

# 微通道连续流动高效绿色合成亮丙瑞林

李士杰, 杨 洋, 崔莹莹, 苏贤斌  
(南京工业大学化工学院, 南京 210009)

**摘要** 开发了一种高效绿色的连续流动多肽合成方法, 并成功应用于一种含有9个氨基酸的促性腺激素释放激素类似物(亮丙瑞林)的合成. 该方法采用苄氧羰基(Cbz)保护氨基酸, 在微通道反应器中实现高效偶联与水洗萃取除杂, 并通过钨碳催化剂填充柱氢解反应实现快速洁净地脱除Cbz保护基, 使原料和溶剂的消耗量大大减少, 原子经济性大幅提高. 该高效绿色合成方法将在多肽制药工业中得到更多应用.

**关键词** 微通道反应器; 亮丙瑞林; 连续流动; 液相合成

中图分类号 O629.72 文献标志码 A

多肽作为治疗药物备受关注, 其主要的化学合成方法有固相合成法和液相合成法. 固相合成法虽然操作简单、后处理方便, 但非均相合成不仅需要昂贵的树脂、过量氨基酸和偶联试剂, 还耗费大量的溶剂和脱保护试剂<sup>[1-2]</sup>. 有害试剂和溶剂的大量使用使多肽合成的发展面临巨大的挑战<sup>[3]</sup>. 与固相合成法相比, 多肽液相合成法具有氨基酸及溶剂用量少且溶剂更加绿色等优势<sup>[4-7]</sup>. Sakakibara<sup>[8]</sup>提出在液相中使用1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)作为缩合试剂, 与1-羟基苯并三唑(HOBT)共同使用完成氨基酸的偶联, 通过水洗可以除去多余的缩合试剂. 这种方法使液相合成多肽更具有绿色化学的潜力, 合成成本的降低使其更具有市场竞争力<sup>[9,10]</sup>.

近年来, 连续流动化学在材料及药物合成领域取得了巨大进展<sup>[11-15]</sup>, 在多肽化学合成中的应用也受到了广泛关注<sup>[16,17]</sup>. 虽然连续流动化学在多肽固相合成上的应用研究更加广泛<sup>[18-21]</sup>, 但其合成仍然需要使用昂贵的树脂、管制化学品哌啶和大量的溶剂<sup>[22]</sup>, 这与当今社会追求的绿色化学相违背. 近年来, 有关连续流动液相多肽合成的研究也有所发展<sup>[23,24]</sup>. Fuse等<sup>[25]</sup>采用T型混合器, 将羧基通过三光气活化后, 利用注射泵连续流动合成多肽. 虽然基于三光气预活化的液相连续流动并不适用于酸敏感的氨基酸侧链保护基, 具有很大局限性, 但均相反应更加高效且溶剂的选择更加多样. 此外, 多肽合成选择使用N端苄氧羰基Cbz保护的氨基酸, 通常采用钨碳加氢的方式对Cbz进行氢解脱除. 加氢反应是有机合成中一种常见的反应类型, 而连续流动加氢法为非均相催化加氢反应提供了更高的传质性能<sup>[26-29]</sup>, 催化剂的回收利用与产物的纯化更方便, 能极大地提高生产效率. 与传统釜式加氢法相比, 流动加氢法在安全、效率和成本上更具优势.

亮丙瑞林(Leuprorelin, 序列为H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt)是天然促性腺激素释放激素(GnRH)的合成类似物, 最早由日本武田公司研发生产, 临床上主要用于治疗前列腺癌和子宫内膜异位症<sup>[30]</sup>, 对肯尼迪病也有很好的疗效<sup>[31]</sup>. 1975年, Masahiko等<sup>[32]</sup>首次采用液相法合成了促黄体激素释放激素的九肽酰胺类衍生物, 但其合成方法需要繁琐的后处理, 且合成效率不高. Nicolas等<sup>[33]</sup>采用固相法合成亮丙瑞林, 最终用液体乙胺将肽链从树脂上切割下来, 但需要在低温、高压密封条件下进行, 反应条件苛刻. 岑涛等<sup>[34,35]</sup>分别用微波辅助固相合成和液相片段缩合的方法合成了亮丙瑞林, 但固相合成最终也要从树脂上切割下来后进行乙胺化, 液相片段缩合处理繁琐且片段需要固相合成.

收稿日期: 2020-01-14. 网络出版日期: 2020-06-08.

基金项目: 材料化学工程国家重点实验室探索课题(批准号: ZK201311)资助.

联系人简介: 苏贤斌, 男, 博士, 教授, 主要从事多肽合成和药物化学方面的研究. E-mail: davidsu@njtech.edu.cn

本文将连续流动法与多肽液相合成法相结合,利用微通道反应器传质传热效率高的特点,研究了在微通道反应器中偶联反应温度、浓度和停留时间等因素,优化了流动反应条件;对比研究了微通道反应器中水洗除杂效果,利用钯碳填料柱催化氢解脱除苄氧羰基保护基,实现了更加高效绿色地合成亮丙瑞林.

## 1 实验部分

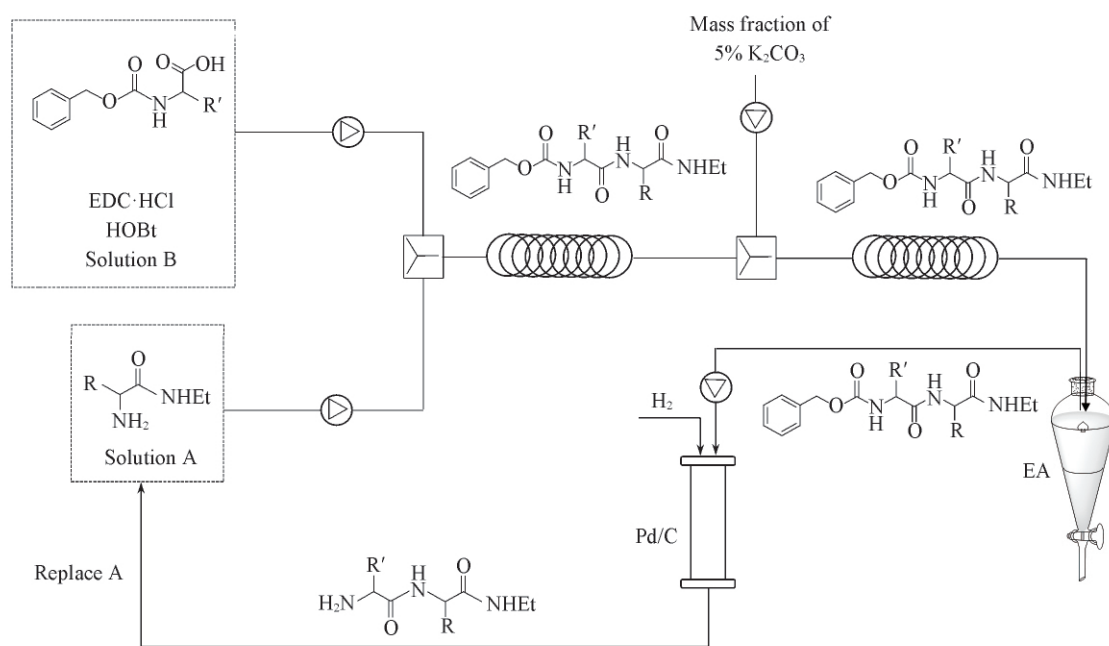
### 1.1 试剂与仪器

*N*-苄氧羰基-*L*-脯氨酸(*Z*-Pro-OH)、*N*5-二[(叔丁氧羰基)氨基]亚甲基-*N*2-(苯基甲氧基)羰基-*L*-鸟氨酸环己胺盐[*Z*-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH·CHA]、*N*-苄氧羰基-*L*-亮氨酸二环己胺盐(*Z*-Leu-OH·DCHA)、*N*-苄氧羰基-*D*-亮氨酸(*Z*-*D*-Leu-OH)、*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-酪氨酸二环己胺盐[*Z*-Tyr(*t*Bu)-OH·DCHA]、*N*-苄氧羰基-*O*-叔丁基-*L*-丝氨酸[*Z*-Ser(*t*Bu)-OH]、1-叔丁氧羰基-*N*-苄氧羰基-*L*-色氨酸二环己胺盐[*Z*-Trp(Boc)-OH·DCHA]、*N*-苄氧羰基-*N'*-三苯甲基-*L*-组氨酸[*Z*-His(Trt)-OH]、*N*-苄氧羰基-*L*-焦谷氨酸[*Z*-Pyr-OH]、1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和1-羟基苯并三唑(HOBT)购自吉尔生化上海有限公司,均为分析纯;三氟乙酸(TFA)和三异丙基硅烷(TIS)购自阿拉丁试剂上海有限公司,均为分析纯;乙胺水溶液(质量分数65%~70%)、乙酸乙酯(EA,分析纯)和碳酸钾(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;高纯氢气购自南京特种气体厂股份有限公司;5%钯碳催化剂(5% Pd/C,质量分数)购自陕西瑞科新材料股份有限公司.其余试剂均为分析纯.

DRX500 400MHz型和ADVANCE III 600 MHz型核磁共振波谱仪(NMR,德国Bruker公司);Agilent 1260分析型液相色谱仪(HPLC,美国安捷伦公司);Agilent 6540型液相色谱-质谱联用色谱仪(LC-MS,美国安捷伦公司);RE-201D型旋转蒸发器(上海东玺制冷仪器有限公司);X-4型显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);WZZ-1型自动旋光仪(上海仪电科学仪器股份有限公司);MRCS100型微通道反应器(山东金德新材料有限公司).

### 1.2 实验过程

Scheme 1为实验总流程示意图.将Cbz保护的氨基酸和偶联试剂混合溶解后,与C端片段一起泵入微通道反应器中进行偶联反应,偶联反应结束后,用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(质量分数5%)水溶液在微通道反应器中萃取分液除去偶联试剂及多余的Cbz保护氨基酸;有机相通过设计的钯碳填料柱进行连续流动氢解脱除Cbz保护基;依次进行偶联-萃取分液-脱保护的过程,最终实现多肽的连续流动合成.用HPLC跟



Scheme 1 Flow chart of continuous flow liquid phase synthesis of polypeptide

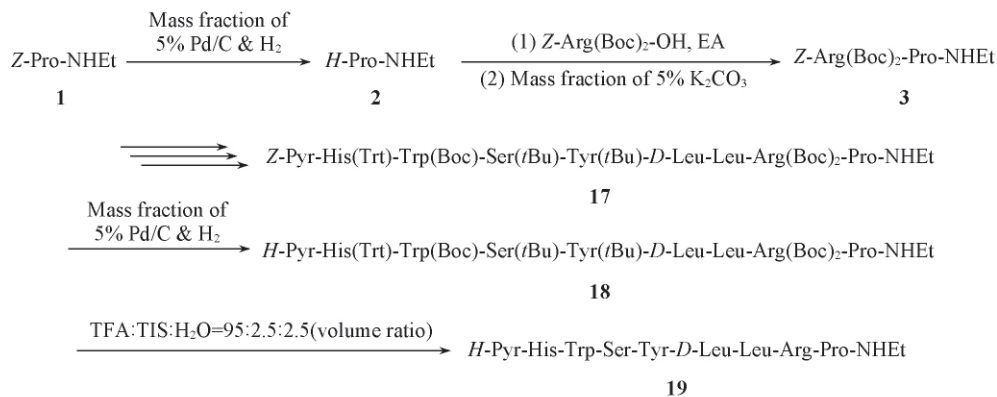
踪监测整个反应过程.

1.2.1 苄氧羰基脯氨酸乙胺 Z-Pro-NHEt (1) 的合成 分别将 5 g (20 mmol) Z-Pro-OH, 3.24 g (24 mmol) HOBT 和 4.62 g (24 mmol) EDC · HCl 溶解在 700 mL EA 中作为物料 B; 将 1.67 g (24 mmol) 质量分数为 65%~70% 的乙胺水溶液溶解在 700 mL EA 中作为物料 A; 调节泵流速均为 4 mL/min, 反应温度为 70 °C, 停留时间 10 min. 反应完成后, 在微通道反应器中萃取除杂, 反应液流速 2 mL/min, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (质量分数 5%) 水溶液流速 4 mL/min; 收集混合液于分液漏斗中静置分液, 弃去水相, 将有机相溶液减压蒸干, 经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚体积比 5:2), 得到 5.035 g Z-Pro-NHEt (1) 白色固体, 收率 90.9%, m. p. 101.3~103.6 °C,  $[\alpha]_D^{20} = -41.0^\circ (c=1.0, \text{AcOH})$ .

1.2.2 连续流动脱除 Cbz 保护基的一般操作 将 700 mL Z-Pro-NHEt 的 EA 溶液(流速 10 mL/min) 和氢气(压力控制为 0.55 MPa) 同时通过钯碳反应柱(16 g, 质量分数 5% 的 Pd/C, 柱管规格 20 mm × 250 mm), 设置反应柱背压为 0.2 MPa, 脱除保护基后反应液进入收集瓶, 气体从收集瓶上端导出; 反应过程中用 HPLC 监测至原料消失, 即得 H-Pro-NHEt 的 EA 溶液, 经减压蒸馏去除溶剂, 可获得无色清油.

1.2.3 连续流动偶联反应的一般操作 将 13.2 g (21.72 mmol) Z-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH · CHA 溶于 100 mL EA 中, 加入质量分数为 1% 的 HCl (50 mL) 水溶液洗涤澄清后, 用分液漏斗分液, 保留有机相; 加入 5.0 g (26.06 mmol) EDC · HCl 和 3.5 g (26.06 mmol) HOBT 配成 700 mL EA 溶液作为物料 B, 将 H-Pro-NHEt 配成 700 mL EA 溶液作为物料 A; 调节两泵流速为 4 mL/min, 将物料 A 和 B 同时泵入微通道反应器中, 于 70 °C 反应 10 min. 反应完成后, 在微通道反应器中萃取除杂, 反应液流速 2 mL/min, 质量分数为 5% 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液流速 4 mL/min, 收集混合液于分液漏斗中静置分液, 弃去水相, 将有机相溶液减压蒸干, 经硅胶柱层析纯化(乙酸乙酯/石油醚体积比 2:1), 得到化合物 Z-Arg(Boc)<sub>2</sub>-Pro-NHEt (3) 白色固体, 收率 90.3%, m. p. 56.8~60.2 °C,  $[\alpha]_D^{20} = -34.2^\circ (c=1.0, \text{AcOH})$ .

1.2.4 连续流动合成全保护亮丙瑞林 重复以上脱保护和偶联的一般操作步骤(Scheme 2). 在偶联反应中, 采取 2 股物料等流速进料, 对脱保护后的另一股物料进行体积定量, 通过旋转蒸发除去多余溶剂定容至 700 mL, 不需蒸干溶剂, 确保以既定的物料比进行下一步偶联即可; 依次偶联 9.7 g (21.72 mmol) Z-Leu-OH · DCHA, 5.28 g (19.91 mmol) Z-D-Leu-OH, 11.0 g (19.91 mmol) Z-Tyr(tBu)-OH · DCHA, 5.88 g (19.91 mmol) Z-Ser(tBu)-OH, 12.3 g (19.91 mmol) Z-Trp(Boc)-OH · DCHA, 9.62 g (18.1 mmol) Z-His(Trt)-OH 和 4.76 g (18.1 mmol) Z-Pyr-OH; Cbz 保护氨基酸的用量降低, 因为反应过程已合成的多肽溶液会出现转移损失, 避免氨基酸的过多剩余造成萃取除杂困难; 其中不含环己胺(CHA) 及二环己胺(DCHA) 的氨基酸不需要进行酸洗除盐操作, 直接配成溶液反应, 若出现溶解不充分现象, 可加入少量乙腈助溶; 合成完成后, 经无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 减压蒸馏得到带保护的亮丙瑞林 25.7 g, 产率 76.1%, HPLC 纯度 92.4%.



Scheme 2 Synthetic route of leuprorelin

1.2.5 亮丙瑞林的裂解 按  $V(\text{TFA}) : V(\text{TIS}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 95 : 2.5 : 2.5$  配制裂解液, 每 1 g 待裂解亮丙

瑞林使用 10 mL 裂解液, 室温下搅拌裂解反应 3 h; 裂解结束后, 加入甲基叔丁基醚沉降粗肽, 经抽滤、干燥得到亮丙瑞林粗肽 13.3 g, 产率 60.8%, 纯度 90%,  $[\alpha]_D^{20} = -31.2^\circ$  ( $c = 1.0$ , AcOH).  $^{13}\text{C}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 14.99, 15.09, 21.68, 21.77, 21.95, 23.35, 23.42, 23.62, 24.40, 24.58, 24.91, 24.96, 25.62, 27.82, 28.53, 59.54, 29.73, 33.80, 37.07, 39.65, 40.59, 40.96, 41.17, 47.21, 50.62, 51.34, 51.90, 53.44, 54.15, 55.41, 55.69, 56.01, 60.13, 62.05, 79.64, 127.84, 128.03, 130.42, 135.29, 136.51, 110.38, 111.66, 115.38, 118.64, 118.85, 121.24, 124.08, 156.34, 157.75, 170.09, 170.42, 171.27, 171.47, 171.66, 172.03, 172.33, 172.68, 174.31, 177.88; IR (KBr),  $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$ : 3411.50, 3285.00, 2957.68, 1637.57, 1545.61, 1456.91, 1246.15, 620.85. 合成的部分化合物的核磁共振及质谱数据见表 1.

Table 1  $^1\text{H}$  NMR and ESI-MS data for compounds 1—3 and 17—19\*

| Compd. | $^1\text{H}$ NMR, $\delta$   | ESI-MS, $m/z$               |
|--------|--|-----------------------------|
| 1      | 7.36—7.31 (m, 5H, ArH), 5.21—5.07 (m, 2H, CCH <sub>2</sub> O), 4.31 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH), 3.54—3.23 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> C), 2.36—1.88 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.05 (t, $J = 8.4$ Hz, 3H, CH <sub>3</sub> )  | 277.14 [M+H] <sup>+</sup>   |
| 2      | 4.10 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, NCHCO), 3.24—3.10 (m, 4H, NCH <sub>2</sub> ), 2.27—1.80 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.05 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH <sub>3</sub> )   | 143.22 [M+H] <sup>+</sup>   |
| 3      | 7.38—7.33 (m, 5H, ArH), 5.1 (m, 2H, CH <sub>2</sub> O), 4.55—4.33 (m, 2H, NCH), 3.71—3.24 (m, 6H, NCH <sub>2</sub> ), 2.37—2.02 (m, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 1.53 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1.5 (s, 18H, CH <sub>3</sub> ), 1.28—1.25 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 1.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH <sub>3</sub> ) | 633.54 [M+H] <sup>+</sup>   |
| 17     |  | 2021.10 [M+Na] <sup>+</sup> |
| 18     |  | 1865.09 [M+H] <sup>+</sup>  |
| 19     | 8.60—6.61 (m, 23H, ArH, NHCO, Indole—H, Imidazole—H), 4.58—3.97 (m, 9H, NCHCO), 3.66—3.45 (m, 2H, OCH <sub>2</sub> ), 3.18—2.71 (m, 12H, NCH <sub>2</sub> ), 2.28—1.33 (m, 18H, CCH <sub>2</sub> , CCH), 1.03—0.75 (m, 15H, CH <sub>3</sub> )  | 1209.63 [M+H] <sup>+</sup>  |

\*  $^1\text{H}$  NMR conditions for compound 1 were 400 MHz and CDCl<sub>3</sub>, for compound 3 were 600 MHz and CDCl<sub>3</sub>, for compounds 2 and 19 were 600 MHz and DMSO- $d_6$ , respectively.

## 2 结果与讨论

### 2.1 微通道反应器偶联条件的探索

2.1.1 温度对偶联转化率的影响 将配制好的 *H*-Pro-NHEt (0.02857 mmol/mL) 和 *Z*-Arg(Boc)<sub>2</sub>-OH (0.03428 mmol/mL) 溶液通过输液泵分别泵入微通道反应器中; 设定 2 股物料的流速均为 4 mL/min, 反应停留时间 10 min, 物料摩尔比为 1:1.2, 反应温度为 30, 40, 50, 60 和 70 °C 时反应的转化率分别是 50.4%, 57.2%, 87.9%, 98.7% 和 100%. 可见, 加入 2 股物料后, 氨基酸偶联的转化率随着温度的升高而升高; 在 70 °C 时可以实现完全转化.

2.1.2 流速对偶联转化率的影响 设定反应温度为 60 °C, 物料摩尔比为 1:1.2, 设定流速参数分别为 40, 20, 10, 8 和 4 mL/min; 在持液量 80 mL 恒定时, 对应的停留时间为 1, 2, 4, 5 和 10 min, 转化率分别为 46.4%, 59.4%, 76.3%, 87.4% 和 98.7%. 可见, 在温度与摩尔比一定时, 随着流速的增大相应的停留时间减少, 偶联转化率降低.

2.1.3 反应液浓度对偶联转化率的影响 设定反应温度为 60 °C, 流速 4 mL/min, 在微通道反应器中的停留时间为 10 min; 配制氨基端氨基酸浓度分别为 0.00714, 0.01428, 0.02857, 0.05714 和 0.11428 mmol/mL, 对应羧基端氨基酸浓度分别为 0.00857, 0.01714, 0.03428, 0.06857 和 0.13704 mmol/mL, 转化率分别为 98.2%, 98.7%, 98.7%, 98.5% 和 99.2%. 可见, 一定范围内浓度对偶联反应的影响不明显, 当氨基酸浓度过高时, 有些 Cbz 保护氨基酸在 EA 中溶解过慢且容易析出. 因此, 选择氨基端溶液浓度为 0.02857 mmol/mL, 对应的羧基端氨基酸溶液浓度为 0.03428 mmol/mL 进行偶联反应.

2.1.4 偶联反应溶剂的选择 在连续液相合成多肽过程中, 采用萃取除杂的方式, 因而 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 等与水互溶的溶剂首先被排除. 难溶于水的常见溶剂中, 乙酸乙酯、氯仿和二甲基四氢呋喃优良的溶解度能满足偶联反应的需要, 而且没有乳化现象, 能良好地萃取分层, 但乙酸乙酯相对

于氯仿和二甲基四氢呋喃具有更加绿色和经济优势。

基于上述实验数据分析,为保证偶联反应效率,确定了亮丙瑞林连续流动合成中微通道反应器中偶联反应条件:反应温度 70 °C,流速 4 mL/min 即停留时间 10 min,反应液浓度为 0.02857 mmol/mL,物料摩尔比为 1.2,该条件下偶联转化率可以达到 100%。

## 2.2 微通道反应器中氨基酸的萃取效果

在液相多肽合成中,萃取分液是重要的除杂步骤。多肽偶联反应通常将 N 端 Cbz 保护氨基酸稍过量,反应后加入质量分数 5% 的  $K_2CO_3$  水溶液萃取除去多余的 Cbz 保护氨基酸,而且萃取洗涤可以将多余的 EDC·HCl, HOBt 及生成的 EDU 除去。为了考察微通道反应器与釜式反应器中的萃取除杂效果,表 2 对比了部分单个氨基酸在釜式和微通道反应器中的萃取洗涤效率。微通道反应器中萃取条件是反应液与 5%  $K_2CO_3$  水溶液的体积比为 1:2,反应液流速 2 mL/min,5%  $K_2CO_3$  水溶液流速 4 mL/min。釜式反应器中萃取洗涤采用机械搅拌的方式,体积比与微通道反应器的一致,温度均为 30 °C。

Table 2 Comparison of washing in the reaction caldron and washing in the microchannel

| Entry | Amino acid                   | Efficiency of one wash in a reaction caldron( %) | Efficiency of one wash in a microchannel reactor( %) |
|-------|------------------------------|--|--|
| 1     | Z-Pro-OH                     | 100  | 100  |
| 2     | Z-Arg( Boc) <sub>2</sub> -OH | 32.5   | 56.4   |
| 3     | H-Arg( Boc) <sub>2</sub> -OH | 100  | 100  |
| 4     | Z-Leu-OH                     | 100  | 100  |
| 5     | Z-D-Leu-OH                   | 100  | 100  |
| 6     | Z-Tyr( tBu)-OH               | 35   | 52.2   |
| 7     | H-Tyr( tBu)-OH               | 100  | 100  |
| 8     | Z-Ser( tBu)-OH               | 100  | 100  |
| 9     | Z-Trp( Boc)-OH               | 20.2   | 31.6   |
| 10    | H-Trp( Boc)-OH               | 100  | 100  |
| 11    | Z-His( Trt)-OH               | 8.2  | 15.4   |
| 12    | H-His( Trt)-OH               | 100  | 100  |
| 13    | Z-Pyr-OH                     | 100  | 100  |

表 2 结果表明,微通道反应器的萃取除杂效果更优。当遇到 Z-Tyr( tBu)-OH, Z-His( Trt)-OH, Z-Arg( Boc)<sub>2</sub>-OH 和 Z-Trp( Boc)-OH 等难以萃取除去的氨基酸时,采取先脱除 Cbz 保护基再萃取的方式即可除去多余杂质。

## 2.3 连续流动加氢脱 Cbz 保护

首先,尝试在微通道反应器中催化加氢脱 Cbz 保护,将 Pd/C 与反应液打成浆状后,一起进料并一起出料。利用 Pd/C 催化氢解脱保护是一个三相混合的反应,在微通道反应器中流速难以控制,而且会出现堵塞,反应后需要过滤反应液并反复清洗微通道反应器。因此,选择钯碳填料柱连续流动的方式进行加氢脱保护,提高了加氢效率;反应后不需要过滤分离钯碳,通过有机溶剂对钯碳柱进行冲洗后,钯碳柱还可以重复利用,提高了钯碳的利用率。

已知在反应釜中进行加氢反应,温度为 40 °C,氢气压力为 1.0 MPa 时,达到完全脱保护的时间在 4 h 以上;在进行连续流动式柱加氢参数探索时发现,氢气压需要与流速达到一个平衡,液体流速设定的同时调整氢气的压力,随着反应液流速的增加,所需平衡的氢气压力随之增大;为避免液体流入气体管道形成液封,最佳的连续流动式加氢状态是气体与液体同时进入收集罐;实验设定反应液流速 5 mL/min 时,对应氢气压力 0.3 MPa,背压 0 MPa, Z-Pro-NHEt 脱除 Cbz 效率为 39.4%,若增加背压虽能提高转化效果,但气液控制不稳定;设定反应液流速 10 mL/min 时,对应氢气压力 0.55 MPa,背压 0.2 MPa, Z-Pro-NHEt 脱除 Cbz 效率为 100%;设定反应液流速 20 mL/min 时,对应氢气压力 1.6 MPa,背压 0.5 MPa, Z-Pro-NHEt 脱除 Cbz 效率为 76.2%;最终选择反应液流速 10 mL/min,氢气压 0.55 MPa,背压 0.2 MPa,对亮丙瑞林合成进行实验验证,结果列于表 3,反应液于室温下通过钯碳柱 3 个循环基本可以将 Cbz 完全脱除。

Table 3 Continuous flow hydrogenation efficiency

| Step | Peptide  | First-round efficiency( %) | Second-round efficiency( %) | Third-round efficiency( %) |
|------|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1    | Z-Pro-NHEt   | 100                        | —                           | —                          |
| 2    | Z-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt   | 97.3                       | 100                         | —                          |
| 3    | Z-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt   | 91.4                       | 100                         | —                          |
| 4    | Z-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt   | 89.7                       | 100                         | —                          |
| 5    | Z-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt                                   | 94.1                       | 100                         | —                          |
| 6    | Z-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt                         | 92.1                       | 100                         | —                          |
| 7    | Z-Trp( Boc)-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt               | 82.6                       | 100                         | —                          |
| 8    | Z-His( Trt)-Trp( Boc)-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt     | 33.5                       | 76.2                        | 100                        |
| 9    | Z-Pyr-His( Trt)-Trp( Boc)-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc) <sub>2</sub> -Pro-NHEt | 79.6                       | 100                         | —                          |

#### 2.4 亮丙瑞林的合成及与固相合成对比

通过微通道反应器的偶联-萃取和钨碳填料柱的连续流动加氢反应,最终完成了全保护亮丙瑞林的合成,图1(A)给出其对应的谱图分析.与固相合成相比,连续流动液相合成的亮丙瑞林粗肽的纯度更高且杂质更少,更有利于后续制备纯化[图1(B)].与固相合成相比,连续流动液相合成不仅可获得更优的亮丙瑞林粗肽,而且在试剂用量、溶剂选择及反应效率等方面更具有优势:(1)不使用昂贵的树脂,使用分子量更小的Cbz保护基,提高了化学经济效益;(2)不使用管制化学品哌啶,利用钨碳填料柱流动式氢解脱保护,降低碱性环境消旋风险且催化剂可以重复使用;(3)选用低毒溶剂EA代替第二类溶剂DMF且用量大大减少,采用水洗萃取除杂,反应更加绿色;(4)利用HPLC监测反应进程更加客观精确;(5)利用微通道连续流提高了传质传热效率,偶联和萃取效率更佳;(6)采用连续流动钨碳填料柱加氢脱Cbz保护基,提高了加氢效率,操作更加安全、方便.

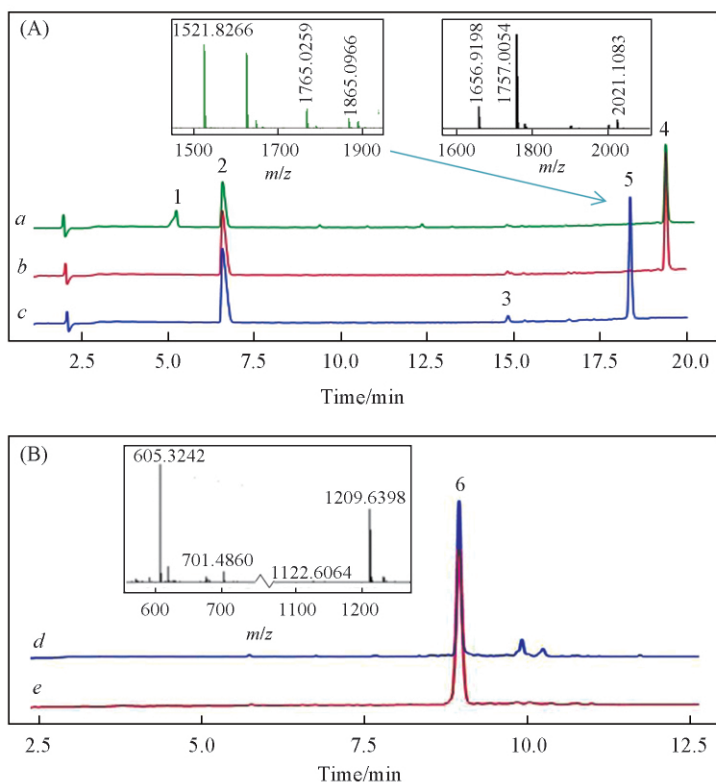


Fig.1 HPLC and ESI-MS( inset) spectra for the synthesis of leuporelin

a. Before washing with 5%( mass fraction)  $K_2CO_3$ ; b. after washing with 5%( mass fraction)  $K_2CO_3$ ; c. after deprotection by hydrogenolysis; d. solid-phase peptide synthesis; e. continuous flow liquid phase synthesis. Peak 1. HOBt; peak 2. ethyl acetate; peak 3. toluene; peak 4. Z-Pyr-His( Trt)-Trp( Boc)-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc)<sub>2</sub>-Pro-NHEt; peak 5. H-Pyr-His( Trt)-Trp( Boc)-Ser( tBu)-Tyr( tBu)-D-Leu-Leu-Arg( Boc)<sub>2</sub>-Pro-NHE; peak 6. crude peptide of leuporelin.

### 3 结 论

采用微通道连续流反应器和钨碳填料柱加氢反应装置连续流动液相合成亮丙瑞林. 考察了连续流动偶联反应的温度、停留时间和浓度对偶联效率的影响, 确定最佳反应温度为 70 °C, 浓度为 0.02857 mmol/mL, 反应停留时间为 10 min, 转化率达到 100%. 利用微通道反应器对反应液萃取除杂, 采用萃取水洗温度为 70 °C, 反应液流速为 2 mL/min, 质量分数为 5% 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液流速为 4 mL/min. 设计连续流动式钨碳填料柱加氢装置脱除苄氧羰基(Cbz) 保护基, 通过调整反应液流速和氢气压力达到稳定的平衡条件, 确定氢气压力 0.55 MPa, 流速 10 mL/min, 背压 0.2 MPa. 与传统多肽合成相比, 本文方法提高了合成效率, 极大地缩短了偶联时间, 提高了萃取除杂效果. 连续流动液相多肽合成是对传统液相合成工艺的创新和突破, 提高了反应效率, 降低了生产成本, 反应更加安全、高效、绿色.

### 参 考 文 献

- [1] Hwang T. L., Ranganathan K., Fang Y. Q., Crockett R. D., Osgood S., Cui S., *Org. Process. Res. Dev.*, **2018**, 22(8), 1007—1014
- [2] Feng H. Y., Gao L., Ye X. H., Wang L., Xue Z. H., Kong J. M., Li L. Z., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2017**, 33(2), 155—159
- [3] Isidro-Llobet A., Kenworthy M. N., Mukherjee S., Kopach M. E., Wegner K., Gallou F., Smith A. G., Roschangar F., *J. Org. Chem.*, **2019**, 84(8), 4615—4628
- [4] Lawrenson S. B., Arav R., North M., *Green Chem.*, **2017**, 19(7), 1685—1691
- [5] Bonnamour J., Métro T. X., Martinez J., Lamaty F., *Green Chem.*, **2013**, 15(5), 1116—1120
- [6] Fan J. H., Bian Y. N., Su X. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2018**, 39(12), 2679—2685(范佳辉, 卞亚楠, 苏贤斌. 高等学校化学学报, **2018**, 39(12), 2679—2685)
- [7] Xu B. F., Yang S., Zhu J. M., Ma Y. D., Zhao G., Guo Y., Xu L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2014**, 30(1), 103—107
- [8] Sakakibara S., *Biopolymers*, **1999**, 51(4), 279—296
- [9] Gravert D. J., Janda K. D., *Chem. Rev.*, **1997**, 97(2), 489—510
- [10] Aihara K., Komiya C., Shigenaga A., Inokuma T., Takahashi D., Otaka A., *Org. Lett.*, **2015**, 17(3), 696—699
- [11] Sheng B. S., Li C., Liu Y. Y., Wang A. J., Wang Y., Zhang J., Liu W. X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2019**, 40(7), 1365—1373(盛炳琛, 李从, 刘颖雅, 王安杰, 王瑶, 张箭, 刘伟旭. 高等学校化学学报, **2019**, 40(7), 1365—1373)
- [12] Tetsu T., Hidekazu O., Shū K., *Nature*, **2015**, 520(7547), 329—332
- [13] Adamo A., Beingessner R. L., Behnam M., Chen J., Jamison T. F., Jensen K. F., Monbaliu J. C. M., Myerson A. S., Revalor E. M., Snead D. R., Stelzer T., Weeranoppanant N., Wong S. Y., Zhang P., *Science*, **2016**, 352(6281), 61—67
- [14] Audubert C., Gamboa M. O. J., Lebel H., *Angew. Chem.*, **2017**, 129(22), 6391—6394
- [15] Cheng D., Chen F. E., *Chemical Industry and Engineering Progress*, **2019**, 38(01), 556—574(程荡, 陈芬儿. 化工进展, **2019**, 38(01), 556—574)
- [16] Gordon C. P., *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, 16(2), 180—196
- [17] Fuse S., Otake Y., Nakamura H., *Chem. Asian J.*, **2018**, 13(24), 3818—3832
- [18] Szloszár A., Fülöp F., Mándity I. M., *Chemistry Select*, **2017**, 2(21), 6036—6039
- [19] Mándity I. M., Olasz B., Ötvös S. B., Fülöp F., *ChemSusChem*, **2014**, 7(11), 3172—3176
- [20] Spare L. K., Laude V., Harman D. G., Aldrich-Wright J. R., Gordon C. P., *React. Chem. Eng.*, **2018**, 3(6), 875—882
- [21] Mijalis A. J., Thomas D. A., Simon M. D., Adamo A., Beaumont R., Jensen K. F., Pentelute B. L., *Nat. Chem. Biol.*, **2017**, 13(5), 464—466
- [22] Nishimura S., Higashi N., Koga T., *J. Polym. Sci. Pol. Chem. Part A: Polym. Chem.*, **2019**, 10(1), 71—76
- [23] Knudsen R. K., Ladlow M., Bandpey Z., Ley S. V., *J. Flow Chem.*, **2014**, 4(1), 18—21
- [24] Mifune Y., Nakamura H., Fuse S., *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14(47), 11244—11249
- [25] Fuse S., Mifune Y., Takahashi T., *Angew. Chem.*, **2014**, 53(3), 851—855
- [26] Elias Y., von Rohr P. R., Bonrath W., Medlock J., Buss A., *Chem. Eng. Process*, **2015**, 95, 175—185
- [27] Avril A., Hornung C. H., Urban A., Fraser D., Horne M., Veder J. P., Tsanaktsidis J., Rodopoulos T., Henry C., Gunasegaram D. R., *React. Chem. Eng.*, **2017**, 2(2), 180—188
- [28] Takashi O., Claudio B., Joel M. H., Steven V. L., *Org. Process Res. Dev.*, **2014**, 18(11), 1560—1566
- [29] Cossar P. J., Hizartidis L., Simone M. I., McCluskey A., Gordon C. P., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13(26), 7119—7130
- [30] Han W., Youn H. J., *Asian Pac. J. Cancer P.*, **2019**, 20(5), 1475—1479
- [31] Fratta P., Nirmalanathan N., Masset L., Skorupinska I., Collins T., Cortese A., Pemble S., Malaspina A., Fisher E. M. C.,

- Greensmith L. , Hanna M. G. , *Eur. Neurol.* , **2014** , 82( 23) , 2077—2084
- [32] Masahiko F. , *Nonapeptide Amide Analogs of Luteinizing Releasing Hormone* , US 4008209( A) , 1977-02-15
- [33] Nicolas E. , Clemente J. , Ferrer T. , Albericio F. , Giralt E. , *Tetrahedron* , **1997** , 53( 9) , 3179—3194
- [34] Zhang J. , Cen T. , Wang A. M. , Zhou C. , Du Z. Q. , Wu X. M. , Shen S. B. , *Chemical Reagents* , **2009** , 31( 6) , 401—404( 张俊 , 岑涛 , 王安明 , 周成 , 杜志强 , 武秀明 , 沈树宝. 化学试剂 , **2009** , 31( 6) , 401—404)
- [35] Cen T. , Zhou C. , Wu X. M. , Jiang B. , Zhu S. M. , Shen S. B. , *Chinese J. Org. Chem.* , **2010** , 30( 6) , 837—842( 岑涛 , 周成 , 武秀明 , 姜波 , 祝社民 , 沈树宝. 有机化学 , **2010** , 30( 6) , 837—842)

## High Efficient and Green Approach to the Synthesis of Leuprolide in Continuous-flow Microreactor<sup>†</sup>

LI Shijie , YANG Yang , CUI Yingying , SU Xianbin<sup>\*</sup>

( College of Chemical Engineering , Nanjing Tech University , Nanjing 210009 , China)

**Abstract** A high efficient and green approach was reported for the synthesis of leuprorelin which is a nonapeptide analogue of gonadotrophin releasing hormone( GnRH) used to treat a wide range of sex hormone-related disorders based on a continuous-flow system. Benzyloxycarbonyl( Cbz) -protected amino acids were used in this approach and coupling reaction was carried out in micro-channel reactors efficiently followed by extraction to remove impurities. A rapid and clean deprotection of Cbz then successfully achieved through hydrogenolysis *via* a column packed with Pd/C catalyst. This approach enabled the stoichiometric amidation of peptide chain elongation and catalytic deprotection hence the consumption of raw materials were dramatically reduced. This new strategy will find more application in peptide manufacturing.

**Keywords** Microchannel reactor; Leuprorelin; Continuous-flow; Liquid phase synthesis

( Ed.: P , H , W , K)

<sup>†</sup> Supported by the State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering of China( No.ZK201311) .