

水/有机相两相体系中 *Saccharomyces cerevisiae* B5 不对称还原制备手性药物中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇的研究

欧志敏^{1*}, 吴坚平², 杨立荣², 岑沛霖² (1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江大学材化学院生物工程研究所, 浙江 杭州 310027)

摘要: 本文对水/有机相两相体系中 *Saccharomyces cerevisiae* B5 催化 2'-氯-苯乙酮不对称还原制备 R-氯丙那林中间体 R-2'-氯-1-苯乙醇进行了详细研究。结果表明, 水/十二烷两相体系还原 2'-氯-苯乙酮可获得较高产率, R-2'-氯-1-苯乙醇的对映体过剩值可达 100% ee, 最佳转化时间为 72h, 证实了在水/有机溶剂两相系统中还原反应的活力倍数与有机溶剂的 $\text{Log}_{\text{P}_{\text{oct}}}$ 值有关
关键词: 水/有机相两相体系; *Saccharomyces cerevisiae* B5; 不对称还原; 手性药物中间体; R-2'-氯-1-苯乙醇

Preparation of chiral pharmaceutical intermediate R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol with the method of *Saccharomyces cerevisiae* B5 asymmetric reduction in water/organic diphasic system

Ou Zhi-min¹, Wu Jian-ping², Yang Li-rong², Cen Pei-lin² (1. *The College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of technology, Hangzhou 310014, China*; 2. *Institute of Biochemical Engineering, College of Material Science and Chemical Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*)

ABSTRACT: The process of preparation of chiral pharmaceutical intermediate R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol with the method of *Saccharomyces cerevisiae* B5 asymmetric reduction in water/organic diphasic system was investigated in detail. The result shows that the higher conversion yield can be gained in water/organic diphasic system than in water single system and the enantiomeric excess of R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol is 100% ee. The best conversion time is 72h. It was confirmed that reduction reaction activity multiple is relate with the $\text{Log}_{\text{P}_{\text{oct}}}$ of organic solvent.

KEY WORDS: water/organic diphasic system; *Saccharomyces cerevisiae* B5; asymmetric reduction; chiral pharmaceutical intermediate; R-2'-chloro-1-phenyl-ethanol

* Email: oozzmm@eyou.com; Tel: 0571-88320803

手性药物是国际新药发展的重要方向之一^[1]。采用生物法制备手性药物及其中间体比化学法生产手性化合物具有更多优势。生物法反应条件温和,立体选择性好,环境友好,可以有效地实现手性化合物的绿色合成^[2]。

采用微生物法还原潜手性化合物可以实现大量手性化合物的制备。潜手性化合物的不对称还原需要大量的还原酶和辅酶,从微生物细胞中分离和提纯酶和辅酶是相当复杂且耗费成本的过程。直接采用含有酶和辅酶的微生物进行还原可以省略了酶和辅酶的分离纯化过程;同时可实现辅酶的原位再生,提高反应效率^[3]。

传统的生物转化反应一般是在水相中进行的。微生物在水相中可以很好生长,同时微生物产生的用于生物转化反应的酶在水相中可以充分发挥活力。然而生物转化过程中许多底物和产物是不溶或难溶于水的有机物,底物在水相中的浓度很低,这将大大降低生物转化反应的速率,有些有机底物或产物对微生物生长还可能存在毒性或对催化生物转化反应的酶存在抑制作用。针对这种情况,考虑采用水/有机相两相体系进行生物转化反应,提高生物转化的效率,消除或减轻底物对生物转化过程的抑制作用,控制反应的立体选择性,有利于实现产物的分离和提取^[4]。

R-2'-氯-1-苯乙醇是制备 R-氯丙那林的重要中间体,本文对水/有机相两相体系中 *Saccharomyces cerevisiae* B5 不对称还原 2'-氯-苯乙酮制备 R-2'-氯-1-苯乙醇的过程进行了详细地研究。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *Saccharomyces cerevisiae* B5

1.1.2 培养基 MYPG 斜面培养基(g/L):麦芽汁 10,酵母粉 3,蛋白胨 5,葡萄糖 10,琼脂 20。液体培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母粉 3,硫酸铵 5,7 H₂O · MgSO₄ 0.5,3 H₂O · K₂HPO₃ 1,KH₂PO₃ 1。

1.1.3 试剂 2'-氯-苯乙酮由 ACROS 公司购得;外消旋的 2'-氯-1-苯乙醇采用硼氢化钠还原 2'-氯-苯乙酮制得^[5];正己烷;环己烷;正庚烷;正辛烷;十二烷;苯;甲苯;乙酸乙酯;1-丙醇;2-丙醇;1-丁醇。

1.1.4 仪器与设备 气相色谱:型号 HP6890,美国惠普公司;超净工作台:苏净集团安泰公司;恒温振荡器:型号 THZ-C,温控范围 10-60℃,调速范围 0~300r. min⁻¹,江苏太仓市实验设备厂;台式离心机:上海安亭科学仪器厂;电子天平:型号 AB204-E,瑞典。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养 从斜面挑一环接种于 100mL 的液体培养基中,置于 30℃ 摇床(160r/min)培养 24h,获得种子;取 10mL 种子培养液转接到 100mL 的液体培养基中,放入摇床中继续培养 24h,收获的菌体即可用于生物转化。

1.2.2 还原反应 将 1.2.1 中获得的菌液取出干重为 43mg 菌液离心分离,沉淀用 0.85% 的生理盐水洗涤两次,将洗涤后的菌体加入到 20mLpH8.0 的磷酸缓冲液(0.1mol/L)和一

定量的有机溶剂中,加入 60mg(约为 19.4mM)2'-氯-苯乙酮和 1mL 乙醇,放入 30℃ 摇床(160r/min)中反应 96h。

1.2.3 分析方法 反应结束后,用 HP6890 气相色谱仪分析有机相层中产物的含量。色谱柱采用手性柱,型号为 HP Chiral 10% β-Cyclodextrin(30m × 0.32mm × 0.25μm);检测条件:载气为氮气,进样器、色谱柱和检测器温度分布为 250℃、130℃ 和 250℃;分流比为 1:100;进样量为 0.1μL;氢离子火焰检测器;以十六烷为内标的内标法进行检测。

1.2.4 活力倍数的计算方法

活力倍数 = $\frac{A}{B}$

式中,A:*S. cerevisiae* B5 在水/有机溶剂两相体系中还原 2'-氯-苯乙酮的还原产率;B:*S. cerevisiae* B5 在水相中还原 2'-氯-苯乙酮的还原产率。

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂对细胞活性的影响

在由水和 11 种有机溶剂构成的两相体系中,以 *S. cerevisiae* B5 不对称还原 2'-氯-苯乙酮为研究对象,测定了 11 种有机溶剂对 *S. cerevisiae* B5 还原能力的影响结果见表 1。实验数据表明:*S. cerevisiae* B5 在水/正己烷、水/正庚烷、水/正辛烷和水/十二烷四种水/有机溶剂两相体系中的催化活性分别是 *S. cerevisiae* B5 在水中催化活性的 3.4、3.5、4.0 和 10.8 倍。其中,水/十二烷体系对于提高 *S. cerevisiae* B5 转化 2'-氯-苯乙酮的能力最佳。

表 1 水/有机溶剂两相体系中 *S. cerevisiae* B5 的还原活力
Tab 1 Reductive activity of *S. cerevisiae* B5 in water/organic solvent diphasic system system

溶剂	Log _{P_{oct}}	产率 (%)	R-2'-氯-1-苯乙醇对映体过剩值 (%)	活力倍数
水	-	0.8	100%	1.0
正己烷	3.4	2.7	100%	3.4
环己烷	1.5	0.4	100%	0.5
正庚烷	4	2.8	100%	3.5
正辛烷	4.5	3.2	100%	4.0
十二烷	6.6	8.6	100%	10.8
苯	2	0	/	0
甲苯	2.5	0	/	0
乙酸乙酯	0.68	0	/	0
1-丙醇	0.28	0	/	0
2-丙醇	0.28	0	/	0
1-丁醇	0.8	0	/	0

2.2 活力倍数和溶剂疏水性的关系

将表 1 中的活力倍数与相应有机溶剂的 Log_{P_{oct}} 值作图,结果见图 1。结果表明采用 Log_{P_{oct}} 值越大的溶剂为有机相获得的还原活力倍数越高。在 Log_{P_{oct}} 值小于 3 的溶剂中,*S. cerevisiae* B5 完全不具有还原 2'-氯-苯乙酮的能力;在 Log_{P_{oct}} 值在 3~4 的中等极性溶剂中 *S. cerevisiae* B5 具有较

好活力;在 Log_{Poct} 值大于4 的弱极性或非极性溶剂中 *S. cerevisiae* B5 具有较高的还原活力。

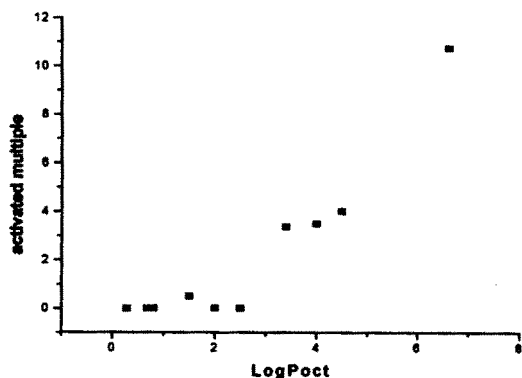


图1 水/有机溶剂两相体系中 *S. cerevisiae* B5 的还原活力倍数与 Log_{Poct} 值的关系

Fig 1 Relationship of activated multiple with Log_{Poct} in water/organic solvent diphasic system

2.3 水/十二烷两相体系中十二烷含量对2'-氯-苯乙酮还原产率的影响

在水/十二烷两相体系中,十二烷的含量对 *S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮的产率有显著影响。图2表明:十二烷在反应介质中的体积比为10%时,*S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮的效果最好,随着反应体系中十二烷含量增加还原产率值降低,最佳十二烷含量为10%(体积比)。

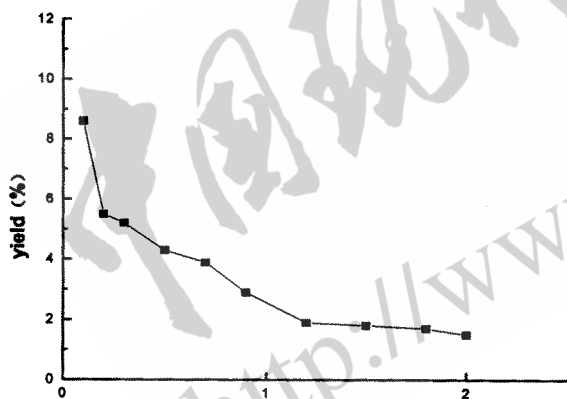


图2 水/十二烷两相体系中十二烷含量对 *S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮产率的影响

Fig 2 Effect of the content of dodecane on the yield with *S. cerevisiae* B5 to reduce 2'-chloroacetophenone in water/dodecane diphasic system system

2.4 水/十二烷两相体系中 *S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮的时间进程

在水/十二烷两相体系中,采用 *S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮(19.4mmol/L),每隔24h 取样分析得到了产率随时间变化的曲线,如图3。反应时间在72h 以前,产率随时间

的延长而增加,当反应时间继续延长产率基本保持不变。确定72h 为最佳反应时间。

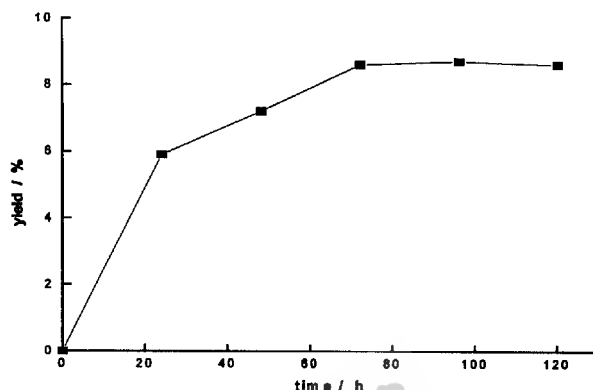


图3 水/十二烷两相体系中 *S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮的时间进程

Fig 3 Time course of reduction of 2'-chloroacetophenone with *S. cerevisiae* B5 in water/dodecane diphasic system

3 结论

在实验所用的反应体系中,水/十二烷两相体系对 *S. cerevisiae* B5 不对称还原2'-氯-苯乙酮的效果最佳。在水/十二烷两相体系中,*S. cerevisiae* B5 还原2'-氯-苯乙酮的最佳反应时间为72h。证实了在水/有机溶剂两相系统中还原反应的活力倍数与有机溶剂的 Log_{Poct} 值有关。在 Log_{Poct} 值小于3 的溶剂中,*S. cerevisiae* B5 完全不具有还原2'-氯-苯乙酮的能力;在 Log_{Poct} 值在3~4 的中等极性溶剂中 *S. cerevisiae* B5 具有较好活力;在 Log_{Poct} 值大于4 的弱极性或非极性溶剂中 *S. cerevisiae* B5 具有较高的还原活力。

参考文献

- [1] 魏志亮,李祖义,林国强. 生物还原反应在手性药物不对称合成中的应用. 有机化学,2001,21(6):403.
- [2] 褚志义. 生物合成药理学. 北京:化学工业出版社,2000,9.
- [3] Goswami A, Bezbaruah R L, Goswami J, Borthakur N, Dey D, Hazarika A K. Microbial reduction of ω -bromoacetophenones in the presence of surfactants. Tetrahedron: Asymmetry, 2000,11: 3701.
- [4] Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for the optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 1987, 30: 81.
- [5] Shimizu S, Kataoka M, Katoh M *et al.* Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by a microbial aldehyde reductase in an organic solvent water diphasic system, Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(3):2374.

收稿日期:2004-07-16