

• 研究简报 •

磷酸化氨基酸酯的合成、波谱表征及生物活性

蔡谊敏^a 高祥^a 黄现统^a 王统建^a 赵玉芬^{*,a,b}

(^a厦门大学化学化工学院 化学生物学福建省重点实验室 厦门 361005)

(^b清华大学化学系生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室 北京 100084)

摘要 磷酸化氨基酸及其酯属于磷酸胺类, 它们作为天然氨基酸的含磷类似物, 具有良好的生物活性, 它的合成与性质的研究引起人们的浓厚兴趣. 本工作用亚硫酸酐先合成磷酸化酰氯, 再由其与氨基酸甲酯反应合成了一系列磷酸化氨基酸酯, 产物经红外光谱, 核磁共振氢谱、碳谱、磷谱, 质谱及元素分析鉴定, 并初步研究这些化合物的抗菌与抗肿瘤的生物活性.

关键词 磷酸胺类衍生物; 亚硫酸酐; 合成; 波谱表征; 生物活性

Synthesis, Spectral Characterization and Biological Activities of Phosphoryl Amino Acid Esters

CAI, Yi-Min^a GAO, Xiang^a HUANG, Xian-Tong^a

WANG, Tong-Jian^a ZHAO, Yu-Fen^{*,a,b}

(^a Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

(^b Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology, Ministry of Education, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Phosphoryl amino acids and phosphoryl amino acid esters, as phosphorus analogs of amino acid, have attracted much attention because they show wide biological activities. In this paper, the title compounds, 2-isopropoxy-(2-isopropyl-5-methyl-cyclohexyloxy)-phosphoryl amino acid esters, were synthesized in the presence of sulfuryl chloride with reasonable yields. Their structures were confirmed by IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR and MS spectra, and the antibacterial and antitumor activities of these compounds were given in this paper.

Keywords phosphonaminates; sulfuryl chloride; synthesis; spectra characterization; biological activity

在生命科学中, 磷和氨基酸占有重要地位. 目前, 在生命过程中还未发现不含磷的生命体^[1]. *N*-磷酸化氨基酸及其酯是天然氨基酸的含磷类似物, 它们作为最小的酶分子模型, 其合成与性能研究引起广泛重视, 是近代杂原子化学研究领域的热点之一^[2~5], 且该类化合物还具有抑菌、抗肿瘤、杀虫以及抗植物病毒的活性^[6]. 磷酸化氨基酸酯上与磷原子相连的两个烷氧基不同以及

氨基上取代基的不同将导致生物活性的巨大差异, 薄荷环也是一种具有多种生物活性的环^[7,8]. 综合二者的结构特点和生物活性, 我们合成了一系列含有薄荷环的磷酸化氨基酸酯, 并发现该类化合物具有很强的抗肿瘤生物活性. 另外, 由于薄荷醇和氨基酸均是手性化合物, 所以对产物的合成分离纯化鉴定以及抗肿瘤生物活性均产生了一定的影响, 下面就这些化合物的具体合成作

* E-mail: yfzhao@xmu.edu.cn; Fax: 0592-2185780; Tel.: 0592-2185780.

Received October 8, 2005; revised February 23, 2006; accepted June 7, 2006.

福建省重点基金(No. 2001F008)资助项目.

3c [R=CH(CH₃)₂], *O*-异丙基-*O*-(2-异丙基-5-甲基)环己基磷酸化-*L*-缬氨酸甲酯, 黄色油状物, 产率 86.5%, $[\alpha]_D^{20} = -48.5$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.61~4.55 [m, 1H, OCH(CH₃)₂], 4.11~4.06 (m, 1H, NHCH), 3.86 (t, *J*=6 Hz, 1H, NH), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.09 (dd, *J*₁=11 Hz, *J*₂=23 Hz, 1H, CH_{cyclohexyl}), 2.27~2.13, 2.05~1.96, [2m, 3H, CH_{cyclohexyl}, 2CH(CH₃)₂], 1.65~1.35 (m, 7H, CH_{cyclohexyl}, 3CH_{2cyclohexyl}), 1.00~0.80 (m, 21H, 7CH₃); ³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ : 6.56, 5.79; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 172.95 (CO), 77.00 (C_{cyclohexyl}), 70.18 (OCH), 59.41 (NHCH), 59.12 (COOCH₃), 51.12, 48.06 (2C_{cyclohexyl}), 42.22 [OCH(CH₃)₂], 33.58 [CH(CH₃)₂], 31.81, 24.90, 23.30 (3C_{cyclohexyl}), 22.16, 21.45, 20.51, 18.30, 17.31, 15.10 (7CH₃); Exact MS for C₁₉H₃₈NNaO₅P⁺ *m/z*: 414.2385; HRMS *m/z*: 414.2377 (M+Na⁺).

3d [R=CH₂CH(CH₃)₂], *O*-异丙基-*O*-(2-异丙基-5-甲基)环己基磷酸化-*L*-亮氨酸甲酯, 黄色油状物, 产率 76.8%, $[\alpha]_D^{20} = -33.4$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.58~4.60 [m, 1H, OCH(CH₃)₂], 4.05~4.15 (m, 1H, NHCH), 3.92 (t, *J*=6 Hz, 1H, NH), 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 3.33 (dd, *J*₁=11 Hz, *J*₂=23 Hz, 1H, CH_{cyclohexyl}), 2.23~2.25, 2.00~1.95, 1.80~1.76 [3m, 3H, CH_{cyclohexyl}, 2CH(CH₃)₂], 1.65~1.35 (m, 9H, NHCHCH₂, CH_{cyclohexyl}, 3CH_{2cyclohexyl}), 0.94~0.82 (m, 21H, 7CH₃); ³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ : 6.02, 5.31; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 173.93 (CO), 77.27 (C_{cyclohexyl}), 69.94 (OCH), 52.33 (COOCH₃), 51.02, 47.96 (2C_{cyclohexyl}), 43.33 (NHCH-CH₂), 42.04 (NHCH), 33.48 [2CH(CH₃)₂], 30.79, 24.70, 23.66 (3C_{cyclohexyl}), 23.08, 22.06, 21.41, 20.39, 15.27 (7CH₃); Exact MS for C₂₀H₄₁NO₅P⁺ *m/z*: 406.2722; HRMS *m/z*: 406.2719 (M+H⁺).

3e (R=CH₂COOCH₃), *O*-异丙基-*O*-(2-异丙基-5-甲基)环己基磷酸化-*L*-天冬氨酸甲酯, 黄色油状物, 产率 83.1%, $[\alpha]_D^{20} = -27.3$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 4.56~4.50 [m, 1H, OCH(CH₃)₂], 4.12~4.02 (m, 1H, NHCH), 3.75 (t, *J*=6 Hz, 1H, NH), 3.68, 3.62 (s, 6H, 2COOCH₃), 3.50 (dd, *J*₁=11 Hz, *J*₂=23 Hz, 1H, CH_{cyclohexyl}), 2.24~2.10, 2.05~1.98 [2m, 2H, CH_{cyclohexyl}, CH(CH₃)₂], 1.67~1.63 (m, 2H, NHCHCH₂), 1.33~1.10 (m, 7H, CH_{cyclohexyl}, 3CH_{2cyclohexyl}), 0.94~0.79 (m, 15H, 5CH₃); ³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ : 5.82, 5.22; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 171.77, 170.60 (2CO), 77.75 (C_{cyclohexyl}), 70.64 (OCH), 52.06, 51.36 (2COOCH₃), 50.68, 48.16 (2C_{cyclohexyl}), 42.22 (NHCHCH₂), 38.14 (NHCH),

33.68 [CH(CH₃)₂], 31.06, 25.12, 24.95 (3C_{cyclohexyl}), 23.35, 22.35, 21.60, 20.53, 15.49 (5CH₃); Exact MS for C₁₉H₃₇NO₇P⁺ *m/z*: 422.2308; HRMS *m/z*: 422.2307 (M+H⁺).

3f (R=*p*-HOC₆H₄CH₂), *O*-异丙基-*O*-(2-异丙基-5-甲基)环己基磷酸化-*L*-酪氨酸甲酯, 淡黄色油状物, 产率 89.0%, $[\alpha]_D^{20} = -13.5$ (*c* 1.00, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.65 (s, 1H, OH), 6.96~6.94, (m, 2H, *meta*-Ph-H), 6.80~6.78 (m, 2H, *para*-PhH), 4.54~4.42 [m, 1H, OCH(CH₃)₂], 4.18~4.10 (m, 1H, NHCH), 4.02 (t, *J*=6 Hz, 1H, NH), 3.65 (s, 3H, COOCH₃), 3.20 (dd, *J*₁=11 Hz, *J*₂=23 Hz, 1H, CH_{cyclohexyl}), 3.00~2.90 (m, 2H, PhCH₂), 2.24~2.08, 1.80~1.74 [2m, 2H, CH_{cyclohexyl}, CH(CH₃)₂], 1.65~1.35 (m, 7H, CH_{cyclohexyl}, 3CH_{2cyclohexyl}), 0.94~0.82 (m, 15H, 5CH₃); ³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ : 5.20, 4.54; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 172.57 (CO), 155.90, 129.63, 125.71, 125.51, 114.91 (C_{Ph}), 77.75 (C_{cyclohexyl}), 70.69 (OCH), 55.41 (COOCH₃), 51.16, 47.89 (2C_{cyclohexyl}), 41.97 [CH(CH₃)₂], 39.06 (NHCH), 33.41, 30.72, 24.66 (3C_{cyclohexyl}), 23.01, 22.06, 21.38, 20.38, 15.27 (5CH₃); Exact mass for C₂₃H₃₉NO₆P⁺ *m/z*: 456.2520; HRMS *m/z*: 456.2529 (M+H⁺).

2 结果与讨论

2.1 合成

根据文献[9]报道的方法, 用 Abuzov 反应制备得到磷中心不对称的氢亚磷酸二酯(**1**). 然后用亚硫酸氯进攻形成磷酸氯, 再加入氨基酸甲酯和三乙胺的条件下制备得到 *O*-异丙基-*O*-(2-异丙基-5-甲基)环己基磷酸化氨基酸甲酯.

以前的磷酸化氨基酸酯的合成方法^[2,3,10,11], 都没有分离出中间产物, 所得的副产物多, 不易提纯. 而此法反应原料便宜易得, 条件温和, 副产物少, 且直接得到中间产物, 所得的磷酸化氨基酸酯易提纯, 产率高, 是合成简单磷酸胺类衍生物的重要方法之一.

2.2 IR 光谱

3a~**3f** 的红外光谱在 1660~1676 cm⁻¹ (s) 有强的吸收峰, 是羰基的伸展振动吸收峰($\nu_{C=O}$); 在 3402~3448 cm⁻¹ (s) 有强吸收, 是酰胺的 N—H 伸展振动吸收峰(ν_{N-H}); 在 1225~1246 cm⁻¹ (s) 有强吸收, 是磷氧双键伸展振动吸收峰($\nu_{P=O}$); 在 1009~1074 cm⁻¹ (s) 有强的双峰吸收峰, 是 P—O—C 的伸展振动吸收峰(ν_{P-O-C}). 这就表明这些化合物里既有芳环、羰基、又有酰胺键、磷氧双键、磷氧键.

2.3 ^1H NMR 谱

化合物 **3a**~**3f** 的 ^1H NMR 在 δ 4.8~4.6 显示吸收峰, 可归属为 $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 上的氢原子; 在 δ 4.05~4.15 附近都显示有多重峰, 是 PNH 上的氢原子。

2.4 ^{13}C NMR 谱

化合物 **3a**~**3f** 的 ^{13}C NMR 在 δ 175~170 显示吸收峰, 可归属于酰胺键 $\text{O}=\text{CNH}$ 碳原子。

2.5 ^{31}P NMR 谱

化合物 **1** 的 ^{31}P NMR 在 δ 6.0~4.5 显示一组四重裂峰, 可归属于两个不对称的磷原子。从 ^1H - ^{31}P 相关谱可以知道, 两个不对称的磷(*R* 和 *S*)分别形成一个峰, 化学位移分别为 δ 7.0 和 4.0 左右, 然后其再被磷上的氢裂分, 其偶合常数 $J_{(\text{PCH})}$ 是 684.9 Hz, 故在磷谱上看到四重裂峰; 化合物 **3a**~**3f** 的 ^{31}P NMR 在 δ 6.0~4.5 显示一组双峰, 是两个不对称磷酰化氨基酸甲酯中磷原子的信号峰。

2.6 主要 MS 数据分析

在表 1 中的数据 displays: 这些化合物都有分子离子峰 ($\text{M}+\text{H}^+$) 和 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 化合物 **3a**~**3f** 的二级质谱都有裂解掉 $m/z=138$, 42, 80 的离子峰。以化合物 **3a** 为例, 裂解方式可能如 Scheme 2 进行。

2.7 生物活性分析

2.7.1 抗菌活性

抗菌活性用滤纸片法^[12]测定溶解于甲醇的化合物对指示菌的拮抗性, 化合物 **3a**, **3b**, **3f** 对五种常用细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、镰刀菌、交链孢霉)的抑菌活性不强。

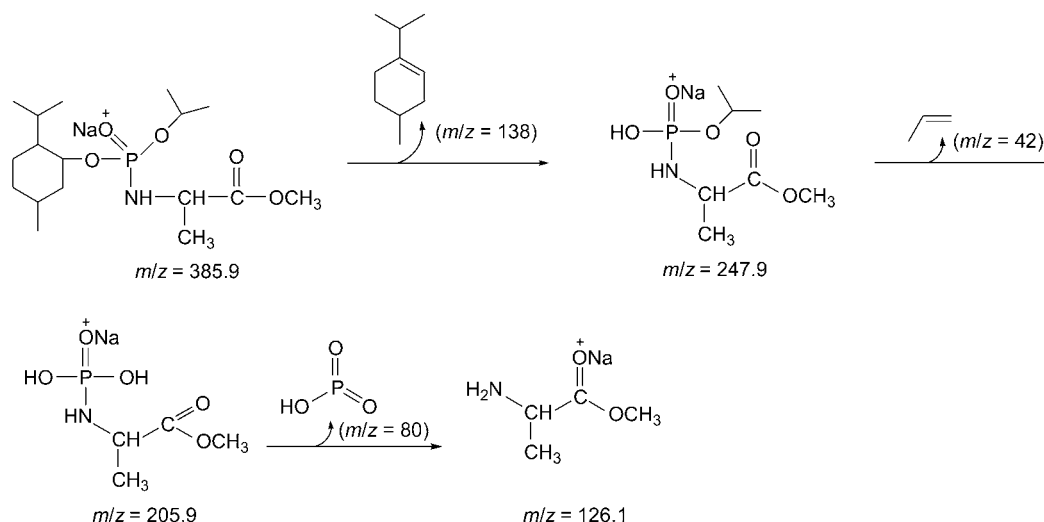
2.7.2 抗肿瘤活性

抗肿瘤活性采用细胞毒 MTT 法测定^[13,14]: 测得化合物 **3a**, **3b**, **3f** 都具有较好的抗肿瘤细胞的生物活性(表 2)。

表 1 化合物 **1**, **2** 和 **3a**~**3f** 的主要质谱数据
Table 1 MS spectral data of compounds **1**, **2** and **3a**~**3f**

Compd.	MS m/z (%)		
1	284.8 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 19.30)	524.3 ($2\text{M}+\text{H}^+$, 5.18)	546.4 ($2\text{M}+\text{Na}^+$, 100)
2	318.6 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100)	320.6 ($\text{M}+\text{H}^+$, 31.84) ^a	
3a	363.5 ($\text{M}+\text{H}^+$, 12.54)	385.9 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 15.56)	748.5 ($2\text{M}+\text{Na}^+$, 100)
3b	363.8 ($\text{M}+\text{H}^+$, 9.93)	386.0 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 100)	748.5 ($2\text{M}+\text{Na}^+$, 2.72)
3c	391.9 ($\text{M}+\text{H}^+$, 23.48)	414.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 100)	804.8 ($2\text{M}+\text{Na}^+$, 80.83)
3d	406.3 ($\text{M}+\text{H}^+$, 10.14)	428.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 100)	
3e	421.8 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100)	444.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 91.57)	
3f	456.6 ($\text{M}+\text{H}^+$, 11.32)	478.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$, 100)	

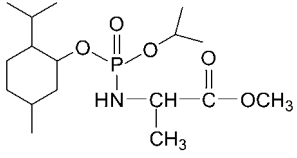
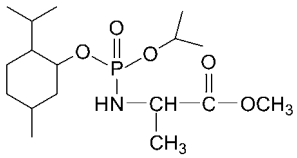
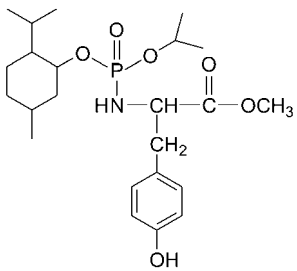
^a表示化合物 **2** 中氯的两个同位素峰, 且丰度比大约为 3:1。



Scheme 2

表2 化合物 3a, 3b 和 3f 抗肿瘤细胞的生物活性数据

Table 2 Cytotoxicities of compounds 3a, 3b and 3f

Compd.	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		
	Hep-G2	Raji	KB
 3a	23.8	12.6	21.9
 3b	22.5	14.4	16.1
 3f	19.2	—	10.2

从表中可以看出它们的活性随着 R 取代基团的增大而增强, 而且磷酸化 L 型氨基酸甲酯和磷酸化 D 型氨基酸甲酯的活性也各不相同, 这为寻找具有更高活性的含磷化合物指明了方向.

References

- Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. *Sci. Technol. Rev.* **1994**, 3, 6.
- Ji, G.-J.; Xue, C.-B.; Zeng, J.-N. *Synthesis-Stuttgart* **1988**, 444.
- Ma, X.-B.; Zhao, Y.-F. *Chin. J. Org. Chem.* **1989**, 54(16), 4005.
- Zeng, J.-N.; Xue, C. B.; Chen, Q. W.; Zhao, Y.-F. *Bioorg. Chem.* **1989**, 17, 434.
- He, H.-W. *Chin. J. Org. Chem.* **2003**, 23(2), 155 (in Chinese).
(贺红武, *有机化学*, **2003**, 23(2), 155.)
- Zetterqvist, O.; Engstrom, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, 141, 523.
- Zhang, Q.-Y. *Food Nutr. China* **2005** (4), 20 (in Chinese).
(张秋燕, *中国食物与营养*, **2005**, (4), 20.)
- Dong, P. *Tianjing Pharm.* **1998**, 11(4), 38 (in Chinese).
(董平, *天津药学*, **1998**, 11(4), 38.)
- Sun, X.-B.; Kang, J.-X.; Zhao, Y.-F. *Chem. Commun.* **2002**, 20, 2414.
- Zhao, Y.-F.; Zhang, J.-C.; Cao, S.-X.; Xu, J.; Rong, C.-L.; Qu, L.-B. *Chin. J. Org. Chem.* **2004**, 24(6), 609 (in Chinese).
(赵玉芬, 张建臣, 曹书霞, 徐军, 荣垂林, 屈凌波, *有机化学*, **2004**, 24(6), 609.)
- Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 469.
- Li, G.-L.; Wang, J.-F.; Huang, Y.-J.; Zheng, Z.-H.; Su, W.-J. *Microbiology* **2001**, 28(6), 64 (in Chinese).
(李桂玲, 王建锋, 黄耀坚, 郑忠辉, 苏文金, *微生物学通报*, **2001**, 28(6), 64.)
- Zhang, Y.-J.; Wang, J.-F.; Huang, Y.-J.; Zheng, Z.-H.; Su, W.-J. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2002**, 41(6), 804 (in Chinese).
(张永杰, 王建锋, 黄耀坚, 郑忠辉, 苏文金, *厦门大学学报(自然科学版)*, **2002**, 41(6), 804.)
- Mosmann, F. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

(Y0510081 QIN, X. Q.; ZHENG, G. C.)