

微水-有机溶剂两相体系中消旋萘普生的酶法拆分

辛嘉英 李树本 徐 毅 王来来 沈润南

(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 兰州 730000)

摘 要 研究了微水-有机溶剂两相体系中固定化脂肪酶催化的萘普生甲酯的立体选择性水解反应。固定化酶活性受载体极性、水含量、有机溶剂的 $\log P$ 值、产物抑制的影响,据此构建了一种可以连续拆分产生(S)(+)-萘普生的微水-有机溶剂两相体系。反应在一个具有回路的连续流搅拌反应器中进行,反应器中添加有采用吸附法固定化的脂肪酶,载体为一种弱极性的合成载体,水相连同固定化酶颗粒一起永久保持在反应器中,有机流动相带入底物,带出产物。固定化酶在该 50mL 反应器中 30℃ 连续操作 60d,仅损失活性 25%,产生(S)(+)-萘普生 900mg,产物对映体过量值(ee_p)为 95%。

关键词 萘普生 固定化脂肪酶 立体选择性水解 微水-有机溶剂两相体系 连续法
中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0055-05

萘普生是解热镇痛、消炎抗风湿的主要药物。它的(S)(+)构型的药效为其R(-)构型的28倍^[1]。(S)(+)萘普生可通过酶法拆分获得^[2,3]。本文在微水-有机溶剂体系中利用脂肪酶催化的萘普生脂的立体选择性水解反应拆分萘普生,为增加脂肪酶在该体系中的分散度和稳定性,同时便于回收,将其通过吸附法进行了固定化,研究了各种反应条件对酶活性的影响,提出了一种可连续产生(S)(+)萘普生的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

圆柱状假丝酵母脂肪酶,产生菌为皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)购自Sigma公司,YWG-C₆H₅、YWG-CN和YWG-NH₂为天津化学试剂二厂生产的键合有不同疏水基团的多孔硅胶。

1.2 酶的固定化

见文献[4]。

1.3 分析方法

采用HP1090型高效液相色谱测定萘普生甲酯的对映体过量值(ee_s),产物萘普生衍生成萘普生甲酯后采用同样方法测定 ee_p (紫外检测器,固定相:涂敷3,5-二甲基苯基氨基甲酸纤维素的手性固定相,流动相:正己烷:异丙醇=99.5:0.5,流速:

0.5mL/min,进样量:10 μ L)。采用日本岛津UV-120-02型分光光度计271nm测定底物的转化率(C)。采用GC-204气相色谱仪测定甲醇含量(FID检测器,PorparkQ柱(3mm \times 2000mm),柱温90℃,检测室温度176℃,注射室温度90℃,载气为氮气,流速7.0mL/min)。

1.4 酶活测定

含75mg游离酶的0.8mL磷酸缓冲溶液(0.2mol/L,pH7.0)或500mg包含0.8mL磷酸缓冲溶液(0.2mol/L,pH7.0)的固定化酶加入到25mL有机溶剂(萘普生甲酯的浓度为10mg/mL)中30℃,150r/min条件下反应,反应结束后分离产物和底物进行检测,计算出单位重量(mg)的酶在单位时间(h)内产生萘普生的浓度(μ mol/L)。

1.5 萘普生甲酯在批式反应器中的酶法水解

在25mL萘普生甲酯浓度为10mg/mL的异辛烷中,添加含有0.8mL磷酸缓冲溶液(0.2mol/L,pH7.0)的0.5g固定化酶启动反应。在30℃,150r/min条件下反应,每批反应结束后倾出有机相,添加含有新的底物的有机相继续下一批反应。

1.6 萘普生甲酯在连续流搅拌反应器中的酶法水解

将与上述水含量相同的0.5g固定化酶添加在一个自制的50mL搅拌反应器中,该反应器内先添

加有 25mL 的有机溶剂然后在 1.25mL/h 流速下连续泵入该有机溶剂(萘普生甲酯浓度为 10mg/mL)。从该反应器中泵出的含(R)-(-)-萘普生甲酯、(S)-(+)-萘普生和甲醇的有机溶剂被连续泵入填充有可吸附萘普生及甲醇的 SiO_2 (10g) 分离柱, 从该分离柱流出的仅含有萘普生甲酯的有机溶剂再循环回反应器中继续反应。循环的有机溶剂的总体积为 1000mL。当剩余萘普生甲酯的 ee_s 值超过 31.45% 或转化率超过 25% 时, 更换新的底物。利用乙酸乙酯洗脱吸附柱中的产物, 再在 120℃ 烘烤可再生吸附柱, 再生的吸附柱经有机溶剂预平衡后可再与搅拌反应器串接。将两根分离柱交替使用可使系统连续操作。从分离柱中洗脱出的乙酸乙酯溶液经减压蒸馏后用 5% 的 NaHCO_3 抽提, 水相用 5% HCl 酸化到 $\text{pH}=2$, 过滤干燥后得到 900mg(S)-(+)-萘普生。

1.7 萘普生甲酯的合成

萘普生甲酯的合成参考文献[5]的方法使用萘普生、亚硫酸氯和甲醇合成。

2 结 果

2.1 载体极性对固定化酶活性的影响

在微水-有机溶剂体系中, 脂肪酶不溶于有机溶剂, 只能保持在被载体束缚着的水相中, 因此可被有效地固定化。我们将脂肪酶通过吸附法固定在不同极性的载体上(YWG- C_6H_5 , YWG-CN, 和 YWG- NH_2), 该酶在室温下 30min 内可完全被固定化。脂肪酶经固定化后, 被有效地分散在载体表面, 避免了其在有机溶剂中的聚集, 活性明显高于游离酶(表 1)。

表 1 固定化酶活性与载体对萘普生及其酯吸附能力间的相互关系

Table 1 Relationship between the activity of immobilized enzyme and the absorption ability of supports for naproxen methyl ester or naproxen

Supports	Adsorption ability of supports for naproxen methyl ester/(mg/g)	Adsorption ability of supports for naproxen/(mg/g)	Activity of lipase/ ($\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{mg}\cdot\text{h}$)
YWG- NH_2	10.5	33.2	0.64
YWG-CN	37.0	18.8	1.40
YWG- C_6H_5	66.5	9.50	2.10
Free-enzyme	/	/	0.20

Adsorption conditions: 250mg of naproxen or its methyl ester was mixed with 25mL methanol or isooctane and 0.5g support, allowed to absorb at 37℃ for 24h and the organic layer was analyzed by spectrophotometry

从表 1 可看出, 极性不同的载体吸附底物萘普生甲酯和产物萘普生的能力不同, 而这种底物或产物与载体间的相互作用对反应速度影响很大。由于在 YWG- C_6H_5 载体的液-固表面局部底物浓度较高而局部产物浓度较低, 固定在 YWG- C_6H_5 上的脂肪酶表现较高活性。而在 YWG- NH_2 载体的液-固表面局部底物浓度较低而局部产物浓度较高, 因而固定在 YWG- NH_2 上的脂肪酶表现较低活性。

2.2 水含量对固定化酶活性的影响

水可从作为底物和影响两相接触面两方面影响反应速率。在该体系中, 增大两相界面有利于反应进行。水含量较低时, 单层分布在载体的孔隙和内表面的水可产生最大的两相界面, 但热力学反应平衡对水解反应不利; 水含量较高时, 热力学反应平衡对水解反应有利, 但由于水层较厚, 载体的孔隙和内表面逐渐被水层充满, 两相界面变小。因此, 存在一个最佳水含量。由于有机溶剂都用磷酸缓冲溶液(0.2mol/L, $\text{pH}7.0$) 预饱和, 可以认为所有添加的水都被限制在了载体周围, 所以两相的界面大小是由载体和水的量决定的。如图 1 所示, 当载体和有机溶剂的量保持 0.5g 和 25mL 不变时, 水量达到 0.8mL(水:载体 = 1.6mL/g) 时最佳, 此时反应的转化率最高。

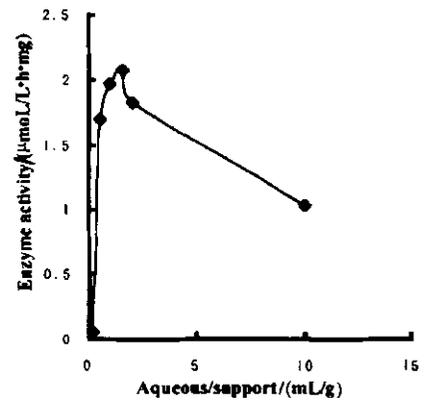


图 1 水含量对 YWG- C_6H_5 上固定化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of water content on the activity of enzyme immobilized on YWG- C_6H_5

250mg naproxen methyl ester in 25mL of isooctane, 500mg enzyme immobilized on YWG- C_6H_5 with different water content. The reaction was started by added the immobilized enzyme into the organic

2.3 产物甲醇对固定化酶活性的抑制作用

萘普生甲酯水解的另一产物是甲醇, 通过在反应起始阶段添加不同量甲醇发现其可以明显抑制脂肪酶的活性(图 2)。在微水-有机溶剂两相反应体系中, 由于异辛烷从水相中抽提甲醇的能力较弱, 因

而会引起甲醇在水相中的积累。随着反应的进行,产生的甲醇会越来越多,对酶活性的抑制也会越来越严重。气相色谱分析发现,当批式反应的时间间隔为 24h 时,产生甲醇 1.08×10^{-4} mol, 异辛烷从水相中抽提出甲醇 8.40×10^{-5} mol, 水相中剩余的甲醇浓度为 0.1% (V/V); 当批式反应的时间间隔为 120h 时,产生甲醇 5.40×10^{-4} mol, 异辛烷从水相中抽提出甲醇 4.37×10^{-4} mol 时水相中剩余的甲醇浓度为 0.4% (V/V)。由图 3 可见,批式反应的时间

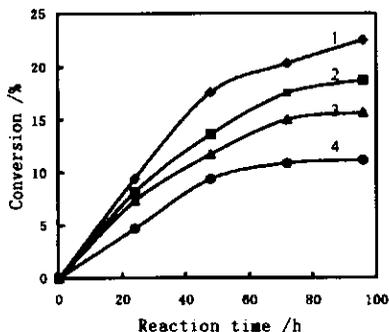


图 2 甲醇对萘普生甲酯水解反应的影响

Fig. 2 Effect of methanol on the hydrolysis of naproxen methyl ester

250mg naproxen methyl ester in 25mL of isooctane, 500mg enzyme immobilized on YWG-C₆H₅ with 0.8mL water content, and the indicated quantity of methanol.

Methanol added: 1. 0 μ L; 2. 4.4 μ L; 3. 8.8 μ L; 4. 13.2 μ L

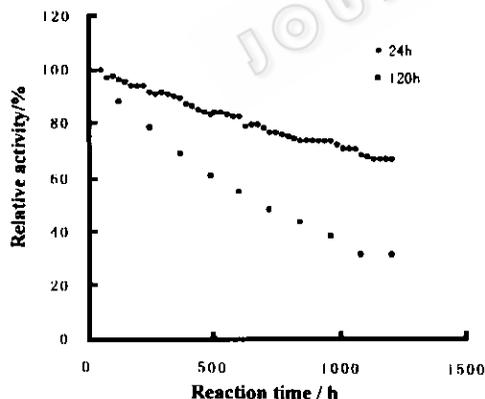


图 3 固定化酶水解萘普生甲酯的批式反应

Fig. 3 Repeated-bath experiments of naproxen methyl ester hydrolysis by the lipase immobilized on YWG-C₆H₅

间隔为 120h 时酶的失活明显高于时间间隔为 24h 时酶的失活,这主要就是因为水相中积聚的甲醇对酶的抑制作用造成的。为了避免这种抑制作用及排出产物萘普生,应该使用具连续流动有机相的反应器。有机相的连续抽提作用会使水相中甲醇保持较低浓度而减少对酶的失活。

2.4 有机相的选择

为了构建一个连续流反应器,有机相应能够同时提供底物和排出产物。但萘普生在异辛烷中的低溶解度(0.062mmol/L)会造成产物萘普生不易排出和反应器堵塞。为了增加萘普生在有机相中的溶解度,可以使用极性较高的有机溶剂,然而,正如图 4 中所示,脂肪酶活性受溶剂 logP 值影响很大,使用极性较高的有机溶剂会使酶活性急剧降低。此时产生的萘普生的量大大低于有机溶剂能够抽提出的萘普生的极限量。我们通过细心的混合异辛烷和甲苯,可以得到 logP 值介于 4.0~4.5 的混合有机溶剂,其溶解萘普生的能力大大提高,而对酶活性的影响却较小。当二者比为 90/10(mol/mol)时,从有机相可以抽提到最高的产量(图 4)。

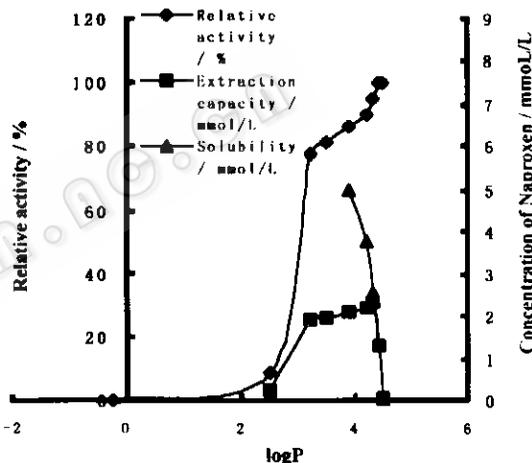


图 4 有机溶剂对酶活性、萘普生溶解度及抽提能力的影响

Fig. 4 Effect of organic solvent on activity of enzyme, solubility of Naproxen and extraction capacity

Solvents (Values of logP): Isooctane (4.51); nhexane(3.5); Cyclohexane(3.2); Toluene (2.5) acetone(-0.23). Values of logP from 4.5 to 4.0 for the mixture were calculated as follows: $\log P = (1-x) \log P_{\text{toluene}} + x \log P_{\text{isooctane}}$, with x to be the mole fraction of isooctane.

2.5 连续反应器的构建及操作稳定性

在前述的最佳反应条件下,构建了一个可连续操作的酶反应器(图 5),它包含一个添加有以 YWG-C₆H₅ 为载体的固定化脂肪酶的恒温搅拌反应器,最佳量的水被限制在载体表面和内部,永久保持在该反应器中。含有 10mg/mL 萘普生甲酯的混合有机相(异辛烷/甲苯=90:10mol/mol)被泵入该反应器,泵出的有机相中含有(R)-萘普生甲酯、(S)-(+)-萘普生和甲醇。混合有机相在 30 $^{\circ}$ C 溶解萘普生的极限为 2.55mmol/L,因此调整有机相的流速为 1.25mL/h,此时反应的转化率为 6%,产生的萘普生和甲醇的量为 7.38×10^{-5} mol/L,有机相抽提

萘普生极限量为 7.65×10^{-5} mol/L, 抽提出的甲醇的极限量为 8.4×10^{-5} mol/L, 因此可以保证产生的萘普生和甲醇不在水相中继续积累。由图 6 可见, 该连续流搅拌反应器由于克服了甲醇在水相中积累引起的酶的失活, 连续操作 60d, 酶活仅损失 25%, 产生了 900mg (S)-(+)-萘普生 ($ee_p > 95\%$, 比旋光值 $[\alpha]_D = +63^\circ (c = 0.5, \text{CHCl}_3)$), 将产物点样于

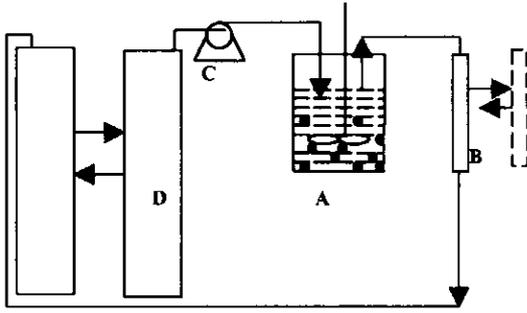


图 5 反应器示意图

Fig. 5 Schematic representation of the stirred reactor used

- A. Stirred reactor; B. Adsorption column;
C. Recycle pump; D. Organic phase reservoir

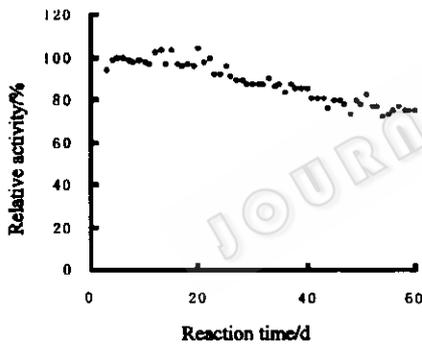


图 6 固定化酶在连续流搅拌反应器中的操作稳定性

Fig. 6 The operated stability of immobilized lipase in the continuous-flow stirred reactor

GF₂₅₄薄层板上, 置于石油醚:乙酸乙酯:乙酸 = 3:1:0.05 上行展开, $R_{f\text{产物}} = 0.37$, 与标准品一致, 其中未发现萘普生甲酯斑)。根据文献[6], 当对映体比率 E 一定时, ee_p 值与反应的转化率 c 有关, 为了得到高 ee_p 的产物 (95%), 应在转化率低于 25% 或萘普生甲酯的 ee_s 值低于 31% 时更换新的底物。

3 讨 论

水溶液中酶法拆分萘普生有如下缺点: 1) 底物在水中的低溶解度导致低反应速度^[7]; 2) 水溶液中易发生非立体选择性的化学水解^[8]; 3) 从水溶液中提纯产物很困难^[9]。另一拆分方法是在水饱和和有机溶剂中水解萘普生酯, 这时底物的溶解度及酶回收问题可以解决。但不利于水解反应的热力学平衡及有机溶剂的低含水能力可能会阻碍达到所要求的转化率和对映体过量值^[10]。本文在微水-有机溶剂两相体系中水解萘普生酯, 为增加脂酶的分散度和稳定性, 同时为避免水相和有机相形成乳化状态, 将脂肪酶与水相共同固定在载体上。此系统既具有高的底物溶解度和有利于水解反应的热力学平衡, 又便于酶的回收。本文采用异辛烷和甲苯混合的方法, 得到了一个既能达到所要求的抽提萘普生能力又对酶活性损失较小的混合溶剂。以此为有机相, 与固定化酶结合, 构建了一种可连续产生 (S)-(+)-萘普生的反应器。由于水含量是在该微水-有机溶剂两相体系中水解萘普生甲酯的关键因素, 因此有机相在使用前必须用水饱和, 同时根据水解反应所消耗的水量小心添加水以保持最佳水含量是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] Margolin A L. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15:266~279
- [2] Gu Q M, Chen C S, Sih C J. *Tetrahedron Lett*, 1986, 27:1763~1766
- [3] Ezio Battistel, Daniele Bianchi, Pietro Cesti *et al.* *Biotech Bioeng*, 1991, 38:659~664
- [4] 辛嘉英, 李树本, 徐毅等. *分子催化*, 1999, 13(2):103~108
- [5] Brook A, Chan T H. *Synthesis*, 1983, 201
- [6] Chen Ching-shih, Yoshinori Fujimoto, Gary Girdaukas *et al.* *J Am Chem Soc*, 1981, 104:7294~7299
- [7] Akita H, Enoki Y, Yamada H *et al.* *Chem Pharm Bull*, 1988, 37:2876~2878
- [8] Kise H, Tomiuchi Y. *Biotech Lett*. 1991, 13:317~322
- [9] Caron G, Kazlauskas R. *J Tetrahedron Asymmetry*. 1993, 4:1995~2000
- [10] Rakels J L L, Straathof A J J, Heijnen J *et al.* *Asymmetry*, 1994, 1:93~100

Enzymatic Resolution of Racemic Naproxen in A Low Aqueous-organic Biphasic System

XIN Jia-ying LI Shu-ben XU Yi WANG Lai-lai SHEN Run-nan

(OSSO, Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

Abstract A stereoselective hydrolysis of the racemic naproxen methyl ester by immobilized lipase from *Candida rugosa* in a low aqueous-organic biphasic system was studied. Support polar, water content, the logP value of organic phase and product inhibition effected the activity of immobilized enzyme. According to these reaction conditions, a low aqueous-organic biphasic system for the continuous production of (S)(+)-Naproxen was developed. The reaction was carried out in a continuous-flow closed-loop 50mL stirred bioreactor packed with YWG-C₆H₅, a poorly polar synthetic support on which the lipase had been immobilized by adsorption. The aqueous phase was permanently remained in the reactor associated with the immobilized enzyme particles; the organic phase containing substrate was pumped through this reactor and emerged with the products. The continuous-flow stirred bioreactor containing 75mg lipase was allowed to operate continuously for 60 days at 30°C with a 25% loss of activity, 900mg of (S)(+)-Naproxen (ee_p 95%) were produced.

Key words Naproxen, lipase, stereoselective hydrolysis, low aqueous-organic biphasic system, immobilized enzyme, continuous process