

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

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

450064, 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., 450064, Ufa, Russia; ph. (347)2431935, e-mail: chemist.518@mail.ru

Нами была исследована возможность получения энантиомерно 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 3*R*-(-)-3-аминобутановой кислоты с выходом 88% от теоретического и оптической чистотой 86% *ee*. Выход остаточного пентилового эфира 3*S*-(+)-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 3*S*-(+)-3-аминобутановая кислота с выходом 68% от теоретического и оптической чистотой 79% *ee*. Остаточный пентильный эфир 3*R*-(-)-3-аминобутановой кислоты получен с выходом от 60% теоретического и оптической чистотой 45% *ee*.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования 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 3*R*-(-)-3-aminobutyric acid with a yield of 88% of theoretical and optical purity of 86% *ee*. The yield of residual pentyl ester of 3*S*-(+)-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 3*S*-(+)-3-aminobutyric acid is formed with yields of 68% of theoretical and optical purity of 79% *ee*. The residual pentyl 3*R*-(-)-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 Science and High Education of Russia in the framework of the state task.

Дата поступления 01.10.21

Энантиомерно чистые 3-аминозамещенные карбоновые кислоты являются важными строительными блоками в синтезе фармацевтических препаратов и средств защиты растений¹. Они широко используются в синтезе гипогликемических, кетогенных, противогрибковых, антигельминтных и инсектицидных препаратов^{2,3}. Известно, что оптически чистая (*R*)-3-аминобутановая кислота (*BABA*) стимулирует устойчивость растений к абиотическому стрессу⁴. 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 химотрипсина 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 химотрипсина (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 снижению оптической чистоты продуктов (2, 3) из-за медленного протекания гидролиза пентилового эфира 3*S*(+)-3-аминобутановой кислоты.

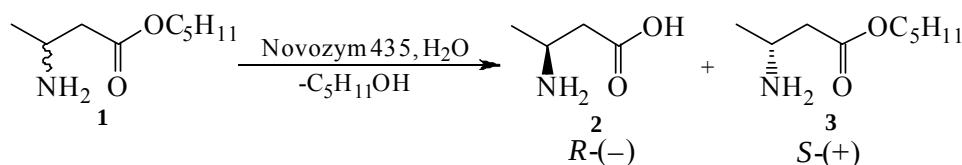


Схема 1

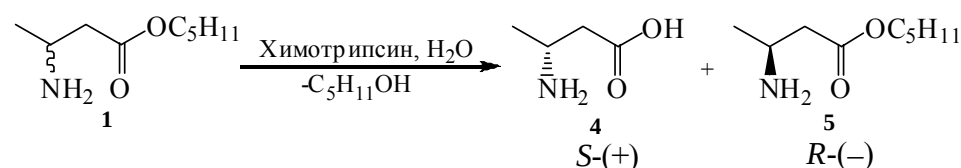


Схема 2

В аналогичных условиях ферментативный гидролиз пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты (1) в присутствии химотрипсина (схема 2) 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).

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 поляриметрии.

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 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)

$[\alpha]_D^{20}$ измеряли на автоматическом поляриметре «Optical Activity Limited» модели АА-55 с галогеновой лампой (стандартная длина волны 589.44 нм). Стандартная величина удельного вращения 3R-(–)-3-аминобутановой кислоты $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ ($c=0.6$, H₂O); 3S-(+)-3-аминобутановой кислоты $[\alpha]_D^{20} = +34^\circ$ ($c=0.6$, H₂O)⁷.

Синтез рацемического пентилового эфира 3-аминобутановой кислоты был осуществлен по известной методике⁸.

Пентиловый эфир 3-аминобутановой кислоты 1. Выход 86% от теоретического. Спектр ЯМР ¹H, (CDCl₃, δ, м.д.): 0.84 т (3H, CH₃), 1.07 д (3H, CH₃), 1.19-1.28 м (2H, CH₂), 1.48-1.58 м (2H, CH₂), 1.88-1.97 м (2H, CH₂), 2.23 д (2H, CH₂), 3.31-3.54 м (1H, CHNH₂), 4.01 т (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-ами-

нобутановой 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 3R-(–)-3-аминобутановой кислоты (или 3S-(+)-3-аминобутановой кислоты).

3R-(–)-3-аминобутановая кислота 2. Спектр ЯМР ¹H (D₂O, δ, м.д.): 1.18 д (3H, CH₃), 2.35 д (2H, CH₂), 3.45-3.49 м (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).

3S-(+)-3-аминобутановая кислота 4. Спектр ЯМР ¹H (D₂O, δ, м.д.): 1.20 д (3H, CH₃), 2.38 д (2H, CH₂), 3.47-3.50 м (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.
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.
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.
5. Ленкова А.О., Зорин А.В., Чанышева А.Р., Гельмел К.В., Файзуллина Г.А., Зорин В.В. Энантиоселективный гидролиз бутилового эфира α-аминомасляной кислоты в присутствии *Novozym 435* // *Баш. хим. ж.* – 2016. – Т.23, №4. – С.42-44.
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 β-Amido Esters: Candida Antarctica Lipase A as a Chemoselective Deprotection Catalyst // *ChemCatChem*. – 2016. – V.8. – Pp.1226-1232.
8. Гринштейн Дж. Химия аминокислот и пептидов / Под ред. М.М. Шемякина. – М.: Мир, 1965. – 825 с.

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.
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.
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.
5. Lenkova A.O., Zorin A.V., Chanysheva A.R., Gelmel K.V., Faizullina G.A., Zorin V.V. *Enantioselektivnyi gidroliz butilovogo эфира α-aminomaslianoi kisloty v prisutstvii Novozym 435* [Enantioselective hydrolysis of butyl ester of α-aminobutyric acid in the presence of *Novozym 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], 2016, vol.23, no.4, pp.42-44.
7. Maenpaa H., Kanerva L.T., Liljeblad A. [Acylation of β-Amino Esters and Hydrolysis of β-Amido Esters: Candida Antarctica Lipase A as a Chemoselective Deprotection Catalyst]. *ChemCatChem*, 2016, vol.8, pp.1226-1232.
8. Greenstein J. *Khimiya aminokislot i peptidov* [Amino acid and peptide chemistry]. Ed. M.M. Shemyakin. Moscow, Mir Publ., 1965, 825 p.