

黑曲霉催化烯烃的不对称双羟基化反应的机理和应用

张子张

(浙江大学 理学院化学系, 浙江 杭州 310027)

关键词: 不对称双羟基化; 黑曲霉; 单氧酶; 环氧化物水解酶; 手性二醇

中图分类号: TQ426.97 O643.3 **文献标识码:** A

以酶和活细胞为催化剂的生物催化/生物转化技术已受到广泛关注^[1~3]. 实际上, 生物催化作为对环境友好的绿色合成方法, 无疑将成为未来医药中间体和精细化学品的核心制造技术. 据估计, 自然界大约有 $10^6 \sim 10^7$ 微生物物种^[4], 其中只有大约 1% ~ 10% 得到分离、培育和某种程度的研究开发及利用. 另外, 尚有许多植物和动物来源的酶催化剂. 近年来出现的定向进化技术更使得在基因水平上设计和改良生物催化剂成为可能, 因此生物催化具有丰富的资源和广阔的发展前景.

黑曲霉(*Aspergillus niger*, AN)广泛存在于自然界. 黑曲霉活细胞可催化多种不同类型的化学反应, 是一个底物范围广、强劲耐用的生物催化剂. 我们旨在讨论黑曲霉活细胞催化的烯烃的双羟基化反应, 该反应具有高度的立体选择性, 反应所涉及的生物化学机理相当复杂, 但化学过程却简单、实用, 是一个高效的产生手性二醇化合物的催化方法.

1 双羟基化反应过程及其二步机理

1.1 AN 催化的香叶醇苯氨基甲酸酯孤立双键的不对称双羟基化反应

Fourneron 等^[5]发现全细胞 AN (LCP 521) 能够氧化单萜类化合物香叶醇衍生物 **1** (6, 7) 位上的非活化双键, 将后者转化为相应的二醇 **2**, 反应具有高度的区域选择性(如图 1 所示).

进一步的研究发现该双羟基化反应的立体化学输出随反应介质 pH 值的不同而不同. 实验表明, 在酸性条件下(pH 2), 主要产物为高对映体过量的

(6*S*)-**2** (ee > 95%); 在中性条件下(pH 7), 主要

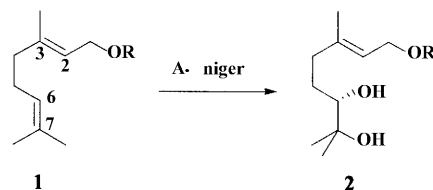


图 1 黑曲霉催化的香叶醇衍生物非活化双键的不对称双羟基化

Fig. 1 Asymmetric dihydroxylation of geraniol derivative mediated by *A. niger*

产物为高对映体过量的(6*R*)-**2** (ee > 95%); 而介于 pH 2 ~ 7 之间, 反应产物为两个对映体的混合物, 包括消旋体(6*RS*)-**2** (ee = 0) (如图 2 所示)^[6].

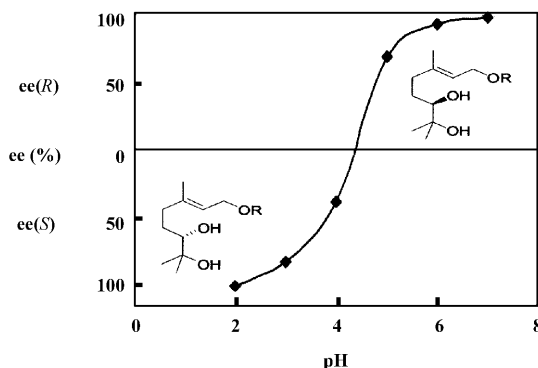


图 2 pH 与立体化学输出^[3]

Fig. 2 Stereochemical outcome vs. pH

1.2 AN 催化的反应过程及其化学机理

氧气氛中进行的¹⁸O₂的同位素示踪法等实验证明 AN 催化的双羟基化反应过程由氧化和水解两个

步骤组成. 氧化反应是由黑曲霉通过呼吸链单加氧酶(monooxygenase, MO)的作用将分子氧中的一个氧原子立体选择性地插入底物双键, 特异性地形成环氧化物中间体(6*S*)-**3**, 介质 pH 值对这一步反应没有影响. 水解反应中, 因介质酸度不同, 有两种机理分别起作用, 在 pH 2 下, 是酸催化的开环反应, 其中氧原子被质子化后开环形成较稳定的 7 位

叔碳正离子, 以 Sn1 历程形成(6*S*)-**2**, 中间体的绝对构象得以保留; 而在中性或弱碱性条件, 环氧化物水解酶(epoxide hydrolase, EH)的作用下, 水分子亲核进攻少取代的 6 位碳, 以 Sn2 历程, 形成(6*R*)-**2**, 绝对构象发生翻转; 而介于 pH 2~7 之间, 两种机理同时起作用, 形成部分(或全部)消旋的二醇(见图 3 所示)^[6].

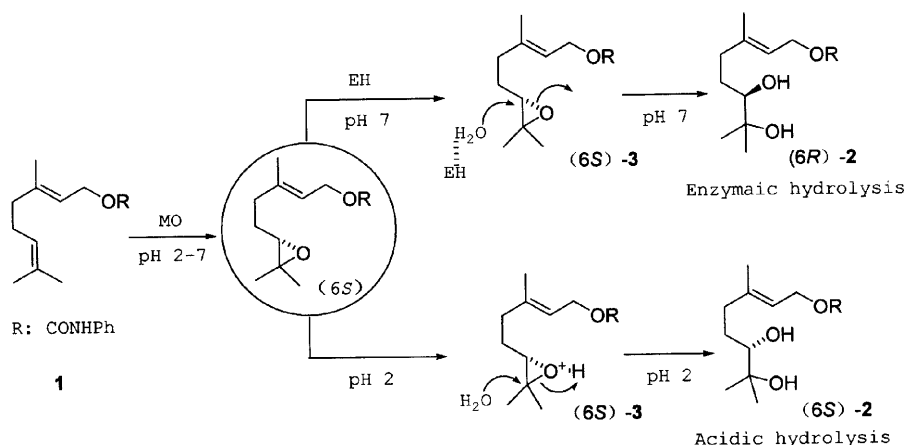


图3 双羟基化反应的二步机理

Fig. 3 Two-step cascade mechanism of the AN catalyzed dihydroxylation

1.3 AN 催化的生化机理探讨

上述 AN 活细胞催化过程主要涉及二个酶促反应: 细胞色素 P450 型 MO 催化的立体选择性氧化和 EH 催化的环氧化物水解反应. MO 和 EH 广泛存在于动物, 植物及微生物中. P450 MO 是一个纳米机器, 可催化多种不同类型的氧化反应, 如烯烃的环氧化、C-H 键的羟基化等^[7]. MO 氧化反应机理的研究是过去三十年来生命和化学科学领域研究的一大热点, 有许多综述文献和专著问世^[7,8], 其内容超出了本文的讨论范围, 不再赘述. 有关 AN-MO 催化的香叶醇衍生物的双羟基化反应机理的理论计算和体外实验尚未见报道, 对该反应表现出的高度区域及立体选择性的来源和分子水平上的催化机理, 还有待深入探讨. 自 Zhang^[6] 和 Hechtberger^[9] 先后在真菌和细菌中发现 EH 的存在及其作用以来, 微生物 EH 受到了广泛的关注, 已经形成生物催化领域的另一热点^[9-12]. EH (*A. niger* LCP521) 得到了深度的研究和开发, Zou 等^[13] 通过基因工程方法克隆并在大肠杆菌中表达了该 EH 基因. EH 的蛋白质单晶结构已在 0.18 nm 分辨率下获解析, 相应的数据可在蛋白数据库 PDB 上查到. 酶制剂也已有市场销售.

上述双羟基化反应得以实现, 除需考虑多酶的共同作用外, 还需考虑底物的跨膜能力和挂固因素. 底物结构需具有一定的亲脂性以透过细胞膜, 同时需有挂固基团以保证底物在酶的活性位点中占据正确的位置以使转化进行^[5, 6, 14, 15]. 我们讨论的生物转化中, 苯氨基甲酸基团被认为起这种挂固作用, 同样可以用于此目的还有, (1-苯基-乙基)氨基甲酸基和 7-羟基香豆素基. 和氨基甲酸基团相比, (1-苯基-乙基)氨基甲酸基中具有手性碳, 但该手性碳的存在对香叶醇的生物转化没有明显改善作用^[15]. 用 7-羟基香豆素基作挂固基, 可直接产生天然的 Marmin 及其非天然对映体^[13]. 有关底物挂固基团的系统性研究未见报道, 它对活细胞生物转化中的选择性(底物特异性, 区域选择性, 手性选择性)等的影响有待于进一步探讨.

综上所述, AN 催化的双羟基化反应机理包括反应 pH 值、MO 和 EH 的协同作用以及底物的跨膜能力和挂固作用. 该机理的揭示, 使得这一转化过程成为一个实际可用的合成方法. 该方法与纯化学催化反应在区域选择性, 立体选择性, 反应历程及机理上均有不同, 过程在水相中进行, 是化学方法的一个补充. 产物二醇是重要的合成子, 可广泛用

于天然化合物的合成,此方法成为合成这些复杂化合物的另一简捷通路.该生物转化过程作为手性二醇(6*S*)及(6*R*)-**2**的制备法,经 Holland 等实验验证,已被收录入 S M Roberts 编著的专著^[16].

2 应用示例

通过 AN 活细胞催化的双羟基化反应引入手性,这一方法可广泛地用于复杂化合物的合成,这些化合物包括:不对称合成子,天然产物 Marmin^[14~17,18]、环氧法尼醇、环氧角鲨烷^[18]、环氧化葡萄糖内酯^[17~19]、环氧化番茄色素^[20]、侧生孢黄嘌呤^[21]、昆虫保幼荷尔蒙^[21]、水果香精^[23~26]等等.限于篇幅,我们主要讨论以下几个应用实例.

2.1 多取代四氢呋喃和四氢吡喃环状化合物的合成

如图 4 所示,以(6*S*)-**2**为例((6*R*)同理),用

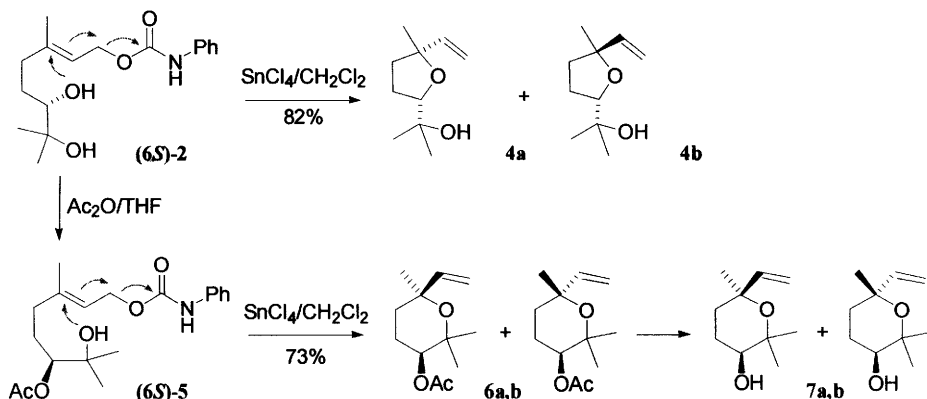


图 4 二醇合成子在天然产物合成中的应用示例

Fig.4 Utility of chiral diol in synthesis of natural products

2.2 香茅醇苯氨基甲酸酯孤立双键的双羟基化

香茅醇**6**,**7**-二醇四个立体异构体的合成 香茅醇和香叶醇结构很相似,应用香茅醇衍生物**8a**和**8b**作底物,AN 双羟化反应引入的第二个手性碳 C6 的构象,产物的构象仅取决于反应条件,与 C3 的手性无关.通过此法,分别从香茅醇的两个对映体出发可以制备其具有两个手性中心的(6,7)-二醇**9**的所有四个异构体(如图 5 所示).这些立体化学确定的合成子是有机合成(如加利福尼亚红害虫外性激素**10**的合成)中不可或缺的重要工具^[27].

2.3 香叶基香豆素孤立双键的不对称双羟基化

伞型素酮族化合物的合成 香豆素(Coumarins)及其衍生物广泛存在于自然界,特别是在伞形科(Umbelliferae)植物中含量甚多^[28]. Marmin**11**, (6',7')-环氧葡萄糖内酯**13**及(3',6')-环氧

路易斯酸处理,活化的 6 位氧在 C3 的二个前手性面 re 及 si 上等价进攻,引起 3 位上双键的迁移和苯氨基甲羧基的离去,分子内关环,形成不对称三取代的芳樟环环氧醇的两个顺反异构体**4a**,**4b**(50/50).用乙酰基保护 C6 羟基形成(6*S*)-**5**,同样的关环反应可形成顺反异构体**6a**,**6b**(50/50),进而得到不对称三取代的四氢吡喃衍生物的两个顺反异构体(**7a**,**7b**)[50/50].该对顺反异构体上一个碳的绝对构象相同,另一个碳的不同,是非对映体,可通过简单的柱色谱法方便地实现分离.平行地,从(6*R*)-**2**出发,可制备 4 和 7 的另外两个异构体**4c**和**4d**,**7c**和**7d**个(为简便起见,图中未标出结构).顺便指出,许多天然产物具有五元的呋喃和六元的吡喃环状结构单元,因此化合物**4**和**7**是重要的合成子,也是许多水果香精的组分^[23,24].

葡萄糖内酯**14**是代谢上相关的香叶基类香豆素.他们同属于伞型素酮(Umbelliferon)家族.天然 Marmin 的 X-衍射晶体结构新近才见报道^[29].伞型素酮化合物显示了多种有用的生物活性,包括抗菌、抗血凝、抗痉挛、抗由酒精引起的胃溃疡、以及抗 HIV 等活性^[30~32].

从结构上看,**11**与我们上面中讨论的产物**2**侧链相同.可以通过对映体特异性反应应用香豆素基团置换二醇**2**中的苯氨基甲酰基合成 Marmin 及其非天然对映体.然而从合成角度看,这一置换需要保护及去保护等多个反应步骤.在底物中直接应用香豆素基团,会使合成路线大大缩短.

香叶基香豆素**12**是难溶于水的固体,难以想象这样的化合物可以作为活细胞转化的底物,但实际上,将**12**以乙醇悬浮物状分散添加入反应体系,

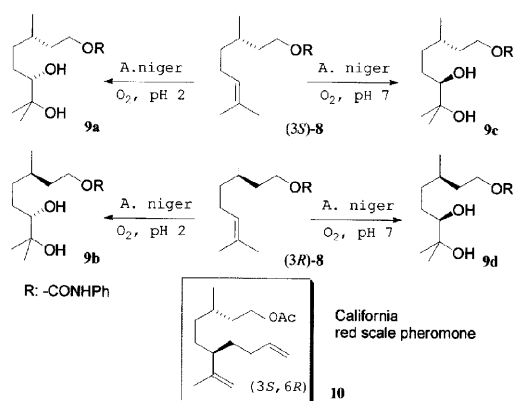


图5 香茅醇衍生物的不对称生物双羟基化反应

Fig.5 Asymmetric biotransformation of citronellol derivatives

双羟基化反应照常进行(如图6所示),在 pH 7 和 pH 2 条件下分别给出天然产物 Marmin(6'R)-**11** (43% 产率, 94% ee,) 和其非天然对映体(6'S)-**11** (60% 产率, 98% ee). (6'S)-**11** 可在不牺牲光学纯度的情况下立体特异性地经环化转化为 6', 7'-Epoxyaurapten(6R)-**13**^[1], 进而转化为架桥的二环化合物 3', 6'-Epoxyaurapten (R)-**14**. 同样地, (6'R)-**11** 可转化为这些化合物的另一对映体^[13,16~17], 实现其所有可能异构体的不对称合成.

2.4 (±) 6-甲基-5-庚烯-2-基苯氨基甲酸酯孤立双键的双羟基化

Pityol 的合成 (2R, 5S)-Pityol **15** (如图7所示) 是林木蛀虫 (Pityophthorus pityographus) 的雄性

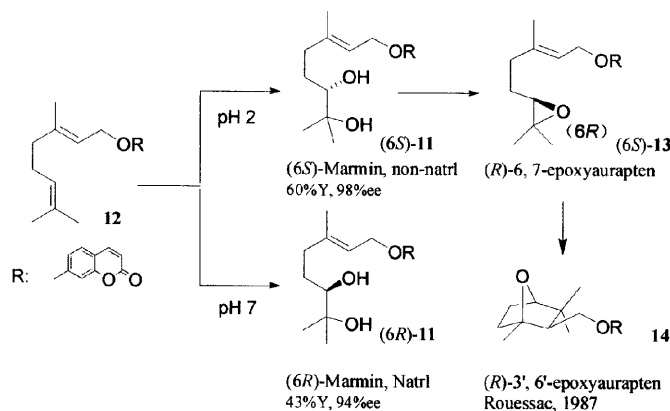


图6 香叶基香豆素的不对称双羟基化及伞型素酮类化合物的不对称合成

Fig.6 Asymmetric dihydroxylation of geranyl coumarin and chiral synthesis of Umbelliferons

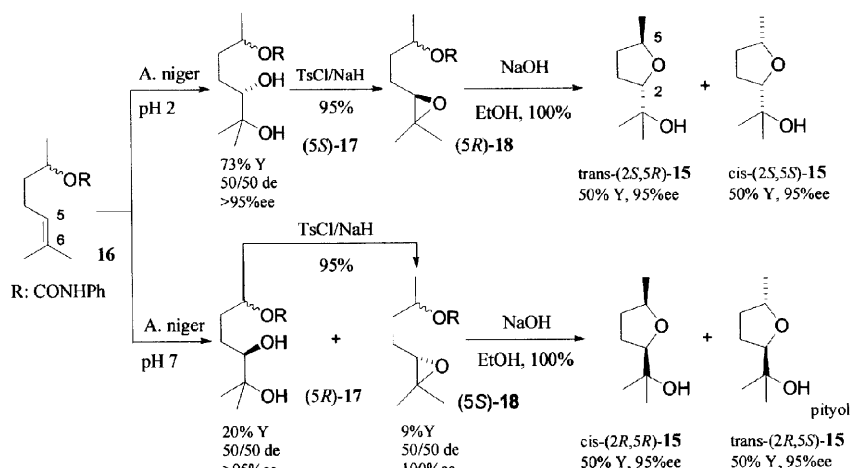


图7 食菌甲诱醇衍生物的不对称双羟基化及 pityol 四个立体异构体的合成

Fig.7 Asymmetric biotransformation of sulcatol derivative and synthesis of stereoisomers of pityol

特异性激素。用有效方法合成这一化合物及其立体异构体,对研究该害虫的行为,进化及其生态控制都有重要的意义。有关该化合物的合成报导不多,

Mori 等人从手性 3-羟基丁酸乙酯出发经 5 步反应制备了该化合物,总产率未见报导,最后一步产率 12%^[33,34]。

用食菌甲诱醇(Sulcatol, 粉蠹虫性信息素)的消旋体衍生物 **16** 作底物(由 6-甲基-5-庚烯-2-酮经 NaBH_4 还原、衍生制得), AN 双羟基化反应在 C5 上引入第二个手性碳, 其构象只取决于反应条件, 而与 C2 上的手性无关. 在 pH 2 和 pH 7 下分别给出 (2R, 5S)/(2S, 5S)-**17** (50/50) 和 (2S, 5R)/(2R, 5R)-**17** (50/50). 有趣的是, 在 pH 7 的实验中, 分离到少量 (5S) 构象的环氧化物 **18**. 不经分离, 直接用对甲苯磺酰氯/氢氧化钠处理 **17** 后, C5 上构象发生翻转关环形成相应的环氧化物 **18**. 后者经 NaOH (4N)/EtOH 处理, 苯氨基甲羧基脱去, 自由出来的羟基进攻环氧环上少取代的 C5, 绝对构象再一次翻转, 分子内关环形成 C2 (对应底物上的 C5) 上绝对构象为 (S) 的二取代四氢呋喃衍生物 *cis*-和 *trans*-**15** (50/50). 后者为非对映异构体, 可简单地通过柱色谱得以分离. 通过这一方法, 可以制得天然产物 Pityol**15** 及其所有四个立体异构体(如图 7 所示). 分析显示, 此法制得的每个异构体都具有高的对映体纯度 ($ee \geq 95\%$). 显然, 用已知 C2 构象的单个对映体的食菌甲诱醇出发, 用 pH 控制 C5 构象, 过程产出绝对构象一定的单一产物^[15].

3 结论与展望

AN 活细胞是个多酶系统. 其催化的双羟基化反应由 MO 和 EH(或 H^+) 配合完成. 利用这一原理, 通过调节 pH 值控制产物的立体化学, 可以随意地在烯烃双键上引入 (R) 或 (S) 构象的双羟基. 以该双羟基化反应为核心方法引入手性中心, 可以使许多复杂化合物的不对称合成变得简单. 文中通过对 9 类化合物, 共计 40 个异构体的合成的评述, 清楚地说明了这一点. 由于篇幅关系, 没有做与传统纯化学合成法在路线长短、反应条件、能耗、废物排放等方面的优劣对比, 但不难看出, 文中所列合成路线都很短. 我们知道, 缩短合成路线, 减少合成环节是整个过程降低排放的最有效途径. 而这正是生物转化法的优势所在. 可以预见, 通过进一步的开发, 这一绿色平台技术将在未来精细化学品的生产和循环经济中扮演重要角色.

参考文献:

- [1] Holland H L. *Current Opinion on Chemical Biology* [J], 1998, **2**: 77
- [2] a. Xin Jia - ying (辛嘉英), ZHAO Yong - jie (赵永杰), XIA Chun - gu (夏春谷), LI Shu - ben (李树本). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20** (1): 76 ~ 83
b. Liu Yong (刘 勇), Wumanjiang Aili (吾满江·艾力), Xamxi Kamar (夏木西长玛尔), *et al.* *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20** (3): 260 ~ 266
- [3] Gao Jing (高 静), Jiang Yan - jun (姜艳军), Ma Li (马 丽), Song Yu (宋 宇). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化) [J], 2006, **20** (4): 346 ~ 350
- [4] Cowan D. *Tibtech* [J], 2000, **18**: 14 ~ 16
- [5] Fourneron J D, Archelas A, Furstoss R. *J. Org. Chem.* [J], 1989, **54**: 4 686
- [6] Zhang X M, Archelas A, Furstoss R. *J. Org. Chem.* [J], 1991, **56**: 3 814
- [7] Meunier B, de Visser S P, Shaik S. *Chem. Rev.* [J], 2004, **104**: 3 947 ~ 3 980
- [8] Ortiz P R. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed. New York Kluwer Academic/Plenum Publishers: . 2005
- [9] Hechtberger P, Wirnsberger G, Mischitz M, *et al.* *Tetrahedron Asymmetry* [J], 1993, **4**: 1 161
- [10] Archelas A, Furstoss R. *Current Opinion in Chemical Biology* [J], 2001, **5**: 112
- [11] Jia J, Yang L, Zhang Z Z. *J. Zhejiang Univer. Sci. B* [J], 2006, **7** (1): 1
- [12] Kim I H, Morisseau C, Watanabe T, Hammock B D. *J. Med. Chem.* [J], 2004, **47**: 2 110
- [13] Zou J, Hallberg B M, Bergfors T, *et al.* *Structure* [J], 2000, **8**: 111
- [14] Zhang X M, Archelas A, Furstoss R. *Tetrahedron: Asymmetry* [J], 1991, **2**: 247
- [15] Zhang X M. PhD Dissertation, Université d'Aix - Marseille II, Oct 29, 1991
- [16] Zhang X M, Archelas A, Furstoss R. In: Roberts S M ed. *Biocatalysis for Fine Chemicals Synthesis* [M], Chichester, John Wiley and Sons, 1999, **3**: 5, 16
- [17] Aziz M, Rouessac F. *Tetrahedron Lett.* [J], 1987, **28** (23): 2 579
- [18] Aziz M, Rouessac F. *Tetrahedron* [J], 1988, **44** (1): 101
- [19] Yamada S, Oh - Hashi N, Archiva R. *Tetrahedron Lett.* [J], 1976, **17**: 2 557
- [20] Meier H, Vebelhart P, Eugster C H. *Helv. Chim. Acta.* [J], 1986, **69**: 106
- [21] Eschenmoser W, Vebelhart P, Eugster C H. *Helv.*

- Chim. Acta.* [J], 1983, **66**: 82
- [22] Imai K, Marumo S. *Tetrahedron Lett.* [J], 1976, **17**: 1 211
- [23] Méou A, Bouanah N, Archelas A, *et al.* *Synthesis*[J], 1991, 681
- [24] Méou A, Bouanah N, Archelas A, *et al.* *Synthesis*[J], 1990, 752
- [25] Flath R A, Forrey R R. *J. Agric. Food. Chem.* [J], 1977, **25**: 103
- [26] Winterhalter P, Katzenburger D, Schreier P. *Phytochemistry*[J], 1986, **25**: 1 347
- [27] Zhang X M, Archelas A, Furstoss R. *Tetrahedron: Asymmetry*[J], 1992, **3**: 1 369
- [28] Chartterjee A, Bhattacharya A. *J. Chem. Soc.* [J], 1959, 1 922
- [29] Gupta V K, Goswami S, Gupta B D. *Analytical Sciences* [J], 2006, **22**: XII
- [30] Kwon Y S, Choi W G, Kim W J, *et al.* *Arch. Pharm. Res.* [J], 2002, **25**: 154
- [31] Tao Z F, Qian X, Fan M. *Tetrahedron*[J], 1997, **53**: 13 329
- [32] Takase H, Yamamoto K, Hirano H, *et al.* *Jpn. J. Pharmacol.* [J], 1994, **66**(1):139
- [33] Mori K, Puapoomchareon P. *Liebigs Ann. Chem.* [J], 1989, 1 261
- [34] Mori K, Puapoomchareon P. *Liebigs Ann. Chem.* [J], 1987, 271

欢迎订阅《分子催化》

《分子催化》是由中国化学会主办、科学出版社出版,由中国科学院兰州化学物理研究所承办的向国内外公开发行的学术刊物. 主要报导有关分子催化方面的最新进展与研究成果. 辟有学术论文、研究简报、研究快报及进展评述等栏目. 内容侧重于络合催化、酶催化、光助催化、催化过程中的立体化学问题、催化反应机理与动力学、催化剂表面态的研究及量子化学在催化学科中的应用等. 工业催化过程中均相催化剂、固载化的均相催化剂、固载化的酶催化剂等的活化、失活和再生,以及用于新催化过程的催化剂的优选与表征等方面的稿件,本刊也很欢迎. 读者对象主要是科研单位及工矿企业中从事催化工作的科技人员、研究生、高等院校化学系和化工系师生. 欢迎相关专业人员投稿.

本刊为双月刊,每逢双月末出版,大16开本,约16万字,每册定价18.00元.

本刊为国内外公开发行. 中国标准刊号: ISSN 1001-3555/CN 62-1039/O6. 邮发代号: 54-69. E-mail 信箱: FZCH@lzb.ac.cn 网址: www.mcc.ac.cn

通过兰州市邮局发行. 亦可向本刊编辑部直接函购.

本部地址: 甘肃兰州市中国科学院兰州化学物理研究所《分子催化》编辑部

邮政编码 730000; 电话: (0931) 4968226; 传真: (0931) 8277088.