

研究报告

响应面法优化丁酸缩水甘油酯的酶法拆分工艺

钱俊青, 周文武, 匡春兰

浙江工业大学药学院, 杭州 310014

摘要: 在已有的酶法拆分丁酸缩水甘油酯单因素试验最适条件的基础上, 采用 Plackett-Burman 设计在影响酶法拆分的 6 个因素中, 有效筛选出主效因素: 底物浓度、酶用量和温度。在此基础上, 再利用响应面分析法(RSM)对以上三个显著因子的最佳水平范围进行研究, 通过对二次多项回归方程求解得知, 酶法拆分最适条件为: 底物浓度 0.499 mol/L、酶用量 30.23 mg/(g 底物)和温度 29.68°C; 并结合单因素最适条件: pH 7.6; 时间 4 h; 转速 150 r/min 进行酶促拆分实验, 得到 R-酯的对映体过量值为 93.28%。对比优化之前的单因素试验最适条件的结果, 最大对映体过量值 84.65%, 有了显著的提高, 证明 RSM 法优化酶法拆分丁酸缩水甘油酯工艺是可行的。

关键词: 丁酸缩水甘油酯, 脂肪酶, 拆分, Plackett-Burman 设计, 响应面分析法, 优化

Optimization of Enzymatic Resolution Technique of Glycidyl Butyrate via Response Surface Methodology

Junqin Qian, Wenwu Zhou, and Chunlan Kuang

College of Pharmaceut Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Our previous work has indicated that enzymatic resolution of glycidyl butyrate are strongly affected by many factors, including concentration of substrate, amount of lipase, the temperature, pH, shaking speed and reaction time. In this study, Plackett-Burman design was undertaken to evaluate the effects of the six factors. By regression analysis, concentration of substrate, amount of lipase and the temperature were found to be important for enzymatic resolution of glycidyl butyrate. In the second phase of the optimization process, a response surfacemethodology(RSM) was used to optimize the above critical factors, and to find out the optimal concentration levels and the relationships between these factors. By solving the quadratic regression model equation using appropriate statistic methods, the optimal parameter of the variables were determined as: 0.499 mol/L glycidyl butyrate, 30.23 mg/g lipase and 29.68°C. In the optimum condition, the value of enantiomeric excess(ee%) was 93.28%. Compared to 84.65% which was the maximum ee% under the non-optimized condition, this study has a significant advancement. The experimental data under various conditions have validated the theoretical values.

Keywords: glycidyl butyrate, optical resolution, lipase, Plackett-Burman design, RSM, optimization

目前, 手性化合物的合成已经成为有机化学的一个重要发展方向。高纯度的手性化合物, 对于化学、生物学以及药学都具有重要的意义, 特别是在药学研究中, 对映体药物可以拓宽用途, 减少剂量

和代谢负担, 提高活性和专一性, 减少与其他药物的相互作用, 并降低由其对手性体可能引起的副作用。随着消旋体药物逐渐被淘汰, 消旋体的拆分和手性化合物的合成就显得更为重要了。(R)-丁酸缩

Received: March 8, 2008; Accepted: March 17, 2008

Corresponding author: Junqing Qian. E-mail: qjq@zjut.edu.cn

水甘油酯作为一种重要的手性原料和合成中间体,在有机化工和制药领域,发挥着日益重要的作用^[1]。(R)-丁酸缩水甘油酯是合成(S)-缩水甘油的前体,而(S)-缩水甘油是一种非常有用的光学活性医药中间体,用于合成心血管药物、 β -阻断剂、L-肉碱、治疗艾滋病的 HIV 蛋白酶抑制剂、抗病毒药物及许多具有生物活性的手性内酯和甘油磷脂。另外,它还是某些光电材料和功能高分子材料的重要手性中间体^[2]。同时还在农药、液晶和生物探针等领域得到开发利用^[3]。由此可见,拆分丁酸缩水甘油酯得到(R)-酯对于药物中间体(S)-缩水甘油的制备是非常有利的。生物催化拆分方法,反应条件温和,副产物少,产品的分离提纯简单,生产安全有效^[4,5]。酶参加的反应,通常具有高度的立体专一性,因此得到产物的旋光纯度较高,而且酶易降解,不会造成环境污染^[6,7]。

在酶促拆分条件优化方面,通常用于优化拆分条件的统计方法如逐因子实验、全因子实验等,由于因子较多需要海量次数试验。Plackett-Burman 设计通过 N 次试验可以最多考察 N-1 个因素,从众多的影响因素中快速、有效地筛选出几个主效因子,供进一步研究^[8]。响应面分析(Response surface methodology)法,简称 RSM,系采用多元二次回归方法作为函数估计的工具,将多因子实验中因素与指标的相互关系用多项式近似拟合,依此可对函数的响应面和等高线进行分析,研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系。它与过去广为使用的“正交试验设计法”不同,具有试验周期短,求得的回归方程精度高,能研究几种因素间交互作用等优点^[9,10]。

本文在酶法拆分单因素试验最适条件的基础上^[11],采用 Plackett-Burman 设计在多项影响脂肪酶酶法拆分丁酸缩水甘油酯的因素中,有效筛选出主要因素:底物浓度、酶用量和温度。再利用响应面分析法(RSM)对以上三个条件进行优化,拟合出酶法拆分最适条件,在此最优条件下进行酶法拆分实验得到对映体过量值达到 93.28%,相比单因素试验最适条件下对映体过量值 84.65%,有显著提高。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

丁酸缩水甘油酯,浙江震元制药有限公司提供;猪胰脂肪酶(Porcine Pancreatic Lipase,简称 PPL)为 SIGMA 公司产品;其他试剂均为分析纯;THZ-C 恒温振荡器,江苏太仓市实验设备;投影式自动旋光仪(配 2 dm 旋光管),WZZ-T1 型,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

拆分方法:称取一定量的丁酸缩水甘油酯于 250 mL 具塞锥形瓶中,恒温振荡器中预热 10 min 后,再称取一定量酶粉,用磷酸缓冲液缓冲液溶解后,加入锥形瓶中,恒温振荡反应一定时间。每个条件做两个平行样。

底物转化率的测定方法:酸式滴定法。用移液管量取 5.0 mL 的反应液用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定,0.5% 酚酞作指示剂,空白对照。根据丁酸的生成量来计算底物的转化率。

对映体过量值的测定方法^[12]:旋光法。用三氯甲烷将反应体系中丁酸缩水甘油酯萃取出来,分离出含酯的三氯甲烷溶液,用投影式自动旋光仪测定溶液旋光度 α ,再根据其浓度 c 计算出比旋光度 $[\alpha]=\alpha/cL(L=2\text{ dm})$ 。R-丁酸缩水甘油酯的 $ee(\%)=[([R]-[S])/([R]+[S])]\times 100=[\alpha]/[\alpha]_{\max}\times 100$,而纯 R-丁酸缩水甘油酯在 20°C 时的比旋光度为 $[\alpha]_{\max}=-28.4^{\circ}$ ^[13]。

含酯样品浓度的测定方法:用氯化氢加成法^[14]。取 5.0 g $MgCl_2\cdot 6H_2O$,置于锥形瓶中,用移液管加入 5.0 mL 的盐酸乙醇溶液(0.2 mol/L),振荡使饱和。再加入 1.0 mL 的含酯的试样,振荡使混和。在室温静置反应 30 min 后加入 30 mL 蒸馏水使 $MgCl_2$ 完全溶解,加入 2 滴溴甲酚绿指示液,用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定到蓝绿色即为终点。空白样作对照,计算出样品的浓度。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 设计筛选影响酶法拆分主效因子

本文在已有酶法拆分单因素试验最适条件^[5](酶用量为 30 mg/(g 底物)、底物浓度 0.4 mol/L、温度

30°C、磷酸缓冲溶液 pH 7.5、振荡频率 150 r/min 和反应时间 4 h)的基础上,选用 $N=8$ 的 Plackett-Burman 设计对实验进行研究,考查了酶用量(A)、底物浓度(B)、温度(C)、pH(D)、时间(E)、转速(F)6个因素,G为空白因素,每个因素取两水平:高水平“+”和低水平“-”,以对映体过量值响应值。实验设计及结果见表1;实验结果选用 SAS 8.0 软件对实验结果进行了统计分析(表2)。

表1 $N=8$ 的 Plackett Burman 实验设计及响应值
Table 1 Plackett-Burman design and its result

Trial No.	Factors							Value of ee(%)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	+	+	-	+	-	-	65.96
2	-	+	+	+	-	+	-	72.36
3	-	-	+	+	+	-	+	60.62
4	+	-	-	+	+	+	-	50.69
5	-	+	-	-	+	+	+	81.33
6	+	-	+	-	-	+	+	56.41
7	+	+	-	+	-	-	+	82.53
8	-	-	-	-	-	-	-	90.44

2.2 响应面分析法(RSM)优化实验条件

由表2所示实验结果可知,酶用量、底物浓度和温度对拆分效果影响显著,是重要因素,以此三因素为自变量,对映体过量值为响应值,利用响应面分析法设计了三因素三水平的试验,因素取值见表1,各实验点设计及实验结果见表2。其他因素 pH 为 7.6,时间为 4 h,转速为 150 r/min。

实验以随机次序进行,实验结果用 SAS 软件进行分析,经回归拟合后求得响应函数的回归方程表达式: $Y = -1140.708 + 16.105X_1 + 1877.992X_2 + 34.510X_3 - 0.185X_1^2 - 1158.417X_2^2 - 0.555X_3^2 - 15.625X_1X_2 + 0.0972$

$X_1X_3 - 8.395X_2X_3$, 并由此得出回归分析结果(表5)、方差分析表(表6)和响应面分析图(图1、2和3)。

回归方程中各变量对响应值(ee值)影响的显著性,由 F 检验来判定,概率 P 的值越小,则相应变量的显著程度越高。从表5的回归分析和表6方差分析结果可以看出,方程一次项和二次项极明显,交互项显著性一般,总回归模型拟合度好,其中一次项中最显著的因素为 X_2 ,即底物浓度。方程复相关系数的平方 $R^2=0.9671$,说明建立的模型能解释对映体过量值(ee值)变化的 96.71%,即能较好的描述拆分实验的变化规律。在所选的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序: $X_2 > X_3 > X_1$,即:底物浓度 > 反应温度 > 酶用量。

从图1、2和3可直观了解各因素的交互作用对整个拆分反应的影响是显著的,并且底物浓度、温度和酶用量并不是越大越高越好,都在零水平左右存在最佳点。底物浓度过高时磷酸缓冲液无法调节生成的大量丁酸对体系 pH 值的冲击,转化率就愈低,因为碱性环境有利于水解反应的进行。另一方面来看,该酯与磷酸缓冲液的体系也是个两相体系,酯的浓度过高不利于酯在磷酸缓冲液中的扩散与传质,对酶促反应有影响。温度升高时,反应速率增大,但酶蛋白变性失活的速度也增大,酶的最适温度是这两因素综合影响的结果。单因素实验也表明温度不能过高,大于 30°C 时,转化率及对映体过量值均减小了,不能达到良好的拆分效果,说明了酶活的最适温度并不是酶促反应的最适温度。脂肪酶作为反应的催化剂,随着用量的递增,反应速度加快,但该反应也是一个可逆反应,正反应增加的同时,逆反应也迅速增加,当酶用量大于 30 mg/(g 底物)

表2 Plackett-Burman 实验设计各因素水平编码及影响效果
Table 2 Level, code of variabl and results of Plackett-Burman design

Trial No.	Factor		Coded level		T-test	Prob>T
	Coded	Variable	(-)	(+)		
1	A	Amount of lipase/(mg/g)	30	35	-34.13889	0.01864
2	B	Concentration of substrate/(mol/L)	0.4	0.6	30.56944	0.02082
3	C	Temperature/°C	25	30	-34.47222	0.01846
4	D	pH	7.5	8.0	-19.40278	0.03278
5	E	Time/h	4	5	-29.95833	0.02124
6	F	Totation speed/(r/min)	150	200	-26.91667	0.02364

表 3 响应面三因素三水平实验设计

Table 3 Level and code of variables of Response Surface Method

Variable	Symbol	Coded level		
		-1	0	+1
Amount of lipase/(mg/g)	X ₁	25	30	35
Concentration of substrate/(mol/L)	X ₂	0.4	0.5	0.6
Temperature/°C	X ₃	25	30	35

表 4 响应面分析实验设计及结果

Table 4 The experiment design and results of Response Surface Method

Trial No.	X ₁	X ₂	X ₃	Value of ee (%)
1	-1	-1	0	65.02
2	-1	0	-1	72.12
3	-1	0	1	67.34
4	-1	1	0	76.05
5	0	-1	-1	57.17
6	0	-1	1	63.74
7	0	1	-1	69.75
8	0	1	1	59.53
9	1	-1	0	83.18
10	1	0	-1	66.81
11	1	0	1	71.75
12	1	1	0	62.96
13	0	0	0	90.02
14	0	0	0	87.14
15	0	0	0	86.88

表 5 酶法拆分回归方程回归分析结果

Table 5 Regression for the regression equation of enzymatic resolution

Parameter	Value	Error	t-value	Prob>t
y-intercept	-1140.708	133.624	-8.537	3.631E-4
A (x ₁)	16.105	4.705	3.423	0.0188
B (x ₂)	1877.992	214.502	8.755	3.222E-4
C (x ₃)	34.510	4.705	7.335	7.388E-4
D (x ₁ ²)	-0.185	0.0664	-2.787	0.0386
E (x ₂ ²)	-1158.417	166.025	-6.977	9.305E-4
F (x ₃ ²)	-0.555	0.0664	-8.361	4.005E-4
G (x ₁ x ₂)	-15.625	3.190	-4.898	0.00448
H (x ₁ x ₃)	0.0972	0.0638	1.523	0.188
L (x ₂ x ₃)	-8.395	3.190	-2.631	0.0465
R-Square(COD)		Adj. R-square		Root-MSE(SD)
0.9671		0.9078		3.1902

后, 酶浓度过大, 反应系统总含水量增加, 反应向逆方向进行, 转化率下降, ee 值也相应下降。从图 1 看出, 响应曲线陡峭, 说明底物浓度酶用量对反应的交互作用非常显著。图 2 也是如此, 说明底物浓

度是影响反应的主因素之一。另外, 从图 3 也可以看出, 温度和酶用量有较明显的交互性。

表 6 酶法拆分回归方程方差分析结果

Table 6 ANOVA for the regression equation of enzymatic resolution

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob>F
Model	1493.737	9	165.9703	16.3075	0.00338
Error	50.888	5	10.1775		
Total	1544.620	14			

2.3 最佳优化条件的确定

为了确证各因素的最佳点, 对已回归的非线性模型方程求一阶偏导, 并令其等于零, 可以得到曲面的最大点, 求导方程整理得:

$$\begin{cases} 16.10475 - 0.37014X_1 - 15.625X_2 + 0.0972X_3 = 0 \\ 1877.99167 - 15.625X_1 - 2316.8333X_2 - 8.395X_3 = 0 \\ 34.51025 + 0.0972X_1 - 8.395X_2 - 1.11054X_3 = 0 \end{cases}$$

在回归方程中, 求解得 X₁=30.231 223; X₂=0.499 170 01; X₃=29.676 608

即为优化后条件。

2.4 方程的验证

由于以上最佳条件未包括在 RSM 的 16 个实验中, 应进一步确认计算结果, 但因优化后实验条件过于精确, 我们以温度 29.68°C; 酶用量 30.23 mg/g; 底物浓度 0.499 mol/L, 并结合单因素最适条件: pH 7.5、转速 150 r/min 和时间 4 h, 对映体过量值为 93.28%, 对照优化之前的最适条件下的最大对映体过量值 84.65%, 有了大大的提高, 证明用 RSM 法优化实验条件是可行的。

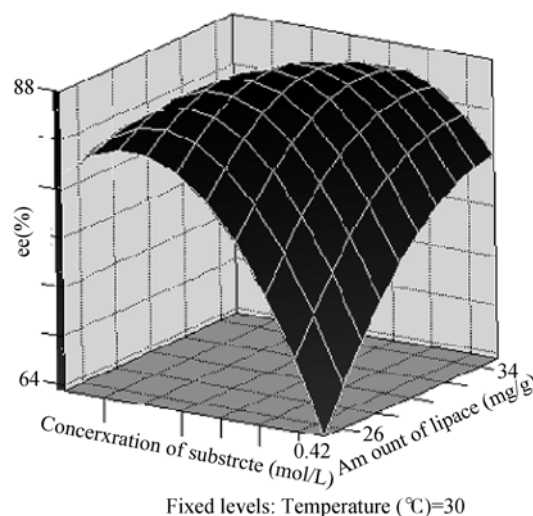


图 1 底物浓度和酶用量交互影响 ee 值的曲面图
Fig. 1 Response surface of ee% versus concentration of substrate and amount of lipase

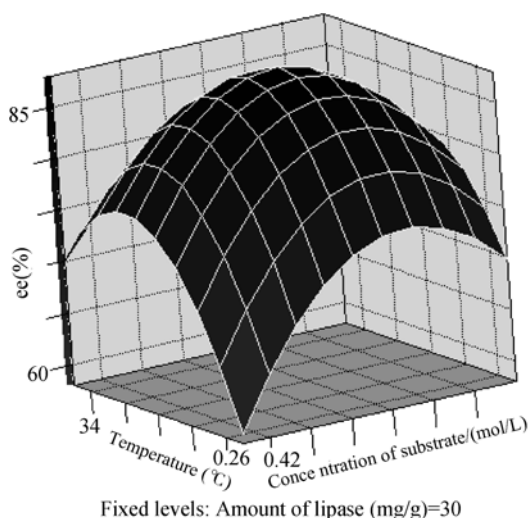


图2 底物浓度和酶用量交互影响 ee 值的曲面图
Fig. 2 Response surface of ee% versus concentration of substrate and amount of lipase

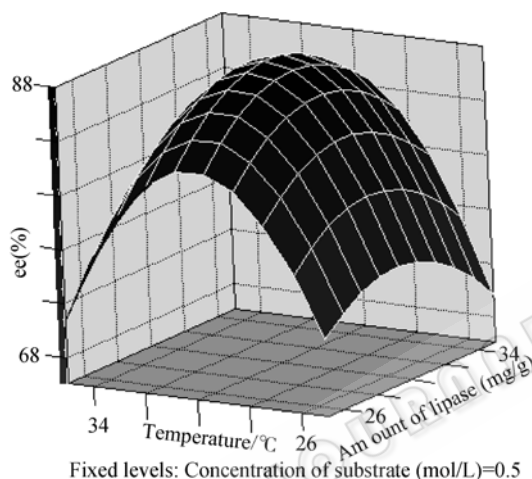


图3 温度和酶用量交互影响 ee 值的曲面图
Fig. 3 Response surface of ee% versus temperature and amount of lipase

3 结论

用猪胰脂肪酶水解拆分丁酸缩水甘油酯效果很好, 能有效的对映选择性地水解 S 型的丁酸缩水甘油酯, 回收 R 型酯, 达到良好的拆分效果。本文在酶法拆分丁酸缩水甘油酯的单因素试验最适条件(底物浓度 0.4 mol/L; 酶用量为 30 mg/(g 底物); pH 7.5, 温度 30°C; 转速 150 r/min; 时间 4 h)基础上, 采用 Plackett-Burman 试验设计在多项影响脂肪酶法拆分的因素中, 有效筛选出主要因素: 底物浓度、酶用量和温度。再利用响应面分析法(RSM)对以上三个关键因素的最佳水平范围进行研究, 通过对二次多

项回归方程求解, 拟合出酶法拆分最适条件: 温度 29.68°C; 酶用量 30.23 mg/g; 底物浓度 0.499 mol/L, pH 7.5, 转速 150 r/min 和时间 4 h。在此最优条件下进行酶法拆分实验得到对映体过量值达到 93.28%, 相比单因素试验最适条件下对映体过量值 84.65%, 有显著的提高, 说明响应面实验设计法优化酶法拆分 R-丁酸缩水甘油酯工艺是可行的。

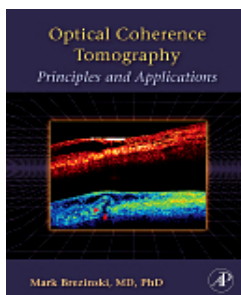
REFERENCES

- [1] Ma J, Xue FQ. Synthetic methodology of (R)-glycidol butyrate. *Huaxue Shiji*, 2002, **24**(1): 19–21.
马静, 薛飞群. 手性化合物(R)-缩水甘油丁酸酯的合成. *化学试剂*, 2002, **24**(1): 19–21.
- [2] Marcel K, Vincent HME, Jackvan L, *et al.* Lipase sinthe preparation of β -Blockers. *TIBTECH*, 1988, **6**(3): 251.
- [3] Hanson RM. The synthetic methodology of nonracemic glycidol and related 2,3-epoxy alcohol. *Chem Rev*, 1991, **91**(4): 437–475.
- [4] Wang Z, Dong H, Cao SG. The application of lipase for the preparation chiral pharmaceutical intermediate. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2003, **10**(2): 112–115.
王智, 董桓, 曹淑桂. 脂肪酶在手性药物中间体制备中的应用. *药物生物技术*, 2003, **10**(2): 112–115.
- [5] Palomo JM, Segura RL, Gloria FL, Guisan JM, Roberto FL. Enzymatic resolution of (\pm)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**: 1157–1161.
- [6] Wang Y, Xu JH, Zhuang YP, Hu Y. Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl butyrate. *Journal of East China University of Science and Technology*, 1999, **25**(2): 209–211.
王阳, 许建和, 庄英萍, 胡英. 缩水甘油丁酸酯的对映选择性酶促水解. *华东理工大学学报*, 1999, **25**(2): 209–211.
- [7] Yu DH, Wang L, Gu Q, Chen P, Li Y, Wang Z, Cao SG. A two-step enzymatic resolution of glycidyl butyrate. *Process of Biochemistry*, 2007, **42**: 1319–1325.
- [8] Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, **34**: 255–272.
- [9] Brandvik PK, Daling PS. Optimisaion of oil spill dispersant composition by mixture design and response surface method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, **42**(1-2): 63–72.
- [10] Chen H, Yang JK, Liu MX, Yan YJ. Optimization of lipase production conditions for *Aspergillus* sp. F044 by response surface methodolog. *Industrial Microbiolog*, 2007, **37**(1): 47–52.
陈晖, 杨江科, 刘曼西, 闫云君. 响应面法快速优化曲霉 *Aspergillus* sp. F044 产脂肪酶培养条件. *工业微生物*, 2007, **37**(1): 47–52.
- [11] Kuang CL, Qian JQ, Zou XM, Yang LH. Study on optical

- resolution of chiral drugs intermediate R-glycidyl butyrate by lipase. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2004, **32**(5): 581-583.
- 匡春兰, 钱俊青, 邹小明, 杨兰花. R-丁酸缩水甘油酯的酶法拆分研究. *浙江工业大学学报*, 2004, **32**(5): 581-583.
- [12] Zhang YB. *Chiral Synthesis by Biocatalysis*. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
张玉彬. 生物催化的手性合成. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [13] Lander WE, Whitesides GM. Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohol. *J Am Chem Soc*, 1984, **106**(5): 7250-7251.
- [14] Zhang ZX. *Quantitative Analysis of Organic Functional Group*. Beijing: Chemical Industry Press, 1990
张志贤. 有机官能团定量分析. 北京: 化学工业出版社, 1990.



爱思唯尔生物医学工程专业图书推荐



ISBN: 0121335704
ISBN-13: 9780121335700
Publication Date:
08/25/2006

Optical Coherence Tomography

Principles and Applications

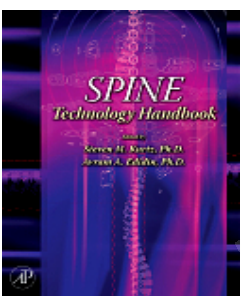
By *Brezinski*

Product Type: Hardcover

Price: \$98.95

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

This book brings together information that is needed by the various and sometimes disparate groups interested in optical coherence tomography. It gives a broad treatment of the subject including 1) the optics, science, and physics needed to understand the technology 2) a description of applications with a critical look at how the technology will successfully address actual clinical need, and 3) a discussion of delivery of OCT to the patient, FDA approval and comparisons with available competing technologies. Although the required mathematical rigor is present, it is accessible to non-scientists and non-engineers so they may gain a basic understanding of OCT, its applications and the issues of bringing the technology to the market.



ISBN: 012369390X
ISBN-13: 9780123693907
Publication Date:
08/14/2006

Spine Technology Handbook

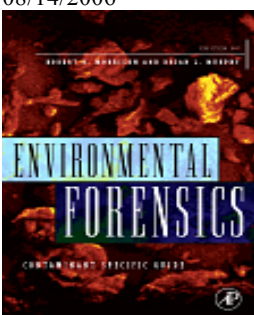
By *Kurtz and Edidin*

Product Type: Hardcover

Price: \$72.95

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

Over the past decade, there has been rapid growth in bioengineering applications in the field of spine implants. This book explains the technical foundation for understanding and expanding the field of spine implants, reviews the major established technologies related to spine implants, and provides reference material for developing and commercializing new spine implants. The editors, who have a track record of collaboration and editing technical books, provide a unified approach to this topic in the most comprehensive and useful book to date.



ISBN: 0125077513
ISBN-13: 9780125077514
Publication Date:
12/16/2005

Environmental Forensics

Contaminant Specific Guide

By *Morrison and Murphy*

Product Type: Hardcover

Price: \$97.95

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

Environmental forensics is the application of scientific techniques for the purpose of identifying the source and age of a contaminant. Because of the wide-spread application of this science, it has become a billion dollar industry. Investigators and governmental agencies use environmental forensics to trace the source of oil, chemical, and pollution release, to evaluate crime scenes and to ensure national security. It is also utilized in civil law for claims from property damage and trespassing to land disputes and well contamination. This book provides the environmental professional or student with a contaminant specific resource for investigating and solving the important questions which need to be addressed when a contaminant release occurs. It also provides the basis for apportioning liability among multiple responsible parties.

以上为爱思唯尔经典生物医学工程图书信息, 如果对您的研究工作有所帮助, 请向所在图书馆推荐。谢谢!