

四种缩合试剂对含 N-Me 二肽的合成

刁建忠, 许文杰, 廖小建, 徐石海

(暨南大学化学系, 广东 广州 510632)

[摘 要] 用 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)/1-羟基-苯并-三氮唑(HOBt)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)/HOBt、2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)、3-(二乙氧基磷酰基)-氧-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT) 4种常用缩合试剂合成了含 N-Me 二肽 Boc-Leu-N-Me-Leu-OBzl, 产率分别为 73.5% ~ 92.8%, 65.2% ~ 85.9%, 38.9%, 87.8%。比较发现反应物 Boc-Leu-OH、H-N-Me-Leu-OBzl 与缩合试剂 DCC/HOBt 的物质的量比在 2.0:1.0:2.0 时产率最高。利用此比例合成了 3 个立体异构体, 产率较高。

[关键词] 缩合试剂; 亮氨酸; 肽

[中图分类号] O62 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)03-0298-04

Four coupling reagents for synthesis of N-methyldipeptide

DIAO Jian-zhong, XU Wen-jie, LIAO Xiao-jian, XU Shi-hai

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] Dipeptide Boc-Leu-N-Me-Leu-OBzl containing N-Me was synthesized with four different coupling reagents. After activated by coupling reagents such as DCC/HOBt, EDC/HOBt, EEDQ and DEPBT, the yield were 73.5% ~ 92.8%, 65.2% ~ 85.9%, 38.9%, 87.8%, respectively. The yield was higher than any of other coupling reagents when the molar ratio of Boc-Leu-OH/ H-N-Me-Leu-OBzl/ DCC/HOBt was 2.0:1.0:2.0. Three stereoisomers were gotten by coupling reagent DCC/HOBt with high yield when the molar ratio was 2.0:1.0:2.0.

[Key words] coupling reagent; leucine; peptide

人们发现许多新生物活性肽的基本结构中大多数都含有 N-烷基氨基酸片段^[1-2], 肽化学家也利用 N-烷基化作为一种修饰方法以加强肽的生物活性^[3-4]. N-烷基化与肽的生物活性有很大的关系. 例如, 有研究表明, 两个 N-甲基氨基酸所形成的二肽能有效抑制蛋白质水解, 提高药物口服效果并延长药物作用时间^[5]. 然而 N-烷基氨基酸及其衍生物在自然界是难以得到的, 且它们的空间位阻较大, 在进行偶合反应时相对比较困难^[6]. 随着肽学科的

发展, 不断有新的缩合试剂出现, 含有 N-烷基氨基酸片段肽不断被合成, 产率也不断被提高. 本研究将对几种常用缩合试剂 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)/1-羟基-苯并-三氮唑(HOBt), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)/HOBt, 2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ), 3-(二乙氧基磷酰基)-氧-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT)在不同条件下合成含 N-Me 二肽 Boc-Leu-N-Me-Leu-OBzl 的产率影响进行探讨.

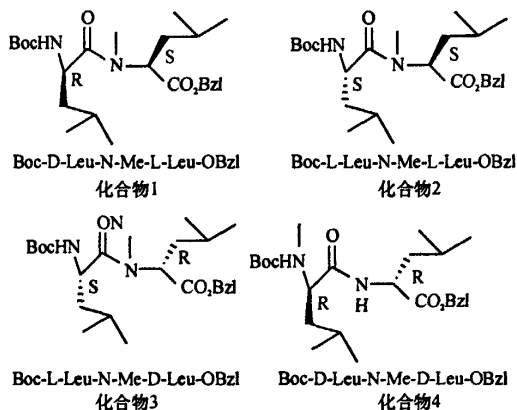
[收稿日期] 2008-09-23

[基金项目] 国家 863 基金项目(2006AA09Z408); 国家自然科学基金项目(20772048); 广东省自然科学基金项目(06025194, 2005A30503001, 2006Z3-E 4041)

[作者简介] 刁建忠(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物合成. 通讯作者: 徐石海, 教授

1 仪器与材料

Bruker Biospin International AG 的 AVANCE 500 (500 MHz) 核磁共振谱仪 (CDCl₃, DMSO 为溶剂, TMS 为内标); WZZ-2A 上海永亨数字自动旋光仪; X-6 显微熔点测定仪; 青岛化工厂的柱层析硅胶 (200-300 目); Boc-(D, L)-Leu-OH 和 H-N-Me-(D, L)-Leu-OBzl · TosOH 购自上海吉尔生化公司; N, N-二异丙基乙胺 (DIEA), N-甲基吗啉 (NMM); 缩合试剂 N, N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-羟基-苯并三氮唑 (HOBt)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC)、2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ)、3-(二乙氧基磷酰基)-氧-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮 (DEPBT) 购自上海延长生化公司; 溶剂四氢呋喃 (无水)、CH₂Cl₂ (无水)。化合物 1~4 结构式如下:



2 实验方法

2.1 化合物 1 的合成

(1) DCC 法合成化合物 1^[7-9] 准确称取 2.442 g (6 mmol) 的 H-N-Me-L-Leu-OBzl · TosOH 投于 100 mL 的圆底烧瓶中, 氮气保护下用无水 CH₂Cl₂ 溶解, 利用 DIEA 调 pH 值到 7~8, 接着加入 Boc-D-Leu-OH 1.290 g (6 mmol) 和 HOBt^[10] 0.89 g (6.6 mmol), 然后 0 °C 下搅拌。半小时后加入 DCC 1.36 g (6.6 mmol), TLC 监测反应进程。10 h 后反应完全, 先减压旋干, 再用 EtOAc 溶解, 饱和 NaCl 溶液洗涤, 溶液分层后取出有机相, 反复用 EtOAc 提取水层, 合并 EtOAc。EtOAc 相再依次用饱和 NaHCO₃ 洗 3 次, 饱和柠檬酸洗 2 次, 饱和 NaCl 洗至中性, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 减压浓缩得粗产物。硅胶柱层析, V_{正己烷}:V_{丙酮} = 3:1 的洗脱剂洗脱,

得无色晶体即化合物 1。实验结果见表 1。[α]_D²⁰ - 0.7°, m. p. 49.0~49.9 °C。¹H NMR (DMSO): 7.35 (m, 5H), 6.40 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.22 (dd, J = 4.5 Hz, 1H), 4.32 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 1.82 (m, 1H), 1.59 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.35 (m, 9H), 1.23 (m, 1H), 0.86 (m, 12H); ¹³C NMR (CDCl₃): 173.96 (1C), 171.31 (1C), 155.57 (1C), 135.65 (1C), 128.71 (1C), 128.59 (1C), 128.26 (1C), 128.08 (2C), 79.42 (1C), 66.81 (1C), 55.29 (1C), 49.14 (1C), 42.85 (1C), 37.40 (1C), 31.66 (1C), 28.35 (3C), 25.05 (1C), 24.65 (1C), 23.39 (1C), 23.26 (1C), 21.90 (1C), 21.30 (1C)。

(2) EDC 法合成化合物 1^[11-13] 将 4 mmol 的 H-N-Me-D-Leu-OBzl · TosOH 溶于 50 mL 的无水 CH₂Cl₂ 中, 接着加入 40 mL 的水, 然后加入 Boc-D-Leu-OH 0.924 g (4 mmol) 和 HOBt 0.54 g (4 mmol), 然后 0~5 °C 下搅拌。半小时后加入 EDC 0.84 g (4.4 mmol), TLC 监测反应进程。24 h 后反应完全, 加入 0.5 mol/L 的盐酸 20 mL, 溶液分层后取出有机相, 反复用 EtOAc 提取水层, 合并 EtOAc。EtOAc 相再依次用饱和 NaHCO₃ 洗 3 次, 饱和柠檬酸洗 2 次, 饱和 NaCl 洗至中性, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 减压浓缩得粗产物。硅胶柱层析, V_{正己烷}:V_{丙酮} = 3:1 的洗脱剂洗脱, 得无色晶体即化合物 1, 结果见表 1。m. p. 48.7~50.0 °C。产品结构经¹H NMR 证实。

(3) EEDQ 法合成化合物 1^[14-15] 在 100 mL 圆底烧瓶中加入 Boc-D-Leu-OH 0.747 g (3 mmol) 和 EEDQ 0.742 g (3 mmol), 无水 THF 溶解, 搅拌。另 1 个烧瓶中加入 H-N-Me-D-Leu-OBzl · TosOH 0.814 g (2 mmol), 无水 THF 及足量 NMM。搅拌 0.5 h, 把两个烧瓶中的溶液混合, 搅拌, TLC 监测反应进程。24 h 后反应完全, 先减压旋蒸, 再用 EtOAc 溶解, 加入饱和 NaCl 溶液, 振荡静置, 溶液分层后取出有机相, 反复用 EtOAc 萃取水相 (2 × 20 mL), 合并 EtOAc。EtOAc 相再依次用饱和 NaHCO₃ 洗 2 次, 饱和柠檬酸洗至 TLC 检测无 EEDQ, 饱和 NaCl 洗至中性, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 减压浓缩得粗产物。硅胶柱层析, V_{正己烷}:V_{丙酮} = 3:1 的洗脱剂洗脱, 得无色晶体即化合物 1, 结果见表 1。m. p. 48.9~50.4 °C。产品结构经¹H NMR 证实。

(4) DEPBT 法合成化合物 1^[16-17] 将 4 mmol (1.628 g) 的 H-N-Me-D-Leu-OBzl · TosOH 溶于适量的 THF 中, 置于 0 °C 冰水中搅拌, 加入 DEPBT

2.4 g(8 mmol),然后用 DIEA 调 pH 值到 7~8,另 1 个烧瓶中加入 Boc-D-Leu-OH 1.017 g(4.4 mmol),无水 THF 溶解,搅拌 0.5 h,把两个烧瓶中的溶液混合,搅拌,TLC 监测反应进程. 4 h 后反应完全,先减压旋蒸,再用 EtOAc 溶解,加入饱和 NaCl 溶液,振摇静置,溶液分层后取出有机相,反复用 EtOAc 萃取水相,合并 EtOAc. EtOAc 相再依次用质量分数 5% 的柠檬酸,水,质量分数 5% Na_2CO_3 溶液,水及饱和 NaCl 洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤,减压浓缩得粗产物. 硅胶柱层析, $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}}=3:1$ 的洗脱剂洗脱,得无色晶体即化合物 1,结果见表 1. m. p. 48.5~50.5 °C. 产品结构经 ^1H NMR 证实.

表 1 化合物 1 的制备实验结果

序号	缩合试剂	Boc-Leu-OH: H-N-CH ₃ -Leu-OBzl :缩合试剂	m/g	产率/%
1	DCC	1.0 : 1.0 : 1.1	2.19	81.3
2	DCC	1.5 : 1.0 : 1.5	2.11	78.3
3	DCC	2.0 : 1.0 : 2.0	2.50	92.8
4	DCC	2.5 : 1.0 : 2.5	1.98	73.5
5	EDC	1.0 : 1.0 : 1.1	1.37	76.4
6	EDC	1.5 : 1.0 : 2.0	1.54	85.9
7	EDC	2.0 : 1.0 : 2.0	1.44	80.3
8	EDC	2.5 : 1.0 : 2.5	1.17	65.2
9	EEDQ	1.5 : 1.0 : 1.5	0.35	38.9
10	DEPBT	1.1 : 1.0 : 2.0	1.57	87.8

2.2 化合物 2 的合成

用合成化合物 1 相同的 DCC 法合成化合物 2. 粗产物用硅胶柱层析, $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}}=3:1$ 的洗脱剂洗脱,吹干,得无色晶体即化合物 2,并得到单晶^[18],产率是 84.9%. $[\alpha]_D^{20}$ 8.2°, m. p. 66.5~68.0 °C. ^1H NMR(DMSO): 7.35(m, 5H), 6.97(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.23(dd, $J=11.3, 3.0$ Hz, 1H), 5.09(m, 2H), 4.33(m, 1H), 2.89(s, 3H), 1.76(m, 1H), 1.58(m, 2H), 1.45(m, 1H), 1.34(s, 9H), 1.20(m, 2H), 0.93(m, 12H); ^{13}C NMR(CDCl_3): 173.94(1C), 171.57(1C), 155.75(1C), 135.44(1C), 128.58(1C), 128.39(1C), 128.27(1C), 128.02(2C), 79.46(1C), 66.93(1C), 54.44(1C), 48.92(1C), 41.99(1C), 36.89(1C), 30.79(1C), 28.26(3C), 24.70(1C), 24.52(1C), 23.33(1C), 23.25(1C), 21.76(1C), 21.34(1C).

2.3 化合物 3 的合成

用合成化合物 1 相同的 DCC 法合成化合物 3.

粗产物用硅胶柱层析, $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}}=3:1$ 的洗脱剂洗脱,得无色晶体即化合物 3,产率是 88.5%. $[\alpha]_D^{20}$ -0.5°, m. p. 51.0~52.0 °C. ^1H NMR(CDCl_3): 7.35(m, 5H), 6.92(d, $J=8.5$ Hz, 1H), 5.10(s, 2H), 4.92(dd, $J=4.5$ Hz, 1H), 4.43(m, 1H), 2.97(s, 3H), 1.81(m, 1H), 1.59(m, 2H), 1.42(m, 2H), 1.36(m, 9H), 1.24(m, 1H), 0.86(m, 12H); ^{13}C NMR(CDCl_3): 173.95(1C), 171.55(1C), 155.75(1C), 135.48(1C), 128.58(1C), 128.45(1C), 128.38(1C), 128.26(2C), 79.46(1C), 66.92(1C), 54.49(1C), 48.94(1C), 41.98(1C), 36.93(1C), 30.80(1C), 28.33(1C), 28.26(1C), 28.20(1C), 24.72(1C), 24.54(1C), 23.31(1C), 23.22(1C), 21.78(1C), 21.36(1C).

2.4 化合物 4 的合成

用合成化合物 1 相同的 DCC 法合成化合物 4. 粗产物用硅胶柱层析, $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{丙酮}}=3:1$ 的洗脱剂洗脱,得无色晶体即化合物 4,产率是 82.7%. $[\alpha]_D^{20}$ 10.7°, m. p. 69.0~69.6 °C. ^1H NMR(DMSO): 7.35(m, 5H), 6.96(d, $J=9.00$ Hz, 1H), 5.25(m, 1H), 5.09(m, 2H), 4.32(m, 1H), 2.97(s, 3H), 1.77(m, 1H), 1.61(s, 2H), 1.66(m, 1H), 1.35(s, 9H), 1.32(s, 1H), 1.22(m, 1H), 0.80(m, 12H); ^{13}C NMR(CDCl_3): 173.94(1C), 171.29(1C), 155.55(1C), 135.60(1C), 128.56(1C), 128.45(1C), 128.40(1C), 128.23(1C), 128.06(1C), 79.40(1C), 66.79(1C), 55.23(1C), 49.10(1C), 42.81(1C), 37.34(1C), 31.63(1C), 28.43(1C), 28.38(1C), 28.32(1C), 25.01(1C), 24.75(1C), 23.37(1C), 23.31(1C), 21.86(1C), 21.26(1C).

3 结果与讨论

在化合物 1 的合成过程中,DCC 法的产率为 73.5%~92.8%,EDC 的产率为 65.2%~85.9%,EEDQ 的产率为 38.9%,DEPBT 的产率为 87.8%. 其中,EEDQ 的产率最低,DEPBT 虽然合成产率好,可成本太高,DCC 和 EDC 的产率高,价格低廉,是比较适合的缩合试剂. 在合成中经过对反应物和缩合试剂的比例优化发现:反应物 Boc-Leu-OH、H-N-Me-Leu-OBzl 与缩合试剂 DCC/HOBt 的物质的量比在 2:2:1 时产率最高达 92.8%. 利用此比例我们合成了化合物 1 的 3 个新的不同构型的化合物 2~4,

产率较高。

由此,DCC/HOBt 作为一种经典的偶合试剂同样适合 N-Me 肽的合成,且产率较高。从经济的角度看,给以后合成工艺的扩大提供了可能。

[参考文献]

- [1] LACKNER H. Three-dimensional structure of the actinomycins [J]. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 1975, 14(6): 375-386.
- [2] WILLIAMS P G, YOSHIDA W Y, MOORE R E, et al. Isolation and structure determination of obyanamide, a novel cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(1): 29-31.
- [3] ROGER D T, DANIEL H R. Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl) phosphinic chloride (1) as a coupling reagent for N-alkyl amino acids [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107(14): 4342-4343.
- [4] LIU Shou-xin, GU Wen-xin, DENISE L, et al. N-Methylsalsalvamide a peptide analogues. Potent new antitumor agents [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(10): 3630-3638.
- [5] MAZUR R H, JAMES P A, TYNER D A, et al. Bradykinin analogues containing N-alpha-methyl amino acid [J]. *J Med Chem*, 1980, 23(7): 758-763.
- [6] ALI F E, BENNETT D B, CALVO R R, et al. Conformationally constrained peptides and semipeptides derived from RGD as potent inhibitors of the platelet fibrinogen receptor and platelet aggregation [J]. *J Med Chem*, 1994, 37(6): 769-780.
- [7] 黄惟德, 陈常庆. 多肽合成 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 108.
- [8] 刘丽艳, 凤 侠, 赵桂琴, 等. 活性肽 RGD 的液相合成 [J]. *化学试剂*, 2006, 28(1): 55-56.
- [9] BENEDICT M, GERALD P. Total synthesis of molamide, a reverse prenyl substituted cytotoxic cyclic peptide from *didemnum molle* [J]. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40(50): 9317-9320.
- [10] JI Jian-guo, ZHANG De-yi, YE Yun-hua, et al. Studies on the reactions of HOBt, HOOBt, HOSu with dichloral-kane solvents [J]. *Tetrahedron Letters*, 1998, 39(36): 6515-6516.
- [11] HO Guo-jie, EMERSON K M, ATHRE D J. Carbodiimide-mediated amide formation in a two-phase system. A high-yield and low-racemization procedure for peptide synthesis [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1995, 60(11): 3569-3570.
- [12] SHEEHAN J C, PRESTON J, CRUICKSHANK P A. A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1965, 87(11): 2492-2493.
- [13] CARPINO L C. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115(10): 4397-4398.
- [14] 杨大成, 范 莉, 钟裕国. 全保护 RGD 三肽的合成方法研究 [J]. *有机化学*, 2003, 23(5): 493-498.
- [15] LIU Qian, FANG Gang, WU Li-ping, et al. Study on the stereoselective synthesis of carbapenem sidechain (2S, 4S)-4-acetylsulphonyl-2-[(S)-1-phenylethylcarbamoyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid 4-nitrobenzyl ester [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15(12): 1395-1396.
- [16] 叶蕴华, 范崇旭, 张德仪, 等. 四个有机磷缩合试剂的合成及其在生物活性肽合成中的应用 [J]. *高等学校化学学报*, 1997, 18(7): 1086-1092.
- [17] YE Yun-hua, LI Hai-tao, JIANG Xiao-hui. DEPBT as an efficient coupling reagent for amide bond formation with remarkable resistance to racemization [J]. *Biopolymers*, 2005, 80(2): 172-178.
- [18] LIAO Xiao-jian, XU Wen-jie, XU Shi-hai. Benzyl 2-[[2-(tert-butoxycarbonylamino)-4-methylpentanoyl]methylamino]-4-methyl-pentanote [J]. *Acta Crystallogr E*, 2007, 63: O3313.

[责任编辑:黄建军]