

文章编号:1673-1689(2009)05-0716-05

L-苯基乙酰基甲醇的生物合成、分离纯化和鉴定

李丹¹, 林彦良¹, 林慧彬², 林建强^{*1}

(1. 微生物技术国家重点实验室, 山东大学, 山东 济南 250100; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘要: L-苯基乙酰基甲醇(L-phenylacetylcarbinol, L-PAC)是合成麻黄碱等药物的重要手性中间体。利用酵母生物催化法合成 L-PAC; 采用制备型高效制备液相色谱(RP-HPLC)纯化转化产物, 获得高纯度的 L-PAC(纯度>99%); 采用紫外光谱、红外光谱、旋光、核磁共振及高分辨质谱等技术手段对分离产物进行了结构鉴定。

关键词: 制备型反相高效液相色谱; L-苯基乙酰基甲醇; 麻黄碱; 伪麻黄碱

中图分类号: TQ 461

文献标识码: A

Biosynthesis, Separation, Purification and Identification of L-Phenylacetyl Carbinol

LI Dan¹, LIN Yan-liang¹, LIN Hui-bin², Lin Jian-qiang^{*1}

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China; 2. Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract: L-phenylacetylcarbinol(L-PAC) is an important chiral intermediate for ephedrine and pseudoephedrine synthesis. In this study, L-PAC could produced from pyruvate and benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*. Then the crude extract of the bio-resultant was purified using preparative reversed-phase high performance liquid chromatography to achieve purified L-PAC. The result from HPLC chromatogram, which equipped with UV detector at the wave length of 283 nm, indicated that the purity of the purified L-PAC was over 99%. The ultra violet absorbance (UV), infrared (IR), specific rotation, nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) was further used to identify the structure of L-PAC.

Key words: Preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (Preparative RP-HPLC), L-phenylacetylcarbinol, ephedrine, pseudoephedrine

L-苯基乙酰基甲醇(L-PAC)又称 1-羟基-1-苯基丙酮(1-hydroxy-1-phenylacetone)、 α -羟基苯基甲基酮(α -hydroxy benzyl methyl ketone),是一种化学性质十分活泼的邻位羟基酮类化合物,易形成分子内和分子间半缩酮类环状化合物^[1]。其结构见

图 1。

L-PAC 是一种重要的有机合成手性中间体,在制药业作为前体用来合成 L-麻黄碱(L-ephedrine)、D-伪麻黄碱(D-pseudoephedrine)^[2],以及安非他命(amphetamine)、苯胺和苯丙胺等药物^[3]。利用生

收稿日期: 2008-11-05

* 通讯作者: 林建强(1964-),男,福建厦门人,理学博士,教授,主要从事应用微生物学研究。

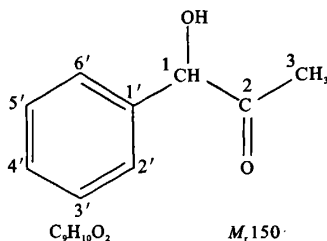


图1 L-PAC的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of L-PAC molecule

物转化法,以苯甲醛和丙酮酸为底物经酵母发酵,能生成高光学纯度的 L-PAC^[4]。与化学合成法相比,生物转化法具有环境友好、产物光学纯度高等优点,避免了化学合成外消旋产物的手性分离这一复杂过程,具有良好应用前景,是未来的发展方向。

在 L-PAC 的分离纯化和鉴定方面,目前除德国巴斯夫公司拥有高纯度的 L-PAC 对照品(非卖品)外^[5],几乎所有研究者都必须自行纯化 L-PAC。虽然 L-PAC 已被发现 80 多年,但其分离纯化方法却没有大的改进,都较为复杂^[1,6-7]。一般先用等体积的乙醚抽提转化产物 3~5 次;再用 NaHCO₃ 除去酸;然后加入偏亚硫酸氢钠(sodium metabisulphite)结合其中的醛和醇;乙醚洗涤后再用固体 NaHCO₃ 释放醛和醇;最后再经两次硅胶柱分离,十分繁琐。作者利用生物转化法合成 L-PAC,利用制备型 HPLC(RP-HPLC)分离纯化转化产物,及对纯化的 L-PAC 的结构进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 器材

LC-10 AD 分析型高效液相色谱仪, LC-6 AD 制备型高效液相色谱仪, SPD-M10A 紫外检测器,均为日本 Shimadzu Co 制; NEXUS 470 FT-IR 傅立叶红外光谱仪,美国 Nicolet Co 制; AVANCE 600 型核磁共振仪,瑞士 Bruker Co 制,内标为四甲基硅(TMS); GCT 高分辨气相色谱-质谱联用仪(EI+model, TOF),英国 MarcoMass Co 制。

冰醋酸、乙腈为市售色谱纯;其他试剂均为市售分析纯。活性干酵母,安琪酵母股份有限公司提供。

1.2 L-PAC 的生物转化

2 g 活性干酵母置于 20 mL KH₂PO₄ 缓冲液(50 mmol/L)中,30 ℃ 220 r/min 振摇活化 2 h 后,12 000 r/min 离心 10 min,去上清液。KH₂PO₄ 缓冲液洗涤湿菌体 1 次,12 000 r/min 离心 10 min,收集湿菌体。加入 48 mL 转化原液(50 mmol/L KH₂PO₄, 180 mmol/L 丙酮酸钠,调 pH 至 6.0)重悬菌

体,30 ℃ 静置 1 h 后,加入苯甲醛(终浓度为 60 mmol/L),30 ℃ 220 r/min 振摇 12 h,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。

1.3 L-PAC 的制备色谱分离

1.3.1 一次制备分离 色谱条件为:HiQ sil C₁₈-10 色谱柱(5 μm,250 mm×10 mm);流动相:乙腈-体积分数 0.5% 醋酸水溶液(体积比 3:7);体积流量:5 mL/min;检测波长为 283 nm;柱温为室温;进样量为 300 μL。

1.3.2 二次制备分离 色谱条件为:HiQ sil C₁₈-10 色谱柱(5 μm,250 mm×10 mm);流动相:乙腈-体积分数 0.5% 醋酸水溶液(体积比 2:8);体积流量:5 mL/min;检测波长为 283 nm;柱温为室温;进样量为 1 200 μL。

流动相在使用前经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,超声脱气。

1.4 L-PAC 的鉴定

1.4.1 L-PAC 的色谱鉴定 分析型高效液相的色谱条件:100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-体积分数 0.5% 醋酸水溶液(体积比 3:7);体积流量 1 mL/min;检测波长 283 nm;柱温为室温;进样量为 20 μL。

1.4.2 L-PAC 的结构鉴定 采用 UV、IR、旋光、NMR、GC-MS 检测,确定其化学结构。

2 结果与讨论

2.1 L-PAC 的生物转化和抽提

按 1.2 所述方法进行 L-PAC 生物转化,转化产物进行分析型 HPLC 检测。结果见图 2,表明在该色谱检测条件下,转化液中至少含有 9 种物质。

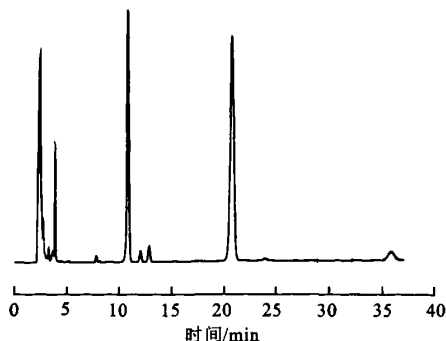


图2 L-PAC 生物转化液的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatogram of the L-PAC biotransformation medium

由于 L-PAC 易溶于多种有机溶剂,综合溶解度、回收率、毒性、成本等因素,最终确定以乙醚为

抽提溶剂,等体积抽提4次能完全抽提。转化液用等体积的乙醚萃取4次,合并有机相,减压蒸发至5~10 mL,4℃避光保存。

2.2 L-PAC 色谱分离

由1.2所述方法所得到的转化液样品经乙醚抽提浓缩,浓缩样品经0.2 μm微孔滤膜过滤,作为一次制备色谱用样品液。按1.3所述方法进行二次制备,根据检测结果收集相应流出液,收集得到A馏分(见图3),减压旋转蒸发至15 mL。

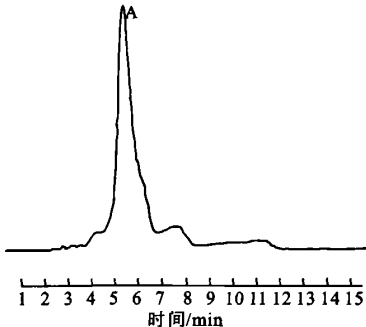


图3 乙醚抽提样品的制备液相色谱图

Fig. 3 Preparative RP-HPLC chromatogram of the ether extracted sample

浓缩后的A馏分经0.2 μm微孔滤膜过滤后,作为二次制备色谱用样品液。按1.3所述方法进行二次制备,根据检测结果收集相应流出液,收集得到化合物I(图4),40℃减压蒸干。

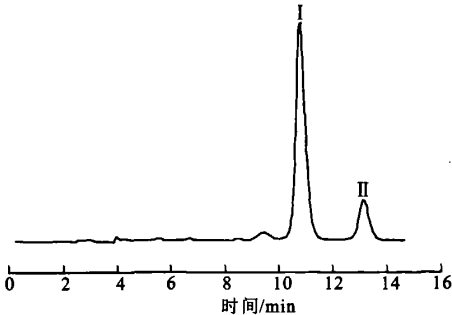


图4 A馏分的制备液相色谱图

Fig. 4 Preparative RP-HPLC chromatogram of the component A

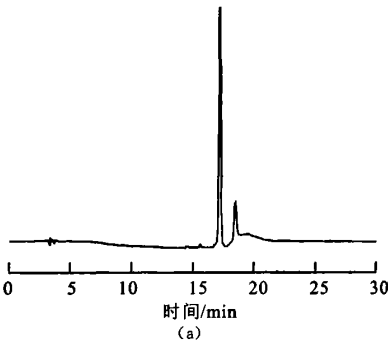
在采用高效制备液相色谱法进行物质的分离纯化时,不但要求所分离的物质有较好的分离度,而且要求进样量大、收率高、实验运行时间短,以降低运行成本^[8]。适当增加流动相中水的比例,可提高色谱峰的分离度,但水量过多,制备时间过长。本实验中尝试了梯度洗脱(M₁)、体积分数10%乙腈(M₂)、20%乙腈(M₃)、25%乙腈(M₄)、30%乙腈(M₅)的等度洗脱,进行二次液相分离(图5),发现以乙腈-体积分数0.5%醋酸水溶液(体积比3:

7)进行一次制备,收集样品再经乙腈-体积分数0.5%醋酸水溶液(体积比2:8)进行二次制备后,能获得最佳的分离效果。两次制备体积流量均为5 mL/min,制备分离在20 min内完成。每次处理1 L生物转化液,回收率为15%(见表1)。

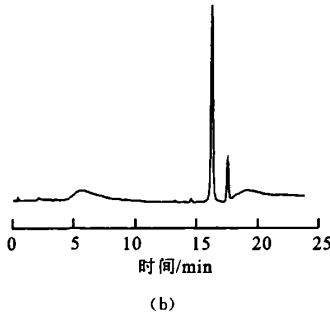
表1 L-苯基乙酰基甲醇分离纯化过程的纯度及回收率

Tab.1 The purity and recovery of L-PAC in the purification process

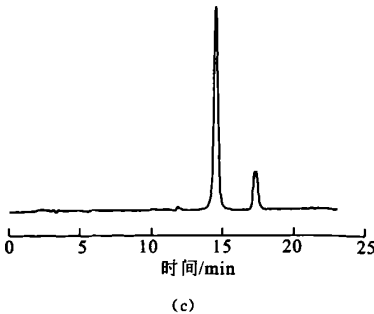
分离纯化步骤	L-PAC 的质量/mg	纯度/%	回收率/%
生物转化液	1 152	22.2	100
乙醚抽提	956	78.2	83
第一次液相制备分离	438	80.8	38
第二次液相制备分离	174	99.2	15



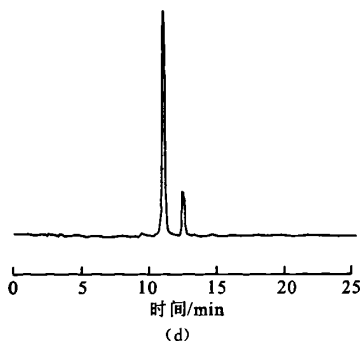
M₁:梯度洗脱,乙腈体积分数由10%缓慢提高至25%



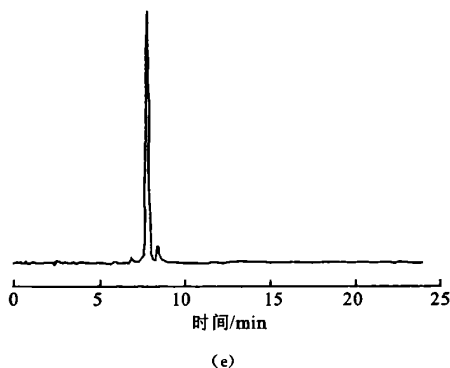
M₂:等度洗脱,乙腈-体积分数0.5%醋酸水溶液(体积比10:90,)



M₃:等度洗脱,乙腈-体积分数0.5%醋酸水溶液(体积比20:80)



M₄:等度洗脱,乙腈-体积分数 0.5%醋酸水溶液(体积比 25 : 75)



M₅:等度洗脱,乙腈-体积分数 0.5%醋酸水溶液(体积比 30 : 70)

图 5 不同洗脱条件下 A 组分的高效液相色谱分离图

Fig. 5 HPLC Chromatogram of component A under various elution conditions

2.3 L-PAC 色谱鉴定

对化合物 I 进行分析型高效液相色谱检测。图 6 为化合物 I 的分析型 HPLC 分离图。经峰面积归一法计算,此化合物纯度为 99.15%,保留时间为 10.17 min。

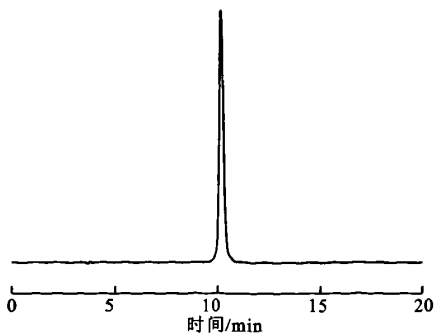


图 6 化合物 I 的高效液相色谱分离图

Fig. 6 HPLC chromatogram of compound I

2.4 L-PAC 结构鉴定

对化合物 I 进行物性和化学鉴定,以及 UV、IR、旋光、NMR、GC-MS 等光谱学鉴定。化合物 I 外观为黄绿色油状物,溶于乙醚、氯仿、乙酸乙酯、二氯乙烷、甲醇、乙醇等溶剂,温度高易发生结构变化; α -萘酚-肌酸反应呈紫红色;UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}} = 252 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{sh}} = 282 \text{ nm}$; IR (KBr) $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 3 445 (OH), 3 031 (Ph), 1 716 (C=O), 1 600 (Ph), 1 091 (CH_3), 见图 7; 旋光测定结果: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 -294° (体积分数 2% 无水乙醇); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ : 25.294 (C-3), 80.136 (C-1), 127.372 (C-4'), 128.898 (C-3', 5'), 129.043 (C-2', 6'), 134.641 (C-1'), 207.160 (C-2), 见图 8; TOF EI + MS (m/z): 150.069 4 (分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$), 与理论计算值 150.068 1 吻合,与高分辨率 GC-MS 谱库中标准谱图比对一致。根据以上数据,确定化合物 I 为 L-苯基乙酰基甲醇。

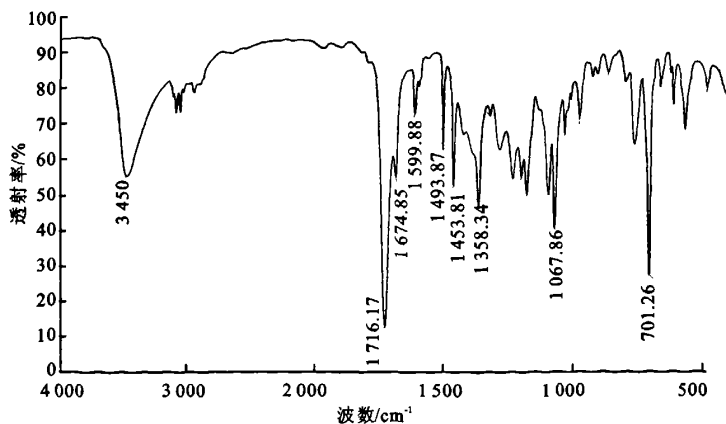
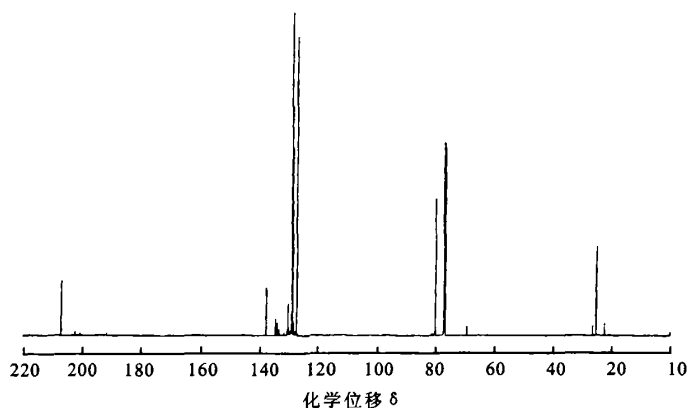


图 7 化合物 I 的红外光谱图

Fig. 7 IR absorption of compound I

图8 化合物I的 ^{13}C NMRFig. 8 ^{13}C NMR of compound I

本次实验中纯化所得的 L-PAC 的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -294° (体积分数 2% 无水乙醇), 而之前文献报道^[9] 的 L-PAC 的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -107° (体积分数 2% 无水乙醇)。表明本实验获得的 L-PAC 对照品光学纯度更高。

3 结 语

生物转化法制备 L-PAC 绿色环保、工艺简单。高效制备液相色谱法分离制备化合物, 能高效、快

速地获得高纯度的化合物单体, 避免了反复进行柱色谱分离造成的样品损失及大量的时间浪费, 且操作简便, 设备简单, 制备出的产品纯度高, 可作对照品。由于至今国内尚无 L-PAC 的对照品, 本实验中首次采用制备型高效液相色谱分离纯化 L-PAC, 经 HPLC 归一化法检测, 单体纯度达 99.15%, 符合要求, 并对其结构进行了鉴定。本课题为生物转化生产 L-PAC 的进一步产业化研究打下了基础。

参考文献(References):

- [1] 李继珩, 冯亚宁. L-苯基乙酰基甲醇分离纯化及性质研究[J]. 化学世界, 2002, 43(3): 127-129.
LI Ji-heng, FENG Ya-ning. Study on purification and properties of L-phenylacetyl carbinol[J]. *Chemical World*, 2002, 43(3): 127-129. (in Chinese)
- [2] Long A, Ward O P. Biotransformation of benzaldehyde by *saccharomyces cerevisiae*: Characterization of the fermentation and toxicity of substrates and products[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 34(7): 933-941.
- [3] Astrup A, Buemann B, Christensen N J, et al. The effect of ephedrine/caffeine mixture on energy expenditure and body composition in obese women[J]. *Metabolism*, 1992, 41(7): 686-688.
- [4] Neuberg C, Libermann L. Zur kenntnis der carboligase[J]. *Biochem Z*, 1921, 121: 311-325.
- [5] Breuer M, Pohl M, Hauer B, et al. High-throughput assay of (R)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 374(6): 1069-1073.
- [6] Shukla V B, Kulkarni P R. Downstream processing of biotransformation broth for recovery and purification of L-phenylacetyl carbinol (L-PAC) [J]. *J Sci Ind Res*, 1999, 58(8): 591-593.
- [7] Long A, James P, Ward O P. Aromatic aldehydes as substrates for yeast and yeast alcohol dehydrogenase[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 33(5): 657-660.
- [8] 田娜, 刘仲华, 黄建安, 等. 高效制备液相色谱法从荷叶中分离制备黄酮类化合物[J]. 色谱, 2007, 25(1): 88-92.
TIAN Na, LIU Zong-hua, HUANG Jian-an, et al. Isolation and preparation of flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(1): 88-92. (in Chinese)
- [9] 胥秀英, 郑一敏, 温寿祯, 等. 左旋麻黄素半生物合成研究(I) L-苯基乙酰基甲醇生物合成条件研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 119-121.
XU Xiu-ying, ZHENG Yi-min, WEN Sou-zhen, et al. Studies on the semi-biosynthesis of L-Ephedrine(I) studies on the biosynthesis of L-Phenyl acetyl carbinol[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2001, 26(2): 119-121. (in Chinese)

(责任编辑: 秦和平)