

Е. Н. Рычкова (магистрант), Л. С. Гильманова (магистрант), А. О. Ленкова (к.х.н., инж.-иссл.),
А. В. Зорин (к.х.н., в.н.с.), Л. Н. Зорина (к.х.н., доц., с.н.с.)*

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПЕНТИЛОВОГО ЭФИРА 3-АМИНОБУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРИСУТСТВИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств

*кафедра общей и аналитической химии

450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; тел. (347)2431935, e-mail: chemist.518@mail.ru

E. N. Rychkova, L. S. Gilmanova, A. O. Lenkova, A. V. Zorin, L. N. Zorina

ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF PENTYL ETHER 3-AMINOBUTYRIC ACID IN THE PRESENCE OF ENZYME DRUGS

Ufa State Petroleum Technological University

1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia; ph. (347)2431935, e-mail: chemist.518@mail.ru

Нами была исследована возможность получения энантимерно чистой 3-аминобутановой кислоты путем энантиоселективного гидролиза рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты в присутствии ферментных препаратов *Candida Antarctica* (CAL-B) (Novozym 435) и Химотрипсина. Энантиоселективный гидролиз рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты в присутствии Novozym 435 приводит к образованию 3R-(–)-3-аминобутановой кислоты с выходом 88% от теоретического и оптической чистотой 86% *ee*. Выход остаточного пентилового эфира 3S-(+)-3-аминобутановой кислоты составил 28% от теоретического с оптической чистотой 56% *ee*. В результате парциального гидролиза рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты в присутствии химотрипсина образуется 3S-(+)-3-аминобутановая кислота с выходом 68% от теоретического и оптической чистотой 79% *ee*. Остаточный пентильный эфир 3R-(–)-3-аминобутановой кислоты получен с выходом от 60% теоретического и оптической чистотой 45% *ee*.

Ключевые слова: 3-аминобутановая кислота; Novozym 435; пентильный эфир 3-аминобутановой кислоты; химотрипсин; энантиоселективный гидролиз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания.

We investigated the possibility of obtaining enantiomerically pure 3-aminobutyric acid by enantioselective hydrolysis of racemic pentyl ether of 3-aminobutyric acid in the presence of enzyme preparations *Candida Antarctica* (CAL-B) (Novozym 435) and Chymotrypsin. Enantioselective hydrolysis of the racemic pentyl ester of 3-aminobutyric acid in the presence of Novozym 435 leads to the formation of 3R-(–)-3-aminobutyric acid with a yield of 88% of theoretical and optical purity of 86% *ee*. The yield of residual pentyl ester of 3S-(+)-3-aminobutyric acid was 28% (of theory) and an optical purity of 56% *ee*. As a result of the partial hydrolysis of racemic pentyl ether of 3-aminobutyric acid in the presence of chymotrypsin 3S-(+)-3-aminobutyric acid is formed with yields of 68% of theoretical and optical purity of 79% *ee*. The residual pentyl 3R-(–)-3-aminobutyrate was obtained in yields of 60% (of theory) and optical purity of 45% *ee*.

Key words: 3-aminobutyric acid; pentyl ester 3-aminobutyric acid; Novozym 435; chymotrypsin; enantioselective hydrolysis.

This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia in the framework of the state task.

Дата поступления 13.03.20

Энантиомерно чистые 3-аминозамещенные карбоновые кислоты являются важными строительными блоками в синтезе фармацевтических препаратов и средств защиты растений ¹. Они широко используются в синтезе гипогликемических, кетогенных, противогрибковых, антигельминтных и инсектицидных препаратов ^{2,3}. Известно, что оптически чистая (*R*)-3-аминобутановая кислота (ВАВА) стимулирует устойчивость растений к абиотическому стрессу ⁴. Таким образом, разработка эффективного метода получения *R*- и *S*-энантиомеров 3-аминозамещенных карбоновых кислот является актуальным направлением исследований.

Ранее было показано, что в присутствии ферментных препаратов Novozym 435 или химоотрипсина энантиоселективный гидролиз рацемических алкиловых эфиров α -аминомасляной кислоты приводит к образованию 2*R*-(–)- или 2*S*-(+)- α -аминомасляной кислоты с выходами 46–72 % от теоретического и оптической чистотой 74–84 % *ee*, соответственно ^{5,6}.

С целью получения энантиомерно чистой 3-аминобутановой кислоты была исследована возможность осуществления парциального гидролиза ее рацемического пентилового эфира в присутствии *Candida Antarctica* (CAL-B) (Novozym 435) и химоотрипсина (схема 1).

Установлено, что парциальный гидролиз пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты **1** при 20–25 °С в присутствии Novozym 435 в течение 24 ч приводит к образованию 3*R*-(–)-3-аминобутановой кислоты **2** с выходом 44% (88% от теоретического) и оптической чистотой 86% *ee* (по данным поляриметрических исследований) и пентилового эфира 2*S*-(+)-3-аминобутановой кислоты **3** с выходом 14% (28% от теоретического) и оптической чистотой 56% *ee* (по данным энантиоселективного ГЖХ анализа). Увеличение продолжительности ферментативного гидролиза приводит к сни-

жению оптической чистоты продуктов **2, 3** из-за медленного протекания гидролиза пентилового эфира 3*S*-(+)-3-аминобутановой кислоты.

В аналогичных условиях ферментативный гидролиз пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты **1** в присутствии химоотрипсина приводит к образованию 3*S*-(+)-3-аминобутановой кислоты **4** с выходом 34% (68% от теоретического) и оптической чистотой 79% *ee* (по данным поляриметрических исследований) и пентилового эфира 3*R*-(–)-3-аминобутановой кислоты **5** с выходом 30% (60% от теоретического) и оптической чистотой 45% *ee* (по данным энантиоселективного ГЖХ анализа) (схема 2).

При увеличении продолжительности ферментативного гидролиза наблюдается снижение оптической чистоты продуктов **4, 5**, что связано с медленным протеканием гидролиза пентилового эфира 3*R*-(–)-3-аминобутановой кислоты.

Строение продуктов подтверждено спектрами ЯМР ¹H и ¹³C, ХМС и поляриметрией.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C записаны в CDCl₃ (D₂O) на приборе Bruker AM-300 (рабочая частота 300 и 75.47 МГц соответственно), внутренний стандарт — ТМС. Хроматографический анализ продуктов проводили на программно-аппаратном комплексе Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором, газ-носитель — гелий (1.1 мл/мин), энантиоселективная колонка Astec CHIRALDEXB-PM (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм). Использовали программированный температурный режим: 80–200 °С, скорость подъема температуры 2 °С/мин. Хромато-масс-спектральный анализ проводили на приборе GCMS-QP2010S Shimadzu (электронная ионизация при 70 эВ, диапазон детектируемых масс 33–350 Да). Использовали

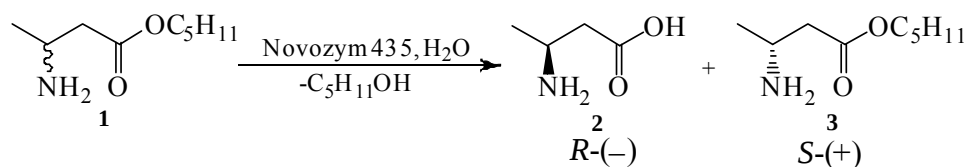


Схема 1.

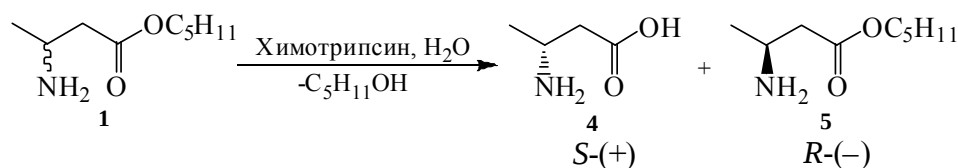


Схема 2.

капиллярную колонку HP-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура испарителя 300 °С, температура ионизационной камеры 250 °С. Анализ проводили, используя программированный температурный режим от 50 до 300 °С со скоростью 20 °С/мин, газ-носитель — гелий (1.1 мл/мин). Удельное вращение полученных продуктов **2**, **4** [α_D^{20}] измеряли на автоматическом поляриметре «Optical Activity Limited» модели АА-55 с галогеновой лампой (стандартная длина волны 589.44 нм). Стандартная величина удельного вращения 3*R*-(–)-3-аминобутановой кислоты $\alpha_D^{20} = -34^\circ$ ($c = 0.6$, H₂O); 3*S*-(+)-3-аминобутановой кислоты $\alpha_D^{20} = +34^\circ$ ($c = 0.6$, H₂O) ⁷.

Синтез рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты был осуществлен по известной методике ⁸.

Пентиловый эфир 3-аминобутановой кислоты 1. Выход 86% от теоретического. Спектр ЯМР ¹H, (CDCl₃, д, м.д.): 0.84т (3H, CH₃), 1.07д (3H, CH₃), 1.19-1.28м (2H, CH₂), 1.48-1.58м (2H, CH₂), 1.88-1.97м (2H, CH₂) 2.23д (2H, CH₂), 3.31-3.54м (1H, CHNH₂), 4.01т (2H, CH₂O). Спектр ЯМР ¹³C, δ_C, м.д.: 13.86 (1C, CH₃), 22.22 (1C, CH₂), 23.22 (1C, CH₃), 28.00 (1C, CH₂), 28.23 (1C, CH₂) 40.01 (1C, CHNH₂), 43.93 (1C, CH₂), 64.52 (1C, CH₂), 172.37 (1C, C=O). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 102 (3), 88 (3), 70 (3), 57 (3), 45 (3), 44 (100), 43 (18), 42 (16), 41 (14), 39 (6).

Методика парциального гидролиза рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты. К 1.6 ммоль пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты (**1**) в 2–2.5 мл воды при нормальных условиях (20–25 °С) добавляли 8.7 мг ферментного препарата Novozym 435 (или химотрипсин — 3.5% от массы субстрата). Контроль за протеканием реакции осуществлялся с использованием метода энантиоселективной газо-жидкостной хроматографии. После окончания реакции фермент осаждали 5% водным раствором трихлоруксусной кислоты и осадок отфильтровывали. Остаточный пентиловый эфир 3-аминобутановой кислоты экстрагировали гексаном (2×10 мл) и концентрировали. Водный слой упаривали под вакуумом. После упаривания воды образовывались кристаллы 3*R*-(–)-3-аминобутановой кислоты (или 3*S*-(+)-3-аминобутановой кислоты).

3*R*-(–)-3-аминобутановая кислота 2. Спектр ЯМР ¹H (D₂O, δ, м.д.): 1.18д (3H, CH₃), 2.35д (2H, CH₂), 3.45-3.49м (1H, CHNH₂). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O, δ_C, м.д.): 17.69 (1C, CH₃), 40.63 (1C, CH₂), 45.36 (1C, CHNH₂), 179.01 (1C, COOH).

3*S*-(+)-3-аминобутановая кислота 4. Спектр ЯМР ¹H (D₂O, δ, м.д.): 1.20д (3H, CH₃), 2.38д (2H, CH₂), 3.47-3.50м (1H, CHNH₂). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O, δ_C, м.д.): 19.32 (1C, CH₃), 42.24 (1C, CH₂), 47.00 (1C, CHNH₂), 179.66 (1C, COOH).

Литература

1. Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.M., Beasley V.R., Carmichael W.W. Total synthesis of ADDA, the unique C 20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins // *Tetrahedron Letters*.— 1989.— V.30.— Pp.4349-4352. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)99357-2.
2. Shinagawa S., Kanamaru T., Harada S., Asai M., Okazaki H. Chemistry of emeramine and its analogs and their inhibitory activity in long-chain fatty acid oxidation // *J. Med. Chem.*— 1987.— V.30.— Pp.1458-1463. DOI: 10.1021/jm00391a030.
3. Seebach D., Matthews J.L. β -Peptides: a surprise at every turn // *Chem. Commun.*— 1997.— Pp.2015-2022.
4. Baccelli I., Mauch-Mani B. Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones // *Plant Molecular Biology*.— 2015.— V.91.— Pp.703-711. DOI:10.1007/s11103-015-0406-y.
5. Ленкова А.О., Зорин А.В., Чанышева А.Р., Гельмель К.В., Файзуллина Г.А., Зорин В.В. Энантиоселективный гидролиз бутилового эфира 6-аминомасляной кислоты в присутствии Novozym 435 // *Баш. хим. ж.*— 2016.— Т.23, №4.— С.42-44.

References

1. Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.M., Beasley V.R., Carmichael W.W. [Total synthesis of ADDA, the unique C 20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins]. *Tetrahedron Letters*, 1989, vol.30, pp.4349-4352. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)99357-2.
2. Shinagawa S., Kanamaru T., Harada S., Asai M., Okazaki H. [Chemistry of emeramine and its analogs and their inhibitory activity in long-chain fatty acid oxidation]. *J. Med. Chem.*, 1987, vol.30, pp.1458-1463. DOI: 10.1021/jm00391a030.
3. Seebach D., Matthews J.L. [β -Peptides: a surprise at every turn]. *Chem. Commun.*, 1997, pp.2015-2022.
4. Baccelli I., Mauch-Mani B. [Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones]. *Plant Molecular Biology*, 2015, vol.91, pp.703-711. DOI:10.1007/s11103-015-0406-y.
5. Lenkova A.O., Zorin A.V., Chanysheva A.R., Gelmel K.V., Faizullina G.A., Zorin V.V. *Enantioselectivnyi gidroliz butilovogo efira α -aminomaslianoi kisloty v prisutstvi Novozym 435* [Enantioselective hydrolysis of butyl ester of α -aminobutyric acid in the presence of Novozym

6. Ленкова А.О., Зорин А.В., Чанышева А.Р., Зорина Л.Н. Энантиоселективный гидролиз алкиловых эфиров α -аминомасляной кислоты в присутствии химотрипсина // Баш. хим. ж.— 2017.— Т.24, №1.— С.12-14.
7. Maenpaa H., Kanerva L.T., Liljeblad A. Acylation of β -Amino Esters and Hydrolysis of γ -Amido Esters: Candida Antarctica Lipase A as a Chemoselective Deprotection Catalyst // ChemCatChem.— 2016.— V.8.— Pp.1226-1232. DOI: 10.1002/cctc.201501381.
8. Гринштейн Дж. Химия аминокислот и пептидов / Под ред. М.М. Шемякина.— М.:Мир, 1965.— 825 с.
- 435]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2016, vol.23, no.4, pp.42-44.
6. Lenkova A.O., Zorin A.V., Chanysheva A.R., Zorina L.N. *Enantioselektivnyi gidroliz alkilovykh efirov α -aminomaslianoi kisloty v prisutstvii khimotripsina* [Enantioselective hydrolysis of alkyl esters of α -aminobutyric acid in the presence of Chymotrypsin]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2017, vol.24, no.1, pp.12-14.
7. Maenpaa, Kanerva L.T., Liljebla A. [Acylation of β -Amino Esters and Hydrolysis of γ -Amido Esters: Candida Antarctica Lipase A as a Chemoselective Deprotection Catalyst]. *ChemCatChem*, 2016, vol.8, pp.1226-1232. DOI: 10.1002/cctc.201501381
8. Greenstein J. *Khimiya aminokislot i peptidov* [Amino acid and peptide chemistry]. Ed. M.M. Shemyakin. Moscow, Mir Publ., 1965, 825 p.