

# 固定化脂肪酶连续动力学拆分 1,1,1-三氟异丙胺的研究

蒋成君<sup>1</sup>, 徐仁杰<sup>1</sup>, 程桂林<sup>2\*</sup>

(1. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023;

2. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要:**探讨了连续流动反应器中动力学拆分 1,1,1-三氟异丙胺(TFPA)的可行性,比较了 3 种脂肪酶的催化效果及其对连续流动与间歇搅拌反应的影响。结果表明,连续流动反应方式下,以 Novozym 435 为催化剂,65℃下在装载固定化脂肪酶的色谱柱内停留 3 min,1,1,1-三氟异丙胺的转化率可达到 50%,产物 *N*-[(1*R*)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]-乙酰胺的对映体过量值(*ee*)高达 99.5%,且连续反应 50 h 后酶的活性保持原有水平,表观米氏常数为 4.8 mmol/L;而采用间歇搅拌方式、反应时间为 8 h 时,转化率仅为 41.6%。

**关键词:**固定化脂肪酶;流动化学;连续动力学拆分;1,1,1-三氟异丙胺

中图分类号:TQ463

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)10-0196-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.10.038

## Study on continuous kinetic resolution of 1,1,1-trifluoroisopropylamine by immobilized lipase

JIANG Cheng-jun<sup>1</sup>, XU Ren-jie<sup>1</sup>, CHENG Gui-lin<sup>2\*</sup>

(1.School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou 310023, China; 2.Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**Abstract:**The feasibility of kinetic resolution of 1,1,1-trifluoro-isopropyl amine is explored in a continuous flow reactor.Catalytic effects of three kinds of common lipases are compared, and their effects on continuous flow and intermittent stirring reaction respectively are compared. Studies show that the conversion rate of 1,1,1-trifluoroisopropylamine can reach 50% and the enantiomeric excess value of product *N*-[(1*R*)-2,2,2-trifluoro-1-methyl-ethyl]-acetamide is as high as 99.5% when Novozym 435 is used as catalyst,the temperature is at 65℃,the retention time is 3 minutes and the reaction is performed under continuous flow mode.Furthermore,the activity of lipase remains its original level after 50 hours of continuous reaction,and apparent Michaelis constant is 4.8 mmol·L<sup>-1</sup>.The conversion rate is only 41.6% after 8 hours of reaction and intermittent stirring mode is employed.

**Key words:**immobilized lipase; flow chemistry; continuous kinetic resolution; 1,1,1-trifluoroisopropylamine

目前,大部分酶催化反应采用的是间歇搅拌方式,由于受化学平衡的限制,转化率低<sup>[1]</sup>。连续流动反应技术已成为合成化学中的一项关键技术,相对于釜式反应,其主要优点包括合成效率高、安全性高及选择性好。连续性生物催化在工业上引起越来越多的关注,成为一个新兴领域<sup>[2-3]</sup>。

目前,连续流动模式在脂肪酶催化转化的应用中存在明显的上升趋势<sup>[4-5]</sup>。连续流动反应方式下,生物催化转化的有机反应具备重现性高、反应参数易控制、反应条件易于优化等优点<sup>[6-7]</sup>,符合当前“绿色化学”的研究方向,提高了工艺安全性,减少了溶剂使用和废物产出<sup>[8-9]</sup>。酶催化动力学拆分是一种光学纯活性化合物的制备方法<sup>[10-12]</sup>,而光学纯的三氟异丙胺是非常重要的医药、农药中间体<sup>[13]</sup>。

笔者以 1,1,1-三氟异丙胺(TFPA)为模型底物,对连续流动反应与间歇搅拌反应 2 种不同的方式进行对比,研究不同条件对 *N*-[(1*R*)-2,2,2-三氟-1-甲基乙基]-乙酰胺(TMA)对映体过量值(*ee*)的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

1,1,1-三氟异丙胺,分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司生产;乙酸乙烯酯、甲苯,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;Lipozyme TL IM, Lipase(Thermomyces lanuginosus),CAS:9001-62-1、Novozyme 435,Lipase acrynic resin(Candida Antarctica)、CAS:9001-62-1;Lipozyme RM IM, Lipase

收稿日期:2021-11-04;修回日期:2022-07-31

基金项目:2020 年度浙江省基础公益研究计划项目(LGJ20B060001);浙江中医药大学校级基金(2019ZG48)

作者简介:蒋成君(1981-),男,博士,高级工程师,研究方向为制药工程,jcj312@163.com;程桂林(1982-),女,博士,高级实验师,研究方向为酶催化,通讯联系人,cheng\_guilin@163.com。

(*Rhizomucor miehei*), CAS:9001-62-1, 诺维信(中国)生物技术有限公司生产。岛津 GC2014 气相色谱仪, 日本岛津公司生产。

### 1.2 间歇搅拌反应

动力学拆分反应在 25 mL 的反应瓶中进行。典型的反应条件为: 环己烷 15 mL; TFPA (0.2 mmol/mL) 3 mmol; 乙酸乙烯酯 (0.8 mmol/mL) 12 mmol; 酶 (10 mg/mL) 150 mg; 反应温度为 60°C; 转速为 200 r/min; 反应一定时间。

### 1.3 连续流动反应

连续流动反应器为高效液相色谱不锈钢柱 (74.0 mm×4.6 mm), 去除固定相, 装载固定化脂肪酶, 当负载脂肪酶 Novozym 435<sup>®</sup> 150 mg 时, 内部体积分别为 0.40 mL, 两端用玻璃棉填充, 以防止酶在反应器顶部结块与流失。通过色谱柱恒温箱控制温度, 液相色谱泵控制流速从 0.1 mL/min 到 1 mL/min。在每个流速下收集 1 mL 溶液用于分析。停留时间  $\tau$  为反应器的体积除以流速。

### 1.4 分析条件

气相色谱条件: Astec<sup>®</sup> CHIRALDEX<sup>®</sup> B-DM 手性柱 (30 m×0.25 mm×0.12  $\mu$ m), 进样口温度为 250°C; 检测器温度为 260°C; 柱温 50 ~ 120°C (5 min), 升温速率为 5°C/min, 载气为氮气。

### 1.5 反应的转化率及 ee 值

反应的转化率及 ee 值计算式分别为:

$$\text{转化率} = \frac{\text{反应物反应量}}{\text{投入反应物的总量}} \quad (1)$$

$$ee_s \text{ 值} = \frac{[S(\text{TFPA}) - R(\text{TFPA})]}{[S(\text{TFPA}) + R(\text{TFPA})]} \quad (2)$$

$$ee_p \text{ 值} = \frac{[R(\text{TMA}) - S(\text{TMA})]}{[S(\text{TMA}) + R(\text{TMA})]} \quad (3)$$

式中:  $S(\text{TFPA})$  为  $S$  构型 TFPA 物质的量;  $R(\text{TFPA})$  为  $R$  构型 TFPA 物质的量;  $S(\text{TMA})$  为  $S$  构型 TMA 物质的量;  $R(\text{TMA})$  为  $R$  构型 TMA 物质的量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同的酶对反应的影响

1,1,1-三氟异丙胺与乙酸乙烯酯在各种催化条件下的乙酰化反应如图 1 所示。

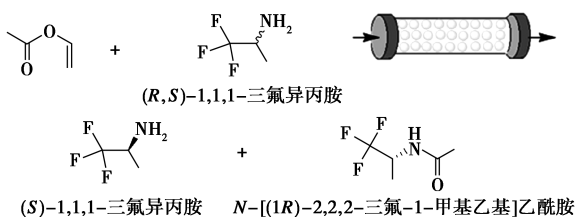
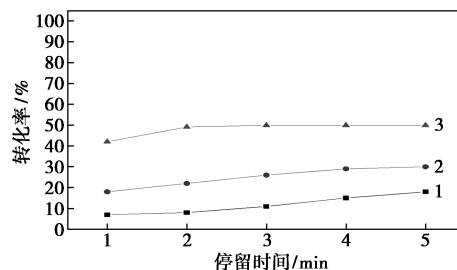


图 1 连续流动拆分 TFPA

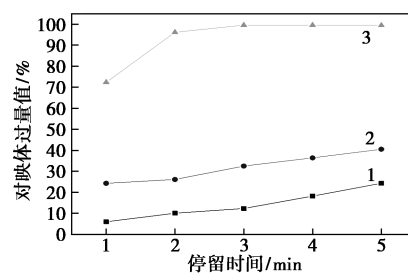
筛选了常用的 3 种固载酶 Lipozyme TL IM、Lipozyme RM IM 和 Novozyme 435。这 3 种固载化酶不仅酶的来源不同, 而且固定化方式有所不同。Lipozyme TL IM 是硅胶吸附疏棉状嗜热丝孢菌 (TLL) 的固定化酶制剂, lipozyme RM IM 为一种大孔阴离子交换树脂吸附的米黑根毛霉菌 (*Rhizomucor miehei*), Novozym 435 是来自于 *Candida Antarctica B* 的固定化脂肪酶, 其由一种经过基因改性的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 微生物进行深层发酵并吸附在大孔丙烯酸树脂上而制成。不同的酶对反应转化率的影响如图 2 所示。由图 2 中可以看出, 停留时间大于 2 min 时, Novozym 435 催化反应的转化率接近于 50%, 而 Lipozyme TL IM 与 Lipozyme RM IM 催化反应的转化率低于 30%。



1—Lipozyme TL IM; 2—lipozyme RM IM; 3—Novozym 435

图 2 不同的酶对反应转化率的影响

酶选择性地 将  $R$  构型的 TFPA 转化为酰胺, 而保留  $S$  构型的 TFPA, 理论上最高转化率为 50%。不同的酶对产物 ee 值的影响如图 3 所示。



1—Lipozyme TL IM; 2—lipozyme RM IM; 3—Novozym 435

图 3 不同的酶对产物 ee 值的影响

由图 3 可以看出, 停留时间大于 2 min, Novozym 435 选择性非常高,  $R$  构型产物的 ee 值高达 99.5%, 而 Lipozyme TL IM 与 Lipozyme RM IM 的选择性均低于 50%。在连续流动固定床反应器中, 脂肪酶 Novozym 435 催化拆分 TFPA 反应, 具有最高的催化活性与选择性。

### 2.2 连续流动与间歇搅拌对比

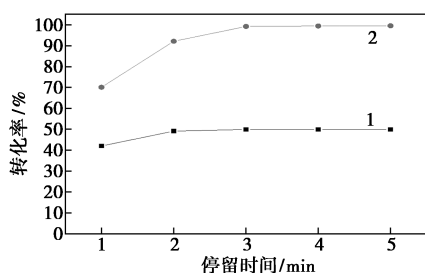
研究连续和间歇 2 种方式下反应的差异。连续

流动与间歇搅拌方式对反应的影响可以用生产率( $r$ )来衡量:

$$r_{\text{flow}} = ([P] \times f) / m_e; r_{\text{batch}} = n_p / (t \times m_e) \quad (4)$$

其中:[P]是产品的浓度, mmol/mL;  $f$ 是底物流速, mL/min;  $n_p$ 是产品的摩尔数, mmol;  $t$ 是时间, min;  $m_e$ 是指酶的用量, g。

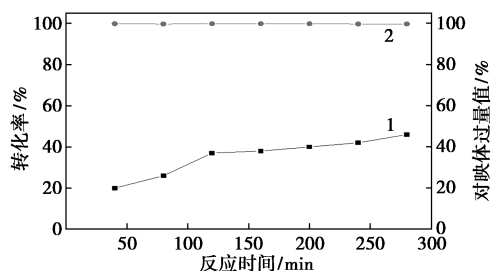
为了提高TFPA的转化率,需要足够长的停留时间以确保底物与脂肪酶的活性部位相互作用。因此,调整底物流速以增加反应物的停留时间,TFPA的转化率显著增加。连续流动模式下停留时间对反应的影响见图4。由图4可以看出,当TFPA的浓度为0.2 mmol/mL、停留时间为3 min、流速为0.13 mL/min时,转化率接近50%,此时R构型的TFPA基本全部转化,产物的 $ee$ 值接近100%, $r_{\text{flow}}$ 为0.09 mmol/(g·min)。



1—转化率;2—对映体过量值

图4 连续流动模式下停留时间对反应的影响

间歇搅拌模式下反应时间对反应的影响如图5所示。



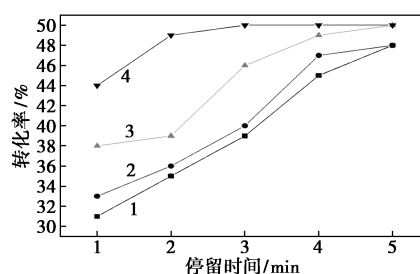
1—转化率;2—对映体过量值

图5 间歇搅拌模式下反应时间对反应的影响

由图5中可以看出,在脂肪酶Novozym 435(150 mg)催化下,反应时间为280 min,TFPA(0.2 mmol/mL)的转化率接近50%, $r_{\text{batch}}$ 为0.03 mmol/(g·min)。由此可见,连续流动模式的生产率是间歇搅拌的3倍,主要归因于3个因素:传质增强,形成层流反应器系统缩短了扩散时间;快速搅拌下固定化脂肪酶容易粉碎;没有返混。

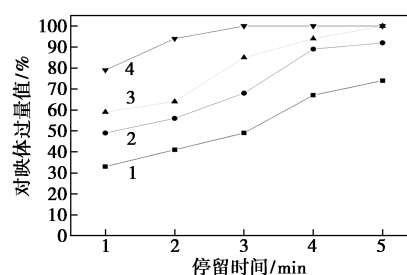
### 2.3 反应温度对反应的影响

反应温度对反应的影响如图6、图7所示。



1—313 K;2—323 K;3—333 K;4—343 K

图6 反应温度对转化率的影响



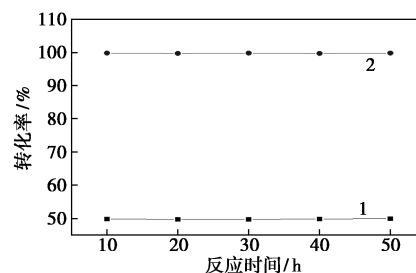
1—313 K;2—323 K;3—333 K;4—343 K

图7 反应温度对产物 $ee$ 值的影响

从图6和图7中可以看出,反应温度对酶促反应的转化率和选择性具有显著影响。在反应温度为343 K、停留时间为3 min时,转化率达到50%,而反应温度为313 K时只能达到39%。对产物 $ee$ 值的影响也有同样的趋势,在反应温度为343 K、停留时间为3 min时, $ee$ 值可以达到99%。在固定化脂肪酶连续动力学拆分1,1,1-三氟异丙胺反应中,拆分的速率随着温度的升高而加快,并且产物的 $ee$ 值也高。这是因为Novozym 435是一种耐热性很高的酶,在70~80℃范围内有最高的活力。

### 2.4 连续反应时间对反应的影响

连续运行时间对反应的影响如图8所示。



1—转化率;2—对映体过量值

图8 连续运行时间对反应的影响

由图8可以看出,反应时间长达50 h,Novozym

435 的催化活性和选择性仍保持稳定。不同于间歇搅拌模式,连续流动固定床不会将 Novozym 435 在反应过程中破碎,在保证颗粒形貌方面有很大的优势。

## 2.5 连续流动固定床反应器中的反应动力学

连续流动固定床反应成为促进生物催化产业化的一种方式。此外,当操作连续流动反应系统时,流速也对酶动力学产生影响。这种条件下,可以通过为填充床反应器系统开发的 Lilly-Hornby 模型评估酶动力学参数<sup>[15]</sup>。

$$F[A_0] = V/f + K_{m(\text{app})} \ln(1 - F) \quad (5)$$

式中:  $V$  为反应器的体积, mL;  $f$  是底物流速, mL/min;  $K_{m(\text{app})}$  是表观米氏常数;  $[A_0]$  为 TFPA 的初始浓度, mmol/L;  $F$  为已经反应的 TFPA 百分比。

在稳态条件下,假设活塞流和抑制作用可忽略不计,则固定化酶固定床中的表观动力学参数可以根据  $F[A_0]$  对  $\ln(1-F)$  的曲线计算得出,斜线的斜率即为  $K_{m(\text{app})}$ , 详见图 9。

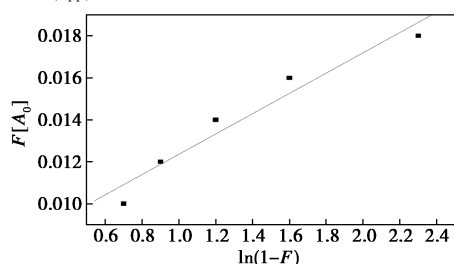


图 9  $F[A_0]$  与  $\ln(1-F)$  关系图

由图 9 计算得到表观米氏常数  $K_{m(\text{app})}$  为 4.8 mmol/mL。

## 3 结论

生物催化和流动化学的结合得到了越来越广泛地应用。流动化学连续过程所具备的高比表面积与体积比、强化的混合和传质、精确的温度控制以及催化剂用量的减少等优点,将引起研究人员越来越强烈的兴趣。评价了不同来源的固定化酶的催化效果,确定了脂肪酶 Novozyme 435 作为研究的最佳选择,证明了一种新颖有效的动力学连续过程,用于 Novozym 435 在连续流动固定床生物反应器中拆分 1,1,1-三氟异丙胺。与间歇反应器相比,在连续流动模式下催化剂具有更好的活性与选择性,产物  $N-[(1R)-2,2,2\text{-三氟-1-甲基乙基}]\text{-乙酰胺}$  的  $ee$  值可达到 99.5%。连续反应 50 h,酶的活性与选择性均保持稳定。而在传统的间歇反应器中,反应时间

为 8 h 时,酶促转化率仅为 41.6%。连续流动生物催化技术用于合成光学纯的化合物将会在医药农药等领域得到越来越广泛的关注和应用。

## 参考文献

- [1] 王清莲, 王晓达, 王红星, 等. 酶反应精馏耦合技术研究进展[J]. 化工学报, 2020, 71(1): 122-137.
- [2] Lindeque R M, Woodley J M. Reactor selection for effective continuous biocatalytic production of pharmaceuticals[J]. Catalysts, 2019, 9: 262.
- [3] Musa M M, Hollmann F, Mutti F G. Synthesis of enantiomerically pure alcohols and amines via biocatalytic deracemisation methods[J]. Catalysis Science & Technology, 2019, 9: 5487-5503.
- [4] Carvalho A C, Fonseca L M, Mattos T S, et al. Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16: 29682-29716.
- [5] 蒋成君, 吕力琼, 黄俊. 金属-酶协同催化动态动力学拆分反应研究进展[J]. 化工进展, 2016, 35(3): 807-814.
- [6] Junior I I, Miranda L S M, Souza R O M A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2013, 85-86: 1-9.
- [7] Wiles C, Watts P. Continuous flow reactors: A perspective[J]. Green Chem, 2012, 14: 38-54.
- [8] Manoel E A, Pais K C, Flores M C, et al. Kinetic resolution of a precursor for myo-inositolphosphates under continuous flow conditions[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2013, 87: 139-143.
- [9] Liu Z, Burgess K. Continuous flow biocatalytic resolution of methyl sulfinylacetates[J]. Tetrahedron Lett, 2011, 52: 6325-6327.
- [10] Thomas J C, Burich M D, Bandeira P T, et al. Biocatalysis in continuous-flow mode: A case study in the enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols via acylation and deacylation reactions mediated by Novozym 435<sup>®</sup>[J]. Biocatalysis, 2017, 3: 27-36.
- [11] Oláh M, Kovács D, Katona G, et al. Optimization of 2-alkoxyacetates as acylating agent for enzymatic kinetic resolution of chiral amines[J]. Tetrahedron, 2018, 74(7): 3663-3670.
- [12] Moissã M E, Spelmezan C G, Paul C, et al. Tailored sol-gel immobilized lipase prepartes for the enzymatic kinetic resolution of heteroaromatic alcohols in batch and continuous flow systems[J]. RSC Advances, 2017, 7: 52977-52987.
- [13] 蒋成君, 徐国明, 袁慎峰. Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Novozyme 435 动态动力学拆分 1,1,1-三氟异丙胺[J]. 化工进展, 2017, 36(1): 324-328.
- [14] Ortiz C, Ferreira M L, Barbosa O, et al. Novozym 435: The "perfect" lipase immobilized biocatalyst? [J]. Catalysis Science & Technology, 2019, 9: 2380-2420.
- [15] Carvalho F, Fernandes P. Packed bed enzyme microreactor: Application in sucrose hydrolysis as proof-of-concept [J]. Biochemical Engineering, 2015, 104(15): 74-81. ■