

酶促尿嘧啶与丙烯酸乙酯 Michael 加成反应的研究

王磊¹, 杜创², 吉腾飞³, 王智^{1*}, 曹淑桂^{1*}

(1. 吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林 长春 130023;

2. 吉林大学 材料与工程学院, 吉林 长春 130023;

3. 中国医学科学院 药物研究所中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

摘要:考察了4种水解酶在尿嘧啶与丙烯酸乙酯 Michael 加成反应中的催化效率. 初步探讨了反应溶剂, 反应温度, 反应时间, 底物配比, 酶添加量等反应条件对该加成反应的影响. 筛选得到最适反应条件, 在该反应条件下, Michael 加成反应产率可达 61.2%.

关键词:酶; 尿嘧啶; 丙烯酸乙酯; Michael 加成

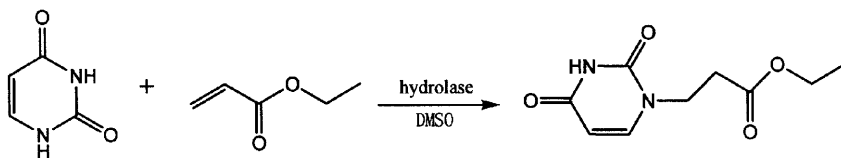
中图分类号: O643.3

文献标识码: A

在有机合成领域中, 生物活性化合物的合成日益引起人们关注. 很多嘌呤和嘧啶类化合物都可以作为抗病毒药物, 如芬昔洛韦 (penciclovir), 阿昔洛韦 (acyclovir), 泛昔洛韦 (famciclovir) 等. 这些化合物的合成可以通过对嘌呤和嘧啶的 N-烷基化或 Michael 加成反应制得^[1~3]. 随着上述化合物在临床应用上的迅速发展, 关于其合成方法的研究也已经成为有机化学中的研究热点. 近年来, 大量研究发现很多生物大分子如 RNA、抗体或酶都可以作为

催化剂对此类化合物进行 Michael 加成反应^[4~11]. 这些研究不但扩展了酶等生物大分子的应用范围, 也将 Michael 加成反应的催化剂研究引入了一个新领域, 但是这些生物催化剂催化该反应的最大缺点在于反应时间比较长, 反应收率低. 例如枯草杆菌碱性蛋白酶催化尿嘧啶与丙烯酸乙酯 Michael 加成反应时, 反应 72 h, 产率 49.5%^[12].

比较了4种水解酶在尿嘧啶与丙烯酸乙酯 Michael 加成反应 (Scheme 1) 中的催化效率, 对反应



Scheme 1 Michael addition reaction of uracil to ethyl acrylate catalyzed by hydrolase

溶剂, 底物配比, 酶添加量, 反应温度, 反应时间等反应条件进行了筛选.

1 实验部分

1.1 主要试剂及仪器

嗜热酯酶 APE1547 为吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室自行克隆、表达^[13]; Novozyme-435 购于丹麦诺维信公司; 枯草杆菌碱性蛋白酶 (Alkaline protease from *Bacillus subtilis*) 为无锡酶制品厂产品; 猪胰脂肪酶 (PPL, Porcine pancreas li-

pase) 购于 Sigma 公司. 层析硅胶为青岛海洋化工厂生产, 丙烯酸乙酯、尿嘧啶及其它化学试剂均为国产分析纯试剂. 测试仪器有: Varian Unity 500 型核磁共振仪, CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标; Avatar Nicolet Impact 410 型红外光谱仪; HPLC 型号 Waters P-600, DiamonsilC18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm 粒径), 紫外检测器.

1.2 酶促尿嘧啶与丙烯酸乙酯的 Michael 加成反应

将 0.005 mol (0.56 g) 尿嘧啶与 0.025 mol 丙烯酸乙酯混合溶于 25 mL 溶剂中, 加入一定量酶, 在

收稿日期: 2007-06-12; 修回日期: 2007-08-23.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20432010, 20672045, 30400081).

作者简介: 王磊, 男, 生于 1978 年, 讲师, 博士.

1) 通讯联系人, E-mail: caosg@mail.jlu.edu.cn; wangzhi@jlu.edu.cn; Tel: (0431) 88498972.

一定温度下反应一段时间. 反应结束后, 将酶粉滤出, 减压蒸除溶剂. 剩余物质用二氯甲烷萃取, 并用水洗涤, 减压除去二氯甲烷得粗产品.

1.3 加成产物产率确定方法

取出少量反应液, 减压除去溶剂, 剩余物质溶于甲醇, 滤去酶粉, 采用 HPLC 测定加成产物产率. HPLC 具体检测条件为: 检测波长 260 nm, DiamonsilC18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm 粒径), 流动相为甲醇/水(80/20, 体积比), 流速为 0.8 mL/min.

1.4 产品纯化以及结构表征

粗产物用硅胶柱层析(甲醇/氯仿/乙酸乙酯 = 1/4/10, 体积比)进行纯化. 得到白色晶体, 熔点: 78 ~ 80 ℃. 产物结构经 IR, ¹H-NMR 进行了确证. IR: 1 725.28 cm⁻¹ (O = C-O-); 1 696.30, 1 681.53 cm⁻¹ (嘧啶环). ¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 8.558 (s, 1H, O = C-NH-C = O), 7.386 (d, 1H, J = 8.0 Hz, O = C-N-C =), 5.660 (d, 1H, J = 8.0 Hz, O = C-CH =), 4.159 (q, 2H, J = 7.0 Hz, O-CH₂), 3.988 (t, 2H, J = 6.0 Hz, N-CH₂-), 2.779 (t, 2H, J = 6.0 Hz, CH₂-C = O), 1.240 (t, 3H, J = 7.0 Hz, -CH₃).

2 结果与讨论

2.1 酶源影响

酶在有机介质中催化反应, 由于来源不同, 往往会导致其稳定性以及催化活性存在较大的差异. 为了研究酶在该 Michael 加成反应中的催化能力, 本文选用了 4 种不同来源的酶制剂进行了研究, 实验结果如表 1 所示.

表 1 尿嘧啶与丙烯酸乙酯的 Michael 加成反应中酶源筛选
Table 1 Enzyme screening for Michael addition of uracil and ethyl acrylate

The type of enzyme	Yield (%)
None	No reaction
APE1547	18.5
Novozyme-435	21.5
Alkaline protease from Bacillus subtilis	9.4
Porcine pancreas lipase	5.6

Experimental conditions: 0.005 mol uracil; 0.025 mol ethyl acrylate; 15 mg/mL enzyme; 25 mL DMSO; 50 ℃; 12 h

由表 1 中数据可以发现, Novozyme-435 催化该

Michael 加成反应的活性最高, 嗜热酯酶 APE1547 其次, 而枯草杆菌碱性蛋白酶和 PPL 最低. 在该反应中, 由于强极性有机溶剂 DMSO 作为反应介质, 反应温度为 50 ℃, 因此可能导致部分枯草杆菌碱性蛋白酶和猪胰脂肪酶失活变性, 这也许是造成它们催化活力较低的主要原因; 而 Novozyme-435 是一种商品化的固定化酶(固定化载体为大孔聚丙烯酸树脂), 该酶具有较高的热稳定性以及耐有机溶剂的能力, 因此催化性能最佳; 嗜热酯酶 APE1547 来源于嗜热性古细菌 Aeropyum pernix K1, 同样具有耐热和耐有机溶剂的能力. 由于 Novozyme-435 价格昂贵, 本文将以嗜热酯酶 APE1547 作为催化剂对该 Michael 加成反应进行研究.

2.2 反应溶剂影响

在非水酶学的研究中, 反应介质是最重要的影响因素之一. 反应介质不但影响酶分子的空间构象, 而且能够直接或间接地与底物和产物发生相互作用, 进而影响酶的催化活性. 一种良好的反应介质不但应该能够保持酶分子的催化活性构象, 而且应该能很好的溶解反应底物. 在本研究中, 由于尿嘧啶在多种有机溶剂中的溶解度不是很好, 因此反应介质的筛选就显得更加重要.

实验结果(表 2)表明, 以疏水性有机溶剂作为表 2 溶剂对 Michael 加成反应的影响

Table 2 Effect of solvents on the enzyme catalyzed michael addition^a

Solvent	Log P	Yield (%) ^b
Cyclohexane	3.4	2.1
Benzene	2.1	4.8
Chloroform	2.0	7.5
Dichloromethane	0.6	8.2
Pyridine	0.65	16.3
DMSO	-1.3	18.5

^a Experimental conditions: 0.005 mol uracil; 0.025 mol ethyl acrylate; 15 mg/mL APE1547; 25mLSolvent; (25 mL) 50 ℃; 12 h; ^b Evaporated solvent, then methanol was added to residue and filtration; yield was determined by HPLC analysis.

反应介质, 反应产率普遍较低; 而吡啶, DMSO 等强极性有机溶剂作为反应介质时, 加成反应产率较高. 我们认为出现这种现象的主要原因是由于尿嘧啶在不同有机介质中具有不同程度的溶解性造成

的, 强极性有机溶剂(如吡啶, DMSO 等)能够较好溶解尿嘧啶, 使反应体系中的底物浓度大幅度提高, 因此有利于反应的进行. 另外, 有研究表明 DMSO 作为反应介质时容易导致酶变性失活^[14], 但是在本研究中, APE1547 在以 DMSO 作为反应介质时可得到较高反应产率. 我们推测这是因为嗜热酯酶 APE1547 具有很强的耐有机溶剂能力. 通过在蛋白质结构分析工作站上对嗜热酯酶 APE1547 的 3D 结构进行分析^[15,16], 发现它具有一个立体的电荷作用网, 导致该酶具有一种独特的刚性结构, 正是这种独特的刚性结构使嗜热酯酶 APE1547 在极性溶剂 DMSO 中依然能够保持其酶活性中心的结构完整性, 因此能够保持较高的催化活性和稳定性.

2.3 反应温度影响

一般来说, 当反应温度升高时酶的催化速度也增加, 这符合化学催化剂的一般规律; 但是当温度继续升高, 酶分子的变性失活速度也会增加. 由于本研究中所使用的酶制剂是嗜热酯酶 APE1547, 其最适温度范围为 50 ~ 80 °C^[17], 因此为了筛选得到该酶催化 Michael 加成反应的最适反应温度, 本研究选择了 30 ~ 100 °C 的反应温度范围, 考察了反应温度的影响, 实验结果如图 1 所示.

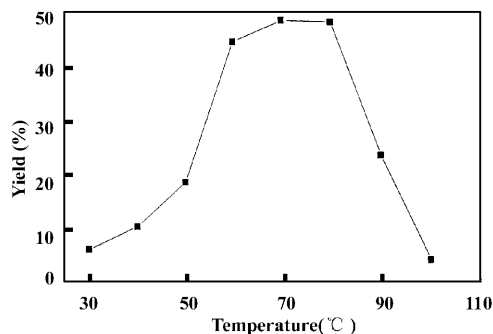


图 1 反应温度对 Michael 加成反应的影响

Fig. 1 Effect of the reaction temperature on the enzyme catalyzed Michael addition

Experimental conditions: 0.005 mol uracil;
0.025 mol ethyl acrylate; 15 mg/mL enzyme;
25 mL DMSO; 12 h

实验结果表明: 在较低温度下, APE1547 催化加成反应的活性较低; 随着反应温度的上升, 催化活性不断增加, 70 °C 时催化活性最高(反应 12 h 产率可达 48.2%), 温度在 70 ~ 80 °C 之间时, 产率变化不大; 当反应温度超过 90 °C 时, 反应产率急剧下降, 可见 APE1547 催化该加成反应的最适温度为

70 °C. 我们认为: 在较低温度下, 加成反应的两种底物的扩散速度较低, 而且嗜热酶 APE1547 也失去了它的最佳催化构象, 从而导致反应进行缓慢; 而当反应温度高于酶催化反应的最适温度时, APE1547 在有机溶剂 DMSO 中可能出现部分失活变性的情况, 因此催化该反应的活力急剧下降. 嗜热酯酶 APE1547 之所以在 70 °C 下能够表现出最大的催化活性, 主要是由于该酶分子中含有大量的盐桥、氢键、离子对; 而且酶分子中的大量芳香基团的相互作用及疏水基团的相互作用也增强了蛋白疏水内核的相互作用力, 这些都可以在高温条件下增强该酶的蛋白构象的刚性, 从而能够抵抗热振动对酶蛋白结构的破坏, 使酶在高温条件下仍然发挥其正常的催化功能.

2.4 反应时间影响

反应时间影响该酶促加成反应的实验结果如图 2 所示. 可以发现利用嗜热酯酶 APE1547 作为催化

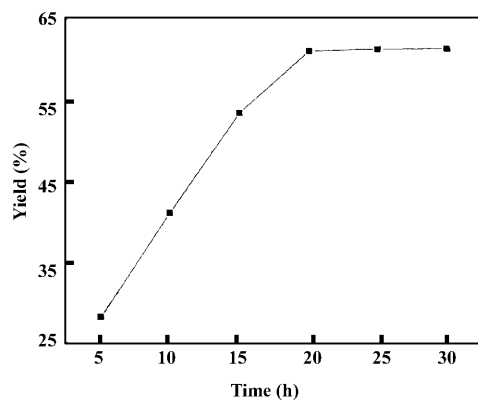


图 2 反应时间对 Michael 加成反应的影响

Fig. 2 Effect of the reaction time on the enzyme catalyzed Michael addition

Experimental conditions: 0.005 mol uracil;
0.025 mol ethyl acrylate;
15 mg/mL enzyme; 25 mL DMSO; 70 °C

剂, 反应温度为 70 °C 可以使该加成反应在较短的时间内(20 h)产率达到 61.2%, 随着反应时间的进一步延长, 产率基本保持不变. 因此最适反应时间为 20 h.

2.5 底物配比影响

由于 Michael 加成反应是一个双底物分子反应, 因此底物比例对反应进行必然存在一定的影响. 由于尿嘧啶在 DMSO 中溶解度不是很大, 因此固定尿嘧啶(0.001 mol/5 mL)的量, 通过改变丙烯酸乙酯的量来考察底物对比对 Michael 加成反应的

影响, 实验结果如表 3 所示. 实验结果表明, 随着丙烯酸乙酯和尿嘧啶摩尔比的增加, 产物收率随之增加, 并在比例达到 5: 1 时达到最大, 继续增加二者比例对反应产率没有明显影响.

表 3 底物配比对 Michael 加成反应的影响

Table 3 Effect of molar ratio (ethyl acrylate to uracil) of substrates on the Michael addition

Molar ratio	yield (%)
0. 5: 1	16. 8
1: 1	38. 3
2: 1	53. 4
5: 1	61. 2
7: 1	60. 9
9: 1	60. 7

Experimental conditions; 0. 005 mol uracil;
15 mg/mL APE1547; 25mL DMSO; 70 ℃; 20 h

2. 6 酶添加量影响

表 4 的实验结果表明, 一定程度上提高单位反

表 4 酶添加量对 Michael 加成反应的影响

Table 4 Effect of enzyme amount on the enzyme catalyzed michael addition

Enzyme amount (mg/mL)	Yield (%)
5	41. 5
10	56. 3
15	61. 2
20	60. 6
25	60. 8

Experimental conditions; 0. 005 mol uracil; 0. 025 mol ethyl acrylate; 25 mL DMSO; 70 ℃; 20 h

应介质中的酶添加量可加速酶促反应; 但是当酶添加量达到一定值时, 酶添加量的增加对酶促反应速度的影响减小. 但若继续延长反应时间, 则无论酶用量多少, 最终反应的产率均可达 60% 以上, 因此, 酶添加量多少改变反应速度, 而反应最终产率并未发生变化. 从经济角度考虑, 选择单位反应介质中酶添加量为 15 mg/mL.

3 结 论

在嗜热酯酶 APE1547 催化 Michael 加成反应过程中, 反应温度、反应时间、底物配比、酶添加量均对反应产率有影响, 在最适反应条件下加成反应

产率可达 61. 2%. 本研究为酶催化 Michael 加成反应提供了一定的实验依据, 同时也扩展了嗜热酯酶在有机合成中的应用. 由于尿嘧啶与丙烯酸乙酯不是嗜热酯酶 APE1547 的最适底物, 而且 Michael 加成反应也不是酯酶的最适催化反应类型, 因此反应产率并不是很高, 不过通过分子生物学手段对其进行突变, 则很有可能筛选得到具有更高活性的嗜热酶; 另外利用离子液体作为反应介质也很有可能大幅度提高 Michael 加成反应产率, 相关研究正在进行中.

参考文献:

[1] Bhujangs R A, Gundu R C, Singh B B. *J. Org. Chem.* [J], 1990, **55**: 3 702

[2] Martín-Aranda R M, Lopez-Pestana J M. *J. Mol. Catal. A: Chem.* [J], 1997, **124**: 115

[3] Martín-Aranda R M, Ortega-Cantero E, Rojas-Cervantes M L. *Catal. Lett.* [J], 2002, **84**: 201

[4] Kitazume T, Murata K. *J. Fluorine Chem.* [J], 1988, **39**: 75

[5] Sengle G, Eisenf hr A, Arora P S. *Chem. Biolo.* [J], 2001, **8**: 459

[6] Dai H X, Yao S P, Wang J. *Biotechnol. Lett.* [J], 2006, **28**: 1 503

[7] Cook C E, Allen D A, Miller D B. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1995, **117**: 7 269

[8] Chen Zhi-gang(陈志刚), Zong Min-hua(宗敏华), Lou Wen-yong(娄文勇). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2007, **21**(1): 90 ~ 95

[9] Qi Na(戚娜), Fu Shao-jun(傅绍军), Zhu LI-min(朱利民). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2007, **21**(2): 168 ~ 171

[10] Zhang Zi-zhang(张子张). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2008, **22**(1): 86 ~ 96

[11] Wang Hai-ou(王海鸥), Wang Yan-ji(王延吉), Li Fang(李芳), Zhao Xin-qiang(赵新强). *J. Mol. Catal. (China)* (分子催化)[J], 2007, **21**(1): 85 ~ 89

[12] Ying C, Jian Y W, Na W. *Chin. Chem. Lett.* [J], 2004, **15**: 594

[13] Gao R J, Feng Y, Kazuhiko I. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* [J], 2003, **24 ~ 25**: 1

[14] Pedersen N R, Kristensen J B, Bauw G. *Tetrahedron: Asymmetry*[J], 2005, **16**: 615

[15] Zhang G R, Gao R J, Zheng L Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* [J], 2006, **38**: 148

[16] Bartlam M, Wang G G, Yang H T. *Structure*[J], 2004,

12: 1 481

2002, 58: 1 054

[17] Wang G G, Gao R J, Ding Y. *Acta Crystallogr D* [J],

Study on the Enzymatic Michael Addition of Uracil to Ethyl Acrylate

WANG Lei¹, DU chuang², JI Teng-fei³, WANG Zhi^{1*}, CAO Shu-gui^{1*}

(1. *Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130023, China;*

2. *College of Materials Science and engineering, Jilin University, Changchun 130023, China;*

3. *Key Laboraory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine Ministry of Education, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)*

Abstract: Four kinds of hydrolase were used to catalyze the Michael addition reaction of uracil to ethyl acrylate. The optimum conditions (reaction solvent, reaction temperature, reaction time, molar ratio of two substrates and enzyme amount, et al) were screened out. Under the optimum conditions, 61.2% yield of the product was obtained.

Key words: Enzyme; Uracil; Ethyl acrylate; Michael addition