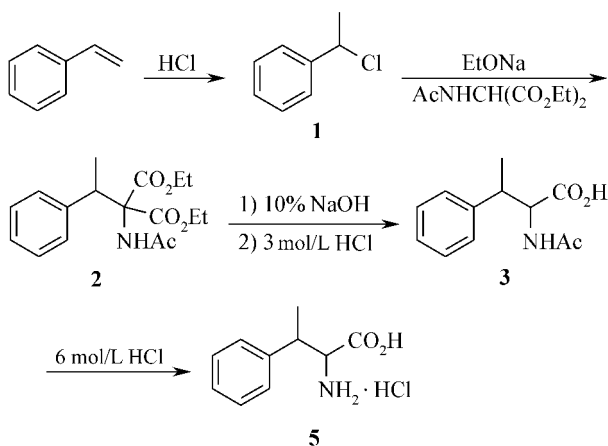


Figure 3

2 结果与讨论

2.1 合成及拆分路线的选择

2.1.1 合成路线的选择



Scheme 1

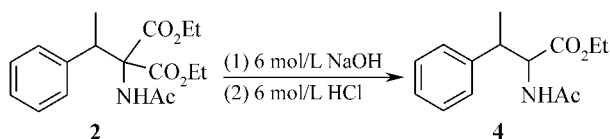
外消旋的 β -甲基苯丙氨酸是根据 Kataoka 等人^[2]的方法稍加改进合成的(Scheme 1)。我们用 α -氯代乙苯替代原文献使用的 α -溴代乙苯。氯化氢气体的制备及纯化比溴化氢方便,也更为经济。但在发生亲核取代反应时,氯原子的离去性能比溴原子差,可能会影响下一步缩合产率。我们把反应温度从 30 $^{\circ}\text{C}$ 提高到 70 $^{\circ}\text{C}$,并加入 KI 作催化剂,不仅获得了较好的缩合产率,而且使反应时间从 20 h 缩短到 10 h。同时我们对缩合反应的后处理也作了改

进,使操作更加方便、简单。

2.1.2 拆分方法的探索

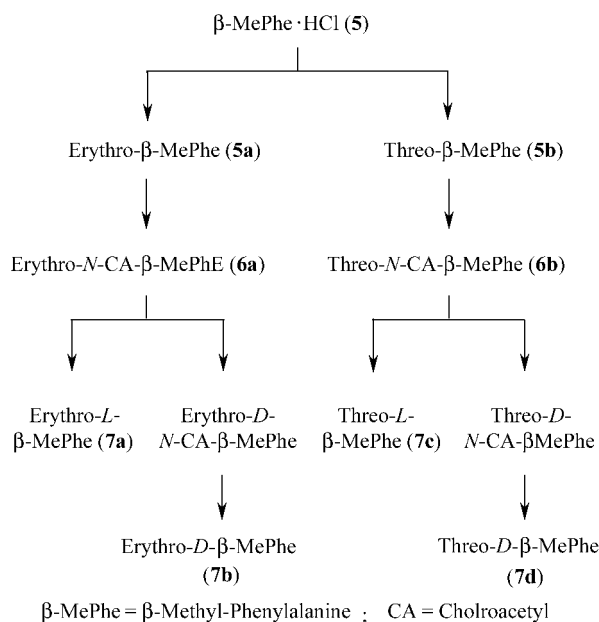
化合物 3 的结构符合乙酰化酶对底物的要求,因此我们首先选择用乙酰化酶对化合物 3 进行酶促拆分。但实验结果表明该反应速度很慢,不能彻底水解 *L*-异构体。反应 193 h 后仍有大量 *L*-型底物未被水解,*L*-氨基酸的产率只有 28.5%,只能得到 *L*-Threo、*L*-Erythro 两种光学纯的异构体。

我们以蛋白酶进行水解拆分。先将化合物 2 水解一个酯基,再经脱羧得到化合物 4 (Scheme 2)。化合物 4 的结构符合蛋白酶水解的要求。采用水作介质、糜蛋白酶作拆分剂水解化合物 4 结果表明,化合物 4 在该条件下完全不能被糜蛋白酶水解。



Scheme 2

文献报道^[4]氯乙酰基是一种比乙酰基更优良的离去基团,当用乙酰化酶对氯乙酰基保护的 α -氨基酸进行水解时,通常比乙酰基保护的快。因此我们决定先拆分苏式和赤式,再分别用氯乙酰基保护后用乙酰化酶拆分。采用该方法,我们成功地拆分得到了四种光学纯的异构体(Scheme 3)。



β -MePhe = β -Methyl-Phenylalanine; CA = Choloroacetyl

Scheme 3

2.2 苏式和赤式的拆分

Kataoka 等人^[2]在拆分苏式和赤式时,先将氨基用苯甲酰基保护起来,然后通过重结晶分别得到赤式-*N*-苯甲酰基- β -甲基苯丙氨酸和苏式-*N*-苯甲酰基- β -甲基苯丙氨酸,最后水解除去苯甲酰基。另有文献报道^[5],用水重结晶化合物 **5** 可容易地得到赤式,再把母液里的物质反复重结晶得苏式。但该文文献未报道产率。用水作溶剂重结晶化合物 **5** 的实验证明,赤式和苏式可被拆分,但产率较低。主要是化合物 **5** 在水中溶解度太大,导致重结晶效率不高。我们改用浓盐酸作溶剂,采用分步降温法,重结晶三次即可得到纯度为 99.6% 以上的赤式,母液中的物质重结晶四次可获得纯度 99.2% 以上的苏式,且产率较高(赤式 85.4%,苏式 19.5%)。

2.3 *N*-氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸(**6a**、**6b**)的合成

氨基酸的氯乙酰化有很多文献报道^[6],这些方法中无论是用氯乙酰氯还是用氯乙酸酐,都有副反应,且产率较低。H. Keith Chenault 报道^[4],在无水乙腈中氨基酸和氯乙酰氯在氮气保护下回流,可得较高产率。我们采用该方法得到比较满意的效果。产物的¹H NMR 图谱显示产物未发生外消旋化现象。

2.4 *N*-氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸的酶促拆分

为了拆分 *N*-氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸,我们选择乙酰化酶 I (Acylase I) 作为拆分剂。商品乙酰化酶 I 主要有从猪肾脏里分离出来的 Porcine Kidney (PKA) 和从曲霉菌中分离出来的 Aspergillus sp. (AA)。由于 PKA 对氧比较敏感^[4],需在无氧环境下反应,所以我们选择了对空气稳定的 AA。拆分条件是 pH = 7.3 ~ 7.8,温度为 37 °C 左右,酶的用量约为底物的 2% 并分批加入。实验结果表明,*L*-*N*-氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸能被很好地水解。虽然 β -位甲基的存在使酶与底物的结合存在一定的位阻,但使用离去性能更好的氯乙酰基作保护基,使拆分效果得到改善。

3 实验

熔点由 Fluke-51K/J 熔点仪测定,温度未经校正。旋光值由 Perkin-Elmer 241 旋光仪测定。HPLC 由 Waters TM600(柱: Nove-Pak C18 3.9 * 150 mm)测定。¹H NMR 由 Fluke Avance-500 核磁共振仪测定。无水溶剂及试剂都经通用方法处理。糜蛋白酶及乙

酰化酶均购买于 Aldrich 公司。

3.1 α -氯代乙苯(**1**)的合成

量取 23 mL (200 mmol) 苯乙烯溶于 35 mL CH₂Cl₂ 中,冰浴冷却下通入干燥的 HCl 气体。约 27 h 后反应完全(TLC 跟踪)。旋转蒸发除去 CH₂Cl₂,剩余液体减压蒸馏,收集 43 ~ 44 °C (300 Pa) 馏分,共 27.2 g。产率 96.8%, n_D^{25} 1.5252。文献值^[7]: b. p. 85 °C (2.67 kPa), n_D^{25} 1.5250。

3.2 异乙苯基乙酰氨基丙二酸二乙酯(**2**)的合成

向 100 mL 绝对无水乙醇中加入 2.3 g (100 mmol) 金属钠,待金属钠完全反应后,向溶液中加入 21.7 g (100 mmol) 乙酰氨基丙二酸二乙酯。全部溶解后回流 10 min,再加入 0.17 g (1 mmol) K₂CO₃ (溶于少量 DMF 中)。接着向溶液中滴加 14 mL (106 mmol) α -氯代乙苯,并使反应温度控制在 70 °C 左右。TLC 跟踪反应,10 h 后反应无进一步变化,停止反应。把反应混合物倒入 100 mL 热水中,搅拌,静置。冷却至室温后放入冰箱冷却,产物自然结晶出来。抽滤,得浅黄色固体。用 95% 乙醇重结晶后得 21.1 g 白色固体,产率 65.5%,m. p. 124 ~ 125 °C。文献值^[2]: m. p. 122.5 ~ 123 °C。

3.3 *N*-乙酰基- β -甲基苯丙氨酸乙酯(**4**)的合成

化合物 **2** 9.63 g (30 mmol) 溶于 150 mL 95% 的乙醇中,搅拌下加入 5.5 mL 6 mol/L NaOH (33 mmol),室温下搅拌 2 h 后,用 6N HCl 调 pH 5 ~ 6,加热回流 3 h。反应结束后旋转蒸发除去大部分乙醇,再加入适量水。将反应混合液用饱和 NaHCO₃ 调 pH 至 7 ~ 8,乙酸乙酯萃取。合并有机相,无水 MgSO₄ 干燥,减压除去溶剂,乙酸乙酯重结晶。得柱状晶体 5.0 g,产率 66.7%,m. p. 126 ~ 128 °C。

3.4 *N*-乙酰基- β -甲基苯丙氨酸(**3**)的合成

参照文献^[2]方法合成。由于脱羧时新手性中心的形成受邻位手性中心的影响,该过程具有立体选择性过程。生成的产物中苏式与赤式之比并不是 1 : 1, HPLC 及¹H NMR 显示苏式与赤式之比为 1 : 2.35。产物用乙醇重结晶后为白色晶体,产率 92.6%,m. p. 180 ~ 181 °C。

3.5 β -甲基苯丙氨酸盐酸盐(**5**)

方法同文献^[2]。产率 97.8%,m. p. 182 ~

188 °C。文献值^[2] m.p. 181 ~ 189 °C。

3.6 苏式和赤式 β -甲基苯丙氨酸(5a, 5b)的分离

取 40.0 g (186 mmol) β -甲基苯丙氨酸盐酸盐(5) 溶于最少量沸腾的浓盐酸中, 80 °C 保温 12 h, 60 °C 保温 12 h, 室温 12 h, 最后放入冰箱冷却 12 h。过滤, 浓盐酸洗涤。重复结晶三次, 得 25.4 g, 产率 63.5%。母液合并后旋转蒸发至干, 所得固体采取同样方法重结晶, 操作四次后得固体 7.8 g, 产率 19.5%。把上述所得固体分别溶于无水乙醇中, 滴加环氧丙烷脱去氯化氢。所得固体干燥后用水重结晶, 分别得到无色针状晶体(5a)(5b)。5a: 纯度 99.6% m.p. 226 ~ 227 °C。文献值^[2] m.p. 226 ~ 227 °C。¹H NMR(D₂O) δ : 1.31(d, J = 7.21 Hz, 3H, β -CH₃) 3.19(m, 1H β -H) 3.70(d, J = 7.73 Hz, 1H, α -H), 7.25 ~ 7.36(m, 5H, Ar-H)。5b: 纯度 99.2%, m.p. 222 ~ 223 °C。文献值^[2] m.p. 222 ~ 223 °C。¹H NMR(D₂O) δ : 1.29(d, J = 7.48 Hz, 3H, β -CH₃), 3.44(m, 1H β -H) 3.83(d, J = 4.97 Hz, 1H, α -H), 7.22 ~ 7.35(m, 5H, Ar-H)。

3.7 赤式和苏式 N -氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸的合成(6a, 6b)

于 60 mL 无水乙腈中加入 5.4 g (30 mmol) 5a 或 5b, 氮气保护下加入 2.4 mL (32 mmol) 氯乙酰氯回流, 直到氨基酸完全溶解(约 2 h)。取出反应混合物旋转蒸发至干, 用乙酸乙酯溶解后过滤, 母液旋转蒸发至干。乙酸乙酯-正己烷重结晶后得白色晶体。6a: 5.9 g, 产率 77.0%, m.p. 156 ~ 158 °C, ¹H NMR(CDCl₃) δ : 1.43(d, J = 7.10 Hz, 3H β -CH₃); 3.51(m, 1H β -H) 4.05(s, 2H τ -COCH₂Cl) 4.84(m, 1H α -H), 7.22 ~ 7.36(m, 5H, Ar-H); m/z (%) : 256 (M^+ , 62), 258 ($M^+ + 2$, 23), 210(31), 162(14), 105(基峰)。6b: 5.8 g, 产率 75.7%, m.p. 132 ~ 133 °C, ¹H NMR(CDCl₃) δ : 1.25(d, J = 7.36 Hz, 3H β -CH₃), 3.76(m, 1H β -H) 4.08(s, 2H τ -COCH₂Cl) 4.95(m, 1H α -H), 7.24 ~ 7.37(m, 5H, Ar-H); m/z (%) : 256 (M^+ , 62), 258 ($M^+ + 2$, 23), 210(31), 162(14), 105(基峰)。

3.8 赤式和苏式 N -氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸的拆分

将赤式(或苏式) N -氯乙酰基- β -甲基苯丙氨酸 20.44 g (80 mmol) 溶解在 80 mL 1 mol/L NaOH 溶液中, 用 640 mL 水稀释成 0.1 ~ 0.2 mol/L 浓度的溶

液, 再用稀 HCl 调节到 pH 7.3 ~ 7.8 之间, 水浴加热至 37 ~ 38 °C。加入 0.30 g 乙酰化酶(AA), 保温 37 ~ 38 °C, 充分搅拌, 用 TLC 跟踪反应。反应前期 pH 值会逐渐下降, 可用稀 NaOH 调整, 保持 pH 值在 7.3 ~ 7.8 之间。第二天补充 0.10 g 酶, 第三天补充 0.10 g 酶。当 pH 值不再降低, TLC 检测时产物斑点不再增大后, 继续反应 6 h 停止(共约 60 h)。加入少量活性碳, 升温至 50 ~ 60 °C 进行脱色。过滤, 母液旋转蒸发除去大部分水。pH 计监控下用稀 HCl 调至 pH 值为 5.50, 有晶体析出, 静置过夜。过滤后固体用稀 HCl (pH = 5.50) 洗涤, 得针状晶体 7a(或 7c)。滤液用 HCl 调 pH 至 2.0, 乙酸乙酯萃取, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥。除去有机溶剂后加入 6 mol/L HCl 回流, TLC 检测时原料消失。旋转蒸发干后固体溶于无水乙醇, 滴加环氧丙烷脱去氯化氢。过滤得固体, 干燥后用水重结晶得无色针状晶体 7b(或 7d)。7a: 5.8 g, 产率 81.0%, m.p. 226 ~ 227 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -29.6°(c 1, H₂O)。文献值^[2] m.p. 226 ~ 227 °C $[\alpha]_D^{25}$ -30.6°(c 1, H₂O)。7b: 5.5 g, 产率 76.8%, m.p. 225 ~ 226 °C $[\alpha]_D^{25}$ +29.2°(c 1, H₂O)。文献值^[2] m.p. 226 ~ 227 °C $[\alpha]_D^{25}$ +29.0°(c 1, H₂O)。7c: 5.9 g, 产率 82.4%, m.p. 222 ~ 223 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -7.4°(c 1, H₂O)。文献值^[2] m.p. 223 ~ 224 °C $[\alpha]_D^{25}$ -7.5°(c 1, H₂O)。7d: 5.5 g, 产率 76.8%, m.p. 222 ~ 223 °C $[\alpha]_D^{25}$ +7.4°(c 1, H₂O)。文献值^[2] m.p. 222 ~ 223 °C $[\alpha]_D^{25}$ +7.3°(c 1, H₂O)。

References

- (a) Kazmiershi, W.; Yamamra, H. I.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2275.
(b) Olson, G. L.; Voss, M. E.; Hill, D. E.; Kahn, M.; Madison, V. S.; Cook, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 323.
(c) Kazmiershi, W.; Hruby, V. J. *Tetrahedron* **1988**, 44, 697.
- Kataoka, Y. I.; Seto, Y.; Yamamoto, M.; Yamada, T.; Kuwata, S.; watanabe, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, 49, 1081.
- (a) Dharanipragada, R.; Vanhulle, K.; Bannister, A.; Bear, S.; Kennedy, L.; Hruby, V. J. *Tetrahedron* **1992**, 48(23), 4377.
(b) Feng-Di, L.; Guigen, L.; Bih-Show, L.; Hruby, V. J. *Synth. Commun.* **1995**, 25(1), 57.
(c) Guigen, L.; Dnesh, P.; Hruby, V. J.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1994**, 3057.

(d) Shapiro , G. ; Buechler , D. ; Marzi , M. ; Schmidt , K. ;
Gormez-Lor B. *J. Org. Chem.* **1995** , *60* , 4978.

4 Chenault , H. K. ; Dabmer , J. ; Whitesides , G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989** , *111* , 6354.

5 Péter , A. ; Tóth , G. ; Cserpán , Tourwé D. *J. Chromatogr. , A* **1994** , *660* , 283.

6 (a) Birnbaum , S. M. ; Leventow , L. ; Kingly , R. B. ;
Greenstein , J. P. *J. Biol. Chem.* **1952** , *194* , 455.

(b) Ronwin , E. J. *J. Org. Chem.* **1953** , *18* , 127.

(c) Ronwin , E. J. *J. Org. Chem.* **1953** , *18* , 1546.

7 Fan , N. T. *Youji Hecheng Shidian* , Press of Beijing University of Science and Technology , Beijing , **1992** , 50.

(Y200009123 SHI C. N. ; FAN Y. Y.)