

N-叔丁氧羰基-DL-(±)-高酪氨酸的合成

刘红明, 秦 焯, 姚建忠, 盛春泉, 缪震元, 张万年 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 制备用于新型多肽类药物全合成研究的非必需氨基酸*N*-叔丁氧羰基-DL-(±)-高酪氨酸(1)。方法 以L-天冬氨酸(2)为原料,经*N*-甲氧羰基保护、分子内脱水酸酐化、与邻氯苯甲醚的Friedel-Crafts反应、10%钯碳催化氢化、48%氢溴酸脱*N*-甲氧羰基和酚甲醚保护、*N*-叔丁氧羰基保护6步反应合成了目标化合物。结果 以总收率49.7%成功地合成了目标化合物1,其结构经电喷雾质谱(ESI-MS)、氢谱(¹H NMR)和碳谱(¹³C NMR)确认。结论 该合成路线具有原料价廉易得、操作简便、总收率高等优点。

[关键词] *N*-叔丁氧羰基-DL-(±)-高酪氨酸;合成;L-天冬氨酸;Friedel-Crafts反应;催化氢化

[中图分类号] R914 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)05-0345-04

Synthesis of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-DL-(±)-*homo*-tyrosine

LIU Hong-ming QIN Ye YAO Jian-zhong SHENG Chun-quan MIAO Zhen-yuan ZHANG Wan-nian (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective To prepare *N*-*tert*-butoxycarbonyl-DL-(±)-*homo*-tyrosine (1), a key unusual amino acid and pharmaceutical intermediate for the total synthesis of novel peptides drug including cyclic or straight chain peptide. Methods Starting from L-aspartic acid (2), the target compound 1 was synthesized via 6 steps including *N*-methoxycarbonylation, intramolecular dehydration and anhydridation, Friedel-Crafts reaction with 2-chlorobenzole, catalytic hydrogenation with 10% Pd-C, *N*-demethoxycarbonylation and demethylation with 48% HBrHOAc followed by *N*-Butoxycarbonylation. Results Target compound 1 had been successfully synthesized in an overall yield of 49.7%. The structure of the target compound was confirmed by ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR.

Conclusion The process developed has several advantages such as cheap materials, convenient workup and high yield.

[Key words] *N*-*tert*-butoxycarbonyl-DL-(±)-*homo*-tyrosine synthesis; L-aspartic acid; Friedel-Crafts reaction; catalytic hydrogenation

高酪氨酸作为人体非必需氨基酸,常是构成某些天然多肽类活性化合物的重要结构单元。比如,棘白菌素(echinocandin)是一类对深部真菌具有独特“杀菌”活性的天然环六脂肽类真菌细胞壁-1,3-葡聚糖合成酶抑制剂^[1]。对其大量的半合成研究已成功上市了三个新药:卡泊芬净(caspofungin)^[2]、米卡芬净(micafungin)^[3]、阿尼芬净(anidulafungin)^[4]用于治疗侵入性念珠菌和曲霉菌病。研究标明,其中高酪氨酸残基是保持此类药物抗真菌活性所必需的氨基酸结构片段。

为进一步探讨棘白菌素类药物的构效关系并寻找高效、低毒、广谱抗深部真菌新药,作者开展了新型环六脂肽胺类衍生物的优化设计与全合成研究。其中,*N*-叔丁氧羰基-DL-(±)-高酪氨酸(1)是全合

成目标化合物的关键*N*保护氨基酸合成子。但高酪氨酸及1的合成方法,目前国内尚未见相关的文献报道。本合成参照文献^[5-8]方法,以市售L-天冬氨酸(2)为原料,在氢氧化钠溶液中与氯甲酸甲酯经氨基甲氧羰基化反应生成(S)-*N*-甲氧羰基-L-天冬氨酸(3);化合物3在三氟醋酸酐(TFAA)作用下于乙酸乙酯中发生分子内脱水酸酐化形成(S)-*N*-甲氧羰基-L-天冬氨酸酐(4);化合物4在AlCl₃催化下与邻氯苯甲醚发生傅克反应生成(2S)-2-[(甲氧羰基)氨基]-4-氧代-4-(3-氯-4-甲氧基苯基)丁酸(5);化合物5在四氢呋喃-水(1:1)中经10% Pd-C催化加压氢化还原酮羰基并脱卤制得(2S)-2-[(甲氧羰基)氨基]-4-(4-甲氧基苯基)丁酸(6);化合物6在48%氢溴酸的冰醋酸溶液作用下酸分解脱甲氧羰基及酚甲醚保护后制得高酪氨酸的氢溴酸盐(7)后,直接在碱性条件下,于1,4-二氧六环-水(2:1)中与二碳酸二叔丁基酯(Boc₂O)反应制得目标化合物1。该合成方法总收率达49.7%,具有原料价廉易得、操作简便、总收率高等优点。其合成路线

[基金项目] 国家自然科学基金(30772674,30930107),上海市重点学科建设项目(B906)资助项目。

[作者简介] 刘红明(1982-),男,硕士研究生。E-mail: liuhm1030@sina.com

[通讯作者] 张万年。E-mail: zhangwnk@hotmail.com;
姚建忠。E-mail: yaojz@sh163.net

如图 1 所示。

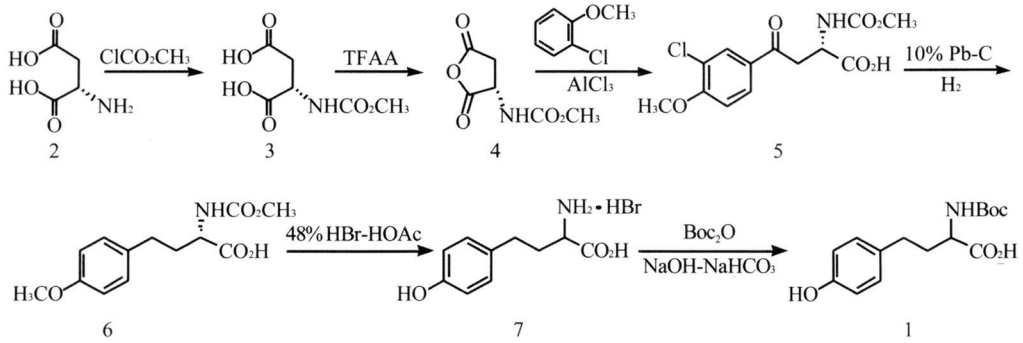


图 1 *N*-叔丁氧羰基-DL-(±)-高酪氨酸 (1) 的合成路线

1 实验部分

核磁共振谱 ($^1\text{H NMR}$) 用 Bruker DMX-500 型核磁共振仪测定, TMS 为内标; 电喷雾质谱 (ES/MS) 用 Micromass Q-ToF Micro LC/MS/MS 质谱仪测定; 熔点用 XT4A 显微熔点仪测定, 温度未校正。旋光度用 WXG-4 圆盘旋光仪测定。实验所用试剂和溶剂均为市售化学纯商品。

1.1 (S)-*N*-甲氧羰基-L-天冬氨酸 (3) 的合成 取 L-天冬氨酸 (2) 53.3 g (0.40 mol), 加 8 M NaOH 水溶液 200 ml 于冰浴和机械搅拌下滴加氯甲酸甲酯 61.2 g (0.65 mol), 1 h 滴完。撤去冰浴, 在 20 °C 下继续搅拌反应 1 h。反应液用 12 M HCl 调节 pH 至 1, 减压除去水, 所得白色固体用热的乙酸乙酯提取 (600 ml \times 3), 合并乙酸乙酯液, 减压回收溶剂得白色固体 (3) 70.4 g 收率 92.0%, m.p. 150~151 °C。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 12.55 (s, 2H, $2 \times \text{CO}_2\text{H}$), 7.43 (d, 1H, $J = 8.4 \text{ Hz}$, NH), 4.31 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{NHCO}_2\text{CH}_3)-$), 3.54 (s, 3H, 酯 OCH₃), 2.70 (dd, 1H, $J = 5.45, 16.40 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_a\text{H}_b\text{CO}_2\text{H}$), 2.54 (dd, 1H, $J = 8.10, 16.40 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_a\text{H}_b\text{CO}_2\text{H}$)。 $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 173.18 ($-\text{CO}_2\text{H}$), 172.15 ($-\text{CO}_2\text{H}$), 156.87 (NHCO₂CH₃), 51.97 (CH₃), 50.95 (CH), 36.53 (CH₂)。

1.2 (S)-*N*-甲氧羰基-L-天冬氨酸酐 (4) 的合成 取化合物 (3) 54.3 g (0.28 mol) 混悬于 800 ml 乙酸乙酯中, 于 20 °C 机械搅拌下滴加三氟醋酸酐 (TFAA) 56.5 ml (84.0 g, 0.40 mol), 1 h 滴完后于 35 °C 下继续搅拌反应 1 h。反应液减压浓缩溶剂至 500 ml 静置待析出少量结晶后于 0 °C 下快速搅拌下慢慢滴加 2.5 L 干燥正己烷, 滴加完毕, 继续于 0 °C 下搅拌 1 h 过滤, 滤饼用正己烷-乙酸乙酯 (5:1) 洗涤, 干燥, 得白色晶固体 (4) 45.3 g 收率 92.1%, m.p. 133 °C。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.02 (d, 1H, $J = 7.6 \text{ Hz}$, NH), 4.68 (m,

1H, $-\text{CH}(\text{NHCO}_2\text{CH}_3)-$), 3.58 (s, 3H, 酯 OCH₃), 3.24 (dd, 1H, $J = 10.05, 18.40 \text{ Hz}$, $-\text{H}_a\text{CH}_b\text{CO}_2-$), 2.91 (dd, 1H, $J = 6.25, 18.40 \text{ Hz}$, $-\text{H}_a\text{CH}_b\text{CO}_2-$)。 $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 172.75 (CO₂-), 170.41 (CO₂-), 156.97 (NHCO₂CH₃), 52.66 (CH₃), 50.96 (CH), 35.28 (CH₂)。

1.3 (2S)-2-[(甲氧羰基)氨基]-4-氧代-4-(3-氯-4-甲氧基苯基)酸 (5) 的合成 取无水 AlCl₃ 82 g (0.61 mol), 加无水二氯甲烷 600 ml 于 0 °C 及机械搅拌下再加入干燥硝基甲烷 33 ml (36.8 g, 0.61 mol), 然后滴加邻氯苯甲醚 46 ml (51.8 g, 0.36 mmol), 30 min 加完。将反应液升温至 20 °C, 分批加入化合物 (4) 42.0 g (0.24 mol); 再于 N₂ 气流下回流反应 30 h。搅拌下将冷却至 20 °C 后的反应液倒入 600 g 冰, 1.2 L 乙酸乙酯和 600 ml 2 M 磷酸水溶液组成的溶剂体系中。分离出有机层, 依次用 600 ml 2 M 磷酸水溶液、600 ml 饱和食盐水洗涤, 硅藻土过滤, 所得滤液浓缩至 500 ml 静置待析出少量结晶后于 0 °C 下快速搅拌下慢慢滴加 1.6 L 正己烷, 滴加完毕, 再于 0 °C 下搅拌 1 h 过滤, 滤饼用正己烷-乙酸乙酯 (3:1) 洗涤, 干燥, 得白色固体 (5) 70.0 g 收率 91.4%, m.p. 143~144 °C。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ 9.52 (br s, 1H, CO₂H), 7.98 (d, 1H, $J = 1.89 \text{ Hz}$, 邻氯芳氢), 7.86 (dd, 1H, $J = 1.89, 8.65 \text{ Hz}$, 对氯芳氢), 6.96 (d, 1H, $J = 8.65 \text{ Hz}$, 间氯芳氢), 5.87 (d, 1H, $J = 6.16 \text{ Hz}$, NH), 4.77 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{NHCO}_2\text{CH}_3)-$), 3.98 (s, 3H, 酚 OCH₃), 3.71 (dd, 1H, $J = 8.97, 18.20 \text{ Hz}$, ArCOCH_aH_b-), 3.68 (s, 3H, 酯 OCH₃), 3.51 (dd, 1H, $J = 4.0, 18.20 \text{ Hz}$, ArCOCH_aH_b-)。 MS (ESI) m/z 314 [M (^{35}Cl)]⁺, 100%], 316 [M (^{35}Cl) + H, 37.3%], 361.5 [M (^{35}Cl) + 2Na, 14.9%]。 $[\alpha]_{589} = +51.3^\circ$ ($c = 0.048 \text{ g/ml}$)

无水乙醇)。

1.4 (2S)-2-[(甲氧羰基)氨基]-4-(4-甲氧基苯基)酸(6)的合成 取化合物(5) 65.0 g(0.21 mol)溶于 350 ml 的 THF-H₂O (1:1)混合溶剂,通 N₂ 5 min 加 10% Pd-C 3.5 g 在室温及 40 psi(2.7 atm)压力下通 H₂ 搅拌反应 24 h。反应完毕,过滤,所得滤液减压回收 THF,残液加等量的水稀释,乙酸乙酯提取(300 ml × 3)。合并乙酸乙酯提取液,用饱和食盐水洗涤,减压浓缩至 150 ml 静置待析出少量结晶后快速于 0 °C 搅拌下慢慢滴加 600 ml 正己烷,滴加完毕,继续于 0 °C 下搅拌 1 h。过滤,滤饼用冷的正己烷-乙酸乙酯(5:1)洗涤,干燥,得白色针晶(6) 50.0 g 收率 90.9%。m.p. 101~102 °C。¹H NMR(CDCl₃) δ 7.10(d, 2H, J=8.60 Hz 甲氧基邻位芳氢), 6.83(d, 2H, J=8.60 Hz 甲氧基间位芳氢), 5.19(br d, 1H, J=8.05 Hz NH), 4.40(m, 1H, -CH(NHCO₂CH₃)-), 3.78(s, 3H, 酚 OCH₃), 3.71(s, 3H, 酯 OCH₃), 2.66(m, 2H, ArCH₂-), 2.19(m, 1H, ArCH₂CH_aH_b-), 1.98(m, 1H, ArCH₂CH_aH_b-)。MS(ESI)^{m/z} 266(M⁺H, 100%), 316(M, 15.4%)。[α]_D²⁵ = +15° (c=0.2 g/ml 无水乙醇)。

1.5 *N*-叔-氧羰基-DL-(+)-高酪氨酸(1)的合成 取化合物(6) 5.0 g(18.7 mmol),加 48% HBr 冰醋酸液 25 ml 加热至 90 °C 反应 36 h。反应液有固体析出,减压除去溶剂及 HBr 残余物加适量乙酸乙酯搅拌,过滤,滤饼用乙酸乙酯洗涤得白色固体高酪氨酸的氢溴酸盐(7)。

取上述所得化合物(7),溶于 60 ml 1,4-二氧六环水(2:1)混合溶剂,冰浴下滴加 3 M NaOH 10 ml 后,再加碳酸氢钠 2.2 g(26.1 mmol)和二碳酸二叔丁基酯 5.5 g(26.1 mmol),在 0 °C 反应 1 h 后撤去冰浴,室温继续搅拌反应过夜。次日,反应液经减压除去 1,4-二氧六环后,于冰浴下用 1M KHSO₄ 水溶液调节 pH 至 3 乙酸乙酯萃取(30 ml × 3),合并乙酸乙酯液,无水硫酸钠干燥,减压回收溶剂。残物经硅胶 H 柱层析(展开剂 CH₂Cl₂:CH₃OH=18:1)分离得淡黄色油状物(1) 3.9 g 两步收率 70.6%。¹H NMR(DMSO-d₆) δ 12.40(s, 1H, -CO₂H), 9.12(s, 1H, 酚-OH), 7.15(d, 1H, J=7.70 Hz NH), 6.96(d, 2H, J=8.10 Hz 酚羟基邻位芳氢), 6.66(dd, 2H, J=8.10 Hz 酚羟基间位芳氢), 3.81(m, 1H, -CH(NHCO₂C(CH₃)₃)-), 2.50(m, 2H, ArCH₂-), 1.84(m, 1H, ArCH₂CH_aH_b-), 1.79(m, 1H, ArCH₂CH_aH_b-), 1.37[d, 9H, -NHCO₂C(CH₃)₃]₃。 ¹³C NMR(DMSO-d₆) δ 174.64(CO₂H), 156.05(叔丁氧羰基季碳), 155.86(与酚羟基

相连芳环季碳), 131.6(酚羟基对位芳环季碳), 129.6(酚羟基间位 2 个芳环叔碳), 115.5(酚羟基邻位 2 个芳环叔碳), 78.4(叔丁基季碳), 53.3(与氮原子相连的叔碳), 33.4(ArCH₂-), 31.2(ArCH₂CH₂-), 28.7(叔丁基的 3 个甲基伯碳)。MS(ESI)^{m/z} 294(M⁺H, 100%)。[α]_D²⁵ = 0° (c=0.1 g/ml 甲醇)。

2 结果与讨论

合成了目标化合物 1,其结构经电喷雾质谱(ESI-MS)、核磁共振(¹H NMR)和碳谱(¹³C NMR)确证。高酪氨酸作为非必需氨基酸,其单一立体构型的 *N*-叔丁氧羰基保护产物的成熟手性合成方法还尚未见相关文献报道,作者在本实验中也进行了有益的探索。

文献^[5,6]报道以 D-天冬氨酸为原料合成了光学纯(2R)-2-[(甲氧羰基)氨基]-4-(4-甲氧基苯基)丁酸,它是化合物 6 的旋光异构体。据此,本文以 L-天冬氨酸(2)为原料,成功合成了光学纯化合物 6。作者设想参照文献^[7,8]方法,进一步将化合物 6 经酸解脱 *N*-甲氧羰基和酚甲醚保护、氨基的叔丁氧羰基(Boc)保护 2 步反应制备光学纯的 *N*-Boc-L-(+)-高酪氨酸。但实验结果发现,用 48% 的 HBr-HOAc 于 90 °C 搅拌反应 36 h 虽然可同时脱除化合物 6 中的酚羟基的甲基及氨基的甲氧羰基两个保护基,但产物 7 发生明显的消旋,最终导致由化合物 7 与 Boc₂O 反应仅制得 *N*-Boc-高酪氨酸(1)的消旋体。

总之,脱除化合物 7 中的两个保护基是整条合成路线的关键。芳甲醚很稳定,一般条件下不易脱去,需用强质子酸或路易氏酸,但强酸和高温容易引起消旋。鉴于文献^[9]曾报道光学纯 L-O-甲基-甲基酪氨酸在稍过量的 NaI 存在下,用过量 48% 的 HBr 水溶液于 90~94 °C 水浴加热处理 2 h 可脱去酚甲醚保护基且不发生消旋。为此,作者也尝试了将化合物 7 用上述条件并于 90 °C 下反应 2 h 制得化合物 7 后直接在碱性条件下与 Boc₂O 反应来制备光学纯 *N*-Boc-L-(+)-高酪氨酸,结果却得到了大部分构型翻转但未完全翻转的 *N*-Boc-高酪氨酸,其旋光度为 -3.5°。

因此,基于非必需氨基酸的手性全合成成本高,而酶法拆分不仅特异性强、产物光学纯度高,而且成本低廉,不失为制备单一立体构型的 *N*-叔丁氧羰基高酪氨酸的一种重要方法。因此,笔者下一步拟采用酶法手性拆分制备单一立体构型的 *N*-叔丁氧羰基-L-(+)-高酪氨酸和 *N*-叔丁氧羰基-D-(-)-高酪氨酸,为新型环六脂肽胺类衍生物的全合成与抗菌构效关系

(下转第 384 页)

存放,未能严格控制温湿度等影响因素。这些问题都反映出中药材及其饮片问题仍十分严峻,加强中药材的监督管理是药品监管工作的一个重要环节。

3.2 医疗机构制剂的质量问题 医疗机构制剂品种不合格原因主要集中在装量差异、含量测定和微生物限度等几个方面。造成微生物限度不合格的主要原因是制剂室设施落后,洁净度不达标或卫生质量管理不到位,或是包装材料不合格,如个别外包装已长霉,包材清洁处理不彻底、包材密封不严等;还有个别单位微生物限度检查由临床检验实验室代做,未能按药典要求检验,导致检验结果的不可靠。含量测定、装量不合格主要原因一是制剂配制分装人员和药检人员对最低装量检查法的理解不准确,没有严格按标准操作规程执行,在制作工艺上存在问题。二是地区环境差异。各地区的温度、湿度等方面存在区别,加之包装不够严密,导致制剂在从配制单位运送到检验单位后主要成分的挥发、装量的减少及含量增高等现象出现。三是医院制剂包装材料上存在差别。制剂在本医疗机构使用时,包装密封程度上能达到规定标准,但在需要长途运输的情况下,简易包装受到温度、时间、湿度等各方面的影响就会很大,影响了检验结果的准确性。

4 意见与建议

4.1 加强中药材质量的监控,确保中药制剂的质量

中药材是中药制剂的原料,其质量的优劣直接影响中药制剂的质量。目前,市场上的中药材质量较差,加强中药材进货渠道的管理尤为重要,制剂配制用药材与饮片应把好采购关、检验合格后方可投入使用^[3]。

4.2 加强医疗机构制剂管理,提高制剂安全监管力

度 针对近两年医疗机构制剂抽验数量下降的趋势,加大制剂抽验的力度。按照制剂配制和使用的时限要求,采取分时抽样,促使医疗机构审批的制剂有效地使用于临床,并结合《中国人民解放军医疗机构制剂规范》改版工作,着力提高和统一制剂质量标准。

4.3 及时跟踪溯源 加强三年来药品和制剂抽验不合格单位的跟踪检查,对不合格制剂品种进行质量追踪和安全性评价,不合格的取消制剂批准文号。建立健全不合格药品和制剂追查制度,及时做好质量抽验不合格品种的溯源和清查工作,对问题药品和制剂做出停购、停制、停用,确保广大官兵和人民群众用药安全。

4.4 开展快速检验 充分运用药品仪器检验所配发的“军队药品快速检验箱”,进行现场快速检验,可以较好地解决了基层单位样品量少、检验条件受限等问题,提高了药品抽验的效率。

由于药品是特殊的商品,不存在质量等级之分,只有合格或不合格。作为药品质量的监督机构,对于抽验中发现的问题,我们更应强调对不合格药品的处置、分析和查找原因,并采取措施,保证人民群众和广大官兵安全用药。

【参考文献】

- [1] 中国药典 [S]. (二部). 附录, 2005: 100.
- [2] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 中国人民解放军医疗机构制剂规范 (2002年版增补本) [M]. 北京: 人民军医出版社, 41.
- [3] 蔡怀友, 赵兴红, 邬静, 等. 兰州军区九五期间医疗机构制剂质量抽验结果分析及改进对策 [J]. 解放军药学学报, 2002, 18(5): 319. [收稿日期] 2010-09-03 [修回日期] 2010-09-19

(上接第 347 页)

研究提供更多不同光学活性的单元氨基酸片段。

【参考文献】

- [1] Petrlikos G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy [J]. International Journal of Antimicrobial Agents 2007, 30: 108.
- [2] Denning DW. Echinocandin antifungal drugs [J]. Lancet 2003, 362: 1142.
- [3] Chandrasekar PH, Sobel JD. Micafungin: A new echinocandin [J]. Clinical Infectious Diseases 2006, 42: 1171.
- [4] Vazquez JA, Sobel JD. Anidulafungin: A novel echinocandin [J]. Clinical Infectious Diseases 2006, 43: 215.
- [5] Melillo DG, Larsen RD. Practical enantioselective synthesis of a homotyrosine derivative and (R,R)-4-propyl-9-hydroxy-9-oxa-1,4-diazepine a potent dopamine agonist [J]. J Org Chem, 1987, 52: 5143.
- [6] Melillo DG, Plains S. Chiral synthesis of (+)-trans-1A, 2, 3, 4A, 5, 6-hexahydro-9-hydroxy-4-propyl-4H-naphtho[1,2-b]-1,4-oxazine [P]. U. S. Patent 4758661, 1988.
- [7] Zambias RA, Hammond ML. Preparation and structure-activity relationship of simplified analogues of the antifungal agent cifburgin: a total synthesis approach [J]. J Med Chem, 1992, 35(15): 2843.
- [8] Das AK, Banerjee A, Drew MB, et al. Can a consecutive double turn conformation be considered as a peptide based molecular scaffold for supramolecular helix in the solid state? [J]. Tetrahedron 2005, 61: 5027.
- [9] Guigen Li, Patel D, Hruby VJ. An efficient procedure for the demethylation of arylmethyl ethers in optically pure unusual amino acids [J]. Tetrahedron Letters 1993, 34(34): 5393. [收稿日期] 2010-05-02 [修回日期] 2010-05-27