

^{15}N 标记 *L*-胱氨酸

罗 勇, 汤财德, 李美华, 宋家龙, 陆平晔, 杜晓宁

(上海化工研究院 上海稳定同位素工程技术研究中心, 上海 200062)

摘要: 以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为起始原料, 通过改进的 Gabriel 方法得到 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸, 再经酶法拆分和解保护后得到 ^{15}N 标记 *L*-胱氨酸。对影响各步反应收率的主要因素进行了考察, 在较优的工艺条件下, 以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 计, ^{15}N 标记 *L*-胱氨酸收率为 13.5%, 产物经 HPLC、红外、质谱和元素分析等证实, 质谱分析表明未出现同位素丰度稀释现象。

关键词: ^{15}N ; 标记; *L*-胱氨酸

中图分类号: TQ126.2; TQ464.7 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2010)02-0111-06

Cystine Labeled With ^{15}N

LUO Yong, TANG Cai-de, LI Mei-hua, SONG Jia-long, LU Ping-ye, DU Xiao-ning

(Shanghai Engineering Research Center of Stable Isotope,

Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China)

Abstract: By using $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as starting material, an improved Gabriel preparation method was used for the synthesis of *S*-benzyl-*D,L*-cysteine, which was further converted to *S*-benzyl-*L*-cysteine by optical resolution in the presence of aminoacylase. After the removal of protective group, the target compound ^{15}N -*L*-cystine was obtained. The main controlling factors of the reactions were investigated. Under the optimized conditions, the total yield of *L*-cystine reached 13.5% based on $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ consumed. The product was characterized by HPLC, IR, MS-EI and elemental analysis. The dilution of enrichment was not found in the process.

Key words: ^{15}N ; labeling; *L*-cystine

^{15}N 是氮元素的稳定同位素之一, 可以用作示踪元素, 广泛应用于生物化学、医学、药理学、农业科学等领域。 ^{15}N 标记氨基酸和多肽是研究医学和生命科学的重要工具, 在蛋白质的人工合成、判定生物活性物质(多肽、蛋白质)的化学结构及药用机理等方面起着独特的示踪作用, 其应用越来越广泛, 市场前景良好^[1]。*L*-胱氨酸和

L-半胱氨酸均为含硫氨基酸, 属人体非必需氨基酸, 在体内均可由蛋氨酸转变而来。其中, 从 *L*-半胱氨酸出发可生成谷胱甘肽(G-SH), 由于其活性基团巯基的存在, 使之具有许多重要的生理功能, 如整合解毒作用、增强肝功能、抗氧化作用和促进毛发生长等。*L*-胱氨酸同时也是多种硬蛋白质如角质蛋白的重要成分。

收稿日期: 2009-09-29; 修回日期: 2009-11-28

基金项目: 上海市科委科研计划项目(07dz51051)

作者简介: 罗勇(1974—), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事精细有机合成及工业催化等研究

通信作者: 杜晓宁, 女, 教授, 主要从事稳定同位素标记化合物的合成与分析, E-mail: xiaoningdu@163.com

L-胱氨酸广泛存在于动物的毛、发、骨、角中,目前工业上主要采用生物化学方法,经由蛋白质(如毛发)水解、分离、精制而成。*L*-胱氨酸的化学生产具有较大的难度,合成过程中需对巯基进行保护和解保护^[1-2]。此外,经化学方法合成的通常为消旋的 *D, L*-氨基酸,不具有光学活性,必须经化学或酶法拆分以得到有光学活性的 *L* 型产物。

¹⁵N 标记的 *L*-胱氨酸是研究蛋白质代谢的重要示踪剂之一,目前国际上仅 ISOTOPE 等少数公司能提供产品,价格昂贵,售价高达每克 4 640 美元。因此开发 ¹⁵N 标记 *L*-胱氨酸的制备工艺具有较好的学术意义和经济效益。

基于 *L*-胱氨酸可在酸性溶液中还原为 *L*-半胱氨酸,*L*-半胱氨酸也可在碱性环境中氧化为 *L*-胱氨酸,本实验拟设计一个新的合成路线合成 ¹⁵N-*L*-胱氨酸。

1 主要仪器与试剂

WRS-1 数字熔点仪:上海精密仪器有限公司;Bruker biospin AC-P200 型核磁共振仪:德国 Bruker 公司;Nicolet FT-IR 6770 红外吸收光谱仪:美国 Nicolet 公司;Perkin-Elmer 240C

元素分析仪:美国 PE 公司;LC-20AT 高效液相色谱:日本岛津公司;Thermo Finingan TSQ/Accela 质谱仪:美国热电公司;MAT-271 气体同位素质谱计:西德菲尼根玛特公司。

¹⁵NH₄Cl:上海化工研究院生产;邻苯二甲酸、丙二酸二甲酯、苄硫醇、三聚甲醛等皆为市售化学纯或分析纯试剂。

2 实验方法

总体合成路线设计为三步:第一步先合成 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸;第二步,采用酶法拆分 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸,包括对 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸乙酰化、酶拆分和消旋化;第三步,对拆分后的 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸解保护,脱除苄基后再经氧化得到 *L*-胱氨酸。

2.1 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸的合成

S-苄基-*D, L*-半胱氨酸的合成采用经过改进的 Gabriel 方法,其合成路线示于图 1。邻苯二甲酸钾盐(1)与溴代丙二酸二甲酯缩合得到邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯(2),其钠盐(3)再与苄基氯甲硫醚(4)反应得到 *N*-苄基氯甲硫醚基邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯(5),再经水解得到 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸(6)。

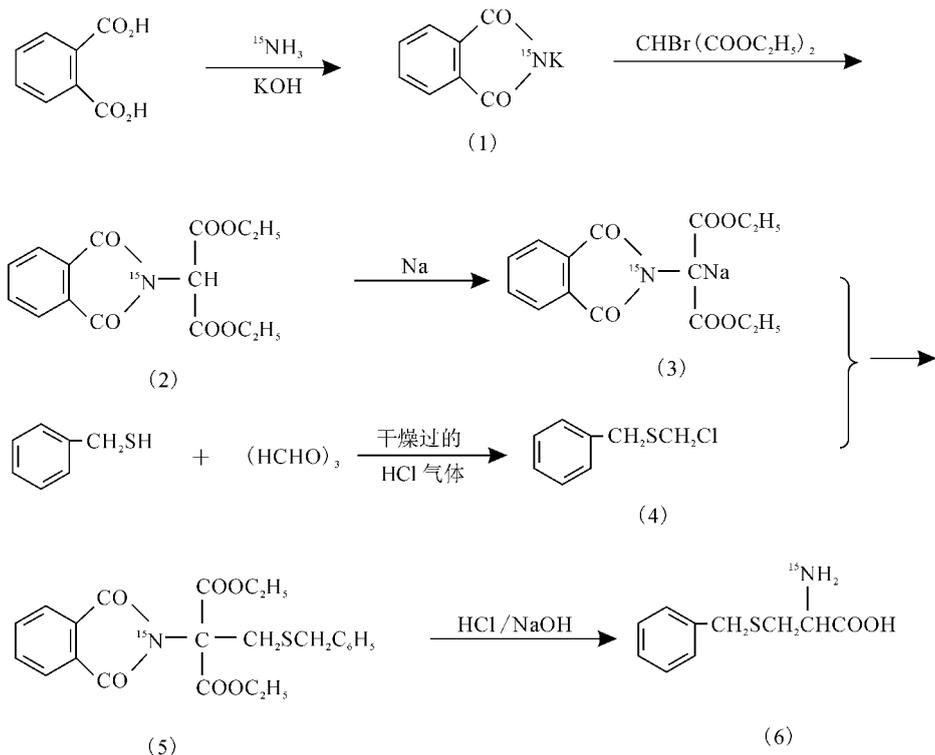


图 1 *S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸的合成路线

(1)——邻苯二甲酰亚胺钾盐;(2)、(3)——邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯及其钠盐;

(4)——苄基氯甲硫醚;(5)——*N*-苄基氯甲硫醚基邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯;

(6)——*S*-苄基-*D, L*-半胱氨酸

2.1.1 邻苯二甲酰亚胺钾盐(1)的制备

邻苯二甲酰亚胺钾盐(1)的合成参考文献[3-4]。将 NaOH 溶液缓慢滴加到 26.75 g (0.50 mol) NH_4Cl 中,生成的 NH_3 随 N_2 气流通入由 83.1 g (0.50 mol) 邻苯二甲酸和 200 mL 水配成的悬浊液中。待 NH_3 完全被邻苯二甲酸溶液吸收后,先于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下蒸除溶液中的水,然后缓慢升温至 $200\text{ }^\circ\text{C}$ 脱水,最后将温度逐渐上升至 $300\text{ }^\circ\text{C}$,冷却得白色固体 74.1 g。将上述制得的邻苯二甲酰亚胺粗品溶于无水乙醇,于搅拌下缓慢滴加 KOH 的无水甲醇溶液,室温下保持 3 h,过滤,用无水乙醇洗涤 3 次,得邻苯二甲酰亚胺钾盐(1)白色晶体 88.9 g,收率 96.1%。

2.1.2 邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯(2)及其钠盐(3)的制备

将 18.52 g (0.1 mol) *N*-邻苯二甲酰亚胺钾盐(1)与 23.90 g (0.1 mol) 新鲜制备的溴代丙二酸二乙酯均匀混合,在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 油浴中加热 1 h,冷却后加水搅拌,反应物变为固体。将其转移到钵内反复研磨,水洗抽滤后得到 29.80 g (2),收率 97.6%。将制得的产物(2)加热溶解于 100 mL 甲苯中,加入 2.75 g (0.12 mol) 金属钠条,回流搅拌 3 h,沉淀经甲苯洗涤,干燥,得 30.7 g 黄色产物(3),收率 96.2%。

2.1.3 苄基氯甲硫醚(4)的制备

将 49.7 g (0.40 mol) 苄硫醇与 40.5 g (0.45 mol) 三聚甲醛在冰浴中冷却,并用干燥过的 HCl 气饱和,然后加入 70 g (0.63 mol) CaCl_2 ,再于室温下保持 24 h。过滤除去固体物质后,母液用 5 mol/L NaOH 溶液洗涤 3 次,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤后,减压(0.27 kPa)蒸馏,收集 $102\text{ }^\circ\text{C}$ 的馏分,得到苄基氯甲硫醚(4)

21.1 g,收率 30.5%。

2.1.4 *N*-苄基氯甲硫醚基邻苯二甲酰亚胺抱丙二酸二乙酯(5)的制备

将 5.00 g (0.015 3 mol) 钠盐(3)和 2.70 g (0.015 6 mol) 苄基氯甲硫醚(4)和 50 mL 无水甲苯搅拌回流 12 h,过滤。沉淀经甲苯洗涤后,再用无水乙醇重结晶,得到产物(5) 4.0 g,产率 59.4%。产物(5)的熔点为 $79.5\sim 80.4\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 1.28 (t, 6H, $J = 7.0\text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$), 3.55 (s, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}-$), 3.70 (s, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 4.32 (q, 4H, $J = 7.0\text{ Hz}$, $-\text{OCH}_2-$), 7.10 ~ 7.27 (m, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.72 ~ 7.81 (m, 4H, $-\text{C}_6\text{H}_4$)。

2.1.5 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸(6)的制备

将 4.0 g 缩合产物(5)悬浮于 25 mL $V(\text{乙醇}):V(\text{水}) = 1:1$ 混合液中,于搅拌下逐滴加入 20 mL 5 mol/L NaOH,保持温度 $55\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$,搅拌 1 h 后,加入足量浓盐酸酸化,加热水解 2 h 后蒸干溶液,滴加少许 NaOH 溶液至溶液呈中性(刚果红)。将得到的沉淀过滤,并悬浮于沸腾的 95% 乙醇中,趁热过滤,冷却后得到晶体状 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸(6) 0.98 g,收率 50.1%。产物(6)的熔点: $211\sim 214\text{ }^\circ\text{C}$; 元素分析实测值(计算值, %): C 56.80(56.87), N 6.58(6.63), H 6.15(6.20); MS-EI (m/z , %): 211.1 (M^+ , 10), 91.1 (100); IR (ν/cm^{-1} , KBr): 3 062 (C—H, Ar—H), 2 934 (O—H, $-\text{COOH}$), 1 500, 1 588 (C—C, benzene), 1 400 (C = O, $-\text{COOH}$)。

2.2 氨基酰化酶法拆分 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸

氨基酰化酶法拆分 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸的化学过程示于图 2。

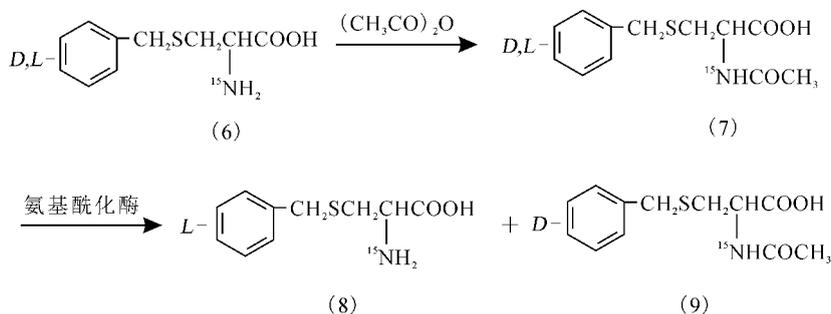


图 2 氨基酰化酶法拆分 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸的化学过程

(6)——*S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸;(7)——*N*-乙酰-*S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸;

(8)——*S*-苄基-*L*-半胱氨酸;(9)——*N*-乙酰-*S*-苄基-*D*-半胱氨酸

的影响,结果列于表 2。由表 2 可知,在实验条件下,反应时间对邻苯二甲酰亚胺丙二酸二乙酯的收率有较大影响。随着反应时间延长,产物收率显著增加;12 h 以后,进一步延长反应时间(16 h),反应收率不再有明显变化,因此,该步反应时间以 12 h 为宜。

表 1 反应温度对邻苯二甲酰亚胺丙二酸二乙酯(2)收率的影响

反应温度/℃	收率/%	熔点/℃
100	92.4	65.3~67.4
110	97.6	65.2~68.1
120	96.5	67.1~68.4
130	90.2	64.4~67.9
140	85.4	62.5~68.5

表 2 反应时间对 N-苄基氯甲硫醚基邻苯二甲酰亚胺丙二酸二乙酯(5)收率的影响

反应时间/h	收率/%	熔点/℃
4	34.1	71.6~74.0
8	50.4	71.8~75.3
10	61.8	73.7~79.6
12	62.5	72.9~78.2
16	61.3	72.5~78.5

3.1.3 水解时间对 S-苄基-D,L-半胱氨酸(6)收率的影响

在探索实验中发现,N-苄基氯甲硫醚基邻苯二甲酰亚胺丙二酸二乙酯的水解时间是影响 S-苄基-D,L-半胱氨酸收率的重要因素。反应按 2.1.5 进行,在其他条件不变的情况下,只改变盐酸水解的时间,考察水解时间对 D,L-硫苄基半胱氨酸收率的影响,结果列于表 3。由表 3 可知,随着反应时间延长,产品收率上升,2 h 时收率最高,达 50%,此后随着水解时间进一步延长,产品收率略有下降。因此,实际水解时间应控制在 2 h。

表 3 水解时间对 S-苄基-D,L-半胱氨酸收率的影响

水解时间/h	收率/%
1	37.3
2	50.0
3	47.4
6	42.6

3.2 氨基酰化酶法拆分 D,L-硫苄基半胱氨酸中的影响因素

将所制得的 S-苄基-D,L-半胱氨酸进行乙酰化,并采用氨基酰化酶对其进行光学拆分,再将具有光学活性的 S-苄基-L-半胱氨酸从拆分混合液中分离出来。为了提高拆分的收率,还需对未参与反应的 N-乙酰-S-苄基-D-半胱氨酸进行消旋化,进行再次拆分。

在本研究过程中,先后通过单因素考察和正交实验,对影响氨基酰化酶法拆分 N-乙酰-S-苄基-D,L-半胱氨酸生成 S-苄基-L-半胱氨酸的多种影响因素进行了优化,找到了比较合适的工艺条件^[11]:反应物 N-乙酰-S-苄基-D,L-半胱氨酸的量为 5 g,pH 为 8.0,反应温度为 37 ℃,酶用量为 200 mg,反应液总体积为 50 mL,反应时间为 30 h。在此条件下,S-苄基-L-半胱氨酸拆分的单程收率达到 45%,N-乙酰-S-苄基-D-半胱氨酸回收率达到 88%。经过两次拆分以后,S-苄基-D,L-半胱氨酸总的拆分收率达到 62%。

3.3 保护基的脱除

解保护即脱除 S-苄基-L-半胱氨酸上的保护基苄基。可供选择的体系有 HF 体系^[10]和 Na/NH₃ 体系。HF 体系收率较高(90%),但 HF 气体毒性大,对于实验装置要求很高;Na/NH₃ 体系收率相对较低(78%),操作相对容易,危险性较小。因此在实验中选择 Na/NH₃ 体系进行解保护。由于 L-半胱氨酸在中性和碱性溶液中易被氧化生成 L-胱氨酸,且 L-胱氨酸难溶于水,因此在解保护后,在痕量 Fe³⁺ 的催化下,于近中性溶液中将 L-半胱氨酸氧化为 L-胱氨酸。

3.4 产品的分析与表征

对于终产品进行红外分析,结果示于图 4。根据图 4 可计算 IR(ν/cm^{-1} ,KBr)得:2 980(O—H,—COOH),1 680(C=O,—COOH),1 590(N—H,—NH₂),1 480(C—H,—NH₂—),1 400(C—O,—COOH),1 110(C—N,—CH—NH₂)。薄层层析鉴定表明,产物与 L-胱氨酸标样具有相同的 R_f。比旋光度 $[\alpha]_D$ 为 -215°(c=1,1 mol/L HCl,20 ℃),与标样在该条件下的比旋光度 -220°很接近。在 HPLC 上检测产物纯度大于 98%。元素分析,C₆H₁₂N₂S₂O₄ 实测值(计算值):C 29.82%(29.99%),N 11.59%(11.66%),H 6.15%(6.13%)。

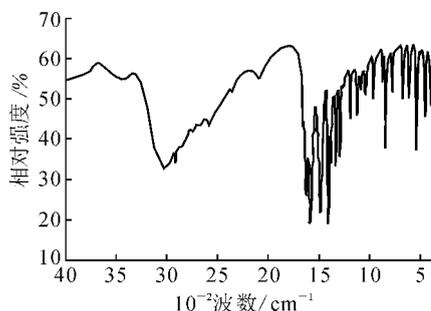


图 4 *L*-胱氨酸的红外光谱

3.5 ^{15}N -*L*-胱氨酸丰度实验验证

通过优化合成方法,以 NH_4Cl 和苄基氯甲硫醚为前体进行了 *L*-胱氨酸的合成,总收率为 13.9%,产物的化学纯度和光学纯度符合要求。在此基础上,以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (10.20% ^{15}N) 为标记前体,进行 *L*-胱氨酸合成的丰度实验,合成总收率 13.5%, ^{15}N 的丰度为 10.18%,未出现同位素稀释现象。

4 小 结

设计并完成了适合 ^{15}N 标记的 *L*-胱氨酸,以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为起始原料,通过改进的 Gabriel 方法得到 *S*-苄基-*D,L*-半胱氨酸,再经氨基酰化酶法拆分和解除保护后得到 ^{15}N 标记 *L*-胱氨酸。红外、HPLC 质谱、元素分析等分析手段均确证了多种中间体和 ^{15}N 标记 *L*-胱氨酸的结构;以同位素原料计总产率为 13.5%,所用工艺不会产生同位素稀释,可以满足商品化 ^{15}N 标记 *L*-胱氨酸及相关衍生物的合成。

参考文献:

- [1] John W, Vincent V. A new synthesis of cystine [J]. *J Bio Chem*, 1939, 131(1):267-271.
- [2] Masatsune Kenichi U. Synthesis of [$1,1'$ - $^{13}\text{C}_2$]-*L*-cysteine[J]. *J Label Comp Radiopharm*, 1991, 29(8): 867-874.
- [3] 盛怀禹,陈耀焕,袁群,等. 同位素有机化学[M]. 浙江:浙江教育出版社,1994:209-214.
- [4] Authur M, Lloyd W. Organic syntheses with isotopes: part II [M]. New York: Interscience publishers, 1958: 1 776-1 788.
- [5] Yuan YJ, Wang SH, Song ZX, et al. Production of *L*-methionine by immobilized pellets of *Aspergillus oryzae* in a packed bed reactor[J]. *J Chem Tech Bio*, 2002, 77(6): 602-606.
- [6] 张倩颖,张关永. *S*-苄基-*L*-半胱氨酸测定方法的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(3):62-64.
- [7] 姚文兵,侯振清,吴梧桐,等. 固定化牛肾氨基酰化酶拆分法制备 *D*-丙氨酸[J]. 中国药科大学学报, 2000,31(4):297-300.
- [8] 张清玉,谭欣,赵林,等. 乙酰-*D*-氨基酸消旋工艺的研究[J]. 化学工业与工程,2004,21(2):91-95.
- [9] John W, Vincent V. Racemization of benzyl-*L*-cysteine, with a new method of preparing *D*-cystine[J]. *J Bio Chem*, 1939, 130(1): 109-114.
- [10] Shumpei S, Yasutsugu S, Yasuo K, et al. Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis: I. Behavior of various perprotective groups in anhydrous hydrogen fluoride[J]. *Bull Chem Soc Japan*, 1967, 40(9): 2 164-2 167.
- [11] 柯昌武,罗勇,潘洁,等. 酶法拆分 ^{15}N 标记 *S*-苄基-半胱氨酸的研究[J]. 上海化工,2009, 34(10): 7-11.