

脂肪酶催化一步酯化协同拆分合成 S-萘普生淀粉酯

王艳¹, 辛嘉英^{1,2}, 于佳琪¹

(1. 哈尔滨商业大学 省高校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所 碳基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 利用 CRL 脂肪酶选择性催化外消旋萘普生甲酯与玉米淀粉进行转酯化反应合成光学纯 S-萘普生淀粉酯, 同时达到拆分外消旋萘普生的目的. 考察了有机溶剂、脂肪酶用量、底物浓度比、反应温度对酯化协同拆分反应的影响, 结果表明在异辛烷中脂肪酶 CRL 可以催化 S-萘普生甲酯与淀粉发生转酯化反应同时完成外消旋萘普生的拆分, 并且在脂肪酶用量为 10%、底物浓度比为 1:3、异辛烷用量为 15 mL、反应温度为 60 °C 的条件下反应 6 d, 外消旋萘普生甲酯的转化率为 42.5%, 产物对映体过量值 ee_p 高达 99.1%.

关键词: 外消旋萘普生; S-萘普生淀粉酯; 脂肪酶; 酯化协同拆分

中图分类号: O643.32

文献标志码: A

2-芳基丙酸类药物是一类被广泛用于处理人体结缔组织疾病的非甾体抗炎药, 包括布洛芬、卡洛芬、酮布洛芬、氟比洛芬和萘普生等, 其中商品标记的主要有布洛芬和萘普生, 是解热镇痛, 消炎和抗风湿的基本化学药物^[1]. 然而, 因为其结构中含有羧基, 为酸性药物, 对胃黏膜有刺激作用, 萘普生可导致胃肠道不良反应(对胃黏膜具有刺激作用, 引起胃出血、溃疡等), 限制了其进一步应用. 另外, 萘普生的 α 位上含有一个手性碳原子, 存在一对光学活性对映体. 萘普生的 S-(+)-构型活性为其 R-(-)-构型的 28 倍^[2]. 为了提高药效, 降低药物的毒副作用, 扩大用药安全范围, 正确评价药物, 减少并发症以及寻找新的适应症, 制备光学纯 S-(+)-萘普生前药是十分必要的.

目前对于萘普生前药的设计思想主要是通过酯化对萘普生的羧基进行屏蔽, 进而提高经皮吸收系数、增大脂溶性、提高其生物利用度和降低不良反应, 如萘普生吗啉酯、萘普生烷基哌嗪酯、萘普生烷基酯、萘普生脂肪酰甘油酯、萘普生甘油酯等前药均是对萘普生的羧基进行酯化而实现上述目的的^[3]. 但上述前药的合成一般均使用化学法先将萘普生羧基酰氯化后再进行酯化反应, 反应条件苛刻, 副产物多, 同时也不具有立体选择性, 无法在

合成萘普生前药的同时实现外消旋(R,S)-萘普生的拆分. 生物酶由于是手性分子, 其催化一对外消旋化合物进行反应时, 其中一个对映异构体的反应速度总是快于另一个对映异构体^[4]. 利用生物酶的这种立体选择性进行的酶拆分反应是制备手性化合物的重要手段.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

圆柱状假丝酵母脂肪酶(CRL, *Candida rugosa* lipase, L-1754)为 Sigma 公司产品, 890 μ /mg, 外消旋萘普生购自于上海九州制药厂, 外消旋萘普生甲酯(自制), 高效液相色谱图用的正己烷和异丙醇购自于的 Dikma 公司, 异辛烷、正己烷、甲苯、叔戊醇、叔丁醇、丙酮、甲醇(分析纯, 天津化学试剂二厂).

磁力搅拌油浴(中国, EMS-8C), 高效液相色谱(美国, Agilent Technologies 1200), FTS3000 型红外光谱扫描仪(美国, BIO-RAD 公司), 核磁共振仪(美国, Varian 公司), 紫外分光光度计(日本, 岛津 UV2550).

1.2 萘普生甲酯的制备

将 5.5 g 外消旋的萘普生、40 mL 无水甲醇以

收稿日期: 2015-08-17; 修回日期: 2015-09-20.

基金项目: 黑龙江省应用技术研究项目(GC13C111)(Application technology research project of heilongjiang province GC13C111).

作者简介: 王艳(1984-), 女, 博士, 讲师, E-mail: wangyan_123456@163.com(wang yan, woman, doctor, Lecturer, E-mail:wangyan_123456@163.com).

* 通讯联系人, Tel:(0451)84867583; E-mail:xinjiayingvip@163.com.

及 40 mL 苯加入至圆底烧瓶中，在回流冷凝管一端装有分水器，以便及时将反应产生的水带出，反应溶液加热回流 4~5 h. 加热回流结束后，将溶液移至分液漏斗中. 分别用蒸馏水，5% NaHCO₃ 水溶液以及蒸馏水洗涤. 将上层有机相用无水 NaSO₄ 干燥 12 h. 然后加压蒸干溶剂，加入少量含甲醇的石油醚重结晶，得到的白色结晶即为外消旋的萘普生甲酯. 经薄层分析，萘普生的转化率为 100%^[5].

1.3 淀粉的活化预处理

将一定量质量比为 2 的氢氧化钠和尿素加入到去离子水中配制成浓度为 9% 的氢氧化钠/尿素混合溶液，置于冰箱中冷却至 -10 ℃ 左右，在快速搅拌下缓慢加入 5% 的干基玉米淀粉，继续搅拌直至得到透明、均相的淀粉糊，滴加稀盐酸至中性，缓慢滴加无水乙醇使淀粉沉淀析出，95% 乙醇溶液洗涤数次直至无氯离子，再用无水乙醇洗涤以脱去水分，75 ℃ 真空干燥后备用^[6].

1.4 脂肪酶催化的一步酯化拆分反应

称取一定量自制的萘普生甲酯于 25 mL 具塞及搅拌装置的三角瓶中，然后加入 15 mL 有机溶剂使萘普生充分溶解后再缓慢加入一定摩尔比的预处理淀粉，边加边搅拌直至充分混溶，再加入一定量的脂肪酶 CRL，恒温反应一段时间. 反应结束后加入 10 mL 异辛烷摇晃片刻过滤使固液分离，再用 10 mL 异辛烷洗涤固体数次，分别收集滤液和固体产物进行分析测定. 利用 HPLC 测定滤液中剩余底物的对映体过量值(ee_s)和萘普生甲酯的转化率(C)，

然后根据公式 $ee_p = ee_s \times (1-C)/C$ 计算出产物对映体过量值(ee_p)^[7].

1.5 分析条件以及操作参数

样品用高效液相色谱仪进行分析，分析条件如下：手性柱 Chiralcel OD-H (5 μm, 4.6 mm×250 mm)，流动相为正己烷和异丙醇(95：5)，流速为 0.5 mL/min，检测波长 UV 254 nm，进样量 7.5 μL，柱温 30 ℃^[8].

将干燥淀粉样品 2 mg 与粒径 0.071 mm 干燥的溴化钾 200 mg 混合压片后进行红外扫描，以观察淀粉样品的分子基团变化. 仪器为 FTS3000 型红外光谱扫描仪(美国，BIO-RAD 公司)，扫描范围在 4 000~600 cm⁻¹^[9].

萘普生淀粉酯不能溶于氘代氯仿、氘代水等，实验室常用氘代试剂，能溶于氘代二甲基亚砜. 因此选取核磁共振仪(美国，Varian 公司)对样品进行核磁共振氢谱测试. 测定条件为：毛细管电压：3 kV；扫描范围是 200~900 (m/z)；电离电压(cone)：ES+10 v, 30 v；ES-10 v, 30 v；离子源温度：130 ℃；去溶剂温度：180 ℃. 色谱柱：XTerraR MS C₁₈(2.1×150 mm)，5 μm. 样品用量为 2 mg^[10].

2 结果与讨论

2.1 萘普生淀粉酯的定性分析

图 1 为预处理淀粉(a)及其萘普生淀粉酯(b) FT-IR 谱图. 由图可以看出，预处理玉米淀粉经萘普生酯化改性后在 1743.09cm⁻¹ 出现新的吸收峰，

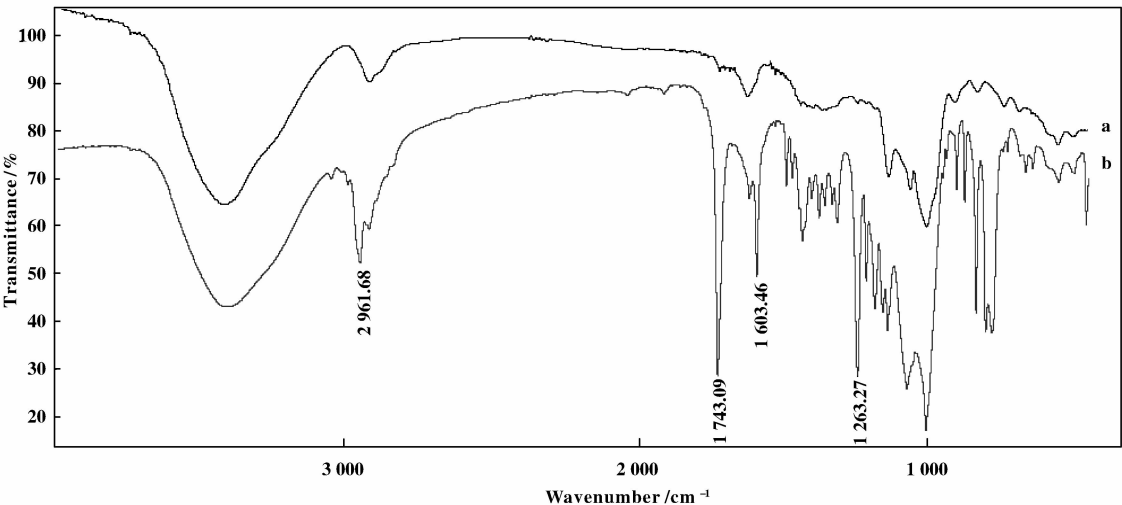


图 1 预处理淀粉(a)与萘普生淀粉酯(b)的红外光谱图
Fig.1 FT-IR spectra of pretreatment starch (a) and napprxen starch ester (b)

这是羰基的特征吸收峰,佐证了酯键的生成. 红外谱图的特征峰归属: 氢键缔合的 O—H 伸缩振动在 $3\,426 \sim 3\,648\text{ cm}^{-1}$ 附近、萘普生分子中的 O—CH₃ 的不对称伸缩振动在 $2\,961\text{ cm}^{-1}$ 附近和 D-吡喃葡萄糖带与羟基相连的 C—O 伸缩振动在 $700 \sim 1\,100\text{ cm}^{-1}$ 之间^[11]. 860 cm^{-1} 吸收峰表示萘环上有孤立氢, 819.75 cm^{-1} 吸收峰表示萘环上有两个相邻氢. $1\,608\text{ cm}^{-1}$ 附近和 $1\,263\text{ cm}^{-1}$ 附近分别为萘环上 C=C 和 C—C 基团的吸收峰^[12].

仅用红外光谱是不能确定萘普生淀粉酯的结构, 氢谱能敏感的反应氢核所处化学环境的细微差

别. 因此, 为了进一步确认萘普生淀粉酯的生成, 我们用 ¹H NMR 对其进行了表征. 图 2 为萘普生淀粉酯的 ¹H NMR 谱图, 在 $\delta 2.34 \sim 3.94\text{ ppm}$ 产生的较大的吸收峰为淀粉中氢核的吸收峰^[13]. 在 $\delta 0.86 \sim 1.48\text{ ppm}$ 范围内的峰为萘普生甲酯上氢原子的吸收峰^[14-15]. 而在 $\delta 7.15 \sim 7.82\text{ ppm}$ 没有出现吸收峰正好说明萘普生淀粉酯中没有残留的萘普生甲酯, 这也进一步证明了用异辛烷可以有效地除去未反应的萘普生甲酯. 结合红外分析证明了萘普生淀粉酯的生成.

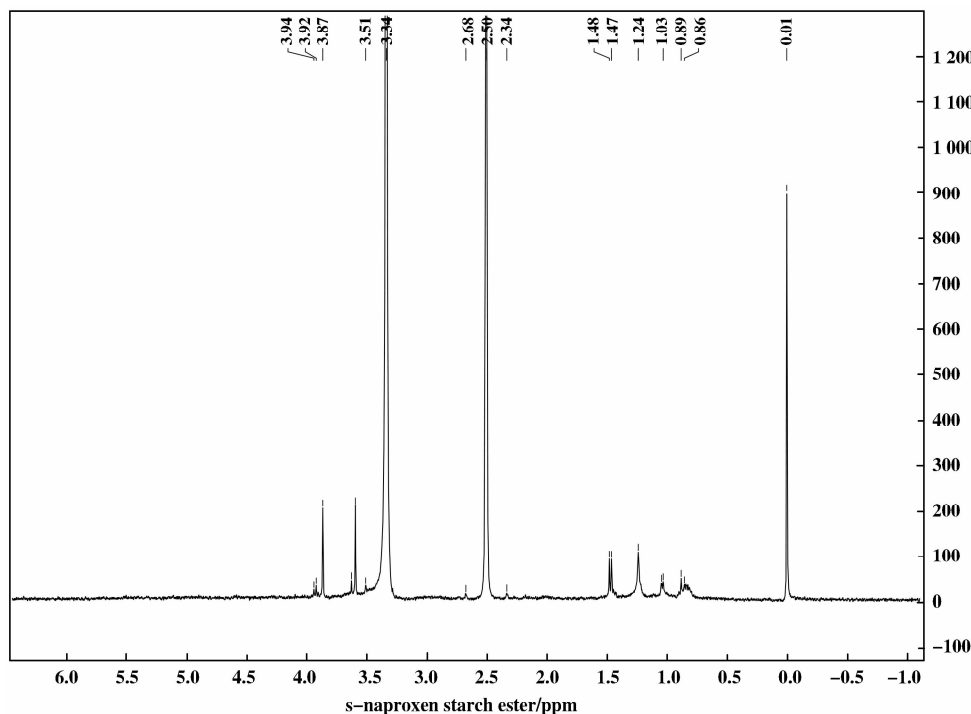


图 2 萘普生淀粉酯的核磁共振氢谱图

Fig. 2 ¹H NMR spectrum of narpixen starch ester

2.2 有机溶剂对反应的影响

选取异辛烷、正己烷、甲苯、叔戊醇、叔丁醇、丙酮等 6 种极性不同的有机溶剂作为酶促酯化反应的介质, 考察有机溶剂对酶促酯化反应的影响. 如表 1 所示, 有机溶剂的 logP 值越大, 底物转化率和产物对映体过量值越大, 这说明此时酶的催化活性及底物专一性越好. 这主要是由于酶的活性中心周围具有一层水化层, 这个水化层是酶发挥其催化活性所必须的, 当所用有机溶剂的极性过大, 也就是 logP 值太小时, 就会过度的夺取水化层中的必需

水, 从而影响酶的催化活性. 因此, 选择异辛烷这种既可以溶解萘普生甲酯降低反应体系粘度完成传质, 同时又很好的保持酶活性中心弹性的有机溶剂作为反应介质.

2.3 酶用量对反应的影响

酶用量的改变对底物转化率和产物对映体过量值会产生明显的影响, 如图 3 所示, 当酶的添加量由 2% 增加到 10% 时, 底物转化率和产物对映体过量值均呈现迅速上升的趋势. 而当脂肪酶的添加量在 10% ~ 20% 范围内变化时, 底物的转化率基本不

表 1 有机溶剂对萘普生甲酯与淀粉转酯化反应的影响

Table 1 Effect of organic solvent on the transesterification of naproxen methyl with starch

Organic solvent	log ^P	Conversion rate, C/%	Enantiomeric excess of product, ee _p /%
isooctane	4.7	84.31	72.74
n-hexane	3.5	15.78	36.58
methylbenzene	2.5	12.19	26.64
tertiary amyl alcohol	1.5	29.82	6.05
tertiary butanol	0.8	28.35	2.54
acetone	-0.23	0	0

Reaction condition: the amount of enzyme is 10%, the ration of starch to racemic naproxen methyl ester is 1 : 2, rotation speed is 200 r/min, temperature was 55 ℃.

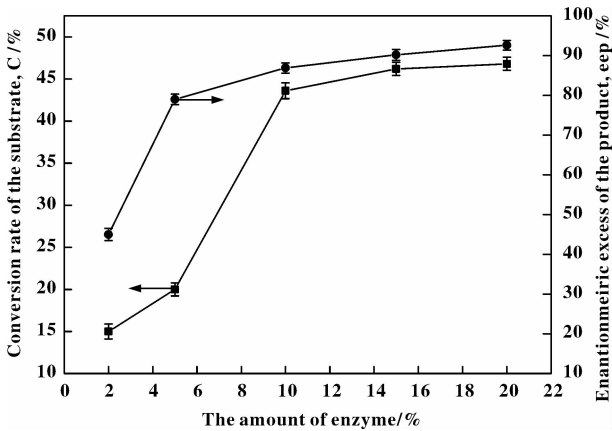


图 3 酶用量对底物转化率 C 及产物对映体过量值 eep 的影响

Fig. 3 Effect of enzyme loading on the C and eep of transesterification product

Reaction conditions: 15 mL isooctane as the medium, the ration of starch to racemic naproxen methyl ester is 1 : 2, rotation speed is 200 r/min, temperature was 55 ℃

变,但产物的对映体过量值仍然呈现上升趋势. 这说明当酶的加入量为 10% 时,反应体系的内扩散抑制作用已经完全被克服,但酶的立体选择性没有达到最佳. 实际上,此时酶浓度的提高只能缩短到达反应平衡的时间而不会移动反应平衡的位置. 在异辛烷为介质的反应体系中,酶用量的增加可以提高酶的立体选择性. 但基于成本的考虑,最终选择可以达到高转化率的酶用量即 10% 进行后续实验,通过其他条件的优化来提高酶的立体选择性.

2.4 底物比对反应的影响

由图 4 可知,当预处理淀粉与萘普生甲酯的摩尔比为 3 : 1 时,反应 6 d 后产物的对映体过量值仅为 45%. 这主要是由于当萘普生甲酯浓度过低时,大部分酶被预处理淀粉饱和,萘普生甲酯与酶分子

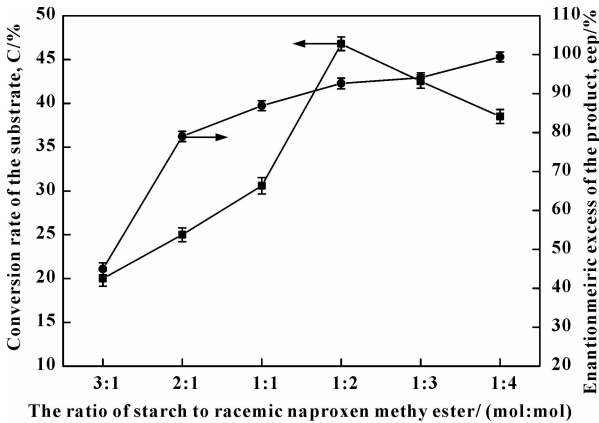


图 4 淀粉与萘普生甲酯的摩尔比对底物转化率 C 及产物对映体过量值 eep 的影响

Fig. 4 Effect of the ratio of starch to racemic naproxen methyl ester

on the C and eep of transesterification product

Reaction conditions: 15 mL isooctane as the medium, the amount of enzyme is 10%, rotation speed is 200 r/min, temperature was 55 ℃

的接触的几率太小,导致转酯化反应不易进行,从而使底物转化率和产物对映体过量值很低. 当预处理淀粉与萘普生甲酯的摩尔比为 1 : 2 时,底物转化率达到最大值 46.8%,这因为萘普生甲酯摩尔数的增大即增加了酰基供体的用量,有利于反应平衡向右移动,这与化学平衡理论是一致的. 但继续增加萘普生甲酯的用量,产物的转化率开始下降,而产物的对映体过量值却持续升高至 99.4%,这说明在该反应体系中过量的萘普生甲酯可以有效提高脂肪酶 CRL 的立体选择性. 因此,为达到一步酯化拆分的目的,获得高产物对映体过量值的光学纯萘普生淀粉酯,在保证较高转化率的同时,最终确定预处理淀粉与萘普生甲酯的摩尔比为 1 : 3.

2.5 反应温度对反应的影响

反应温度不仅影响酶的热稳定性和催化活性,也影响底物的状态以及产物的传质速度,从而影响酶催化酯化反应的进行.如图 5 所示当温度升高时,反应底物的溶解度提高,反应体系的粘度降

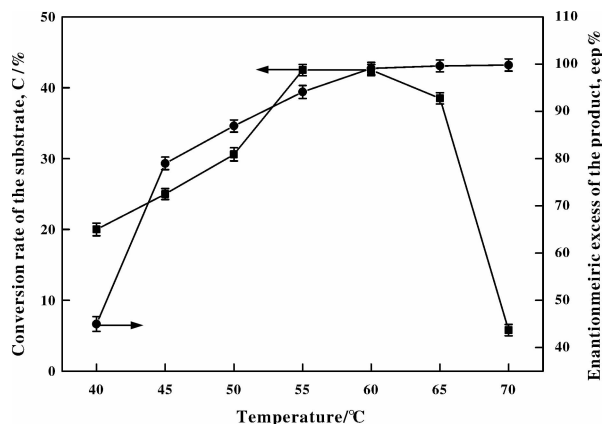


图 5 反应温度对底物转化率 C 及产物对映体过量值 ee_p 的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the C and ee_p of transesterification product

Reaction conditions: 15 mL isooctane as the medium, the amount of enzyme is 10%, the ration of starch to racemic naproxen methyl ester is 1 : 3, rotation speed is 200 r/min

低,使体系传质过程加快,促进底物与酶的有效接触,加快化学反应速度,因而底物的转化率和产物的对映体过量值都随之升高,这一现象符合化学反应的一般规律.但温度过高酶分子的变性失活也会加快,因此当温度升高到 60 °C 以后底物的转化率开始随之下降,70 °C 时转化率仅为 5%.而此时,产物对映体过量虽然没有明显的升高,但始终呈现上升趋势,70 °C 时产物对映体过量值高达 99.8%.这说明,反应温度是影响脂肪酶立体选择性的一个主要因素.因此,基于以上分析,最终选定 60 °C 作为反应最佳温度.

3 结论

综上所述,在异辛烷作为反应介质的有机溶剂体系中,脂肪酶 CRL 可以选择性的催化外消旋萘普生甲酯中的 S-萘普生甲酯与预处理淀粉发生转酯化反应合成光学纯 S-萘普生淀粉酯.在整个反应过程中,酶的立体选择性受底物比的影响较大,因此在实际生产中可以通过改变底物比来调节产物的对映体过量值.为达到一步酯化拆分外消旋萘普生

的目的,在保证较高转化率的同时,以脂肪酶用量为 10%、底物浓度比为 1 : 3、异辛烷用量为 15 mL、反应温度为 60 °C 的条件反应 6 d,外消旋萘普生甲酯的转化率为 42.5%,产物对映体过量值 ee_p 高达 99.1%.

参考文献:

- [1] Morrone R, Antona N D, Lambusta D, *et al.* Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen[J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2010, **65**: 49–51.
- [2] Elif Y, Keziban C, Mehmet S, *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester[J]. *Biore Technol*, 2011, **102**(2): 499–506.
- [3] Liu Ying(刘映). Synthesis of naproxen derivatives and investigation of it transdermal delivery system (萘普生酯类衍生物的合成及其经皮制剂透皮能力的初步研究)[D]. *Mas Diss Hunan Univer* (湖南大学硕士学位论文), 2013.
- [4] a. Liu Jun-min(刘军民), XU Jian-he(徐建和), Liu You-yan(刘幽燕). Enantioselective esterification of ketoprofen by immobilized lipase in mixed solvent systems (混合溶剂系统中固定化脂肪酶对酮基布洛芬的催化酯化反应)[J]. *Chem J Chin Univer* (高等学校化学学报), 1998, **19**(12): 195–163.
b. Xiang Shuang-long(项双龙), Yang Xiao-jun(杨小俊), Zhang Yu-lian(张育莲), *et al.* Preparation and application of coconut shell activated carbon covalently immobilized palladium complexes(椰壳活性炭共价固载钯离子有机配合物催化剂的制备与应用)[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2013, **27**(1): 55–62.
c. Li Wei-xiang(李伟翔), Li Chun(李春), Liu Gui-yan(刘桂艳), *et al.* Advances of enzyme catalyzed asymmetric synthesis system(酶促不对称催化手性合成系统研究进展)[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2014, **28**(6): 581–594.
d. Wang Yan(王艳), Xin Jia-ying(辛嘉英), Shi Jia(石佳), *et al.* Lipase-catalyzed esterification of starch using lauric acid under microwave(微波辅助酶促月桂酸淀粉酯的合成)[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2014, **28**(1): 67–74.
- [5] Eun G L, Hye S W, Bong H C, *et al.* Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone-treated *Candida rugosa* lipase[J]. *Pro Biochem*, 2001, **37**(3): 293–298.

- [6] Yan Wang, Jia Ying Xin, Jia Shi, *et al.* A kinetic study of starch palmitate synthesis by immobilized lipase-catalyzed esterification in solvent free system [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, **101**: 73–79.
- [7] Xin Jia-ying(辛嘉英), Yu Jia-qi(于佳琪), Li Hai-yan(李海燕), *et al.* Lipase catalyzed double kinetic resolution for the preparation of high enantiopurity (S)-Naproxen (脂肪酶二次动力学拆分制备高光学纯度(S)-萘普生) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2015, **29**(1): 90–95.
- [8] Lucia S, Dean B. Optimisation of stabilised carboxyl-esterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester[J]. *Pro Biochem*, 2008, **43**: 1419–1426.
- [9] Gang Y, Praveen P N, Morshed A C. Synthesis and biological evaluation of N-difluoromethyl-1, 2-dihydropyrid-2-one acetic acid regioisomers; dual Inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase [J]. *Bio & Med Chem Lett*, 2010, **20**(7): 2168–2173.
- [10] Tang Jing-yi(唐静怡). The synthesis, oil/water partition coefficient and antioxidant ability determination of (S)-naproxen reverse esters ((S)-萘普生反酯的合成、脂水分配系数测定及相关活性研究) [D]. *Doc Dissert Cen Sou Univer* (中南大学博士论文), 2013.
- [11] Huang M F, Yu J G, Ma X F. Studies on the properties of montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites [J]. *Polymer*, 2004, **45**(20): 7017–7021.
- [12] Peng Shi-qi(彭师奇). Spectral analysis of drugs(药物的波谱解析) [M], Bei jing(北京), Medical University (北京医科大学), Chin Peking Union Med Coll Pre (中国协和医科大学联合出版社), 1988, 53–112.
- [13] Elomaa M, Asplund T, Soininen P, *et al.* Determination of the degree of substitution of acetylated starch by hydrolysis, ¹H NMR and TGA/IR [J]. *Carbohydr Polym*, 2004, **57**(3): 261–267.
- [14] Unistia L J, Sugih A K, Manurung R, *et al.* Synthesis of higher fatty acid starch esters using vinyl laurate and stearate as reactants [J]. *Starch-Starke*, 2008, **60**(12): 667–675.
- [15] Zhang Ming-ming(张明明). β -cyclodextrin-naproxen inclusion complex and its NMR characterization (β -环糊精包合萘普生及其 NMR 表征) [D]. *Doc Dissert Chongqing Univer* (重庆大学博士论文), 2011.

One Step Esterification Synergy Resolution Synthesis (S) - Naproxen Starch Ester by Lipase in Solvent System

WANG Yan¹, XIN Jia-ying^{1, 2*}, YU Jia-qi

(1. Key Laboratory for Food Science & Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: A enzymatic esterification synthesis process has been developed to prepare (S)-Naproxen starch ester from racemic naproxen methyl ester using lipase as the biocatalysis in the organic solvent. The slow release macromolecular (S)-Naproxen has been synthesised to improve the efficacy of racemic naproxen and overcome its side effects. With carefully selection of the reaction medium (isooctane, 15 mL), the ration of starch to racemic naproxen methyl ester (1 : 3), lipase (Candida Rugosa Lipase, CRL, 10%) and the temperature (60 °C), a high conversion (42.5%) and enantiomeric excess of product (99.1%) was obtained. The stereo selectivity of Candida Rugosa Lipase was greatly influenced by the substrate ratio that improved with the increase of the amount of acemic naproxen methyl ester.

Key words: racemic naproxen; (S)- Naproxen starch ester; lipase; esterification synergy resolution