

文章编号: 1001-3555(2015)01-0090-06

脂肪酶催化二次动力学拆分制备高光学纯度(S)-萘普生

辛嘉英^{1,2}, 于佳琪¹, 李海燕¹, 王艳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. 中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 设计了一种利用立体选择性相反的两种脂肪酶催化二次动力学拆分, 由外消旋萘普生甲酯制备高光学纯度(S)-萘普生的方法。理论曲线预测, 与简单的酶促动力学拆分反应相比, 二次动力学拆分可以明显提高高光学纯度产物的产率。根据几种脂肪酶在微水/异辛烷双液相反应体系中不对称水解萘普生甲酯的立体选择性和对映体比率(E), 首先选用R选择性的固定化南极假丝酵母脂肪酶(Novozym 435)对外消旋萘普生甲酯进行第一次拆分, 然后选用S选择性的柱状假丝酵母脂肪酶(CRL)对S过量的剩余底物萘普生甲酯在同样的反应体系中进行第二次拆分。该二次拆分反应对映体过量值为96.8%的(S)-萘普生生产率达19.9%。

关键词: 萘普生; 二次动力学拆分; 脂肪酶; 不对称水解

中图分类号: O643.32 **文献标志码:** A

萘普生(Naproxen, 化学名为2-甲基-6-甲氧基-2-萘乙酸)是解热镇痛、消炎抗风湿的主要药物, 其 α 位含有1个手性碳原子, 存在(S)-型和(R)-型光学异构体。萘普生的(S)-构型的药效为其(R)-构型的28倍, 且(R)-萘普生还会扰乱人体正常的脂代谢^[1]。为了提高药效, 降低药物的毒副作用及正确地评价药物, 往往需要拆分获得对映体过量值(enantiomeric excess, ee)超过96%的高光学纯度的(S)-萘普生进行临床使用。由于酶促拆分法具有反应条件温和、环境污染小、拆分效率高、选择性高的特点, 利用脂肪酶进行动力学拆分已成为制备手性化合物的有效手段之一^[2]。对于简单的动力学拆分反应, 产物可达到的最大光学纯度, 即对映体过量值(ee)受到拆分反应的对映体比率(Enantiomeric ratio, E)限制。根据公式 $ee_{p, \max} = (E-1+E \times ee_0 + ee_0)/(E+1+E \times ee_0 - ee_0)$ ($ee_{p, \max}$ 为产物的最大对映体过量值, ee_0 为初始底物的对映体过量值)^[3], 对于E=20的一次拆分反应, 产物的最大光学纯度仅能达到90.5%。同时, 受质量作用的影响, 拆分过程中, 产物的对映体过量值还会随着产物产率的增加而降低。高光学纯度产物的获得必须以牺牲产率为代价。在无法通过改变反应条件、底物结构和酶来提高动力学拆分反应的对映体比率(E)情况下, 利用二次拆分改变初始底物的对映体过量值(ee_0)

可以明显提高一定产率下产物的光学纯度。然而目前文献[4-6]报道的脂肪酶催化二次拆分法或是将第一次拆分反应的产物经过化学衍生化后作为第二次拆分反应的底物, 再对此底物使用与第一次拆分过程相同选择性的脂肪酶进行第二次拆分; 或是利用脂肪酶在不同反应条件下可立体选择性地催化两个方向(如水解和酯化)的反应, 将第一次拆分反应的产物直接作为第二次拆分反应的底物, 通过改变反应条件采用相同选择性的脂肪酶催化其逆反应。前者的缺点是两次拆分过程中需插入一步化学转变过程, 后者的缺点是受反应热力学平衡的影响, 难以达到要求的产率。

我们选择立体选择性相反的两种酶进行二次拆分。如图1所示, 首先对外消旋萘普生甲酯采用R选择性的Novozym 435脂肪酶进行第一次拆分, 然后, 将S-过量的剩余底物萘普生甲酯直接作为第二次拆分的底物, 利用S选择性的CRL脂肪酶选择性地作用于底物中的快反应异构体, 以提高产物中S-对映异构体的光学纯度。理论曲线预测和实验结果表明, 高光学纯度(S)-萘普生的产率明显得以提高。

1 材料与方法

1.1 材料

柱状假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase,

收稿日期: 2015-01-06; 修回日期: 2015-02-17.

基金项目: 黑龙江省应用技术研究与开发项目(GC13C111).

作者简介: 辛嘉英(1966-), 男, 博士, 龙江学者特聘教授, 博士生导师, E-mail: xinjiayingvip@163.com.

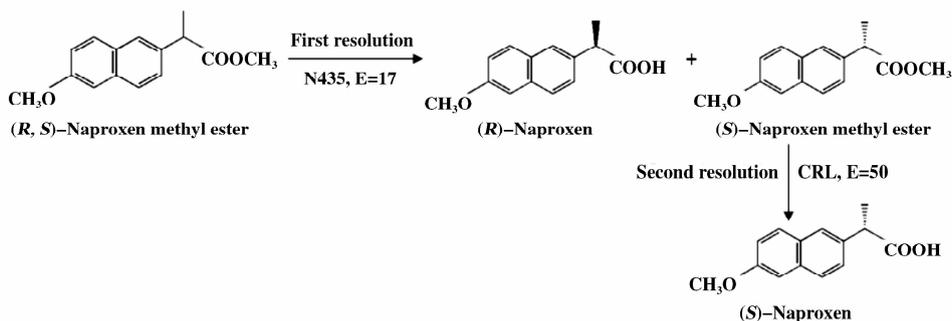


图 1 利用 Novozym 435 脂肪酶和 CRL 脂肪酶制备(S)-萘普生的二次拆分方案

Fig. 1 Scheme of double resolution with Novozym 435 and CRL lipase for preparation of (S)-Naproxen

CRL), 猪胰脂肪酶 (porcine pancreatic lipase, PPL), 麦芽脂肪酶 (wheat germ lipase, WGL) 购自 Sigma 公司, 固定化南极假丝酵母脂肪酶 (immobilized *Candida antarctica* lipase, Novozym 435) 购自诺维信生物技术有限公司, 木瓜脂肪酶 (*Carica papaya* lipase, CPL) 购自广西南宁天绿生物制品有限公司的木瓜粗酶并采用文献[7]方法纯化后获得. 外消旋萘普生购自上海美岚实业有限公司.

1.2 分析方法

采用 Agilent 1200 高效液相色谱 Chiralcel OD-H 手性柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (Dacel Chemical Ind. Ltd) 测定萘普生甲酯的对映体过量值 (ee_s) 和产物萘普生的对映体过量值 (ee_p). 色谱条件: 流动相: 正己烷: 异丙醇 = 99.5 : 0.5, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 5 μL. 采用日本岛津 UV-2550 型紫外可见分光光度计 271 nm 测定底物的转化率 (C, $C = (\text{反应初始阶段底物浓度} - \text{反应终止阶段底物浓度}) / \text{反应初始阶段底物浓度} \times 100\%$).

1.3 酶促动力学拆分反应

按照文献利用微水-异辛烷反应体系中脂肪酶催化的不对称水解反应进行萘普生动力学拆分^[8]. 单酶催化的简单动力学拆分反应在 100 mL 磨口具塞三角烧瓶中进行, 向含有 25 mL 萘普生甲酯浓度为 10 mg/mL 的异辛烷溶液中添加 0.8 mL 磷酸缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 7.0) 和 500 mg 硅藻土作为分散介质和微水固定介质构成的微水-有机溶剂反应体系, 添加 100 mg 脂肪酶启动反应. 在不同温度、200 rpm 条件下振荡反应, 不同时间从异辛烷相中取样检测 C 和 ee_s , 并根据 $C = ee_s / (ee_s + ee_p)$ 计算获得 ee_p .

采用同样的反应体系和反应条件进行脂肪酶催化的二次拆分反应. 在对消旋底物萘普生甲酯的第

一次拆分反应进行到一定转化率时倾出含有剩余底物的异辛烷溶液终止反应, 将含有剩余底物的异辛烷溶液倒入含有 100 mg 第二种脂肪酶、0.8 mL 磷酸缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH 7.0) 和 500 mg 硅藻土的具塞三角烧瓶中继续进行反应, 不同时间从异辛烷相中取样检测 C 和 ee_s , 并根据 $C = ee_s / (ee_s + ee_p)$ 计算获得 ee_p . 反应结束后倾出含有剩余底物的异辛烷溶液并对其进行 C 和 ee_s 测定, 沉淀用异辛烷清洗 3 次后利用无水甲醇溶解产物进行 ee_p 测定, 过滤除去脂肪酶和硅藻土后获得产物 (S)-萘普生.

1.4 拆分效果的评价

利用脂肪酶催化萘普生甲酯不对称水解反应的对映体比率 (E) 和对映体过量值 (ee) 来评价酶的拆分效果. E 值计算公式为^[3]:

$$E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$$

上述公式中的 C 为转化率, ee_s 为底物对映体过量值.

ee 值计算公式为:

$$ee = (R-S) / (R+S)$$

其中 R、S 分别为两种对映体的含量.

1.5 萘普生甲酯的合成

萘普生甲酯通过经典的方法使用萘普生、亚硫酸氯和甲醇合成^[9], 在冰水浴冷却搅拌条件下, 15 mL (0.2 mol) 亚硫酸氯逐滴加入 250 mL 萘普生 (0.12 mol) 的甲醇溶液中, 回流 2.5 h, 反应结束后蒸出溶剂, 在 5% 碳酸氢钠和石油醚中分配得到萘普生甲酯, 经薄层层析分析仅含有萘普生甲酯斑, 无萘普生斑, 红外图谱与标准品一致.

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的选择

为了选择适合于二次拆分反应的脂肪酶, 根据

前期的工作基础,在微水-异辛烷反应体系中对文献中几种常用的商品化脂肪酶进行催化萘普生甲酯不对称水解反应评价.发现在该反应体系中PPL脂肪酶无法催化萘普生甲酯水解,Novozym 435脂肪酶可以选择性催化R型萘普生甲酯水解,其它脂肪酶可以催化S型萘普生甲酯水解.其中S型异构体

选择性的CRL脂肪酶具有较高的立体选择性($E=50$),R型异构体选择性的Novozym 435脂肪酶具有中等偏低的立体选择性($E=17$).因此分别选择R型异构体选择性的Novozym 435脂肪酶和S型异构体选择性的CRL脂肪酶作为催化第一次拆分和第二次拆分反应的酶进行二次动力学拆分.

表1 微水-异辛烷双液相反应体系中脂肪酶催化萘普生甲酯不对称水解反应的动力学参数
Table 1 Kinetic parameters of lipases-catalyzed asymmetric hydrolysis of Naproxen methyl ester in microaqueous-isooctane biphase system

Lipases	Time /h	Temperature /($^{\circ}\text{C}$)	ee_p /($\%$)	ee_s /($\%$)	Conversion /($\%$)	Stereopreference	E
CRL	120	30	95.1	22.6	19.2	S	50
Novozym 435	96	40	87.0	16.6	15.9	R	17
CPL	144	30	92.6	11.2	10.8	S	29
WGL	144	30	-	-	2.3	S	-
PPL	144	30	-	-	0.0	-	-

2.2 单酶催化的简单动力学拆分

酶催化简单动力学拆分反应是指经过一次拆分将底物萘普生甲酯的一对对映异构体分离的方法.采用CRL脂肪酶和Novozym 435脂肪酶分别催化萘普生甲酯不对称水解反应.图2和图3显示了剩余底物和产物的对映体过量值与拆分反应的转化率之间关系的实验结果和理论曲线.如图所示,反应的最初阶段产物的对映体过量值(ee_p)最大,随着反应的进行,由于底物中慢反应异构体的比例增加,

质量作用导致产物的对映体过量值(ee_p)随转化率增加而降低.同产物对映体过量值(ee_p)的降低相反,底物的对映体过量值(ee_s)随反应的进行而增加.根据理论曲线预测,在拆分反应的最初阶段和近终点,能获得较高光学纯度的产物和剩余底物,但化学产率均较低.

2.3 二次拆分法提高光学纯度及化学产率

对于S型异构体选择性的CRL脂肪酶催化的萘普生甲酯不可逆水解反应,由于立体选择性较强

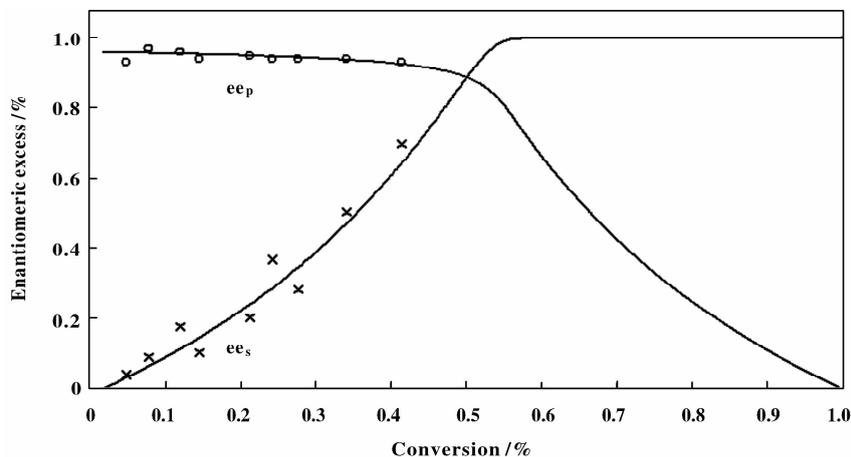


图2 CRL脂肪酶催化萘普生甲酯动力学拆分的对映体过量值随转化率变化关系

Fig. 2 The enantiomeric excess (ee) as a function of the degree of conversion (C) for CRL lipase catalyzed kinetic resolution of racemic Naproxen methyl ester

The curves were computer generated from equation $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$ [3] (substrate) and $E = \ln[1-C(1+ee_p)] / \ln[1-C(1-ee_p)]$ (product) [3] for $E=17$ and the symbols show the experimental data.

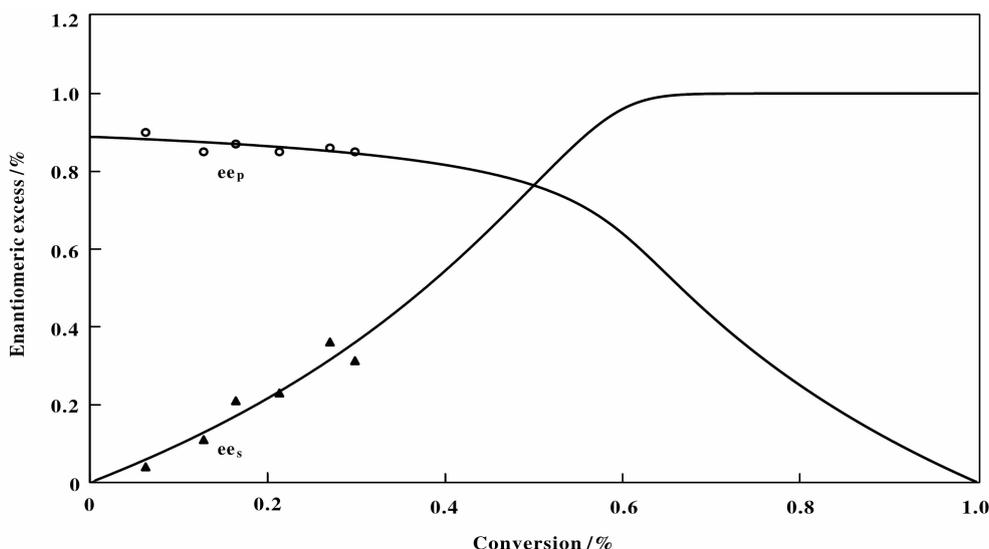


图 3 Novozym 435 脂肪酶催化萘普生甲酯动力学拆分的对映体过量值随转化率变化关系

Fig. 3 The enantiomeric excess (ee) as a function of the degree of conversion (C) for Novozym 435 lipase catalyzed kinetic resolution of racemic Naproxen methyl ester

The curves were computer generated from equation $E = \ln[(1-C)(1-ee_s)] / \ln[(1-C)(1+ee_s)]$ (substrate) and $E = \ln[1-C(1+ee_p)] / \ln[1-C(1-ee_p)]$ (product) for $E=17$ and the symbols show the experimental data.

($E=50$), 通过在低转化率时终止简单拆分反应, 还是可以获得高光学纯的产物的, 但这种高光学纯度的获得是以牺牲产率为代价的. 为了得到高光学纯的产物, 只能将拆分反应终止在最初阶段, 分得低产率的产物. 根据方程 $ee_{p, \max} = (E-1+E \times ee_0 + ee_0) / (E+1+E \times ee_0 - ee_0)$ ($ee_{p, \max}$ 为产物的最大对映体过量值, ee_0 为初始底物的对映体过量值)^[3], 该拆分反应产物的最大对映体过量值为 96.1%. 同时, 受质量作用的影响, 拆分过程中, 产物的对映体过量值还会随着产物产率的增加而降低. 由图 2 理论曲线推测, 如要求产物的对映体过量值 (ee_p) 达到 95.0%, 那么, 反应必须终止在 18.0% 的底物转化率, 此时产物的产率为 18.0%; 如果要求产物的对映体过量值 (ee_p) 达到 96.0%, 那么, 反应必须在 1.0% 的底物转化率下终止, 此时产物的产率仅为 1.0%. 可见, 采用 CRL 脂肪酶催化的简单动力学拆分反应, 无法以较高的化学产率获得高光学纯度 (对映体过量值超过 96%) 的产物.

采用计算机对公式 $[1-C(1+ee_p)] / (1+ee_0) = [1-C(1-ee_p)] / (1-ee_0)$ ^E 作图 (图 4) 可以看出, 除了通过筛选对映体比率 (E) 高的酶外, 使用快反应异构体过量的底物 ($ee_0 > 0$) 代替外消旋底物 ($ee_0 = 0$), 可以提高产物的最大对映体过量值并在较高的

化学产率下获得高光学纯度的产物. 如果采用 R -选择性的脂肪酶 ($E=20$) 首先对外消旋底物萘普生甲酯进行第一次拆分, 根据方程进行理论计算, 在底物转化率 $C=18.6\%$ 时可以获得 $ee_s=20.0\%$ 的 S -过量的剩余底物. 对该剩余底物采用 S -选择性的脂肪酶 ($E=50$) 进行第二次拆分. 根据方程 $ee_{p, \max} = (E-1+E \times ee_0 + ee_0) / (E+1+E \times ee_0 - ee_0)$, 该拆分反应产物的最大对映体过量值为 97.4%. 由图 4 理论曲线推测, 由于快反应底物过量, 在同样要求产物的 ee_p 达到 95.0% 时, 反应可以终止在 35.0% 的底物转化率, 此时产物的产率为 $(1-18.6\%) \times 35.0\% = 28.5\%$; 高于单酶催化 18.0% 的产物产率; 而如果要求产物的 ee_p 达到 96.0%, 反应可以终止在 27.0% 的底物转化率, 此时产物的产率为 $(1-18.6\%) \times 27.0\% = 22.0\%$, 明显高于单酶催化 1.0% 的产物产率. 可见, 此方法能以较高的化学产率获得高光学纯度 (对映体过量值大于 96%) 的产物.

据此, 根据理论曲线指导, 首先采用 R -选择性的 Novozym 435 脂肪酶对外消旋底物萘普生甲酯进行第一次拆分. 如图 5(a) 所示, 底物转化率和剩余底物的对映体过剩值 (ee_s) 均随时间呈上升趋势. 但反应前期转化率和剩余底物的对映体过剩值 (ee_s) 上升较快, 反应 96 h 后趋于平缓, 酶反应速率

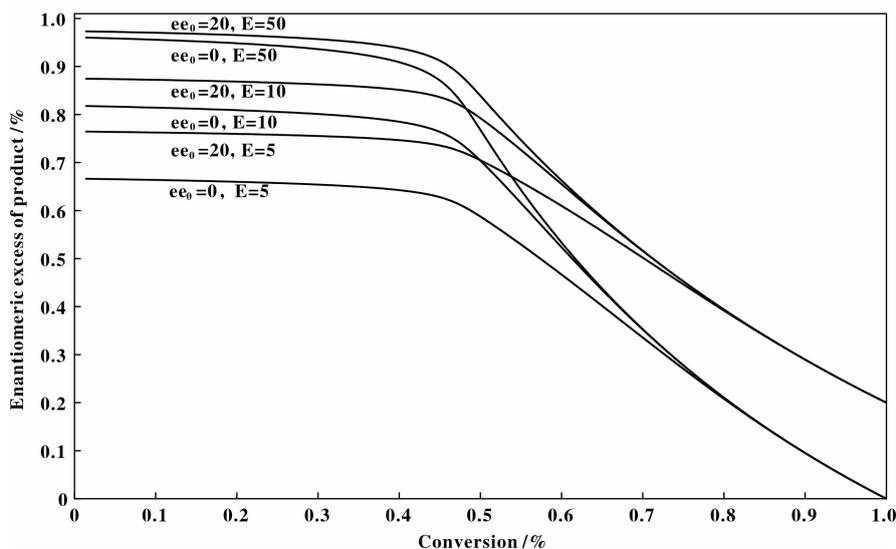


图4 不同的初始底物对映体过量值(ee_0)和对映体比率(E)下产物对映体过量值随转化率变化理论曲线

Fig. 4 Theory curves of the final enantiomeric excess of product (ee_p) as a function of the conversion for various values of initial enantiomeric excess (ee_0) and enantiomeric ratio (E)

明显降低. 这主要是由于快反应异构体(R)-萘普生甲酯的消耗造成的. 因此在反应 96 h 转化率达 18.0% 时停止反应, 此时剩余底物的对映体过量值为 $ee_s = 19.1\%$. 将含有该剩余底物(S)-萘普生甲酯的异辛烷溶液倒入含有 CRL 脂肪酶的反应体系中继续进行二次拆分反应. 如图 5(b) 所示, 在此反

应过程中, 产物(S)-萘普生的对映体过量值(ee_p)变化很小, 几乎呈一水平直线, 如果实验选取 144 h 作为酶促拆分的反应时间, 此时, 酶催化萘普生的转化率达 22.6%, 产物对映体过剩值为 96.8%. 产物(S)-萘普生的产率为 $(1\% \sim 18.0\%) \times 22.6\% = 18.5\%$.

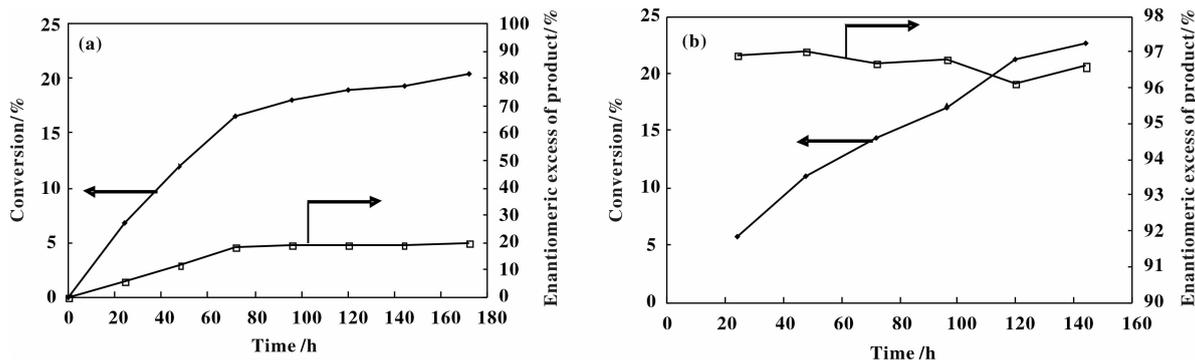


图5 Novozym 435 脂肪酶(a)和 CRL 脂肪酶(b)催化萘普生甲酯不对称水解反应的时间曲线

Fig. 5 Time course of Novozym 435 lipase (a) and CRL lipase (b) catalyzed asymmetric hydrolysis of Naproxen methyl ester

3 结论

R 选择性的 Novozym 435 脂肪酶催化萘普生甲酯不对称水解反应的对映体比率中等偏低 ($E=17$), 尽管 Novozym 435 脂肪酶催化萘普生甲酯不对称水解的速度较快, 但很难用于 (S)-萘普生制备的动力学拆分反应. 本文将其与 S 选择性的 CRL 脂肪酶结合进行二次拆分反应. 通过 Novozym 435 脂肪酶催化 R -

异构体水解来提高剩余底物中 S -异构体含量, 从而使 CRL 脂肪酶催化底物萘普生甲酯不对称水解反应可以在较高的产率下获得高光学纯度产物(对映体过量值超过 96%). 我们通过改变第二次拆分反应所用酶的拆分方向, 将第一次拆分得到的剩余底物不需要特殊处理就直接应用于第二次拆分反应, 避免了引入化学衍生步骤. 同时由于两次拆分使用的反应体系完全相同, 简化了拆分过程, 为制备高光学纯度

萘普生提供了另一条有效途径。

参考文献:

- [1] Pandey A, Benjamin S, Soccol C R, *et al.* The realm of microbial lipases in biotechnology [J]. *Biotech Appl Biochem*, 1999, **29**: 119–131.
- [2] a. Turner N J. Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8**: 114–119.
b. Wang Yan, Xin Jia-ying, Shi Jia *et al.* Lipase-catalyzed esterification of starch using lauric acid under microwave[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(1): 67-74.
c. Xu Hong-mei, He Cong-lin, Xiong Wen-juan, *et al.* Preparation of (R)-O-chloromandelic acid via dynamic kinetic resolution of o-chloromandelonitrile by whole cell of *alcaligenes faecalis* CGMCC 1.2006[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(2): 174–181.
- [3] Chen C S, Fujimoto Y, Girdaukas G, Sih C J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers[J]. *J Am Chem Soc*, 1982, **104**: 7294.
- [4] a. Brem J, Naghi M, Tosa M I, *et al.* Lipase mediated sequential resolution of aromatic b-hydroxy esters using fatty acid derivatives[J]. *Tetra: Asy*, 2011, **22**: 1672–1679.
b. Long Xiang-dong, Li Ze-long, Gao Guang, *et al.* Recent advances in the hydrogenation of levulinic acid for valerol actone[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(4): 384–392.
- [5] Caterina Carnovale, Daniela Iannazzo, Giovanni Nicolsi, *et al.* Preparation of isoxazolidinyl nucleoside enantiomers by lipase-catalysed kinetic resolution [J]. *Tetra: Asy*, 2009, **20**(4): 425–429.
- [6] Yu D H, Wang L, Gu Q, *et al.* A two-step enzymatic resolution of glycidyl butyrate[J]. *Proc Biochem*, 2007, **42**: 1319–1325.
- [7] Chen C C, Tsai S W, Villeneuve P. Enantioselective hydrolysis of (R, S)-naproxen 2, 2, 2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from *carica pentagona heilborn* and *carica papaya* [J]. *J Mol Catal B: Enzy*, 2005, **34**: 51–57.
- [8] Xin Jia-ying (辛嘉英), Li Shu-ben (李树本), Xu Yi (徐毅), *et al.* 有机溶剂-水双液相体系脂肪酶不对称水解合成(S)-(+)-萘普生[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 1998, **12**(6): 412–416.
- [9] Brook A, Chan T H. A Sample procedure for the esterification of carboxylic acids[J]. *Synthesis*, 1983, **3**: 201–203.

Lipase-catalyzed Double Kinetic Resolution for the Preparation of High Enantiopurity (S)-Naproxen

XIN Jia-ying^{1,2}, YU Jia-qi¹, LI Hai-yan¹, WANG Yan¹, 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 and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: A R-preference lipase and a S-preference lipase catalyzed double kinetic resolution strategy for preparation of high enantiopurity (S)-Naproxen from racemic Naproxen methyl ester has been designed. The theoretical plots predict that the yield of high enantiopure product was increased obviously by carrying out the double kinetic resolution reaction instead of a single-resolution reaction. According to the stereopreference and enantiomeric ratio(E) of lipases for asymmetric hydrolysis of Naproxen methyl ester in microaqueous-isooctane biphasic system, the (S)-Naproxen methyl ester was enriched using immobilized *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) catalyzed hydrolysis and then was hydrolyzed selectively to (S)-Naproxen by *Candida rugosa* lipase (CRL) in microaqueous-isooctane biphasic system. In this way, a yield of 19.9 % was obtained for (S)-Naproxen with high enantiopurity of 96.8%.

Key words: naproxen; double kinetic resolution; lipase; asymmetric hydrolysis