

化学—酶法立体控制合成光学纯 3-(2-吡啶基)丙氨酸的新方法

赵健身 朱立* 杨顺楷**

(中国科学院成都生物研究所,成都 610041)

3-(2-吡啶基)丙氨酸作为非天然含氮芳香族氨基酸,不仅自身有显著的药物活性,如抗炎⁽¹⁾等,而且在生物活性肽类结构改造及其它新药研制方面有重要用途⁽²⁾。但是到目前为止,除有少量关于消旋体制备的报道外⁽³⁾,其光学纯对映体的直接立体控制合成尚没有文献报道。因酶通常具有立体特异性,并且可允许其底物结构有所变化,已应用于氨基酸光学异构体的制备⁽⁴⁾。苯丙氨酸解氨酶(*L*-phenylalanine ammonialyase, PAL, EC4. 3. 1. 5)可催化反式肉桂酸进行 *L*-构型特异性的氨化反应,也可作用于部分反式肉桂酸类似物,生成 *L*-苯丙氨酸及其类似物^(5,6)。尽管3-(2-吡啶基)丙烯酸(III)同反式肉桂酸有相似的结构,但是 Renard 等曾报道粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)PAL 不能催化该化合物 III 进行氨化反应,我们开展了类似的研究,却发现国内筛选到的一株深红酵母(*Rhodotorula rubra*)AS 2. 166经充分诱导培养获得 PAL 活性后可有效地催化该化合物 III 进行氨化反应,生成光学纯3-(2-吡啶基)丙氨酸(IV)。

我们从易得的2-甲基吡啶出发,经二步化学反应合成得到3-(2-吡啶基)丙烯酸(III)。然后在过量氨及铵盐存在下经有 PAL 活性的深红酵母细胞催化,一步实现 α 位的立体特异性氨化(图1)。酶反应转化率可达60%左右。由于化合物 III 易溶于水,难同产物 IV 分离,为此我们考察了几种硅胶层析分离系统,见表1所示。其中以 *n*-C₄H₉OH—CH₃COOH—H₂O(4:1:1)溶剂系统的分离效果最好。因此我们首先用上述展开系统进行干柱层析,将未转化的化合物 III 完全分离除去,然后用吸附树脂层析柱进一步纯化。所得产品经核磁、红外及质谱数据证实结构同预期 IV 相符。经高效液相色谱柱(填充手性固定相 Cu²⁺-*L*-proline)对所得产品进行对映体过量分析⁽⁷⁾,仅给出单一对映体峰, $[\alpha]_D^{24} = +36.25^\circ$ (c 0.250, H₂O)。该氨基酸 IV 的旋光性质尚未见文献报道。由于使用深红酵母菌株 AS 2. 166,其 PAL 酶催化反式肉桂酸及其它类似物均给出 *L*-构型氨基酸产物⁽⁶⁾,而且氨基酸 IV 在上述手性高效液相色谱柱上的行为(例如柱上保留时间较长,为10.0 min)同 *L*-构型相符,因此可初步推测产物 IV 为 *L*-构型氨基酸。其绝对构型仍有待于进一步确证。如此,我们给出了一条从易得的原料2-甲基吡啶(I)出发经两步化学步骤和一步酶反应制备光学纯3-(2-吡啶基)丙氨酸(IV)的化学—酶法合成路线。该路线反应较简单,可避免复杂的传统化学合成及消旋体拆分,因此有重要的应用价值。

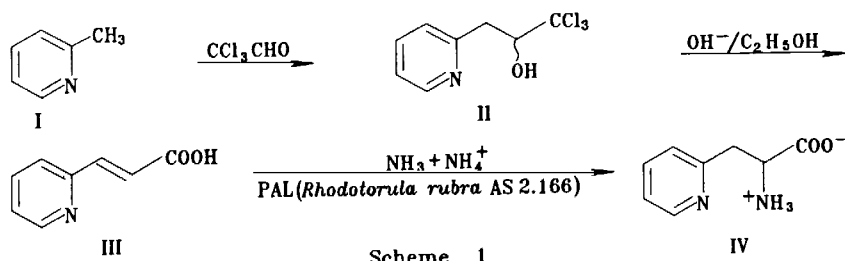
本文于1993年11月10日收到。

* 四川大学生化专业93届毕业生

** 通讯联系人

Tab 1 Solvent systems for the separation of compounds III and IV on silica gel TLC

Solvent systems (V:V)	R _f value × 100	
	III	IV
CH ₃ OH—CHCl ₃ —H ₂ O(2:2:1)	66	55
C ₂ H ₅ OH—H ₂ O(7:3)	87	63
n-C ₃ H ₇ OH—H ₂ O(7:3)	76	46
C ₂ H ₅ OH—CH ₃ COOH—H ₂ O(4:1:1)	87	55
n-C ₃ H ₇ OH—CH ₃ COOH—H ₂ O(4:1:1)	86	38
n-C ₄ H ₉ OH—CH ₃ COOH—H ₂ O(4:1:1)	73	12



Scheme 1 The chemoenzymatic synthesis of optically pure 3-(2-pyridyl)alanine.

实 验 部 分

质谱仪为 Finnigan MAT 4510型。核磁共振仪为 JMN-Fx90Q 型,溶剂为 D₂O。红外光谱仪为 Nicolet Mx-1E, KBr 压片法。旋光仪为 Perkin-Elmer 241型。熔点仪为柳本 MR-500型,温度未校正。薄层层析用硅胶 GF₂₅₄为青岛海洋化工厂产品。

1,1,1-三氯-2-羟基-3-(2-吡啶基)丙烷(II)

参考文献⁽⁸⁾方法合成。收率81%, mp 84~85℃ (67%, 85~86℃)⁽⁸⁾。

反式-3-(2-吡啶基)丙烯酸(III)

按文献⁽⁹⁾方法合成。收率70%, mp 198~199℃ (73%, 194~197℃)⁽⁹⁾。

光学纯-3-(2-吡啶基)丙氨酸(IV)

将深红酵母(*Rhodotorula rubra*) AS 2.166(中国科学院保藏菌株)麦芽汁斜面培养物接种至已灭菌(0.98 Pa, 30 min)的100 ml 诱导培养基(酵母汁1%, 蛋白胨1%, DL-苯丙氨酸0.1%, NaCl 0.5%, pH 6.0)中,在30℃,180 r/min 摇床条件下旋转培养48 h。然后转种至灭菌的上述诱导培养基1 L中,在相同条件下再培养24 h。离心收获湿菌体23 g,加入到含1.33 mol/L (NH₄)₂CO₃和3.8 mol/L NH₃(pH 10.5)的水溶液100 ml中。在60 h内分次将化合物 III 1.8 g(12 mmole)加入该溶液中。酶反应在30℃,100 r/min 的密闭三角瓶条件下进行,并通入 N₂以利于 PAL 稳定。根据我们已报道的 TLC 方法⁽¹⁰⁾测得产物累积浓度约12 g/L,转化率达60%。离心除去菌体并浓缩至少量体积后用硅胶 GF₂₅₄混匀凉干,然后加到装有硅胶 GF₂₅₄的层析柱(62×3.3 cm)上端,以 n-C₄H₉OH—CH₃COOH—H₂O(4:1:1)为展开系统进行干柱层析。收集含产物段硅胶并用甲醇洗脱产物。经浓缩至干后用适量水溶解,再通过另一 CGA-688 吸附树脂层析柱(45×3 cm),用水洗脱。收集茚三酮显色部分,浓缩至干,直空干燥后得浅黄色粉末 IV 0.52 g(3.1 mmole, 26%), [α]_D²⁴ = +36.25°(c 0.250, H₂O)。IR (KBr) cm⁻¹: 3200~2200, 1498 (NH₃⁺), 1582, 1400(COO⁻), 754(C₅H₄N)。¹H NMR (δ ppm): 3.3~3.5(d, 2H, CH₂), 3.9~4.2

(t, 1H, CH), 7.2~8.4(m, 4H, C₅H₄N)。EIMS m/z(%): 167(MH⁺, 100), 123(M-CO₂⁺, 25), 106(M-CO₂-NH₃⁺, 10), 93(M-H₂NCHCOOH⁺, 25)。

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 光学纯3-(2-吡啶基)丙氨酸; 化学—酶法; 苯丙氨酸解氨酶; 深红酵母

参 考 文 献

- 1 Shimeno H, et al. Anti-inflammatory activities of pyridylalanine analogs and their influences on the anti-inflammatory action of cortisone. *Chem Pharm Bull* 1977; **25**:2988.
- 2 刘寅曾, 褚季瑜. 生物活性肽研究进展. 见惠永正, 陈耀全. 化学与生命科学. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 1992: 38~82.
- 3 Greenstein JP and Winitz G. *Chemistry of Amino Acids* Vol 3, New York: John Wiley & Sons, 1961: 2710~2713.
- 4 Jones JB. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron* 1986; **42**:3351.
- 5 Renard G, et al. Synthesis of *L*-phenylalanine analogs by *Rhodotorula glutinis*. Bioconversion of cinnamic acid derivatives. *Biotechnol Lett* 1992; **14**:673.
- 6 赵健身, 等. 酶催化反式肉桂酸类似物的不对称氨化反应. 有机化学 1993; **13**:486.
- 7 吴邦桂, 等. 高效配体交换色谱法直接拆分氨基酸对映体. 分析化学 1991; **19**:303.
- 8 Tullock CW and McElvain SM. Piperidine derivatives VIV; Local anesthetics derived from α -picoline. *J Am Chem Soc* 1939; **61**:961.
- 9 King JA, et al. Attempted synthesis of pelletierine. *J Org Chem* 1951; **16**:1100.
- 10 杨顺楷, 赵健身. 第七次全国色谱学术报告会文集. 北京: 1989: 491.

A NEW CHEMOENZYMATIC ROUTE FOR THE STEREOCONTROLLED SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE 3-(2-PYRIDYL) ALANINE

JS Zhao, L Zhu and SK Yang

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

ABSTRACT A new chemoenzymatic synthesis of optically pure 3-(2-pyridyl) alanine (IV) was established, which comprised the stereocontrolled amination of olefinic bond in compound 3-(2-pyridyl) acrylic acid (III) catalyzed by *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) contained in *Rhodotorula rubra* mycelium. Compound III was prepared chemically from 1,1,1-trichloro-2-hydroxy-3-(2-pyridyl) propane (II) which was formed by addition of chloral to α -picoline (I). The enzymatic amination of compound III was completed in aqueous ammonia solution (6.4 mol/L, pH 10.5, 30°C) with the conversion of 60%. The product IV was separated from the unconverted III by silica gel dry column chromatography and further purified by non-polar resin (CGA-688) column chromatography. The specific rotation $[\alpha]_D^{24} = +36.25^\circ$ (c 0.250, H₂O).

Key words Optically pure 3-(2-pyridyl) alanine; Chemoenzymatic synthesis; *L*-Phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5); *Rhodotorula rubra*