

文章编号:1006-3080(2013)06-0660-05

# L-谷氨酰异丙胺的合成、表征及工艺条件的优化

卜 宇, 刘 虹, 肖 艳, 郎美东

(华东理工大学材料科学与工程学院, 上海 200237)

**摘要:**以廉价的 L-谷氨酸为初始原料,首先使用邻苯二甲酸酐保护其  $\alpha$  位氨基并进行分子内羧基的环酐化反应,再通过氨基与酸酐的反应在  $\gamma$  位引入异丙胺,最后用水合肼脱除氨基保护得到目标产物 L-谷氨酰异丙胺。利用 $^1\text{H}$ -核磁共振( $^1\text{H-NMR}$ )、傅里叶红外光谱(FT-IR)以及液相色谱-质谱(LC-MS)对最终产物进行了结构表征和纯度测定,并通过改变反应时间、温度以及反应物的投料摩尔比对其合成条件进行了初步的探索和优化。

**关键词:**L-谷氨酰异丙胺; 合成; 表征; 优化

中图分类号:O623

文献标志码:A

## Synthesis, Characterization and Optimization of Isopropyl-L-Glutamine

BU Yu, LIU Hong, XIAO Yan, LANG Mei-dong

(School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Using cheap L-glutamic acid as raw material, phthalic anhydride was employed to protect the  $\alpha$ -amino group of L-glutamic acid, and acetic anhydride was used to form the glutamic anhydride. Then, the glutamic anhydride was attacked by isopropylamine to open the ring. Finally, hydrazine hydrate was used to deprotect the phthaloyl, and isopropyl-L-glutamine was obtained. The structure of product in each step was confirmed by  $^1\text{H-NMR}$ , FT-IR and LC-MS. The synthesis was optimized under different reaction temperature, time and reactant ratios.

**Key words:** isopropyl-L-glutamine; synthesis; characterization; optimization

L-谷氨酸是组成生物体内各种蛋白质必须的 20 种氨基酸之一,是生物学领域中非常重要的一种物质<sup>[1-2]</sup>。 $\gamma$  位羧基修饰的 L-谷氨酸是一类重要的 L-谷氨酸衍生物,可以作为生化试剂直接用于生物科学领域,也可以作为合成中间体进一步合成生物活性材料等<sup>[3-4]</sup>。

早期研究者们主要研究 L-谷氨酸酯类衍生物<sup>[5-7]</sup>,如 L-谷氨酸苄酯、L-谷氨酸甲酯、L-谷氨酸乙酯等。近年来,L-谷氨酰胺类物质作为一类重要

的生物活性物质被人们所熟知,其在生理和医学上的研究取得了很大的进展<sup>[8-10]</sup>。L-谷氨酰胺作为一种重要的氨基酸类物质在许多代谢过程中起着重要的作用,L-谷氨酰乙胺在消除疲劳、增强免疫能力等方面有着重要的应用。但是,对 L-谷氨酰胺类物质的合成及其结构与功能之间关系的研究却十分少见,因此合成不同  $\gamma$  位修饰的 L-谷氨酰胺类物质,对于活性氨基酸分子的设计与化学合成有着重要的意义。

收稿日期:2013-04-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21274039)

作者简介:卜 宇(1988-),男,浙江建德人,硕士生,主要从事生物医用聚肽材料的合成与研究。E-mail:bycc1988@yahoo.com.cn

通信联系人:郎美东,E-mail:mdlang@ecust.edu.cn

本文借鉴此前 L-谷氨酰胺类物质的合成方法<sup>[11-13]</sup>, 合成得到 L-谷氨酰异丙胺, 并初步探讨其最佳合成条件。本文以 L-谷氨酸(1)为初始原料, 首先使用邻苯二甲酸酐保护其  $\alpha$  位氨基并进行分子

内羧基的环酐化反应得到 N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐(2), 再通过氨基与酸酐的反应在  $\gamma$  位引入异丙胺, 最后使用水合肼脱除氨基保护得到目标产物 L-谷氨酰异丙胺(3)。合成路线如图 1 所示。

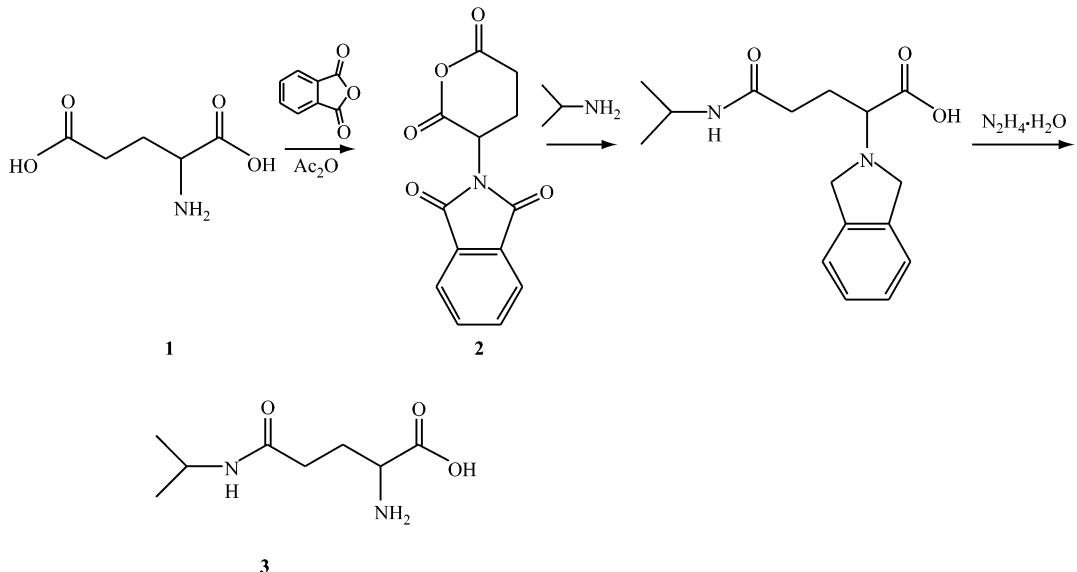


图 1 L-谷氨酰异丙胺的合成路线

Fig. 1 Synthesis route for the isopropyl-L-glutamine

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Bruker 400 MHz 核磁共振波谱仪、Nicolet 5700 型的傅里叶红外光谱仪、Agilent 1100 型高效液相色谱仪、1100-MSD 型液相色谱-质谱联用分析仪。

吡啶使用氢化钙搅拌 48 h, 蒸馏得无水吡啶, 干燥密闭保存待用。四氢呋喃用钠丝回流, 以二苯甲酮作为指示剂直至变蓝黑色, 蒸馏得无水四氢呋喃, 干燥, 密闭保存, 待用。其余试剂均为分析纯, 未经进一步纯化即使用。

### 1.2 合成方法

**1.2.1 N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的合成** 将谷氨酸(64.8 g)和邻苯二甲酸酐(64.8 g)加入到盛有 240 mL 无水吡啶的 500 mL 圆底烧瓶中, 在 130 °C 下回流反应大约 5 h。反应结束后, 减压蒸馏溶剂吡啶。完全除去溶剂后, 将温度升高至 160 °C, 并加入乙酸酐(180 mL)暴沸反应约 10 min。反应完成后自然冷却并重结晶, 抽滤得白色固体。再将固体用过量的无水乙醚洗涤 3 次, 抽滤并真空干燥 6 d 后溶解于 700 mL 乙酸乙酯中, 加热至 70 °C 后趁热过滤除去不溶物, 溶液静置、冷却、重结晶, 抽滤并真

空干燥 6 d 后得白色固体产物。采用 HPLC 测得产物纯度为 98.5%。

**1.2.2 L-谷氨酰异丙胺的合成** 取 1.2.1 节得到的产物(20 g)置于 500 mL 圆底烧瓶中, 并加入 200 mL 干燥的四氢呋喃。将 20 mL 异丙胺溶于 50 mL 干燥的四氢呋喃中, 用恒压滴定漏斗缓慢滴加入烧瓶, 控制流速, 大约 1 h 滴完。滴加完成后于 25 °C 下反应 16 h, 减压蒸馏, 除去过量的异丙胺及四氢呋喃, 得到透明的黏稠状固体。

反应产物不经处理直接加入至 120 mL 乙醇中加热回流, 至固体全部溶解。再将 10 mL  $w=80\%$  水合肼缓慢滴加入烧瓶中。回流反应大约 6 h 后, 减压蒸馏出乙醇溶剂, 再逐渐加入 50 mL 蒸馏水, 加热回流大约 30 min。将反应液滴入过量的丙酮里, 析出白色沉淀, 抽滤得白色固体。白色固体用二甲基亚砜(DMSO)和甲醇分别洗涤 2 次。洗涤完的产物真空干燥 12 h, 然后用  $\varphi=80\%$  的乙醇溶液重结晶, 自然冷却后抽滤固体, 真空干燥 24 h 后得白色针状晶体。

## 2 结果与讨论

### 2.1 N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的结构表征

本合成路线中将邻苯二甲酸酐保护  $\alpha$  位氨基反

应与分子内羧基的环酐化反应合并为一步进行反应。考虑到反应物在有机溶剂中的溶解性和反应所需条件,选择邻苯二甲酰基作为氨基的保护基团。水是此反应的产物之一,因此需要使用干燥的吡啶作为溶剂,使反应平衡尽量右移。两步反应后最终产物在乙酸乙酯里进行重结晶提纯,产率较高,产物的结构通过氢核磁共振谱图、傅里叶红外谱图、高效液相色谱来确定。

**2.1.1 核磁共振氢谱表征** *N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的<sup>1</sup>H-NMR谱图如图2所示。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, *d*-DMSO, TMS),  $\delta$ : 8.00~7.86(m, 4H), 5.52~5.43(m, 1H), 3.20~2.92(m, 2H), 2.69~2.54(m, 2H), 2.19~2.05(m, 2H)。

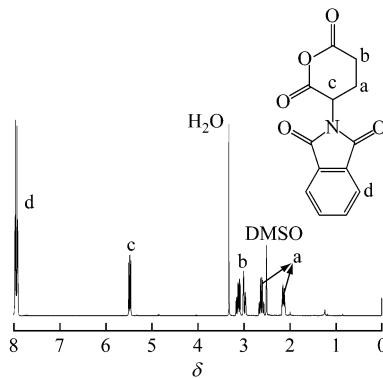


图2 *N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的<sup>1</sup>H-NMR谱图

Fig. 2 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the *N*-phthaloyl-*L*-glutamic anhydride

通过观察图2中特征峰的出峰位置以及峰面积的积分,可以发现:8.00~7.86处苯环峰的存在表明成功使用邻苯二甲酰对*L*-谷氨酸分子内的氨基进行了保护;另外,由于结构中存在酸酐的环,所以亚甲基上的两个质子氢具有两种不同的化学环境,说明*L*-谷氨酸分子中羧基的环酐化非常成功。

**2.1.2 傅里叶红外光谱表征** 图3所示为*N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的红外谱图。在图中,

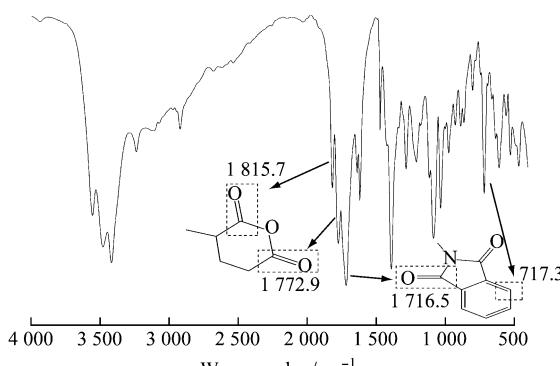


图3 *N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的红外谱图

Fig. 3 FT-IR spectrum of *N*-phthaloyl-*L*-glutamic anhydride

1815.7 cm<sup>-1</sup>和1772.9 cm<sup>-1</sup>处的红外特征吸收峰是谷氨酸酐环上两个羰基的伸缩振动峰,表明酸酐环的合成是成功的。1716.5 cm<sup>-1</sup>处的红外特征吸收峰是邻苯二甲酰基上羰基的伸缩振动峰,这两个羰基的化学环境是一样的;717.3 cm<sup>-1</sup>是邻苯二甲酰基上苯环内的C—H伸缩振动峰。这表明用邻苯二甲酰保护 $\alpha$ -氨基是非常成功的。

**2.1.3 高效液相色谱表征** 图4是*N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的高效液相色谱,为了使得下一步反应更好地进行,我们对产物进行了重结晶(溶剂为乙酸乙酯)来提高产物的纯度。HPLC测试结果表明产物的纯度为98.5%,达到了下一步反应的纯度要求。

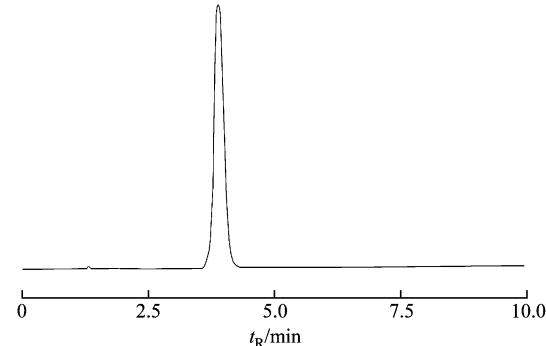


图4 *N*-邻苯二甲酰基-*L*-谷氨酸酐的高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC spectrum of *N*-phthaloyl-*L*-glutamic anhydride

## 2.2 *L*-谷氨酰异丙胺的结构表征

**2.2.1 核磁共振氢谱表征** 最终产物*L*-谷氨酰异丙胺的<sup>1</sup>H-NMR谱图如图5所示。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, *D*<sub>2</sub>O, TMS),  $\delta$ : 3.85~3.72(m, 1H), 3.68~3.60(m, 1H), 2.32~2.16(m, 2H), 2.06~1.95(m, 2H), 1.09~0.93(d, 6H)。

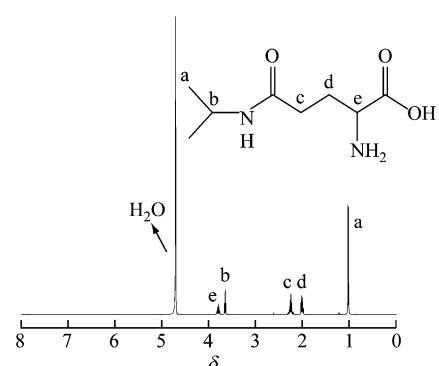


图5 *L*-谷氨酰异丙胺的<sup>1</sup>H-NMR谱图

Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the isopropyl-*L*-glutamine

通过与图1比较发现苯环特征吸收峰消失,说明邻苯二甲酰基被完全脱除,这表明氨基的脱保护是成功的;1.09~0.93处为异丙胺基上甲基的特征

吸收峰,表明异丙胺成功修饰了L-谷氨酸的 $\gamma$ 位羧基。综上所述,目标产物被成功地合成了。

**2.2.2 傅里叶红外光谱表征** 图6所示为L-谷氨酰异丙胺的红外光谱图。与图1相比较,图6中 $1\ 815.7\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 772.9\text{ cm}^{-1}$ 处的的红外特征吸收峰消失,同时, $\alpha$ -羧基上端羟基和羰基的特征吸收峰分别在 $3\ 289.6\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 580.9\text{ cm}^{-1}$ 处出现,说明谷氨酸酐环被进攻打开;同时 $1\ 640.5\text{ cm}^{-1}$ 处出现明显的特征吸收峰,这是典型的酰胺键上羰基的伸缩振动峰,表明异丙胺对 $\gamma$ 位羧基成功地进行了修饰。 $1\ 716.5\text{ cm}^{-1}$ 和 $717.3\text{ cm}^{-1}$ 处的红外特征吸收峰消失,同时 $\alpha$ -氨基的特征吸收峰在 $2\ 972.7\text{ cm}^{-1}$ 处出现,这表明邻苯二甲酰基被水合肼成功地从 $\alpha$ -氨基上脱保护。综上所述,L-谷氨酰异丙胺的主要特征吸收峰已在红外谱图上一一对应。

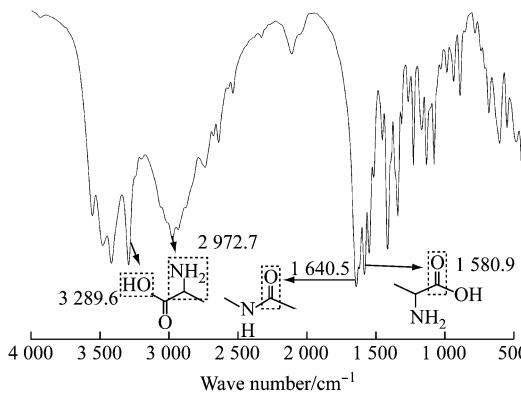


图6 L-谷氨酰异丙胺的红外光谱

Fig. 6 FT-IR spectrum of isopropyl-L-glutamine

**2.2.3 液相色谱-质谱联用表征** 图7是L-谷氨酰异丙胺的液相色谱与质谱联用谱图,对产物进行重结晶(溶剂为乙酸乙酯)来提高产物的纯度。液相色谱测试结果表明产物的纯度达到了99.53%,质谱结果表明碎片离子较少,产物的分子离子峰在 $m/z=189.0$ 处,与预期的产物分子量相吻合。以上表征证明目标产物L-谷氨酰异丙胺已被成功合成,且纯度较高。

### 2.3 L-谷氨酰异丙胺最佳合成条件的确定

对L-谷氨酰异丙胺的合成条件的探讨主要集中在异丙胺(A)与N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐(B)的反应上,通过改变反应时间、反应温度以及异丙胺与N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的投料摩尔比来探讨合成的最佳条件(后续用水合肼脱邻苯二甲酰基保护采用的条件相同)。

**2.3.1 反应温度对L-谷氨酰异丙胺收率的影响** 从表1可以看出,随着反应温度的升高,收率(Y)先增大后减小,25℃时收率最高。这可能是因为当温

度较低( $<25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )时,反应不完全;而当温度较高( $>25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )时,副反应增多,收率急剧下降。因此,25℃是反应的最佳温度。

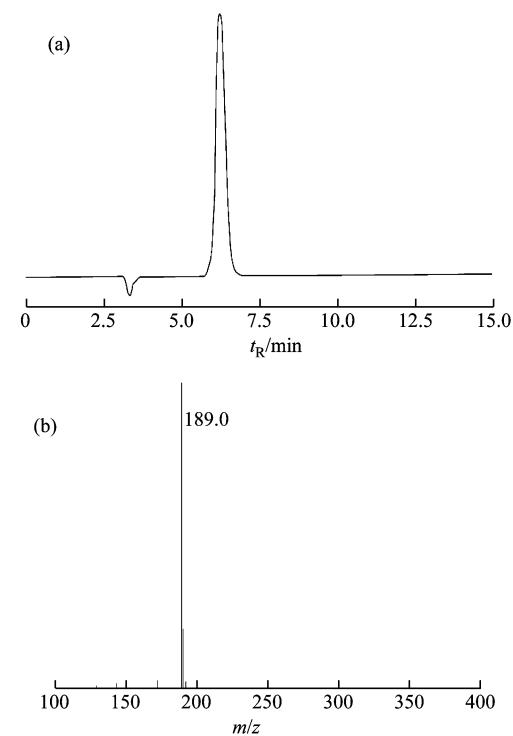


图7 L-谷氨酰异丙胺的液相色谱(a)与质谱(b)联用谱图

Fig. 7 LC(a)-MS(b) spectra of isopropyl-L-glutamine

表1 反应温度对收率的影响

Table 1 Effects of reaction temperature on the yield

T/℃	t/h	n(A) : n(B) <sup>1)</sup>	Y/%
10	16	2 : 1	54.8
20	16	2 : 1	63.8
25	16	2 : 1	69.3
30	16	2 : 1	64.5
40	16	2 : 1	40.7

1) A is isopropylamine; B is N-phthaloyl-L-glutamine

**2.3.2 不同反应时间对L-谷氨酰异丙胺收率的影响** 从表2可以看出收率随着反应时间的增加而大幅度增加,当反应超过16 h时,反应基本已经完成,收率基本不再有大的变化。因此,16 h为最佳的反应时间,超过16 h后,继续延长反应时间对产率的提高没有显著影响。

**2.3.3 反应物不同投料比对L-谷氨酰异丙胺收率的影响** 表3给出了反应物不同的投料比对L-谷氨酰异丙胺收率的影响。可以看出,当异丙胺与N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的投料摩尔比从1:1增加到2:1时,反应更加完全,产物收率增加;当投料摩尔比超过2:1时,因异丙胺的增加使得反应体系

碱性太强,导致酸酐提前加速水解<sup>[14]</sup>,使得副反应增多,产物收率降低。

表2 反应时间对收率的影响

Table 2 Effects of reaction time on the yield

t/h	T/℃	n(A) : n(B) <sup>1)</sup>	Y/%
8	25	2 : 1	45.9
12	25	2 : 1	60.6
16	25	2 : 1	69.3
20	25	2 : 1	68.8
24	25	2 : 1	69.5

1) A is isopropylamine; B is N-phthaloyl-L-glutamine

表3 反应物的投料摩尔比对收率的影响

Table 3 Effects of reactant mol ratio on the yield

n(A) : n(B) <sup>1)</sup>	t/h	T/℃	Y/%
1 : 1	16	25	55.6
3 : 2	16	25	65.3
2 : 1	16	25	69.3
5 : 2	16	25	67.1
3 : 1	16	25	64.2

1) A is isopropylamine; B is N-phthaloyl-L-glutamine

### 3 结 论

本合成采用廉价的 L-谷氨酸为原料,通过对  $\alpha$ -氨基保护后再引入异丙胺基,脱保护后成功合成了目标产物 L-谷氨酰异丙胺,合成路线清晰可行,通过方便简单的重结晶后,产物纯度较高,成分单一。经过初步的合成条件探索,得出异丙胺与 N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的最佳反应条件为:25 ℃,异丙胺与 N-邻苯二甲酰基-L-谷氨酸酐的投料摩尔比 2 : 1,反应 16 h,在此条件下反应收率最高,为 69.3%。合成方法条件温和、原料易得,为 L-谷氨酰胺类物质大规模合成的研究以及其在生物学领域的理论研究打下基础。

### 参考文献:

[1] Yoda R. Elastomers for biomedical applications[J]. Journal of

Biomaterials Science: Polymer Edition, 1998, 9(6): 561-626.

- [2] Watkins J C. L-glutamate as a central neurotransmitter: Looking back[J]. Biochemical Society Transactions, 2000, 28(4): 297-309.
- [3] Luo Kun, Yan Jingbo, Song Zhijiang, et al. Biodegradable interpolyelectrolyte complexes based on methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly( $\alpha$ ,L-glutamic acid) and chitosan[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(10): 2653-2661.
- [4] 韦异,朱海洋,李华山,等. N-脂肪酰基谷氨酸系列表面活性剂在日用化学品中的应用[J]. 日用化学品科学,2003,26(4): 20-23.
- [5] Chen Chongyi, Wang Zhaojun, Li Zhibo. Thermoresponsive polypeptides from pegylated poly-L-glutamates[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(8): 2859-2863.
- [6] Ding Jianxun, Xiao Chunsheng, Li Zhao, et al. Poly(L-glutamic acid) grafted with oligo(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl methacrylate): Thermal phase transition, secondary structure, and self-assembly[J]. Journal Polymer Science: Polymer Chemistry, 2011, 49(12): 2665-2676.
- [7] Cheng Yilong, He Chaoliang, Xiao Chunsheng, et al. Decisive role of hydrophobic side groups of polypeptides in thermo-sensitive gelation[J]. Biomacromolecules, 2012, 13(7): 2053-2059.
- [8] Daly W H, Poche D. The preparation of N-carboxyanhydrides of  $\alpha$ -amino acids using bis(trichloromethyl)carbonate[J]. Tetrahedron Letter, 1988, 29(46): 5859-5862.
- [9] Yan S H, Jean-Pierre D, Marc M. Synthesis and characterization of highly pure theanine[J]. Journal of Tea Science, 2003, 23(2): 99-104.
- [10] 池江涛,许文松. L-谷氨酰胺合成及不对称转化[J]. 化学反应工程与工艺,2002,18(2):164-168.
- [11] Hirokazu K, Kimio S. Facile and large-scale synthesis of L-theanine[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1992, 56(4):689-695.
- [12] Khalil F, Meisam S, Atena I. Synthesis and characterization of optically active polyamides based on 2-(1,3-isoindolinedi-one-2-yl)glutaric acid by direct polycondensation[J]. Chinese Journal of Polymer Science, 2010, 28(4): 589-596.
- [13] Gu Haining, Jiang Yongxiang, Wang Jiong. A practical synthesis of ethyl L-glutamine(L-theanine)[J]. Organic Preparations and Procedures International, 2004, 36(2): 182-185.
- [14] 胡宏纹. 有机化学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:662-664.