

杂环氨基酸酯的合成与表征

马养民, 刘斌

(教育部轻工助剂化学与技术重点实验室, 陕西科技大学, 陕西西安 710021)

摘要: 以三种杂环结构的氨基酸、二氯亚砷、甲醇/乙醇为原料, 合成 L-色氨酸甲/乙酯盐酸盐、L-组氨酸甲酯盐酸盐以及 L-脯氨酸甲/乙酯盐酸盐, 产率较高, 并通过核磁共振谱、红外光谱、元素分析对其盐酸盐进行了结构表征, 所得到的氨基酸酯盐酸盐分别用饱和碳酸钠溶液中和、二氯甲烷萃取, 最终得到了三类杂环氨基酸酯。

关键词: 杂环氨基酸, 氨基酸酯盐酸盐, 酯化反应

Synthesis and characterization of heterocyclic amino acid esters

MA Yang-min, LIU Bin

(Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & Technology for Chemical Industry, Ministry of Education, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract L-tryptophan methyl/ethyl ester hydrochloride, L-histidine methyl ester hydrochloride and L-proline methyl/ethyl ester hydrochloride were synthesized by reacting with three kinds of heterocyclic amino acids in a methanol/alcohol in the presence of thionyl chloride, and high yield product was produced. The structures of these compounds were characterized by NMR spectroscopy, IR spectroscopy and elemental analysis. Three types of heterocyclic amino acid esters were prepared by amino acid ester hydrochloride in saturated sodium carbonate, and extracted by methylene chloride.

Key words heterocyclic amino acid, amino acid ester hydrochloride, esterification reaction

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2011)01-0187-03

杂环类氨基酸结构特殊, 其衍生物很多都具有生物活性。由于其独特的理化性质, 使得其在食品、医药、化工等领域的重要性越来越明显地凸现出来。近年来, 杂环类氨基酸类衍生物的合成与应用已成为化学领域研究的热点之一。以氨基酸为起始原料合成肽类或者其它中间体时一般需要将羧基保护起来^[1]。保护羧基可以起到两个作用: 一方面, 在肽合成反应中, 可防止用某些方法活化反应羧基时, 不需要反应的羧基也被活化而带来副反应^[2]; 另一方面, 防止氨基酸自身氨基组分同羧基形成内盐^[3]。保护羧基最常用的方法就是酯化, 因此, 选择合适的酯化方法来实现氨基酸上羧基的保护就显得尤为重要。目前, 关于常见氨基酸的酯化方法报道较多, 而杂环类氨基酸的酯化方法报道较少^[4], 因此我们进行了杂环氨基酸的酯化方法研究。本文采用一种简便快速的方法来合成三类杂环氨基酸酯盐酸盐, 先将羧基转变成活性较高的酰氯, 然后与醇发生亲核取代反应, 生成相应的酯, 由于体系中有氯化氢产生,

与氨基酸上的游离氨基结合成为氨基酸酯的盐酸盐, 稳定性较好, 易于氨基酸酯的保存。进行下一步反应需要脱掉盐酸时, 用饱和碳酸钠溶液对其进行中和, 再用二氯甲烷萃取, 合并有机相, 蒸干溶剂, 就得到了相应的氨基酸酯, 此方法产率较高。

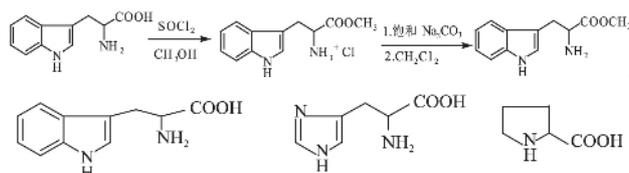


图1 三种杂环氨基酸

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-色氨酸、L-组氨酸、L-脯氨酸 均为生化试剂; 二氯亚砷 使用前重蒸; 无水甲醇、无水乙醇、二氯甲烷 均为分析纯。

核磁共振波谱仪 Bruker 400MHz、傅立叶红外光谱仪 VECTOR-22 德国布鲁克公司; 有机元素分析仪 Vario EL III 德国 Elementar 公司; XT5 显微熔点测定仪 北京市科仪电光仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 甲醇/乙醇-二氯亚砷溶液的制备 在 100mL 的三口烧瓶中加入无水甲醇或乙醇 50mL, 冰盐水中冷却, 保持温度在 0℃ 以下, 开启搅拌器, 用滴液漏

收稿日期 2010-01-04

作者简介: 马养民(1963-), 男, 教授, 主要从事有机合成以及天然产物分离提取研究。

基金项目: 国家自然科学基金(20772075); 教育部科学技术研究重点项目(208144)资助。

斗缓慢滴加新蒸的二氯亚砷 5mL,控制流速在每分钟 15 滴左右,滴完后在 0℃ 以下继续反应 30min,然后慢慢升至室温搅拌 2h。

1.2.2 氨基酸酯盐酸盐的合成 去掉三口瓶上的搅拌器,换上回流冷凝装置(含干燥管),加入沸石,取 20mmol 氨基酸加入到甲醇或乙醇-二氯亚砷溶液中,升温回流,氨基酸溶解完全后持续回流 5h。然后减压蒸馏除去溶剂以及二氯亚砷,得到白色固体或者无色粘稠液体,即为氨基酸酯的盐酸盐,可以在甲醇/乙醇与乙醚的混合溶液进行重结晶(脯氨酸甲/乙酯通过多次重结晶,真空干燥),最后均得到白色固体。

1.3 三种氨基酸酯盐酸盐的表征

1.3.1 L-色氨酸甲酯盐酸盐 白色或略带淡黄色固体,产率 92.8%, m.p. 217~219℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 11.17(s, 1H, indole-NH), 8.70(s, 3H, NH₃⁺), 7.53(d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.38(d, J = 8.0Hz, 1H, ArH), 7.26(s, 1H, indole-CH in 2-moiety), 7.09(m, 1H, ArH), 7.00(m, 1H, ArH), 4.20(t, J = 4.0 Hz, 1H, NH₃⁺-CH), 3.64(s, 3H, OCH₃), 3.31(d, J = 8.0Hz, 2H, CH₂-CHCOOMe), ¹³C NMR δ: 170.1, 136.7, 127.3, 125.3, 120.9, 119.3, 115.7, 112.3, 107.4, 54.7, 51.3, 27.2; IR(KBr), ν, cm⁻¹, 3258, 2955, 1745, 1231; 元素分析, C₁₂H₁₅N₂O₂Cl, 实测值(计算值)/%: C 56.50(56.58); H 6.02(5.94); N 11.12(11.00)。

1.3.2 L-色氨酸乙酯盐酸盐 白色粉末固体,产率 95.1%, m.p. 218~220℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 11.13(s, 1H, indole-NH), 8.60(s, 3H, NH₃⁺), 7.53(d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.37(d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.25(s, 1H, indole-CH in 2-moiety), 7.09(m, 1H, ArH), 7.01(m, 1H, ArH), 4.19(t, J = 4.0 Hz, 1H, NH₃⁺-CH), 4.08(m, J = 8.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.28(d, J = 8.0 Hz, 2H, CH₂-CHCOOEt), 1.10(t, J = 8.0 Hz, 3H, CH₃), ¹³C NMR δ: 169.8, 136.6, 127.3, 125.4, 121.6, 119.0, 118.4, 112.0, 106.8, 62.1, 53.1, 26.6, 14.1; IR(KBr), ν, cm⁻¹, 3284, 2984, 1751, 1244; 元素分析, C₁₃H₁₇N₂O₂Cl, 实测值(计算值)/%: C 58.07(58.10); H 6.46(6.38); N 10.47(10.43)。

1.3.3 L-组氨酸甲酯二盐酸盐 白色粉末固体,产率 96.0%, m.p. 206~208℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 14.81(bris, 2H, imidazole-NH₂⁺), 9.10(s, 3H, NH₃⁺), 7.53(s, 1H, imidazole-CH), 7.09(s, 1H, imidazole-CH), 4.49(s, 1H, NH₃⁺-CH), 3.73(s, 3H, OCH₃), 3.42(m, 2H, CH₂-CHCOOMe), ¹³C NMR δ: 169.0, 134.5, 127.0, 118.5, 53.5, 51.4, 25.4; IR(KBr), ν, cm⁻¹, 3381, 2896, 1765, 1292; 元素分析, C₇H₁₃N₃O₂Cl₂, 实测值(计算值)/%: C 34.79(34.73); H 5.52(5.41); N 17.31(17.36)。

1.3.4 L-脯氨酸甲酯盐酸盐 真空干燥,得白色粉末固体(甲醇:乙醚 = 1:3 重结晶),产率 89.8%, m.p. 70~72℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 6.13(bris, 2H, NH₂⁺), 4.12(m, 1H, Py-CH), 3.67(s, 3H,

OCH₃), 3.35(m, 2H, Py-CH₂), 2.19(m, 2H, Py-CH₂), 1.86(m, 2H, Py-CH₂); ¹³C NMR δ: 169.3, 62.4, 53.4, 48.9, 28.3, 23.4; IR(KBr), ν, cm⁻¹, 3378, 2957, 1738, 1243; 元素分析, C₆H₁₂NO₂Cl, 实测值(计算值)/%: C 43.49(43.51); H 7.42(7.30); N 8.49(8.46)。

1.3.5 L-脯氨酸乙酯盐酸盐 真空干燥,得白色粉末固体(甲醇:乙醚 = 1:3 重结晶),产率 87.6%, m.p. 149~151℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 6.89(bris, 2H, NH₂⁺), 4.26(q, J = 4.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.09(m, 1H, Py-CH), 3.35(m, 2H, Py-CH₂), 2.18(m, 2H, Py-CH₂), 1.85(m, 2H, Py-CH₂), 1.19(t, J = 4.0Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR δ: 168.9, 62.4, 58.8, 45.5, 28.0, 23.3, 14.0; IR(KBr), ν, cm⁻¹, 3382, 2981, 1738, 1241; 元素分析, C₇H₁₄NO₂Cl, 实测值(计算值)/%: C 46.79(46.80); H 7.91(7.86); N 7.76(7.80)。

1.4 盐酸盐的脱除

将氨基酸酯盐酸盐放入小烧杯中,用少量的水溶解,用滴管逐滴加入饱和碳酸钠溶液并振摇,直到加至不再产生沉淀为止,加入适量的二氯甲烷振摇萃取 4 次,合并 4 次萃取的有机相,先用饱和盐水洗涤,再用蒸馏水洗,直到洗涤水的 pH 到 7 左右,无水硫酸钠干燥 5h 后蒸除溶剂,即得到相应的氨基酸酯。

2 结果与讨论

在制备甲醇或乙醇-二氯亚砷溶液的过程中,二氯亚砷的滴加速度和温度对反应的影响比较大,二氯亚砷滴加过快,反应非常剧烈,比较危险,同时体系会产生大量的热,容易有副产物产生,因此,滴加速度应尽量缓慢,控制在大约每分钟 15 滴左右,同时,滴加过程中,反应在冰盐浴中进行,保持温度在 0℃ 以下。

得到的色氨酸甲/乙酯盐酸盐、组氨酸甲酯二盐酸盐蒸干溶剂即为固体,纯度较高,无需处理即可用于下一步反应,而脯氨酸甲/乙酯盐酸盐除去溶剂后仍为无色粘稠状液体,可以采用甲醇-乙醚混合溶剂反复重结晶的方法得到,也可把除掉溶剂后的产物重新加入醇与二氯亚砷的混合溶液进行加热回流 1h,蒸干得到较高纯度的固体。

氨基酸酯盐酸盐脱盐酸方法文献报道的主要有以下几种:通氨气法^[5]、浓氢氧化钠中和法^[5]、三乙胺中和法^[6-7]和碳酸钠中和法^[8]等。通氨气法为非均相反应,不容易带入杂质,但需要氨气发生装置,较为繁琐。经过我们对后三种方法实验,发现浓氢氧化钠中和法操作简单,但这种方法会发生部分皂化。三乙胺中和法是在氨基酸酯盐酸盐的有机溶液中加入三乙胺,产生沉淀,此方法缺点在于副产物三乙胺盐酸盐会部分溶于有机相,同时过量的三乙胺也不易蒸除完全。而选用饱和碳酸钠法除盐酸,一方面饱和碳酸钠溶液碱性适中,不容易发生皂化;另一方面,脱盐酸后有机相经几次水洗就能很好地分离。在脱盐过程中,萃取操作要少量多次,这样能够得到较高的萃取效率。

3 结论

将杂环氨基酸分别加入甲醇/乙醇与二氯亚砷的混合溶液中加热回流,合成出三种杂环氨基酸(色氨酸、组氨酸、脯氨酸)甲酯以及乙酯的盐酸盐,实现了较高的产率和纯度,如无特殊要求不需纯化即可进行下一步反应,并寻找了一种较为简便安全的方法对氨基酸酯盐酸盐脱盐酸,利用饱和碳酸钠中和盐酸,二氯甲烷萃取,少量多次进行,萃取率较高。

参考文献

[1] 张小琴.氨基酸快速酯化方法的研究[J].安庆师范学院学报:自然科学版,1997,3(4):66-68.
 [2] 思洋,刘乐乐,张廊,等.氨基酸甲乙酯的合成及纯化[J].内蒙古医学院学报,2005,27(1):33-34.

[3] 尚岩,王春颖.氨基酸酯合成方法最新研究进展[J].哈尔滨理工大学学报,2008,13(2):107-111.
 [4] 苏为科,夏建胜,边高峰,等.一种杂环羧酸酯和杂环氨基酸酯的合成方法[P].中国专利101177370A,2008-05-14.
 [5] Hülmann G. Preparation of free ester of amine acids from their hydrochlorides[J].Z Naturforsch,1946(1):682-683.
 [6] Fujii T, Okawa K. Synthesis 3,6-bis(α-hydroxyethyl)-2,5-dioxopiperazine[J].Bull Chem Soc Japan,1966,39(7):1598-1599.
 [7] Degraw J, Goodman L, Baker B R. Potential anticancer agents[J].Org Chem,1962,27:576-580.
 [8] Bergel F, Peutherer M A. Interaction between carbonyl groups and biologically essential substituent[J].Chem Soc,1964,3965-3972.

(上接第186页)

表5 正交实验设计及结果分析

实验号	A'	B'	C'	D'	胞外多糖产量 (g/L)
1	1	1	1	1	3.76
2	1	2	2	2	3.84
3	1	3	3	3	3.66
4	2	1	2	3	3.36
5	2	2	3	1	3.49
6	2	3	1	2	3.87
7	3	1	3	2	3.69
8	3	2	1	3	3.71
9	3	3	2	1	3.46
k ₁	3.753	3.603	3.780	3.570	
k ₂	3.573	3.680	3.553	3.800	
k ₃	3.620	3.663	3.613	3.577	
R	0.180	0.077	0.227	0.230	

正交实验结果说明,葡萄糖质量浓度是灰树花深层发酵产胞外多糖的最显著因素,其余三种因素的显著性影响程度依次是蛋白胨、无机盐配比、天麻质量浓度。从表5可知,四因素的最佳组合为:A₁B₂C₁D₂,即葡萄糖质量浓度30g/L,蛋白胨质量浓度5.5g/L,天麻浓度7g/L,KH₂PO₄质量浓度1.5g/L,MgSO₄质量浓度0.75g/L。按最佳发酵条件,分成A、B两组进行灰树花液体深层发酵,B组为不添加天麻的对照组。9d后测得A组胞外多糖质量浓度平均值为3.91g/L,B组的平均值为3.78g/L。与对照组相比A组胞外多糖产量提高了3.4%。

3 结论

通过在灰树花深层发酵培养基中加入天麻的探索,得出添加天麻可提高灰树花产胞外多糖产量。并通过Plackett-Burman筛选和正交实验,确定了添加天麻后的最佳发酵工艺条件:葡萄糖质量浓度30g/L,蛋白胨质量浓度5.5g/L,天麻浓度7g/L,KH₂PO₄质量浓度1.5g/L,MgSO₄质量浓度0.75g/L,培养9d,此时胞外多糖含量可达3.91g/L,与对照组相比胞外多糖产量提高了3.4%。实验表明,添加适

量的天麻到灰树花发酵液中可促进其胞外多糖的产生,为今后进一步研究如何提高灰树花产胞外多糖奠定基础。

参考文献

[1] 张松.食用菌学[M].广州:华南理工大学出版社,2000:23-25.
 [2] 庄毅.中国药用真菌概况[J].中国食用菌,2001,20(2):3-5.
 [3] Matsui K, Kodama N, Nanba H. Effects of maitake (*Grifolafrondosa*)D-fraction on the carcinoma angiogenesis[J].Cancer Letters,2001,172:193.
 [4] Ohno N, Iino K, Takeyama T, et al. Study on fermentation conditions of *Grifolafrondosa* [J]. Chem Pharma Bull,1984,32(3):1142.
 [5] Nanba H. Maitake mushroom immunotherapy to prevent from cancer growth and metastasis[J].1995(6):1.
 [6] 邓超, 鄢敏辰. 食用菌深层发酵及其多糖活性研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(15):4622-4625.
 [7] 周鹏, 谢明勇. 多糖的生物活性[J].食品研究与开发,2001,22(2):6-8.
 [8] 陈士良. 药用真菌灰树花深层发酵技术及其抗肿瘤多糖的研究[D].无锡轻工大学博士学位论文,2000.
 [9] 谢宗万. 中药材品种论述(上册)[M].上海:上海科学技术出版社,1990:367-368.
 [10] 杨海龙, 吴天祥, 章克昌. 中药提取液对灵芝深层发酵的影响[J].微生物学报,2003(4):519-522.
 [11] 王兴红, 李旗德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J].中草药,2001,32(3):267-268.
 [12] 周德庆. 微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993:38-44.
 [13] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册[M].北京:化学工业出版社,2002:131-133.
 [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999:10-12.