

# *N*-叔丁氧羰基-*O*-苄基-*L*-苏氨酸的制备及其在合成奥曲肽中的应用研究<sup>Δ</sup>

邓桂茹\*, 张庆云, 李蓉, 韩香<sup>#</sup>(武警后勤学院基础部化学教研室, 天津 300162)

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1556-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.08

**摘要** 目的:合成*N*-叔丁氧羰基-*O*-苄基-*L*-苏氨酸(化合物1),并将其作为原料合成多肽药物奥曲肽。方法:以侧链羟基和氨基均被保护的苏氨酸为原料,分别采用混合酸酐法、四氢锂铝(LiAlH<sub>4</sub>)法以及卡特缩合剂(BOP)法进行还原反应,柱层析分离纯化,合成目标化合物,经红外光谱(IR)、核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)及质谱(MS)进行表征。合成的目标化合物经脱除氨基保护,用于奥曲肽合成。结果:混合酸酐法、LiAlH<sub>4</sub>法、BOP法合成目标化合物1的收率分别为83.2%、73.4%、69.5%,纯度分别为99.0%、98.8%、98.5%,并经过结构表征确证;奥曲肽合成收率为6%,纯度>98%。结论:混合酸酐法合成化合物1的操作简便、收率高、纯度高,并成功应用于奥曲肽的合成。

**关键词** *N*-叔丁氧羰基-*O*-苄基-*L*-苏氨酸;合成;奥曲肽;BOP法;混合酸酐法;四氢锂铝法

## Study on the Preparation of *N*-Boc-*O*-Benzyl-*L*-Threoninol and Its Application in the Synthesis of Octreotide

DENG Gui-ru, ZHANG Qing-yun, LI Rong, HAN Xiang (Dept. of Chemistry, Basic Section, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To synthesize *N*-Boc-*O*-Benzyl-*L*-Threoninol (compound 1), and to apply it as raw material in the synthesis of octreotide. METHODS: Using threonine with protected side-chain hydroxyl group and amino group as raw material, the reduction reaction was carried out with mixed anhydride method, LiAlH<sub>4</sub> method and BOP method. Then the purification was performed on column chromatography to synthesize aimed compound, which was characterized with IR, <sup>1</sup>H-NMR and MS. Then the aimed compound was used as material in octreotide synthesis after the cleavage of its amino-protecting group. RESULTS: The yields of aimed compound 1 by mixed anhydride method, LiAlH<sub>4</sub> method and BOP method were 83.2%, 73.4%, 69.5%, and the purities were 99.0%, 98.8% and 98.5%. After structure characterization, the overall yield of octreotide was 6% and its purity was higher than 98%. CONCLUSIONS: The mixed anhydride method is simple, with high yield and purity for the synthesis of compound 1, and the obtained compound 1 is used for octreotide synthesis successfully.

**KEY WORDS** *N*-Boc-*O*-Benzyl-*L*-Threoninol; Synthesis; Octreotide; BOP method; Mixed anhydride method; LiAlH<sub>4</sub> method

氨基酸是一种重要的氨基酸衍生物,其可作为非天然氨基酸构件对许多生物活性多肽进行结构修饰,合成具有抗酶解的假肽(Pseudopeptide)<sup>[1-2]</sup>,进而发展成为具有临床应用价值的创新药物。例如,临床上广泛应用于治疗上消化道出血的多肽药物奥曲肽(Octreotide)就是从天然生长抑素(Somatostatin)14肽改造而来,即是把C末端苏氨酸(Thr)还原成了苏氨酸(Thr-ol)结构。手性氨基酸及其衍生物不仅可以作为药物合成中重要的原料和中间体,因其具有良好配位能力的N原子和C原子,还能作为手性助剂用于不对称催化反应<sup>[3-4]</sup>,在药物化学中广泛应用。目前文献<sup>[5]</sup>上报道制备氨基酸的方法主要是用氨基酸酯的还原,但这种方法对于含侧链羟基的丝氨酸和苏氨酸还原为丝氨酸和苏氨酸的效果均不理想,难以分离纯化,收率也较低(<30.3%)。本研究采用侧链羟基和氨基均被保护的苏氨酸[Boc-Thr(Bzl)-OH]为原料,通过改变反应条件,寻求一条简便、高效地合成*N*-叔丁氧羰基-*O*-苄基-*L*-

苏氨酸[Boc-Thr(Bzl)-ol],化合物1}的工艺路线,并将其作为原料合成奥曲肽。

## 1 材料

### 1.1 仪器

YANACO-S3显微熔点仪(日本岛津公司);170-SX型傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪(美国Nicolet公司);MERCURY-300核磁共振(NMR)仪[美国Varian公司,内标:四甲基硅烷(TMS)];Autospec-Ultima ETOF质谱(MS)仪(英国Micromass公司);Perkin-Elmer 341 LC旋光仪(美国珀金-埃尔默公司)。

### 1.2 药品与试剂

合成使用的叔丁氧羰基(Boc)保护氨基酸、缩合试剂均从上海吉尔生化有限公司购入,氯甲酸乙酯(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)、氯甲酸异丁酯、*N*-甲基吗啉(NMM)从Alfa Aesar(天津)化学有限公司购入,卡特缩合剂(BOP)、四氢锂铝(LiAlH<sub>4</sub>)、硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>)均为美国Sigma公司产品,以上试剂均为分析纯;其余溶剂均为市售分析纯,经重蒸处理;层析硅胶(160~200目)为青岛海洋化工厂产品。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验设计

以Boc-Thr(Bzl)-OH为原料合成化合物1,反应体系分别采

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21142011)

\* 讲师,硕士。研究方向:医用化学。电话:022-60578048。

E-mail: dengguiuru@mail.nankai.edu.cn

<sup>#</sup> 通信作者:副教授,博士。研究方向:多肽药物化学。电话:022-60578044。E-mail: hxonly@126.com

用混合酸酐法、LiAlH<sub>4</sub>法以及BOP法,并比较合成收率及纯度。

### 2.1.1 混合酸酐法合成化合物1。合成路线见图1。

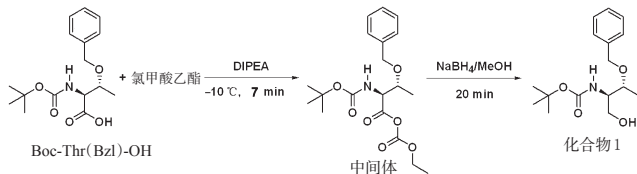


图1 混合酸酐法合成化合物1的路线图

Fig 1 The synthesis scheme of compound 1 by mixed anhydride method

将Boc-Thr(Bzl)-OH 1.546 g(5 mmol)溶于25 ml无水四氢呋喃(THF)中, -10 °C冰盐浴下加入二异丙基乙胺(DIPEA)0.877 ml(5 mmol)及氯甲酸乙酯0.475 ml(5 mmol), 搅拌7 min, 后加入干燥的NaBH<sub>4</sub> 0.565 g(15 mmol), 维持0 °C, 滴加甲醇(MeOH)50 ml, 20 min滴加完毕。搅拌15 min, 减压蒸除有机溶剂, 加蒸馏水25 ml, 乙酸乙酯(EtOAc)萃取3次, 合并乙酸乙酯层, 依次用饱和NaHCO<sub>3</sub>、水、1 mol/L HCl、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离得到淡黄色透明油状物1.227 g。经薄层色谱(TLC)分析为单一斑点, 比移值(R<sub>f</sub>)=0.67[EtOAc-石油醚(PE)(2:1)], 合成收率:83.2%, 光学纯度:99.0%。

合成产物经IR表征:3 429 cm<sup>-1</sup>, 1 105 cm<sup>-1</sup>, 2 933 cm<sup>-1</sup>, 2 873 cm<sup>-1</sup>, 3 018 cm<sup>-1</sup>, 1 496 cm<sup>-1</sup>, 1 460 cm<sup>-1</sup>, 1 442 cm<sup>-1</sup>, 893 cm<sup>-1</sup>, 864 cm<sup>-1</sup>, 1 192 cm<sup>-1</sup>, 1 635 cm<sup>-1</sup>。

合成产物经<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δppm, JHz)表征:7.28~7.4(m, 5H, Ar-H), 5.1(br, 1H, -NH-), 4.63(d, 1H, J=11.4, -O-CH<sub>2</sub>-Ar), 4.38(d, 1H, J=11.4, -O-CH<sub>2</sub>-Ar), 3.84(m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH-O-), 3.74(m, 1H, -NH-CH-CH<sub>2</sub>OH), 3.648(m, 2H, -CH<sub>2</sub>OH), 1.445(s, 9H, -Boc), 1.26(d, 3H, J=6.3, -CH<sub>3</sub>)。

合成产物经快原子轰击(FAB)-MS表征:质荷比(m/z)为296[M+H]<sup>+</sup>。

### 2.1.2 LiAlH<sub>4</sub>法合成化合物1。合成路线见图2。

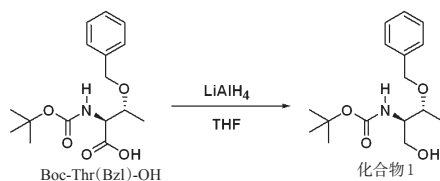


图2 LiAlH<sub>4</sub>法合成化合物1的路线图

Fig 2 The synthesis scheme of compound 1 by LiAlH<sub>4</sub> method

称量LiAlH<sub>4</sub> 0.380 g(10.0 mmol)于干燥三口圆底烧瓶中, 加入无水THF 5 ml, 油浴80 °C加热回流(回流管上端加干燥管)。将Boc-Thr(Bzl)-OH 0.927 g(3.0 mmol)溶于少量无水THF, 于恒压漏斗中缓慢加入反应瓶, 搅拌回流, 1.5 h时补加LiAlH<sub>4</sub>, 又有气泡产生, 2 h时反应毕。加入10%KOH溶液, 加热回流20 min, 过滤, 滤饼用THF 20 ml洗涤, 滤饼中再加入40 ml THF回流20 min, 重复1次, 合并滤液及洗液, 减压回收溶剂。剩余物中加入二氯甲烷(DCM)40 ml, 搅拌溶解, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离得到淡黄色透明油状物0.650 g。经TLC分析为单一斑点, R<sub>f</sub>=0.65[EtOAc-PE(2:1)], 合成收率:73.4%, 光学纯度:98.8%。IR、

<sup>1</sup>H-NMR表征数据与“2.1.1”项下一致。FAB-MS:m/z为296[M+H]<sup>+</sup>。

### 2.1.3 BOP法合成化合物1。合成路线见图3。

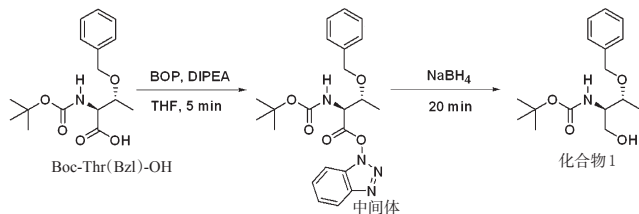


图3 BOP法合成化合物1的路线图

Fig 3 The synthesis scheme of compound 1 by BOP method

将Boc-Thr(Bzl)-OH 0.618 g(2 mmol)与BOP 0.973 g(2.2 mmol)溶于10 ml无水THF中, 加入DIPEA 0.42 ml(2.4 mmol), 室温下搅拌反应5 min。后加入干燥的NaBH<sub>4</sub> 0.228 g(6.0 mmol), 反应20 min后, 滴加甲醇50 ml, 10 min滴加完毕, 搅拌15 min。蒸除有机溶剂, 加蒸馏水100 ml, EtOAc提取3次, 合并EtOAc层, 依次用1 mol/L HCl、水、饱和NaHCO<sub>3</sub>、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离得到淡黄色透明油状物0.410 g。经TLC分析为单一斑点, R<sub>f</sub>=0.66[EtOAc-PE(2:1)], 合成收率:69.5%, 光学纯度:98.5%。IR、<sup>1</sup>H-NMR表征数据与“2.1.1”项下一致。FAB-MS:m/z为296[M+H]<sup>+</sup>。

### 2.2 化合物1的最佳合成路线条件

综上, 与LiAlH<sub>4</sub>法、BOP法相比, 混合酸酐法反应迅速、经济实用、操作简便、合成收率高、对保护基没有影响, 因此选用混合酸酐法合成化合物1。最佳工艺条件: 将Boc-Thr(Bzl)-OH(20 mmol)溶于80 ml无水THF中, 冰盐浴下加入NMM(20 mmol)及氯甲酸丁酯(20 mmol), 搅拌7 min; 后加入干燥的NaBH<sub>4</sub>(2.28 g, 60 mmol), 维持0 °C, 滴加甲醇200 ml, 30 min滴加完毕, 搅拌15 min; 蒸除有机溶剂, 加蒸馏水200 ml, EtOAc提取3次, 合并EtOAc层, 依次用饱和NaHCO<sub>3</sub>、水、1 mol/L HCl、饱和NaCl水充分洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离得到无色透明油状物5.335 g。经TLC分析为单一斑点, R<sub>f</sub>=0.67[EtOAc-PE(2:1)], 合成收率:90.4%, 光学纯度:99.2%。IR、<sup>1</sup>H-NMR表征数据与“2.1.1”项下一致。FAB-MS:m/z为296[M+H]<sup>+</sup>。

### 2.3 化合物1在奥曲肽合成中的应用

2.3.1 O-苄基苏氨酸盐酸盐[HCl·Thr(Bzl)-ol](化合物2)的合成。合成路线见图4。

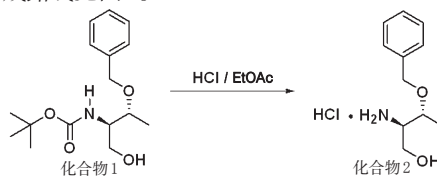


图4 化合物2的合成路线图

Fig 4 The synthesis scheme of compound 2

将2.977 g(10.1 mmol)化合物1, 在0 °C冰水浴及搅拌下加入饱和HCl/EtOAc约40 ml, 固体全溶。待析出白色固体, 10 min后撤去冰水浴, 室温反应进行至TLC检测原料消失。减压蒸除溶剂, 无水乙醚(Et<sub>2</sub>O)、EtOAc充分研磨、洗涤, 得到白色固体, 收率:98.7%, 熔点:109~110 °C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>=-5.7°(c 1.24, 乙醇)。FAB-MS:m/z为196.2[M+H]<sup>+</sup>。

### 2.3.2 奥曲肽的全合成。奥曲肽的全合成设计采用(7+1)的

固相方法:先合成7肽-树脂(化合物3),然后用苏氨酸氨解法裂解树脂,并形成侧链保护的八肽醇(化合物4),合成路线见图5。

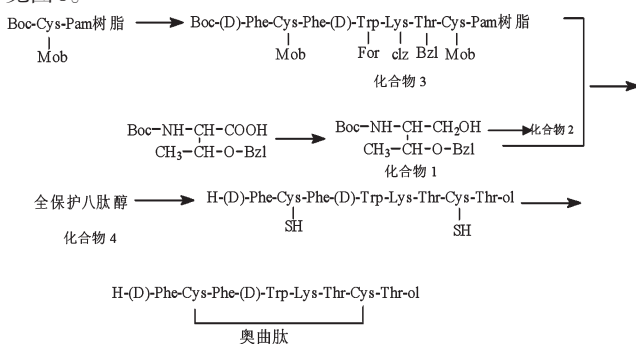


图5 奥曲肽的合成路线图

Fig 5 The synthesis scheme of octreotide

将合成的中间体树脂化合物3约1.88 mg(0.71 mmol),置于100 ml圆底烧瓶中,加入已溶于16 ml THF-DMF(2:1)中的化合物2约2.05 g(8.87 mmol)及三乙胺(TEA)1.25 ml(9 mmol)溶液,于55 °C下搅拌32 h。反应毕将全部混悬液经G3号砂板漏斗抽滤,收集滤液。残余树脂用THF及MeOH交替洗滤。洗出液与第1次滤液合并,再于50 °C下减压浓缩,除去大部分溶剂。向残留液中加0.5 mol/L HCl溶液50 ml,充分搅拌1 h,滤集白色沉淀,水洗沉淀,抽干。滤出的水溶液经中和、提取,可回收化合物2。将灰色膏状产物化合物4的粗品放入含粒状NaOH的真空干燥器中,抽真空过夜。自干燥器中取出化合物4的粗产物,溶于5 ml无水乙醇后逐渐加入10 ml EtO-Ac,出现浑浊。放冰箱(-18 °C左右)过夜后过滤,得白色粉末362 mg。氨解及重结晶的合计收率为30.9%。经TLC分析为单一斑点, $R_f=0.41$ [EtOAc-PE(4:1)]。化合物4经脱保护、氧化环合、反相-高效液相色谱法纯化后得奥曲肽纯品(鉴定等另文发表),总收率6%,纯度>98%,表明收率明显比文献<sup>[6]</sup>收率2.7%高。

### 3 讨论

目前,手性氨基醇主要有以下几种合成方法:氨基酸(醛、酮)的还原或加成;氨基酸酯的还原;环氧乙烷类叠氮化还原。在以上合成方法中,最直接的方法是以天然手性化合物氨基酸为原料,通过直接还原或亲核加成反应获得相应的手性氨基醇。在诸多的天然氨基酸中,基于L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸等的研究较多,但L-苏氨酸衍生的手性氨基醇的合成及其应用方面的报道不多。本研究采用侧链羟基和氨基均受保护的苏氨酸为原料,通过改变还原剂、反应系统等条件,建立一条高效、廉价且操作简便的工艺路线制备化合物1,并在多肽药物奥曲肽的合成中成功应用。

由相应的氨基酸还原得到氨基醇,还原剂主要有LiAlH<sub>4</sub>、甲硼烷(BH<sub>3</sub>)、NaBH<sub>4</sub>、二异丁基氢化铝(DIBAL-H)等,对产物为脂溶性的氨基醇还原收率很高,但对水溶性的氨基醇产物,如苏氨酸和丝氨酸,则分离困难、收率低。主要原因是苏氨酸、丝氨酸分子中有2个侧链羟基,在水中溶解度较大,反应完毕后产物与无机盐混在一起,难以纯化。N-保护的氨基醇是一类重要的化合物,其在药物及天然产物合成中是重要的中间体,可以用来合成具有生物活性的氨基醛、肽醛和肽醇等。如何采用价廉易得的原料,得到相应的氨基醇,建立反应条件

温和、产率高、化学选择性好、保护基不受影响的合成工艺具有广泛意义。本研究通过3种合成方法比较,确定了混合酸酐法合成Boc全保护氨基醇以后,又对其工艺进行了优化。考虑用NMM代替DIPEA,由于NMM的空间位阻小、碱性弱、消旋小、混合酸酐的收率高,可将缩合率由83.2%提高到90.4%。何洪华等<sup>[6]</sup>以侧链不保护的苄氧羰基(Fmoc)-苏氨酸与NMM和氯甲酸酐丁酯反应后经NaBH<sub>4</sub>还原、脱除Fmoc保护基得到苏氨酸,总收率83%。孙滨源等<sup>[7]</sup>以侧链不保护的Boc-苏氨酸与N-乙基吗啉和氯甲酸酐丁酯反应后经NaBH<sub>4</sub>还原、脱除Boc保护基得到苏氨酸,总收率为64.7%。本研究采用氨基酸的混合酸酐法进行还原制备氨基醇时,根据合成需要将侧链羟基也进行了保护,脱除Boc保护基后总合成收率为89.2%。

氨基醇除了作为不对称金属催化的手性配体在手性合成中有广泛用途外,也是核苷酸类药物的原料,用于合成修饰寡核苷酸、脂肪族核苷或核苷类似物等<sup>[8]</sup>。在肽类药物的研发中,氨基醇及其衍生物同样起到了重要作用。肽类化合物半衰期短、生物利用率低,因此许多科学家致力于活性肽类化合物的结构改造,以期将其发展成为理想的药物。多肽分子中只要选择适当的位点修饰改造,其整个分子即可获得对抗酶降解的能力,同时保留期望的活性。其中,以非天然氨基酸组分代替一个或多个天然氨基酸组分,例如用氨基醇替换相应的氨基酸而制得非经典肽是改造活性肽中一种非常重要和有效的手段。为了考察合成的保护氨基醇在肽缩合反应中的性能,本文设计采用了(7+1)的固相方法,用苏氨酸氨解法裂解并成功合成了奥曲肽,为开发有临床应用价值的多肽药物提供可靠依据。

### 参考文献

- [1] Gardiner J, Langenegger D, Hoyer D, *et al.* The enantiomer of octreotate binds to all five somatostatin receptors with almost equal micromolar affinity--a comparison with SANDOSTATIN[J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(7): 1 213.
- [2] Nelissen J, Nuyts K, Dehaen W, *et al.* Synthesis of the orthogonally protected amino alcohol Phaol and analogs [J]. *J Pept Sci*, 2011, 17(7): 527.
- [3] Szakonyi Z, Fülöp F. Monoterpene-based chiral  $\beta$ -amino acid derivatives prepared from natural sources: syntheses and applications[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(3): 597.
- [4] Bagnoli L, Scarponi C, Rossi MG, *et al.* Synthesis of enantiopure 1, 4-dioxanes, morpholines, and piperazines from the reaction of chiral 1, 2-diols, amino alcohols, and diamines with vinyl selenones[J]. *Chemistry*, 2011, 17(3): 993.
- [5] 宋娜玲, 赵启仁, 党永红, 等. 肿瘤放射性受体显像剂奥曲肽的固相合成[J]. *同位素*, 2004, 17(1): 15.
- [6] 何洪华, 龚大春, 李鑫, 等. L-苏氨酸的合成[J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(6): 326.
- [7] 孙滨源, 田桂玲, 王伟, 等. 含侧链羟基氨基酸还原为 $\beta$ -氨基醇及其肽醇的制备[J]. *北京大学学报: 自然科学版*, 1999, 35(4): 441.
- [8] Asanuma H, Toda T, Murayama K, *et al.* Unexpectedly stable artificial duplex from flexible acyclic threoninol[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(42): 14 702.

(收稿日期:2012-08-09 修回日期:2013-01-12)