

南京理工大学

硕士学位论文

苄氧羰基天冬酰胺叔丁酯与苄甲氧羰基酪氨酸苄醚的合成研究

姓名：丁亚明

申请学位级别：硕士

专业：应用化学

指导教师：魏运洋

20050601

摘要

本论文研究了苄氧羰基天冬酰胺叔丁酯和苄甲氧羰基酪氨酸苄醚的制备,旨在研究出简便有效的 L-天冬酰胺和 L-酪氨酸的保护方法。天冬酰胺与氯甲酸苄基酯反应生成氨基由苄氧羰基保护的天冬酰胺,乙酸叔丁酯与苄氧羰基天冬酰胺发生转酯反应得到苄氧羰基天冬酰胺叔丁酯。对反应时间、温度和催化剂用量加以优化,反应产率达到 95%。酪氨酸与溴化苄在硫酸铜存在下反应,选择性地在其侧链酚羟基上引入苄基保护基,通过反应条件的优化,反应产率达到 45%。反应先生成酪氨酸的羧基与铜配位的络合物中间体,从而有效地保护了羧基,使苄基化反应发生在酚羟基上,生成酪氨酸苄醚。实验分离出了酪氨酸铜络合物中间体,元素分析和红外光谱证实其为四配位的酪氨酸铜络合物。酪氨酸苄醚与苄甲氧羰基氯 (Fmoc-Cl) 反应,成功地在氨基上导入了苄甲氧羰基保护基,反应在二氧六环或四氢呋喃中进行,产率达到 98%。

关键词: L-天冬酰胺 L-酪氨酸 氯甲酸苄基酯 乙酸叔丁酯 苄甲氧羰基氯
溴化苄

Abstract

For the purpose of developing simple and effective protection routes of L-asparagine and L-tyrosine, the synthesis of Z-Asn-OBu^t and N-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-benzyltyrosine (Fmoc-Tyr(Bzl)-OH) were studied. The amino group of asparagine was protected by Z group with benzyl chloroformate. The Z-Asn-OH obtained was then treated with t-butyl acetate to give Z-Asn-OBu^t via transesterification. The reaction parameters such as reaction temperature, reaction time and catalyst dosage were optimized and 95% of Z-Asn-OBu^t were obtained. Reaction of L-tyrosine with benzyl bromide in the presence of copper sulfate led to the protection of phenol group on the side chain of L-tyrosine to give H-Tyr(Bzl)-OH in 45% yield via a copper complex intermediate. The formation of copper complex intermediate protected the carboxyl group of L-tyrosine effectively and led the benzylation take place on the side chain of L-tyrosine. The copper complex intermediate was isolated and proved to be a four coordinated complex by IR and elemental analysis. H-Tyr(Bzl)-OH was then react with fluorenylmethyl chloroformate in dioxane or THF to give N-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-benzyltyrosine (Fmoc-Tyr(Bzl)-OH) in 98% yield.

Key word: L- Asparagine L-Tyrosine ter-butyl acetate Fmoc-Cl
Benzyl bromide

声 明

本学位论文是我在导师的指导下取得的研究成果，尽我所知，在本学位论文中，除了加以标注和致谢的部分外，不包含其他人已经发表或公布过的研究成果，也不包含我为获得任何教育机构的学位或学历而使用过的材料。与我一同工作的同事对本学位论文做出的贡献均已论文中作了明确的说明。

研究生签名： 丁亚明 2005 年 6 月 30 日

学位论文使用授权声明

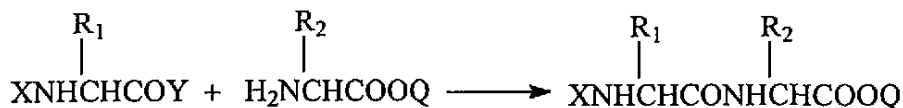
南京理工大学有权保存本学位论文的电子和纸质文档，可以借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容，可以向有关部门或机构送交并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密论文，按保密的有关规定和程序处理。

研究生签名： 丁亚明 2005 年 6 月 30 日

1 引言

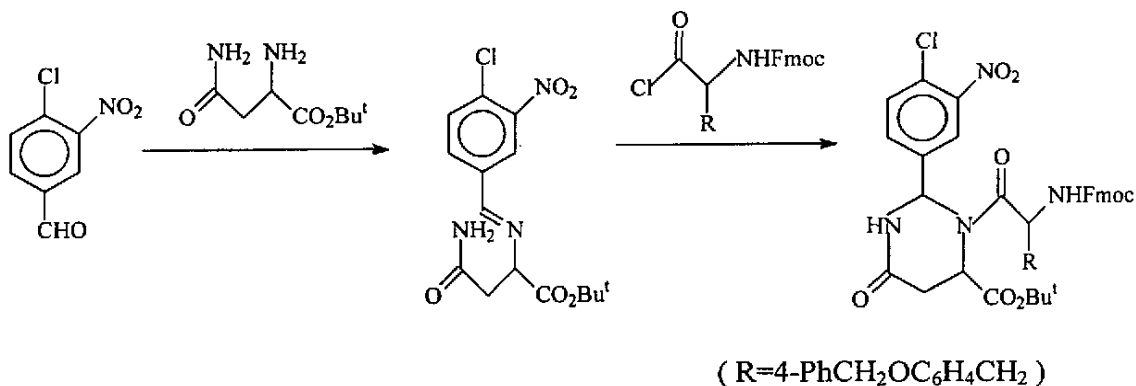
1.1 选题的意义

多肽合成的主要目的是为了制备从自然界难以获得的活性多肽或者是为了改造结构并研究结构与功能之间的关系，化学合成多肽是多肽合成的重要方法之一。化学合成多肽的任务是如何把各种氨基酸单元按所希望的排列顺序和连接方式连接起来。氨基酸在中性条件下以分子内的两性离子形式 ($\text{H}^+\text{NCH}(\text{R})\text{COO}^-$) 存在，氨基酸之间直接缩合形成酰胺键的反应在一般条件下难以进行。氨基酸酯的反应活性较高，在 100°C 下加热或室温下长时间放置都能聚合生成肽酯，但反应没有定向性，两种氨基酸 a_1 和 a_2 的酯聚合时将生成 $\text{a}_1\text{a}_2\dots$ 、 $\text{a}_1\text{a}_1\dots$ 、 $\text{a}_2\text{a}_1\dots$ 等各种任意顺序的混合物。为了得到具有特定顺序的多肽，采用任意聚合的方法是不行的，只能采用逐步缩合的定向合成方法。即先将不需要反应的氨基或羧基用适当的基团暂时保护起来，然后再进行连接反应，以保证合成定向进行。



上式中的 X 和 Q 分别为氨基和羧基的保护基，它不仅以防止发生不希望的副反应，还能消除氨基酸的两性离子形式并使之易溶于有机溶剂。因此多肽合成中保护氨基酸的氨基、羧基及侧链是极其重要的。

本论文研究天冬酰胺 (Asn) 和酪氨酸 (Tyr) 的氨基、羧基和侧链的保护。在多肽和蛋白质的结构中，天冬酰胺起着重要的作用。在 α -螺旋结构的肽链中，天冬酰胺往往处于 C-末端，通过其侧链形成的氢键限制构象任意改变，使螺旋结构稳定^[1]。 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 侧链还可作为糖肽的键合点，在细胞识别方面起着重要作用^[2]。此外，天冬酰胺叔丁酯与芳香醛形成亚胺后，可与另一氨基酸的酰氯缩合，生成二肽的同时伴随天冬酰胺的环化，形成四氢嘧啶酮的环状结构^[3,4]，为天冬酰胺在多肽合成中的应用开辟了新途径。例如^[5]：

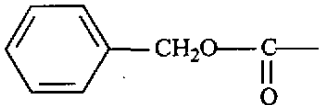
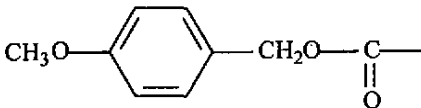
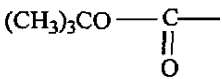
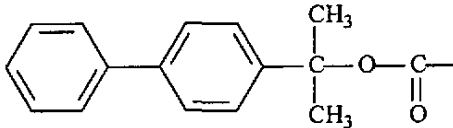
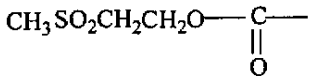


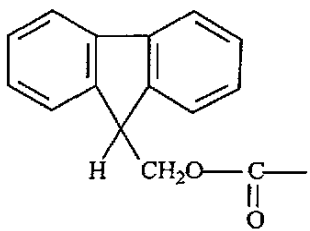
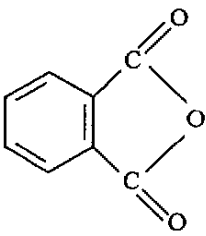
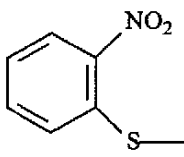
在天然氨基酸中只有脯氨酸具有一环状侧链结构, 探讨环化的天冬酰胺在决定蛋白质和多肽的构象等次级结构方面与脯氨酸是否有类似的作用是一项很有意义的课题。研究出简便有效的 L-天冬酰胺和其它与其成肽的氨基酸的保护方法对于合成不同的含有环化天冬酰胺残基的多肽至关重要。

1.2 氨基保护基概述

可以用于保护氨基的保护基很多, 归纳起来, 可分为烷氧羰基、酰基、烷基三大类。烷氧羰基使用最为广泛, 因为 N-烷氧羰基保护的氨基酸在接肽时不易发生消旋化, 表 1.2 列举了几种代表性的常用的氨基保护基。

表 1.2 几种代表性的常用氨基保护基

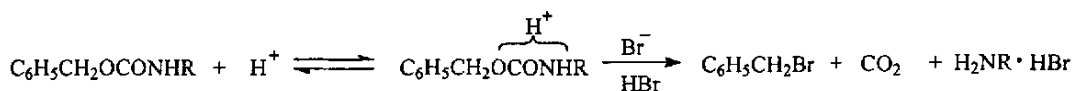
结构	缩写	基团式	基团量	脱去条件
	Z	$C_8H_7O_2$	135.14	HBr/HOAc, 催化氢解, Na/NH ₃ (液), HF, CH ₃ SO ₃ , F ₃ CSO ₃ H
	Mz	$C_9H_9O_3$	165.16	HBr/HOAc, 催化氢解, Na/NH ₃ (液), HF, TFA
	Boc	$C_5H_9O_2$	101.12	1 mol/L HCl/HOAc, 4 mol/L HCl/二氧六环, HF, TFA, HBr/HOAc
	Bpoc	$C_{16}H_{15}O_2$	239.28	HBr/HOAc, HF, TFA, 1 mol/L HCl/CHCl ₃ ClCH ₂ COOH:CH ₂ Cl ₂ : H ₂ O(3:6:1)
	Msoc	$C_4H_7O_4S$	151.16	0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L Ba(OH) ₂

	Fmoc	C ₁₅ H ₁₁ O ₂	207.21	50%哌啶/CH ₂ Cl ₂
F ₃ COO—	Tfa	C ₂ F ₃ O	97	NaOH, Na/NH ₃ (液), NH ₂ OH
	Pht	C ₈ H ₄ O ₂	132.11	胼
	Nps	C ₆ H ₄ SO ₂ N	154.17	HBr/HOAc, HF, TFA, 1 mol/L HCl/HOAc, 4 mol/L HCl/二氧六 环, CH ₃ CSNH ₂
(C ₆ H ₅) ₃ C—	Trt	C ₁₉ H ₁₅	243.31	HOAc, TFA, HCl/有机 溶剂, HBr/HOAc

1.2.1 烷氧羰基

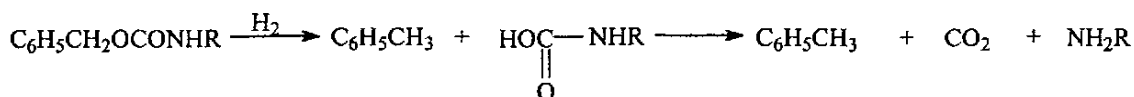
1. 苄氧羰基 (Z) [6]

苄氧羰基是 1932 年贝尔格曼 (Bergmann) 发现的一个氨基保护基, 直到今天还在普遍地使用。苄氧羰基活化酯 (ZOR) 可用来作为苄氧羰基的导入试剂, 但一般都用 Z-Cl 为导入试剂。当要选择性地脱去 N-苄氧羰基而向 N 端延伸肽链时, 一般采用 HBr 的醋酸溶液处理或催化氢解的方法。在片段合成以后, 要将苄氧羰基同其他基团一并脱去, 则多采用 HF 处理或 Na/NH₃ (液) 还原的方法。HBr/HOAc 是酸解脱除苄氧羰基的常用试剂, 脱除反应按下式进行:



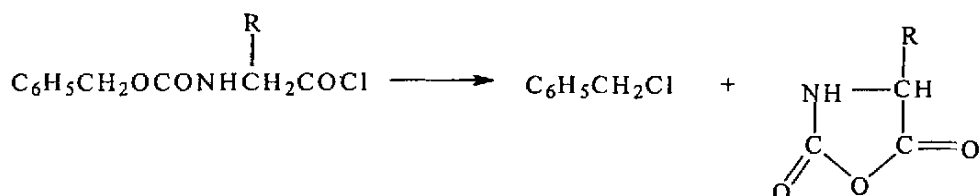
反应需要消耗 2 分子的 HBr, 但经研究发现 Z 基的脱除速度随 HBr 浓度的增大而增大, 因此实际上都是采用高浓度的过量 HBr/HOAc 溶液以保证反应的完全。

催化氢解和 Na/NH₃ (液) 还原脱苄氧羰基如下式所示:



催化氢解的氢供体可以是 H_2 或环己二烯^[7]和甲酸^[8]。催化剂可以用钨黑、5~10%的钨-碳或钨-聚乙烯亚胺涂层载体^[8]。当用 HBr/HOAc 脱去 Z 基时, 产物往往带有颜色, 而且分解产生的溴化苄会产生一些副反应并难以除尽, 而催化氢解多数能得到无色的产物。由于硫能使催化剂中毒, 因此, 含有胱氨酸或半胱氨酸的肽的 Z 基不能用催化氢解法脱除。

羧酸与 SOCl_2 或 PCl_5 等氯化剂反应可以生成活泼的酰氯, 但 N-苄氧羰基氨基酸的酰氯很容易脱去氯化苄而环化生成 N-羧基酸酐 (NCA):



因此 Z-氨基酸在接肽时不能采用酰氯的形式活化。

2. 取代的苄氧羰基

由于苄氧羰基在保护氨基上所取得的成功, 促使人们在苄氧羰基的苯环上进行了一系列的取代, 得到了一些具有与苄氧羰基不同的选择性脱去或其他优点的取代的苄氧羰基。如苄氧羰基的苯环上用卤素或硝基取代以后, 不仅可以提高对酸的稳定性, 而且其衍生物有时更易于结晶。

3. 叔丁氧羰基 (Boc) ^[9-11]

除苄氧羰基外, 叔丁氧羰基也是目前多肽合成中广为应用的氨基保护基, 特别是在固相合成中, 氨基的保护多不用苄氧羰基而用叔丁氧羰基。叔丁氧羰基具有以下优点: (1) Boc-氨基酸除个别外都能得到结晶; (2) 易于酸解除去, 但又有一定的稳定性, Boc-氨基酸能较长期的保存而不分解; (3) 酸解时产生的是叔丁基阳离子, 再分解为异丁烯, 不会带来副反应; (4) 对碱水解和肼解都稳定; (5) 叔丁氧羰基对催化氢解稳定, 但比苄氧羰基对酸要敏感得多。当叔丁氧羰基和苄氧羰基同时存在时, 可以用催化氢解脱去苄氧羰基, 叔丁氧羰基保持不变, 或用酸解脱去叔丁氧羰基而苄氧羰基不受影响, 因而两者能很好地搭配。

4. (R₁R₂R₃) COCO-

由于叔丁氧羰基的成功, 促使人们对叔丁氧羰基的叔丁基进行了广泛的结构改变, 发现了一系列比 Boc 基对酸稳定或更不稳定的保护基。由于 Boc 基的酸解是通过叔丁基碳正离子的中间产物, 因此, 将联结在碳原子上的甲基用给电子基团取代, 必将有利于叔碳正离子的形成而提高酸解的速度。联苯异丙氧羰基(Bpoc 或 Dpoc)

是最常用的这种类型的保护基。Bpoc 基能被 80%醋酸(数分钟)、75%氯乙酸- CH_2Cl_2 (体积比为 37:50) (15min)、醋酸-83%甲酸-水 (体积比为 7:1:2) (2h) 等较温和的酸处理条件顺利地脱去。同 Boc 基比较, 其脱去速度根据所用酸解条件的不同可以快 2000 到 9000 倍, 因此可以在 Boc 基存在下选择性地只酸解脱去 Bpoc 基。Bpoc 基更多地是在固相肽合成中用作 α -氨基的保护基。

5. 其他的烷氧羰基型保护基

(1) 二异丙甲氧羰基 (Dipmoc)

二异丙甲氧羰基的导入试剂为 Dipmoc-Cl。二异丙甲氧羰基对酸的稳定性较高, 它比 Z 基还难以酸解。有人曾经比较了几种 Lys 侧链保护基对 1mol/LHCl/HOAc 的稳定性。经过 20℃处理 24h 后, 乙基脱去约 20%, Z 为 7~8%, 而 Dipmoc 基不超过 1%。

(2) 苄氧羰基 (Fmoc) ^[12-14]

苄氧羰基是由 Carpino 与 Han 为了在肽合成中保护 α -氨基而设计出来的^[8]。这种保护基团一个最大的优点是能够在温和的条件下, 用碱性试剂脱保护, 并且是抗酸性的。Fmoc 基团的这些特点, 使得在保护末端羧基和侧链基团时能够使用酸脱去的保护基团。苄醇在无水二氯甲烷中与过量光气反应可以得到很好产率的苄氧羰基氯 Fmoc-Cl, Fmoc-Cl 在二氧六环- Na_2CO_3 溶液 (pH8~9) 同氨基酸反应则可得 Fmoc-氨基酸。苄氧羰基对酸稳定, 能用浓氨水或二氧六环-甲醇-4mol/L NaOH (体积比为 30:9:1) 以及用哌啶、乙醇胺等胺类的 50%二氯甲烷溶液脱去。苄氧羰基可与酸脱去的保护基搭配而用于液相和固相的肽合成。

(3) 苄烷氧羰基

苄烷氧羰基对酸敏感, 能用 TFA 脱去, 价格也比较便宜, 适于大量制备。

(4) 环戊氧羰基^[15]

环戊氧羰基对酸的稳定性稍低于环己氧羰基, 但比 Boc 基对酸稳定, 在脱 Boc 的条件下不被脱除, 对氢化也稳定, 但能用 HF 于 0~20℃处理 1h 脱去。环戊氧羰基对酸的稳定性比 Z 基还大。

1.2.2 酰基

为了获得可用的羧酰基保护基, 必须对酰基的结构加以改变。

(1) 羧酰基

- 1) 甲酰基 甲酰基对无水酸, 催化氢解和 Na/液氨还原是稳定的, 但能用 HCl 的水或醇溶液脱去。
- 2) 三氟乙酰基 (Tfa) 三氟乙酰基的导入试剂是三氟醋酐。Tfa 基可以在水或乙醇水溶液中用 0.1mol/LNaOH 处理或者用 1mol/L 哌啶溶液处理很容易脱去。
- 3) 邻苯二甲酰基 (Pht) 同一般的酰基氨基酸比较, Pht-氨基酸在接肽时不易

消旋，这是它的优点，但是它对碱不稳定。

(2) 邻硝基苯磺基 (Nps)

Nps 基的特点是它比 Boc 基更易被酸脱去，而且导入试剂 Nps-Cl 的合成比较方便，价格也很便宜。Nps 基保护的一个主要缺点是 Nps-氨基酸和肽不易结晶，而且 Nps-肽带有黄色，即使脱去 Nps 基以后也很难得到无色的产物。

(3) 对甲苯磺酰基 (Tos)

Tos 基非常稳定，它能经得起酸解 (TFA, HBr/HOAc, HF 等)，皂化，催化氢解等多种条件的处理而不受影响，能用 Na/液 NH₃ 处理脱去。

(4) 吡啶-2-甲酰基 (Pc) 和二硫二甲酰基 (Dts)

Pc 基能用 Cu²⁺ 离子在酸存在下脱去。Dts 对酸解稳定，但能用硫醇化合物 (巯基乙醇或巯基乙酰甲氨)，硼氢化物或三烷基磷脱去^[13]。

1.2.3 烷基保护基

烷基保护基主要有三苯甲基，以醛、酮类为试剂的保护基，五碳铬烷基和五碳基钨烷基保护基等。

1.3 羧基保护基概述

多肽合成中，除了参与成肽的羧基需要活化来进行接肽以外，其他不反应的羧基都需要保护。本节只讨论 α -羧基，即氨基组分的末端羧基的保护问题。羧基被保护以后，除了可以防止在接肽反应中当反应羧基用某些方法活化时不需要反应的羧基也会被活化而带来的副反应以外，还有一个能使氨基组分的氨基不能同羧基形成内盐而完全游离出来以便于同羧基组分反应形成肽键的作用。一般是采用成酯的形式来进行保护，若该羧基末端最后要转变为酰肼，则也可以采用取代酰肼的形式来保护。当用迭氮物法、活化酯法和混合酸酐法接肽时，也可采用将氨基组分的羧基同有机碱 (如叔胺等) 成盐的形式来进行反应。这时虽然可以避免羧基保护基的选择和大肽去酯时所带来的麻烦，但在接肽的方法上受到一定的限制，而且由于羧基自由的肽在有机溶剂中的溶解度比酯的溶解度要小，从而对接肽反应和产物的分离提纯方面也有一些不便之处。因此，综合考虑起来，在多肽合成中多数仍然采用以酯或取代酰肼的形式对羧基进行保护。

根据脱去条件不同，目前使用和研究过的羧基保护基大致可分为三类。一类是可用碱皂化脱去的，如甲酯和乙酯等。另一类是可用酸脱去的，如叔丁酯、对甲氧苄酯和邻苯二甲酰亚胺甲酯等。第三类是除了能用酸或碱脱去以外，还能用其他的方法选择性地脱去，如苄酯和苯羰基甲酯能用催化氢解法脱去，三甲硅乙酯能用氟化四乙胺脱去等。在合成工作中，究竟选用哪一种羧基保护基，则应根据其他官能团所用的保护基是什么来进行选择和搭配。

1.3.1 甲酯和乙酯

肽的甲酯和乙酯对 HBr/HOAc, TFA、HCl/有机溶剂等酸解条件和催化氢解都是

稳定的，一般是将保护的肽酯溶于甲醇或乙醇中，加入过量的 1~2mol/LNaOH(或 KOH)在室温下皂化去酯。

1.3.2 苄酯和取代苄酯

N-保护氨基酸或肽的苄酯除了能象甲酯和乙酯那样用皂化脱去以外，还能用催化氢解的方法脱去。对于取代的苄酯来说，有两种情况，当苯环上的取代基为硝基、卤素等电负性强的基团时，其对酸的稳定性增加，而当取代基为甲基、甲氧基等给电子基团时，其对酸的稳定性减弱。

1.3.3 叔丁酯^[16-18]

氨基酸或肽的叔丁酯对催化氢解和肼解稳定，也不易被碱皂化脱去，但能用 HCl/有机溶剂、HBr/HOAc、TFA、HF(液)等酸解方法脱去。同叔丁氧羰基相比，叔丁酯对酸更为稳定。例如，用 0.1mol/L HBr/HOAc 处理时，叔丁氧羰基大约 5min 即可脱去，而叔丁酯则要 1h 左右才能脱去。由于叔丁酯对酸的不稳定性，因此一般最好不用盐酸而用柠檬酸等较弱的酸来洗涤叔丁酯的衍生物。

1.3.4 邻苯二甲酰亚胺甲酯

邻苯二甲酰亚胺甲酯对催化氢解稳定，但能用 HCl/有机溶剂、二乙胺的乙醇溶液、稀的 NaOH 水溶液和肼解脱去。

1.3.5 苯羰甲酯

苯羰甲酯与叔丁酯和二苯甲酯不同的地方是它对 HCl 或 HBr 都稳定，即使用高浓度的试剂也不受影响，但它能用催化氢解的方法或硫代苯酚钠处理脱去。

1.4 氨基酸侧链保护基概述

由于不少氨基酸的侧链上都带有能反应的基团，如羟基、巯基、酚基、 β -和 γ -羧基、胍基、咪唑基、 β -和 γ -酰胺键、吲哚基和硫醚等，为了避免副反应的发生，在多肽合成中往往也选用适当的保护基将它们保护起来。

下面主要叙述一下本论文涉及到的酪氨酸的侧链的保护。酪氨酸侧链上的酚羟基常用的保护基有酰基和烷基。酪氨酸在碱性溶液中与过量的 Z-Cl 反应可以得到 Z-Tyr(Z)-OH^[19]，利用酪氨酸的铜盐复合物同 Z-Cl 反应则可单独导入 O-Z 基而得到 H-Tyr(Z)-OH。酚基上的苄氧羰基也同样可用催化氢化、HBr/HOAc、碱皂化以及肼解等方法脱去。

由于酰基保护基的一些缺点，更常用的是将酚基用烷基保护。其中用得最多的是 O-苄基保护^[20]和 O-叔丁基保护^[21]。O-苄基对碱和弱酸解条件稳定，但能用催化氢化、Na/液氨还原以及强的酸解条件脱去。为了增加 O-苄基对酸的稳定性，可以

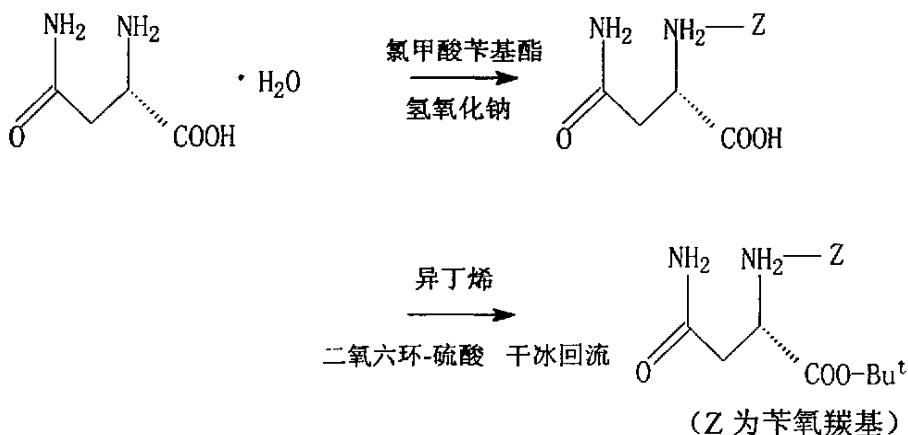
用吸电子基团取代的苄基如 3-溴苄基和 2, 6-二氯苄基等代替苄基来保护酪氨酸的酚基。近来还发展了用邻硝基苄基来保护酚基, 其优点是它能用光解的方法脱去。H-Tyr(Bu^t)-OH 的 O-叔丁基对催化氢化, 碱皂化和胼解等均稳定, 但能用 TFA (室温 1~2h) 或浓盐酸 (0℃, 8~10min) 处理脱去。

曾经用过的其他的酪氨酸酚基保护基还有吡啶-4-甲基、四氢吡喃基、二苯甲基和三苯甲基等。

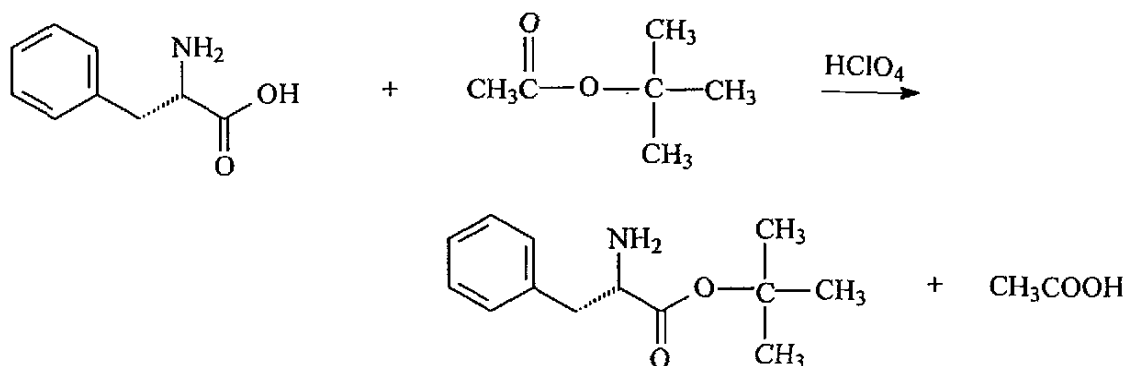
1.5 课题的主要研究内容及技术途径

本课题主要研究 L-天冬酰胺及 L-酪氨酸的氨基、羧基与侧链的保护。探讨苄氧羰基天冬酰胺叔丁酯和苄甲氧羰基酪氨酸苄醚的简便合成方法, 为研究天冬酰胺的环化缩合反应提供基本原料。

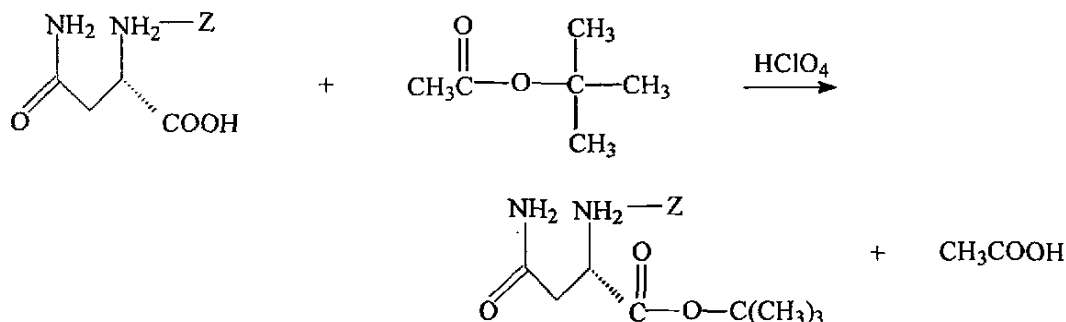
根据文献^[6,18]报道, 对 L-天冬酰胺的保护可先将天冬酰胺与氯甲酸苄基酯反应保护氨基, 然后再与异丁烯反应保护羧基。其基本反应方程式如下:



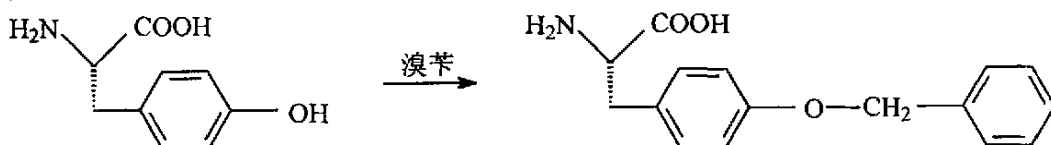
因异丁烯是易爆气体, 反应比较危险, 拟采用另外一条路线, 即把用苄氧羰基保护的 L-天冬酰胺与乙酸叔丁酯反应, 有文献^[22]报道将 L-苯丙氨酸和乙酸叔丁酯反应可得到 L-苯丙氨酸叔丁酯, 方程式如下:



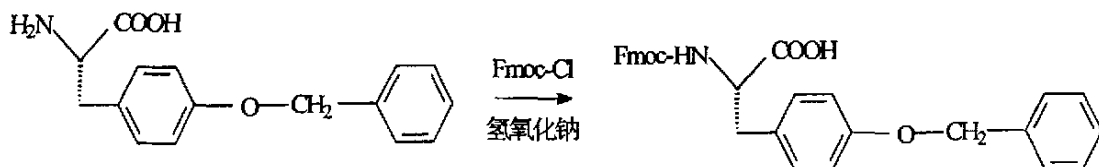
但是该方法未用于天冬酰胺的保护，本论文拟用这种方法来保护天冬酰胺的氨基，反应方程式如下：



对 L-酪氨酸的保护可先将酪氨酸与溴化苄反应保护侧链基团酚羟基，此法已有文献^[23,24]报道，反应方程式如下：



将上步所得产品 H-Tyr(Bzl)-OH 与苄氧羰基氯(Fmoc-Cl)反应保护氨基。有文献^[25]报道，Fmoc-Cl 与 L-色氨酸反应可得到苄氧羰基色氨酸，但是该方法未用于酪氨酸的保护，本论文拟用这种方法来保护酪氨酸的氨基。反应方程式如下：



2. 实验部分

实验仪器如下:

旋转蒸发器	RE-52C 型
DRX-300Hz 型核磁共振仪	德国 Bruker 公司
显微熔点测定仪	北京泰克仪器有限公司
WZZ-2S 数字式自动旋光仪	上海精密科学仪器有限公司
JB50-D 型增力电动搅拌器	上海标本模型厂
85-1 型磁力搅拌器	上海忠威电器有限公司
6402 型电子继电器	上海浦东跃欣科学仪器厂
PE-2400 型元素分析仪	南京大学现代分析中心
VECTOR-22 型红外光谱仪	德国 Bruker 公司

文中所用缩写符号意义如下:

Z — 苄氧羰基;

Bzl — 苄基;

Bu^t — 叔丁基;

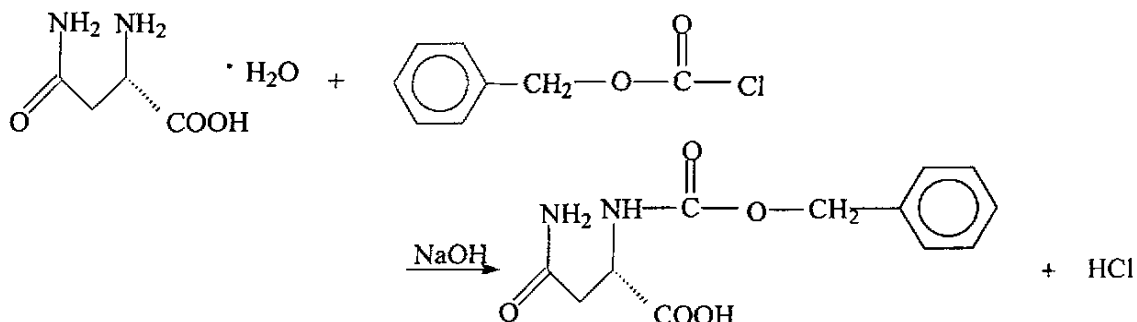
Asn — 天冬酰胺;

Tyr — 酪氨酸。

2.1 L-天冬酰胺的保护

2.1.1 L-天冬酰胺氨基的保护

2.1.1.1 反应路线



2.1.1.2 反应试剂

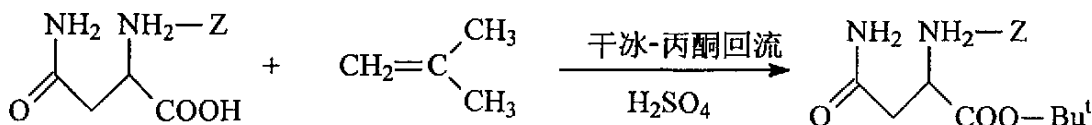
L-天冬酰胺	工业品	
氯甲酸苄基酯	工业品	
氢氧化钠	分析纯	上海试剂一厂

2.1.1.3 实验步骤

将 3.00g L-Asn · H₂O (20.0mmol) 溶于 10mL 2mol/L 氢氧化钠溶液中, 冰浴冷却, 同时滴加 5.12g 氯甲酸苄基酯 (4.29mL, 30mmol) 和 14mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 保持反应混合物的 pH 值为 8 以及反应温度不超过 10℃, 反应物加完后撤去冰浴, 继续搅拌反应 1.5h, 反应结束后在反应混合物中加水至固体产物全部溶解, 用 30mL 乙醚萃取三次, 分出水层, 加入 6.8mL 10%HCl 使产物析出, 过滤, 水洗, 真空干燥得 Z-Asn-OH 3.62g, 产率 68%, m.p. 162~164℃ (文献[6]: m.p. 166~168℃)。

2.1.2 L-天冬酰胺羧基的保护

2.1.2.1 反应路线一



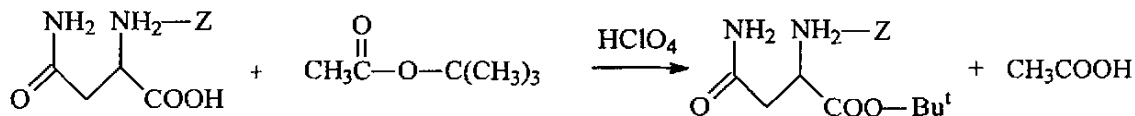
2.1.2.2 反应试剂

羰基天冬酰胺	上步反应产物	
异丁烯	工业品	南京梅山化工厂
1, 4 二氧六环	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸乙酯	分析纯	上海试剂一厂
正己烷	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司

2.1.2.3 实验步骤

在 250mL 的三口烧瓶上安置冷凝器, 在烧瓶中加入 2.66g Z-Asn-OH (10.0mmol) 及 22mL 1,4 二氧六环, 然后将体系密封, 将干冰和丙酮加入到冷凝器中, 使温度保持在 -30~-10℃, 往反应瓶中加入 98% 的浓硫酸 2.20mL, 将异丁烯气体导入反应体系中, 并使其冷凝回流, 不断加干冰于丙酮中, 使异丁烯处于回流状态下反应 4h。将反应液倒入 5% 碳酸氢钠溶液 160mL 和乙醚 60mL 组成的混合液中并快速搅拌混合液, 分出无机层, 用 40mL 乙醚洗两次, 混合醚液用 140mL 5% 碳酸氢钠溶液洗后用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 蒸发溶剂, 粗品再用乙酸乙酯和正己烷重结晶得到 2.3g, 产率为 71.3%, m.p. 102 ~ 104℃ (文献 [26] m.p. 103 ~ 105℃)。
¹HNMR(CD₃COCD₃) δ: 1.38 ~ 1.41 (9H, s, C(CH₃)₃), 4.4(1H, m, CH), 5.08(2H, s, OCH₂C₆H₅), 7.31~7.38(5H, m, C₆H₅)。

2.1.2.4 反应路线二



2.1.2.5 反应试剂

乙酸叔丁酯	化学纯	上海实验试剂有限公司
高氯酸	分析纯	上海试剂一厂
乙醚	分析纯	上海试剂一厂

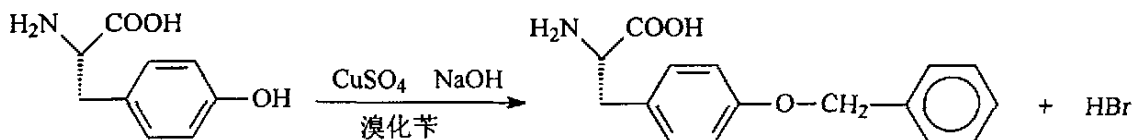
2.1.2.6 实验步骤

在 100mL 三口烧瓶中加入 0.97g Z-Asn-OH 及 20mL 乙酸叔丁酯，冰浴冷却，在 0℃ 下加入 0.46mL 高氯酸，搅拌反应半小时，撤去冰浴，在 15℃ 下继续搅拌反应 5h，反应结束后将反应液倒入 180mL 5% 的碳酸钾溶液与 40mL 乙醚的混合液中，水层分别用 40mL 乙醚萃取三次，合并醚层，用 100mL 5% 碳酸钾溶液洗涤，所得醚液用旋转蒸发仪蒸干溶剂得到乳白色固体 1.105g，产率为 94.7%，m.p. 100~102℃ (文献 [26] m.p. 103~105℃)。¹H NMR(CDCl₃) δ: 1.30~1.44(9H, s, C(CH₃)₃), 4.44~4.46(1H, m, CH), 5.10(2H, s, OCH₂C₆H₅), 7.26~7.34(5H, m, C₆H₅)。

2.2 L-酪氨酸的保护

2.2.1 L-酪氨酸侧链功能团酚羟基的保护

2.2.1.1 反应路线



2.2.1.2 反应试剂

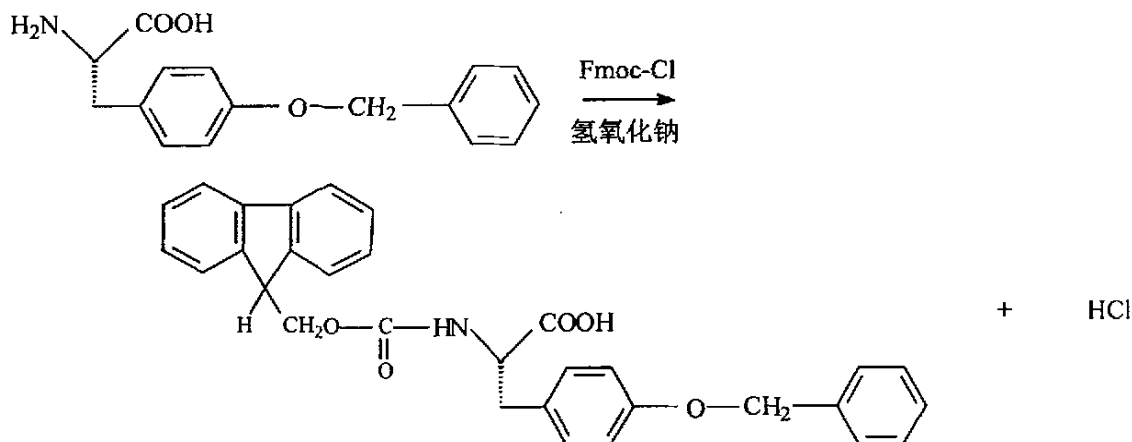
酪氨酸	工业品	
硫酸铜	分析纯	上海振欣试剂厂
甲醇	分析纯	上海试剂一厂
溴化苄	分析纯	国药集团化学试剂
乙酸	分析纯	南京化学试剂一厂

2.2.1.3 实验步骤

将 7.24g 酪氨酸溶于 20mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液中, 搅拌下加入 4.99g 五水硫酸铜的饱和水溶液, 30℃水浴加热 15min, 冷却后加入 150mL 甲醇和 20mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液, 使析出的铜盐复合物溶解, 然后加入 50mL 溴化苄, 并在 25℃激烈搅拌 1h。冷却, 滤取铜盐复合物, 用甲醇/水 (1:3.5) 洗, 60℃干燥到恒重, 产量 8.6g。将所得铜盐复合物用 1mol/L 盐酸多次研磨破坏, 过滤, 依次用水、稀氨水 (30%) 和丙酮/乙醚 (1:3) 洗涤, 用 80%醋酸重结晶得 H-Tyr(Bzl)-OH 无色结晶 4.88g, 产率为 45%。m.p.220~222℃, $[\alpha]_D^{20} = -11.2^\circ [C=1.00, 80\%CH_3COOH]$ (文献[23]: m.p.222~223℃, $[\alpha]_D^{20} = -10.9^\circ [C=1.00, 80\%CH_3COOH]$)。

2.2.2 L-酪氨酸氨基的保护

2.2.2.1 反应路线



2.2.2.2 反应试剂

H-Tyr(Bzl)-OH	上步产品	
1,4-二氧六环	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
苄氧羰酰氯	工业品	扬州宝盛生物化工有限公司
盐酸	分析纯	南京化学试剂一厂

2.2.2.3 实验步骤

将 1g H-Tyr(Bzl)-OH 溶于 10mL 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液与 4mL 1,4-二氧六环的混合溶液中, 冰浴冷却, 边搅拌边同时加入苄氧羰酰氯 (1g) 的 1,4-二氧六环 (10mL) 溶液与 7.4mL 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液, 然后缓慢升温至室温继续搅拌反应 20h。反应结束后将反应液倒入水中, 在冰浴下加入 1 mol/L HCl 调 pH 至弱酸性, 有白色固体产生, 过滤, 水洗, 干燥得到白色固体 1.78g, 产率 98%, m.p.172~174

°C (文献: m.p.175~178°C)。¹HNMR (DMF-d₇) δ2.98~3.17(2H,m,CH₂C₆H₄),4.19~4.37(4H,s,Tyr 上的 CH, 苄甲氧基上的 CH₂、CH), 5.07 (2H,s,CH₂C₆H₅), 6.95~7.93(17H,s,Fmoc 上的 H,Tyr 苯环上的 H, Tyr 侧链保护基苯环上的 H)。

3. 结果与讨论

3.1 Z-Asn-OH 的合成

苄氧羰基虽然是一个比较老的氨基保护基，但是一直被广泛地应用，因为它具有很多优点：A.试剂的制备和保护基的导入都比较容易；B.N-苄氧羰基氨基酸和肽易于结晶而且比较稳定；C.苄氧羰基氨基酸在活化时不易消旋；D.能用多种温和的方法选择性地脱去。

自由氨基酸在用氢氧化钠或碳酸氢钠控制的碱性条件下很容易同氯甲酸苄基酯反应得到 N-苄氧羰基氨基酸。氨基酸酯同氯甲酸苄基酯的反应则是在有机溶剂中进行，并且用碳酸氢盐或三乙胺来中和反应所产生的盐酸。除了氯甲酸苄基酯还有其他一些苄氧羰基活化酯也可用来作为 Z 基的导入试剂，但一般都采用氯甲酸苄基酯。因为氯甲酸苄基酯很容易用苯甲醇同光气反应来制备，在冰箱中可以保存半年以上而不发生显著的分解。

3.1.1 反应时间对产率的影响

取氯甲酸苄基酯与天冬酰胺投料比（摩尔比）为 1:1，反应温度为 25℃，改变反应时间得到不同的产率，结果列入表 3.1.1 中。

表 3.1.1 反应时间对产率的影响

时间/h	0.5	1	1.5	2
产率/%	54.8	61.9	62.4	62.5

由表 3.1.1 可以看出当反应时间达到 1.5h 后再延长反应时间对产率基本上没有影响，因此本反应取 1.5h 为佳。

3.1.2 反应物投料比对产率的影响

取反应温度为 25℃，反应时间为 1.5h，改变反应物投料比得到不同的产率，结果列入表 3.1.2 中。

表 3.1.2 反应物投料比对产率的影响

n 氯甲酸苄基酯/ n 天冬酰胺	0.67	1	1.5	2
产率/%	38	62.4	68	68.5

由表 3.1.2 可以看出反应物投料比是影响产率的一个重要因素，氯甲酸苄基酯过量时产率较高，当氯甲酸苄基酯的摩尔数从天冬酰胺的 1 倍增加到 1.5 倍时产率增加了 5.6%，但是从 1.5 倍增加到 2 倍时产率只增加了 0.5%，虽然产率有所增加，

但是考虑到经济成本等因素,本反应的最适投料比是 n 氯甲酸苄基酯/ n 天冬酰胺=1.5。

3.1.3 反应温度对产率的影响

取氯甲酸苄基酯与天冬酰胺的投料比(摩尔比)为 1:1,反应时间为 1.5h, 改变反应温度得到不同的产率, 结果列入表 3.1.3 中。

表 3.1.3 反应温度对产率的影响

温度/°C	15	20	25	30
产率/%	21	59.5	62.4	62

由表 3.1.3 可以看出本反应最适温度为 25°C, 当温度低于 25°C 时反应不完全, 继续升高温度对产率基本无影响。

由上面一系列实验可以看出本反应的最佳实验条件是取氯甲酸苄基酯与天冬酰胺的投料比(摩尔比)为 1.5:1, 反应温度为 25°C, 反应时间为 1.5h。按此最佳条件可得到最佳反应产率为 68%。

3.2 Z-Asn-OBu^t 的合成

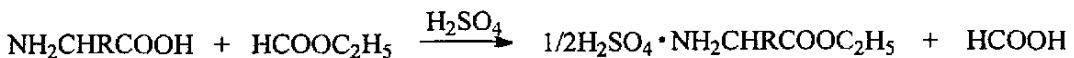
3.2.1 酯化概述

一般氨基酸的酯化有以下几种方法:

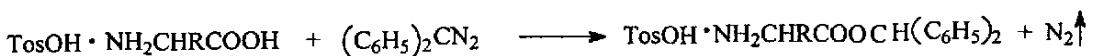
1) 氨基酸同醇直接脱水反应 在酸的存在下, 氨基酸可以同醇发生直接脱水反应成酯。这是一个平衡反应, 酸的作用一方面是和氨基酸的氨基形成盐而使羧基游离, 另一方面是催化平衡到达。所用的酸一般有盐酸、苯磺酸^[27]、对甲苯磺酸和多聚磷酸等, 个别场合也可以用路易斯酸(如三氯化硼)。

2) 用烯烃酯化 将氨基酸悬浮在二氧六环-硫酸中, 通入异丁烯气体到饱和, 密封反应可以得到氨基酸的叔丁酯^[28]。反应的好坏同氨基酸的溶解度有关, 如苯丙氨酸溶解度较好, 反应较快, 并可得到 75% 的酯化产率, 甘氨酸的溶解度很小, 则不易得到酯化产物。

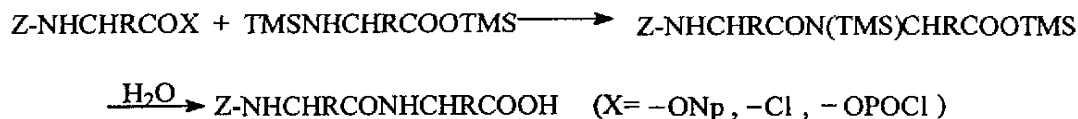
3) 转酯反应 在酸或碱的存在和催化下, 羧酸同羧酸酯之间可以发生酯交换反应。氨基酸同羧酸酯之间也可以进行酯的交换反应, 不过一般是采用酸(如高氯酸、对甲苯磺酸和硫酸等)作为催化剂^[29]。例如



4) 用重氮烷进行酯化 例如氨基酸的对甲苯磺酸盐在 DMF 中加热到 50°C 可以与重氮二苯甲烷反应得到氨基酸二苯甲酯的对甲苯磺酸盐^[30]。



5) 氨基酸同三甲基氯硅烷反应 1mol 的三甲基氯硅烷 (TMS-Cl) 同 1mol 氨基酸酯 (A-OR) 反应生成 TMS-A-OR。但若用 2mol 以上的三甲基氯硅烷同 1mol 氨基酸反应则可得到 TMS-A-OTMS^[27]。TMS 基很容易水解脱去, 因此可用于接肽时的暂时性保护基。如:



本实验用叔丁酯作为羧基保护基, 采用异丁烯酯化法及转酯反应来制得 Z-Asn-t-Bu。叔丁酯是目前多肽合成中最常用的羧基保护基之一。大多数氨基酸叔丁酯的自由酯都可用减压蒸馏纯化, 它比相应的甲酯和乙酯等稳定, 可放置较长时间而不生成二酮哌嗪。叔丁酯在大多数形成肽键的缩合反应条件下不分解, 必要时又可方便地在三氟乙酸中脱去保护, 是理想的保护基。但是叔丁酯的制备相对比较困难。由于叔丁基的空间位阻, 酸催化下由叔丁醇和氨基酸直接酯化通常得不到预期的产物。采用激烈的酯化条件又可能导致氨基酸的消旋化。为克服这些困难, 一般以异丁烯作酯化剂, 在酸催化剂存在下与氨基酸反应制备叔丁酯。例如, 高压釜中, 异丁烯与苄氧羰基保护的天冬酰胺在硫酸催化下反应, 生成相应叔丁酯。由于伴随生成 N-叔丁基副产物, 收率不高。如果采用普通玻璃反应装置, 增加干冰回流冷凝器, 使异丁烯保持回流, 减少异丁烯用量和反应压力, 可有效地抑制 N-叔丁基化副产物, 使酯化收率提高。另外, 还可通过转酯反应来制得叔丁酯。实验的初步探索结果列入表 3.2.1。

根据表 3.2.1 可以看出自由天冬酰胺不管是与乙酸叔丁酯反应还是与异丁烯反应都无法得到天冬酰胺的叔丁酯, 而当 N-保护天冬酰胺与乙酸叔丁酯或异丁烯反应时都能得到相应的叔丁酯。分析原因可能是因为自由天冬酰胺极性较大, 不能溶于乙酸叔丁酯中, 而天冬酰胺氨基接上保护基 (苄氧羰基) 以后, 极性变小, 使之能溶于有机溶剂中, 进而反应得以进行。

表 3.2.1 Z-Asn-OBu^t 制备的初步探索

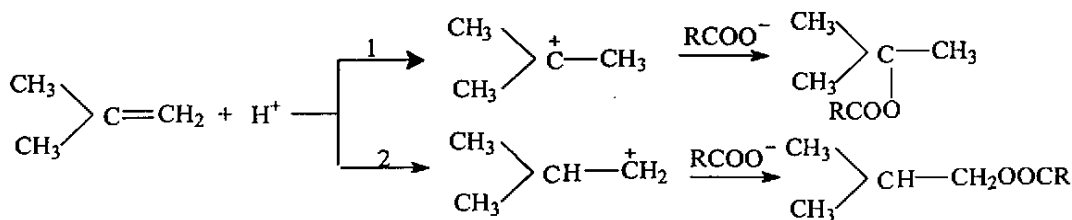
氨基酸	酯化剂	催化剂	溶剂	反应条件	产率 (%)
H-Asn-OH (0.55g)	乙酸叔丁酯 (20mL)	HClO ₄ (0.46mL)	无	N ₂ 保护 10℃ 6h	0
H-Asn-OH (0.55g)	乙酸叔丁酯 (20mL)	HClO ₄ (0.46mL)	无	N ₂ 保护 30℃ 6h	0
H-Asn-OH (0.55g)	乙酸叔丁酯 (20mL)	98% H ₂ SO ₄ (0.3ML)	无	N ₂ 保护 10℃ 6h	0
H-Asn-OH (0.55g)	乙酸叔丁酯 (20mL)	98% H ₂ SO ₄ (0.3ML)	无	N ₂ 保护 30℃ 6h	0
H-Asn-OH (1.5g)	异丁烯	98% H ₂ SO ₄ (2.2mL)	Dioxane (22mL)	封闭体系 干冰回流, 4h	0
Z-Asn-OH (2.66g)	异丁烯	98% H ₂ SO ₄ (2.2mL)	Dioxane (22mL)	封闭体系 干冰回流, 4h	75%
Z-Asn-OH (0.97g)	乙酸叔丁酯 (20mL)	HClO ₄ (0.46mL)	无	N ₂ 保护 20℃ 5h	94.7%

3.2.2 以异丁烯为酯化剂合成 Z-Asn-OBu^t

异丁烯与苄氧羰基保护的天冬酰胺在硫酸催化下, 在高压釜中可以反应生成相应的叔丁酯 Z-Asn-OBu^t。由于伴随生成 N-叔丁基化副产物, 收率不高 (57%)。^[18] 本文参考了本课题组提出的改进方法, 采用普通玻璃反应装置, 增加干冰回流冷凝器, 使异丁烯保持回流, 减少异丁烯用量, 有效地抑制了 N-叔丁基化副反应, 使酯化收率提高到 70% 以上。另外, 考虑到经济成本, 可以用冰-盐来代替干冰-丙酮冷凝, 效果与用干冰-丙酮基本相同。

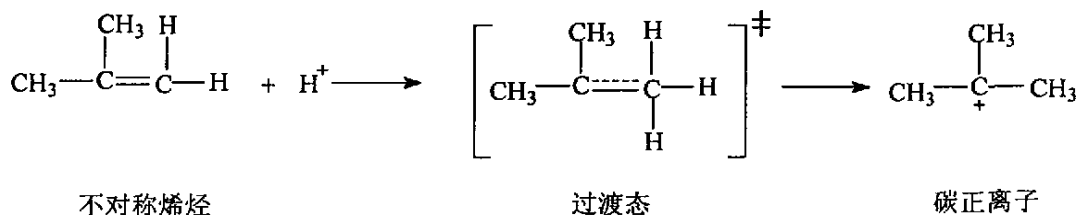
3.2.2.1 反应机理分析^[29]

反应是在浓硫酸催化下进行的, 异丁烯在浓硫酸作用下可以加成质子形成碳正离子, 形成碳正离子可以有两种不同的方式, 即质子和不同的双键碳原子相结合, 形成不同的碳正离子, 碳正离子与羧基氧结合, 就生成氨基酸叔丁酯或氨基酸异丁酯。



反应生成哪种碳正离子是由碳正离子的稳定性决定的。在上述反应中，途径 1 形成的是正碳原子连有三个甲基的叔碳正离子，途径 2 形成的是正碳原子连有一个异丙基而仍连有两个氢原子的伯碳正离子。

碳正离子是活性中间体，在形成时必然要通过一个能量更高的过渡态，如下式所示：



碳正离子形成的难易及其稳定性和能量的关系可以在图 3.2.1 的反应进程图中表示出来。

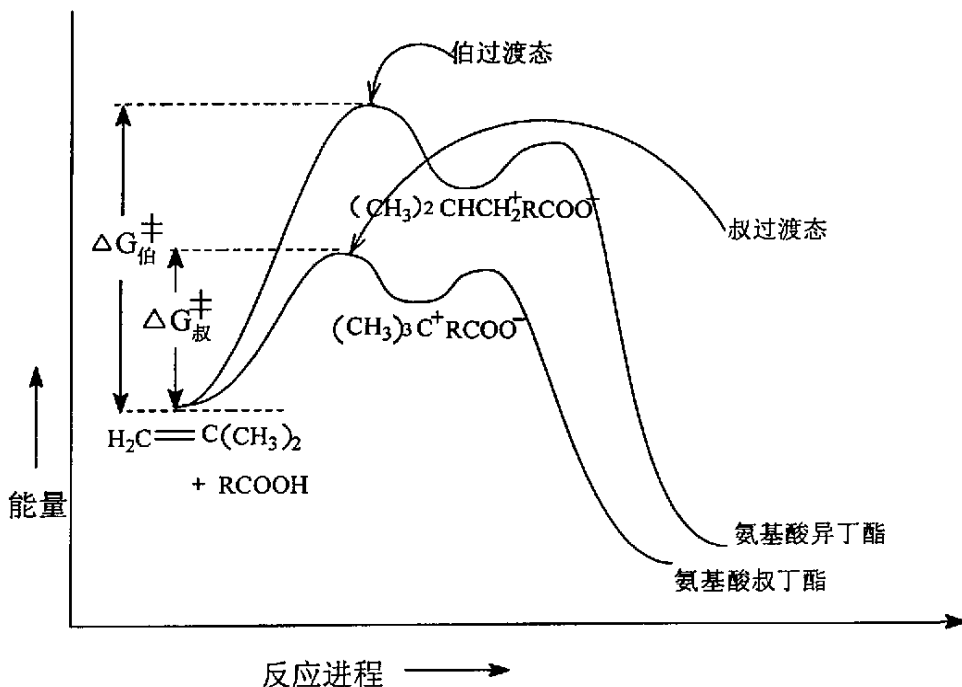
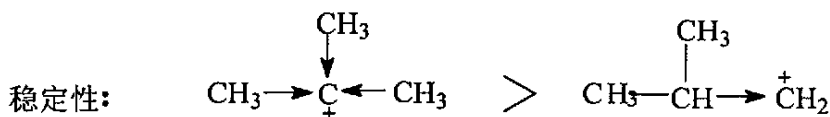


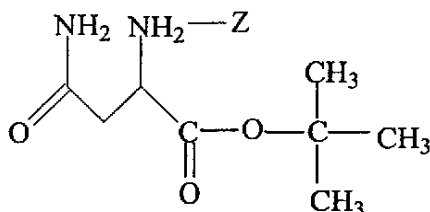
图 3.2.1 碳正离子生成难易和稳定性的比较

和 sp^2 杂化碳原子相连的甲基及其他烷基都有给电子性或供电性（和相连的氢原子相比较）。由于诱导效应，也由于超共轭效应，三个甲基都将电子云推向正碳原子，就减低了正碳原子的正电性，或者说，它的正电荷并不是完全集中在正碳原

子上，可以向三个甲基上分散。按照静电学，一个带电体系的稳定性决定于其电荷的分布情况，电荷愈分散，体系愈稳定。和此相比，由另一途径生成的伯碳正离子，它的使正电荷分散的因素就不如叔碳正离子有利。这里的伯碳正离子，只有一个给电子性的异丙基与正碳原子相连，显然它的稳定性不如叔碳正离子。所以加成主要采取途径 1，先生成叔碳正离子。最后产物以叔丁酯为主。



所以当异丁烯与 Z-Asn-OH 反应的时候，应该生成 Z-Asn-OH 的叔丁酯，如下式所示：



3.2.2.2 反应因素对产率的影响

溶剂种类、硫酸、异丁烯的用量等因素对此酯化反应有显著影响^[18]。用二氯甲烷、二氯甲烷-二氧六环（体积比为 1:1）的混合溶剂作溶剂，反应都不能进行。因为 Z-Asn-OH 在其中的溶解度很小。加入硫酸可以增加 Z-Asn-OH 在二氧六环中的溶解度，使反应在均相条件下进行。异丁烯的用量不能过多，异丁烯是在常压下通入的，反应时间也不需要过长，4h 左右即可，因为继续延长时间，气体几乎不吸收，并可能引起副反应，导致产率下降。

3.2.2.3 核磁共振法表征 Z-Asn-OBu^t 结构

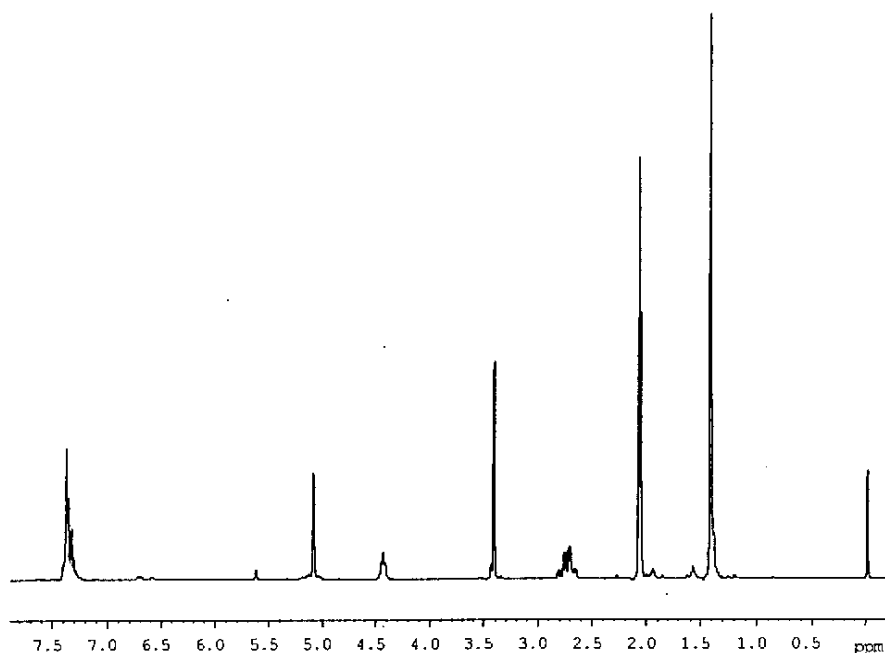
以氘代丙酮作溶剂，所得图谱如图 3.2.2 所示（原图见附录 A）：

对 Z-Asn-OBu^t 的 ¹HNMR 谱图解析：

- a: 1.4ppm 处的峰为叔丁基上 9 个氢的峰；
- b: 5.08ppm 处的峰为天冬酰胺氨基上的氢的峰；
- c: 7.3ppm 处峰为苯环上的氢的峰。

2.07ppm 处的峰为所用试剂氘代丙酮的峰，3.4ppm 处的峰为所用试剂氘代丙酮中水上的氢的峰。

由此 ¹HNMR 谱图可知，样品分子典型质子信号与 Z-Asn-OBu^t 一致，因此，所得产物是目标产物 Z-Asn-OBu^t。

图 3.2.2 Z-Asn-OBu^t 的 ¹H NMR 谱图 1

3.2.3 以乙酸叔丁酯为酯化剂合成 Z-Asn-OBu^t

3.2.3.1 反应时间对产率的影响

取催化剂高氯酸的摩尔数为反应物天冬酰胺的 1.5 倍，反应温度为 20℃，改变反应时间得到不同的产率，结果列入表 3.2.2。

表 3.2.2 反应时间对产率的影响

时间/h	3	4	5	6
产率/%	82	83	94.7	87.4

由表 3.2.2 可以看出在 5h 以内，随着时间的增加，产率不断提高，但是反应时间超过 5 h，反应产率反而下降，可能是因为反应物乙酸叔丁酯属于易挥发物质，反应时间增加，乙酸叔丁酯挥发损失掉越多，导致产率下降，因此，反应时间选 5h 为佳。

3.2.3.2 催化剂用量对产率的影响

取反应时间为 5h，反应温度为 20℃，改变催化剂用量得到不同的产率，结果列入表 3.2.3。

表 3.2.3 催化剂用量对产率的影响

$n_{\text{HClO}_4} / n_{\text{Z-Asn-OH}}$	0.7	1	1.5	2
产率/%	60	71.8	94.7	88.1

由表 3.2.3 可以看出催化剂用量是反应的一个重要因素, 催化剂用的过多或过少都会导致产率下降。当催化剂为反应物 Z-Asn-OH 的摩尔数的 1.5 倍的时候, 产率最高。

3.2.3.3 反应温度对产率的影响

取催化剂高氯酸的摩尔数为反应物天冬酰胺的 1.5 倍, 反应时间为 5h, 改变反应温度得到不同的产率, 结果列入表 3.2.4。

表 3.2.4 反应温度对产率的影响

温度/°C	15	20	25
产率/%	77.5	94.7	81.4

由表 3.2.4 可以看出 20°C 是反应的最佳温度, 温度继续升高将导致产率下降。

3.2.3.4 正交实验及结果分析

正交表是正拉丁方的推广^[30]。一般记成 $L_n(r_1 \times r_2 \times \dots \times r_m)$ 。其中 L 表示正交表, n 表示正交表的行数, 即实验的次数, m 表示正交表的列数, 即实验至多可以安排的因子数, r_j 表示第 j 个因子的水平数。^[32]

根据上述的单因素实验, 设计了该反应的正交实验:

- (1) 指标: 产率/%;
- (2) 因素: A 反应时间; B 催化剂用量; C 反应温度;
- (3) 水平: 如下表

表 3.2.5 因素水平表

	(1)	(2)	(3)
A	4h	5h	6h
B	1	1.5	2
C	15°C	20°C	25°C

根据以上因素水平设计一个 $L_9(3^3)$ 的正交表, 完成 9 个实验, 所得结果列入表 3.2.6 中。

表 3.2.6 正交实验表

序号	A	B	C	产率/%
1	(1)	(1)	(1)	73.6
2	(1)	(2)	(2)	82
3	(1)	(3)	(3)	66.3
4	(2)	(1)	(3)	71.8
5	(2)	(2)	(1)	81.4
6	(2)	(3)	(2)	71.9
7	(3)	(1)	(2)	71.5
8	(3)	(2)	(3)	86.6
9	(3)	(3)	(1)	76.6

表 3.2.7 是对合成 Z-Asn-OBu¹ 反应正交实验的分析:

表 3.2.7 合成 Z-Asn-t-OBu 反应正交实验分析表

K_{1j}	2.219	2.169	2.321
K_{2j}	2.251	2.5	2.304
K_{3j}	2.347	2.148	2.192
k_{1j}	0.740	0.723	0.774
k_{2j}	0.750	0.833	0.768
k_{3j}	0.749	0.683	0.731
R_j	0.01	0.150	0.043

其中, k_{ij} 表示第 j 列中对应水平 i 的实验指标数据之和, R_j 越大表示该因子对指标的作用越大。

因此, 根据表 3.2.7 计算结果可以得出结论: 对反应产率起最大作用的是催化剂高氯酸的用量, 其次是反应温度, 而反应时间的影响是最小的。

从以上实验表明以乙酸叔丁酯为原料合成 Z-Asn-OBu¹ 反应的最佳条件为催化剂高氯酸的用量取 Z-Asn-OH 的摩尔量的 1.5 倍, 反应温度取 20℃, 反应时间取 5h。

取上述条件为反应条件设计一实验, 所得产率达到 94.7%。

3.2.3.5 核磁共振分析

以氘代氯仿作溶剂，所得图谱如图 3.2.3 所示（原图见附录 B）：

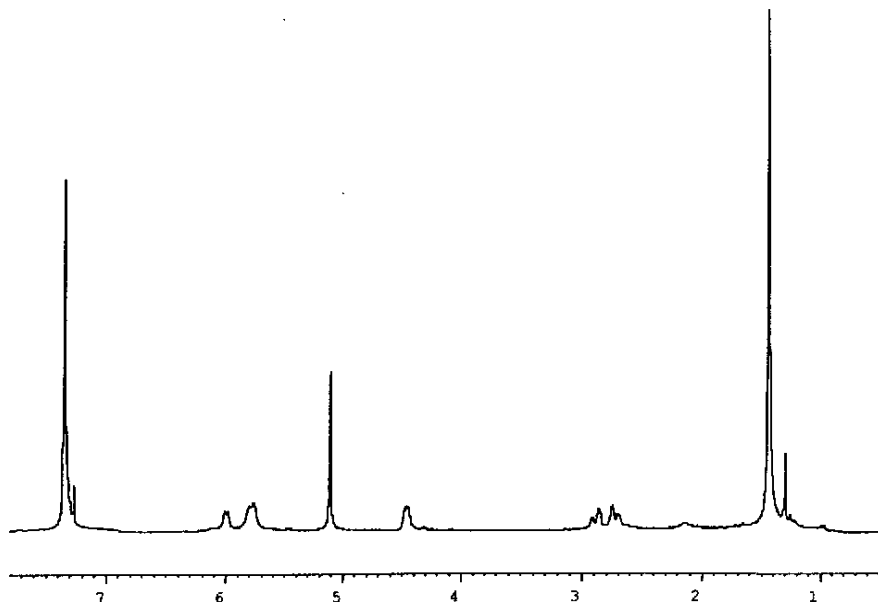


图 3.2.3 Z-Asn-OBu^t的¹H NMR 谱图 2

除了 7.3 处的氘代氯仿的峰以外，该图谱与图 3.2.2 基本一致，具体解析见 3.2.2.4 节，可见，此反应也得到了目标产物 Z-Asn-OBu^t。

3.3 H-Tyr(Bzl)-OH 的合成

酪氨酸的酚基常用的保护基有酰基和烷基。酪氨酸可以通过图 3.3 的反应导入 O-酰基保护基。^[31]

酪氨酸在碱性溶液中同过量的氯甲酸苄基酯(Z-Cl)反应可以得到 Z-Tyr(Z)-OH，利用酪氨酸的铜盐复合物同 Z-Cl 反应可单独导入 O-Z 基而得到 H-Tyr(Z)-OH。酚基上的苄氧羰基也同样可用催化氢化、HBr/HOAc、碱皂化以及肼解等方法脱去。为了提高 O-Z 基对酸的稳定性以便于选择氨基的保护基，可用邻溴代苄氧羰基(O-Br-Z)来代替 O-苄氧羰基。同样，酪氨酸在 pH 9.3 同过量的 Boc-F 反应也可制得很好产率的 Boc-Tyr(Boc)-OH。已经试过的其他烷氧羰基还有甲氧羰基、乙氧羰基、丙氧羰基和异丁氧羰基等。N-苄氧羰基酪氨酸酯(Z-Tyr-OR)同苯甲酰氯或乙酰氯反应可在酚基上导入苯甲酰或乙酰保护基。O-乙酰基和 O-苯甲酰基对催化氢化和 HBr/HOAc 处理稳定，但能用碱皂化和肼解脱去。Z-Tyr-OR 或 Boc-Tyr-OR 同异氰酸酯(RNCO)反应则得到酚基被甲酰化的产物。O-胺甲酰基同样也可用碱皂化、氨解和肼解等方法脱去。

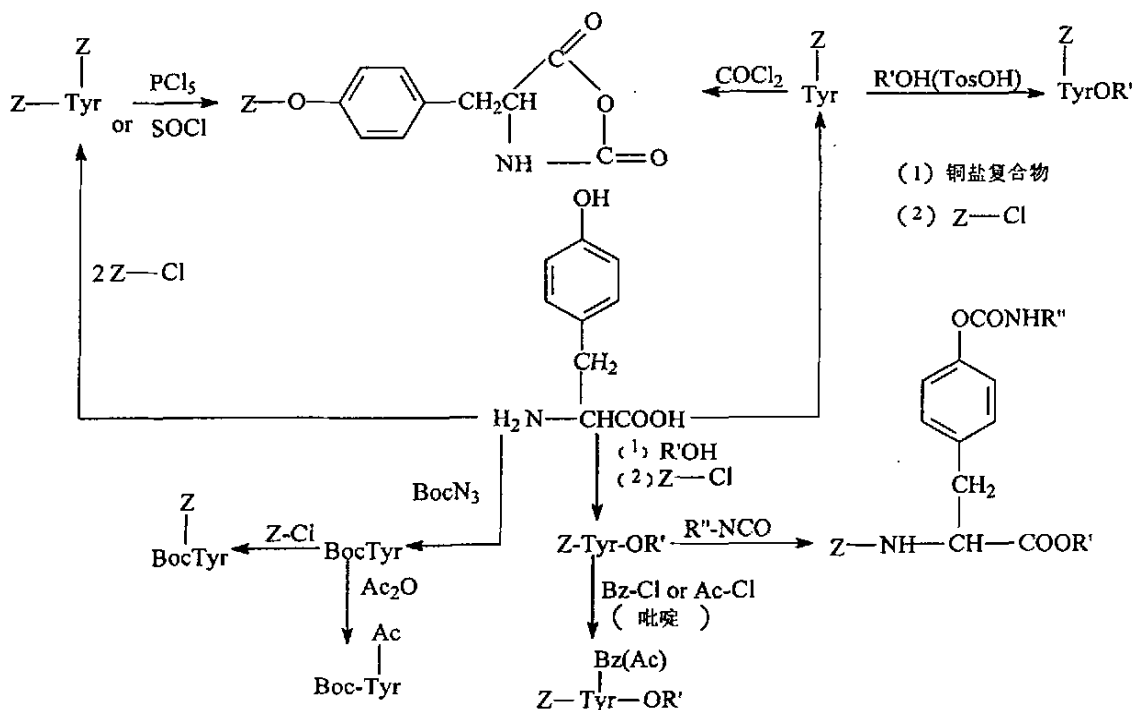
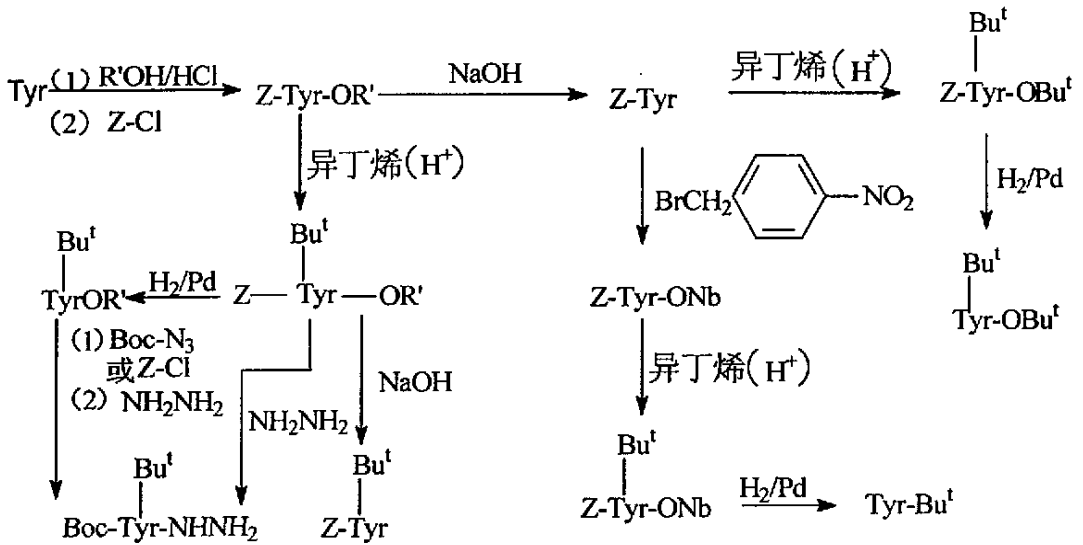


图 3.3 O-酰基酪氨酸衍生物的制备

由于酰基保护基的一些特点，更常用的是将酚基用烷基保护。其中用得最多的是 O-苄基酪氨酸和 O-叔丁基酪氨酸。O-苄基酪氨酸是通过酪氨酸的铜盐复合物在氢氧化钠存在下同溴化苄反应来制备。O-苄基对碱和弱酸解条件稳定，但能用催化氢化、钠/液氨还原以及强的酸解条件如 HBr/HOAc (1~2h)、HBr/TFA、液体 HF (0°C, 60min 回收 Tyr70%) 等脱去。H-Tyr(Bzl)-OH 的 O-苄基对 TFA 比较稳定，用 TFA-CH₂Cl₂ (1:1) 处理 15min 只脱去 0.5%，故在液相肽合成中能够适用于选择性脱去 N-Boc 的场合。但在固相肽合成中，即使是这样微小的脱落副反应也是希望避免的。为了增加对酸的稳定性，可以用吸电子基团取代的苄基如 3-溴苄基和 2,6-二氯苄基等代替苄基来保护酪氨酸的酚基。当 O-苄基酪氨酸被酸解脱去 O-苄基时，需要注意的副反应是可能会导致酪氨酸酚基的邻位上发生烷基化生成 3-烷基酪氨酸衍生物，这是由于在脱除反应中产生的烷基正离子对酚基邻位进行亲电取代的结果。近来还发展了用邻硝基苄基来保护酚基，其优点是它能用光解的方法脱去。

H-Tyr(Bu^t)-OH 则可通过图 3.4 的反应由 N-保护酪氨酸或其酯与异丁烯反应来制备。[32]

图 3.4 H-Tyr(Bu^t)-OH 衍生物的合成

H-Tyr(Bu^t)-OH 的 O-叔丁基对催化氢化、碱皂化和胼解等均稳定，但能用 TFA（室温 1~2h）或浓盐酸（0℃，8~10min）处理脱去。用 TFA 短时间处理没有发现 3-Bu^t-Tyr 的生成，只有当酪氨酸浓度为 0.25 mol/L 和 28℃ 下的较长时间处理，才会有较显著的 3-Bu^t-Tyr 生成，48h 后可达 3%。若加入硫酸作为亲电催化剂，并在 45℃ 处理 18h，可使 3-Bu^t-Tyr 的生成达到 9.5%。

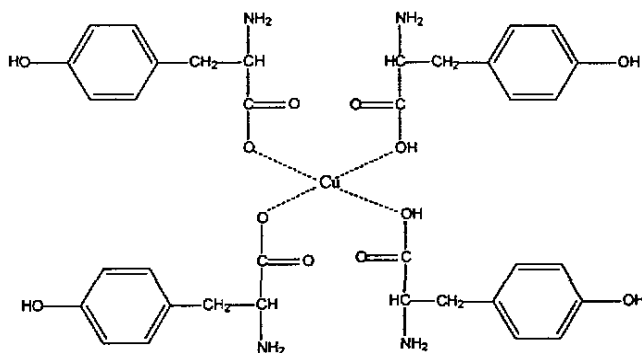
曾经用过的其它的酪氨酸酚基保护基还有吡啶-4-甲基、四氢吡喃基、二苯甲基和三苯甲基等。

本实验采用 O-苄基保护酪氨酸侧链的酚羟基。

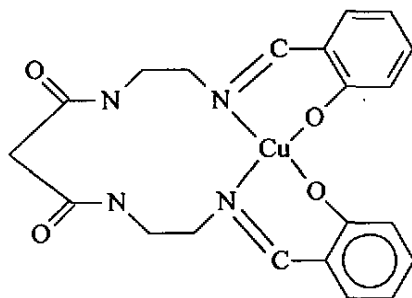
3.3.1 中间产物酪氨酸铜络合物的结构分析

将 7.24g 酪氨酸溶于 20mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液中，搅拌下加入 4.99g 五水硫酸铜的饱和水溶液，30℃ 水浴加热 15min，出现蓝色沉淀酪氨酸铜络合物，过滤，烘干，将蓝色沉淀用沸水重结晶，得到蓝色固体。将此固体作元素分析及红外光谱检测。

络合物元素分析值为 C% :54.73, H% :5.71, N% :6.91%（见附录 C）。根据这个结果推测该酪氨酸铜络合物的结构为如下所示：



按此结构各元素理论含量计算值为 C% :54.99, H% :5.38, N% :7.12%。与元素分析检测结果基本吻合。根据文献报道^[33]很多铜络合物都是四配位的, 例如由 N,N'-双[水杨醛缩(2-氨基)]丙二酰胺与醋酸铜乙醇溶液制得的铜络合物结构如下所示:



另外根据红外光谱图也可以证实酪氨酸与铜离子形成了络合物, 图 3.3.1 为酪氨酸的红外光谱图 (原图见附录 D), 图 3.3.2 为酪氨酸铜络合物的红外光谱图 (原图见附录 E)。

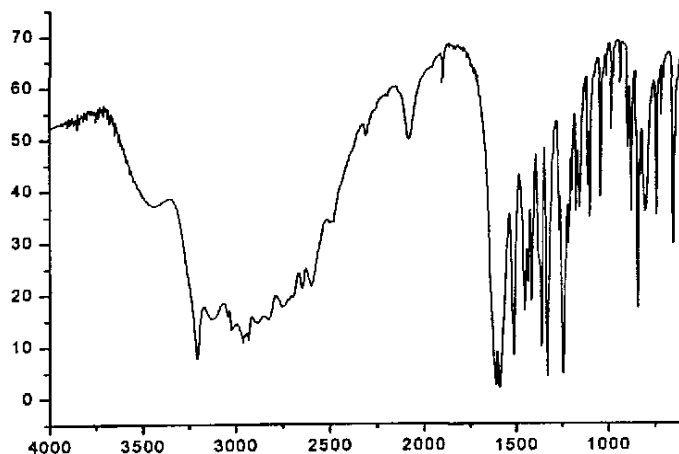


图 3.3.1 酪氨酸红外光谱图

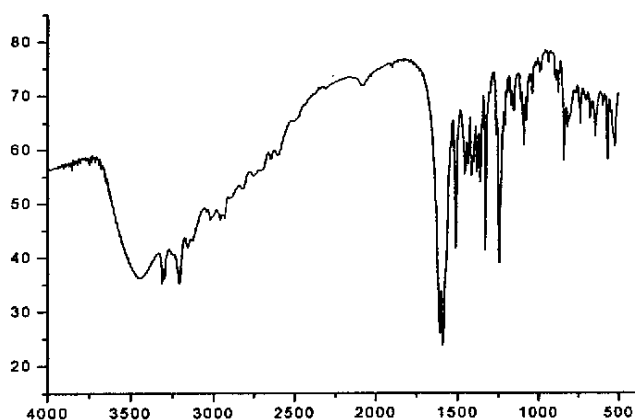


图 3.3.2 酪氨酸铜络合物红外光谱图

比较图 3.3.1 和图 3.3.2 可以发现酪氨酸形成酪氨酸铜络合物以后, 原在 2082 cm^{-1} 处 NH_3^+ 非对称变形振动和 NH_3^+ 受阻转动的合频谱带消失。在 3309 cm^{-1} 和 3206 cm^{-1} 处出现游离 NH_2 的伸缩振动双峰。说明铜和羧基氧原子配位使 NH_3^+ 变为游离伯胺。在指纹区 $1250\sim 675\text{ cm}^{-1}$ 处, 图 3.3.1 和图 3.3.2 有很大的区别, 说明两个样品是两种化合物。

根据此结构可以说明该酪氨酸铜络合物在反应中的作用是保护酪氨酸的羧基, 使苄基能够保护酪氨酸的酚羟基, 完成反应。

在本论文中研究酪氨酸铜络合物的目的主要是为了分析该铜络合物在反应中所起的作用, 但是氨基酸和肽的铜络合物在其他领域有着很重要的作用。^[34]例如甘氨酸组氨酸的铜络合物可促使神经细胞、免疫相关细胞和肾小球细胞的生长、分裂和分化, 可促进纤维细胞胶原蛋白的合成, 还能够加速大鼠、小鼠、猪等表面伤口的愈合。

3.3.2 反应物摩尔比对合成 H-Tyr(Bzl)-OH 反应产率的影响

取反应时间为 1h, 反应温度为 25°C , 改变反应物摩尔比, 得到不同的产率, 结果列入表 3.3.1 中。

表 3.3.1 反应物摩尔比对反应产率的影响

$n_{\text{Tyr}}/n_{\text{BnBr}}$	1.5:1	1:1	1:1.5
产率/%	32.7	45	46

由表 3.3.1 可以看出反应的最佳摩尔比是 1:1, 如果酪氨酸过量的话, 在粗产品中会含有过量的酪氨酸, 粗产品是用 80%醋酸重结晶的, 而酪氨酸是不溶于 80%醋酸的, 这就导致在重结晶时增加加热过滤操作。如果溴化苄过量的话, 反应结束后反应液中含有过量的溴化苄, 而溴化苄是一种催泪物质, 在后处理时对人体影响较大,

因此反应摩尔比最好选用 1:1。

3.3.3 反应时间对合成 H-Tyr(Bzl)-OH 反应产率的影响

取反应物摩尔比为 1:1, 反应温度为 25℃, 改变反应时间得到不同的产率, 结果列入表 3.3.2 中。

表 3.3.2 反应时对产率的影响

时间/h	0.67	1	1.5	2
产率/%	37.4	45	46	45.6

由表 3.3.2 可以看出反应达到 1h 以后, 再延长反应时间对产率基本没有影响了, 因此反应取 1h 即可。

3.3.4 反应温度对合成 H-Tyr(Bzl)-OH 反应产率的影响

取反应物摩尔比为 1:1, 反应时间为 1h, 改变反应温度得到不同的产率, 结果列入表 3.3.3 中。

表 3.3.3 反应温度对产率的影响

温度/℃	15	25	35
产率/%	33	45	45.4

由表 3.3.3 可以看出反应温度达到 25℃ 时就得到最高产率了, 再升高温度也不能提高产率。所以反应最适温度为 25℃。

3.3.5 Tyr(Bzl)的旋光度测定

通常把溶液的浓度规定为 1g/mL, 盛液管的长度规定为 1dm, 在这种条件下的旋光度叫做比旋光度, 一般用 $[\alpha]$ 表示。比旋光度只决定于物质的结构。因此各种化合物的比旋光度是它们各自特有的物理常数。^[35]

测定时一般可以用任一浓度的溶液, 在任一长度的盛液管中进行测定。然后将实际测得的旋光度 α , 按下式换算成比旋光度 $[\alpha]$ 。

$$[\alpha] = \alpha / (l * C)$$

式中: C——溶液的浓度 (g/mL); l——管长 (dm)。

3.3.5.1 实验操作

第一步, 准确称取样品 0.0823g, 用 80%醋酸溶液配置成 20mL 待测溶液。计算 C (浓度) = 0.004115g/mL。

第二步, 润洗管长度为 1dm, 先用 80%醋酸将盛液管润洗三遍, 然后在盛液管中盛满 80%的醋酸, 放入旋光仪中, 对旋光仪进行校零。

第三步, 将盛液管拿出, 倒掉醋酸, 用已配好的样品溶液润洗盛液管三遍, 然后进行测定, 测三次, 取其平均值。测得:

$$\alpha_1 = -0.046^\circ$$

$$\alpha_2 = -0.047^\circ$$

$$\alpha_3 = -0.045^\circ$$

$$\text{则 } \alpha (\text{平均}) = -0.046^\circ$$

第四步, 根据公式计算比旋光度:

$$[\alpha] = \alpha / (l \cdot C) = -0.046 / (1 \cdot 0.004115) = -11.2^\circ$$

所以, 实验所得产品 Tyr(Bzl) 的比旋光度为:

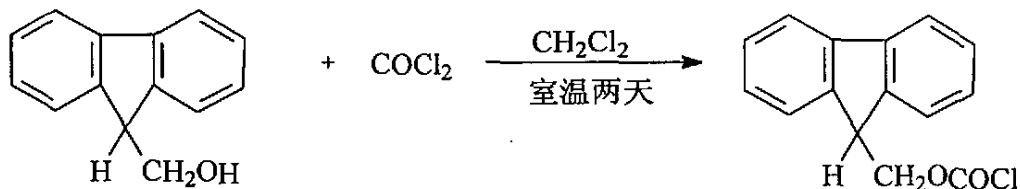
$$[\alpha]_D^{20} = -11.2^\circ$$

(D 表示旋光仪以钠光灯为光源, 20 表示实验操作时温度为 20℃)

文献值为 $[\alpha]_D^{20} = -10.9^\circ$, 样品测得结果与文献基本一致。

3.4 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的合成

苄甲醇在无水二氯甲烷中与过量光气反应可以得到很好产率的苄甲氧羰基氯 (Fmoc-Cl), 反应方程式如下所示:



所得的 Fmoc-Cl (熔点 61.5-63℃) 在二氧六环- Na_2CO_3 溶液中 (pH 8~9) 同氨基酸反应则可得到 Fmoc-氨基酸。

苄甲氧羰基同许多烷氧羰基不同, 它对酸稳定, 但能用浓氨水或二氧六环-甲醇-4N NaOH(30:9:1) 以及用哌啶、乙醇胺、环己胺、1, 4-氮氧六环、吡咯烷酮等胺类的 50% 二氯甲烷溶液脱去。叔胺 (如三乙胺) 的脱去效果较差, 具有空间位阻的胺的脱除效果最差。此外, 还可用带有环状仲胺基团的不溶的高分子试剂在室温下处理脱去。

苄甲氧羰基可与酸脱去的保护基搭配而用于液相和固相的肽合成。苄甲氧羰基磺化后得到 2-磺酸苄甲氧羰基, 它也可用于固相肽合成中作为氨基保护基。

3.4.1 合成方法的改进

Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的合成参考了关于制备 Fmoc-Trp-OH 的文献^[25]。按文献报道, 制备 Fmoc-Trp-OH 时, 将 Trp (1.58g) 加入 1,4 二氧六环 (10mL) 和 NaCO_3 (10% 20.2mL) 的混合溶液中, 搅拌, 冰浴冷却, 加入 Fmoc-Cl(2g) 的 1,4-二氧六环 (20mL) 溶液。在冰浴下反应 4h, 然后在室温下继续反应 8h, 反应结束后将反应液倒入 450mL 的水中, 用乙醚萃取, 水层中滴加盐酸至刚果红试纸变色, 然后放置冰箱中过夜。过滤可得到产物 3.1g, 产率为 94%。

但是, 用这种方法来制备 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH, 得不到产物。其原因可能是: 第

一，在整个反应过程中酪氨酸溶解度很小，但是如果用氢氧化钠代替碳酸钠的话，酪氨酸在 1,4 二氧六环和氢氧化钠的混合溶液中溶解度显著增加；第二，在后处理时，不能用乙醚萃取，如果用乙醚萃取，再在水层中滴加盐酸，没有白色沉淀出现，如果将反应液倒入水中，然后直接滴加盐酸，就有产物出现。而且产率达到 98%。

3.4.2 核磁共振法表征 Fmoc- Tyr(Bzl)-OH 的结构

以氘代 DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 作溶剂，所得图谱如图 3.4.1 所示 (原图见附录 F)：

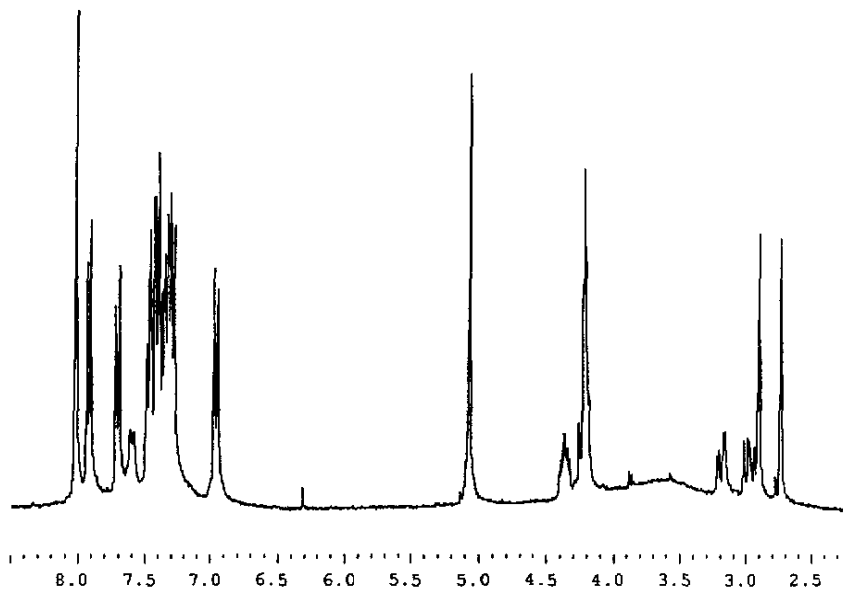


图 3.4.1 Fmoc- Tyr(Bzl)-OH 的 ^1H NMR 谱图 1

对 Fmoc- Tyr(Bzl)-OH 的 ^1H NMR 谱图解析如下：

- a. 5.05ppm 处的峰为连在苯与酪氨酸酚羟基之间的 CH_2 上的 H 质子的峰；
 - b. 7-8ppm 处的峰为 Fmoc 上 H 质子和酪氨酸苯环及侧链保护基苯环上 H 质子的峰。
 - c. 2.98-3.17ppm 处的峰为酪氨酸上 CH_2 上的 H 质子的峰；
 - d. 4.1-4.3ppm 处的峰为酪氨酸上 CH 及 Fmoc 上亚甲基上的 H 质子的峰。
- 2.7ppm, 2.8ppm, 8.02ppm 处的峰为氘代 DMF 的峰

由谱图 3.4.1 可知实验所得产品就是目标产物 Fmoc- Tyr(Bzl)-OH。

下图是 Fmoc- Tyr(Bzl)-OH 标准品的 ^1H NMR 谱图 (原图见附录 G)：

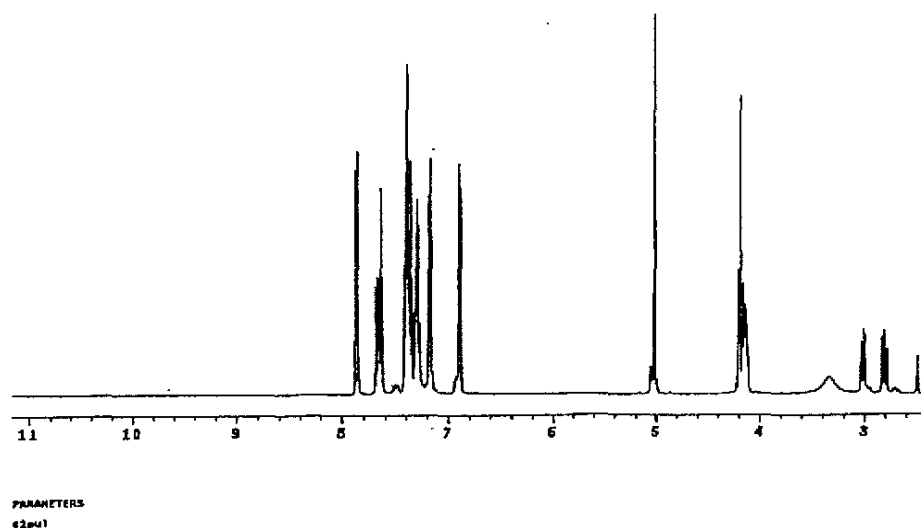


图 3.4.2 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 标准品的 ^1H NMR 谱图

比较图 3.4.1 和图 3.4.2，可以发现除了图 3.4.1 在 2.7，2.8，8.02 处的溶剂峰以外，其他的峰一致，这就进一步说明了实验所得产物确实是目标产物 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH。

3.4.3 反应溶剂的影响

上述方法用的溶剂是二氧六环，但是二氧六环有很大的毒性，是一种致癌物质，所以尝试用四氢呋喃来代替二氧六环，具体实验方法与用二氧六环作溶剂的实验方法一样。结果显示用四氢呋喃作溶剂同样能够制得 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH。产率也可达到 98%。测得产品熔点为 $174\sim 176^\circ\text{C}$ ，与用二氧六环作溶剂制得的产品熔点基本一致。用四氢呋喃作溶剂所得产品的 ^1H NMR 谱如下（原图见附图 4）：

以氘代 DMF (N,N -二甲基甲酰胺) 作溶剂

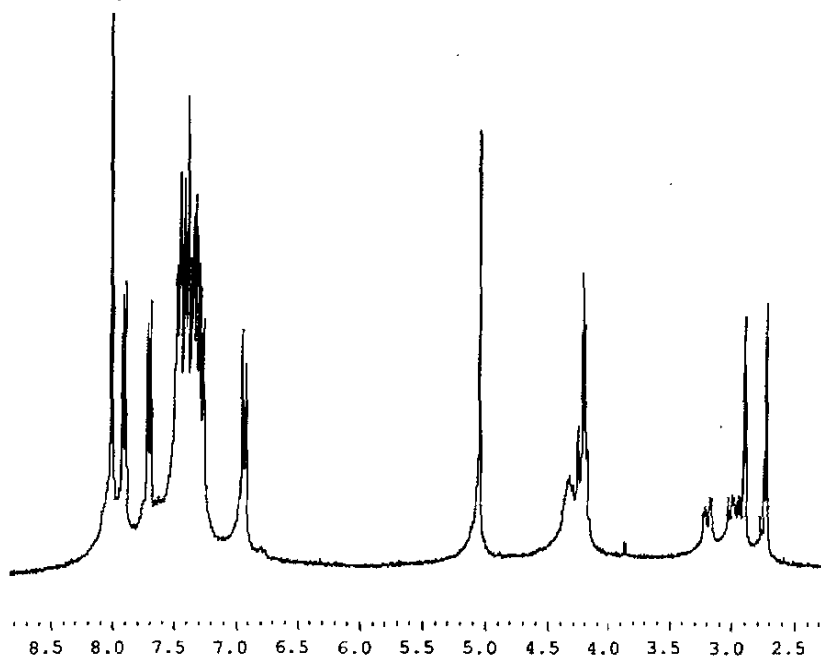


图 3.4.3 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的 ^1H NMR 谱图 2

通过比较图 3.4.1、图 3.4.2 和图 3.4.3 可以发现三张谱图的峰基本相同, 说明用四氢呋喃作溶剂也可以制备 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH。

结论

本论文对 Z-Asn-OBu^t 的制备方法进行了改进, 设计了 Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的制备途径, 得到如下结论:

1. 用氯甲酸苄基酯同天冬酰胺在碱性条件下反应制得 Z-Asn-OH。通过大量实验得出: 最佳反应时间为 1.5h, 最佳投料比为天冬酰胺: 氯甲酸苄基酯=1:1.5, 最佳反应温度为 25℃, 产率可达到 68%。
2. 用异丁烯和 Z-Asn-OH 反应制备 Z-Asn-OBu^t。采用普通玻璃反应装置, 增加干冰回流冷凝器, 使异丁烯保持回流, 减少异丁烯用量, 有效地抑制了 N-叔丁基化副反应, 使酯化收率提高到 70% 以上。另外, 考虑到经济成本, 可以用冰-盐浴来代替干冰-丙酮冷凝, 效果与用干冰-丙酮基本相同。
3. 用乙酸叔丁酯和 Z-Asn-OH 反应来制备 Z-Asn-OBu^t。通过设计正交实验得出: 最佳反应时间为 5h, 最适温度为 20℃, 催化剂高氯酸的最佳用量为 Z-Asn-OH 的摩尔量的 1.5 倍, 产率达到 94.7%。
4. 用溴化苄和酪氨酸反应制备 Tyr(Bzl), 通过大量实验得出: 最佳反应时间为 1h, 最适反应温度为 25℃, 反应物最佳摩尔比为溴化苄/酪氨酸=1:1, 产率达到 45%。成功分离了反应的中间产物酪氨酸铜络合物, 并推测和证实了该络合物的结构, 分析发现该络合物在反应中的作用是保护酪氨酸的羧基, 使苄基能够成功地保护酪氨酸的酚羟基。
5. 用 Fmoc 基团保护酪氨酸的羧基, Fmoc-Cl 作为 Fmoc 基团的导入试剂, 发现用二氧六环或者四氢呋喃作溶剂都能得到目标产物, 产率都能达到 98%。

致谢

本论文是在魏运洋教授的精心指导下完成的。在论文的工作期间魏老师倾注了大量的心血，他渊博的学识、敏锐的洞察力、活跃的学术思想、诲人不倦的师德和忘我的工作热情给我留下了难忘的印象，是我今后工作和学习的榜样。在此对魏老师的精心培养和热心关怀表示衷心的感谢和深深的敬意。

感谢 302 教研室所有老师的关心和帮助。

感谢施志浩、岳彩波博士，王吉吉、张术君、杨敏芳硕士对我的帮助，特别是施志浩博士在论文期间给了我很大的帮助和指点，在此一并向他们表示衷心的感谢。

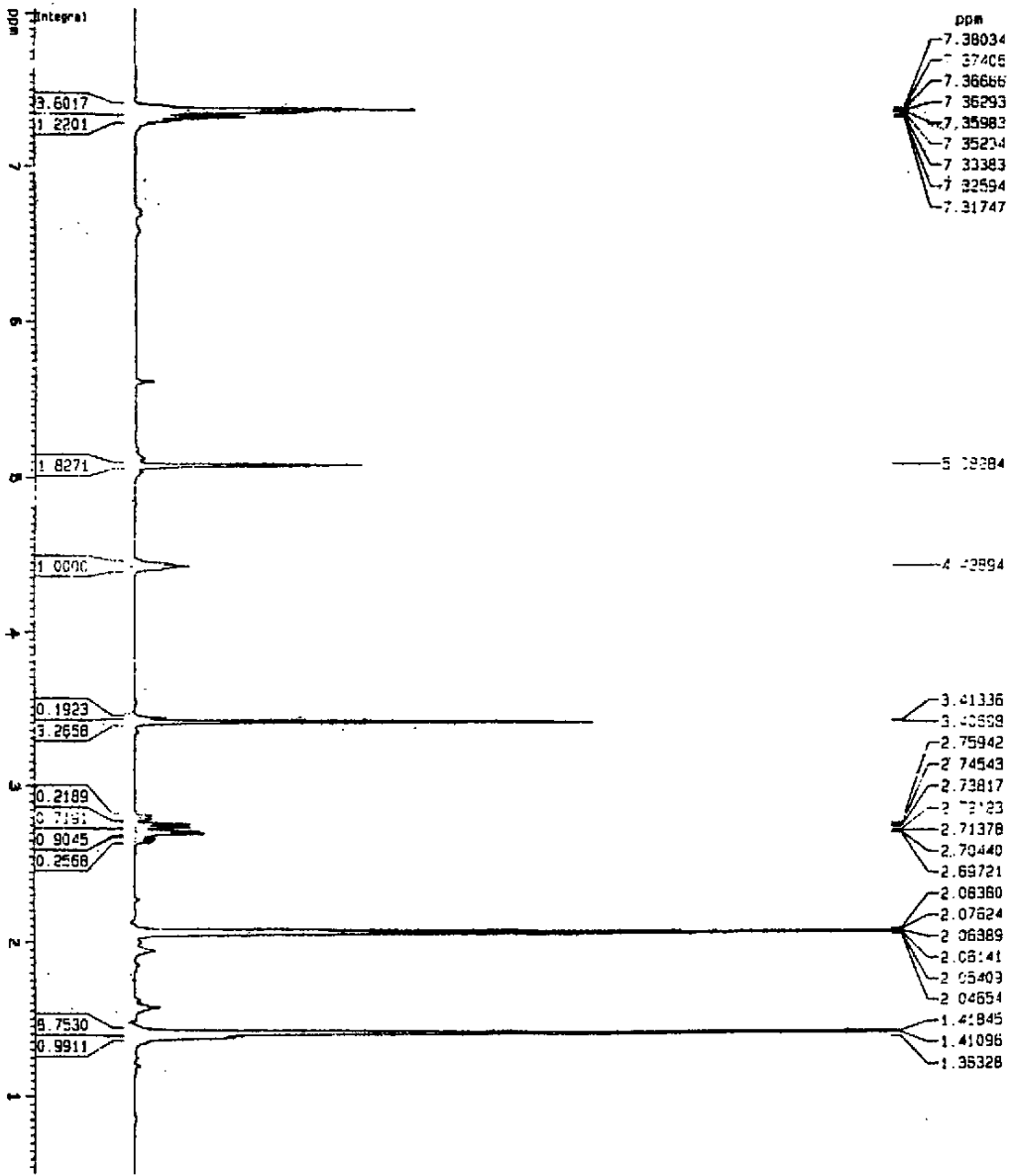
参考文献

1. Zhou H X, Lyu. P. C., Wemmer DE et al. Position dependent stabilizing effects in α -helices; N-terminal capping in synthetic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116: 1139-40
2. Dwek R. A. *Glycobiology*; Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* 1996, 96: 683-720
3. Konopelski J. P., Filonova L. K., Olmstead M. M. Dipeptide surrogates containing Asparagine derived tetrahydropyrimidinones. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119: 4305-4306
4. Konopelski J. P., Wei Y., Olmstead M. M. Dipeptide surrogates containing asparagine-derived tetrahydropyrimidinones structure and amide rotamer stereochemistry of a prolinemimic. *J. Org. Chem.* 1999, 64(14): 5148-5151
5. 魏运洋. 天冬酰胺的环化缩合反应及其在合成拮抗剂与吗啡肽中的应用. *应用化学*. 2004, 21(1): 70-75
6. 黄惟德, 陈常庆. *多肽合成*. 北京: 科学出版社. 1985
7. G. brierfer, T. T. Nestrick. *Catalytic transfer hydrogenation*. 1961, 83: 142
8. D. R. Coleman, G. P. Royer. *New hydrogenation catalyst: palladium-poly(ethylennimine). Applications in peptide synthesis*. 1974, 74: 567-580
9. Mohamed K., Anwe, Amo F. Spatola. An advantageous method for the rapid removal of hydrogenolysable protecting group under ambient condition; Synthesis of leucine-enkephalin. *Gerog Thieme Verlag Stuttgart*. 1980, 11: 929
10. G. Abbenante. D. R. March et al. Regioselective structural and functional mimicry of peptides design of hydrolytically-stable cyclic peptidomimetic inhibitors of HIV-1 protease. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117: 10220-10226
11. Xiangming Zhu, Kandasamy Pachamuchu et al. Synthesis of s-linked glycopeptides in aqueous solution. *J. Org. Chem.* 2003, 68: 5641-5651
12. Agnes Bodanszky et al. Active esters of 9-Fluorenylmethyl-oxycarbonyl amino acids and their application in the stepwise lengthening of a peptide chain. *J. Org. Chem.* 1980, 45: 72-76
13. Louis A. Carpino et al. (9-Fluorenylmethyl)carbonyl(Fmoc) amino acid chlorides. Synthesis, characterization, and application to the rapid synthesis of short peptide segments. *J. Org. Chem.* 1986, 51: 3732-3734
14. Louis A. Carpino et al. ((9-Fluorenylmethyl)oxy)carbonyl amino acid chlorides in solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.* 1991, 56: 2635-2642
15. F. C. McKay, N. F. Abertson. *New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis*. 1957, 79: 4686-4690
16. Agnes Bodanszky, Miklos Bodanszky et al. Active esters of 9-fluorenylmethyl-oxycarbonyl amino acid and their application in the stepwise lengthening of a peptide chain. *J. Org. Chem.* 1980, 45: 72-76
17. By Francism et al. The tertiary butyl group as a blocking agent for hydroxyl, sulfhydryl and amido function in peptide synthesis. *Jan.* 1963, 20: 201-207.
18. 魏运洋. 天冬酰胺叔丁酯的改良. 合成. *化学通报*. 2000, 12: 49-51
19. F. H. Stewart. Notes-L-Tyrosyl-L-phenylalanine. *J. Org. Chem.* 1960, 25: 1828

20. 姚志勇, 杨大成, 范莉. O-苄基丝氨酸苄酯盐酸盐的制备方法研究. 中国药物化学杂志. 2003, 13(1): 16-20
21. J. Gordon Adamson. Simple and convenient synthesis of ter-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine. J. Org. Chem. 1991, 56: 3447-3449
22. 王晓季, 陈立功, 李阳. N-甲基二肽 MeVal-MePhe-O^tBu 的合成研究. 精细化工. 2004, 21(6): 434-438
23. Herrn Professor Dr. W Graß mann zum 60. Geburtstag gewidmet darstellung und peptidsynthetische verwendung von O-Benzyl-L-tyrosin. Jahrg. 1958, 91: 542-547
24. 于晓彩, 杨春艳等. O-苄基酪氨酸的合成及其电离常数研究. 沈阳化工学院学报. 1997, 11(4): 256-260
25. Louis A. Carpino et al. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. J. Org. Chem. 1972, 37(22): 3404-3409
26. Koning W, Kernebeck. Saure abspaltung der s-trityl-group and beispiel synthetischer insulinfragmente. Liebigs Ann Chem. 1979, 227-247
27. Jingdan Hu, Marvin J. Miller. Total synthesis of a mycobactin, a siderophore and growth promoter of mycobacterium smegmatics, and determination of its growth inhibitory against mycobacterium. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119: 3462-3468
28. Teresa Mancilla, Lourdes Carrillo, Luis S et al. Synthesis and characterization of new 2-substituted isoindoline derivatives of α -amino acids. Organic preparations and procedures int. 2001, 33(4): 341-349
29. 徐寿昌. 有机化学. 第二版. 北京: 高等教育出版社. 1993
30. 孙荣桓. 应用数理统计. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998
31. D. Yamashiro, C. H. Li. Protection of tyrosine in solid-phase peptide synthesis. J. Org. Chem. 1973, 38: 1508
32. F. M. Callahan et al. The tertiary butyl group as a blocking agent for hydroxyl, sulfhydryl and functions in peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 1963, 85: 201
33. 牛德仲, 朱守荣, 罗勤慧. 双穴二氧四胺 Cu(II)和 Ni(II)配合物的合成和性质. 无机化学学报. 1994, 10(1): 1-5
34. 陈钧辉, 王文刚等. 甘氨酸组氨酸赖氨酸及其与铜的络合物的合成和对细胞 DNA 合成的影响. 中国药理学通报. 1997, 13(5): 455-457
35. Raban M, Mislow K. Modern methods for the determination of optical purity. Top. Stereochem.. 1976, 11: 134

附录 A

Z-Asn-OBu^t 的 ¹H NMR 谱图 1



```

Current Data Parameters:
NAME      Z-ASN-OBUT
EXPNO    17
PROCNO   14
PROCDS   1

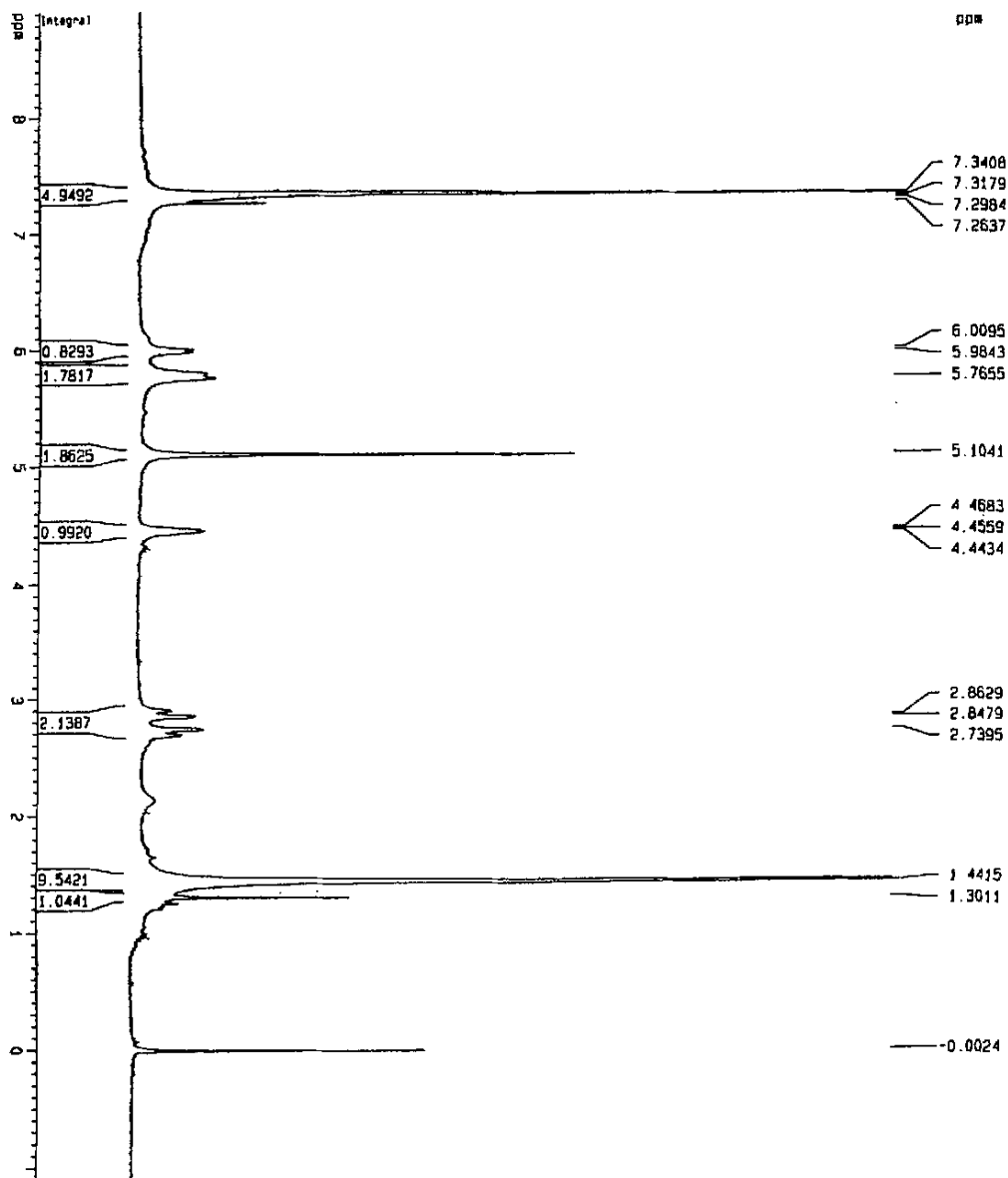
F2 - Acquisition Parameters:
Date_    20040326
Time     14.34
INSTRUM  ERX300
PROBHD   5 mm QNP 1H/
PULPROG  zgpg30
ID       zgpg30
SOLVENT  Acetoni
NS       8
DS       2
AQ       4.9900170 hr
FIDRES   0.152293 Hz
AQ       3.7834076 sec
RG        64
DR        100.6190 MHz
DE        6.1450000 sec
TE        300.2 K
D1        8.00000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        9.00 usec
PL1       -2.00 dB
SFO1      300.1314101 MHz

F2 - Processing parameters:
SI        32768
SF        300.13289612 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

2D NMR List Parameters:
CA        28.00 cm
C1P       16.031 ppm
F1A0      0.171 Hz
F1P       0.171 Hz
F2        152.25 MHz
PRNU      0.34189 ppm/Hz
RG2       102.62944 Hz/cm
MZR2      102.62944 Hz/cm
    
```

附录 B

Z-Asn-OBu¹的¹HNMR谱图 2



```

Current Data Parameters
NAME          Y10
EXPNO        15
PROCNO       1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_        2004124
Time         18.14
INSTRUM     spect
PROBHD      5 mm QNP 13C
PULPROG     zgpg30
TD           32768
SOLVENT     DMS-d6
NS           3
DS           2
SWH          8627.908 Hz
FIDRES       0.177841 Hz
AQ           1.8115660 sec
RG           68
DB           0.0000000 sec
DE           6.00 uSARC
TE           300.0 K
D1           0.00000000 sec
-----
Channel f1 -----
NUC1         1H
P1           5.00 uSARC
PL1         -2.00 dB
SFO1         300.1317140 MHz
-----
F2 - Processing parameters
SI           16384
SF           300.1352420 MHz
WDW          no
SSB          0
LN           0.00 Hz
GB           0
PC           1.00
-----
1D FID plot Parameters
CX           32.00 cm
CZ           8.603 cm
F1           2877.54 Hz
F2           -1.051 ppm
F3           -327.34 Hz
PUNCH        0.48915 ppm/cm
XZCM         136.80384 Hz/cm
    
```

附录 C

酪氨酸铜络合物元素分析

国家教育部
STATE EDUCATION MINISTRY
南京大学现代分析中心
CENTER OF MATERIALS ANALYSIS, NANJING UNIVERSITY

检测报告

REPORT FOR DETECTING AND ANALYZING

样品名称: (NAME OF SAMPLE)	委托单位:南京理工大学 (ENTRUSTING UNIT)
送样日期:2005年5月19日 (DATE OF SAMPLE SUPPLYING)	检测项目:CHN含量 (ITEMS FOR DETECTING AND ANALYZING)
检测依据:分析方法通则 (BASIS FOR DETECTING)	检测设备:元素分析仪等 (INSTRUMENT)

分析检测结果

RESULTS OF DETECTING AND ANALYZING

C%	H%	N%
54.78	5.68	6.98
54.67	5.73	6.83

(以下空白)

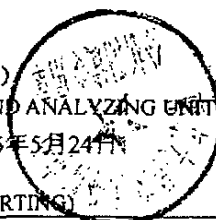
中心主任(章):
(DIRECTOR)



检测单位(公章)
(DETECTING AND ANALYZING UNIT)

报告日期: 2005年5月24日

(DATE OF REPORTING)



本报告共 一 页(其中图 / 页; 表 / 页)

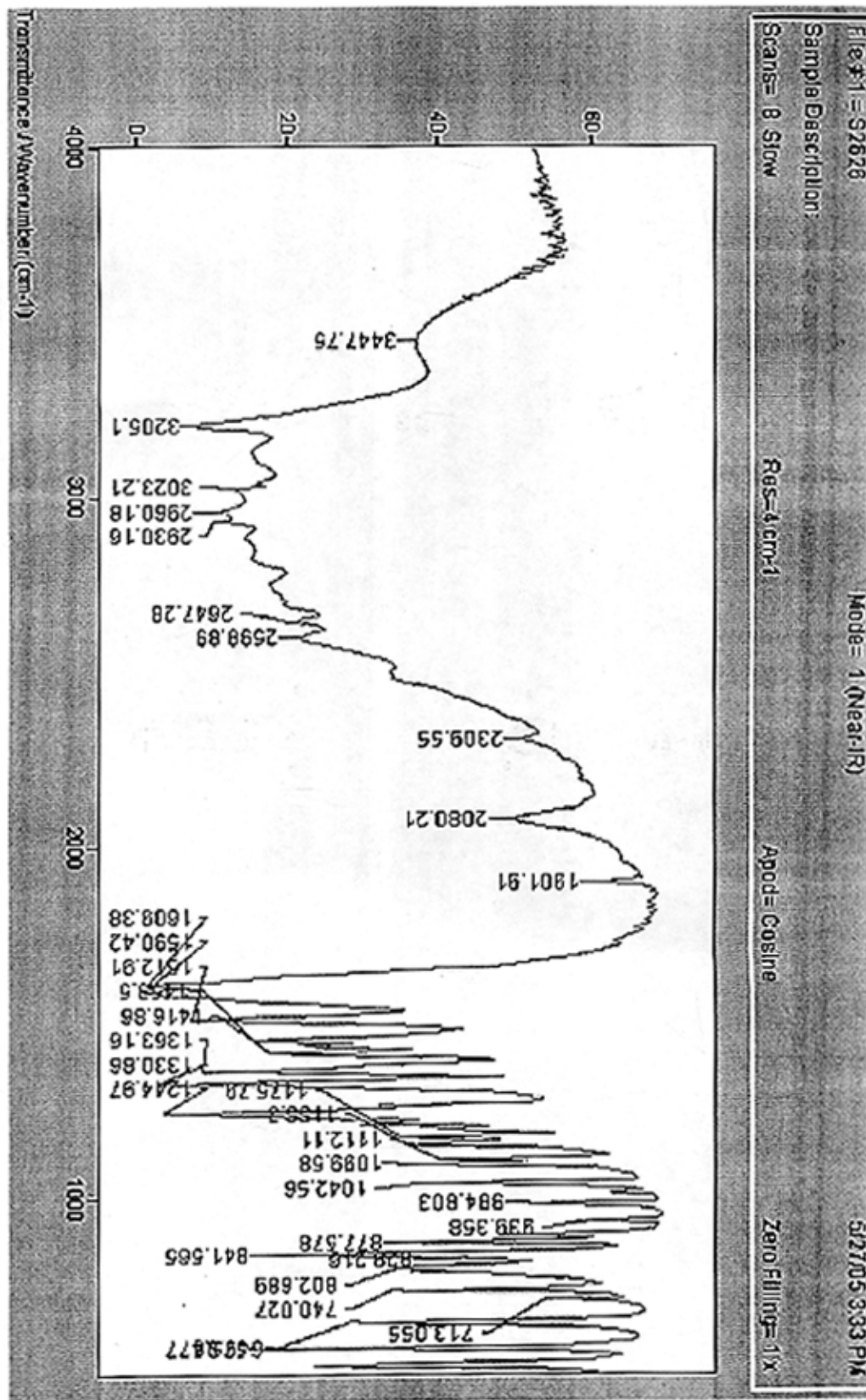
- 说明:
1. 本报告未加盖本单位印章无效,本报告未盖CMA章, 不作为公证数据;
 2. 本报告复印件未加盖本单位印章无效,本报告涂改增删无效;
 3. 委托检验只对来样负责。
 4. 若对本报告有异议, 请于报告发出之日起 / 天内来本单位复检, 逾期不予受理。

地址: 中国南京汉口路22号
邮编: 210093
电话: (025)3592318

Center of Materials Analysis, Nanjing University
Hankou Road 22, Nanjing 210093, P.R.China
Tel: (025)3592318

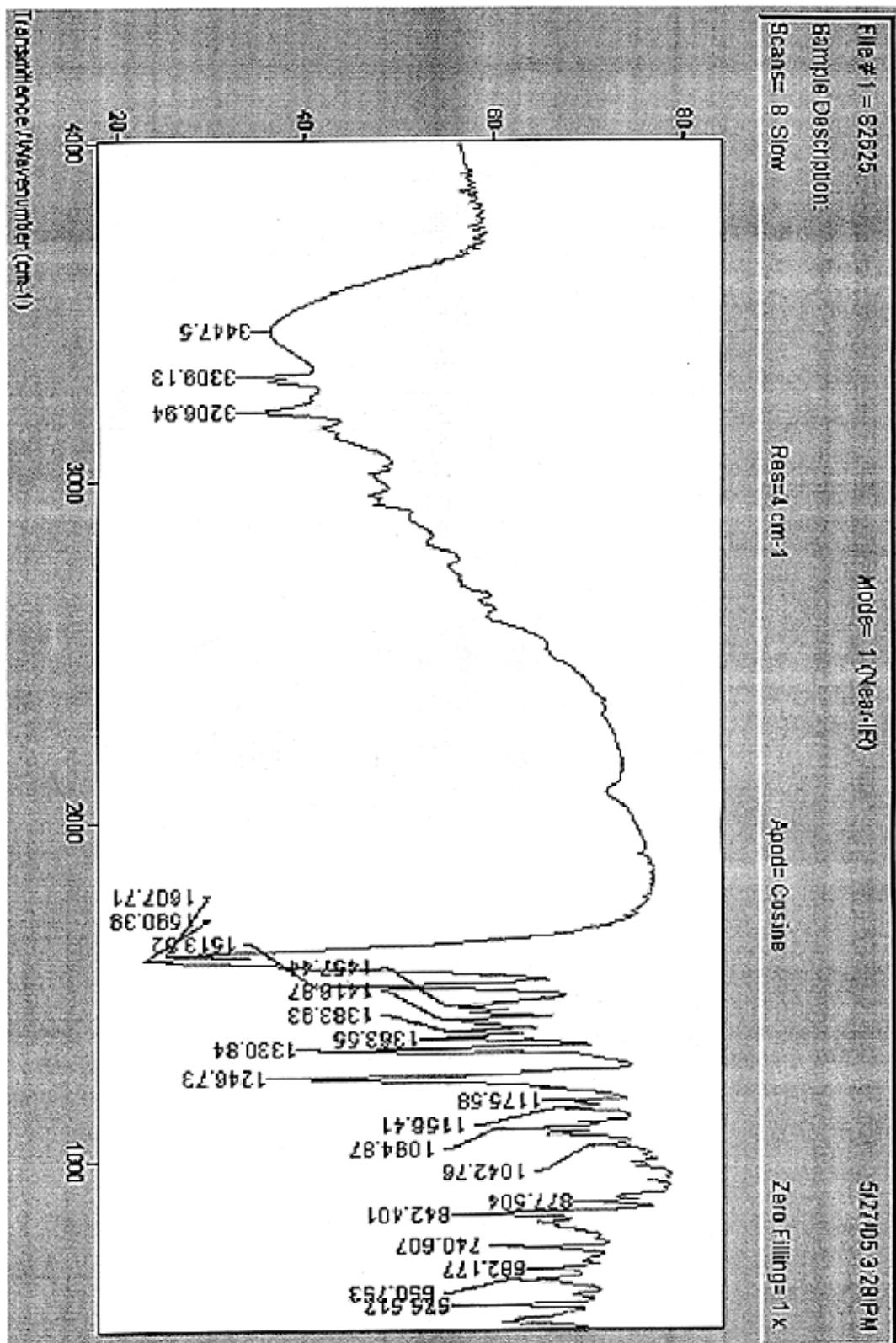
附录 D

酪氨酸红外光谱图



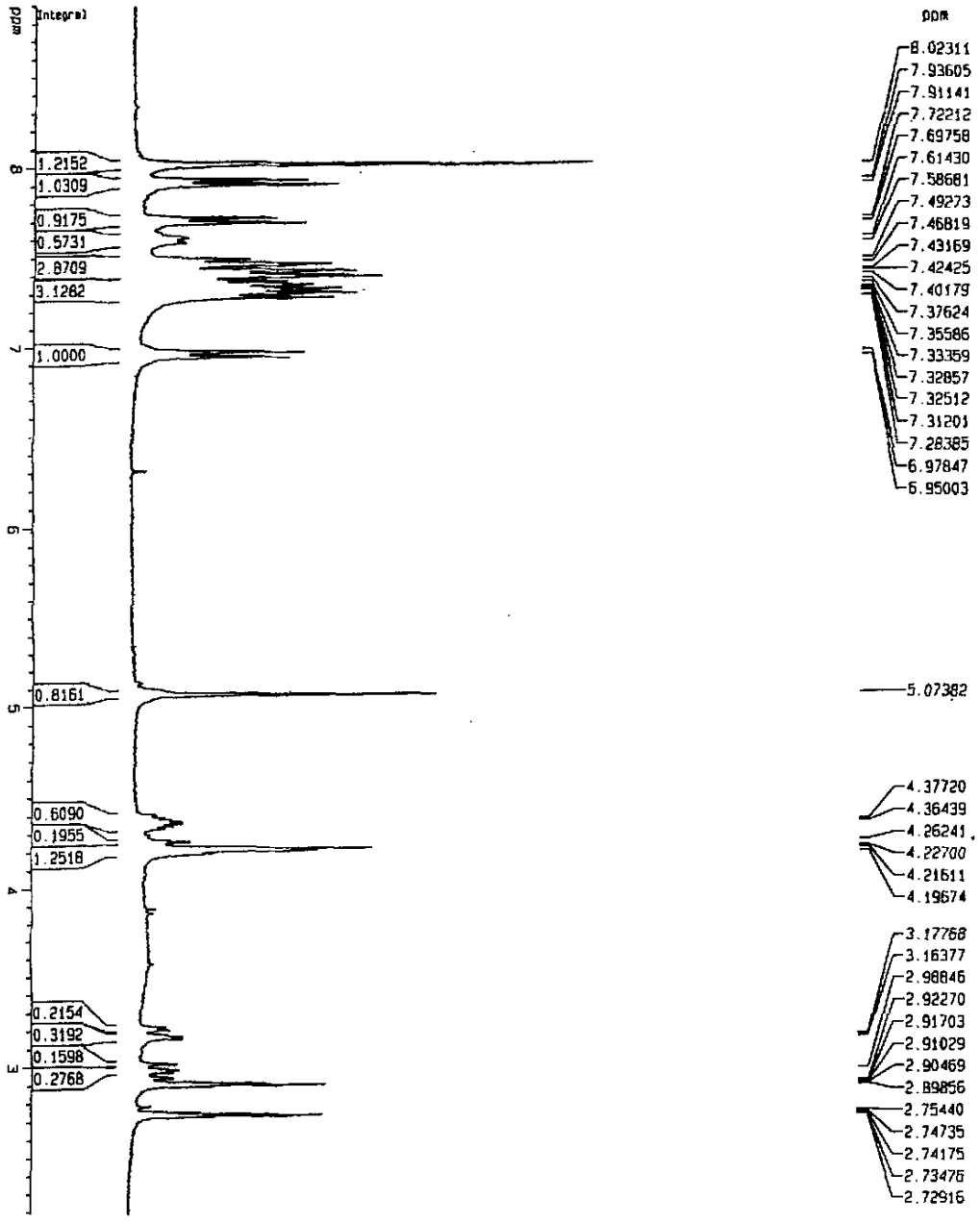
附录 E

酪氨酸铜络合物红外光谱图



附录 F

Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的 ¹HNMR 谱图 1



```

Current Data Parameters
NAME          Y10
EXPNO        50
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20041107
Time          15.44
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm DML 13C
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      DMF-D7
NS           7
DS           2
SWH          8992.806 Hz
FIDRES      0.274458 Hz
AQ          1.8219508 sec
RG          60
DM          25.000 uSBC
DE          6.108 uSBC
TE          300.0 K
D1          8.00000000 sec

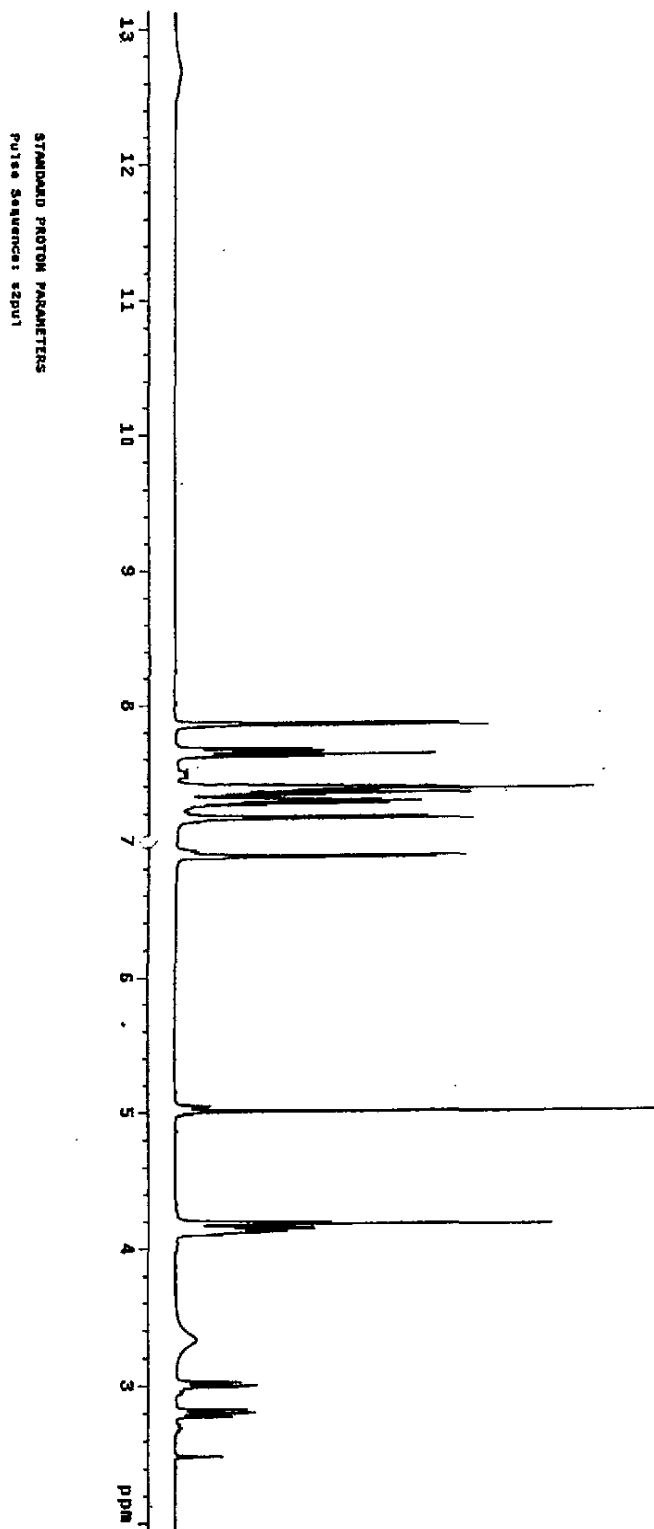
***** CHANNEL f1 *****
NUC1         13C
P1           5.00 uSBC
PL1         -2.00 dB
SFO1        300.1317500 MHz

F2 - Processing parameters
SI          16384
SF          300.1258001 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          0.00 Hz
GB          0
PC          1.00

1D NMR plot parameters
SI          32768
SF          8.900 MHz
F1         2521.50 ppm
F2         2.102 MHz
S2         651.07 Hz
PRGNAME    0 3x1608 m13c1cm
AQ         91.50811 Hz/cm
N1CM
    
```

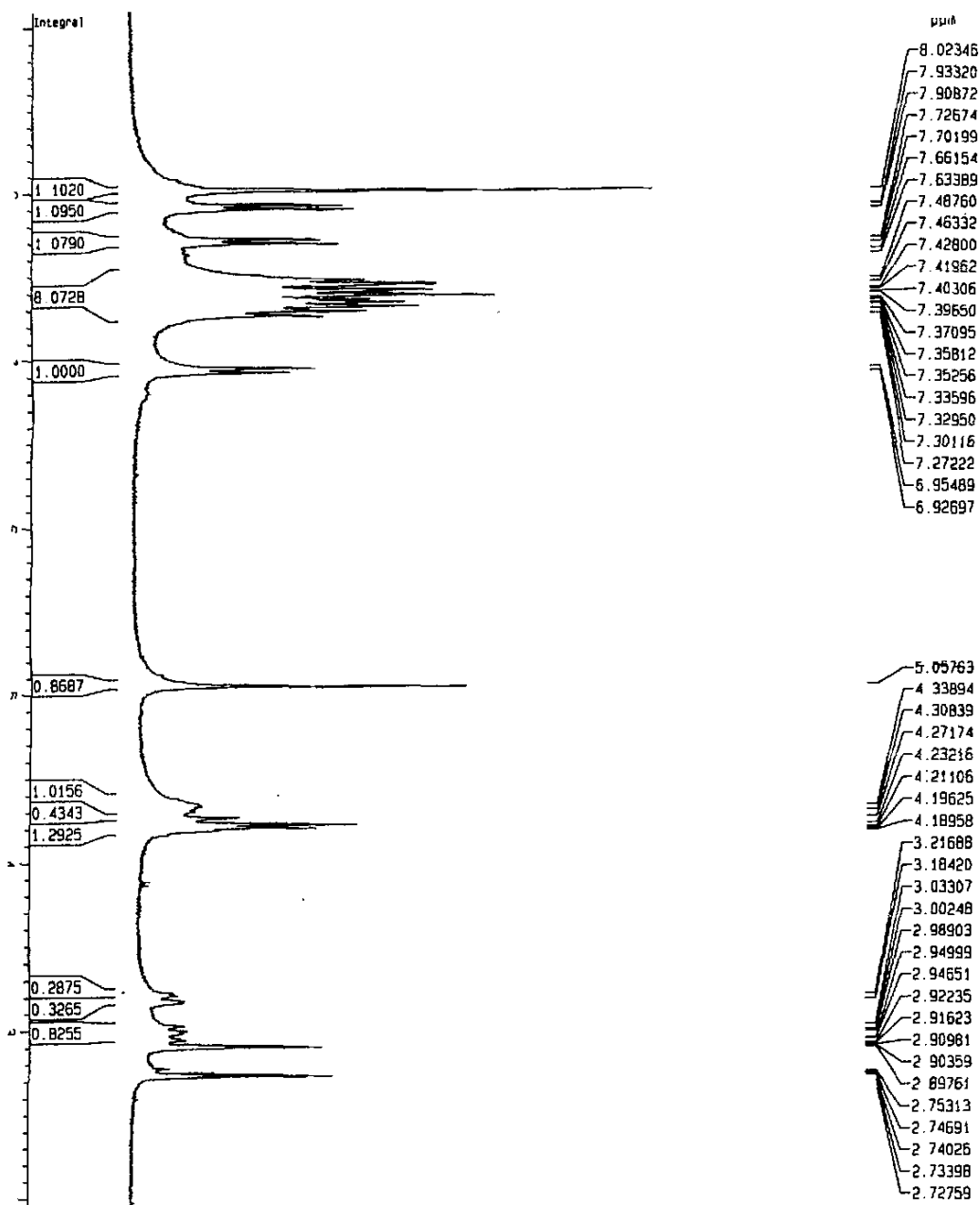
附录 G

Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 标准品的 ¹HNMR 谱图



附录 H

Fmoc-Tyr(Bzl)-OH 的 ¹HNMR 谱图 2



```

Current Data Parameters
NAME      Y10
EXPNO    72
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20041118
Time     15 11
INSTRUM  drx300
PROBHD   5 mm DUL 13C
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  D2O
NS       11
DS       2
SWH      5827.506 Hz
FIDRES   0.177841 Hz
AQ       2.8150444 sec
RG       80
PC       85.800 usec
QM       0.00 usec
DC       300.0 K
TE       8.00000000 sec
D1

***** CHANNEL f1 *****
NUC1      13C
P1        5.00 usec
PL1      -2.00 dB
SFO1     300.1317140 MHz

F2 - Processing parameters
SI       16384
SF       300.1305435 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

ID NMR plot parameters
LK       25.00 cm
F1P     4.1025 ppm
F1       27261.97 Hz
F2P     1.948 ppm
F2       584.54 Hz
FREQMCM 0.32452 ppm/cm
MAGN    97.51807 Hz/cm
    
```