

N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸不对称热水解反应的研究

江 宁 贺 鹏 卢大军 强亚静 杨 柳 孙万儒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

D-苯甘氨酸是半合成 β -内酰胺类抗生素的重要原料,它的合成主要是从 5-苯基海因出发,经海因酶开环生成 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸后,再脱去氨甲酰基得到。后一步目前国内外主要用两种方法:一种是用亚硝酸通过迭氮化反应脱氨甲酰基^[1],另一种是用酶法脱氨甲酰基^[2]。但这两种方法都存在一定问题。亚硝酸是致癌物质,会带来环境污染。酶法则由于微生物天然存在的脱氨甲酰基酶活力只有海因酶的 1%~2%^[2],反应效率很低。因此,N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸脱氨甲酰基反应就成为 D-苯甘氨酸合成路线中的一个瓶颈。

最近,我们发现在弱酸或弱碱条件下,N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸加热可以得到 D-苯甘氨酸,可望解决这一瓶颈问题。本文报道了对该反应的部分研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)J43,本实验室筛得。

1.1.2 培养基(%):酵母膏1,牛肉膏1,葡萄糖0.5,NaCl 0.3,pH7.2。

1.1.3 试剂:D-苯甘氨酸购自 SIGMA 公司,N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸由本实验室合成,其余试剂为市售分析纯或化学纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的合成:(1)生物合成:恶臭假单胞菌 J43 接种于 30ml 培养基中,28℃ 振荡培养 16h 后离心收集细胞,细胞洗涤后加入 30ml、4% 5-苯海因溶液(pH8.5),在 30℃ 搅拌反应 6h,其间不断滴加 NaOH 保持 pH 恒定。酶反应结束后离心除去菌体,上清液调至 pH2,减压浓缩、冷却、结晶得到 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸。(2)化学合成:在 50ml 水中加入 7.2g D-苯甘氨酸和 4.5g NaCNO,于 70℃ 水浴中搅拌反应 3h,冷却后加入 25ml、8mol/L HCl,于 4℃ 结晶得到 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸。

1.2.2 不对称热水解反应的过程:1%~4%的 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸水溶液用浓盐酸或氢氧化钠调至适当 pH 后加热,沸腾后通入水蒸汽,调节蒸汽量与加热速度使反应体积保持恒定,并用蠕动泵加入盐酸或氢氧化钠使反应 pH 也保持恒定。定时取样测定,计算转化率。

$$Y = \frac{c_p}{c_x + c_p} \times 100\%$$

其中 Y 为转化率(%), c_p 为测得的产物浓度(mmol), c_x 为测得的剩余底物浓度(mmol)。

1.2.2 测定方法:反应过程中 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的测定用 PDAB 法^[3],铵离子用脲普纳法^[4],D-苯甘氨酸用茚三酮法(铵离子对茚三酮也显色,故计算苯甘氨酸浓度时需扣除铵离子对显色的影响)。

1.2.3 D-苯甘氨酸的分离纯化:反应结束后,用等电点结晶的方法分离 D-苯甘氨酸,得到粗品后再用乙醇重结晶得到 D-苯甘氨酸。用旋光仪和红外光谱进行检测。光学纯度定义为 D-苯甘氨酸在苯甘氨酸中的百分数:

收稿日期:1997-04-30,修回日期:1997-12-20。

$$P = 100\% - \frac{[\alpha]_s - [\alpha]_p}{2[\alpha]_s} \times 100\%$$

其中 P 为产品的光学纯度(%), $[\alpha]_s$ 为标准品的旋光度(-155), $[\alpha]_p$ 为产品的旋光度。

2 结果与讨论

2.1 N-羧甲酰基-D-苯甘氨酸热水解反应的动力学

N-羧甲酰基-D-苯甘氨酸不对称热水解反应的过程如表 1 所示:

表 1 不同初始浓度和合成方法的 N-羧甲酰基-D-苯甘氨酸热水解过程

Table 1 Processes of thermal hydrolysis of N-carbamoyl-D-phenylglycine with different synthesis methods and different initial concentrations

t/h	0	4	8	12	16	20	26	30
4%, C	1.62	27.43	43.61	56.28	69.22	72.31	86.05	91.37
4%, B	2.02	28.62	50.18	56.88	69.39	75.61	82.89	86.25
1%, C	2.66	25.48	43.98	51.78	61.71	69.66	79.07	85.89
1%, B	3.98	29.82	44.04	57.95	70.51	80.29	87.42	91.96

C-chemical synthesis, B-biosynthesis

从表 1 可以看出,反应的转化率与反应物初始浓度无关,也与反应物的合成方法无关。将 $\ln 1/(1-Y)$ 对时间 t 作图,得一直线(图 1),因此初步判断该反应是动力学一级反应:

$$k_c = \frac{dc}{dt}$$

其中, k 为速度常数, c 为底物浓度(mmol), t 为时间(h),此式积分整理可得:

$$k = \frac{\ln 1/(1-Y)}{t}$$

在反应过程中,不断补充 N-羧甲酰基-D-苯甘氨酸,使其浓度保持恒定,得到产物 D-苯甘氨酸与时间的关系也呈直线(图 2),这也证明了该反应是一级反应。

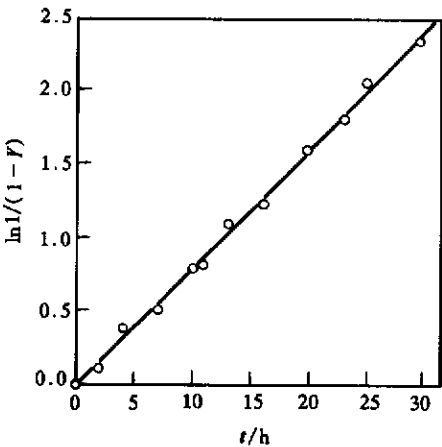


图 1 $\ln 1/(1-Y) - t$ 图

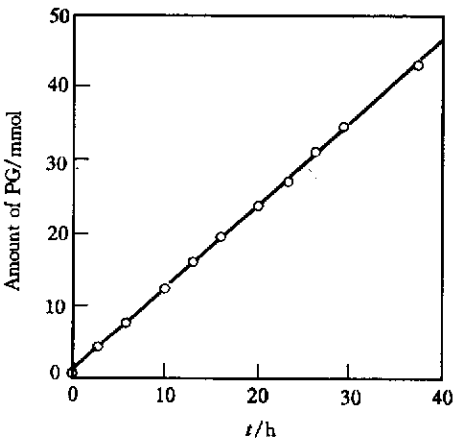


图 2 反应物浓度恒定(4%)时产物与时间的关系

2.2 pH 对反应的影响

pH 对反应过程和产物旋光度的影响如图 3 所示。

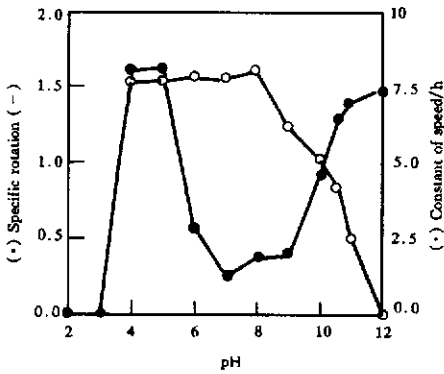
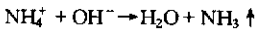


图 3 pH 对速度常数和旋光度的影响

当 pH<2.5 时, N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸会闭环生成 5-苯基海因并自发消旋。因此热水解反应的 pH 应控制在 3 以上, pH 升高时, CO₂ 的产生与排出速度将减慢, 使反应速度减慢。当 pH>6 时, HCO₃⁻ 再生成 CO₂ 排出, 反应保持平衡。

当 pH 继续升高至 9 以上时, 在碱性条件下:



平衡被打破, 因此在碱性条件下不断补充碱也能使反应进行下去。并且 pH 升高, 反应速度加快, 这同样与 NH₃ 的产生与排出速度有关。但产物 D-苯甘氨酸在碱性和高温条件下会逐渐消旋, pH 越高, 消旋速度也越快, 当 pH>10.5 时, 产物的光学活性已很低, 而 pH 在 10 以下时, 反应速度又很慢, 因此从应用角度看, 热水解反应在碱性条件下不如在酸性条件下有利, 酸性条件下不仅 pH 范围宽(3.5-5.5), 反应易控制, 而且反应速度也快。

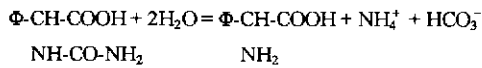
2.3 产物的旋光度和红外光谱

在弱酸性条件下反应的产物经提取结晶后, 测得其旋光度 [α]_D²⁰ 为 -153 (C = 1, 1mol/L HCl), 其红外光谱如图 4:

从旋光和红外的分析结果看, 不对称热水解反应产物的质量可满足抗生素合成的需要。其光学纯度达 99.35%, 化学纯度大于 98%。因此这一反应的发现与应用对酶法合成 D-苯甘氨酸具有现实意义。

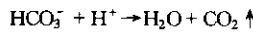
从图 3 可以看出 pH 是 N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸热水解的关键影响因素, 不但影响反应过程, 而且影响产物的光学活性。

N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸热水解反应是一个可逆反应:



这反应在中性 pH 附近很快达到平衡。

在酸性条件下:



因此, 在酸性条件下不断补充酸, 使 CO₂ 不断排出, 可使反应进行完全。

当 pH<2.5 时, N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸会闭环生

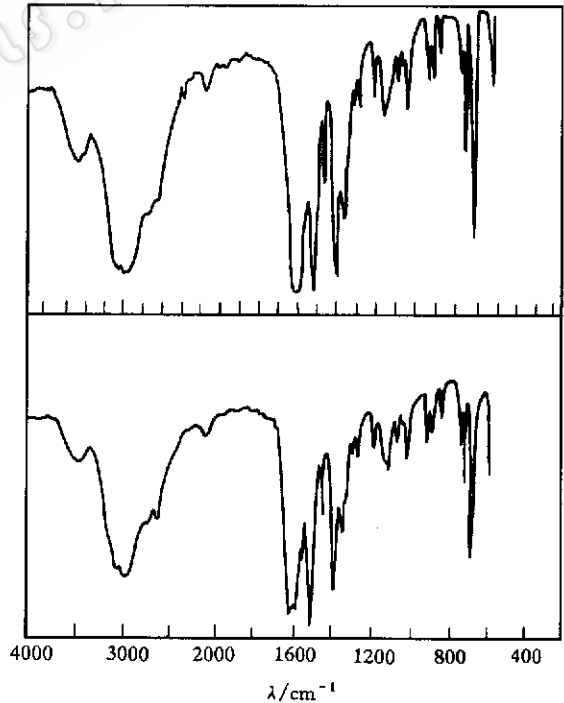


图 4 D-苯甘氨酸的红外光谱

上-样品, 下-对照, (SIGMA)

2.4 N-氨甲酰基氨基酸不对称热水解反应的普遍性

由于 5-苯海因衍生物可以用廉价原料合成,经 N-氨甲酰基氨基酸合成光学活性氨基酸的合成路线引起了广泛的重视^[5-6]。N-氨甲酰基-D-苯甘氨酸的热水解反应如能推广到其他 N-氨甲酰基氨基酸中去,将可为一些价格较高的天然光学活性氨基酸和非天然氨基酸开辟一条新的合成路线,具有重要的应用前景。我们用 N-氨甲酰基-L-苯丙氨酸作实验也得到了类似的结果^[7]。因此 N-氨甲酰基氨基酸不对称热水解反应可能具有一定的普遍性。当然要得出这一结论还需要更多的实验证据。

参 考 文 献

- 1 Takahashi S, Ohashi T, Kii Y *et al.* J Ferment Technol, 1979, 4:328~332
- 2 Serge R, Chinski N, Ohleyer E. Appl Microbial Biotechnol, 1990, 33:382~388
- 3 孙万儒.微生物学报, 1983, 23(2):133~142
- 4 Olivieri R, Fascetti E, Angelini L *et al.* Enzyme Microb Technol, 1979, 1:201~204
- 5 Yokozeki K, Nakamori S, Yamanaka S *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51(3):715~719
- 6 Syltatk C, Lehmsiek V, Ulrichs G *et al.* Biotechnol Lett, 1992, 14(2):99~104
- 7 江 宁, 贺 鹏, 孙万儒等. N-氨甲酰基氨基酸热水解制备光学活性氨基酸的方法, 1997, CN1146447A

Unsymmetrical Thermal Hydrolysis of N-Carbamoyl-D-phenylglycine

Jiang Ning He Peng Lu Dajun Qiang Yajin Yang Liu Sun Wanru

(Institute of Microbiology, The Chinese of Academic Sciences, Beijing 100080)

Abstract N-carbamoyl-D-phenylglycine could be hydrolyzed to obtain D-phenylglycine by heating under weak acid or basic condition. Experimental results showed that the reaction was first order kinetically. It was effected by pH. The specific rotation $[\alpha]_{20}^D$ of purified product D-phenylglycine was 153(C=1, 1NHCl). The discovery of the reaction should open a new way to synthesis optical active amino acids.

Key words Phenylglycine, carbamoyl, unsymmetry thermal hydrolysis