

化学—酶法立体控制合成光学纯 *L*-羟基苯丙氨酸的新方法

赵健身 曹家强* 杨顺楷**

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

L-羟基苯丙氨酸(*L*-HO-Phe, III)是体内 *L*-苯丙氨酸(*L*-Phe)的代谢产物或中间体⁽¹⁾, 有显著的生物活性, 如 *L*-间-酪氨酸(*L*-*m*-Tyrosine, *L*-*m*-Tyr, IIIb)可用作抗抑郁剂⁽²⁾。此外, 还用于肽类等药物的结构改造⁽³⁾及病理药理研究。由于酚羟基的存在, 其化学合成复杂, 除拆分外^(4,5)尚未见 *L*-*m*-Tyr(IIIb)及 *L*-邻-酪氨酸(*L*-*o*-Tyrosine, *L*-*o*-Tyr, IIIa)两种手性物质直接用立体控制方法合成的报道。本文报道以相应芳醛为起始原料, 经一步化学反应和一步酶反应直接合成得到光学纯 *L*-HO-Phe(III)的新合成路线(图 1)。

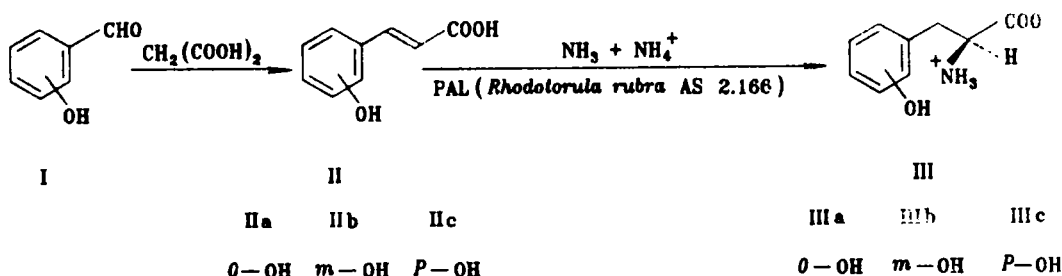


Fig 1 The chemoenzymatic synthesis of optically pure *L*-hydroxyphenylalanine (III).

从相应羟基苯甲醛(I)出发, 经一步化学反应合成得反式-羟基肉桂酸(trans-hydroxycinnamic acid, HO-CA, II)。一株深红酵母(*Rhodotorula rubra*) AS 2.166 经充分诱导培养获得 *L*-苯丙氨酸解氨酶(*L*-Phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.5)^(6,7)活性后, 使其全细胞悬浮在含过量氨的溶液中, 它催化化合物 II 氨化生成 α -氨基酸(III)。本研究选用分次添加化合物 II 的工艺, 以避免它抑制 PAL 酶的活性⁽⁸⁾。产物 III 浓度按前报方法测定⁽⁹⁾, 结果见表 1。可以看出邻-羟基肉桂酸(*o*-HO-CA, IIIa)的转化率最高, 达 74.8%, 其转化的时间过程曲线见图 2。对-羟基肉桂酸(*p*-HO-CA, IIIc)和间-羟基肉桂酸(*m*-HO-CA, IIIb)的转化率较低, 约 20%。

Tab 1 Enzymatic synthesis of *L*-hydroxyphenylalanine (III) from hydroxycinnamic acid (II)

Compound	Conversion (by TLC analysis, %)	Yield (pure III, %)
IIIa	74.8	43.7
IIIb	21.1	6.5
IIIc	20.6	11.0

本文于 1994 年 8 月 30 日收到。

* 四川大学生化专业九四届毕业生

** 通讯联系人

转化液通过酸化沉淀除去未转化化合物 II, 残留部分用乙醚萃取除去, 然后用非极性树脂柱层析纯化, 得到氨基酸纯品 III。纯品产率见表 1 所示。需指出, 不同化合物 III 因其在溶液中的浓度(柱层析前上柱样品)、水溶性及所用层析柱树脂用量差异, 分离步骤及纯品收率有所不同, 有待于进一步改进分离工艺。所得氨基酸产品 III 的结构通过红外、核磁及质谱等得到证实。产品间-羟基苯丙氨酸(*m*-HO-Phe, IIIb)和对-羟基苯丙氨酸(*p*-HO-Phe, IIIc)的比旋度同文献报道 *L*-异构体的数据接近, 旋光方向一致。产物邻-羟基苯丙氨酸(*o*-HO-Phe, IIIa)和上述两种氨基酸的圆二色谱(CD)均在 215 nm 处表现为正 Cotton 效应, 同文献报道 *L*-氨基酸的 CD 谱与构型对应的经验规律相符^[10], 因此推断本研究所得的三种氨基酸均为 *L*-构型。图 3 给出产物 III 的 CD 谱。使用一种手性高效色谱柱对所得产品 III 进行对映体分析^[11], 结果均给出单一的对映体峰。其中产品 IIIc 的保留时间同 *L*-对-酪氨酸标准品的保留时间一致。由此可知所合成得到的氨基酸产物 III 为光学纯的 *L*-对映体。

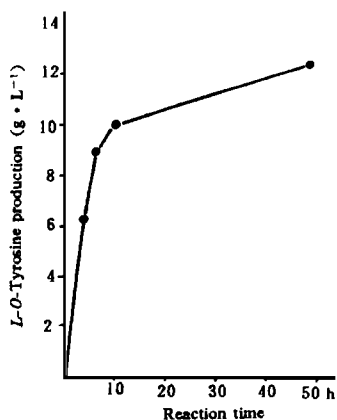


Fig 2 *L*-*o*-tyrosine (IIIa) production time-course from *o*-hydroxycinnamic acid (IIa).

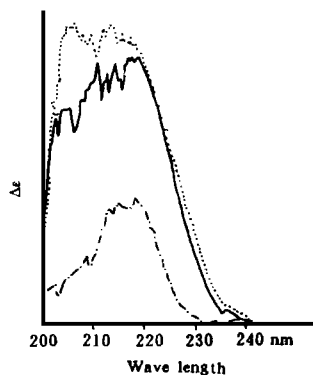


Fig 3 Circular dichroism (CD) spectrum of product III ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). IIIa: (·····); IIIb: (—); IIIc: (- · - · -).

综上所述, 我们建立了一条从羟基苯甲醛(I)出发, 无需保护羟基, 经一步化学反应和一步酶反应直接合成光学纯 *L*-HO-Phe(III)的新化学—酶法合成路线, 该路线简单易行, 在制备这类生物活性氨基酸及其衍生物方面有重要应用价值。

实 验 部 分

显微熔点仪为 XRC-1 型, 温度未校正。质谱仪为 Finnigan MAT 4510 型。核磁共振仪为 Spectrospin AC-P300 MHz 型, 溶剂为 D₂O。红外光谱仪为 Nicolet Mx-1E 型, KBr 压片法。旋光仪为 Perkin-Elmer 241 型。圆二色谱仪为 J500C 型。CGA-688 型树脂为晨光化工院产品。

邻-羟基肉桂酸(IIa)

按文献^[12]方法合成。收率 65%, mp 200~202°C (60%, 208°C)^[12]。

间-羟基肉桂酸(IIIb)

参照文献^[12]方法合成。收率 81%, mp 191.0~191.5°C (191°C)^[13]。

对-羟基肉桂酸(IIc)

按文献^[14]方法合成。收率 60%, mp 207~210°C (74%, 208~210°C)^[14]。

深红酵母菌体培养^[6]

将深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) AS 2.166 (中国科学院保藏菌株) 的麦芽汁琼脂斜面培养物接种到已灭菌 (0.96 Pa, 30 min) 的诱导培养基 (酵母膏 1.0%, 蛋白胨 1.0%, DL-苯丙氨酸 0.1%, NaCl 0.5%, pH 6.0) 中, 在 30°C, 180 r·min⁻¹ 摇床条件下旋转培养 48 h。然后按 10% 接种量转种到上述培养基内再旋转培养 24 h。1 l 该培养液可离心收获湿菌体约 20 g。

L-邻-羟基苯丙氨酸(IIIa)

将红酵母菌体 8.5 g 加入到溶有化合物 IIa 0.125 g 的 NH₃ 溶液 33 ml 内 (3.80 mol·L⁻¹ NH₃, 1.33 mol·L⁻¹ (NH₄)₂CO₃, pH 10.5), 通 N₂ 1 min 后密闭, 在旋转摇床上 (30°C, 100 r·min⁻¹) 振荡反应。分别在 4.0, 6.5, 10.0 h 时添加化合物 IIa 0.175, 0.150, 0.045 g。共添加 IIa 0.495 g (3.02 mmole), 总浓度为 15.0 g·L⁻¹。48 h 终止转化。产物 IIIa 终浓度为 12.4 g·L⁻¹, 转化率达 74.8%。离心除去菌体后, 用浓 HCl 酸化至 pH 2.0 以下, 沉淀得未转化物 IIa 0.04 g。溶液用等体积乙醚萃取除去残留物 IIa, 调 pH 至中性, 减压蒸去乙醚, 然后上 CGA-688 柱 (22.5×2.0 cm), 用 0.09% 稀 NH₃ 水洗脱, 茚三酮显色部分减压浓缩干。经 60% 乙醇水溶液重结晶得白色粉末 IIIa 0.239 g (1.32 mmole, 43.7%), mp 212~214°C。[α]_D²⁵-4.8° (c 0.500, H₂O)。IR (KBr) cm⁻¹: 3200~2400, 1497 (NH₃⁺), 1602, 1410 (COO⁻), 751 (C₆H₄)。¹HNMR δ ppm: 2.99~3.40 (m, 2H, CH₂), 3.91~3.98 (q, 1H, CH), 7.19~7.39 (m, 4H, C₆H₄)。EIMS m/z (%): 164 (M-NH₂, M-HO, 13)⁺, 154 (M+H-CO, 30)⁺, 91 (M-H₂NCHCOO-HO, 20)⁺, 74 (H₂NCHCOOH, 100)⁺。

L-间-羟基苯丙氨酸(IIIb)

将红酵母湿菌体 10.8 g 加入到溶有化合物 IIb 0.50 g 的上述 NH₃ 溶液 110 ml 内, 反应条件同上。分别在反应进行 9, 21, 32, 43, 56, 67, 79 h 时补加化合物 IIb 0.50, 0.30, 0.50, 0.50, 0.50, 0.20 g。共添加 IIb 3.50 g (21.3 mmole), 浓度为 31.8 g·L⁻¹。100 h 后终止转化, 最终产物 IIb 浓度为 7.4 g·L⁻¹, 转化率为 21.1%。离心除去菌体后的清液经酸化 (同上) 沉淀回收得未转化物 IIb 1.85 g (11.3 mmole)。滤液调 pH 至中性后上 CGA-688 柱 (45×3 cm), 用 0.09% NH₃ 水洗脱, 收集茚三酮显色部分并减压浓缩干, 用 60% 乙醇水溶液重结晶得微黄色晶体 IIIb 0.250 g (1.38 mmole, 6.5%), mp 275~276°C (文献 275~276°C)^[4]。[α]_D²⁰-11.1° (c 0.497, 0.1 N NaOH)。IR (KBr) cm⁻¹: 3200~2400, 1505 (NH₃⁺), 1577, 1410 (COO⁻), 870, 797 (C₆H₄)。¹HNMR δ ppm: 3.00~3.26 (m, 2H, CH₂), 3.94~3.98 (q, 1H, CH), 6.68~6.79, 7.26~7.31 (m, 4H, C₆H₄)。EIMS m/z (%): 181 (M, 21.2)⁺, 136 (M-COOH, 53.1)⁺, 107 (M-H₂NCHCOOH, 60)⁺, 91 (M-H₂NCHCOO-OH, 24)⁺, 74 (H₂NCHCOOH, 100)⁺。

L-对-羟基苯丙氨酸(IIIc)

将红酵母湿菌体 21.4 g 加入到溶有化合物 IIc 0.50 g 的上述 NH₃ 溶液 110 ml 内, 反应条件同上。分别在反应进行 3, 6, 9, 21 h 时补加 IIc 0.50, 0.50, 0.50, 0.11 g。共添加化合物 IIc 2.11 g (12.9 mmole), 总浓度为 19.2 g·L⁻¹。48 h 终止反应, 测得产物 IIIc 浓度为 4.38 g·L⁻¹, 转化率为 20.6%。离心除去菌体后酸化沉淀回收得未转化物 IIc 1.39 g, 滤液用等体积乙醚萃取回收 IIc 0.03 g, 共回收 IIc 1.42 g (8.66 mmole)。水相经减压蒸去乙醚后上 CGA-688 柱 (22.5×2.0 cm), 以 0.09% NH₃ 水洗脱, 氨基酸 IIIc 即从洗脱液中逐渐析出, 过滤并浓缩母液至干, 合并后用稀 HCl 溶解, 再用 NH₃ 中和即得白色晶体状产物 IIIc 0.258 g (1.42 mmole,

11.0%), mp 266~267 °C。 $[\alpha]_D^{25} = -7.0^\circ$ (c 0.505, 2 N HCl)。 IR (KBr) cm^{-1} : 3200~2400, 1515 (NH_3^+), 1590, 1415 (COO^-), 840 (C_6H_4)。 $^1\text{H NMR}$ δ ppm: 2.80~3.30 (m, 2H, CH_2), 4.00~4.20 (t, 1H, CH), 6.80~7.30 (q, 4H, C_6H_4)。 EIMS m/z (%): 181 (M, 2) $^+$, 107 (M - $\text{H}_2\text{NCHCOOH}$, 100) $^+$, 74 ($\text{H}_2\text{NCHCOOH}$, 100) $^+$ 。

致谢 本工作得到中国科学院成都分院青年基金和中国科学院成都生物所择优经费资助。

关键词 化学—酶法合成; 苯丙氨酸解氨酶; *L*-邻-酪氨酸; *L*-间-酪氨酸; *L*-对-酪氨酸

参 考 文 献

- 1 Fujimoto S, Ohara A. *In vivo* studies on the formation of *m*-tyrosine and *o*-tyrosine from *L*-phenylalanine in rats. *Chem Pharm Bull*, 1986, **34**: 768
- 2 Johnson JC. *Amino Acids Technology (recent developments)*, Park Ridge, New Jersey: Noyes Data Corporation, 1978: 379~380
- 3 王德心, 王妮, 鲁桂琛等. 酪氨酸相关肽的合成及抗孕酮生物活性. *药学报*, 1994, **29**: 438
- 4 Sealock RR, Speeter ME, Schweet RS. The synthesis, resolution and proof of configuration of the isomers of *m*-tyrosine. *J Am Chem Soc*, 1951, **73**: 5386
- 5 Garnier-Suillerot A, Albertini JP, Collet A *et al.* Spectrophotometric studies of the copper (II)-*D*-*o*-tyrosine complex. Assignment of the 330-nm dichroic band in copper (II) and iron (III) transferrins. *J Chem Soc Dalton Trans*, 1981, **12**: 2544
- 6 杨顺楷, 赵健身, 李果龙等. 酵母细胞生物转化反式-肉桂酸生产 *L*-苯丙氨酸的研究. *天然产物研究与开发*, 1990, **2**(1): 1
- 7 赵健身, 杨顺楷. 苯丙氨酸解氨酶. *天然产物研究与开发*, 1993, **5**(4): 47
- 8 Sato T, Kiuchi F, Sankawa U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry*, 1982, **21**: 845
- 9 赵健身, 黄炜, 杨顺楷. 硅胶薄层色谱分析技术在微生物酶法合成 *L*-苯丙氨酸上的应用. 第七届四川色谱学术报告会论文集, 西昌, 1994: 41
- 10 尤田靶. 手性化合物的现代研究方法. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993: 280
- 11 吴邦桂, 旷昌渝, 黄天宝等. 高效配体交换色谱法直接拆分 α -氨基酸对映体. *分析化学*, 1991, **19**: 303
- 12 李述文, 范如霖. *实用有机化学手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 372~374
- 13 Buckingham J. *Dictionary of Organic Compounds*, London: Chapman and Hall, 1982
- 14 樊能廷. *有机合成事典*. 北京: 北京理工大学出版社, 1992: 769~770

A NEW CHEMOENZYMATIC STEREOCONTROLLED SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE *L*-HYDROXYPHENYLALANINE

JS Zhao, JQ Cao and SK Yang

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

ABSTRACT Optically pure *L*-3-(2-hydroxyphenyl) alanine (*L*-*o*-tyrosine, IIIa), *L*-3-(3-hydroxyphenyl) alanine (*L*-*m*-tyrosine, IIIb) and *L*-3-(4-hydroxyphenyl) alanine (*L*-*p*-tyrosine, IIIc) were synthesized by the stereocontrolled amination of corresponding hydroxycinnamic acid (II) catalyzed by *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC4. 3. 1. 5) contained in *Rhodotorula rubra* mycelium. The amination of compound II was completed in aqueous ammonia solution (6.4 mol · L⁻¹, pH 10.5, 30°C) with the conversion of 74.9% (IIa), 21.1% (IIb) and 20.6% (IIc) respectively. The absolute configuration of the products IIIa~c were confirmed by circular dichroism (CD), and chiral high-performance ligand exchange chromatography (HPLEC) showed that products III were optically pure *L*-isomers.

Key words *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC4. 3. 1. 5); Chemoenzymatic synthesis; *L*-*o*-tyrosine; *L*-*m*-tyrosine; *L*-*p*-tyrosine