

# Preparation of Chiral Alcohol (R)-[3,5-Bis(Trifluoromethyl)Phenyl] Ethanol by Biocatalytic

Liping Li, Zhen Luo, Linli Yang, Minghui Zhang, Nengqiang Wang\*

School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan  
Email: wang\_780214@126.com

Received: Jun. 16<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jun. 28<sup>th</sup>, 2018; published: Jul. 6<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

Chiral alcohols are a group of the most important building blocks, and have been widely used in the pharmaceutical, chemical and agriculture industries for production of chiral information into the products. (R)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanol is an important chiral intermediate for the synthesis of a tachykinin NK1 receptor antagonist widely administered to cancer patients without the nausea and vomiting side effects that often happen with chemotherapy, such as Aprepitant (Emend) and Fosaprepitant (Ivemend). The biocatalytic asymmetric reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl) acetophenone is an effective approach for the preparation of (R)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanol. In this paper, a novel strain HNNQ1, which had highly efficient reduction for 3,5-bis(trifluoromethyl) acetophenone, was isolated from a soil sample and identified as *Stenotrophomonas* sp. The reaction conditions for prepared (R)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanol by whole cells of strain HNNQ1 was carried out. The obtained optimized conditions for the bio-reduction are as follows: 2-propanol with a concentration of 15% (v/v) as co-substrate, buffer pH 7.2, 40 mM of 3,5-bis(trifluoromethyl) acetophenone, 250 g/L of resting cells as biocatalyst, reaction for 15 h at 30°C and 150 rpm. Under above conditions, best yields of 98.8% and 99.6% of product ee were obtained, respectively.

## Keywords

(R)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] Ethanol, *Stenotrophomonas* Sp, Biocatalytic, Optimization

# 生物转化法制备手性醇(R)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇

李丽平, 罗 珍, 杨林莉, 张明慧, 王能强\*

湖南科技大学生命科学院, 湖南 湘潭

\*通讯作者。

Email: wang\_780214@126.com

收稿日期: 2018年6月16日; 录用日期: 2018年6月28日; 发布日期: 2018年7月6日

## 摘要

手性醇是一类重要的手性模块化合物, 广泛应用于医药、化工和农业等领域。*(R)*-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇是合成用于治疗癌症病人化疗时引起恶心和呕吐的NK-1受体拮抗剂(如阿瑞吡坦和福沙吡坦)的重要手性中间体。不对称生物还原[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙酮是制备*(R)*-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的重要方法。本文从土壤中筛选获得一株对[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙酮具有高效还原的微生物菌株HNNQ1, 该菌株被鉴定为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp), 命名为寡养单胞菌HNNQ1。对菌株HNNQ1不对称还原制备*(R)*-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的条件进行了研究, 结果表明, 菌株HNNQ1的最佳还原条件如下: 辅助底物种类为异丙醇, 且浓度为15% (v/v), 反应温度为30℃, 反应缓冲液pH为7.2, 最适的底物浓度为40 mmol/L, 菌体浓度为250 g/L, 反应时间为15 h。在上述条件下, 产物的产率和对映体过量值(enantiomeric excess, ee)分别为98.8%和99.6%。

## 关键词

*(R)*-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇, 寡养单胞菌属, 生物催化, 优化

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

## 1. 引言

手性醇是在手性碳原子上连有活泼羟基的一类模块化合物, 因其具有特殊的生理活性以及独特的光、热和化学稳定性, 广泛应用于化学、医药工业、精细化工和农业等领域[1] [2] [3], 特别是在制药工业中, 手性醇作为一类手性化合物的构建模块, 已经成为多种类型手性药物合成的重要中间体或手性原料。例如 *D*-(-)-泛酰内酯可以合成 *D*-泛酸钙(Vitamin B<sub>5</sub>) [4], (*S*)-(4-氯苯基)(吡啶-2-基)甲醇可以合成抗过敏药物倍他司汀(Betahistine) [5], (*S*)-(-)-3-氯-1-苯基-1-丙醇可以合成抗抑郁药氟西汀(Fluoxetine) [6], (*R*)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯可以合成降压药卡托普利(Enalapril)、贝那普利(Benazepril)和赖诺普利(Lisinopril) [7]。

手性芳香醇(*R*)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇是用于合成新型化疗止吐药物NK-1受体拮抗剂类药物的重要手性中间体, 由其制备得到的抗抑郁药物在治疗一系列中枢和末梢神经系统抑制中具有很好的潜在疗效。目前, 制备光学纯(*R*)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的方法主要有化学法和生物法。采用化学法合成时, 需要使用昂贵的过渡金属Ru等化学催化剂, 且步骤繁琐, 反应条件苛刻, 能耗高, 污染大, 产率偏低[8] [9] [10] [11]。生物法则是利用游离酶或全细胞来催化制备, 具有反应条件温和、催化效率高、专一性强等特点。本文以微生物全细胞催化[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙酮不对称还原制备NK-1受体拮抗剂类药物阿瑞吡坦的重要手性中间体(*R*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇为研究模型(见图1), 从自然环境中筛选获得新型、高效的生物催化剂, 并对其进行分析和鉴定, 此外, 对其生物催化过程进行优化。以期筛选获得能高效不对称还原[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙酮制备(*R*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇的微生物菌株, 实现NK-1受体拮抗剂类药物重要手性中间体(*R*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇的生物法高效制备。同时, 本文



### 2.4.3. 菌体培养

斜面培养: 从原斜面上用接种环挑取 1 环菌种到试管斜面上, 30℃ 恒温培养 2~3 d, 4℃ 冰箱保存。

种子培养: 从培养成熟的斜面挑取 1 环菌体接入种子培养基中, 500 mL 锥形瓶装液量 200 mL, 30℃ 振荡培养, 摇床转速 150 rpm, 培养 24 h。

发酵培养: 将培养好的种子液以 8% (v/v) 接种量转接至装有 200 mL 发酵培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30℃ 振荡培养, 摇床转速 150 rpm, 培养 48 h。

### 2.4.4. 菌种收集

湿菌体收集: 培养结束后, 将发酵培养液于 8000 rpm, 4℃ 离心 10 min, 弃去上清液, 收集菌体并用生理盐水洗涤两次, 离心 10 min, 收集洗涤后的湿菌体, 备用。

### 2.4.5. 不对称还原反应

取一定量离心得到的湿菌体悬浮于磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.0)中, 加入一定浓度的[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮和一定体积的异丙醇, 置于 30℃, 150 r/min 的摇床中恒温反应 24 h。反应结束后, 反应液用乙酸乙酯萃取, 8000 rpm, 4℃ 离心 5 min, 取 1 mL 上清液加入少量无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥过夜, 采用气相色谱分析检测。

### 2.4.6. 气相色谱分析

不对称还原反应结束后, 反应萃取液中的产物和残留底物的浓度采用气相色谱分析, 用内标法定量。内标物是十二烷。取 1 mL 萃取液加入 2 μL 十二烷进行分析。

气相色谱条件: 日本岛津 GC-2014 气相色谱仪; 美国瓦里安 CP-Chirasil-Dex 手性毛细管气相色谱柱 (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。载气为高纯氮气, 流量为 2 mL/min; 进样量 1 μL, 分流比为 15:1; 检测器和进样口温度均为 250℃; 色谱柱温度 80~180℃; 升温速度: 8℃/min; 检测器为 FID。各物质的出峰时间约为: [3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮 3.657 min, 十二烷 7.365 min, (S)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇 8.398 min, (R)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇 8.798 min。

根据峰面积和测出的相对校正因子, 可分别计算出反应液中的底物和产物的浓度。

$$C_{\text{产物}} = f'_{\text{产物}} \times \frac{S_{\text{产物}} \times C_{\text{十二烷}}}{S_{\text{十二烷}}}$$

$$C_{\text{底物}} = f'_{\text{底物}} \times \frac{S_{\text{底物}} \times C_{\text{十二烷}}}{S_{\text{十二烷}}}$$

从而求出反应的产率  $Y$ , 计算式为:  $Y\% = C_{\text{产物}}/C_0 \times 100\%$ 。式中  $C_0$ 、 $C_{\text{产物}}$  分别为反应起始底物的摩尔浓度和反应结束时产物的摩尔浓度。

产物的光学纯度由对映体过量值(enantiomeric excess, ee)来表征。定义式为:

$$ee = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100\%$$

式中  $C_R$  和  $C_S$  分别为  $R$  型和  $S$  型[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的摩尔浓度。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 菌种筛选与鉴定

通过初筛和复筛, 从土样中筛选得到一株产羧基还原酶菌株 HNNQ1, 能高选择性催化合成( $R$ )-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇。经分子生物学分析, 该菌 16SrDNA (1462 bp)与嗜麦芽寡养单胞菌 PBCC9 (*Stenotrophomonas maltophilia* strain PBCC9, GenBank 登录号为 No. HM775375.1)的相似度为 99%, 因此, 菌株 HNNQ1 鉴定为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.), 命名为 *Stenotrophomonas* sp. HNNQ1。

### 3.2. 不对称还原反应条件研究

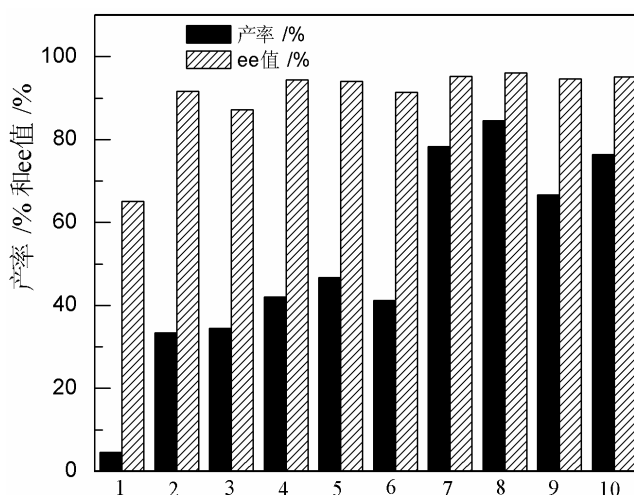
#### 3.2.1. 添加不同种类的辅助底物对产率和 ee 值的影响

本文研究了半乳糖、麦芽糖、葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘油、异丙醇、乙醇、甲醇等不同类型的辅助底物对产率和 ee 值的影响,结果见图 2。由图 2 可知,添加这些辅助底物有助于提高催化[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮不对称还原制备(*R*)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的产率和 ee 值,且以异丙醇为辅助底物的产率和 ee 值最高,分别为 84.6%和 96.1%。

#### 3.2.2. 辅助底物异丙醇浓度对产率和 ee 值的影响

本文研究了 0、5、10、15、20、25、30、35 和 40% (v/v)等浓度的异丙醇对产率和 ee 值的影响,结果见图 3。

由图 3 可知,在一定浓度范围内随着异丙醇的浓度的增加,产率也增加,当异丙醇浓度为 15%时,



1.空白对照, 2.半乳糖, 3.麦芽糖, 4.葡萄糖, 5.乳糖, 6.蔗糖, 7.甘油, 8.异丙醇, 9.乙醇, 10.甲醇

Figure 2. Effects of co-substrate type on yield and ee values

图 2. 不同辅助底物种类对产率和 ee 值的影响

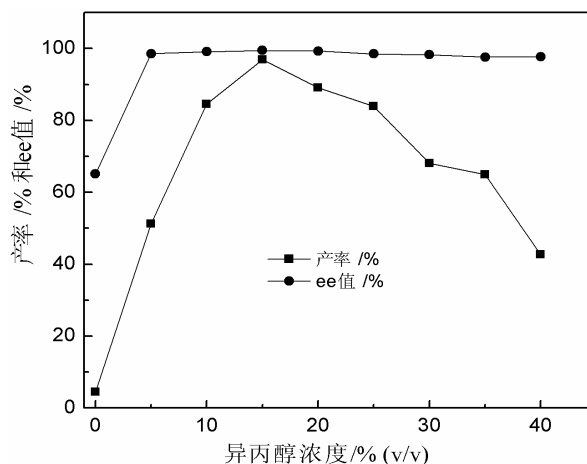


Figure 3. Effects of 2-propanol concentration on yield and ee values

图 3. 异丙醇浓度对产率和 ee 值的影响

产率达到最大, 为 96.9%, 然后当异丙醇浓度继续增大时, 产率反而降低。此外, 结果研究表明, 异丙醇的添加可以提高产物的 ee 值, 且 ee 值随异丙醇浓度的增加变化不大, 都在 97% 以上。综上所述, 反应体系中异丙醇添加的最佳浓度为 15%, 此浓度下, 产物的产率和 ee 值分别为 96.9% 和 99.5%。

### 3.2.3. 反应温度对产率和 ee 值的影响

本文研究了不同的反应温度(20、25、30、35 和 40℃)对产率和 ee 值的影响, 结果见图 4。由图 4 可知, 催化[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮不对称还原制备(R)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的最佳反应温度为 30℃。

### 3.2.4. 缓冲液 pH 值对产率和 ee 值的影响

本文研究了缓冲溶液不同 pH 值对产率和 ee 值的影响, 结果见图 5。由图 5 可知, 催化[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮不对称还原制备(R)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的最佳缓冲液 pH 值为 7.2, 此时产物的产率和 ee 值分别为 99.2% 和 99.7%。

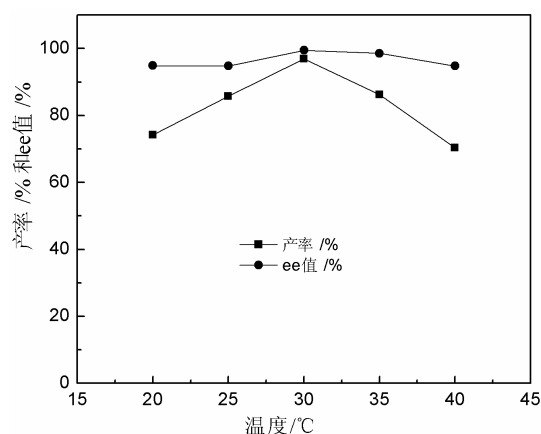
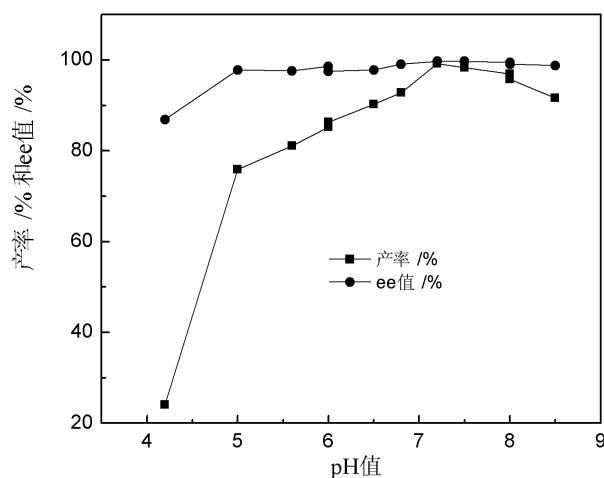


Figure 4. Effect of reaction temperature on yield and ee value

图 4. 反应温度对产率和 ee 值的影响



Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸: 4.2、5.0、5.6、6.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6.0、6.5、6.8、7.2、7.5、8.0, tris-HCl: 8.0 和 8.5

Figure 5. Effect of buffer pH on yield and ee value

图 5. 缓冲液 pH 值对产率和 ee 值的影响

### 3.2.5. 底物浓度对产率和 ee 值的影响

本文研究了反应体系中添加不同浓度的底物(10、20、40、60、80 和 100 mmol/L)对产率和 ee 值的影响,结果见图 6。由图 6 可知,最佳的底物添加浓度为 40 mmol/L,此时产物的产率和 ee 值分别为 95.6% 和 99.7%。

### 3.2.6. 菌体浓度对产率和 ee 值的影响

取不同浓度的湿菌体(100、150、200、250、300 和 350 g/L)悬浮于磷酸盐缓冲液中,加入 40 mmol/L 的[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮和 15% (体积比)的异丙醇,置于 30℃, 150 r/min 的摇床中恒温反应 6 h。反应结束后,气相色谱分析产物的产率和 ee 值,结果见图 7。由图 7 可知,最佳的菌体添加量为 250 g/L,此时产物的产率和 ee 值分别为 50.8%和 99.7%。

### 3.2.7. 不对称还原反应的过程曲线

本文研究了在最佳反应条件下(5 mL 0.2 mol/L pH 7.2 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液体系, 250 g/L 静息细胞, 40 mmol/L [3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮, 1 mL 异丙醇, 30℃, 150 rpm), 菌株 HNNQ1 不对称还原 [3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮制备(R)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的反应过程, 结果见图 8。

由图 8 可知,随着反应时间的延长,产率逐渐增大, ee 值几乎保持不变。当反应时间达到 15 h 后,产物产率几乎保持不变(此时产率和 ee 值分别为 98.8%和 99.6%),反应基本完成。因此,确定反应转化所需时间为 15 h。

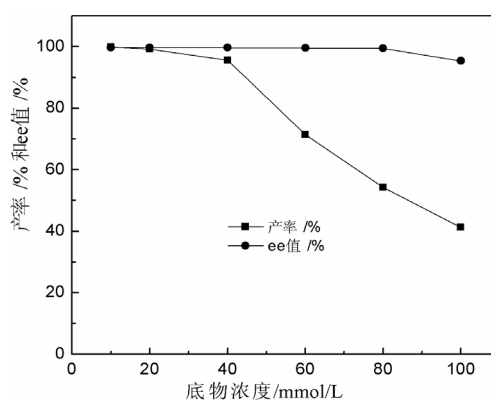


Figure 6. Effect of 3,5-bis(trifluoromethyl) acetophenone concentration on yield and ee value

图 6. [3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮底物浓度对产率和 ee 值的影响

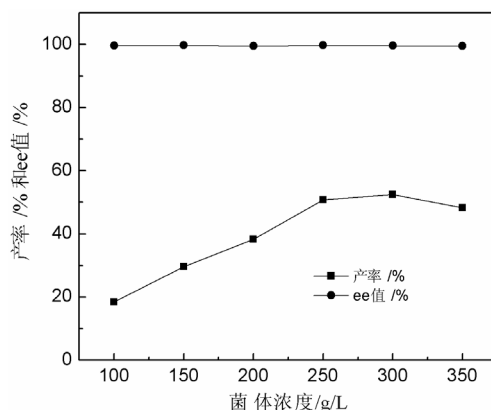
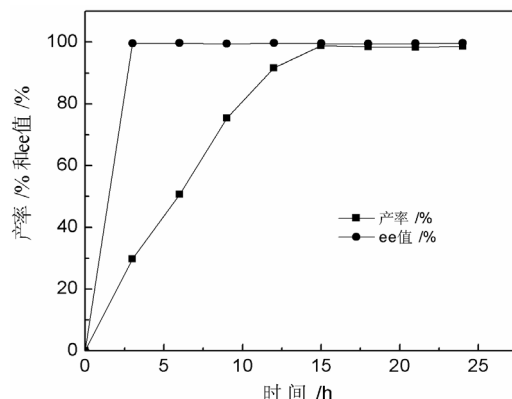


Figure 7. Effect of cell concentration on yield and ee value

图 7. 菌体浓度对产率和 ee 值的影响



**Figure 8.** Process curve of prepared (*R*)-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethanol by the asymmetric reduction  
**图 8.** 不对称还原制备(*R*)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇的过程曲线

#### 4. 结论

从土样中筛选得到一株产羰基还原酶的菌株, 经鉴定为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp) HNNQ1, 该菌能高选择性催化制备(*R*)-[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙醇。利用单因素实验, 确定菌株 HNNQ1 不对称还原[3,5-二(三氟甲基)苯基]乙酮的最佳条件: 最佳辅助底物为异丙醇, 最佳添加浓度为 15% (体积比), 反应温度为 30℃, 反应缓冲液 pH 为 7.2, 底物浓度为 40 mmol/L, 菌体浓度为 250 g/L, 反应时间为 15 h。在上述条件下, 产物的产率和 ee 值分别为 98.8%和 99.6%。

#### 基金项目

湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(143252)资助, 湖南科技大学科学研究基金项目(E51530)。

#### 参考文献

- [1] Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Stürmer, R. and Zelinski, T. (2004) Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. *Angewandte Chemie International Edition*, **43**, 788-824. <https://doi.org/10.1002/anie.200300599>
- [2] Huisman, G.W., Liang, J. and Krebber, A. (2010) Practical Chiral Alcohol Manufacture Using Ketoreductases. *Current Opinion in Chemical Biology*, **14**, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.12.003>
- [3] You, Z.Y., Liu, Z.Q. and Zheng, Y.G. (2014) Chemical and Enzymatic Approaches to the Synthesis of Optically Pure Ethyl (*R*)-4-Cyano-3-Hydroxybutanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 11-21. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5357-0>
- [4] Qin, H.M., Yamamura, A., Miyakawa, T., Kataoka, M., Nagai, T., Kitamura, N. and Tanokura, M. (2014) Structure of Conjugated Polyketone Reductase from *Candida parapsilosis* IFO 0708 Reveals Conformational Changes for Substrate Recognition upon NADPH Binding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 243-249. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5073-9>
- [5] Ni, Y., Zhou, J.Y. and Sun, Z.H. (2012) Production of a Key Chiral Intermediate of Betahistine with a Newly Isolated *Kluyveromyces* sp. in an Aqueous Two-Phase System. *Process Biochemistry*, **47**, 1042-1048. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.022>
- [6] 童凌斐, 罗智, 卢俊. 不对称合成(*S*)-(-)-3-氯-1-苯基-1-丙醇和(*S*)-盐酸氟西汀的工艺研究[J]. 精细与专用化学品, 2013, 21(5): 45-48.
- [7] Ni, Y., Su, Y.N., Li, H.D., Zhou, J.Y. and Sun, Z.H. (2013) Scalable Biocatalytic Synthesis of Optically Pure Ethyl (*R*)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyrate Using a Recombinant *E. coli* with High Catalyst Yield. *Journal of Biotechnology*, **168**, 493-498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.09.021>
- [8] Hansen, K.B., Chilenski, J.R., Desmond, R., et al. (2003) Scalable, Efficient Process for the Synthesis of



- (*R*)-3,5-Bistrifluoromethylphenyl Ethanol via Catalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation and Isolation as a DABCO Inclusion Complex. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 3581-3587. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2003.08.043>
- [9] Brands, K.M.J., Payack, J.F., Rosen, J.D., *et al.* (2003) Efficient Synthesis of NK1 Receptor Antagonist Aprepitant Using a Crystallization-Induced Diastereoselective Transformation. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 2129-2135. <https://doi.org/10.1021/ja027458g>
- [10] Naud, F., Malan, C., Spindler, F., *et al.* (2006) Ru-(Phosphine-Oxazoline) Complexes as Effective, Industrially Viable Catalysts for the Enantioselective Hydrogenation of Aryl Ketones. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **348**, 47-50. <https://doi.org/10.1002/adsc.200505246>
- [11] 何军邀, 唐俊, 王普, 等. 手性 1-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇的合成与拆分[J]. 科技通报, 2011, 27(3): 321-325.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8844, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjctet@hanspub.org](mailto:hjctet@hanspub.org)