

科研与开发

# 化学酶法合成光学纯 (S)-1,2,3,4-四氢喹啉-3-羧酸的研究

龚大春<sup>1</sup> 周 华<sup>1</sup> 龚美珍<sup>2</sup> 韦 萍<sup>1</sup> 欧阳平凯<sup>1</sup>  
(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009;  
2. 三峡大学化学与生命科学学院, 湖北 宜昌 443001)

**摘要:** 采用化学酶法以消旋体苯丙氨酸和多聚甲醛为起始原料, 用氢溴酸作为催化剂, 经 Pictet-Spengler 反应、酯化、脂酶催化水解等过程合成了光学纯的(S)-1,2,3,4-四氢喹啉-3-羧酸(Tic)。对 Pictet-Spengler 反应和脂酶催化水解进行了工艺优化。Pictet-Spengler 反应的最佳条件是:  $n(\text{苯丙氨酸}):n(\text{多聚甲醛}):n(\text{HBr})=1:1.4:8.8$  (HBr 使用其 40% 质量分数的水溶液), 反应温度为 60℃, 消旋体 Tic 收率为 87.1%。脂酶催化水解的最适宜条件是反应温度为 30℃, 酶和底物的质量比为 0.2, pH 值为 7.5, 可得到光学收率 e.e % > 99%、化学收率 49.1% 的(S)-Tic。

**关键词:** 化学酶法; (S)-1,2,3,4-四氢喹啉-3-羧酸; Pictet-Spengler 反应; 脂酶催化水解

中图分类号: TQ517

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)12-0023-03

## Study on chemoenzymatic synthesis of optically pure (S)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid

GONG Da-chun<sup>1</sup>, ZHOU Hua<sup>1</sup>, GONG Mei-zhen<sup>2</sup>, WEI Ping<sup>1</sup>, OUYANG Ping-kai<sup>1</sup>

(1. College of Life and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;

2. College of Life and Chemistry, Three Gorges University, Yichang 443001, China)

**Abstract:** The process to prepare optically pure (S)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic) by chemoenzymatic synthesis with racemic phenylalanine and polyformate as starting materials and hydrobromic acid as catalyst, through Pictet-Spengler reaction, esterification, and enzymatic hydrolysis by CRL lipase was introduced. The racemic Tic yield can reach 87.1% under the following optimal conditions of Pictet-Spengler reaction such as: at 60℃ for 5 h with  $n(\text{phenylalanine}):n(\text{polyformate}):n(\text{HBr})=1:1.4:8.8$  (HBr is a 40% mass ratio as aqueous solution). The chemical yield can reach 49.1% with 99.5% (enantiomerically purity) of (S)-Tic under such optimal conditions of enzymatic hydrolytic reaction as the following: at 30℃ for 48 h with a 0.20 of mass ratio between CRL enzyme and substrate under pH 7.5.

**Key words:** chemoenzymatic method; (S)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid(Tic); Pictet-Spengler reaction; lipase-catalytic hydrolysis

(S)-1,2,3,4-四氢喹啉-3-羧酸, 简称(S)-Tic, 是一种非蛋白  $\alpha$ -氨基酸。(S)-Tic 所具有的特殊的分子几何构型和特定的生物活性已受到人们的极大关注, 已成为合成多种酶抑制剂, 如 ACE 抑制剂<sup>[1-3]</sup>、HIV 酶抑制剂<sup>[4-7]</sup>、基质金属蛋白酶抑制剂<sup>[8]</sup>和法尼转移酶抑制剂<sup>[9]</sup>等肽类和拟肽类药物的关键手性原料, 也是合成一些四氢异喹啉类似物

物碱的起始原料<sup>[10-11]</sup>。最近还发现用(S)-Tic 代替脯氨酸合成一种从海洋生物所提取的生物活性物质 Didemnin 类似物 Tic5 - Didemnin B<sup>[12-13]</sup> 和 Spirooxindol<sup>[14]</sup>, 表现出强烈的抗癌活性, 可以抑制蛋白生物合成, 诱导快速细胞程序死亡, 是一种很有前景的抗癌新药。

合成光学纯的(S)-Tic 的方法主要有 3 种:

收稿日期: 2003-08-20

作者简介: 龚大春(1967-), 男, 博士, 副教授, 主要从事手性化合物合成技术的研究; 欧阳平凯(1945-), 教授, 博导, 中国工程院院士, 通信联系人, 从事生物化学工程与化学生物学新技术的研究, 025-3587001。

①以 *L*-苯丙氨酸为原料,用浓盐酸作催化剂,经 Pictet-Spengler 反应脱水缩合得到<sup>[15]</sup>Tic,但反应过程中存在 30%左右的消旋产物,而且有致癌物二氯甲醚生成;②以 1,2-二氯甲基苯和 *N*-乙酰-2-氨基丙二酸为原料合成消旋体 Tic,然后用薄荷醇或扁桃酸等手性试剂拆分<sup>[16]</sup>,该路线较复杂,成本高;③以炔类化合物、甘氨酸、简单烯烃经 $[2+2+2]$ Diels-Alder 反应合成消旋体 Tic 及其衍生物<sup>[17]</sup>。虽然可以合成多种取代的 Tic 衍生物,但反应条件较苛刻,不易工业化,且产品为非光学纯的。笔者采用化学酶法以消旋体苯丙氨酸为原料,用氢溴酸作催化剂,经 Pictet-Spengler 反应合成消旋体 Tic,然后经酯化、脂肪酶水解得到光学纯的(*S*)-Tic。该合成路线简捷,成本低,产物光学纯度高,污染少,易于工业化。

## 1 实验部分

### 1.1 合成路线

(*S*)-Tic 分子几何构型如图 1,其合成路线如图 2。

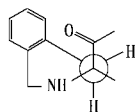


图 1 具有特殊  $x_1$  扭转角的 (*S*)-Tic

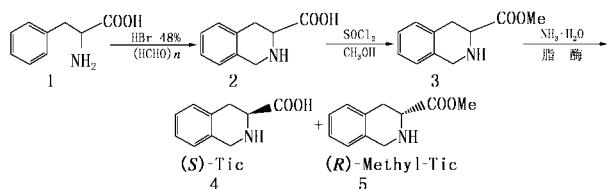


图 2 化学酶法合成(*S*)-Tic 流程

### 1.2 试剂与仪器

消旋体苯丙氨酸,纯度 > 99%,国家生化工程中心(南京);CRL(*Candida rugosa*)酶从 Sigama 公司购买;氢溴酸,质量分数 48%;多聚甲醛、无水甲醇、氯化亚砷、正己烷等均为分析纯,国产。

气质联用仪,API2000LC/MS/MS;自动旋光分析仪,WZZ-2A,上海物理光学仪器厂;显微熔点仪,XT4A,北京市科仪电光仪器厂;核磁共振仪,AVANCE400D + HR/MAS,瑞士 Bruker 公司。

### 1.3 实验步骤

#### 1.3.1 Pictet-Spengler 闭环反应

在 500 mL 三颈瓶中加入 16.5 g(0.1 mol)苯丙氨酸和适量氢溴酸,磁力搅拌下加入多聚甲醛,加热回流。反应 4 h 以上,TLC(薄层色谱)检测反应终点,展开剂为  $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰醋酸})=2:1$  的饱和

水溶液。酸点消失后,过滤,用冷乙醇/水( $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=2:1$ )洗涤,得到有银色反光的固体 2。干燥后,用含氨质量分数 10%的氨水调 pH 值为 6.5~7.0。用热乙醇水溶液( $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}=2:1$ )重结晶。称重并计算收率,测定熔点。改变多聚甲醛、氢溴酸的用量及反应温度,优化工艺条件。

#### 1.3.2 酯化反应

向盛有甲醇的 500 mL 烧瓶中于  $-10^{\circ}\text{C}$  下加入重蒸后的  $\text{SOCl}_2$ ,反应 30 min 后,加入固体 2,搅拌下室温反应 24 h,TLC 检测反应终点。旋转蒸发,得到白色粉末 3 的盐酸盐,测熔点。用碳酸钠调 pH 值,用醋酸乙酯萃取,蒸馏得到无色液体 3,核磁检测。

#### 1.3.3 脂肪酶的水解反应

在带有磁力搅拌的 500 mL 烧瓶中加入 23.8 g(0.1 mol)的产物 3 的盐酸盐,以正己烷和少量水为溶剂,加入适量 CRL 酶粉,用氨水调节 pH 值  $30^{\circ}\text{C}$  下搅拌反应 48 h。离心分离,调节等当点,过滤,得到光学纯的(*S*)-Tic。用热乙醇水溶液重结晶,得到具有金属光泽的固体 4。称重,计算收率,测定比旋光度、熔点,用 LC/MS 检测产品。改变酶的浓度和 pH 值,优化水解工艺。

## 2 结果和讨论

### 2.1 多聚甲醛用量对 Pictet-Spengler 反应的影响

经典的 Pictet-Spengler 反应是用 37% (甲醛质量分数)甲醛水溶液参与闭环反应的,笔者也用甲醛水溶液进行了实验,发现反应存在较多的水解产物,收率只能达到 74%。在滤液中经旋转蒸发得到 20%左右的白色晶体,经检测为 1-*H*,2-苯基吡喃-3-羧酸。熔点为  $196\sim 199^{\circ}\text{C}$ ,  $M_s, m/z: 176(M^+), 130(M-46), 77(M-99)$ ,因此改用多聚甲醛。但多聚甲醛在反应温度下易挥发,所以按化学计量投入只能得到 50%左右的收率,其用量对 Tic 收率的影响见表 1。在反应温度为  $70^{\circ}\text{C}$ ,苯丙氨酸用量为 16.5 g(0.1 mol),氢溴酸(40%水溶液)用量为 80 mL,反应时间为 5 h 的条件下,多聚甲醛的最佳用量为 3.8 g,收率为 85.2%。

表 1 多聚甲醛用量对 Tic 收率的影响

实验	$m(\text{多聚甲醛})/\text{g}$	$n(\text{多聚甲醛}):n(\text{苯丙氨酸})$	收率/%
1	2.8	1.0	50.1
2	3.3	1.2	65.0
3	3.8	1.4	85.2
4	4.3	1.5	83.1
5	4.8	1.7	82.9

## 2.2 氢溴酸用量的影响

为了避免致癌物质二氯甲醚生成,选用氢溴酸(质量分数40%的水溶液)参与Pictet-Spengler反应。氢溴酸一方面作为亲核加成缩合的催化剂,另一方面作为反应介质,溶解苯丙氨酸和多聚甲醛。因此在反应温度为80℃,苯丙氨酸用量为16.5g,多聚甲醛用量为3.3g,反应时间为5h的条件下,对氢溴酸用量进行了优化。结果表明在氢溴酸用量为120mL,即 $n(\text{氢溴酸}):n(\text{苯丙氨酸})=8.8$ 时效果最好,收率可达80.3%。

表2 氢溴酸用量对Tic收率的影响

实验	氢溴酸(40%)用量/mL	$n(\text{氢溴酸}):n(\text{苯丙氨酸})$	收率/%
1	60	4.3	60.7
2	80	5.8	65.1
3	100	7.3	70.2
4	120	8.8	80.3
5	140	16.9	80.3

## 2.3 温度的影响

Pictet-Spengler反应受温度影响最大。温度过高时酸和甲醛挥发,严重影响Tic收率。温度太低时反应则缓慢。在上述优化条件下,即 $n(\text{苯丙氨酸}):n(\text{多聚甲醛}):n(\text{氢溴酸})=1:1.4:8.8$ 时,对反应温度从50℃到90℃进行了优化,结果见表3。可以看出反应温度为60℃,反应收率最好。

表3 温度对Tic收率的影响

实验	反应温度/℃	收率/%
1	50	78.2
2	60	87.1
3	70	86.5
4	80	80.4
5	90	70.1

## 2.4 CRL酶浓度对水解反应的影响

CRL酶的对映选择性水解,会受到反应底物浓度、酶浓度、反应溶剂、pH值等多因素的影响。实验发现反应温度的影响较小,控制在30℃。而酶浓度对(S)-Tic收率的影响较大。pH值为7时,投入23.8g底物3的盐酸盐进行实验,结果见表4。在酶的浓度较低时,酶的浓度增加会提高反应速度,当 $m(\text{酶}):m(\text{底物3})$ 增加到0.20(这里酶的质量为载体与酶的总质量)时,反应收率最大。继续增加酶的浓度,对反应速度和收率影响不大。

表4 酶浓度对(S)-Tic收率的影响

实验	$m(\text{酶}):m(\text{底物3})$	收率/%
1	0.05	37.0
2	0.10	47.0
3	0.15	47.6
4	0.20	47.8
5	0.25	47.1

## 2.5 pH值对酶水解反应的影响

在非水介质中,由于酶的“记忆”效应,使得酶的活力受pH值影响较大。根据厂家提供的酶促反应的pH值范围,在6.0~9.0之间进行了优化,实验结果见表5。在反应温度为30℃, $m(\text{酶}):m(\text{底物})=0.2$ 时,CLS酶促反应的最佳pH值为7.5。

表5 pH值对(S)-Tic收率的影响

实验	pH值	收率/%
1	6.0	45.1
2	7.0	47.6
3	7.5	49.1
4	8.0	48.3
5	9.0	43.3

## 2.6 分析检测数据

产品4(S)-Tic的熔点320~323℃(dec), $[\alpha]_D^{22}=-176.1^\circ$ ,光学收率为99.5%,( $c=0.75,1\text{ mol/L NaOH}$ );文献值<sup>[15]</sup>:熔点>280℃, $[\alpha]_D^{22}=-178^\circ$ ( $c=1,1\text{ mol/L NaOH}$ );MS  $m/z$   $C_{10}H_{12}NO_2$ ,178.08(M)<sup>+</sup>,132.01(M-46),104.0(M-74)。

中间体3的盐酸盐熔点322~325℃,文献值<sup>[16]</sup>328.5℃;IR(KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):3 437.6,2 926.7,1 633.2,1 403.3,1 316.9,740.0。

中间体3  $^1\text{H NMR } \delta(\text{CDCl}_3)$ :2.15(1H, s, —NH—),2.74~3.01(2H, m, Ar—CH<sub>2</sub>—CH—),3.68(3H, s, COOCH<sub>3</sub>),3.40~3.81(1H, m, CH—N),3.98(2H, s, ArCH<sub>2</sub>—N),6.81~7.12(4H, m, Ar—H)。

## 3 结语

通过采用化学酶法成功地合成了高光学纯的(S)-1,2,3,4-四氢喹啉-3-羧酸(Tic)。此路线选择性高,成本低,效率高,易于规模制备。对该路线的两步重要反应:Pictet-Spengler反应和CLS酶水解反

(下转第27页)

垢效果的试验研究,确定了合成工艺的最佳反应条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

马来酸酐,碳酸铵,碳酸氢钠,氯化钙,氢氧化钠,乙醇,二甲基甲酰胺等,均为分析纯。真空过滤器;恒温培养箱,天津实验仪器厂;乌式黏度计,沈阳精密仪器厂;红外光谱仪,Spectrum one型,美国PE;核磁共振波谱仪,ARX400型,瑞士Bruker。

### 1.2 PASP 制备方法

#### 1.2.1 PSI 合成

研钵中将片状马来酸酐和块状碳酸铵晶体研成粉末,称取20g的马来酸酐和一定量的碳酸铵,混合后置入反应器内,在30min内缓慢升高温度至65℃,恒温60min。生成反应中间产物,然后在30min内提高温度至170℃,聚合反应一定时间后,取出聚合反应产物备用。

#### 1.2.2 PASP 制备

室温条件下聚合产物用质量分数为14% NaOH的水溶液水解1h,完全溶解后用稀盐酸调至中性,溶液中加入乙醇混合,形成棕色沉淀,沉淀物经真空过滤、105℃干燥2h得PASP产品,计算产率。

### 1.3 产物纯化和阻垢性能测试

取聚合反应产物5.0g于250mL三角瓶中,加入20mL二甲基甲酰胺,搅拌条件下在40℃的水浴

中恒温2h,此时聚合物全部溶解,混合溶液经真空过滤,滤液用乙醇沉析,沉淀物为纯化的PSI。

取纯化PSI 0.5g,溶于100mL二甲基甲酰胺(DMF)配制的0.5%溶液,(25±0.1)℃条件下用 $\eta = 0.5$  mm的乌式黏度计测定溶液黏度 $\eta_{sp}$ ,PASP黏均分子量 $M$ 按下列公式计算<sup>[7]</sup>:

$$n = 3.52 \times \eta_{sp}^{1.56}, \eta_{sp} = (t - t_0)/t_0, M = 115.1 \times n + 18$$

式中 $n$ 为PSI聚合度; $M$ 为PASP黏均分子量; $\eta_{sp}$ 为溶液相对黏度; $t_0$ 为纯溶剂流过毛细管的时间,s; $t$ 为溶液流过毛细管的时间,s。

各取50mL  $Ca^{2+}$ 和 $HCO_3^-$ 水样,加入不同浓度PASP阻垢剂,(70±2)℃预热0.5h,然后混合在(70±2)℃水溶液中恒温16h,溶液冷却至室温,取上层清液,用EDTA络合滴定法测定 $Ca^{2+}$ 离子浓度,由下列公式计算阻垢率:

$$\text{阻垢率} = (V_1 - V_0)/(V_2 - V_0) \times 100\%$$

式中 $V_1$ 为加PASP水样消耗EDTA溶液的体积, $V_2$ 为未加PASP水样消耗EDTA溶液的体积, $V_0$ 为未加药剂水样(空白)消耗EDTA溶液的体积。

## 2 结果分析

### 2.1 聚合物的结构表征

当温度升高至55℃时,碳酸铵分解,氨气和水迅速被马来酸酐吸收,此时发生氨转移反应,生成

(上接第25页)

应进行了优化: $n$ (苯丙氨酸): $n$ (多聚甲醛): $n$ (HBr) = 1:1.4:8.8(氢溴酸含40%质量分数的HBr),反应温度为60℃时,可使消旋体Tic的合成收率达到87.1%。当反应温度为30℃,酶/底物的质量比为0.2,pH值为7.5时,可得到光学收率>99%,化学收率为49.1%的(S)-Tic。

### 参考文献

- [1] Kimiaki H, Ken-ichi N, Kazuo S. [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(5): 2011 - 2022.
- [2] Hoechst A G. Peptide mit bradykinin-antagonistischer wirkung[P]. DE 4013270, 1990.
- [3] Syntex, Inc. Selective amidination of diamines[P]. EP 260118, 1988.
- [4] Kuo Long Y, William F H. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1993, 3(4): 535 - 538.
- [5] Clariant Life Science Molecules (Italian) SPA. Method of preparation of (S)-N-tert-butyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic[P]. WO 02/30905, 2002 - 04 - 18.
- [6] Gianfranco B, Remo G, Severo S. [J]. J Med Chem, 2002, 45(3):

713 - 720.

- [7] Gianfranco B, Severo S, Remo G, et al. [J]. J Med Chem, 2002, 45(25): 5556 - 5563.
- [8] Hans M, Manfred S, Wilfrid S, et al. [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10(11): 3529 - 3544.
- [9] Sambasivara K, Nampally S. [J]. Eur J Org Chem, 2001, (17): 3375 - 3383.
- [10] Isabelle M P, Dieter S. [J]. Hev Chi Act, 1987, 70(7): 1944 - 1954.
- [11] 何立文, 黄文龙, 彭司勋, 等. [J]. 药学进展, 1997, 21(1): 31 - 35.
- [12] Jame E T, Amy J P, Madeleine M J. [J]. J Org Chem, 2001, 66(23): 7575 - 7587.
- [13] Amy J P, Matthew D V, Xiaobin D, et al. [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1998, 8(24): 3653 - 3656.
- [14] Subramanian G, Raghunathan R, Nethaji M. [J]. Tetrahedron, 2002, 58(44): 9075 - 9079.
- [15] Kimiaki H, Yasuhiko O, Ken-ichi N, et al. [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(1): 321 - 324.
- [16] Kammermeier B O T, Lench U. [J]. Synthesis, 1992, (11): 1157 - 1160.
- [17] Sambasivarao K, Nampally S. [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, 10: 1413 - 1415. ■