

连续条件下氨基酸的 N-苄基化反应研究

张娇娇^{1,2}, 辜顺林^{1,2}, 严生虎^{1,2}, 张跃², 陶正东^{1,2}, 刘建武^{1,2*}

(1.常州大学药学院,江苏常州 213164; 2.石油和化工行业连续流技术工程实验室,江苏常州 213164)

摘要:以氨基酸、苯甲醛、氢氧化钠、硼氢化钠为原料合成了一系列 N-苄基氨基酸类化合物,并选取典型天然氨基酸进行连续 N-苄基化反应,考察了缩合反应中苯甲醛摩尔分数、反应温度、停留时间等因素对反应的影响;以及还原反应中硼氢化钠摩尔分数、反应温度、停留时间等因素对反应的影响。对典型案例进行连续和间歇反应结果的对比,结果表明,连续法能大大缩短反应时间、简化操作、提高装备效率与收率,该研究为氨基酸的连续 N-苄基化生产应用奠定了理论基础。

关键词:缩合-还原; N-苄基化反应; 连续; 氨基酸

中图分类号: TQ244.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)08-0180-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.08.034

N-benylation of amino acids under continuous flow conditions

ZHANG Jiao-jiao^{1,2}, GU Shun-lin^{1,2}, YAN Sheng-hu^{1,2}, ZHANG Yue²,
TAO Zheng-dong^{1,2}, LIU Jian-wu^{1,2*}

(1.School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

2.Continuous Flow Engineering Laboratory of National Petroleum and Chemical Industry, Changzhou 213164, China)

Abstract: A series of N-benzyl amino acid compounds are synthesized by using amino acids, benzaldehyde, sodium hydroxide and sodium borohydride as raw materials. Typical natural amino acids are also selected for continuous N-benylation. The effects of the molar fraction of benzaldehyde, reaction temperature, residence time, and other factors on the condensation reaction are investigated, and the influences of the molar fraction of sodium borohydride, reaction temperature, residence time and other factors on the reduction reaction are studied. The results of continuous and batch reaction results are compared in typical cases. It is found that the continuous flow method can greatly shorten the reaction time, simplify the operation, and improve the equipment efficiency and yield. This research work lays a theoretical foundation for the continuous N-benylation production and application of amino acids.

Key words: condensation-reduction; N-benylation; continuous flow; amino acids

氨基酸及其衍生物由于其特定的生理活性,广泛应用于医药、食品、饲料和化工等行业^[1],其中,由 N-烷基化氨基酸构成的生物分子具有显著而又广泛的生物效应,包括抗生素、抗癌、抗病毒和免疫抑制活性等^[2]。

目前制备氨基酸的 N-单烷基化反应产物的方法主要有还原胺化法、噁唑啉酮水解法^[3-4]。其中,还原胺化法是通过氨基酸与醛或酮缩合成 Schiff 碱再还原来实现,常见的还原剂有甲酸^[5]、金属氢化物、硼氢化钠、催化氢化等,值得一提的是,以硼氢化钠为还原剂还原氨基酸类 Schiff 碱的适用性更广、价格更低廉^[6-9]。笔者选取苄基为代表,以氨基酸、苯甲醛为底物,硼氢化钠为还原剂,合成一系列 N-单苄基氨基酸类化合物,并探索了连续条件下合成 N-苄基-D-丙氨酸。

目前氨基酸的 N-苄基化主要采用间歇法,即将氨基酸、溶剂和碱先加到反应釜中,再向其中滴加苯甲醛进行缩合,缩合完成后向反应釜中加入硼氢

化钠。由于反应过程在一个体系内持续搅拌,会出现较多的双取代副产物,降低收率,并且会给分离纯化过程带来很大的不便,所以如果能及时移走生成的产物,则对收率的提高非常有利,连续反应器具有这样的优点。普通管式连续反应器和微通道连续反应器是连续反应器的两种形式,而微通道反应器的面积/体积比相较于传统釜式反应器提高了上千倍之多^[10],且传质传热效率高、易于控制,同时能有效降低能耗^[11],大大提高了反应过程中的安全性和可控性。本课题组在流动化学领域有多年的研究经验,成功开发出重氮化、硝化、氧化等多种类型反应的连续合成技术^[12-16]。

鉴于氨基酸的单苄基化反应特点,笔者采用具有特定脉冲混合结构的微通道反应器为实验装备,研究该反应的连续合成工艺,以 D-丙氨酸、苯甲醛为原料连续合成氨基酸类 Schiff 碱;再经硼氢化钠还原得到 N-苄基-D-丙氨酸。分别考察了两步反应中原料摩尔比、反应温度以及停留时间对反应的

收稿日期:2022-09-15;修回日期:2023-05-30

作者简介:张娇娇(1997-),女,硕士研究生,研究方向为连续流合成工艺,2660448963@qq.com;刘建武(1973-),男,博士,正高级工程师,研究方向为连续流化工过程技术开发,通讯联系人,liujianwu@cczu.edu.cn。

影响,并对工艺条件进行了优化。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

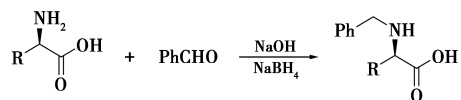
D-丙氨酸(质量分数98%),上海达瑞精细化学品有限公司生产;苯甲醛(GC,质量分数>99.0%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产;氢氧化钠(分析纯)、甲醇(分析纯)、硼氢化钠,国药集团化学试剂有限公司生产;甲醇(色谱纯),萨恩化学技术(上海)有限公司生产;去离子水,实验室自制。

TBP-5002SF型柱塞计量泵,上海同田生物技术股份有限公司生产;依利特型高效液相色谱仪,北京创新通恒科技有限公司生产;DL-180E型超声波清洗器,上海之信仪器有限公司生产;紫外-可见分光光度计,上海棱光技术有限公司生产;FA2204型电子天平,常州科源电子仪器有限公司生产;ST-HC-F100型金属微通道反应器,江苏迪源精密仪器科技有限公司生产。

1.2 实验过程

1.2.1 实验操作(间歇)

向反应瓶中分别加入无水甲醇(20 mL)、氨基酸(11.2 mmol)和氢氧化钠(0.45 g, 11.2 mmol), 30℃下磁力搅拌使其溶解。将溶有苯甲醛(1.43 g, 13.5 mmol)的无水甲醇(20 mL)溶液缓慢滴加至上述混合液中60℃搅拌1 h;随后降温至0℃,向反应瓶中加入含3.37 mol/L硼氢化钠(1.27 g, 33.7 mmol)的碱水溶液,0~5℃继续反应0.5 h后,用1 mol/L盐酸调pH为5~6,减压蒸除溶剂;将粗产品溶于甲醇,滤去不溶性盐,再次减压蒸除溶剂得白色固体^[17-21],反应通式为:



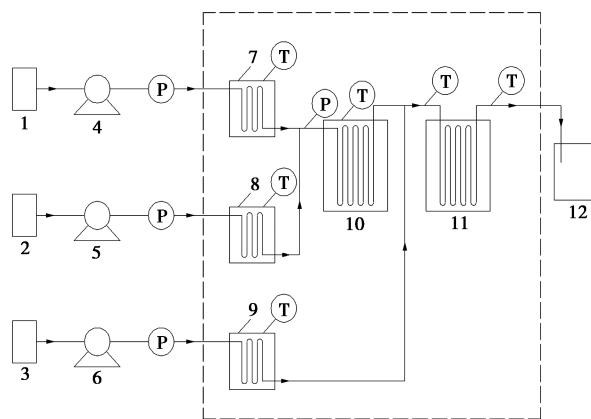
用上述实验方法得到一系列氨基酸的N-苄基化产物,如表1所示。

表1 氨基酸的N-苄基化产物

序号	R	w(N-苄基氨基酸)/%
1	CH ₃	78.7
3	Ph	74.3
4	CH ₂ OH	71.9
5	CH ₂ COOH	68.4
6	CH ₂ (CH ₃) ₂	76.8
7	CH(CH ₃) ₃	75.2
8	(CH ₂) ₃	58.6

1.2.2 实验操作(连续)

连续流反应系统流程如图1所示。在室温下,将D-丙氨酸和氢氧化钠溶于定量的甲醇记为原料1,苯甲醛溶于定量的甲醇记为原料2,硼氢化钠和氢氧化钠溶于定量的水记为原料3;当系统整体温度达到设置值且泵的流速稳定后,用计量泵分别将原料1、原料2送进微通道反应器的预热区域;待原料1与原料2预热到一定温度后,进入反应区10进行缩合反应,得到的中间产物经冷却模块降温后再继续进入反应区11,并通过计量泵将原料3经冷却模块降温后送进反应区11和生成的Schiff碱进行还原反应。产物从出口连续出料,系统运行稳定后取样,加稀盐酸淬灭,经浓缩、甲醇溶解、过滤旋干得N-苄基-D-丙氨酸,用高效液相色谱进行分析检测。



1, 2, 3—原料罐; 4, 5, 6—原料计量泵; 7, 8—预热区;
9—预冷区; 10, 11—反应区; 12—产物收集区;
P—压力传感器; T—温度传感器

图1 连续流反应系统流程

1.3 分析方法

采用高效液相色谱法进行定量分析,色谱柱为4.6 mm×250 mm C18柱;检测波长为202 nm;流动相V(甲醇):V(水)=1:1;柱温为25℃;流速为1 mL/min;进样量为20 μL。

2 结果与讨论

2.1 缩合反应条件

2.1.1 苯甲醛摩尔分数对反应的影响

在n(D-丙氨酸):n(氢氧化钠):n(硼氢化钠)=1:1:1.2、停留时间(residence time, RT)为2 min、反应温度为30℃时,考察了连续条件下苯甲醛摩尔分数对反应的影响,结果如图2所示。

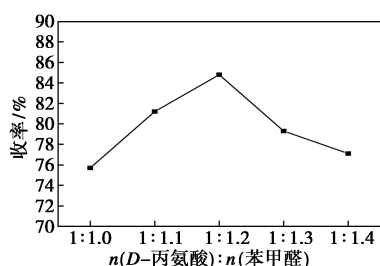


图 2 苯甲醛摩尔分数对反应的影响

由图 2 可知,随着苯甲醛摩尔分数的增加,反应的收率呈现先缓慢上升后下降的趋势。当 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛})=1:1.2$ 时, N-苄基-D-丙氨酸收率达 84.8%。这是由于随着苯甲醛摩尔分数的增大, D-丙氨酸与苯甲醛的碰撞概率增加,促进了反应的进行,使得产物收率上升;当 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛})$ 大于 1:1.2 时,产物收率逐步下降,这是因为双取代产物的增加降低了最终收率,此外,随着苯甲醛摩尔分数的增加,体系中剩余的苯甲醛增多,会消耗还原剂硼氢化钠生成苯甲醇。

2.1.2 氢氧化钠摩尔分数对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1.2$ 、 $RT=2\text{ min}$ 、反应温度为 30°C 时,考察了连续条件下氢氧化钠摩尔分数对反应的影响,如图 3 所示。

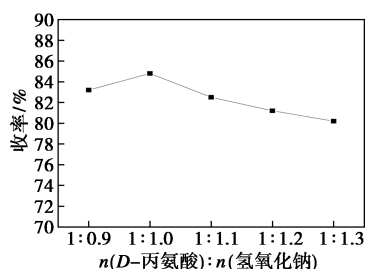


图 3 氢氧化钠摩尔分数对反应的影响

由图 3 可知,氢氧化钠摩尔分数较小时,产物收率稍低,当氢氧化钠摩尔分数为 1 时,产物收率达到最高,继续增加氢氧化钠的摩尔分数,产物收率反而下降。这是由于氨基与苯甲醛的缩合反应是可逆反应,过量的碱容易引起醛的歧化反应,从而降低收率,若氢氧化钠的摩尔分数小,原料 D-丙氨酸不能完全溶解,反应不彻底。因此,选取 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{氢氧化钠})=1:1$ 。

2.1.3 反应温度对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$ 、 $RT=2\text{ min}$ 时,考察了连续条件下不同反应温度对反应的影响,结果如

图 4 所示。

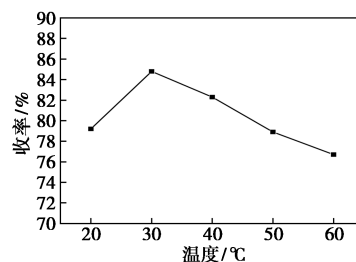


图 4 温度对反应的影响

由图 4 可知,反应温度在 $20\sim 30^\circ\text{C}$ 时,反应收率随着温度升高而升高;当超过 30°C 时,产物的收率随着温度的升高呈现下降的趋势。这是因为 Schiff 碱的热不稳定性,较高温度容易引起 Schiff 碱的分解,导致产物收率降低。所以低温有利于 Schiff 碱的合成,但温度太低会降低 Schiff 碱的生成速率。 30°C 是较为适宜的反应温度,此时 N-苄基-D-丙氨酸的收率达到最高。

2.1.4 停留时间对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$ 、反应温度为 30°C 时,考察了连续条件下不同停留时间对反应的影响,结果如图 5 所示。

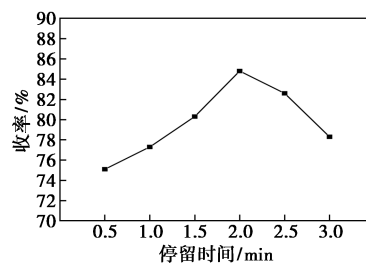


图 5 停留时间对反应的影响

由图 5 可知,随着停留时间的延长, N-苄基-D-丙氨酸的收率呈先上升后下降的趋势,当停留时间为 2 min 时,收率达到最高值 84.8%。当停留时间小于 2 min 时,适当延长反应时间会使产物收率提高;当停留时间进一步延长时,一方面过量的苯甲醛可与产物生成二取代物;另一方面流速降低,传质效果也在下降,引起更多的副反应,从而降低产物的收率,所以缩合反应的最佳停留时间为 2 min。

2.2 还原反应条件

2.2.1 硼氢化钠的摩尔分数对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1$ 、 $RT=1.5\text{ min}$ 、反应温度为 10°C 时,考察了连续条件下不同硼氢化钠摩尔分数对反应的影响,结果如图 6 所示。

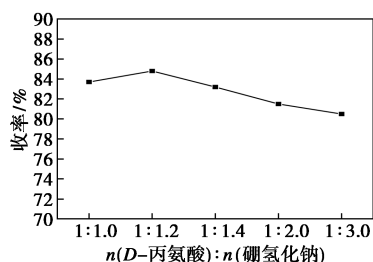


图6 硼氢化钠摩尔分数对反应的影响

由图6可知,随着硼氢化钠摩尔分数的增加,产物N-苄基-D-丙氨酸的收率呈现先增加后逐步降低的趋势。当硼氢化钠摩尔分数为1.2时,产物收率达到最高。当硼氢化钠摩尔分数较小时,不能完全还原第一步生成的Schiff碱,且体系中还有未反应的苯甲醛会被硼氢化钠还原为苯甲醇,苯甲醛会和Schiff碱竞争还原剂硼氢化钠;当硼氢化钠摩尔分数超过1.2时,体系中会产生大量副产物苯甲醇、硼酸酯等,后处理麻烦,造成分离纯化过程中产物的损失。为了保证较高的收率,减少三废和降低成本,硼氢化钠的摩尔分数为1.2最合适。

2.2.2 反应温度对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$ 、 $RT=1.5\text{ min}$ 时,考察了连续条件下不同反应温度对反应的影响,结果如图7所示。

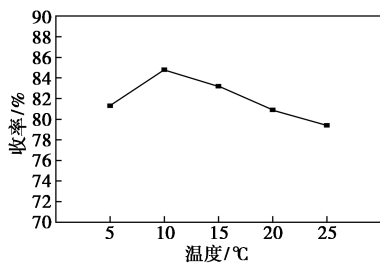


图7 温度对反应的影响

由图7可知,反应温度在5~10°C时,随着反应温度的升高,反应收率也在升高;当反应温度超过10°C时,产物的收率随着温度的升高呈现下降的趋势。这是因为反应中产生气体且反应放热,高温使得气体体积膨胀,快速推动物料离开反应器进入淬灭区域,缩短了实际停留时间,导致反应不完全,因此,10°C是较为适宜的反应温度。

2.2.3 停留时间对反应的影响

在 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$ 、反应温度为10°C时,考察了连续条件下不同 RT 对反应的影响,结果如图8所示。

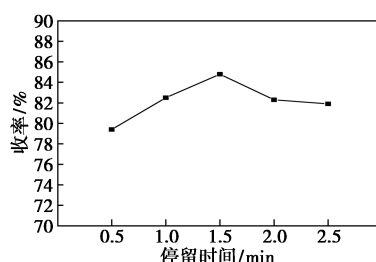


图8 停留时间对反应的影响

由图8可知,随着停留时间的延长,N-苄基-D-丙氨酸的收率呈现先上升后趋于平缓的趋势,当停留时间为1.5 min时,产物收率达到最高值84.8%。Schiff碱与硼氢化钠反应生成N-苄基-D-丙氨酸,随着停留时间的延长,整个体系更加稳定,但停留时间过长,生成的产物还可能与过量的苯甲醛继续苄基化,从而降低收率。因此停留时间也不宜过长,最佳停留时间为1.5 min。

2.3 间歇工艺与连续流工艺对比

对比了间歇烧瓶、脉冲混合式微通道反应器以及普通管式反应器(通道尺寸 $\Phi 0.8\text{ mm}$)在最佳工艺条件下对D-丙氨酸苄基化的影响,结果如表2所示。

表2 间歇工艺与连续流工艺对比

反应条件	间歇烧瓶	脉冲混合式微通道反应器	管式反应器
$n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})$	1:1.2:1:3.0	1:1.2:1:1.2	1:1.2:1:1.5
缩合反应温度/°C	60	30	30
缩合反应停留时间/min	60	2	3
还原反应温度/°C	0~5	10	10
还原反应停留时间/min	30	1.5	4
产品收率/%	78.7	84.8	82.3

从表2中可以看出,与传统间歇反应相比,连续流工艺大大缩短了反应时间,减少了能耗,其反应系统密闭,几乎无放大效应,操作安全性高。与管式反应器相比,脉冲混合式微通道反应器具有更高的传热、传质效率,能有效减少硼氢化钠的用量,缩短反应时间,有效提高反应的产率。

3 结论

(1)以氨基酸、苯甲醛、氢氧化钠、硼氢化钠为原料,合成了一系列N-苄基氨基酸类化合物。

(2)研究了连续条件下D-丙氨酸的还原胺化反应,优化了微通道连续合成工艺条件,在N-苄

基-D-丙氨酸的合成中,当 $n(\text{D-丙氨酸}):n(\text{苯甲醛}):n(\text{氢氧化钠}):n(\text{硼氢化钠})=1:1.2:1:1.2$,第 1 步反应温度为 30°C 、停留时间为 2 min;第 2 步反应温度为 10°C 、停留时间为 1.5 min 时,产物的收率达到 84.8%。

(3)与常规间歇式反应工艺相比,连续流微通道反应工艺的原料消耗较低,大大缩短了反应时间,提升了装备效率和产品收率,为后续工业化应用提供了研究基础。

参考文献

- [1] 孙薇,丁冬芹,柏丹阳,等.芳香族氨基酸及其衍生物的细胞工厂构建策略[J].合成生物学,2021,2(6):18-19.
- [2] Rijkers D T S, Jo W M Hoppener, Posthuma G, *et al.* Inhibition of amyloid fibril formation of human amylin by N-alkylated amino acid and alpha-hydroxy acid residue containing peptides[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2002, 8(18):4285-4291.
- [3] 布晓东,许艳杰.氨基酸的 N-甲基化方法[J].化工中间体,2008,(4):1-5.
- [4] 王玲丽.生物质平台化合物合成噁唑烷酮类及胺类化合物的研究[D].石家庄:河北科技大学,2018.
- [5] Hannachi J C, Vidal J, Mulatier J C, *et al.* Electrophilic amination of amino acids with N-Boc-oxaziridines: Efficient preparation of N-orthogonally diprotected hydrazino acids and piperazic acid derivatives[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69(7):2367-2373.
- [6] 葛新.还原胺化反应的应用及其机理研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [7] Sukanta, Bhattacharyya, Arindam, *et al.* Reductive amination with zinc borohydride. efficient, safe route to fluorinated benzylamines [J]. *Synthetic Communications*, 1997, 27(24):4265-4274.
- [8] Ranu B C, Majee A, Sarkar A. One-pot reductive amination of conjugated aldehydes and ketones with silica gel and zinc borohydride [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63(2):370-373.
- [9] Kumpaty H J, Bhattacharyya S. Efficient synthesis of N-alkyl tetrahydroisoquinolines by reductive amination [J]. *Synthesis*, 2005, (13):2205-2209.
- [10] 丁云成,王法军,艾宁,等.微反应器内连续重氮化/偶合反应进展[J].化工学报,2018,69(11):4542-4552.
- [11] Avon E D L, Cesson P W. Process intensified microfluidic devices: US, 7939033B2 [P]. 2011-05-10.
- [12] 刘建武,张跃.丙酮液相氨脲化连续流反应[J].精细化工,2021,38(5):1075-1080.
- [13] 郭冰蒙,张跃,严生虎,等.微通道反应器中 3,5-二硝基苯甲酸的连续合成工艺[J].天然气化工: C1 化学与化工,2021,46(2):77-80.
- [14] 岳家委,辜顺林,刘建武,等.重氮乙酸乙酯的连续合成工艺研究[J].现代化工,2021,41(6):205-208.
- [15] 祁锴铤,辜顺林,刘建武,等.硫酸苯肼的合成及分析方法[J].化学试剂,2022,44(6):936-940.
- [16] 严生虎,韩玲玲,沈卫,等.微通道中环己酮氧化合成 ϵ -己内酯的连续流工艺[J].化工进展,2014,33(11):3061-3066.
- [17] Huy P H, Koskinen A M P. Efficient, stereodivergent access to 3-piperidinols by traceless P(OEt)₃ cyclodehydration [J]. *Organic Letters*, 2013, 15(20):5178-5181.
- [18] Fu X, Li Z, Wei J, *et al.* Schiff base and reductive amination reactions of α -amino acids: A facile route toward N-alkylated amino acids and peptoid synthesis [J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2018, 9(37):4617-4624.
- [19] Aboussafy C L, Clive D L J. A Dieckmann cyclization route to piperazine-2,5-diones [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77(11):5125-5131.
- [20] Huy P H, Westphal J C, Koskinen A M P. Concise, stereodivergent and highly stereoselective synthesis of cis- and trans-2-substituted 3-hydroxypiperidines-development of a phosphite-driven cyclodehydration [J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2014, 10(1):369-383.
- [21] Yoon U C, Jin Y X, Oh S W, *et al.* A synthetic strategy for the preparation of cyclic peptide mimetics based on SET-promoted photocyclization processes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(35):10664-10671. ■
- [13] Huang S, Li H M, Liu Y, *et al.* Investigations of conformational structure and enzymatic activity of trypsin after its binding interaction with graphene oxide [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 392:122285.
- [14] Xiang X, Zhu Y, Gao C, *et al.* Study on the structure of reduced graphene oxide prepared by different reduction methods [J]. *Carbon Letters*, 2022, 32(2):557-566.
- [15] Feng J L, Ye Y Q, Xiao M, *et al.* Synthetic routes of the reduced graphene oxide [J]. *Chemical Papers*, 2020, 74(11):3767-3783.
- [16] Bai Y T, Ming Z, Cao Y Y, *et al.* Influence of graphene oxide and reduced graphene oxide on the activity and conformation of lysozyme [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 154:96-103.
- [17] 刘焯焯.负载溶菌酶的聚醚砜杂化超滤膜制备及其抗菌性能研究[D].郑州:郑州大学化工与能源学院,2014.
- [18] Luo R P, Zhou X R, Xiu Y, *et al.* Preparation of hierarchically mesoporous bioactive glass and immobilization of lysozyme [J]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2018, 87(3):584-592.
- [19] 郭庆启,张娜,符群,等. AB-8 大孔树脂固定化溶菌酶及酶学性质研究[J].食品科学,2012,33(17):216-220.
- [20] 傅婷,万骥,王丹,等.牛肾溶菌酶的分离纯化及部分酶学性质[J].食品科学,2016,37(5):126-131.
- [21] Lian Z X, Ma Z S, Wei J, *et al.* Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(2):201-208.
- [22] 张群,张育淇,刘晓贞,等.大尺寸 SiO₂ 大孔材料固定化漆酶[J].无机化学学报,2013,29(10):2065-2070.
- [23] Xue F, Chen Q, Li Y L, *et al.* Immobilized lysozyme onto 1,2,3,4-butanetetracarboxylic (BTCA)-modified magnetic cellulose microsphere for improving bio-catalytic stability and activities [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131:109425.
- [24] Bayazidi P, Almasi H, Asl A K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107(Pt B):2544-2551.
- [25] 朱衡,张继福,张云,等.基于羧基载体 LX-1000IDA 的脂肪酶固定化研究[J].广西师范大学学报(自然科学版),2020,38(6):88-101.
- [26] 宋雅丽,王林变,高莉,等.氧化石墨烯抗菌性及生物安全性研究进展[J].生态毒理学报,2020,15(1):109-118. ■

(上接第 179 页)