

面包酵母生物催化不对称合成丹参素冰片酯

匡新谋¹, 孙颖², 白亚军², 南叶飞³, 郑晓晖^{2*}

(1. 宁波职业技术学院 化工学院, 浙江 宁波 315800; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 3. 西安石油大学 化学化工学院, 陕西 西安 710065)

摘要: 以 3,4-二羟基苯甲醛为原料, 经 Knoevenagel 缩合、水解反应合成 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸, 利用对甲苯磺酸催化 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸和冰片反应合成了 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯, 最后利用面包酵母生物催化不对称合成了丹参素冰片酯 (DBZ)。系统考察了葡萄糖加入量、反应时间、pH 及 β -环糊精加入量等因素对面包酵母生物催化合成不对称丹参素冰片酯的影响, 结果表明: 在底物 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯加入量为 0.5 g 时, 其最佳反应条件为: 葡萄糖 30 g、 β -环糊精 1.5 g、pH 为 7、反应时间 24 h, 此条件下对映体过量值 (e.e.) 高达 84.9%, 产物主要为 *S* 构型的丹参素冰片酯。该工艺条件温和、成本较低, 是一条极具价值的丹参素冰片酯生产工艺。

关键词: 面包酵母; 生物催化; 不对称还原; β -环糊精; 丹参素冰片酯; 催化技术

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2018) 06-0987-05

Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Danshensu Borneol Ester by Baker's Yeast

KUANG Xin-mou¹, SUN Ying², BAI Ya-jun², NAN Ye-fei³, ZHENG Xiao-hui^{2*}

(1. School of Chemical Engineering, Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800, Zhejiang, China; 2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an Shiyou University, Xi'an 710065, Shaanxi, China)

Abstract: β -(3,4-dihydroxyphenyl) pyruvic acid was first synthesized by Knoevenagel condensation and hydrolysis reactions of 3,4-dihydroxybenzaldehyde. Then, β -(3,4-dihydroxyphenyl) pyruvate borneol ester was prepared from β -(3,4-dihydroxyphenyl) pyruvic acid with borneol in the presence of a catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid. Finally, biocatalytic synthesis of target product Danshensu borneol ester (DBZ) catalyzed by bread's yeast was obtained. The factors affecting synthesis of DBZ such as amount of glucose, reaction time, pH valve and amount of β -cyclodextrin were systematacially investigated. The results showed that when the amount of β -(3,4-dihydroxyphenyl) pyruvate borneol ester was 0.5 g, the optimum reaction conditions were as follows: amount of glucose 30 g, reaction time 24 h, pH 7, amount of β -cyclodextrin 1.5 g. Under these conditons, enantiomeric excess (e.e.) valve of the target product was as high as 84.9%, and *S* enantiomer was the predominant component. The process in this paper is mild and low cost, and is a very valuable process for the production of DBZ.

Key words: baker's yeast; biocatalysis; asymmetric reduction; β -cyclodextrin; danshensu borneol ester; catalysis technology

Foundation items: National Key Scientific Instrument and Equipment Development Project (2013YQ17052509); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of Ministry of Education of China (IRT_15R55)

收稿日期: 2017-07-06; 定用日期: 2017-11-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170546

基金项目: 国家重大仪器设备开发专项 (2013YQ17052509); 中国长江学者课程和教育部大学创新研究团队 (IRT_15R55)

作者简介: 匡新谋 (1983—), 男, 工程师, 硕士; 联系人: 郑晓晖 (1968—), 男, 博士, 教授, 电话: 029-88302686, E-mail: zhengxh@nww.edu.cn

丹参素冰片酯 (DBZ) 是西北大学郑晓晖课题组在丹参素结构上引入冰片结构而设计合成的新化合物^[1]。相关研究表明, DBZ 具有抗动脉粥样硬化^[2-3]、抗心脑血管缺血^[4]、降低血压、改善心脏舒张功能^[4]等作用。

中国科研工作者在如何高效且低成本的制备 DBZ 方面做了大量的工作。郑晓晖^[1]以 3,4-二羟基苯甲醛为原料, 率先用锌汞齐^[5]将羰基还原合成了混旋 DBZ, 但该工艺存在锌汞齐^[5]毒性大以及收率低等缺点。张群正^[6]以 3,4-二羟基苯甲醛为原料, 经苄基保护、Darzens 环氧化^[7]、Lewis 酸开环、NaBH₄ 还原、催化加氢脱保护得到了混旋的 DBZ, 此工艺路线存在反应条件相对苛刻, 且成本较高等缺点。田海林^[8]、Chen^[9]分别以 3,4-二羟基苯甲醛为原料, 先后经苄基保护、Knoevenage 缩合^[10]、酰化得到酰氯, 再与相应的醇反应得酯, 通过 Sharpless 不对称双羟化反应^[11]构建手性中心, 再经选择性催化加氢, 最后脱保护分别得到了光学纯度较高的丹参素异丙酯及 DBZ, 此方法也存在实验条件苛刻、成本高的缺点。刘佩^[12]以原儿茶醛为原料, 经苄基保护、氯乙酸酯环氧化、钨碳/氢气催化还原先合成混旋的 DBZ, 再通过超临界流体色谱纯化, 得到了光学纯的 DBZ; 白亚军^[13]通过雷尼镍催化加氢还原酮酸酯类衍生物得到混旋的 DBZ, 再用超临界流体色谱分离纯化, 得到了较高光学纯度的 DBZ。这两种方法存在手性拆分成本高、原子利用率低等缺点。因此, 寻求一条反应条件温和、成本低、绿色环保的 DBZ

合成工艺具有重大的研究意义。

面包酵母含有丰富的氧化还原酶, 可催化多种羰基化合物的不对称还原, 使用面包酵母全细胞催化反应, 只需添加廉价的碳源就能使细胞再生出价格昂贵的辅酶, 因此能极大地降低生产成本^[14]。杨忠华^[15]在面包酵母中添加烯丙基类化合物、马小魁^[16]在面包酵母中添加 β-环糊精等作为手性催化剂, 实现了羰基化合物的不对称还原。

本文在合成出 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯的基础上, 通过面包酵母不对称还原合成了 DBZ, 目前本工艺鲜见报道。探讨了葡萄糖加入量、反应时间、pH 及 β-环糊精加入量等因素对面包酵母生物催化过程的影响, 得到了一条反应条件温和、绿色环保、成本相对较低的 DBZ 制备工艺, 是一条极具价值的丹参素冰片酯生产工艺。

1 实验部分

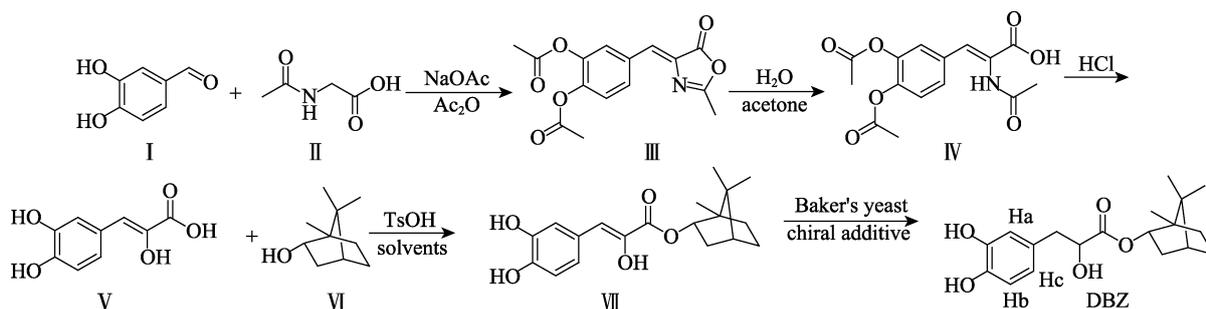
1.1 试剂与仪器

3,4-二羟基苯甲醛 (CP, 广西省化工总公司进出口公司); 面包干酵母为市售的常见的安琪面包酵母; (R)-DBZ 和 (S)-DBZ 标准品为西北大学中草药现代化工程与研究中心提供; 其他试剂为市售 CP。

红外光谱仪 (FTIR360, 美国 Nicolet 仪器公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1100 series, 美国 Agilent 科技有限公司); 核磁共振仪 (INOVA-400 MHz, 美国 Varian 公司)。

1.2 合成

DBZ 合成路线如下:



以 3,4-二羟基苯甲醛、甘氨酸为原料, 在醋酸酐及醋酸钠作用下经 Knoevenagel 缩合、盐酸水解, 合成 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸, 再利用对甲苯磺酸催化 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸和冰片反应合成 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯, 最后用面包酵母生物催化不对称合成 DBZ。

1.2.1 2-甲基-4-(3,4-二乙酰氧基苄叉基)噁唑酮 (III) 的制备

参考文献[13], 得深黄色固体, 即为目标化合物 III, 收率 67.5%。

1.2.2 α-乙酰氨基-β-(3,4-二乙酰氧基苯基)丙烯酸 (IV) 的制备

参考文献[13], 得黄色粉末, 即为目标化合物 IV, 收率 78.9%。

1.2.3 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸 (V) 的制备

参考文献[13], 得白色晶体, 即为目标化合物 V, 收率 43.5%。

1.2.4 β-(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯 (VII) 的制备

向装有搅拌器的 1 L 三口烧瓶中分别加入化合物 V (10 g)、化合物 VI (11 g)、对甲苯磺酸 (1.65 g)、

甲苯 (250 mL), 回流反应 12.5 h。旋蒸除甲苯, 加入乙酸乙酯 (150 mL) 溶解, 经饱和 NaHCO_3 溶液洗涤至有机相 pH 为 5~6, 无水 Na_2SO_4 干燥, 经浓缩、石油醚结晶、抽滤、晶体干燥处理后得黄色固体 9.35 g, 即为化合物 VII, 收率 55.3%。

1.2.5 pH 为 7 的 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 缓冲溶液的配制

准确称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4.45 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4.48 g), 加水配成 500 mL 的溶液, 得到 pH 为 7 的缓冲溶液。

1.2.6 DBZ 的制备

在 30 °C 恒温水浴中, 向装有搅拌器的 1 L 三口烧瓶中分别加入面包干酵母 (30 g)、葡萄糖 (30 g)、手性添加剂 β -环糊精 (1.5 g)、预先配制好的缓冲溶液 (250 mL), 搅拌预处理 6 h 后, 加入化合物 VII (0.5 g), HPLC 监测反应。反应结束后, 经离心、乙醚萃取 (4×100 mL) 后, 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 经过柱层析 [V (石油醚) : V (乙酸乙酯)=2 : 1]、旋蒸, 得到 DBZ 0.43g, 收率 86%。IR(KBr), ν/cm^{-1} : 3363.61(—OH)、2953.12(— CH_3)、2881.54(— CH_2), 1725.51(C=O)、1608.20、1521.53、1450.32(苯环骨架)、1281.36(C—O)、1143.9(C—O)、885.71、805.68(1,2,4-三取代苯环); $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 8.64~8.75(m, 2H, AR—OH), 6.42 (m, 1H, AR—H, Hc 处 H), 6.56 (m, 1H, AR—H, Hb 处 H), 6.58 (m, 1H, AR—H, Ha 处 H), 5.45(m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH—OH}$), 4.83(m, 1H, COOCH), 4.10 [t, $J=12$ Hz, 1H, CH(OH)], 2.60~2.70 (m, 1H, Ph— C H_a —), 2.70~2.80(m, 1H, Ph— C H_b —), 0.60~2.40(m, 冰片上的氢)。

利用文献[13]提供的 HPLC 检测方法(方法 B): 保留时间为 33.1 min 的物质为(S)-DBZ, 在 HPLC 上的峰面积记为 S_{t1} , 保留时间为 36.3 min 的物质为(R)-DBZ, 其峰面积记为 S_{t2} , 本文中(S)-DBZ 及(R)-DBZ 的 e.e. 计算方法分别按照公式 (1) 及 (2) 计算。

$$\text{e.e.}/\% = \frac{S_{t1}}{S_{t1} + S_{t2}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{e.e.}/\% = \frac{S_{t2}}{S_{t1} + S_{t2}} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 面包酵母对催化过程的影响

实验发现, 纯面包酵母反应体系, e.e. 为 0, 且化合物 VII 不能反应完全, 说明纯面包酵母体系中氧化还原酶的活性及选择性均较差。这是因为面包酵母细胞中存在至少两种能催化同一底物还原生成不

同对映异构体的酶, 因此纯面包酵母反应体系的立体选择性不高^[17-18], 如果能抑制生成不需要的对映异构体的酶产生, 就可以提高反应的立体选择性^[15]。面包酵母催化反应体系通常需要作为电子供体的辅酶 NAD(P)H 参与, 但细胞中 NAD(P)H 的含量非常低, 因此, 必须含有再生还原型辅酶 NAD(P)H 才能使反应持续顺利进行, 有学者指出, 葡萄糖^[15]及 β -环糊精^[16]能够促进产生再生还原型辅酶 NAD(P)H。

2.2 葡萄糖对催化过程的影响

不加入 β -环糊精, 当面包酵母加入量为 30 g, 考察了葡萄糖加入量对 e.e. 的影响, 其他实验方法同 1.2.6 节, 结果见图 1。根据 Bai^[13]的 HPLC 方法分析, 本文方法生成的主要产物为(S)-DBZ, 说明葡萄糖在反应过程中能够抑制面包酵母内生成(R)-DBZ 需要的酶的产生。很多学者(如, 杨忠华)发现, 活性酵母细胞可以利用葡萄糖在代谢过程中产生还原型 NAD(P)H, 进而提高面包酵母催化过程的立体选择性^[15]; 本文验证了葡萄糖能提高产物立体选择性的说法。蔡明建发现, 面包酵母活性与其浓度有关, 当面包酵母浓度在一定范围内增加时, 也能提高其氧化还原酶的浓度^[19]。由图 1 可知, 当面包酵母加入量固定为 30 g 时, 葡萄糖加入量达到 30 g 并继续增加时, e.e. 不再变化。因此, 上述实验条件下, 葡萄糖的最佳加入量为 30 g。

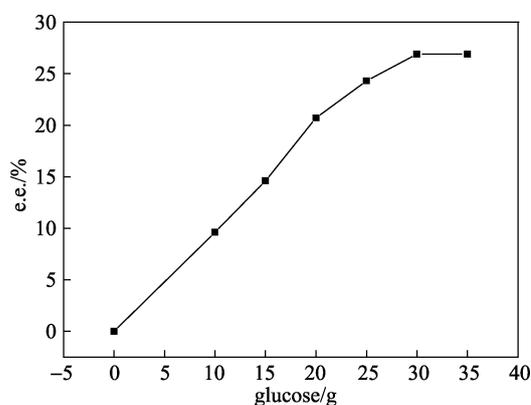


图 1 葡萄糖加入量对 e.e. 的影响

Fig. 1 Effect of amount of glucose on the e.e. value of DBZ

2.3 pH 对催化过程的影响

葡萄糖加入量为 30 g, β -环糊精加入量为 1.5 g, 其他实验方法同 1.2.6 节, 考察了 pH 对催化过程的影响, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 当 pH 逐渐提高时, e.e. 呈现先升后降的趋势; 当 pH 从 4 增加到 7 时, e.e. 从 11.7% 迅速增加到最高的 84.9%; 继续提高 pH 时, e.e. 迅速降低。因此, pH 对催化过程存在很大的影响, 这可能是由于中性的 pH 环境对面包酵母没有毒害作用, 而过低或者过高的 pH 环境

能够抑制面包酵母酶的活性所致。因此,上述实验条件下,最佳的 pH 为 7。

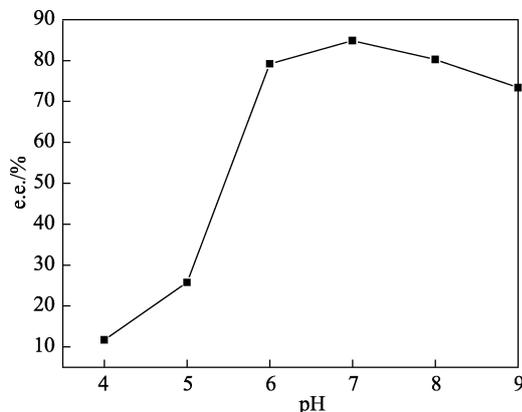


图 2 pH 对 e.e. 的影响

Fig. 2 Effect of pH value on the e.e. value of DBZ

2.4 β -环糊精加入量对催化过程的影响

葡萄糖加入量为 30 g, pH 为 7, 其他实验方法同 1.2.6 节, 考察了 β -环糊精加入量对催化过程的影响, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 当 β -环糊精加入量逐渐提高时, e.e. 呈现先升高后平稳的趋势。当 β -环糊精加入量从 0 g 增加到 1.5 g 时, e.e. 从 25.5% 迅速增加到最高的 84.9%; 继续提高 β -环糊精加入量时, e.e. 趋于稳定, 因此, β -环糊精加入量对面包酵母不对称还原 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯为 DBZ 有很大的影响。 β -环糊精能显著提高面包酵母催化效果, 这是由于 β -环糊精为多糖, 对面包酵母细胞没有毒害作用, 进而能更好的保持面包酵母细胞的活性^[19]; β -环糊精还可能通过抑制或活化催化生成某种对映异构体的酶进而提高了反应的立体选择性^[16]。因此, 上述实验条件下, 最佳的 β -环糊精加入量为 1.5 g。

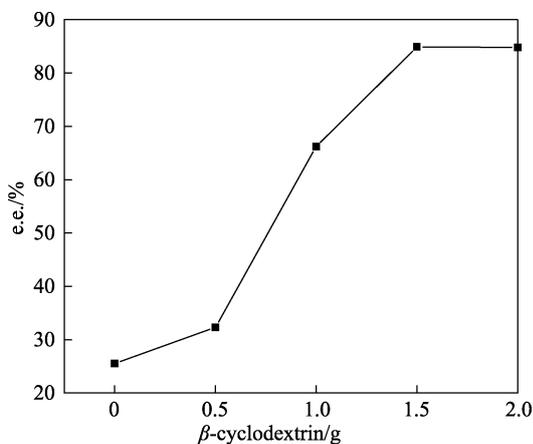


图 3 β -环糊精加入量对 e.e. 的影响

Fig. 3 Effect of amount of β -cyclodextrin on the e.e. value of DBZ

2.5 反应时间对催化过程的影响

固定葡萄糖加入量为 30 g, pH 为 7, β -环糊精加入量为 1.5 g, 其他实验方法同 1.2.6 节, 考察了反应时间对催化过程的影响, 结果见图 4。从图 4 可知, 随着反应时间的增加, e.e. 逐渐提高, 然后趋于稳定。反应 18 h 时, e.e. 为 77.2%; 24 h 时, e.e. 达到最高 (84.9%), 再延长反应时间, e.e. 基本不变, 并有下降的趋势。因此, 上述实验条件下, 最佳的反应时间为 24 h。

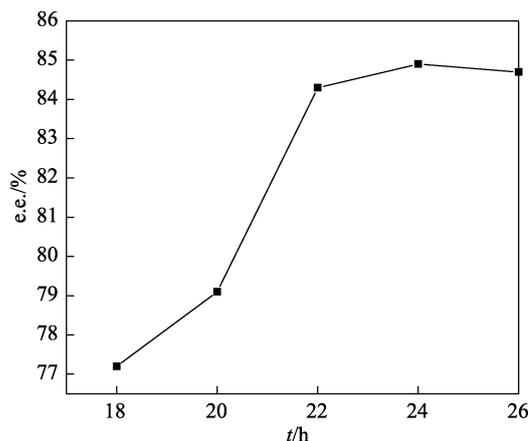


图 4 反应时间对 e.e. 的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on the e.e. value of DBZ

2.6 其他手性添加剂对催化过程的影响

在文献[16]中, 除了 β -环糊精, 还报道了其他的手性添加剂, 如: 硅藻土、L-半胱氨酸等。作者发现, 以硅藻土作为手性添加剂时, 按照文献[13]提供的 HPLC 方法检测, 有 (S)-DBZ 及 (R)-DBZ 生成, (S)-DBZ 的 e.e. 最高达 47%, 这与文献[16]中得出的硅藻土可以提高面包酵母发酵液立体选择性结论一致; 以 L-半胱氨酸作为手性添加剂时, 按照文献[13]提供的 HPLC 方法检测, 同样有 (S)-DBZ 及 (R)-DBZ 生成, (S)-DBZ 的 e.e. 最高达 52%, 但这两种手性添加剂与上文中的 β -环糊精相比, e.e. 明显偏低。所以, 本文选取 β -环糊精作为手性添加剂进行实验。

3 结论

以 3,4-二羟基苯甲醛为原料, 参照文献先合成化合物 VII, 然后直接向面包酵母发酵液中加入手性添加剂, 生物催化化合物 VII 不对称还原合成了 DBZ。考察了多种因素对面包酵母生物催化过程的影响, 结果表明: 当底物 β -(3,4-二羟基苯基)丙酮酸冰片酯加入量为 0.5 g 时, 在 pH 为 7 的反应条件下, 加入 30 g 葡萄糖、1.5 g β -环糊精、反应 24 h, 反应体系的 e.e. 最高达到 84.9%, 主要产物为 (S)-DBZ。与

现有的 DBZ 制备工艺相比, 本工艺是一条反应条件温和、绿色环保、成本相对低的 DBZ 制备工艺。

如本文所述, 利用未经活化的面包酵母能生物催化不对称合成 DBZ, 然而本方法也存在底物浓度不高的缺点; 未来可以在本文方法的基础上, 继续考察其他的手性添加剂对面包酵母生物催化过程的影响, 如: 有机溶剂、表面活性剂等; 还可以进一步利用活化处理后的面包酵母, 或者筛选出面包酵母中的氧化还原酶等方法, 以提高面包酵母生物催化不对称合成 DBZ 的能力。

参考文献:

- [1] Zheng Xiaohui (郑晓晖), Zhang Qunzheng (张群正), Wang Shixiang (王世祥), *et al.* β -(3, 4-dihydroxyphenyl)- α -hydroxy propionic acid borneol ester: CN 1868998[P]. 2006-11-29.
- [2] Li Jing (李静), Zhou Jie (周洁), Liu Qinshe (刘勤社), *et al.* Study on the mechanism of Danshensu borneol ester about mediated intervention of TLR4 signaling pathway on anti-atherosclerosis[J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine (陕西中医), 2012, 33(5): 627-636.
- [3] Li Jing (李静), Liu Yarong (刘亚荣), Liu Qinshe (刘勤社), *et al.* Experimental study on the expression of TLR4, NF-KB and IL-6mRNA in rat abdominal aorta[J]. Journal of Shaanxi Medical (陕西医学杂志), 2012, 41(4): 392-394.
- [4] Liu Shaojing (刘少静). Study on structural characterization, quality control and pharmacokinetic of DBZ[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2009.
- [5] Clemmensen E. Reduction of ketones and aldehydes to the corresponding hydrocarbons using zinc-amalgam and hydrochloric acid[J]. Chemische Berichte, 1913, 46: 1837-1843.
- [6] Zhang Qunzheng (张群正), Dong Yan (董岩), Nan Yefei (南叶飞), *et al.* Synthesis of β -(3, 4-dihydroxyphenyl)- α -hydroxy propionic acid esters[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry(有机化学), 2009, 29(9): 1466-1469.
- [7] Erlenmeyer E. Phenyl- α -oxypropionic acid and phenyl- α , β -propionic acid[J]. Liebigs Annalen der Chemie, 1892, 271: 137-163.
- [8] Tian Hailin (田海林), Zhou Xiaowei (周晓伟), Chen Ming (陈明), *et al.* Asymmetric of synthesis of Danshensu borneol ester[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry (中国药物化学杂志): 2012, 22(2): 113-116.
- [9] Chen M, Chen H, Wang Y Z, *et al.* Efficient and practical asymmetric synthesis of isopropyl (*R*)-3-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate and its enantiomer[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2011, 22(1): 4-7.
- [10] Knoevenagel E. Method for the synthesis of glutaric acid [J]. Chemische Berichte, 1894, 27: 2345-2346.
- [11] Hentges S G, Sharpless K B. Asymmetric induction in the reaction of osmium tetroxide with olefins [J]. Journal of the American Chemical Society, 1980, 102: 4263-4265.
- [12] Liu Pei (刘佩), Qin Fanggang (秦方刚), Bai Yajun (白亚军), *et al.* Synthesis and chiral separation of isopropyl and bornyl β -(3, 4-Dihydroxyphenyl)- α -hydroxypropionate[J]. Journal of northwest university(natural of science edition)(西北大学学报: 自然科学版), 2015, 45(3): 413-417.
- [13] Bai Y J, Zhang Q Z, Jia P, *et al.* Improved process for pilot-scale synthesis of danshensu [(\pm)-DSS] and its enantiomer derivatives[J]. Org Process Res Dev, 2014, 18(12): 1667-1673.
- [14] Yang F, Russell A. Optimization of baker's yeast alcohol dehydrogenase activity in an organic solvent[J]. Biotechnology Progress, 1993, 9(3): 234-241.
- [15] Yang Zhonghua (杨忠华), Yao Shanqing (姚善涇). An effective method for controlling the stereo selectivity in asymmetric reduction of β -oxo ester with yeast cells[J]. Chinese Journal of Catalysis (催化学报), 2004, 25(6): 805-808.
- [16] Ma Xiaokui (马小魁), Wang Zhezhi (王喆之), Chen Wuling (陈五岭). Asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate directly catalyzed by yeast fermentation broth[J]. Chinese Journal of Catalysis (催化学报), 2006, 27(4): 314-318.
- [17] Nakamura K, Kawai Y, Nakajima N, *et al.* Stereochemical control of microbial reduction. 17. a method for controlling the enantioselectivity of reductions with baker's yeast[J]. Journal of Organic Chemistry, 1991, 56(15): 4778-4783.
- [18] Shieh W R, Gopalan A S, Sih C J. Stereochemical control of yeast reductions. 5. characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of α keto esters[J]. Journal of the American Chemical Society, 1985, 107(10): 2993-2994.
- [19] Cai Mingjian (蔡明建), Wang Guangrong (王光荣), Wei Jinfang (魏金芳), *et al.* Study on catalytic asymmetric reduction of aromatic ketones by baker's yeast [J]. Chemical Engineering & Equipment (化学工程与装备), 2010, (10): 32-35, 41.