

有机相中利用脂肪酶催化的醇解反应拆分烯丙醇酮乙酸酯

程咏梅, 吴坚平, 徐 刚, 杨立荣

浙江大学化学工程与生物工程系, 浙江杭州 310027

摘要: 研究了有机相中脂肪酶催化的烯丙醇酮乙酸酯的立体选择性醇解反应, 考察了碱的种类、酰基受体和溶剂等对反应的影响。结果表明, 以四氢呋喃为溶剂, CH₃OH 为酰基受体, Lipase PLG 脂肪酶为催化剂, Na₂CO₃ 为碱性添加剂, 高底物浓度下 40 °C 反应 96 h 后, 底物转化率和产物 ee 值分别达到 49.5% 和 99.5%。碱的添加极大地提高了反应速度。

关键词: 脂肪酶; 烯丙醇酮; 烯丙醇酮乙酸酯; 醇解; 碱性添加剂

中图分类号: O643/Q55

文献标识码: A

Kinetic Resolution of (*RS*)-4-Hydroxy-3-methyl-2-(2'-propynyl)-2-cyclopentenone Acetate by Lipase-Catalyzed Alcoholysis in Organic Media

CHENG Yongmei, WU Jianping, XU Gang, YANG Lirong*

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China

Abstract: Kinetic resolution of (*RS*)-4-hydroxy-3-methyl-2-(2'-propynyl)-2-cyclopentenone (HMPC) acetate was carried out successfully by lipase-catalyzed alcoholysis in organic media. Using tetrahydrofuran as the solvent, methanol as the acyl acceptor, and lipase PLG as the catalyst, the conversion of substrate and the ee value of product were 49.5% and 99.5%, respectively, after 96 h reaction at 40 °C and high substrate concentration. It is noteworthy that basic additives can significantly promote the reaction.

Key words: lipase; (*RS*)-4-hydroxy-3-methyl-2-(2'-propynyl)-2-cyclopentenone; (*RS*)-4-hydroxy-3-methyl-2-(2'-propynyl)-2-cyclopentenone acetate; alcoholysis; basic additive

拟除虫菊酯是一类具有显著杀虫活性的杀虫剂^[1,2], 结构中醇基的改变会影响其活性。自烯丙菊酯(人工合成的天然除虫菊酯-I)被发现以来, 人们进行了大量的研究, 尤其是对于醇基为烯丙醇酮的酯^[3~5]。许多除虫菊酯如烯丙菊酯正是通过对结构中的醇基进行修饰而获得的。烯丙醇酮(4-羟基-3-甲基-2-(2'-烯丙基)-2-环戊烯酮)是合成手性烯丙菊酯的重要中间体, 其杀虫活性主要来源于(*S*)-烯丙醇酮^[6~8]。手性纯(*S*)-烯丙醇酮可通过环戊烯酮醇重排^[9]或者酶或微生物催化(*RS*)-烯丙醇酮乙酸酯水解获得。当采用微生物来催化该反应时, 即便底物浓度较低, 也无法同时获得较高的底物转化率和产物对映体过量值。而酶催化反应由于反应条件温和、反应

易控制而受到人们广泛的重视。Mitsuda 等^[10,11]采用 *Arthrobacter* 脂肪酶催化(*RS*)-烯丙醇酮乙酸酯的水解反应, 在较高底物浓度下得到手性纯(*R*)-烯丙醇酮, 转化率接近 50%。

脂肪酶催化醇解反应是一种动力学拆分消旋化化合物的有效方法^[12]。与酶催化水解相比, 它可省去后处理中从水相萃取有机产物和剩余底物的步骤。因此本文研究了脂肪酶催化醇解反应动力学拆分(*RS*)-烯丙醇酮乙酸酯。

1 实验部分

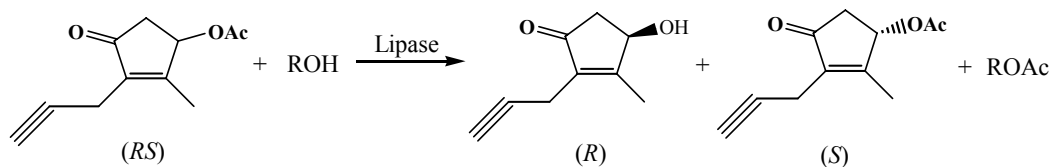
1.1 醇解反应

脂肪酶催化醇解动力学拆分(*RS*)-烯丙醇酮乙

收稿日期: 2009-08-29.

联系人: 杨立荣. Tel/Fax: (0571)87952363; E-mail: lryang@zju.edu.cn; cymhope@zju.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金(20606030); 国家自然科学基金重点项目(20936002); 国家高技术研究发展计划(863 计划, 2006AA02Z238); 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2009CB724706).



图式 1 脂肪酶催化醇解动力学拆分 (RS)-炔丙醇酮乙酸酯

Scheme 1. Lipase-catalyzed kinetic resolution of (RS)-4-hydroxy-3-methyl-2-(2'-propynyl)-2-cyclopentenone ((RS)-HMPC) acetate by alcoholysis.

酸酯的反应如图式 1 所示. 反应在 25 ml 封闭的三角瓶中进行. 典型反应条件为: 5 ml 溶剂(分析纯, 分子筛脱水后使用), 10% (w/v) (RS)-炔丙醇酮乙酸酯(约 520 mmol/L, 常州康美化工股份有限公司), 等摩尔量酰基受体(分析纯, 分子筛脱水后使用), 10 mg/ml 脂肪酶(Lipase PLG, 来源于 *Alcaligenes* sp., 购自 Meito Sangyo 公司, 水解活力为 100 000 U/g), 40 °C, 转速 220 r/min. 间隔取样分析.

1.2 产物分析

采用 Fuli 9790 型气相色谱仪(温岭福立分析仪器有限公司)分析样品中各组分含量, 10% 甲基 β -环糊精手性柱. 色谱条件为: 气化温度 230 °C, 检测温度 230 °C, 柱温 115 °C, 载气 N_2 流速为 45 ml/min. *R* 酯、*S* 酯、*S* 醇和 *R* 醇对应的保留时间分别为 12.890, 13.673, 25.373 和 26.515 min.

根据反应初始阶段(转化率小于 5%)单位时间内产物的增加量计算初始反应速率. 底物对映体过量值 $ee_S = (c_{SS} - c_{SR}) / (c_{SR} + c_{SS}) \times 100\%$, 产物对映体过量值 $ee_P = (c_{PR} - c_{PS}) / (c_{PR} + c_{PS}) \times 100\%$, 转化率由 $ee_S / (ee_S + ee_P) \times 100\%$ 计算得到. 式中 c_{SS} , c_{SR} , c_{PR} 和 c_{PS} 分别为 *S* 醇、*R* 醇、*R* 酯和 *S* 酯的含量.

2 结果与讨论

2.1 溶剂和碱添加剂对反应的影响

在非水相的生物催化中, 溶剂对反应速率和选择性影响均很大. 在本文中, 由于底物炔丙醇酮乙酸酯为固相物质, 它在非极性溶剂如正己烷、苯等溶剂中溶解度极低, 在甲苯、二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷等溶剂中溶解度稍高, 为 5% (w/v) 左右, 而在四氢呋喃中溶解度则大于 20% (w/v), 所以初始选择甲苯、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷和四氢呋喃等为溶剂进行反应. 但在 1.1 节中所述的典型条件下反应 96 h 后, 基本上没有检测到产物. 鉴于此催化剂在催化其它仲醇乙酸酯的醇解反应中性能较高^[7], 故暂可排除催化剂

对底物无催化效果的可能性. 由于酶具有 pH 记忆效应, 其催化活性与冻干前的水相 pH 相关^[13,14], 反应体系的酸碱度接近其最适 pH 时活性较高. 因此使用一些添加剂来调整反应体系的酸碱度或许可促进催化反应的进行^[15~17]. 鉴于四氢呋喃不仅对底物溶解性好, 而且作为醇解反应的溶剂性能也较好^[12], 因此以下实验都选用四氢呋喃为反应介质.

由于有机相中的 pH 很难测定和控制, 故先选择添加几种有机或无机碱来定性考察体系酸碱度对催化反应的影响, 结果见表 1. 由表可见, 添加少量的三乙胺, 反应性能明显改善, 反应 96 h 后底物转化率和底物 *ee* 值分别达到 48.5% 和 94.1%, 产物 (*R*)-炔丙醇酮的 *ee* 值接近 100%, 这与文献报道基本相符^[18~20]. 六氢吡啶的添加对催化反应有一定的促进作用, 但添加吡啶时无反应活性. 添加无机碱如碳酸氢钠和碳酸钠的效果也非常明显, 特别是碳酸钠的加入使得反应 96 h 后底物转化率和底物 *ee* 值分别达到了 49.5% 和 98.1%, 产物 *ee* 值接近 100%.

表 1 碱性添加物对炔丙醇酮乙酸酯的醇解反应的影响
Table 1 Effect of basic additives on the lipase-catalyzed alcoholysis of (RS)-HMPC acetate

Additive	<i>ee</i> _S (%)	Conversion (%)	<i>ee</i> _P (%)
Triethylamine	94.1	48.5	> 99.5
Hexahydropyridine	63.9	39.0	> 99.5
Pyridine	0	0	—
Sodium carbonate	98.1	49.5	> 99.5
Sodium hydrogen carbonate	71.8	41.8	> 99.5

Reaction conditions: (RS)-HMPC acetate 520 mmol/L, methanol 520 mmol/L, lipase PLG 10 mg/ml, tetrahydrofuran (THF) 5 ml, additive 10 mg/ml, rotation speed 220 r/min, 40 °C, 96 h. *ee*_S: enantiomeric excess of substrate; *ee*_P: enantiomeric excess of product.

综上所述, 有机碱和无机碱的添加明显促进了反应的进行, 但其促进作用究竟是通过直接作用于脂肪酶, 还是通过调节反应体系的酸碱性能得以实现的并不确定. 为此本文设计了以下实验: 首先在反应体系中加入碳酸钠(20 mg/ml)固体粉末, 在设定反应

条件下放置一定时间后过滤除去碳酸钠, 再加入脂肪酶反应 72 h. 该操作过程中避免了碳酸钠与脂肪酶接触, 确保碳酸钠对脂肪酶没有直接影响. 反应体系经碳酸钠预处理不同时间后对反应的影响见图 1. 可以看出, 底物转化率均在 45% 以上, 而产物 ee 值均在 99.5% 以上. 可见, 用碳酸钠对反应体系进行预处理与在反应体系中直接添加碳酸钠达到了相同的效果, 因此可以认为添加物对反应的促进作用是通过调节体系的酸碱环境实现的. 酸碱环境的变化可引起酶蛋白表面电离状态的变化^[13,14], 进而影响酶的催化活性. 由于不同碱在有机相中的酸碱性质不同, 因而对脂肪酶活性的影响不同. 鉴于添加碳酸钠的易操作性和高效性, 下述反应中均选择碳酸钠为碱性添加剂.

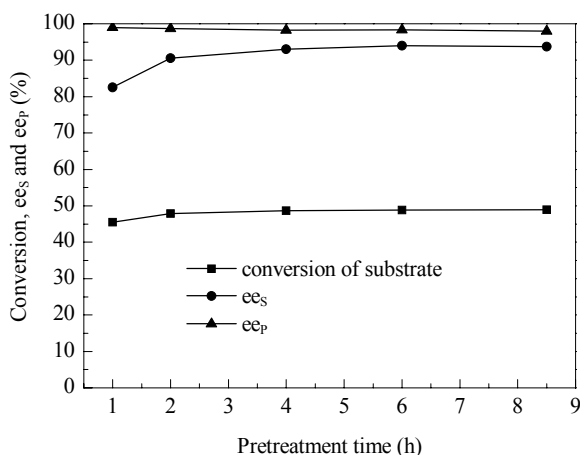


图 1 碳酸钠预处理反应体系时间对反应的影响

Fig. 1. Effect of pretreatment time by Na_2CO_3 on the lipase-catalyzed alcoholysis of (RS)-HMPC acetate. Reaction conditions: (RS)-HMPC acetate 520 mmol/L, methanol 520 mmol/L, lipase PLG 10 mg/ml, THF 5 ml, rotation speed 220 r/min, 40 °C, 72 h.

2.2 不同醇(酰基受体)对反应的影响

在催化反应中, 醇作为底物之一(酰基受体)同样对反应有较大的影响. 甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、2-丁醇和正辛醇对反应的影响如表 2 所示. 可以看出, 添加伯醇后底物转化率和产物 ee 值差异不大, 而异丙醇和 2-丁醇参与的反应底物转化率明显较低. 这主要是因为仲醇的空间位阻比伯醇大, 使得酰基受体与酶-底物复合物的结合受到一定限制. 综合考虑, 采用甲醇作为酰基受体.

2.3 内扩散对反应的影响

考察了酶与底物内扩散对反应的影响, 图 2 显

表 2 不同酰基受体对烯丙醇酮乙酸酯的醇解反应的影响

Table 2 Effects of different alcohols on the lipase-catalyzed alcoholysis of (RS)-HMPC acetate

Acyl acceptor	Conversion (%)	ee _p (%)
Methanol	47.3	>99.5
Ethanol	44.4	>99.5
1-Propanol	47.6	>99.5
Isopropanol	37.4	>99.5
1-Butanol	48.0	>99.5
Sec-butanol	38.9	>99.5
1-Octanol	48.8	>99.5

Reaction conditions: (RS)-HMPC acetate 520 mmol/L, acyl acceptor 520 mmol/L, lipase PLG 10 mg/ml, THF 5 ml, Na_2CO_3 10 mg/ml, rotation speed 220 r/min, 40 °C, 48 h.

示了起始反应速率与酶用量之间的关系. 可以发现, 随着酶浓度的提高, 起始速率呈线性上升, 说明在该反应中, 速率控制步骤为酶催化反应, 反应不受内扩散限制^[21].

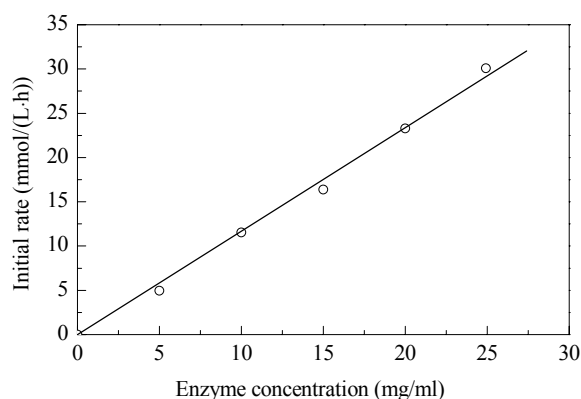


图 2 初始反应速率与酶浓度的关系

Fig. 2. Relationship between initial rate and concentration of enzyme. Reaction conditions: (RS)-HMPC acetate 520 mmol/L, methanol 520 mmol/L, lipase PLG 10 mg/ml, THF 5 ml, Na_2CO_3 10 mg/ml, rotation speed 220 r/min, 40 °C.

2.4 反应温度对反应的影响

反应温度对酶催化反应的影响见图 3. 可以看出, 起始反应速率随温度的升高略有增加. 反应 72 h 时, 在 45 和 50 °C 下反应的产物 ee 值稍有下降, 分别降至 99.10% 和 99.07%, 而其它温度下的产物 ee 值均接近 100%. 综合考虑, 在 40 °C 下反应较为合适.

2.5 底物浓度对反应的影响

在以上优化的反应温度、酰基受体和添加剂等条件下考察了不同底物浓度时底物转化率随时间的变化, 结果见图 4. 可以看出, 底物浓度较低时, 其转化率较高, 当底物浓度为 100 mmol/L 时, 反应 48 h 后

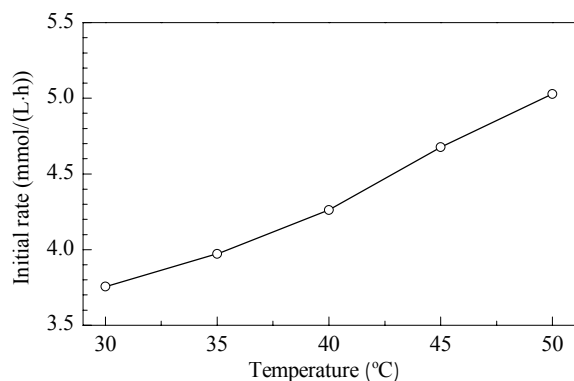


图3 反应温度对初始反应速率的影响

Fig. 3. Effect of temperature on the reaction initial rates. Reaction conditions: (RS)-HMPC acetate 520 mmol/L, acyl acceptor 520 mmol/L, lipase PLG 10 mg/ml, THF 5 ml, Na_2CO_3 10 mg/ml, rotation speed 220 r/min, 72 h.

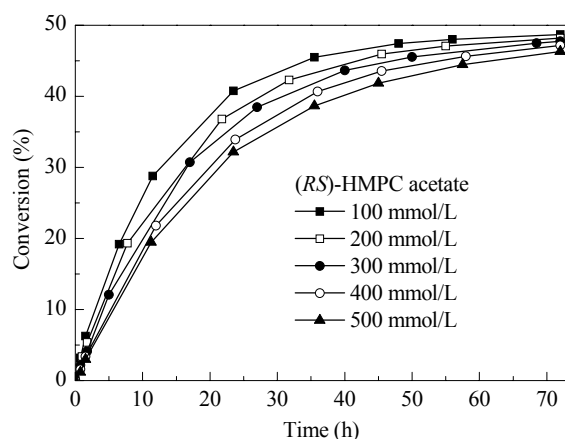


图4 底物浓度对反应的影响

Fig. 4. Effect of substrate concentration on the lipase-catalyzed alcoholysis of (RS)-HMPC acetate. Reaction conditions: $n((\text{RS})\text{-HMPC acetate}):n(\text{methanol}) = 1$, lipase PLG 10 mg/ml, THF 5 ml, Na_2CO_3 10 mg/ml, rotation speed 220 r/min, 40 °C.

转化率达到47.4%,延长反应时间转化率可持续增加.而产物ee值基本与底物浓度无关,均在99.5%以上.

3 结论

利用酶促选择性醇解反应拆分消旋(RS)-烯丙醇酮乙酸酯制备高光学纯度的R-烯丙醇酮和S-烯丙醇酮乙酸酯.该反应在有机溶剂中进行,最终获得的

产物和剩余底物均具有极高ee值,经过醇酯分离后可直接用于烯丙菊酯的合成,避免了水解反应后的分离步骤.反应中添加有机或无机碱均能大大提高催化效率,这主要是因为碱的添加促使催化微环境中的pH接近酶催化的最适pH.在高底物浓度下,需延长反应时间方可获得高转化率,故后续研究中拟通过反应条件的进一步优化来提高反应效率.

参 考 文 献

- 1 丁智慧, 刘吉开, 丁靖坤, 古昆. 云南化工 (Ding Zh H, Liu J K, Ding J K, Gu K. *Yunnan Chem Techn*), 2001, **28**: 22
- 2 周景梅. 农药 (Zhou J M. *Agrochem*), 2008, **47**: 398
- 3 赵玉巧, 许建和. 催化学报 (Zhao Y Q, Xu J H. *Chin J Catal*), 2003, **24**: 613
- 4 汤天羽, 胡永红, 陈光辉, 马海军. 现代农药 (Tang T Y, Hu Y H, Chen G H, Ma H J. *Modern Agrochem*), 2006, **5**: 5
- 5 Yang G, Wu J P, Xu G, Yang L R. *J Mol Catal B*, 2009, **57**: 96
- 6 Satoshi M, Hideo H. WO 8 403 714. 1984
- 7 Umemura T, Inoue A, Mitsuda S. US 4 571 436. 1986
- 8 Danda H, Maehara A, Umemura T. *Tetrahedron Lett*, 1991, **32**: 5119
- 9 Minamii M, Katsura T. JP 06 065 133. 1993
- 10 Mitsuda S, Umemura T, Hirohara H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**: 310
- 11 Mitsuda S, Nabeshima S, Hirohara H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**: 334
- 12 Zhang J, Wu J P, Yang L R. *J Mol Catal B*, 2004, **31**: 67
- 13 Zacharis E, Halling P J, Rees D G. *Chem Appl Biol Sci*, 1999 **96**: 1201
- 14 Halling P J. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**: 74
- 15 Ducret A, Trani M, Lortie R. *Enzym Microb Technol*, 1998, **22**: 212
- 16 Parker M C, Brown S A, Robertson L, Turner N J. *Chem Commun*, 1998: 2247
- 17 Campos F, Bosch M P, Guerrero A. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**: 2705
- 18 Garcia-Urdiales E, Rébolledo F, Gotor V. *Adv Synth Catal*, 2001, **343**: 646
- 19 Quirós M, Parker M C, Turner N J. *J Org Chem*, 2001, **66**: 5074
- 20 Liljeblad A, Kiviniemi A, Kanerva L T. *Tetrahedron*, 2004, **60**: 671
- 21 Bedell B A, Mozhaev V V, Clark D S, Dordick J S. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**: 654