

L-酪氨酸甲酯消旋及 Alcalase 2.4L 催化对映选择性水解制备 D-酪氨酸

徐红梅, 何从林, 夏仕文*

(重庆邮电大学 生物信息学院, 重庆 400065)

摘要: 提出了一个 5-硝基水杨醛催化 L-酪氨酸甲酯消旋化的新方法并推测了 L-酪氨酸甲酯的消旋机理. 在乙腈/磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中, 5-硝基水杨醛催化 L-酪氨酸甲酯消旋为 DL-酪氨酸甲酯, 消旋率 100%, 消旋收率 93%. 优化了 Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸甲酯对映选择性水解的反应条件. 30 °C 下, 在叔丁醇/磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中, Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸甲酯对映选择性水解为 L-酪氨酸和 D-酪氨酸甲酯. 在酶催化水解过程中, L-酪氨酸形成沉淀, 容易通过简单的过滤进行分离. D-酪氨酸甲酯在碱性条件下水解为 D-酪氨酸, 收率 91%, ee97%.

关键词: 消旋; DL-酪氨酸甲酯; Alcalase 2.4L; 对映选择性水解; D-酪氨酸

中图分类号: Q814.1; O643.3

文献标志码: A

D-酪氨酸是一种非蛋白源氨基酸, 是多肽药物和抗肿瘤手性药物的重要中间体^[1-3]. 例如, 以 D-酪氨酸为手性中间体合成的多肽药物阿托西班是一种保胎药. D-酪氨酸的制备方法主要有优势结晶法、化学拆分法、生物拆分法、微生物转化法等. 彭阳峰等^[4]报道了通过 DL-酪氨酸甲酯与 D-酒石酸形成二酪氨酸甲酯酒石酸盐制备 D-酪氨酸的方法, 收率 26%, ee99%. Takahashi 等^[5]以 *Proteus-vulgaris* 细胞为生物催化剂, 通过选择性降解 DL-酪氨酸中的 L-酪氨酸制备 D-酪氨酸, 收率 29.9%, ee99.5%.

Alcalase2.4L 是一种廉价的碱性蛋白酶, 其主要酶组分为丝氨酸型枯草杆菌蛋白酶, 在食品工业中用于蛋白质水解. 除了蛋白质水解活性外, Alcalase 2.4L 亦具有酯酶活性, 在有机溶剂中具有高活性和稳定性^[6-7], 能催化 DL-氨基酸酯或 DL-N-保护氨基酸酯对映选择性水解为 L-氨基酸或 L-N-保护氨基酸^[8]. Tomiuchi^[9]系统研究了水溶性辅溶剂、水含量对枯草杆菌蛋白酶催化 DL-酪氨酸乙酯对映选择性水解的影响, 在乙腈-水 (9 : 1, v/v) 体系中, L-酪氨酸的收率 40% ~ 48%, ee 96% ~ 99%, 未报道 D-酪氨酸乙酯的收率和 ee 值. 在叔丁醇/水

(95 : 5, v/v) 或乙腈/水 (4 : 1, v/v) 体系中, 组合吡哆醛-5-磷酸^[10]、吡啶-2-甲醛^[11]、3,5-二氯水杨醛^[12]催化 D-酪氨酸苄酯的原位消旋和 Alcalase 2.4L 催化 L-酪氨酸苄酯的对映选择性水解, 实现了 DL-酪氨酸苄酯的动态动力学拆分, L-酪氨酸收率分别为 95%、63%、95%, ee 分别为 97%、>98%、99%. 这些动态动力学拆分方法适合制备高光学活性 L-酪氨酸, 不能用于 D-酪氨酸的有效制备.

我们首先以 L-酪氨酸为原料形成 L-酪氨酸甲酯, 以 5-硝基水杨醛为催化剂在温和条件下催化 L-酪氨酸甲酯消旋为 DL-酪氨酸甲酯. 在此基础上以 Alcalase 2.4L 为催化剂, 在叔丁醇/水单相体系中催化 DL-酪氨酸甲酯对映选择性水解为 L-酪氨酸和 D-酪氨酸甲酯, 后者在碱性条件下水解为 D-酪氨酸 (图示 1).

1 实验部分

1.1 实验材料

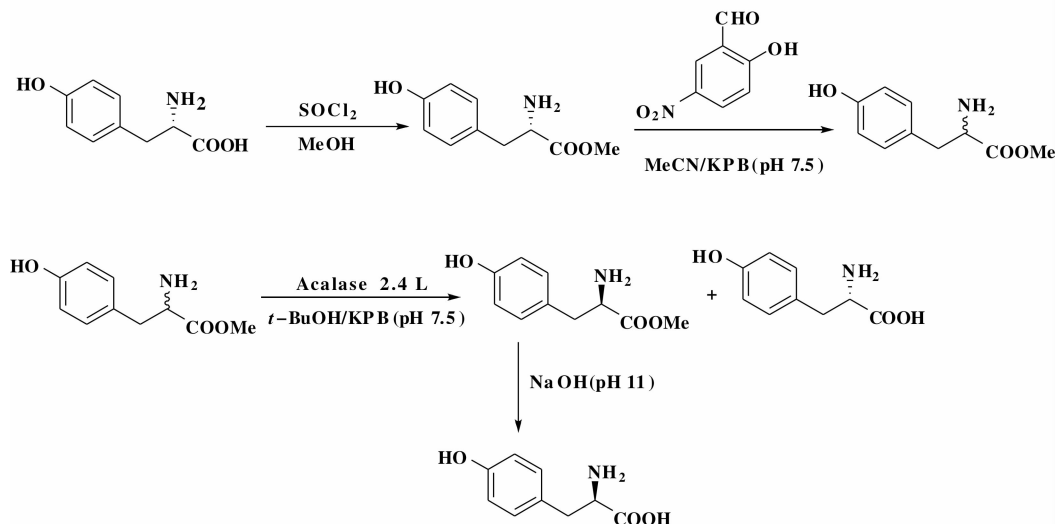
Alcalase2.4L (2.4 AU/g, 诺维信 (中国) 公司), L-酪氨酸 (四川同晟氨基酸有限公司), 5-硝基水杨醛 (巨野锦晨精细化工有限公司), 二氯亚砷、甲醇、乙腈、叔丁醇等为市售化学纯或分析纯试剂.

收稿日期: 2013-03-03; 修回日期: 2013-05-03.

基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC, 2009BB5286) .

作者简介: 徐红梅 (1977-), 女, 硕士, 讲师.

* 通讯联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn.



图示1 L-酪氨酸甲酯消旋化和 DL-酪氨酸甲酯的 Alcalase 2.4L 催化拆分

Scheme 1 Racemization of L-tyrosine methyl ester and alcalase 2.4L catalyzed resolution of DL-tyrosine methyl ester

1.2 实验方法

1.2.1 碱性蛋白酶活性测定 1.95 g (0.01 mol) DL-酪氨酸甲酯溶解于 19 mL 叔丁醇和 1 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中, 加入 0.5 g Alcalase 2.4L, 30 °C 下反应 10 min, 离心, 手性 HPLC 测定 L-酪氨酸甲酯的水解量. 酶活性定义为 1 min 内催化 1 μmol L-酪氨酸甲酯水解的酶量 (g).

1.2.2 L-酪氨酸甲酯制备 在装有搅拌器、温度计和恒压滴液漏斗的三颈瓶中加入 250 mL 甲醇, 冰浴中冷却至 0 ~ 5 °C, 缓慢滴加 22 mL (0.35 mol) 二氯亚砷. 滴加完毕, 搅拌 1 h, 然后加入 45 g (0.25 mol) L-酪氨酸, 溶解后升至室温, 反应 2 h, 然后在 65 °C 下继续反应 2 h, 50 °C 下减压浓缩至干, 得 L-酪氨酸甲酯盐酸盐. 残余物加 200 mL 水溶解, 冰浴下缓慢加入浓氨水, 调 pH 8.5 ~ 9.0, 冷冻过夜, 抽滤, 烘干, 得 L-酪氨酸甲酯 41 g, 收率 84%.

1.2.3 L-酪氨酸甲酯消旋化 将 41 g (0.21 mol) L-酪氨酸甲酯溶于 240 mL 乙腈和 60 mL KPB (pH 7.5) 中, 加入 877 mg 5-硝基水杨醛 (5.25 mmol), 室温下搅拌 24 h, 蒸干, 加 150 mL 水, 浓盐酸酸化至 pH 1 ~ 2, 用二氯甲烷萃取 2 次 (2 × 100 mL), 回收 5-硝基水杨醛. 滤液用活性炭脱色, 冰浴下缓慢加入浓氨水, 调 pH 8.5 ~ 9.0, 冷冻过夜, 抽滤, 烘干, 得 DL-酪氨酸甲酯 38 g, 收率 93%.

1.2.4 DL-酪氨酸甲酯酶催化拆分 19.5 g (0.1 mol) DL-酪氨酸甲酯加入 190 mL 叔丁醇和 10 mL

磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中, 搅拌溶解后, 加入 5 g Alcalase 2.4L, 30 °C 搅拌反应 2 h, 冷至 0 °C, 抽滤, 固体用叔丁醇搅拌洗涤 2 次 (2 × 50 mL), 烘干得 L-酪氨酸 8.5 g, 收率 94%. 酶拆分后的滤液合并, 用 6 mol/L NaOH 调 pH 11.5, 室温下搅拌反应过夜, 用 10% 柠檬酸溶液调 pH 5.7, 冷至 0 °C, 抽滤, 固体用水洗涤 2 次 (2 × 50 mL), 烘干得 8.2 g D-酪氨酸, 收率 91%, ee 97%. $[\alpha]_D^{25} + 10.5^\circ$ (C = 5, 1N HCl). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$): δ = 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, 6-H, 8-H), 7.22 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, 5-H, 9-H), 4.84 (dd, J = 4.8 Hz, J = 8.5 Hz, 1 H, 2-H), 3.72 (dd, J = 4.8 Hz, J = 5.1 Hz, 1 H, 3-H), 3.51 (dd, J = 8.7 Hz, J = 15.1 Hz, 1 H, 3-H) ppm.

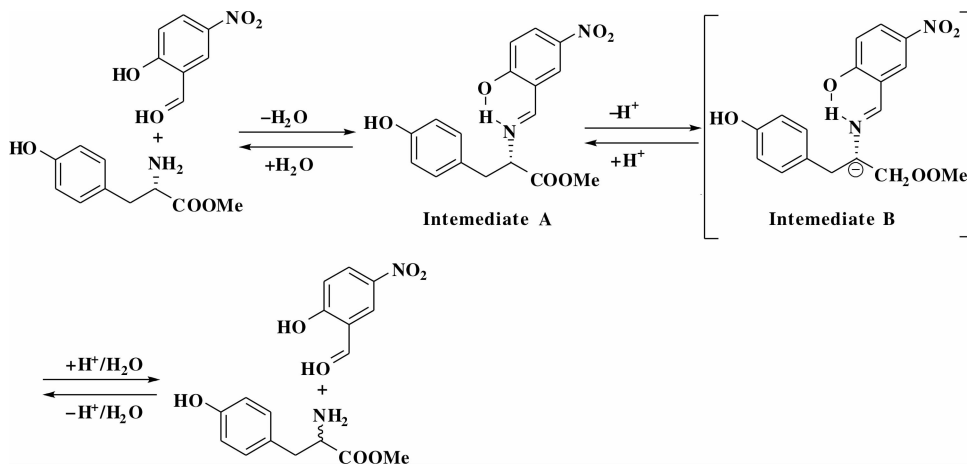
1.2.5 分析方法 酪氨酸和酪氨酸甲酯采用反相 HPLC 测定. 色谱柱: C18 柱 (4.6 × 250 mm, 5 μ), 流动相: 磷酸溶液 (pH 3.0)/乙腈 (90 : 10, v/v), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 214 nm, 温度: 25 °C. DL-酪氨酸、DL-酪氨酸甲酯的对映体采用手性 HPLC 分离. 手性柱: Crownpak CR(+) (4 × 150 mm, 5 μ, 大赛璐化学工业公司), 流动相: 高氯酸溶液 (pH 1.58), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 200 nm, 温度: 25 °C. 酪氨酸的 D-和 L-对映体保留时间分别为 4.67 min、6.11 min, 酪氨酸甲酯的 D-和 L-对映体保留时间分别为 8.90 min、11.6 min. D-酪氨酸的对映体过量 (ee) = $(C_D - C_L) / (C_D + C_L) \times 100\%$,

其中 C_D 、 C_L 分别为 D-酪氨酸和 L-酪氨酸的摩尔浓度. 对映体选择性 $(E) \ln[1-C(1+ee_L)]/\ln[1+C(1-ee_L)]$, 其中 C 为 L-酪氨酸甲酯的转化率, ee 为 L-酪氨酸的对映体过量.

2 结果与讨论

2.1 L-酪氨酸甲酯消旋化

相对于其他氨基酸甲酯, L-酪氨酸甲酯具有结构特殊性, 很难采用常规方法消旋. 苯甲醛尽管能够与 L-酪氨酸甲酯形成席夫碱, 但不能催化 L-酪氨酸消旋. 在同样条件下, 以水杨醛为催化剂, L-酪氨酸甲酯仅有 8% 消旋. 进一步地, 以 5-硝基水杨醛为催化剂, L-酪氨酸甲酯在 24 h 内完全消旋(图 1). 研究表明, 在苯甲醛衍生物中, 2-羟基的存在是催化 L-酪氨酸甲酯消旋的基础, 5-硝基水杨醛中硝基的吸电子效应显著增强催化活性. 5-硝基水杨醛首先与 L-酪氨酸甲酯缩合为中间体 A, 中间体 A 手性碳上的 α -氢酸性增强, 发生快速的质子化-去质子化形成中间体 B, 从而导致 L-酪氨酸甲酯消旋. 中间体 B 水解释放出 DL-酪氨酸甲酯和 5-硝基水杨醛(图示 2).



图示 2 5-硝基水杨醛催化 L-酪氨酸甲酯消旋的机理假设

Scheme 2 Proposed mechanism for 5-nitrosalicylaldehyde-catalyzed racemization of L-tyrosine methyl ester

2.2 DL-酪氨酸和 DL-酪氨酸甲酯的手性分离

为了测定 Alcalase 2.4L 的酶活性并研究 DL-酪氨酸甲酯酶催化反应过程和随后的 D-酪氨酸甲酯碱性皂化过程, 我们首先建立了同时分离 DL-酪氨酸、DL-酪氨酸甲酯两个对映体的手性 HPLC 方法. 在选定条件下, D-和 L-酪氨酸, D-和 L-酪氨酸甲酯均能达到基线分离(图 2-a). D-酪氨酸、L-酪氨酸、D-酪氨酸甲酯和 L-酪氨酸甲酯的保留时间分别为

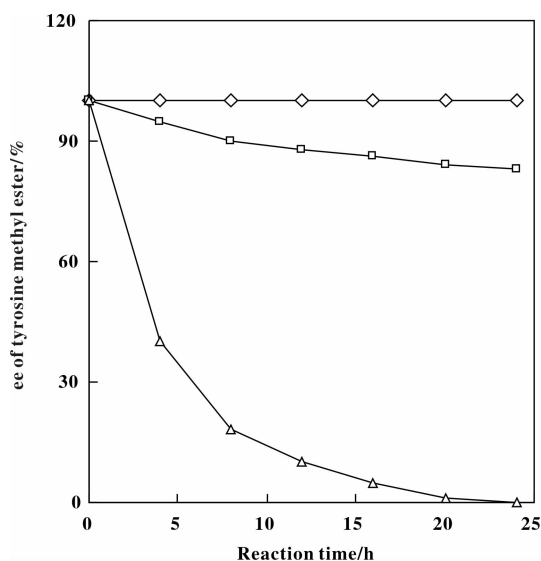


图 1 苯甲醛、水杨醛和 5-硝基水杨醛催化 L-酪氨酸甲酯消旋

Fig. 1 Racemization of L-tyrosine methyl ester catalyzed by benzaldehyde (◇), salicylaldehydes (□) and 5-nitrosalicylaldehyde (△)

Reaction conditions: 19.5 g (0.1 mol) L-tyrosine methyl ester, 120 mL MeCN+30 mL 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.5), aldehyde (2.5 mol%), 25 °C. ee was determined by chiral HPLC

4.670、6.111、8.904 min 和 11.632 min.

2.3 Alcalase 2.4L 催化拆分 DL-酪氨酸甲酯

拆分条件优化. 研究了有机辅溶剂、酶/底物质量比、温度、pH 和反应时间对 Alcalase 2.4L 催化拆分 DL-酪氨酸甲酯的影响.

辅溶剂选择. Alcalase2.4L 在极性较小的醇类溶剂中稳定, 在甲醇、乙醇、叔丁醇、特戊醇中的半衰期分别为 35 min、5 d、5 d 和数周, 在叔丁醇-

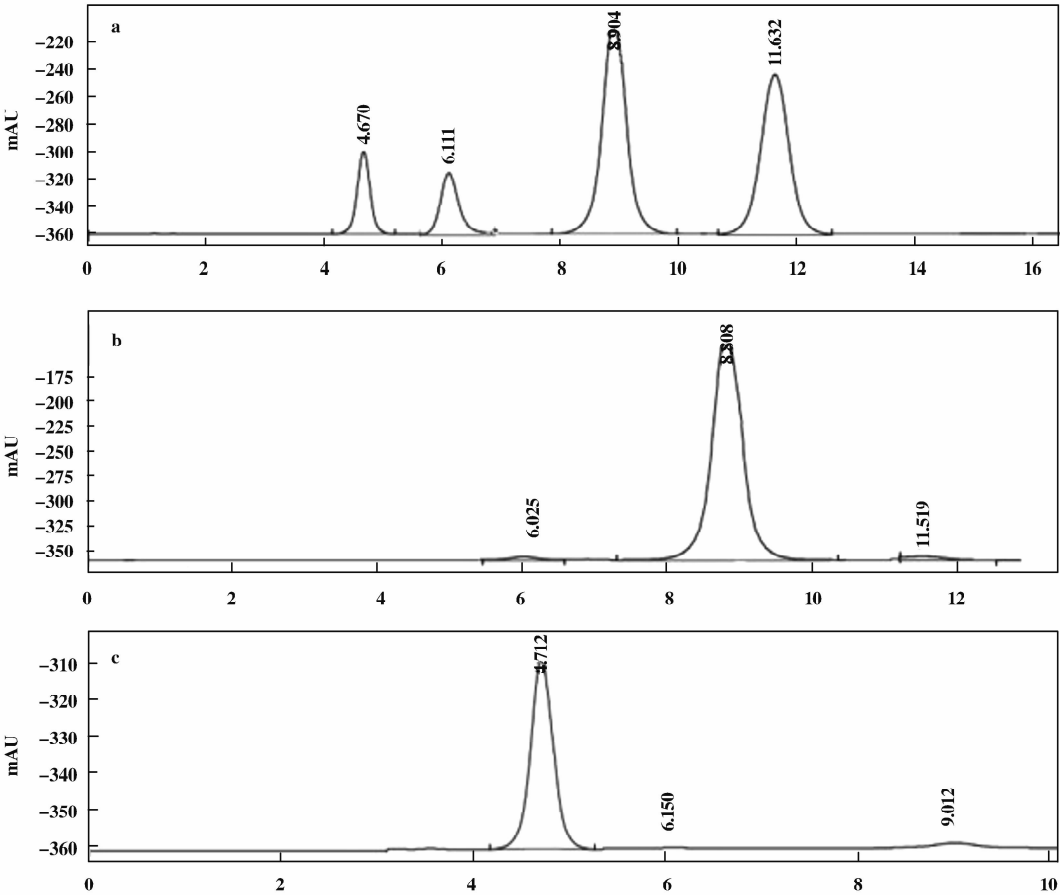


图 2 DL-酪氨酸和 DL-酪氨酸甲酯两个对映体的手性 HPLC 分离
Fig. 2 Chiral HPLC separation of both enantiomers of DL-tyrosine and DL-tyrosine methyl ester
a) standard of DL-tyrosine and DL-tyrosine methyl ester; b) each of components in
reaction solution after hydrolysis; c) ee of D-tyrosine after saponification

磷酸盐缓冲液(5%)中的半衰期为 12 h^[7]. 本研究中, 我们选择叔丁醇-磷酸盐缓冲液(pH7.5, 5%)为反应介质. 主要基于三点考虑: 1) DL-酪氨酸甲酯不发生非酶化学水解; 2) Alcalase 2. 4L 在该介质体系中稳定, 对 DL-酪氨酸甲酯具有高度的 L-选择性, 能够催化底物水解为 L-酪氨酸和 D-酪氨酸甲酯; 2) 底物 DL-酪氨酸甲酯和产物 D-酪氨酸甲酯在该介质体系中有很好的溶解性, 而作为拆分产物之一的 L-酪氨酸不溶, 容易以沉淀的形式析出, 便于通过简单的过滤实现拆分产物的分离.

酶/底物质量比. 固定 DL-酪氨酸的浓度为 0.5 mol/L, 考察酶/底物质量比对 DL-酪氨酸甲酯水解转化率的影响. 当 Alcalase 2. 4L 和底物 DL-酪氨酸甲酯的质量比小于 0.2 时, L-酪氨酸甲酯水解为 L-酪氨酸的转化率与酶/底物质量比成正比. 随着酶/底物质量比的进一步增加, 转化率稍有增加. 考虑

到实际应用, 实验中选择酶/底物质量比为 0.25 (g/g).

表 1 酶/底物质量比对 DL-酪氨酸甲酯水解的影响	
Table1 Effect of enzyme/substrate mass ratio on the hydrolysis of DL-tyrosine methyl ester	
Enzyme/substrate/(g · g ⁻¹)	Conversion /%
0. 1	16
0. 2	30
0. 3	35
0. 4	36
0. 5	38
0. 6	38

Reaction conditions: 2 g (0.01 mol) DL-tyrosine methyl ester, 19 mL *t*-butanol+1 mL 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.5), 0.2 ~ 1.2 g alcalase 2.4L, 30 °C, 20 min. Conversion was determined by HPLC.

pH 和温度. 图 3 的结果表明, Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸甲酯水解在 pH 为 9 时表现出最高活性,

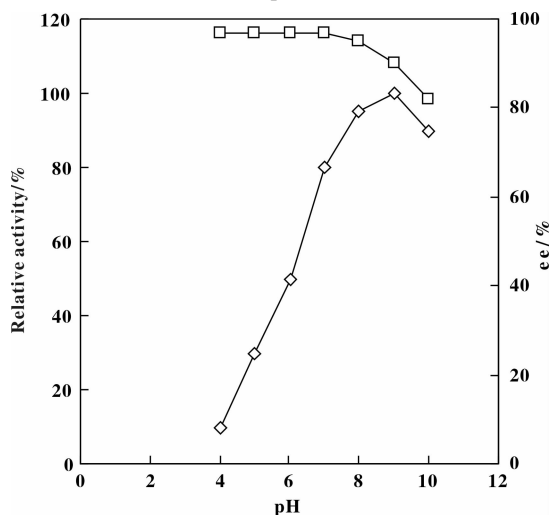


图 3 pH 对 Alcalase 2.4L 催化水解 DL-酪氨酸甲酯的影响

Fig. 3 Effect of pH on the hydrolysis of DL-tyrosine methyl ester catalyzed by alcalase 2.4L

Reaction conditions: 2 g (10 mmol) DL-tyrosine methyl ester, 19 mL *t*-butanol+1 mL 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 4 ~ 10), 0.5 g alcalase 2.4L, 30 °C, 10min. Relative activity (◇) and ee (□) were determined by chiral HPLC. 100% activity corresponded to 6×10^3 U

pH 小于 7 时, 水解产物 L-酪氨酸的 ee 不受 pH 影响, 此后由于 DL-酪氨酸甲酯的非酶水解, ee 逐渐降低, 实验中选择 pH 7.5. 从图 4 的结果看出, Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸甲酯水解在 50 °C 时表现出最高活性. 温度小于 30 °C 时, 水解产物 L-酪氨酸的 ee 不受温度影响, 此后随着温度升高, ee 逐渐降低. 实验中选择 30 °C 为反应温度. 在此温度下, Alcalase 2.4L 同时具有较高活性和对映选择性.

拆分时间. 研究了在叔丁醇-磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中 Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸甲酯对映选择性水解的时间进程 (图 5). DL-酪氨酸甲酯中的 L-对映体在 80 min 内水解接近完全, 转化率 47%, ee 95%, 对映体选择性 (*E*) 为 107. D-酪氨酸甲酯的 ee 为 97% (图 2-b), 表明 Alcalase 2.4 对 DL-酪氨酸甲酯有很好的对映选择性.

2.4 D-酪氨酸甲酯碱水解

经 Alcalase 2.4L 拆分后的 D-酪氨酸甲酯在碱性条件下 (pH 11.5) 室温水解 12 h, D-酪氨酸甲酯完全水解. 水解后得到的 D-酪氨酸 ee 为 97% (图 2-c), 证实 D-酪氨酸甲酯化学水解过程中无消旋现象.

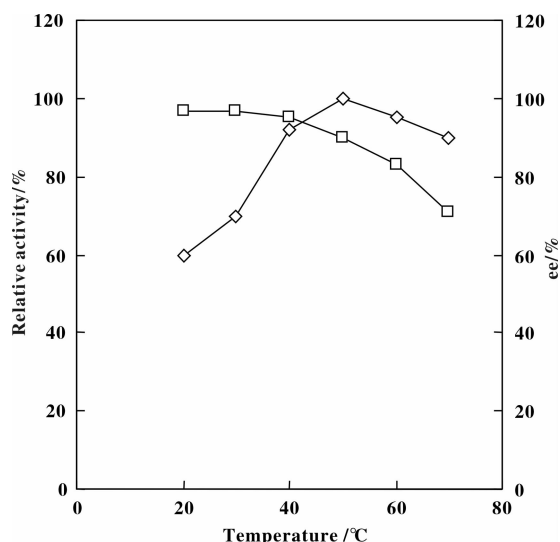


图 4 温度对 Alcalase 2.4L 催化 DL-酪氨酸水解的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the hydrolysis of DL-tyrosine methyl ester catalyzed by alcalase 2.4L

Reaction conditions: 2 g (10 mmol) DL-tyrosine methyl ester, 19 mL *t*-butanol+1 mL 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.5), 0.5 g alcalase 2.4L, 20 ~ 70 °C, 10min. Relative activity (◇) and ee (□) were determined by chiral HPLC. 100% activity corresponded to 6×10^3 U

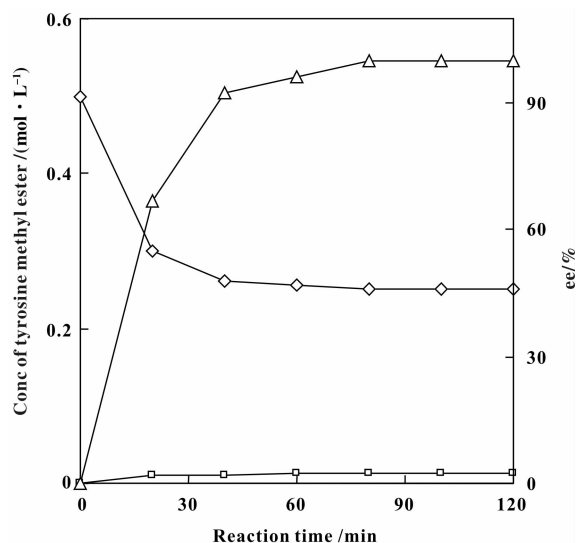


图 5 Alcalase 2.4L 催化拆分 DL-酪氨酸甲酯的时间进程

Fig. 5 Time course of alcalase 2.4L-catalyzed resolution of DL-tyrosine methyl ester

Reaction conditions: 19.5 g (0.1 mol) DL-tyrosine methyl ester, 190 mL *t*-butanol+10 mL 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.5), 5 mL alcalase 2.4L, 30 °C. Tyrosine methyl ester (◇) and tyrosine (□) were determined by RPHPLC. ee (△) was determined by chiral HPLC.

3 结 论

L-酪氨酸甲酯以 5-硝基水杨醛为催化剂, 在乙腈/磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中, 完全消旋为 DL-酪氨酸甲酯, 收率 93%。以 Alcalase 2.4L 为拆分催化剂, 在叔丁醇/磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中, DL-酪氨酸甲酯对映选择性水解为 L-酪氨酸和 D-酪氨酸甲酯。D-酪氨酸甲酯在碱性条件下水解为 D-酪氨酸, 无消旋现象, 收率 91%, ee 97%。另一个拆分产物 L-酪氨酸通过甲酯化形成 L-酪氨酸甲酯, 可实现循环拆分。我们的方法为以廉价的 L-酪氨酸为原料实现 D-酪氨酸的高收率和高对映选择性制备提供了一条绿色途径。

参考文献:

- [1] Ghosh A K, Liu C E. Total synthesis of antitumor depsipeptide (-)-doliculide [J]. *Org Lett*, 2001, **3**: 635–638.
- [2] Chandrasekhar S, Ramachandar T, Reddy M V, *et al.* An efficient synthesis of (+)-deacetylnisomycin starting from D-tyrosine [J]. *Synthesis*, 2002, **13**: 1867–1870.
- [3] Ghosh K K, Swanson L. Enantioselective synthesis of (+)-cryphycin 52 (LY355703), a potent antimitotic antitumor agent [J]. *J Org Chem*, 2003, **68**: 9823–9826.
- [4] Peng Yang-feng(彭阳峰), He Quan(何 仨), Wang Jiarong(王家荣), *et al.* Preparation of D-tyrosine by forming tartaric acid di-tyrosine ester diastereomeric salt(通过形成二酪氨酸酯酒石酸盐法制备 D-酪氨酸的新方法) [J]. *Chin J Org Chem*(有机化学), 2006, **26**: 69–76.
- [5] Takahashi E, Furui M, Shibata T. D-amino acid production from racemic amino acids by a microbial asymmetric degradation[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, **11**: 913–916.
- [6] Tomiuchi Y, Ohshima K, Kise H. Enzymatic reactions in aqueous-organic media. XVIII. Optical resolution of amino acid esters by enzymatic hydrolysis in organic solvents [J]. *bull Chem Soc Jpn*, 1992, **65**: 2599–2603.
- [7] Chen S T, Wang K T. Chemo-enzymatic synthesis of optically active acids and peptides [J]. *J Chin Chem Soc*, 1999, **46**: 301–311.
- [8] Miyazawa T. Enzymatic resolution of amino acids via ester hydrolysis [J]. *Amino Acid*, 1999, **16**: 191–213.
- [9] Chen S T, Huang W H, Wang K T. Kinetic resolution of esters of amino acids in t-butanol containing 5% water catalyzed by a stable industrial alkaline protease [J]. *Chirality*, 1994, **6**: 575–572.
- [10] Chen S T, Huang W H, Wang K T. Resolution of amino acids in a mixture of 2-methyl-2-propanol/water (19 : 1) catalyzed by alcalase via in situ racemization of one antipode mediated by pyridoxal 5-phosphate [J]. *J Org Chem*, 1994, **59**: 7580–7581.
- [11] Schichl D A, Enthaler S, Holla W, *et al.* Dynamic kinetic resolution of α -amino acid esters in the presence of aldehydes acids [J]. *Eur J Org Chem*, 2008, 3506–3512.
- [12] Felten A E, Zhu G, Aron A D. Simplifying pyridoxal: practical methods for amino acid dynamic kinetic resolution [J]. *Org Lett*, 2010, **12**: 1916–1919.

Racemization of L-Tyrosine Methyl Ester and Preparation of D-Tyrosine via Alcalase 2.4L-catalyzed Enantioselective Hydrolysis

XU Hong-mei, HE Cong-lin, XIA Shi-wen¹⁾

(School of Bioinformatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract: A novel procedure for the racemization of L-tyrosine methyl ester was developed and the mechanism of 5-nitrosalicylaldehyde-catalyzed racemization of L-tyrosine methyl ester was proposed. L-tyrosine methyl ester was completely racemized by 5-nitrosalicylaldehyde into its racemate in CH_3CN -phosphate buffer (pH 7.5) in 93% yield within 24 h. DL-tyrosine methyl ester was hydrolyzed enantioselectively into L-tyrosine and D-tyrosine methyl ester by alcalase 2.4L in t-butanol/phosphate buffer (pH 7.5) at 25 °C. L-tyrosine precipitated during the course of hydrolysis, which could be separated by simple filtration. D-tyrosine methyl ester was hydrolyzed into D-tyrosine in 91% yield and 97% ee at alkaline condition.

Key words: racemization; DL-tyrosine methyl ester; alcalase 2.4L; enantioselective hydrolysis; D-tyrosine