



УДК 547.466.22:547.23:547.9.577.1.5

© 1991 г.

*Ю. Н. Белоконь, К. А. Кочетков, В. И. Тараров,
Т. Ф. Савельева, Н. В. Филева, Н. С. Гарбалническая,
М. Б. Сапоровская, З. Б. Бакасова, А. Г. Райт*

НОВЫЙ МЕТОД ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ОПТИЧЕСКИ ЧИСТЫХ НЕБЕЛКОВЫХ α -АМИНОКИСЛОТ ИЗ ГЛИЦИНА

*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова АН СССР,
Москва*

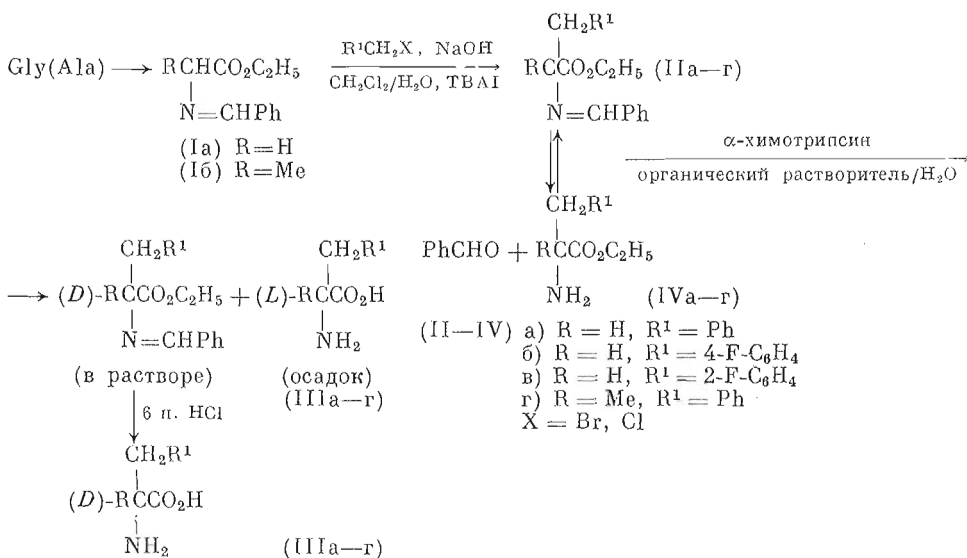
Разработан новый метод химико-ферментативного получения ряда оптически чистых ароматических аминокислот. Алкилированием в межфазных условиях оснований Шиффа бензальдегида с эфирами глицина или аланина по α -углеродному атому действием $\text{R}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{X}$ ($\text{R} = \text{H}, 2\text{-F}, 4\text{-F}$; $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) синтезированы основания Шиффа бензальдегида с эфирами ароматических аминокислот. Полученные субстраты в водно-органических средах в присутствии α -химотрипсина гидролизуются до свободных *L*-аминокислот с высокой степенью оптической чистоты. При использовании в качестве растворителя смеси $\text{MeCN}-\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1) *L*-аминокислоты кристаллизуются из реакционной смеси. После гидролиза непрореагировавших субстратов в соляной кислоте выделены соответствующие *D*-аминокислоты.

В настоящее время получение небольших количеств оптически чистых аминокислот успешно решается путем асимметрического синтеза [1, 2], однако в промышленных масштабах этот путь пока практически не реализован. Очень заманчиво для получения оптически активных аминокислот использование энантиоселективности ферментов в гидролизе таких, например, субстратов, как эфиры, амиды [3—5] или *N*-ацильные производные аминокислот [3, 6]. В последнее время большое внимание привлекает смешанный химико-ферментативный подход [7, 8], включающий в себя на одной из стадий ферментативную реакцию. Такой подход сочетает гибкость в изменении углеродного скелета при реализации химических стадий и высокую энантиоселективность ферментативного катализа. Известные примеры эффективного использования ферментов в асимметрическом синтезе органических соединений также и в неводных средах [8—10] открывают перспективы получения оптически чистых физиологически активных препаратов из рацемических предшественников, нерастворимых в воде. В частности, к таким предшественникам эфиров аминокислот можно отнести основания Шиффа с ароматическими альдегидами и кетонами, широкий набор которых может быть получен исходя из простейших аминокислот — глицина и аланина [11, 12]. Успешное ферментативное расщепление рацематов эфиров аминокислот в виде таких производных позволит достаточно просто получать энантиомерно чистые аминокислоты, в том числе и небелковой природы, что особенно важно в связи с возрастающим значением этих соединений в фармакологии и медицине [13].

В настоящей работе сообщается о синтезе эфиров основания Шиффа ряда ароматических аминокислот как белкового, так и небелкового характера и исследовании их гидролиза, катализируемого α -химотрипсином, в смешанных водно-органических средах. Нами показано, что α -химотрипсин гидролизует указанные субстраты с высокой энантиоселективностью, что позволяет получить оба энантиомера соответствующих аминокислот с оптической чистотой $>95\%$.

Сокращения: ТЕВА — хлорид триэтилбензиламмония, ТВАВг — бромид тетрабутиламмония, ТВАІ — подид тетрабутиламмония.

Исходные соединения — основания Шиффа (I) эфира глицина (или аланина) с бензальдегидом (см. схему) получены из свободных аминокислот, которые этерифицировали и далее конденсировали с бензальдегидом в присутствии водоотнимающих средств. Основание Шиффа (Ia) алкилируется далее галоидными алкилами (R^1CH_2X) в двухфазной системе хлористый метилен — вода в присутствии щелочи до оснований Шиффа соответствующих ароматических аминокислот (IIa—r). Соединения (IIa—r) легко очищаются перегонкой в вакууме.



Эти условия алкилирования оснований Шиффа выгодно отличаются от алкилирования в безводных средах и в присутствии сильных оснований [11]. Попытка проведения превращения (I) \rightarrow (II) в другой известной системе — растворитель — NaOH (твердый) [12] — приводит в нашем случае к образованию в основном диалкилированного продукта. Использование в качестве основания смеси Na_2CO_3 — NaOH (3 : 1) в ацетонитриле [14] позволило получить только основание Шиффа (IIr) из исходного (Ib). В то же время варьирование вида используемого катализатора (ТЕВА, ТВАВr, ТВАI) не влияет на ход процесса.

Основания Шиффа (IIa—r) гидролизуются химотрипсином в водно-органической среде при нейтральном рН с образованием *L*-аминокислот (табл. 1). Поскольку превращение соединений (II) в аминокислоты (III) и бензальдегид не сопровождается изменением рН раствора, ферментативный гидролиз может быть осуществлен и без добавления в раствор буферных компонентов, необходимых для поддержания постоянного рН раствора. При этом результат реакции не зависит от того, изготовлено ли основание Шиффа (II) алкилированием предшественника (I) или получено из эфира соответствующей аминокислоты. Единственное желательное условие проведения эксперимента — перегонка получаемых оснований Шиффа (II) в вакууме. Использование в последующей ферментативной реакции реакционных смесей без подобной очистки приводит к снижению выхода (см. табл. 1).

Растворимость оснований Шиффа в органических растворителях позволяет провести ферментативный гидролиз в смешанных водно-органических средах. При этом в системе растворителей MeCN — вода, 9 : 1, или MeNO₂ — вода, 23 : 2 (в обоих случаях по объему), образующаяся *L*-аминокислота выпадает в осадок и легко отделяется от раствора, содержащего этерифицированное основание Шиффа *D*-ряда и бензальдегид. При этом благодаря низкой концентрации свободной аминокислоты в растворе снижается опасность образования побочных продуктов за счет взаимодействия карбонильной группы эфира со свободной аминогруппой другой молекулы эфира, как это наблюдалось в работе [15].

Катализируемый химотрипсином гидролиз этилового эфира фенилаланина в виде его основания Шиффа с бензальдегидом (IIa) в смешанных водно-органических растворителях *

Органический растворитель — вода	Время реакции, ч	L-АК		D-АК	
		выход, %	е.е., %	выход, %	е.е., %
MeCN / H ₂ O, 9 : 1	24	38	98,7	37	95
MeCN / H ₂ O, 9 : 1 ^{2*}	24	24	98,7	18	91
MeNO ₂ / H ₂ O, 23 : 2	30	20	98		
CHCl ₃ / H ₂ O, 1 : 5	7	32	97	30	38
CHCl ₃ / H ₂ O, 1 : 5 ^{3*}	7	35	86	42	21
CHCl ₃ / H ₂ O, 1 : 5 ^{4*}	7	<40	99	<40	98
DMSO / H ₂ O, 9 : 1	7	39	76		13

* Выход определен после очистки на ионообменной смоле КУ-2 (в H⁺-форме). Контроль методом ГЖХ, внутренний стандарт — L-Val. Энантиомерный избыток (е.е.) определен методом энантиомерной ГЖХ.

^{2*} Гидролиз эфира (IIa) без предварительной перегонки.

^{3*} С добавлением в водную фазу фосфатного буфера.

^{4*} Гидролиз метилового эфира D, L-Phe.

Таблица 2

Катализируемый α-химотрипсином гидролиз эфиров ароматических аминокислот в виде оснований Шиффа с бензальдегидом (IIa — г) в системе MeCN—H₂O, 9 : 1 *

Соединение (II)	R	R ¹	АК(II) : символ	Время реакции, ч	L-АК		D-АК	
					выход, %	е.е., %	выход, %	е.е., %
а	H	Ph	а: Phe	3	14	96,2		65,3
				7	23	96,7		77,9
				22	29	96,2		92,8
				29	38	97,2		94,9
б	H	4-F-Ph	б: Phe (4F)	20	39	99,8		
в	H	2-F-Ph	в: Phe (2F)	20	21	98,4	30	49,7
г	Me	Ph	г: Phe (αMe)	200	29	19,8	30	29,5
д ^{**}	H	Ph	а: Phe	160	—	—	—	—

* См. первую сноску к табл. 1.

^{**} Шиффово основание (IIд) получено реакцией Phe-OEt с бензофеноном [18].

После осаждения фермента трихлоруксусной кислотой и химического гидролиза основания Шиффа D-ряда аминокислота, обогащенная D-энантиомером, также может быть выделена.

Такое проведение процесса дает ряд преимуществ: обеспечивает большую легкость отделения L-энантиомера, уменьшает количество используемых солей и потери целевого продукта. Реакция гидролиза субстрата (IIa) идет с высокой энантиоселективностью также и в системе хлороформ — вода, 1 : 5, т.е. при использовании минимального количества неполярного компонента, необходимого для растворения основания Шиффа (IIa) [16], однако при этом L-фенилаланин переходит в объемную водную фазу и вследствие образования эмульсии разделение фаз затруднено. Использование сильно сольватирующего растворителя — DMSO, обычно резко меняющего стереоселективность ферментативного процесса [17] — привело к снижению энантиомерной чистоты продукта реакции (табл. 1).

Как видно из табл. 1 и 2, скорость реакции гидролиза и ее энантиоселективность зависят не только от применяемой системы растворителей, но и от типа субстрата. Легче всего гидролизуются моноалкилированные продукты (IIб, в), содержащие атом фтора в ароматическом кольце, для которых высокая стереоселективность процесса сочетается с легкостью отделения L-аминокислоты. При использовании смеси ацетонитрил — вода гидролиз завершается за 1 сут, что контролировалось методом ПМР,

а начало образования осадка *L*-аминокислоты в реакционной среде наблюдается при конверсии около 10%. При уменьшении процентного содержания воды в ацетонитриле ниже 5% гидролиз практически не идет. Катализируемый химотрипсином гидролиз шиффового основания эфира α -метилфенилаланина (IIr), полученного алкилированием шиффового основания аланина (Ib) бензилбромидом [14], идет медленно и проходит за 200 ч. Основание Шиффа (IIr) может быть получено также и из соединения (Ia) двойным алкилированием сначала иодистым метилом [12], а затем бромистым бензилом [14].

Известно, что увеличение гидрофобности *N*-замещающей группы в эфире аминокислоты снижает энантиоселективность реакции гидролиза эфиров α -химотрипсином [19, 20]. Однако в нашем случае энантиоселективность гидролиза оснований Шиффа в основных системах растворителей практически не снижается по сравнению с гидролизом свободного эфира. Это может быть объяснено с учетом предположения о предварительном неферментативном обратимом расщеплении альдиминной связи в условиях реакции (см. схему 1). При этом энантиоселективному гидролизу химотрипсином по хорошо изученному механизму [21] подвергается свободный эфир (IV). Можно ожидать, что при проведении ферментативного гидролиза соединений (IIa—r) при их высоких концентрациях в растворе подвижное равновесие между свободным эфиром аминокислоты (IVa—r) и основанием Шиффа сдвигается в сторону последнего. Кроме того, в модельном эксперименте, проводимом в смеси CD_3CN и D_2O (9 : 1) без добавления химотрипсина, сравнительно медленно, по данным ПМР, устанавливается равновесие между основанием Шиффа и свободным эфиром (и альдегидом) (1 : 1). Полупериод реакции при комнатной температуре составляет 4 ч. При уменьшении объемного содержания воды до 5% равновесное соотношение компонентов составляет 4 : 1. Таким образом, при уменьшении объемного содержания воды в среде реакции доля свободного эфира аминокислоты в равновесной смеси уменьшается, что и может обуславливать наблюдаемое нами (данные не приведены) уменьшение скорости гидролиза субстрата в таких смесях.

Косвенным подтверждением того, что именно эфир со свободной NH_2 -группой является реакционноспособным, служит инертность в условиях реакции основания Шиффа (IIд), полученного из эфира фенилаланина и бензофенона (см. табл. 2), который, как известно [12], более устойчив к химическому гидролизу. По данным УФ- и ПМР-спектроскопии не происходит сколько-нибудь заметного распада этого основания Шиффа на свободные компоненты даже в течение 160 ч. Медленный гидролиз основания Шиффа (IIr) объясняется малой реакционной способностью эфира α -метилфенилаланина со свободной NH_2 -группой [13].

Экспериментальная часть

Растворители ацетонитрил, нитрометан и хлористый метилен очищали согласно [22]. Спектры ПМР растворов в $CDCl_3$ снимали на приборе Bruker WP-2000 и Tesla BS-467A. Углы вращения определены на спектрополяриметре Perkin — Elmer-241. Энантиомерный анализ аминокислот проводили методом ГЖХ с использованием высокотемпературной хиральной полисилоксановой диамидной неподвижной фазы типа «Хирасил» [23]. Аминокислоты анализировали в виде *N*-трифторацетильного производного изопропилового эфира на стеклянной капиллярной колонке длиной 25 м (внутренний диаметр 0,28 мм). Детектор пламенно-ионизационный (Carlo Erba), газ-носитель — гелий, система деления пробы цельностеклянная. Определяли энантиомерный избыток (е.е., %) одного из изомеров.

α -Химотрипсин (Ленинградский мясокомбинат им. Кирова) обладал активностью 66% от активности чистого коммерческого фермента.

Основание Шиффа (Ia) получали из эфира глицина и бензальдегида по методике [12]. Выход 89%, использовали без перегонки. Спектр ПМР: 7,9с (1H, CH=N), 6,9—7,6м (5H, Ph), 4,1с (2H, Me), 4,0к (2H, CH_2), 1,0т (3H, Me).

Основание Шиффа (Iб) получали аналогично из эфира аланина и бензальдегида по методике [14]. Выход 85%, т. кип. 130—132° С/2 мм рт.ст. Спектр ПМР в CDCl₃: 8,1с (1Н, СН=N), 7,0—7,7м (5Н, Ph), 4,05к (2Н, СН₂), 4,0к (1Н, СН), 1,4д (3Н, СН₃), 1,1т (3Н, СН₃).

Основание Шиффа (IIа) этилового эфира D, L-фенилаланина с бензальдегидом. 1,91 г (0,01 моль) основания Шиффа (Iа), 0,18 г (5 ммоль) ТВАI в 5 мл хлористого метилена и 2 мл 40% раствора NaOH перемешивали при 0° С и медленно добавляли раствор 1,8 г (11 ммоль) бромистого бензила в 3 мл хлористого метилена. Перемешивали 1 ч при 0° С и 2 ч при 20° С. Реакционную смесь фильтровали, экстрагировали CCl₄, промывали водой и упаривали. Выход 2,3 г (82%), т. кип. 180—184° С/1 мм рт.ст. ПМР-спектр: 7,9с (1Н, СН=N), 7,1—7,7м (10Н, 2Ph), 4,1к (2Н, СН₂), 3,8—4,0м (1Н, СН), 3,0—3,4м (2Н, СН₂), 1,2т (3Н, Me).

Основание Шиффа (IIб) этилового эфира D, L-(*o*-фторфенил)аланина с бензальдегидом получено алкилированием основания Шиффа (Iа), как это описано выше, с использованием *o*-фторбензилбромида. Выход 91%, т. кип. 183—186° С/1 мм рт.ст. ПМР-спектр: 7,85с (1Н, СН=N), 7,0—7,5м (5Н, Ph), 6,8м (4Н, F-C₆H₄), 3,85—4,0м (1Н, СН), 3,95к (2Н, СН₂), 2,9—3,2м (2Н, СН₂), 1,0т (3Н, Me).

Основание Шиффа (IIв) этилового эфира D, L-(*o*-фторфенил)аланина с бензальдегидом получено аналогично с использованием *o*-фторбензилбромида. Выход 88%, т. кип. 185—190° С/1 мм рт.ст. ПМР-спектр: 7,85с (1Н, СН=N), 6,8—7,6м (9Н, арил), 4,0к (2Н, СН₂), 3,7—3,85м (1Н, СН), 2,9—3,3м (2Н, СН₂), 1,05т (3Н, Me).

Основание Шиффа (IIг) этилового эфира D, L-(α -метил)фенилаланина с бензальдегидом получали алкилированием основания Шиффа (Iб) бензилбромидом согласно работе [14]. Выход 45%, т. кип. 188—190° С/1 мм рт.ст. Спектр ПМР: 7,85с (1Н, СН=N), 7,0—7,3м (10Н, 2Ph), 4,0к (2Н, СН₂), 3,1с (2Н, СН₂), 1,3с (3Н, Me), 1,1т (3Н, Me).

Основание Шиффа (IIд) этилового эфира D, L-фенилаланина с бензофеноном получали из эфира фенилаланина и имина бензофенона согласно работе [18]. Выход 80%, т. кип. 205—210° С/1 мм рт.ст. ПМР-спектр: 6,3—7,7м (15Н, 3Ph), 4,05к (2Н, СН₂), 4,0м (1Н, СН), 3,1м (2Н, СН₂), 1,1т (3Н, Me).

Общая методика ферментативного гидролиза эфиров оснований Шиффа аминокислот (IIа—г). К раствору основания Шиффа эфира аминокислоты (3 ммоль) в 9—9,5 мл MeCN добавляли 0,03 г α -химотрипсина в 0,5—1 мл воды и перемешивали несколько часов на магнитной мешалке. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали MeCN, сушили и анализировали методом энантиомерной ГЖХ. Реакционную смесь упаривали, осаждали белок 5% трихлоруксусной кислотой, фильтровали, раствор вновь упаривали. Остаток гидролизovali 6 н. HCl сначала при 20° С, экстрагируя выделяющийся бензальдегид бензолом, а затем при кипячении в течение 3 ч. После упаривания остаток также анализировали методом энантиомерной ГЖХ (свидетель — L-Val).

Получение L-фенилаланина в системе хлороформ — вода. К раствору 3 ммоль основания Шиффа (IIа) в 3 мл хлороформа добавляли 0,03 г α -химотрипсина в 15 мл воды и перемешивали 7 ч при 20° С. Водный слой экстрагировали трижды хлороформом, добавляли 10 мл 5% трихлоруксусной кислоты, фильтровали, упаривали до небольшого объема и очищали от солей на ионообменной смоле КУ-2 (в H⁺-форме), аминокислоту выделяли 5% аммиаком. Выход L-Phe 0,11 г (32% от теории). По данным энантиомерного ГЖХ-анализа, оптическая чистота более 98%. Из раствора хлороформа после упаривания и химического гидролиза 6 н. HCl аналогичным образом выделен фенилаланин, обогащенный D-энантиомером.

Ферментативный гидролиз реакционной смеси, полученной алкилированием основания Шиффа (Iа) бензилбромидом, проводили аналогично (табл. 1).

Контролируемый ПМР обратимый гидролиз основания Шиффа (IIа). Эфир (0,265 ммоль) растворяли в 1,2 мл CD₃CN, добавляли 0,1 мл D₂O

и гексаметилдисилоксан в качестве внутреннего стандарта. Смесь переносили в ампулу ПМР-спектрометра, которая помещалась в термостатированный при 25° С датчик прибора. За прохождением реакции следили по увеличению площади сигнала альдегидного протона при 9,8 м.д. и уменьшению площади сигнала альдиминного протона при 7,9 м.д. Соотношение продуктов реакции контролировалось по соотношению площадей этих сигналов.

Ферментативный гидролиз этилового эфира основания Шиффа (IIб) проводили в стандартных условиях в системе MeCN — вода при перемешивании в течение 160 ч. Выпадения аминокислоты не наблюдалось. Согласно данным ПМР- и УФ-спектроскопии (максимум поглощения основания Шиффа (IIд) 250 нм), гидролиз альдиминной связи в основании Шиффа в условиях реакции не идет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaneko T., Izumi Y., Chibata I., Itoh T. // *Synthetic Production and Utilization of the Amino Acids*. Tokio, Kodansha, 1874. Ch. 3. P. 53.
2. Кочетков К. А., Беликов В. М. // *Успехи химии*. 1987. Т. 56. № 11. С. 1832—1873.
3. Шведас В. К., Галаев И. Ю. // *Успехи химии*. 1983. Т. 52. № 12. С. 2039—2052.
4. Turk J., Panse G. T., Marshall G. R. // *J. Org. Chem.* 1975. V. 40. № 7. P. 953—955.
5. Bosshard H. // *Helv. chim. acta*. 1973. V. 56. № 6. P. 1838—1845.
6. Mizajawa T. // *J. Chem. Commun.* 1988. № 17. P. 1214—1215.
7. Gutman A. L., Bravo T. // *J. Org. Chem.* 1975. V. 54. № 18. P. 4263—4265.
8. Utaka M., Konishi S., Mizuoka A., Ohkubo T., Sakai T., Tsuboi S., Takeda A. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. № 21. P. 4989—4992.
9. Sakurai T., Margolin A. L., Russell A. J., Klibanov A. M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1988. V. 110. № 21. P. 7236—7237.
10. Yamada H., Shimizu S. // *Angew Chem. Int. Ed. Eng.* 1988. V. 27. P. 622—642.
11. Stork G., Leong A. Y. W., Touzin A. M. // *J. Org. Chem.* 1976. V. 41. № 21. P. 3491—3493.
12. Ghosez L., Antoine J. P., Deffense E., Navarro M., Libert V., O'Donnell M. J., Bruder W. A. // *Tetrahedron Lett.* 1982. V. 23. № 41. P. 4255—4258.
13. Модифицированные аминокислоты и пептиды на их основе. Гл. 3 / Ред. Чипенс Г. И. Рига: Знатьне, 1987. С. 29.
14. Yaozhong J., Chanqyou Z., Shengde W., Daimo V., Youan M., Guilan L. // *Tetrahedron*. 1988. V. 44. № 17. P. 5343—5353.
15. Barbas C. F., Matos J. R., West J. B., Wong C.-H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1988. V. 110. № 15. P. 5162—5166.
16. Кочетков К. А., Гарбалинская Н. С., Белоконов Ю. Н., Сапоровская М. Б., Беликов В. М. Способ получения L-фенилаланина: А. с. 1583442 // Б. И. 1990. № 29. С. 95.
17. Lam L. K. P., Hui R. A. H. F., Jones J. B. // *J. Org. Chem.* 1986. V. 51. № 11. P. 2047—2050.
18. O'Donnell M., Polt R. L. // *J. Org. Chem.* 1982. V. 47. № 13. P. 2663—2666.
19. Dupaix A., Bechet J.-J. // *FEBS Lett.* 1973. V. 34. № 2. P. 185—188.
20. Silver M. S. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1972. V. 151. № 1. P. 62—67.
21. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977. С. 126.
22. Органикум. М.: Мир, 1979. Т. 2. С. 353.
23. Сапоровская М. Б., Волкова Л. М., Павлов В. А. // *Журн. аналит. химии*. 1989. Т. 44. № 3. С. 525—528.

Поступила в редакцию
28.IV.1990
После доработки
8.I.1991

Yu. N. BELOKON', K. A. KOCHETKOV, V. I. TARAROV, T. F. SAVEL'eva,
N. V. FILEVA, N. S. GARBALINSKAYA, M. B. SAPOROVSKAYA, Z. B. BACASOVA,
A. G. RAIT

A NEW METHOD FOR THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE L-AMINO ACIDS FROM GLYCINE

A. N. Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A new method for the efficient chemical-enzymatic synthesis of some optically pure aromatic α -amino acids has been developed. Schiff's base derived from ethyl glycinate or alaninate and benzaldehyde were alkylated with substituted benzyl bromide under phase-transfer conditions followed by the hydrolysis with α -chymotrypsin in aqueous-organic medium to yield L-amine acids precipitated from aqueous acetonitrile. The remaining Schiff's base of D-amino acids esters were hydrolysed by HCL into D-amino acids. The enantiomeric purities of the amino acids were higher than 95%.