

# 有机相脂肪酶催化酮基布洛芬的立体选择性酯化\*

杜 伟<sup>1</sup> 宗敏华<sup>1</sup> 陈伟锋<sup>1</sup> 郭 勇<sup>1</sup> 李 琼<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>华南理工大学生物工程系 <sup>2</sup>华南理工大学现代化工技术重点实验室 广州 510640)

**摘要:** 从 5 种脂肪酶中筛选出了具有较高催化活性和对映体选择性的脂肪酶 Novozym 435。进一步探讨了酶浓度、底物结构、底物浓度等因素对脂肪酶拆分酮基布洛芬(Ketoprofen)的影响。结果表明,以 10mL 除水环己烷为反应介质,酶浓度为 5mg / mL, Novozym 435 催化 6.7mmol / L Ketoprofen 与 26.8mmol / L 丙醇进行酯化反应,反应 30h,转化率为 68% 时,S-酮基布洛芬对映体过剩值可达 92%。

**关键词:** 脂肪酶, 酮基布洛芬, 动力学拆分

**中图分类号:** Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0429-04

## LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE ESTERIFICATION OF KETOPROFEN IN ORGANIC MEDIA

DU Wei<sup>1</sup> ZONG Min-Hua<sup>1</sup> CHEN Wei-Feng<sup>1</sup> GUO Yong<sup>1</sup> LI Qiong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology department, <sup>2</sup>Chemical Engineering Lab, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

**Abstract:** Novozym 435 was selected from five lipases because of its high catalytic activity and enantioselectivity. The concentration of enzyme, the structure and content of substrates have profound effects on the lipase-catalyzed kinetic resolution of Ketoprofen. At 68% conversion ratio after 30hr incubation of the mixture (6.7mmol / L ketoprofen, 26.8mmol / L propanol and 5mg / mL Novozym in 10mL cyclohexane), enantiomeric excess of the remaining S-ketoprofen was found to be 92%.

**Key words:** Lipase, Ketoprofen resolution, Kinetic

药物的生物学活性与其对映体构型密切相关,对手性药物而言,通常并非两种异构体均具有相同的活性<sup>[1]</sup>。例如心得安的(S)-( -)-异构体的疗效是(R)-( +)-异构体的 100 倍;反应停(thalidomide)是一种外消旋的手性药物,其(R)-异构体具有镇静功能,而(S)-异构体则具有致畸作用,故妊娠妇女服用此药后,出现了多例畸变胎儿<sup>[2]</sup>。惨痛的教训使人们认识到对手性药物的对映体异构体必须分别考虑,慎重对待。

2-芳基丙酸(2-APA)类药物(Naproxen,

Ibuprofen, Ketoprofen 等)属非甾体抗炎药(NSAID),其 $\alpha$ 位含有一个手性碳原子,存在一对光学异构体,其中(S)-构型的具有生理活性,而(R)-构型的活性低或无活性。历来 2-APA 类药物用化学方法合成,一般总得到等量的一对对映体混合物(外消旋体),将其拆分是获得光学纯(S)-2-APA 的主要方法。通常利用手性试剂将外消旋体混合物中一对对映体转化为两

\* 广东省自然科学基金资助项目(No.980543)

收稿日期: 1999-08-09, 修回日期: 2000-03-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

种非对映体,然后利用非对映体理化性质的差异,将其分开,但此拆分过程较繁杂,手性试剂昂贵,多数情况下难以得到满意的收率<sup>[3]</sup>。

近年来兴起的生物拆分法显示出了其独特的优越性<sup>[4]</sup>。非水相酶学的发展,使人们可方便地通过“溶剂工程”调节酶的特异性,从而有效地拆分外消旋物,这是药物拆分的一条新途径。迄今,国内外一些学者对酶法拆分 Naproxen 及 Ibuprofen 作了不少研究,然而通过有机相酶促 Ketoprofen 的酯化来拆分 Ketoprofen 的报道甚少。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Lipase-OF, Lipase-MY,由 Meito Sangyo CO, LTD(Japan)赠送。脂肪酶 Novozym 435,来源于 *Candida antarctica*,固定化于大孔阴离子交换树脂,丹麦 Novo 公司赠送。脂肪酶 Lipozyme,来源于 *Mucor miehei*,固定化于大孔阴离子交换树脂,丹麦 Novo 公司赠送。脂肪酶 CCL,来源于 *Candida cylindracea*,购自 Sigma 公司。Ketoprofen,购自 Sigma 公司。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 有机溶剂脱水:**将 4A 分子筛于 180℃ 干燥箱内活化 2h,置干燥器中冷却后,加入有机溶剂中,室温振荡 48h,滤去分子筛,得脱水有机溶剂。

**1.2.2 脂肪酶促酯化反应:**在 50mL 带塞三角瓶中装入预定量的反应底物和脱水有机溶剂,加酶开始反应,在 30℃,50r/min 振荡,取样 0.1mL 供液相色谱分析用。根据 Ketoprofen 的减少来计算反应的转化率及对映体选择性(%ee or E)。其他条件相同的不加酶对照实验表明,48h,转化率为 0。

**1.2.3 液相色谱分析:**高效液相色谱仪:HP1100(美国惠普公司),由华南理工大学现代化工技术重点实验室提供;手性柱:Sumichiral OA-2500(日本 Sumika Chemical Analysis Service 公司);检测器:紫外检测,波长为 254nm;流动相:0.03mol/L 乙酸铵甲醇溶液;流

速:0.8mL/min;进样量:20μL。在该分析条件下,Ketoprofen 对映体分离因子  $\alpha = 1.55$ 。由于色谱操作条件稳定,且有自动控制进样装置,故本研究采用外标法。

转化率  $C\% = [1 - (A + B) / (A_0 + B_0)] \cdot 100$ ;

对映体过剩值  $\%ee = [(B - A) / (B + A)] \cdot 100$ ;

对映体选择性  $E = \ln[(1 - c)(1 - ee)] / \ln[(1 - c)(1 + ee)]$

其中 %ee 为对映体过剩值; $A_0$ ,  $B_0$  分别为酶促反应前 Ketoprofen 两对映体的浓度 (mmol/L); $A$ ,  $B$  表示为反应后残余;Ketoprofen 的对映体的浓度 (mmol/L); $E$ :表示酶对映体选择性的大小。 $E$  值越大,酶的对映体选择性越好; $E$  值为 1,表示酶无对映体选择性<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶的筛选

不同来源的脂肪酶 Lipase-OF, Lipozyme, Novozym 435, CCL, Lipase-MY 催化 Ketoprofen 与丙醇酯化反应的结果如表 1。在

表1 不同脂肪酶催化 Ketoprofen 与丙醇的酯化反应

脂肪酶	C (%)	ee (%,S-Ketoprofen)	E
Lipase-OF	81	75	2.8
Lipozyme	96	50	1.4
Novozym 435	87	92	4.5
CCL	23	0	1
Lipase-MY	11	0	1

反应条件:12mmol/L Ketoprofen+27mmol/L 丙醇,5mL 未除水异辛烷,30℃,反应时间:23h,酶量:150mg

研究条件下,CCL 和 Lipase-MY 未表现出对映体选择性;Lipozyme 表现出较高的催化活性,但对映体选择性较差。当转化率为 96% 时,对映体过剩值仅为 50%;Lipase-OF 和 Novozym 435 表现出较高的催化活性和一定的对映体选择性,该两种酶都优先催化 R-异构体转化为相应的酯,反应体系中残留的 Ketoprofen 多是 (S)-Ketoprofen。反应 23h, Lipase-OF, Novozym 435 催化上述酯化反应转化率分别为 81%, 87%, 对映

体过剩值分别为 75%, 92%。在研究的 5 种脂肪酶中, Novozym 435 立体选择性最高, 故选用 Novozym 435 作进一步的研究。

## 2.2 酶浓度对拆分 Ketoprofen 的影响

在研究不同浓度的 Novozym 435 催化 Ketoprofen 与丙醇的酯化反应中, 作者发现, 酶浓度较低时, 随着酶浓度的提高, 酶促酯化反应速度加快, 但当酶浓度超过 5mg/mL 后, 随着酶浓度的继续增大, 酯化反应速率增长甚微(图 1)。兼顾酶促反应速度及实际应用的经济性, 本反应体系最适酶浓度为 5mg/mL。

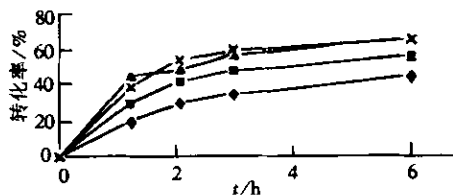


图 1 酶浓度对酶促酯化反应的影响

条件: 6.7mmol/L Ketoprofen+13.4mmol/L 丙醇, 10mL 除水异辛烷, Novozym 435 50mg, 30℃, 酶浓度: 系列 1: 3mg/mL, 系列 2: 5mg/mL, 系列 3: 7mg/mL, 系列 4: 9mg/mL  
—◆—系列 1, —■—系列 2, —▲—系列 3, —■—系列 4

## 2.3 醇结构对酶促酯化反应的影响

醇结构对 Novozym 435 催化 Ketoprofen 酯化反应速度及对映体选择性均有显著的影响: 以短链伯、仲醇为底物, 酶表现出较高的活性。叔丁醇、正己醇和三甲基硅甲醇由于空间障碍较大, 几乎观察不到酶反应。以异丙醇、异丁醇为底物, 酯化反应均比对应的丙醇、丁醇快, 但酶的对映体选择性下降。以丙醇、异丙醇为反应底物, 转化率分别为 68%、65% 时, 反应时间分别为 12h、8h, E 值分别为 4.3、1.1; 以丁醇、异丁醇为底物, 转化率分别为 62%、59% 时, 反应时间分别为 32h、12h, E 值分别为 4.3、1.8。这可能是由于底物溶剂化能的差异使酶更易与异丙醇、异丁醇形成中间复合物, 两对映体的反应速度均加快, 结果导致光学纯度降低(表 2)。

## 2.4 丙醇浓度对脂肪酶促酯化反应的影响

丙醇浓度对脂肪酶促 Ketoprofen 酯化反应

表 2 醇底物对脂肪酶拆分 Ketoprofen 的影响

醇底物	C	E
	(%, t/h)	
丙醇	68(12h)	4.3
异丙醇	65(8h)	1.1
正丁醇	62(32h)	4.3
异丁醇	59(12h)	1.8
叔丁醇	0(32h)	—
正己醇	0(32h)	—
三甲基硅甲醇	0(32h)	—

反应条件: 6.7mmol/L Ketoprofen+13.4mmol/L 醇, 10mL 除水异辛烷, Novozym 435 50mg, 30℃

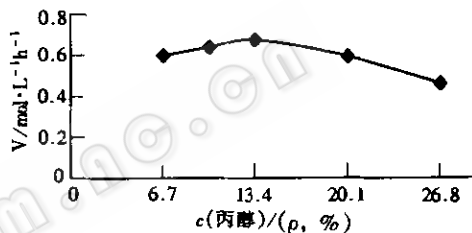


图 2 丙醇浓度对脂肪酶促酯化反应速度的影响

表 3 丙醇浓度对 Novozym 435 拆分 Ketoprofen 对映体选择性的影响

丙醇浓度 (mmol/L)	Ketoprofen		Ketoprofen	
	C (%, t/h)	ee (%, S-)	C (%, t/h)	ee (%, S-)
6.7	55(6h)	38	68(15h)	64
10.5	57(6h)	40	70(15h)	70
13.4	59(6h)	46	72(15h)	80
20.1	54(6h)	48	70(15h)	80
26.8	53(12h)	68	68(30h)	92

反应条件: 6.7mmol/L Ketoprofen, 10mL 除水环己烷, Novozym 435 50mg, 30℃

速度及对映体选择性的影响如图 2, 表 3 所示。醇浓度的提高(由于 Ketoprofen 在环己烷中的溶解性较差)可促进 Ketoprofen 的溶解, 从而加速酯化反应的进行; 另一方面, 较高浓度的醇对酶表现出一定的抑制作用, 酯化反应速度降低。醇浓度对酶反应速度的影响为以上两方面的综

合结果。当醇浓度低于 13.4mmol/L 时,随着醇浓度的提高,反应速度略有提高,但当醇浓度超过 13.4mmol/L 后,反应速度随醇浓度的增加而下降,但酶的对映体选择性却有所增加。这可能是由于过量醇与脂肪酶活性中心的疏水氨基酸结合,这在一定程度上阻碍了底物在酶催化位点上的结合,其中(S)-异构体受阻碍的程度大于(R)-异构体,(醇可能是(S)-异构体的竞

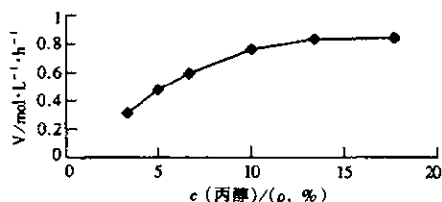


图3 酸浓度对脂肪酶催化酯化反应速度的影响

反应条件: 26.8mmol/L 丙醇, Novozym 435 50mg,  
10mL 除水环己烷, 30℃

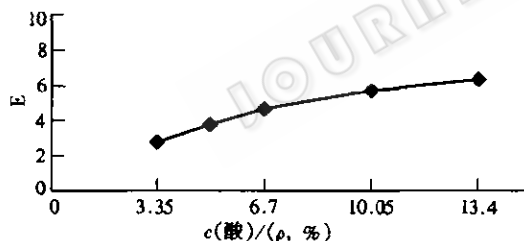


图4 酸浓度对酶促酯化反应立体选择性的影响

反应条件: 26.8mmol/L 丙醇, Novozym 435 50mg,  
10mL 除水环己烷, 30℃

争性抑制剂,随着醇浓度加大,与酶“契合”的(S)-Ketoprofen减少)这一方面导致了反应速率的下降,另一方面光学纯度却增大了。在本研究中,在兼顾酶促酯化反应速度的同时,主要考虑酶反应的对映体选择性。在所研究的浓度范围内,丙醇浓度 26.8mmol/L 的为最宜。

## 2.5 酸浓度对脂肪酶促酯化反应的影响

酸浓度对酶促酯化反应速度及酶反应立体选择性均有显著影响(图3、图4)。当酸浓度较低时,随着酸浓度增大,酯化反应速度加快。当酸浓度从 3.35mmol/L 升至 13.4mmol/L 时,酯化反应速度几乎成线性关系的从 0.31mmol/L·h⁻¹ 升至 0.86mmol/L·h⁻¹。当酸浓度超过 13.4mmol/L 时,酯化反应速度渐趋一最大值。在所研究的浓度范围内,酶反应对映体选择性随酸浓度的增加而增大,这可能是酸通过改变酶微环境影响了酶分子构象,在此构象下酶更易与(R)-Ketoprofen“契合”,则反应体系中残留的(S)-Ketoprofen相对量较大,从而使酶反应的对映体选择性有所提高。由于 Ketoprofen 在环己烷中的溶解性不大,故酸浓度不宜太大。在所研究范围内,酸浓度以 6.7mmol/L 的为最宜。

酶浓度、底物结构、底物浓度等因素对 Novozym 435 拆分酮基布洛芬(Ketoprofen)有着显著影响。结果表明,以 10mL 除水环己烷为反应介质,酶浓度为 5mg/mL, Novozym 435 催化 6.7mmol/L Ketoprofen 与 26.8mmol/L 丙醇进行酯化反应,反应 30h,转化率为 68% 时, S-对映体过剩值可达 92%。

## 参 考 文 献

- [1] Tsai S W, Wei H J. Enzyme Microb. Technol., 1994, 16(4): 328~333.
- [2] 戴立信, 陆熙炎, 朱光美. 化学通报, 1995, 6: 16~20.
- [3] 徐诗伟, 徐清. 中国医药工业杂志, 1995, 26(1): 38~42.
- [4] Raffaele M, Giovanni N, Angela P. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6(7): 1773~1778.
- [5] Chen C S, Yoshinori F, Garg G. J. Am. Chem. Soc., 1982, 104: 7294~7299.