

离子液体中扁桃酸乙酯的酶促不对称水解

王 焱, 高 静¹⁾, 周丽亚, 王海鸥, 贺 莹, 卢 珂

(河北工业大学 化工学院, 天津 300130)

摘 要: 对脂肪酶在离子液体中不对称水解扁桃酸乙酯制备 R-扁桃酸进行了研究, 发现脂肪酶 N435 在离子液体 [BMIM]Br 中的活性和立体选择性最高. 研究了离子液体浓度、底物浓度、反应时间、反应温度、缓冲液 pH 值和摇床转速等因素对反应的影响, 适宜反应条件为: 1.39 mol/L DL-扁桃酸乙酯、1.71 mol/L [BMIM]Br、Tris-HCl 缓冲液 pH7.5、10 mg N435 酶、30 ℃、150 r/min 反应 6 h, 该条件下产物对映体过量值(ee)可达 58.78%, 产率为 65.23%, 并对离子液体进行了重复利用.

关 键 词: 离子液体; 扁桃酸乙酯; R-扁桃酸; 酶促反应; N435

中图分类号: O643.32

文献标识码: A

扁桃酸(Mandelic Acid, 2-羟基苯乙酸), 又名苦杏仁酸, 具有两种光学异构体. 其中 R-扁桃酸及其衍生物是一类重要的手性砌块, 是许多药物如半合成青霉素、头孢菌素等制备的重要中间体, 也是合成许多血管扩张剂、杀菌剂和镇静剂等的重要物质, 被广泛应用于药物合成及立体化学的研究领域^[1, 2]. 离子液体是一类在室温或接近室温呈液态的有机熔融盐, 一般由有机阳离子和无机阴离子组成. 它没有明显的蒸汽压即不挥发, 易于与其它物质分离, 可循环利用^[3~5]. 酶促反应条件温和, 易于操作, 具有极高的催化效率. 近年来研究发现, 某些酶在特定的离子液体中能够表现出比在有机溶剂中更好的催化活性和稳定性, 同时酶的立体选择性也得到了提高^[6~9].

目前已有在有机溶剂中拆分的研究^[10, 11]. 高静^[11]等研究了在叔丁醇中酶促不对称水解扁桃酸乙酯, 反应 24 h, 产率达到 41.6%, 产物 ee 值 84.0%. 然而未见有在离子液体中拆分扁桃酸的详细报道. 娄文永^[8]等在离子液体中利用脂肪酶催化立体选择性水解外消旋体苯甘氨酸甲酯, 研究发现同几种典型的有机溶剂相比, 酶 N435 在四氟硼酸离子液体中有较好的活性和立体选择性. 本文研究了在离子液体中酶促不对称水解扁桃酸乙酯制备 R-扁桃酸.

1 实验部分

1.1 水解反应及分离

取 0.2 g DL-扁桃酸乙酯(北京百灵威化学技术有限公司, 93%)于 50 mL 锥形瓶中, 加入 5.0 mL、pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液(华生生物科技有限公司, 99%)、1.5 g 离子液体和 10 mg 的酶, 于水浴振荡器(HZS-H 型, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)中 50 ℃、150 r/min 条件下反应 6 h. 反应结束后, 过滤除酶, 旋转蒸发(RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂)除水及乙醇, 加入乙酸乙酯萃取, 萃余液为离子液体, 回收; 萃取液旋转蒸发除去溶剂, 用正己烷溶解, 未溶解的是扁桃酸, 溶解的是扁桃酸乙酯.

1.2 衍生化反应

目前绝大多数手性色谱柱在一般条件下分析扁桃酸时都存在严重的拖尾, 分析效果不佳, 必须经过衍生化处理后才能获得良好的分析效果. 取水解得到的扁桃酸, 加入 200 μ L 的三甲基氯硅烷^[12](成都市科龙化工试剂厂, 化学纯)和过量的甲醇, 于水浴振荡器中 30 ℃、150 r/min 反应 24 h, 得到扁桃酸甲酯.

1.3 分析方法

立体选择性是酶催化反应的重要特性, 用对映

收稿日期: 2008-01-24; 修回日期: 2008-04-24.

基金项目: 天津市自然科学基金项目(08JCYBJC02400); 河北省自然科学基金项目(B2008000028).

作者简介: 王 焱, 男, 1983 年生, 硕士生.

1) 通讯联系人, Tel: (022)60204293; Fax: (022)26564294; E-mail: jgao@hebut.edu.cn.

体过量值(ee)定量描述反应中的立体选择性. $ee = (C_R - C_S) / (C_R + C_S)$, 其中 C_R 、 C_S 分别为 R-扁桃酸和 S-扁桃酸的摩尔浓度.

用高效液相色谱法(Agilent1100 高效液相色谱, 安捷伦科技有限公司)测定 ee 值. 采用 CHIRALCEL OD-H 柱(DAICEL), 流动相为正己烷/异丙醇(90/10 V/V), 流速为 0.5 mL/min, 紫外检测器波长为 220 nm. R、S 型扁桃酸乙酯和 R、S 型扁桃酸甲酯(sigma 公司, 97%)的保留时间分别为: 16.46 min、11.35 min、19.19 min 和 13.25 min.

2 实验结果及讨论

2.1 酶和离子液体的筛选

按照上述水解反应, 对酶 N435(固定化南极假

丝酵母脂肪酶 B, sigma 公司)、CRL(玫瑰假丝酵母脂肪酶 *Candida Rugosa* lipase, sigma 公司)、TLIM(嗜热真菌脂肪酶, sigma 公司)及 Pepsin(胃蛋白酶, 华生生物科技有限公司)和离子液体[BMIM]Br(1-丁基-3-甲基咪唑溴盐, 98%, 杭州科默化学有限公司)、[BMIM]BF₄(1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐, 合成级, 河南利华制药有限公司)、[BMIM]PF₆(1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐, 合成级, 河南利华制药有限公司)及[OMIM]PF₆(1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐, 98%, 北京百灵威化学技术有限公司)进行了筛选, 结果见表 1. 综合来看酶 N435 在[BMIM]Br 中的效果最好. 原因可能是不同的离子液体使酶的构象发生不同的变化, 从而改变酶的立体选择性. 故以后的实验选用酶 N435 和

表 1 几种酶在不同离子液体中的立体选择性

Table 1 Enantioselectivity of enzymes in different ionic liquids

	N435		CRL		TLIM		Pepsin	
	ee (%)	Y (%)	ee (%)	Y (%)	ee (%)	Y (%)	ee (%)	Y (%)
H ₂ O	2.18	79.51	0.41	19.52	5.35	19.23	4.83	32.42
[BMIM]Br	35.15	77.55	3.17	16.51	6.62	33.06	8.75	25.38
[BMIM]BF ₄	11.79	25.63	1.48	17.22	5.72	53.95	4.62	26.19
[BMIM]PF ₆	20.25	35.89	1.78	68.31	0.56	20.66	10.11	42.52
[OMIM]PF ₆	1.43	50.68	0.91	43.72	0.87	9.08	1.03	45.27

Reaction conditions: 0.2 g DL-Ethyl mandelate, 5.0 mL pH7.5 buffer, 1.0 mL ionic liquid and 10 mg enzyme;
50 ℃、150 r/min for 6 h

[BMIM]Br.

2.2 离子液体浓度的影响

筛选得到的离子液体为亲水性的, 因此有必要考察离子液体浓度对酶催化活性和立体选择性的影响. 由图 1 可以看出: 随着离子液体浓度的增加,

产物 ee 逐渐增加, 离子液体浓度 1.71 mol/L 时产物 ee 达到最高 35.06%, 此时产率 72.56%. 再接着增加离子液体浓度, ee 值和产率变化不大. 这也说明了[BMIM]Br 影响了 N435 活性位点的构象, 使酶立体选择性更高, 随着离子液体浓度的增加, 这种影响也逐渐增大. 综合考虑适宜离子液体浓度为 1.71 mol/L.

2.3 底物浓度的影响

考察了不同底物浓度(0.14 ~ 0.42 mol/L)对反应的影响. 由图 2 可以看出, 随着产物 ee 值的升高, 产率却呈现下降的趋势, 说明酶 N435 的催化活性同其立体选择性之间可能存在相互抑制. 底物浓度为 0.35 mol/L 时, 产物 ee 最高 43.92%, 此时产率 66.01%. 本实验以拆分为目的, 故底物用量以 0.35 mol/L 为宜.

2.4 反应时间的影响

反应时间的延长会提高反应的产率, 但往往随着 R 型底物的减少, S 型底物的水解速率就会增加, 导致选择性下降. 由图 3 可以看出, 反应时间

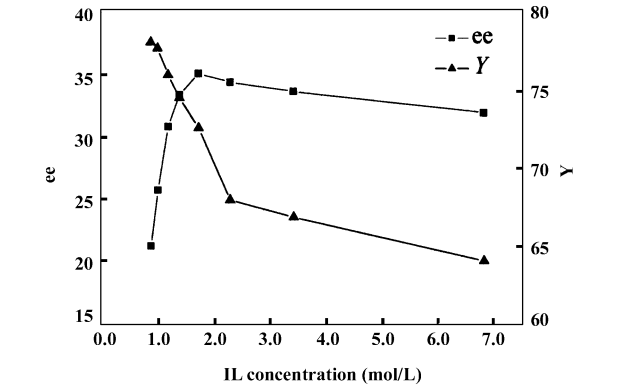


图 1 离子液体浓度的影响

Fig. 1 Effect of ionic liquid concentration on reaction
Reaction conditions: 0.28 mol/L DL-Ethyl mandelate,
pH7.5 buffer and 10 mg N435; 50 ℃、150 r/min for 6 h

超过 6 h 后，产物 ee 迅速下降，故反应时间以 6 h

时达到最高. 温度以 30 ℃ 为宜.

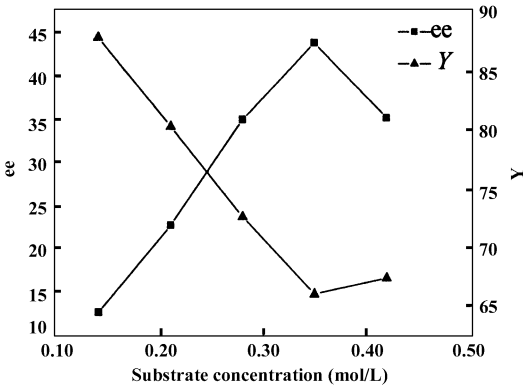


图 2 底物浓度的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on reaction

Reaction conditions: 1. 71 mol/L [BMIM]Br,
pH7.5 buffer and 10 mg N435;
50 ℃、150 r/min for 6 h

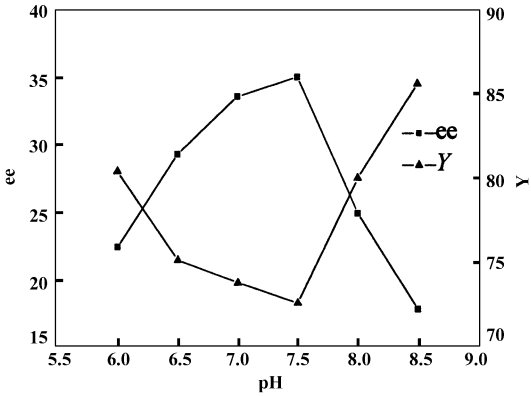


图 4 pH 的影响

Fig. 4 Effect of pH on reaction

Reaction conditions: 0. 28 mol/L DL-Ethyl mandelate,
1. 71 mol/L [BMIM]Br and 10 mg N435;
50 ℃、150 r/min for 6 h

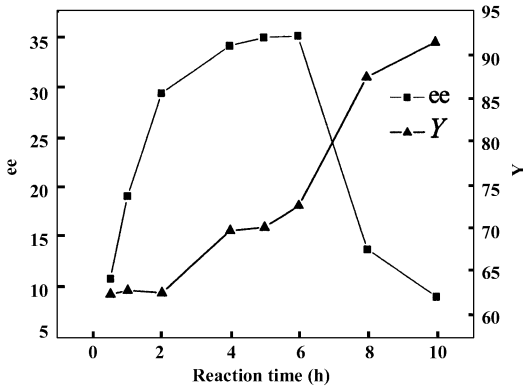


图 3 反应时间的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on reaction

Reaction conditions: 0. 28 mol/L DL-Ethyl mandelate,
pH7.5 buffer, 1. 71 mol/L [BMIM]Br and 10 mg N435;
50 ℃、150 r/min

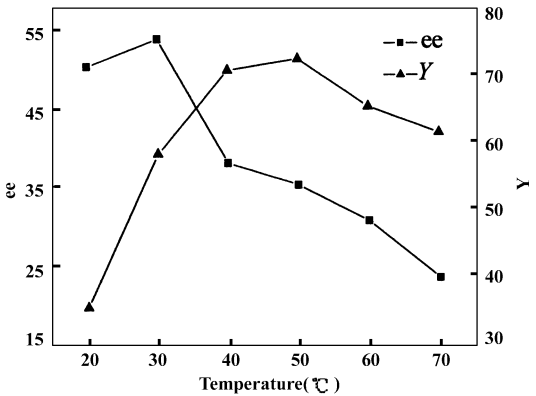


图 5 温度的影响

Fig. 5 Effect of temperature on reaction

Reaction conditions: 0. 28 mol/L DL-Ethyl mandelate,
pH7.5 buffer, 1. 71 mol/L [BMIM]Br and 10 mg N435;
150 r/min for 6 h

2.5 pH 值的影响

pH 可以影响酶的活性和立体选择性. 由图 4 可以看出, pH 为 7.5 时, 产物 ee 最高, 且产物 ee 的变化曲线同产率的变化曲线具有很好的对称性, 这进一步说明了酶 N435 的催化活性同立体选择性相互抑制, 即催化活性高时, 立体选择性较差; 反之亦然. 因此, 缓冲液 pH 以 7.5 为宜.

2.6 温度的影响

温度不仅影响酶的稳定性, 还直接影响酶的催化活性. 由图 5 可以看出, 温度对反应的影响很大, 低温时, 产物 ee 和产率均随温度升高而增大, 温度大于 30 ℃, ee 迅速降低, 但产率继续上升, 50 ℃

2.7 摇床转速的影响

摇床转速直接影响反应的传质, 选择合适的转速不仅可以达到反应所需的传质效果, 而且能够降低能耗. 由图 6 可以看出, 转速达到 150 r/min 之后时, 产率基本保持不变, 可知此时不受传质因素的限制; 考虑到能耗, 转速以 150 r/min 为宜, 此时产物 ee 为 35.06%, 产率为 72.56%.

2.8 最优反应条件的确定

根据上述实验, 得到最适宜的反应条件是: 0.35 mol/L DL-扁桃酸乙酯、1.71 mol/L [BMIM] Br、Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5、10 mg N435 酶、30 ℃、150 r/min 反应 6 h. 在该反应条件下产物 ee 为

58.78%, 产率为 65.23%.

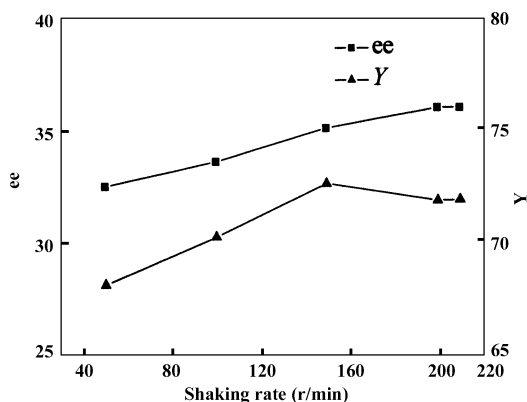


图6 摇床转速的影响

Fig.6 Effect of shaking rate on reaction

Reaction conditions: 0.28 mol/L DL-Ethyl mandelate, pH7.5 buffer, 1.71 mol/L [BMIM]Br and 10 mg N435; 50 °C for 6 h

2.9 [BMIM]Br 的重复利用

乙酸乙酯洗涤回收的离子液体, 旋转蒸发除去离子液体中残留的乙酸乙酯和水分. 用回收的离子液体进行水解反应, 产物 ee 为 31.72%, 产率为 75.26%. 可见离子液体是可以重复使用的, 但结果有所降低, 是因为 [BMIM]Br 吸湿性较强, 回收的离子液体中残留的少量水分很难彻底除去, 因而重复使用时实际离子液体浓度偏低.

3 结 论

通过研究, 找到了适合选择性水解扁桃酸乙酯制备 R-扁桃酸反应的酶和离子液体, 并考察了离子液体浓度、底物浓度、反应时间、pH、温度和摇床转速对反应的影响, 确定了适宜的反应条件. 结果表明, 采用以离子液体 [BMIM]Br 为反应介质, 可以提高酶 N435 水解扁桃酸乙酯的立体选择性; 同在叔丁醇介质中拆分相比, ee 值有所降低但产率大幅上升, 并且反应时间缩短了 1/4; 由于离子液体的循环使用, 该方法更符合可持续发展的战略目标.

参考文献:

- [1] Mill J, Schmiegel K K, Shaw W N. US, 4391826[P]. 1983
- [2] Sarananan P, Singh V K. *Tetrahedron Lett.* [J], 1998, **39**: 167 ~ 170
- [3] Li Ru-Xiong (李汝雄). Research and Application on

Green Solvent-the Ionic Liquid (绿色溶剂-离子液体的合成与应用). Bei Jing(北京): Chemical and Industrial Press(化学工业出版社) [M]. 2004. 20 ~ 38

- [4] Wang Peng(王 鹏), Gao Jin-sen(高金森), Wang Da-xi(王大喜), *et al. J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(3): 278 ~ 283
- [5] Shao Li-li(邵丽丽), Wang Wen-juan(王雯娟), Peng Hui-qi(彭惠琦), *et al. J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2007, **21**(6): 520 ~ 524
- [6] Xin Jia-Ying(辛嘉英), Zhao Yong-Jie(赵永杰), Shi Yan-Guo(石彦国), *et al. Chin. J. Catal.* (催化学报) [J], 2005, **26**(2): 118 ~ 122
- [7] Wang Yong-Ze(王永泽), Mei Le-He(梅乐和), Zhong Chun-Long(钟春龙), *et al. Chin. J. Catal.* (催化学报) [J], 2006, **27**(9): 799
- [8] Lou Wen-Yong, Zong Min-Hua, Liu Yu-Ying, *et al. J. Biotechnol.* [J], 2006, **125**: 64 ~ 74
- [9] Yan Xiang-hui(严祥辉), Xue Ping(薛 屏), Lu Guan-zhong(卢冠忠). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20**(5): 473 ~ 481
- [10] Ganapati D Yadav, P Sivakumar. *Biochem. Engineer. J.* [J], 2004, **19**: 101 ~ 107
- [11] Gao Jing(高 静), He Ying(贺 莹), Jiang Yan-Jun(姜艳军). *J. Chem. Indus. Engineer. (China)* (化工学报) [J], 2006, **57**(12): 2 926 ~ 2 932
- [12] Huang Han-rong, Xu Jian-he, Xu Yi, *et al. Tetrahedron: Asymmetry* [J], 2005, **16**: 2 113 ~ 2 117
- [13] Zhao Yong-Jie(赵永杰), Xin Jia-Ying(辛嘉英), Li Zhen(李臻), *et al. J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2004, **18**(1): 6 ~ 9

Enzyme-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis of Ethyl Mandelate in Ionic Liquids

WANG Yao, GAO Jing, ZHOU Li-ya, WANG Hai-ou, HE Ying, LU Ke

(*School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China*)

Abstract: Enantioselective hydrolysis of ethyl mandelate was studied by using kinds of enzymes in ionic liquids. N435 exhibited excellent activity and enantioselectivity in the system containing [BMIM]Br compared to several other enzymes and ionic liquids tested. Effects of various parameters such as ionic liquid concentration, substrate concentration, reaction time, reaction temperature, pH and shaking rate were studied. The optimum substrate concentration, ionic liquid concentration, pH, enzyme loading, reaction temperature, shaking rate and reaction time were 0.35 mol/L, 1.71 mol/L [BMIM]Br, pH 7.5, 10 mg N435, 30 °C, 150 r/min, and 6 h, respectively, under which the enantiomeric excess(ee) and yield of production could reach 58.78% and 65.23%, respectively. The ionic liquid [BMIM]Br was reused by purifying with ethyl acetate.

Key words: Ionic liquids; Ethyl mandelate; R-mandelic acid; Enzyme-catalysis; N435