

文章编号: 1001-3555(2019)04-0323-08

非水相脂肪酶催化氟比洛芬维 C 酯的合成及条件优化

张宏迪¹, 辛嘉英^{1,2*}, 孙立瑞¹, 马惠琳¹, 夏春谷²

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

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

摘要: 采用非水相酶催化法合成氟比洛芬维生素 C 酯, 使用高效液相色谱和质谱等方法对产物结构进行了表征。同时构建非水相反应体系, 通过研究确定最优合成条件: 在 10 mL、0.057 mol/L 的叔丁醇维生素 C 溶液中, 分别添加 2.84 mmol 氟比洛芬甲酯, 10% 的 N435 脂肪酶(以底物的质量分数计), 0.8 g 分子筛, 在 70 °C, 200 r/min 的条件下反应 28 h。最优条件下的产物转化率为 73.63%。

关键字: 脂肪酶; 氟比洛芬维 C 酯; 非水相反应体系; 前药

中图分类号: TQ460.1

文献标志码: A

氟比洛芬(Flurbiprofen)作为一种丙酸类非甾体类抗炎药(NSAIDs)被广泛应用于临床。氟比洛芬具有一对光学异构体(*R,S*)-氟比洛芬, 其目前以外消旋混合物形式给药, 然而, 该抗炎药的对映体具有不同的药理活性, 其中 *S* 构型抑制还加氧酶的活性, 具有抗炎及止痛的作用, *R* 构型具有抗肿瘤作用, 目前已开展治疗早期老年痴呆症和前列腺癌的研究工作^[1]。然而, 该药物难以透过血脑屏障到达患处, 并且长期使用后会引发胃肠道的不良反应, 对身体造成一定程度的损害, 因此限制了该药物的应用^[2]。很多研究者针对该领域进行研究^[3-5], 并采取前药策略对药物进行修饰, 主要是通过酯化对原药的羧基进行屏蔽, 从而增加脂肪溶解性、增强其利用度并减少不良反应。

L-抗坏血酸即维生素 C (L-Ascorbic acid, VC) 是人体必须的维生素, 它具有抗氧化功能, 可以清除体内自由基, 保护机体组织免受氧化损伤。近年来, VC 在治疗神经系统退变性疾病方面得到了广泛关注, 并发现 VC 在脑组织中达到一定浓度时可起到重要的作用^[6]。Yi Zhao 等^[1]针对该方面进行研究, 实验针对几种 VC 基前药进行药物代谢稳定性及药代动力学研究, 并与原药布洛芬进行比较,

认为这几种 VC 基前药在通过血脑屏障方面具有优异的传输能力, VC 能够被 GLUT 和 SVCT2 识别, 并有效的携带原药进入脑部。脂肪酶由于其催化反应条件温和, 反应类型多样且具有良好的立体选择性, 广泛应用于催化药物合成领域^[7]。近年来, 非水相生物酶催化技术迅速发展, 许多研究表明脂肪酶在催化药物合成方面具有广泛的应用, 且在非水介质中具有较高活性和稳定性^[8], Tomasz 等^[2]在甲醇中用 N435 脂肪酶选择性酯化(*R,S*)-氟比洛芬, 获得的(*R*)-氟比洛芬甲酯光学纯度高达 96.3%。徐文婷等^[9]在非水相体系中用脱脂棉固定化黑曲霉脂肪酶合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯, 产物转化率达到 62.2%。Xin 等^[10]采用两种立体选择性相反的脂肪酶进行二次拆分, 制备出 *S* 型萘普生光学纯度高达 96.8%。江南大学汤鲁宏教授等^[11-12]使用氟比洛芬作为反应底物, 通过酯化反应进行氟比洛芬维 C 酯的合成, 反应进行 144 h 达到平衡状态, 得到产物的质量分数约为 6.76%, 反应所需平衡时间较长, 并且转化率较低。为缩短反应所需平衡时间, 提高转化率, 我们以氟比洛芬甲酯为反应底物, 通过酯交换反应合成氟比洛芬维 C 酯, 对产物结构进行分析, 并对反应体系进行优化。

收稿日期: 2019-07-10; **修回日期:** 2019-07-23。

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目 (No.GC13C111); 哈尔滨商业大学研究生创新科研项目 (SP17CX006) (The Scientific Research Fund of Heilongjiang Province (No.GC13C111); The Graduate Innovative Research Fund Project of Harbin University of Commerce (SP17CX006))。

作者简介: 张宏迪 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物催化。E-mail: 834398080@qq.com (Zhang Hong-di (1995-), Female, Graduate student, Research field: biocatalysis. E-mail: 834398080@qq.com)。

* 通讯联系人, E-mail: xinjiayingvip@163.com。

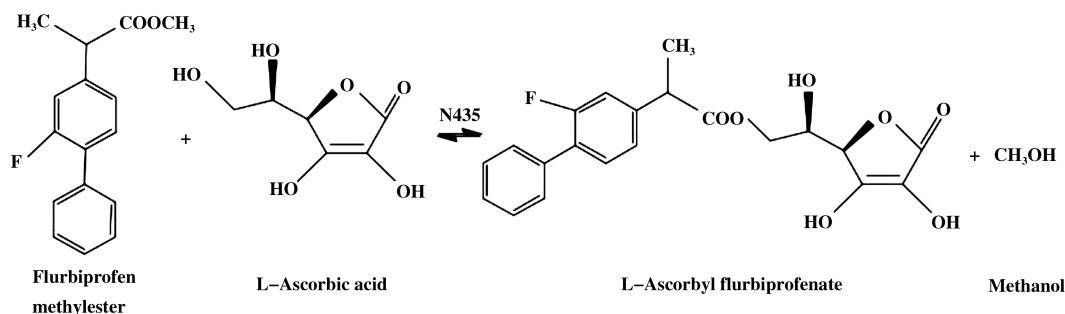


图 1 脂肪酶催化的 VC 和氟比洛芬甲酯的酯交换反应

Fig.1 Lipase-catalyzed transesterification of VC with Flurbiprofenmethyl ester

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

KH-2000 型薄层色谱扫描仪; U3000 型高效液相色谱仪; Bruker Micro TOF-Q- II 型质谱仪。

氟比洛芬(上海美岚实业有限公司); N435 脂肪酶(丹麦 Novozymes A/S 公司); 维生素 C 及其他有机试剂均为分析纯或化学纯(天津市双船化学试剂厂)。

1.2 氟比洛芬甲酯的制备

氟比洛芬甲酯的制备采用化学方法, 分别取 5 g 氟比洛芬、80 mL 苯、150 mL 无水甲醇和 5 mL 浓硫酸置于 500 mL 的圆底烧瓶中, 加热 4 h 保持溶液处于微沸状态。反应结束后, 为了除去溶液中浓硫酸催化剂和未反应的氟比洛芬, 用 5% 碳酸氢钠溶液冲洗反应液, 向其中加入石油醚, 用旋转蒸发仪除去有机相即可得到白色固体。采用薄层层析法对氟比洛芬及其甲酯进行定性分析, 先将 GF254 硅胶板于 110 ℃ 烘箱中活化 2 h, 取样点板, 展层剂(氯仿: 甲醇: 冰醋酸: 水=80: 10: 8: 2)中展开, 紫外灯下可观测到产物的黑斑。

1.3 氟比洛芬维 C 酯的合成及定量分析

取适量的氟比洛芬甲酯和 VC 溶于有机溶剂中, 加入适量的脂肪酶, 并在恒温摇床中反应, 向体系中添加分子筛为控制其水活度小于 0.01, 考察有机溶剂种类、催化时间、底物比、脂肪酶添加量、摇床温度和转速对产物转化率的影响。

使用薄层层析法分析产物, 分别各取 5 μL 反应后样品溶液与氟比洛芬和 VC 标准液, 点在 GF254 硅胶板上, 并于室温下置于展开剂(氯仿: 甲醇: 冰醋酸: 水=80: 10: 8: 2)中 40 min, 自

然风干, 在紫外下观察产物斑点并按照公式(1)进行计算。

转化率计算公式:

$$C = \frac{A_{\text{product}}}{A_{\text{product}} + A_{\text{vitamin C}}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

其中: C——产物转化率;

A_{product} ——使用薄层层析法得出的产物的峰面积;

$A_{\text{vitamin C}}$ ——使用薄层层析法得出的底物的峰面积。

1.4 氟比洛芬维 C 酯的分离及结构分析

1.4.1 产物的分离 通过真空泵滤出反应后的溶液, 除去 N435 脂肪酶和分子筛, 将溶液旋蒸至干, 研磨得到黄色粉末。用 0.2 mol/L 的 pH 8 的磷酸缓冲溶液洗涤并抽滤, 向下清液中加入 3 mol/L 的盐酸将 pH 调至 4, 静置 2 h 后抽滤并回收固体, 再用 65 ℃ 的环己烷冲洗, 最终得到淡黄色固体。

1.4.2 高效液相色谱 通过配有 C₁₈ 反相柱的高效液相色谱检测产物, 使用参考文献[11]中描述的方法进行检测, 将样品稀释 100 倍然后进样, 流动相比为乙腈: 水: 甲酸=80: 20: 0.2, 进样量 10 μL, 流速 1 mL/min; 紫外检测波长为 294 nm。

1.4.3 质谱 质谱的测定是使用 Bruker 公司的 Micro TOF-Q- II 液质联用仪, 采用电喷雾(Electrospray ionization, ESI)离子源, 正离子模式, 溶剂为乙腈。

2 结果与讨论

2.1 薄层层析色谱分析

如下图, 1 为不添加脂肪酶的反应样品、2 为添加脂肪酶催化的样品、3 为氟比洛芬甲酯样品、4 为 VC 标准品、5 为氟比洛芬标准品。参考标准品的

斑点可知，图中黑斑由左至右分别是 VC、产物、氟比洛芬和氟比洛芬甲酯。通过点 1 与点 2 对比我们

可以得出结论，添加 N435 脂肪酶进行催化可以生成新的物质。

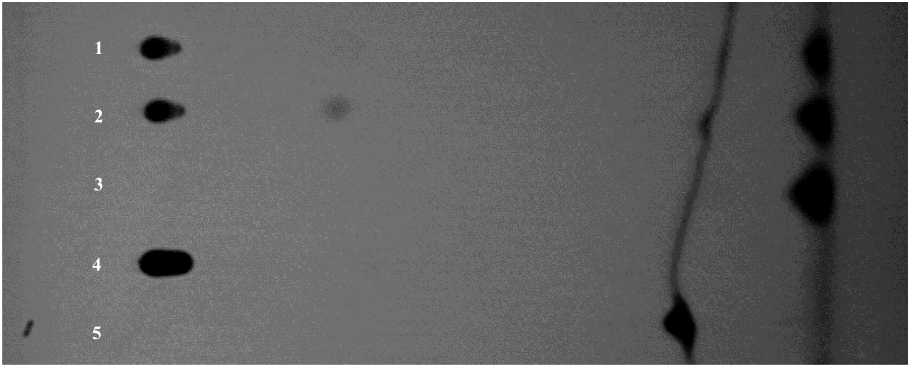


图 2 产物的薄层层析图
Fig.2 Thin-layer chromatogram of the product

2.2 高效液相分析

经高效液相分析得到的色谱图如图 3 所示。a 是氟比洛芬液相色谱图、b 是氟比洛芬甲酯液相色谱图，c 是脂肪酶催化酯化反应后溶液的液相色谱

图。比较显示酯化反应图中的 2 号峰是氟比洛芬，3 号峰是氟比洛芬甲酯，而 VC 在 294 nm 的波长下没有紫外吸收，因此推测 1 号峰为目标产物氟比洛芬维 C 酯。

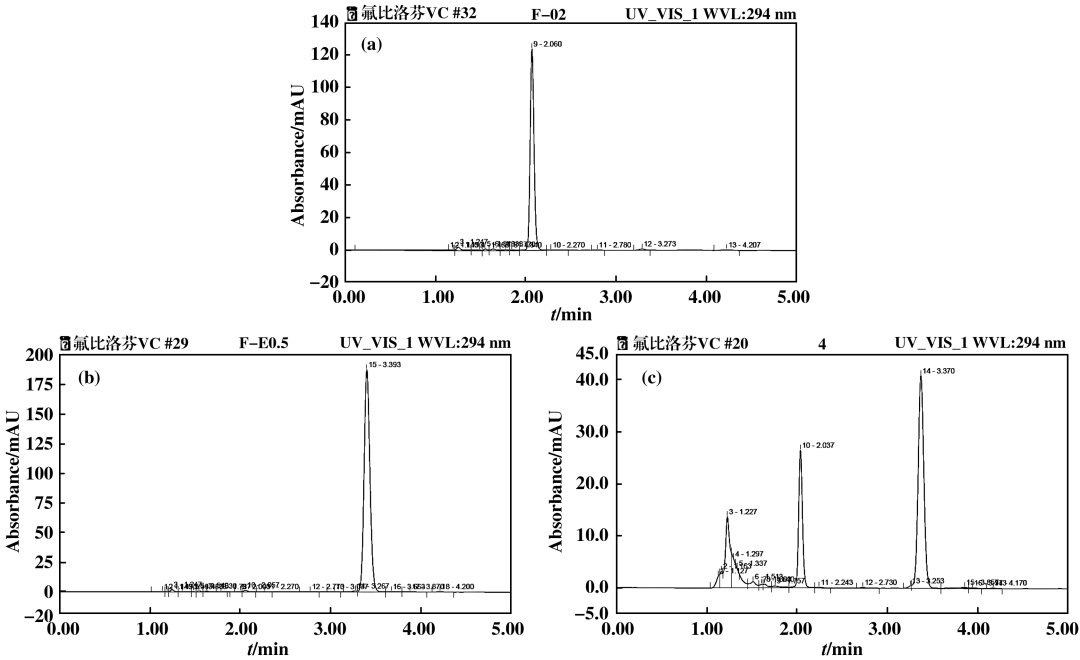


图 3 高效液相色谱图
Fig.3 HPLC

(a. HPLC of flurbiprofen; b. HPLC of flurbiprofenester; c. HPLC of Novozym 435 lipase-catalyzed transesterification)

2.3 质谱分析

通过液质联用仪配套软件计算得到目标产物 (M: C₂₁H₁₉O₇F) 的相对分子质量为 402.110。由图 4 可见阳离子峰：425.059 (M + Na)、827.123 (2M +

Na)、441.055 (M+K)、843.117 (2M+K)，可知 M+Na 的相对分子质量为 425.059，除去钠元素的相对原子质量，与计算所得的产物的相对分子质量相符，确定该物质为目标产物氟比洛芬维 C 酯。

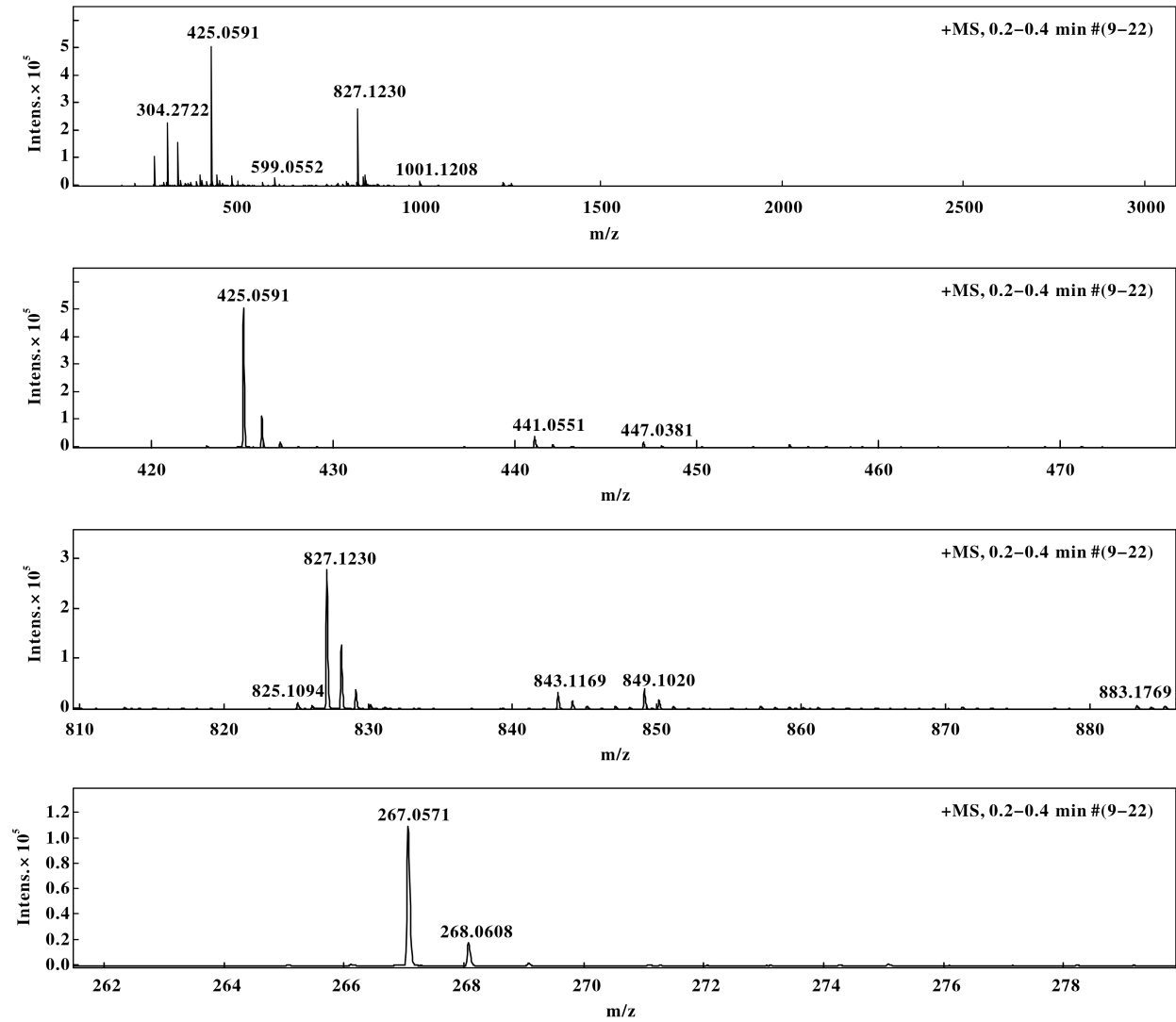


图 4 产物的质谱图
Fig.4 Mass spectrum of product

2.4 有机溶剂的种类对反应的影响

不同来源的脂肪酶具有的催化特性不尽相同. 在实验早期阶段, 分别选取猪胰脂肪酶 PPL、固定化嗜热真菌脂肪酶 TLIM、固定化南极假丝酵母脂肪酶 N435、柱状假丝酵母脂肪酶 CRL、木瓜脂肪酶 CPL 进行催化反应, 发现只有 N435 脂肪酶能催化酯交换反应. 为探索不同有机溶剂对酶催化反应的影响, 分别选用叔丁醇、叔戊醇、乙酸乙酯、丙酮及氯仿进行酯交换反应, 结果如表 1 所示. 反应底物在不同的有机介质中溶解性不同, 有机溶剂的 Log *P* 值较大时 VC 难以溶解, 同时酶的催化活性与有机溶剂的疏水性也呈正相关, 即有机溶剂的 Log *P* 值越大时酶的活性越高, 因为亲水性溶剂能

够剥夺维持脂肪酶构象的“必需水”, 会降低酶的活性. 综上, 实验选择叔丁醇作为反应溶剂.

表 1 N435 脂肪酶在不同溶剂中催化的转化率		
Table 1 The effect of organic solvents on the conversion of N435 lipase-catalyzed reaction		
Solvent	Log <i>P</i>	Conversion/%
Tert-butanol	0.6	41.73
Tert-amyl alcohol	1.09	42.56
Ethyl acetate	0.68	8.71
Acetone	-0.23	31.46
Chloroform	2	-

2.5 反应时间对反应的影响

在催化酯交换反应过程中，针对反应时间进行了研究，分别在不同时间取样检测并计算产物的转化率，得到结果如图 5。由图可看出，0~28 h 时氟比洛芬维 C 酯的转化率随着时间的延长逐渐增加，反应 28 h 后产物的转化率趋于平稳，基本保持不变，因此酶催化的酯交换反应达到平衡的时间为 28 h。

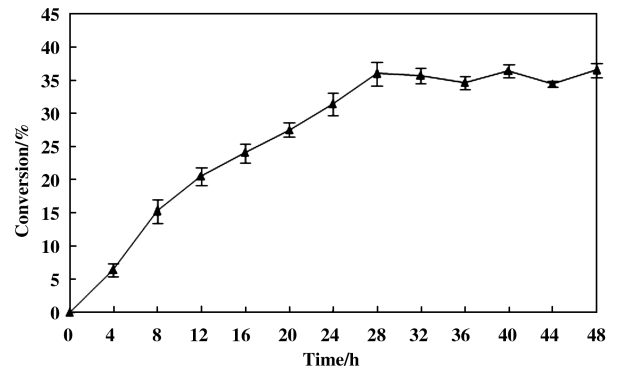


图 5 反应时间对酯交换反应的影响

Fig.5 The effect of reaction time on the conversion of transesterification

(Reaction conditions: flurbiprofen methyl ester (0.57 mmol), VC (0.57 mmol), molecular sieve (0.8 g), tert-butanol (10 mL), Novozym 435 lipase (8%), reaction temperature 50 °C, shaking at 180 r/min. The reaction time was 48 h and sampled every 4 h)

2.6 底物比对反应的影响

底物比率是影响反应平衡的重要参数。固定 VC 的量不变，研究改变氟比洛芬的添加量，如图 6，可以看出随着氟比洛芬 (Flurbiprofen) 的增加，产物的转化率逐渐增高，在底物摩尔比 ($n_{VC} : n_{Flurbiprofen}$) 为 1 : 5 时转化率达到最大值，而当底物的量进一步增加时，产物的转化率呈下降趋势。产生这种现象的原因是增加底物的量可以促进反应向正向进行，产物逐渐增加，转化率上升。当底物 VC 被完全消耗时，转化率达到最大值。而当底物氟比洛芬甲酯的量继续增加时，产生了底物抑制作用，抑制了产物氟比洛芬维 C 酯的生成，同时虽然添加分子筛控制反应体系水活度在 0.01 以下，但反应体系不是绝对的无水状态，除产物氟比洛芬维 C 酯的水解外，底物氟比洛芬甲酯也会发生水解产生甲醇，副产物的积累会促进逆反应的发生，造成转化率下降。

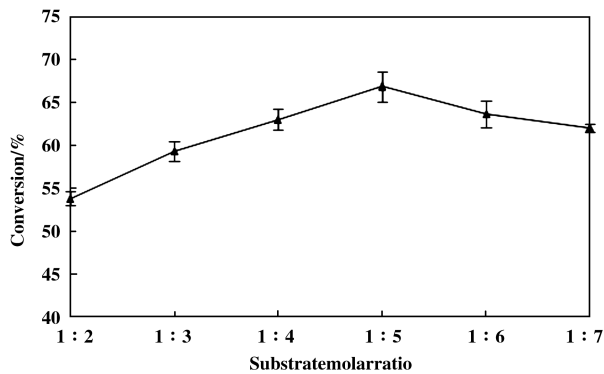


图 6 底物摩尔比对酯交换反应的影响

Fig.6 The effect of substrates molar ratio on the conversion of transesterification

(Reaction conditions: adding different molar ratios of flurbiprofen methyl ester, VC (0.57 mmol), molecular sieve (0.8 g), tert-butanol (10 mL), Novozym 435 lipase (8%), reaction temperature 50 °C, shaking at 180 r/min, reaction time 28 h)

2.7 N435 脂肪酶的添加量对反应的影响

为研究 N435 添加量对酯交换反应的影响，在底物浓度恒定时，分别向其中加入相当于底物质量 2%~14% 的 N435 脂肪酶，结果见图 7。从图中得知，随着脂肪酶添加量的增加，产物的转化率持续增高并在 10% 后趋于平缓，这是由于酶与底物已经充分结合，继续添加也没有催化位点可供结合，所以转化率不再升高。

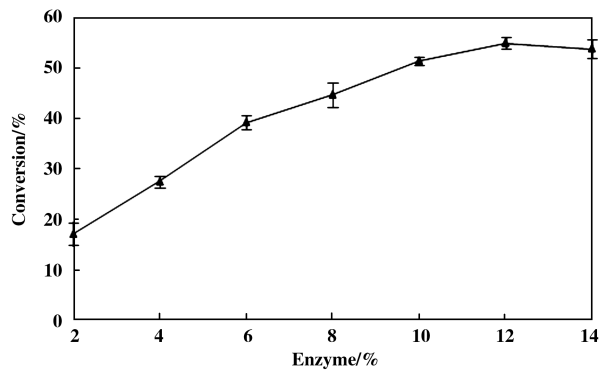


图 7 酶量对酯交换反应的影响

Fig.7 The effect of lipase amount on the conversion of transesterification

(Reaction conditions: flurbiprofen methyl ester (1.71 mmol), VC (0.57 mmol), molecular sieve (0.8 g), tert-butanol (10 mL), reaction temperature 50 °C, shaking at 180 r/min, reaction time 28 h)

2.8 温度对反应的影响

反应温度会影响酶的催化活性和热稳定性,是影响化学平衡常数的一个重要参数.因此,研究了反应温度对酯交换反应的影响.如图8所示,转化

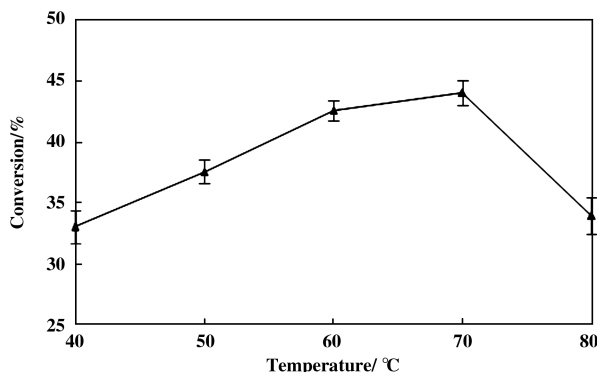


图 8 温度对酯交换反应的影响

Fig.8 The effect of temperature on the conversion of transesterification

(Reaction conditions: flurbiprofen methyl ester (1.71 mmol), VC (0.57 mmol), molecular sieve (0.8 g), tert-butanol (10 mL), Novozym 435 lipase (10%), reaction temperature 40~80 °C, shaking at 180 r/min, reaction time 28 h)

率随温度的增高而先升高后降低,这是因为温度越高,分子热运动越剧烈,加快催化反应进程,同时温度升高逐渐达到酶的最适反应温度,酶活力会增大.但是温度过高,会导致脂肪酶活性中心结构被破坏,酶活性下降或失活.因此 N435 脂肪酶催化氟比洛芬甲酯与 VC 的酯交换反应中最佳反应温度为 70 °C.

2.9 摇床转速对反应的影响

摇床的转速对催化体系的传质有一定影响,如图 9,产物的转化率随摇床转速的提高先上升后趋于平稳.当转速大于 200 r/min 时,底物和酶已充分混合,消除了外部扩散限制,转化率基本稳定不再受摇床转速的影响.因此摇床转速以 200 r/min 为宜.

2.10 N435 脂肪酶稳定性的研究

通过以上实验得到最优反应条件:将 0.57 mmol 维生素 C, 2.84 mmol 氟比洛芬甲酯, 0.8 g 分子筛及 10% 的 N435 脂肪酶加入 10 mL 叔丁醇中,于 70 °C, 200 r/min 的条件下反应 28 h 得到目标产物,在该条件下的转化率达到 73.63%.为了探究酶的操作稳定性,使用同一批次的 N435 脂肪酶反复

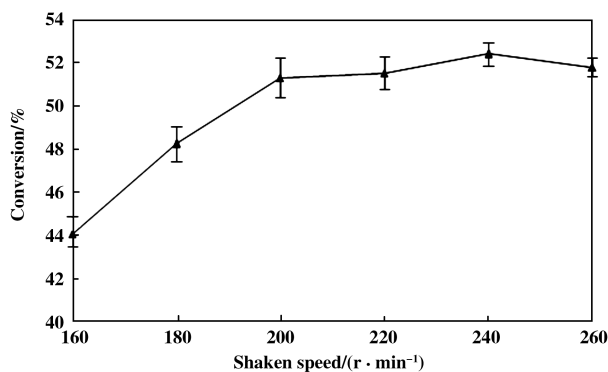


图 9 摇床转速对酯交换反应的影响

Fig.9 The effect of rotation speed on the conversion of transesterification

(Reaction conditions: flurbiprofen methyl ester (1.71 mmol), VC (0.57 mmol), molecular sieve (0.8 g), tert-butanol (10 mL), Novozym 435 lipase (10%), reaction temperature 50 °C, shaking at 180~260 r/min, reaction time 28 h)

进行催化反应,探究重复次数对酯交换反应的影响.

由图 10 可知,转化率随着脂肪酶使用次数的增加而逐渐降低,使用 7 次后转化率低至 37.65%,

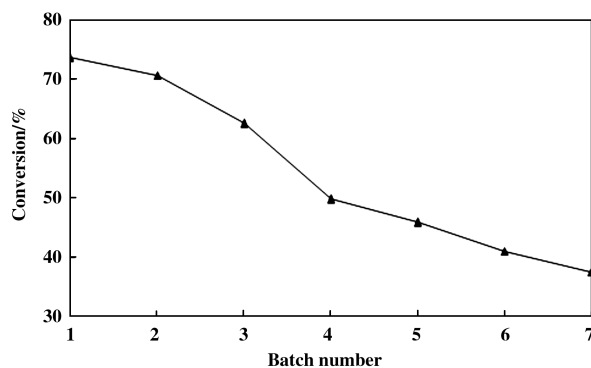


图 10 N435 脂肪酶的稳定性

Fig.10 The stability of N435 lipase

说明酶活力不断下降.造成这种现象的原因是脂肪酶在重复使用期间,不断地清洗和干燥会降低酶活性,同时在反应过程中长时间浸泡在有机溶剂中,也会破坏酶的结构,造成酶活力的损失.

3 结论

我们使用非水相体系成功合成氟比洛芬维 C 酯.在非水相的合成反应中,使用 N435 脂肪酶作为生物催化剂,为了使反应底物能够良好的溶解到反

应介质中, 选择叔丁醇作为反应溶剂. 在该体系中目标产物能够进行良好的合成反应. 通过薄层层析、高效液相色谱、质谱表征产物的结构, 以确定目标产物. 然后优化非水相反应体系, 并讨论了有机溶剂类型、反应时间、底物比例等因素的影响, 得到最优反应条件, 目标产物在最优条件下的转化率为73.63%.

参考文献:

- [1] Zhao Yi, Qu Bo-yi, Wu Xue-ying, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of brain targeting L-ascorbic acid prodrugs of ibuprofen with “lock-in” function[J]. *Europ J Med Chem*, 2014, **82**(23): 314–323.
- [2] TomaszSiódmiak, Debby Mangelings, Yvan Vander Heyden, *et al.* High enantioselective novozym 435-catalyzed esterification of (*R*, *S*)-flurbiprofen monitored with a chiral stationary phase [J]. *Appl BiochemBiotechnol*, 2015, **175**(5): 2769–2785.
- [3] Yildiz Hasan, Ozyilmaz Elif, Bhatti Asif Ali, *et al.* Enantioselective resolution of racemic flurbiprofen methyl ester by lipaseencapsulated mercapto calix [4] arenes capped Fe₃O₄ nanoparticles [J]. *Biopro Biosy Engineer*, 2017, **40**(8): 1189–1196.
- [4] Mahmoud Sheha. Pharmacokinetic and ulcerogenic studies of naproxen prodrugs designed for specific brain delivery [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, **35**(3): 523–530.
- [5] Xin Jia-ying, Sun Li-rui, Chen Shu-ming, *et al.* Synthesis of L-ascorbyl flurbiprofenate by lipase-catalyzed esterification and transesterification reactions[J]. *Bio Med Res Inter*, 2017, 5751262.
- [6] Machhindra Gund A, Parikshit Gaikwad B, NamdevBorhade, *et al.* Gastric-sparing nitric oxide-releasable ‘true’ prodrugs of aspirin and naproxen[J]. *Bioor & Med Chem Lett*, 2014, **24**(24): 5587–5592.
- [7] AdamSikora, AgataTarczykowska, Joanna Chałupka, *et al.* Kinetic resolution of a β -adrenolytic drug with the use of lipases as enantioselective biocatalysts[J]. *Med Res J*, 2018, **3**(1): 38–42.
- [8] Shihui Wang, Xianghe Meng, Hua Zhou, *et al.* Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: A mini review. [J]. *Catalysts*, 2016, **6**(2): 32.
- [9] Xu Wen-ting(徐文婷), Bi Wu-dang(毕武丹), Cong Fang-di(丛方地), *et al.* Immobilized aspergillus niger lipase catalyzed synthesis of L-ascorbyl palmitate in non-aqueous medium (固定化脂肪酶 ANL 非水催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯)[J]. *Chin J Biopro Engineer*(生物加工过程), 2018, **16**(4): 36–39.
- [10] 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 (脂肪酶催化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.
- [11] Wang Ze(王择), Tang Lu-hong(汤鲁宏). Design, synthesis and characterization of ascorbic acid pro-drugs of flurbiprofen (L-抗坏血酸氟比洛芬酯前药的设计、酶催化合成与结构表征)[J]. *Stra Pharm J*(海峡药学), 2010, **20**(10): 213–217.
- [12] Liu Xin-ning(刘信宁), Tang Lu-hong(汤鲁宏). Kinetics and thermodynamics of L-ascorbylprofen esters synthesis catalyzed by lipase in 2-methyl-2-butanol(L-抗坏血酸洛芬酯非水相酶促合成的动力学与热力学)[J]. *Chin J Biopro Engineer* (生物加工过程), 2010, **8**(6): 33–39.

Lipase-catalyzed Synthesis of Flurbiprofen VC Ester

ZHANG Hong-di¹, XIN Jia-ying^{1,2*}, SUN Li-rui¹, MA Hui-lin¹, XIA Chun-gu²

(1. *Key Laboratory for Food Science and 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 Science, Lanzhou 730000, China*)

Abstract: By using five kinds of organic solvents as reaction medium, the immobilized lipase B from *Candida Antarctica* (Novozym 435) as the biocatalyst, Lipase-catalyzed synthesis of Flurbiprofen VC ester was studied. Thin-layer chromatogram, high-performance liquid chromatogram and mass spectrum has been used to analyze the structure of the product. The non-aqueous reaction system was established and the reaction condition was optimized. In 10 mL, 0.057 mol/L of vitamin C solution of tert-butanol was added 2.84 mmol flurbiprofen ester, the ratio of enzyme to substrate was 5% (W/W), the mount of molecular sieve was 0.8 g, and the temperature was 70 °C, the rotating speed was 200 r/min, After the reaction 28 h, the maximum conversion rate of the product reaches 73.63%.

Key words: lipase; flurbiprofen VC ester; Non-aqueous reaction system; prodrugs