

文章编号: 1000-5862(2017)06-0574-05

澳栗精胺衍生物的酶法合成研究

彭 仁 姚清文 洪彬文

(江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022)

摘要: 澳栗精胺具有调节植物生长、抗炎症病变、免疫抑制缺陷和肿瘤转移等方面的功能,澳栗精胺的一些衍生物在抑制人类免疫缺陷病毒和丙肝病毒等方面比澳栗精胺本身活性更高. 该文系统地优化了在有机溶剂中酶法合成澳栗精胺衍生物的条件,并且纯化得到了 6-*O*-丁酰澳栗精胺. 结果表明:合成澳栗精胺衍生物的最优条件为 Lipozyme RM IM 在四氢呋喃中、30 ℃ 下催化反应 60 min,其中澳栗精胺的转化率为 84.3%,6-*O*-丁酰澳栗精胺的得率为 39.2%. 纯化得到的 6-*O*-丁酰澳栗精胺与标准品在高压液相色谱中的保留时间相同.

关键词: 澳栗精胺衍生物; 脂肪酶; 酶法合成; 高压液相色谱

中图分类号: Q 814.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.06.05

0 引言

澳栗精胺最初是由 *Castanospermum australe* 分离得到的一种中氮茛生物碱^[1]. 研究表明它能抑制 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性,因而在调节植物生长、治疗炎症病变、免疫抑制缺陷、肿瘤转移等方面具有一定的应用前景^[2-7]. 澳栗精胺的一些衍生物在抑制人类免疫缺陷病毒和丙肝病毒等方面比澳栗精胺本身活性更高^[8],如 6-*O*-丁酰澳栗精胺比澳栗精胺的抗病毒活性更高、毒性更低^[9-16],因而澳栗精胺的酰基化吸引了制药工业界的注意. 由于澳栗精胺结构中含有 4 个类似的羟基,因此在 6 位的选择性酰基化对于有机合成领域来说是一个复杂的问题^[17]. P. S. Liu 等^[18]用化学的方法合成了 6-*O*-丁酰澳栗精胺,整个合成过程共 5 步,其中需要对相邻的羟基进行保护和去保护. W. K. Anderson 等^[19]用一锅法制备了 6-*O*-丁酰澳栗精胺,其中澳栗精胺和二丁基氧化锡在无水甲醇中反应,然后产物用盐酸和三乙胺原位处理,经快速柱层析后,6-*O*-丁酰澳栗精胺的产率可达 18%~44%. 由于酶具有专一性和反应条件温和等特点,所以用酶作为催化剂对羟基进行选择性的酰基化具有一定的优势. A. L. Deborah 等^[20]用枯草杆菌蛋白酶和脂肪酶 CV/猪胰脂肪酶在吡啶中合成了多种澳栗精胺酯的衍生物. 然而该

方法所需的反应时间长,产率不高. 脂肪酶是迄今为止种类和用途最为广泛的工业用酶之一,现已成功地用于生物柴油、结构性三甘油酯和手性化合物的制备^[21-23],因而能够筛选到合适的脂肪酶用于澳栗精胺衍生物的合成非常重要.

本文系统地优化了酶法合成澳栗精胺衍生物的条件,并且纯化了其中一种澳栗精胺衍生物——6-*O*-丁酰澳栗精胺.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Novozyme 435、Lipozyme TL IM 和 Lipozyme RM IM 购自 Novozymes 公司,脂肪酶 PS 和脂肪酶 AK 购自 Amano 公司,猪胰脂肪酶购自 Amresco 公司. 澳栗精胺和 6-*O*-丁酰澳栗精胺标准品购自 Santa Cruz 生物技术有限公司. 有机溶剂使用前用 0.4 mm 分子筛脱水处理.

1.2 方法

1.2.1 不同种类的脂肪酶对合成澳栗精胺衍生物的影响 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和不同种类的脂肪酶(Novozyme 435、Lipozyme TL IM、Lipozyme RM IM、脂肪酶 PS、脂肪

收稿日期: 2017-06-18

基金项目: 国家自然科学基金(31360216)和功能有机小分子教育部重点实验室开放课题(KLFS-KF-201226)资助项目.

作者简介: 彭 仁(1972-),男,江西丰城人,教授,博士,主要从事生物催化和生物转化研究. E-mail: renpeng@jxnu.edu.cn

酶 AK 和猪胰脂肪酶) 10 mg, 然后在温度为 40 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行反应 60 min, 取样进行产物分析。

1.2.2 不同反应时间对合成澳栗精胺衍生物的影响 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和 Lipozyme RM IM 10 mg, 然后在温度为 40 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行反应。反应时间分别为 5, 10, 15, 20, 60 和 120 min, 取样进行产物分析。

1.2.3 不同种类的反应介质对合成澳栗精胺衍生物的影响 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入不同种类的反应介质(四氢呋喃、乙腈、丙酮、正丁醇和 1,4-二氧六环) 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和 Lipozyme RM 10 mg, 然后在温度为 40 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行反应 60 min, 取样进行产物分析。

1.2.4 不同的反应温度对合成澳栗精胺衍生物的影响 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和 Lipozyme RM IM 10 mg, 然后在温度分别为 20, 30, 40, 50 和 60 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行反应 60 min, 取样进行产物分析。

1.2.5 不同的酶量对合成澳栗精胺衍生物的影响 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和不同酶量的 Lipozyme RM IM (2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 和 30.0 mg), 然后在温度为 30 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行反应 60 min, 取样进行产物分析。

1.2.6 固定化酶 Lipozyme RM IM 合成澳栗精胺衍生物的重复利用性 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol、4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑 0.001 mmol 和 Lipozyme RM IM 5 mg, 然后在温度为 30 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行合成反应 60 min。反应后将 Lipozyme RM IM 从反应混合物中分离, 用四氢呋喃洗涤, 然后用于下一轮反应。

1.2.7 6-O-丁酰澳栗精胺的纯化 在 10 mL 的具塞锥形瓶中分别加入四氢呋喃 4 mL、澳栗精胺 0.004 mmol、丁酸乙烯酯 0.040 mmol 和 Lipozyme

RM IM 5 mg, 然后在温度为 30 ℃、转速为 160 r · min⁻¹ 的摇床中进行合成反应 60 min。反应结束后, 通过过滤除去 Lipozyme RM IM, 滤液进行真空浓缩。浓缩液用半制备型高压液相色谱(Chromolith SemiPrep RP-18 endcapped 100-10 mm HPLC 柱)进行纯化, 其中用水(0.1% 甲酸)/乙腈(0.1% 甲酸)作为流动相。收集含有 6-O-丁酰澳栗精胺的洗脱液, 然后进行真空浓缩。纯化的 6-O-丁酰澳栗精胺用分析型 HPLC 进行表征。

1.2.8 澳栗精胺转化率和 6-O-丁酰澳栗精胺产率的测定 澳栗精胺和丁酸乙烯酯反应形成乙醛, 然后乙醛和 4-胍基-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂二唑反应形成一种荧光物质, 因此澳栗精胺转化率的大小用荧光物质在 535 nm 处的荧光强度来间接表示。使用 Applied Biosystems API4000 来测定 6-O-丁酰澳栗精胺产率。采用 Chromolith FastGradient RP-18 endcapped 50-2 mm HPLC 柱, 流动相为 H₂O (0.1% HCOOH) 和 ACN (0.1% HCOOH) 的混合物。洗脱程序见表 1。

表 1 分析型 HPLC 洗脱程序

洗脱时间/ min	流速/ (mL · min ⁻¹)	H ₂ O (0.1% HCOOH) / %	ACN (0.1% HCOOH) / %
0 ~ 0.40	1.5	90	10
0.40 ~ 1.10	1.0	10	90
1.10 ~ 1.15	1.0	10	90
1.15 ~ 1.50	1.5	90	10

2 结果与讨论

2.1 不同种类的脂肪酶对合成澳栗精胺衍生物的影响

不同种类的脂肪酶对合成澳栗精胺衍生物的影响见图 1。结果表明 Lipozyme RM IM 催化产物的荧光强度最高, 因而是合成澳栗精胺衍生物的最佳用酶。Novozyme 435 催化产物的荧光强度接近于 Lipozyme RM IM 催化产物的荧光强度。Lipozyme RM IM 和 Novozyme 435 都是固定化脂肪酶。Lipozyme RM IM 是将酶蛋白固定于一种大孔阴离子交换树脂, 而 Novozyme 435 是将酶蛋白吸附在大孔丙烯酸树脂制备而成。这 2 种固定化酶已被成功地用于酯的合成^[24-25]。在本研究中, 这 2 种固定化酶也有良好的催化效果。

2.2 不同反应时间对合成澳栗精胺衍生物的影响

不同反应时间对合成澳栗精胺衍生物的影响见图 2。结果表明合成澳栗精胺衍生物的最佳反应时间为 60 min。超过 60 min 后, 产物的荧光强度变化

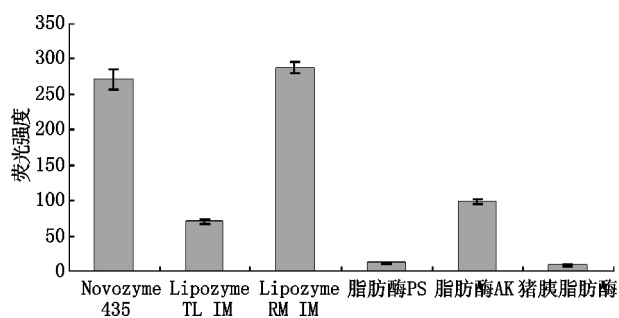


图1 不同种类的脂肪酶对合成澳栗精胺衍生物的影响不大,说明澳栗精胺衍生物的合成和分解基本达到平衡. A. L. Margolin 等^[20]在吡啶中用枯草杆菌蛋白酶催化合成 6-O-丁酰澳栗精胺和 7-O-丁酰澳栗精胺,所用的反应时间为 4 d. 因此用 Lipozyme RM IM 催化合成澳栗精胺衍生物是一种快速的方法.

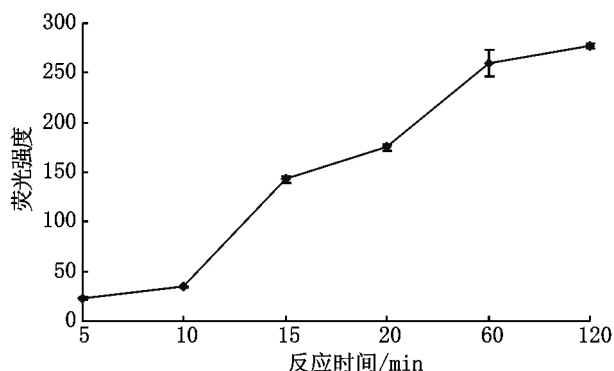


图2 不同反应时间对合成澳栗精胺衍生物的影响

2.3 不同种类的反应介质对合成澳栗精胺衍生物的影响

不同种类的反应介质对合成澳栗精胺衍生物的影响见图3. 结果表明四氢呋喃是最适反应介质. 然而当以丙酮作为反应介质时,产物的荧光强度最低,仅为6.7. 这是因为丙酮极大地影响了脂肪酶的构象,降低了脂肪酶的活性^[26]. 此外,澳栗精胺在不同的反应介质中溶解度也不同.

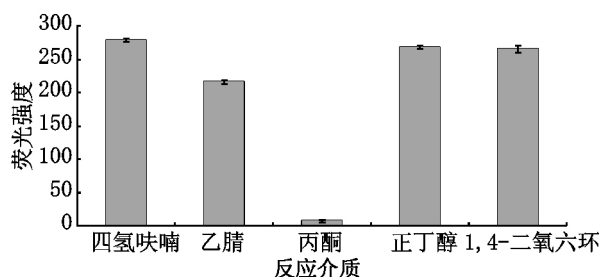


图3 不同种类的反应介质对合成澳栗精胺衍生物的影响

2.4 不同的反应温度对合成澳栗精胺衍生物的影响

不同的反应温度对合成澳栗精胺衍生物的影响见图4. 结果表明:当反应温度从 20 ℃ 提高到 30 ℃,

产物的荧光强度逐渐增加,但是当反应温度为 30 ~ 60 ℃ 时,产物的荧光强度基本不变. 从能耗的角度看,最佳的反应温度是 30 ℃. 一般来说,反应温度在两方面影响酶促反应. 一方面反应温度会影响底物或产物的粘度、疏水特性和扩散速度;另一方面反应温度影响酶的结构,从而影响酶的活性^[27].

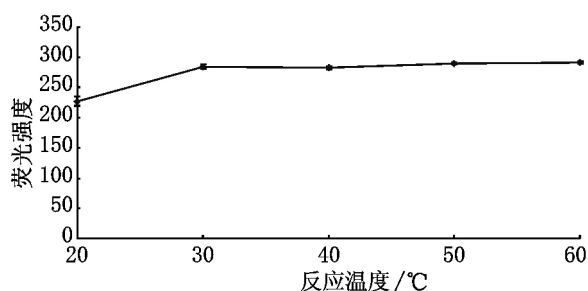


图4 不同的反应温度对合成澳栗精胺衍生物的影响

2.5 不同的酶量对合成澳栗精胺衍生物的影响

不同的酶量对合成澳栗精胺衍生物的影响见图5. 结果表明:当酶量从 2.5 mg 提高到 5.0 mg 时,产物的荧光强度随之增加. 这说明通过提高酶量,使更多的脂肪酶分子参与反应,从而提高了产物量^[28]. 然而当酶量超过 5.0 mg 时,产物的荧光强度基本不变,这可能由于酶的饱和造成的.

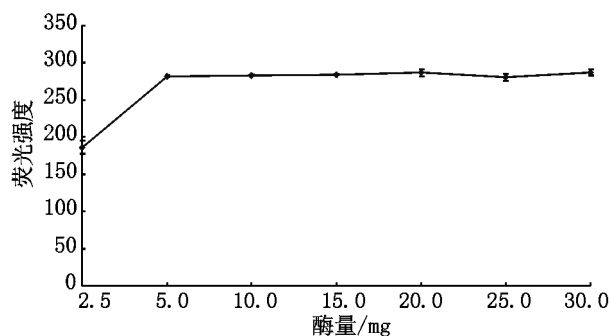


图5 不同的酶量对合成澳栗精胺衍生物的影响

2.6 固定化酶 Lipozyme RM IM 合成澳栗精胺衍生物的重复利用性

固定化酶的重复利用能节省产物制备成本,使酶法催化工艺在经济上可行^[29]. 图6表明固定化酶经过6轮重复利用,产物的荧光强度仅从 286.5 下降至 265.5. 这说明固定化酶 Lipozyme RM IM 合成澳栗精胺衍生物的重复利用性较好. 在另一个合成熊果苷酯的研究中,所使用的固定化脂肪酶在开始时活性剧烈下降,而从第5轮到第10轮,活性基本不变^[30].

2.7 6-O-丁酰澳栗精胺的纯化

根据上述优化条件, Lipozyme RM IM 在四氢呋喃中、30 ℃ 下催化反应 60 min 制备澳栗精胺衍生物.

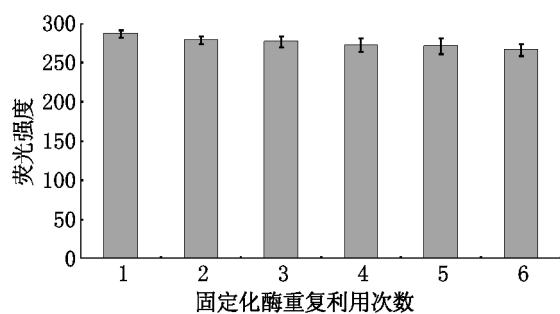


图6 固定化酶 Lipozyme RM IM 合成澳栗精胺衍生物的重复利用

物. 用分析型 HPLC 测得澳栗精胺的转化率为 84.3%。6-*O*-丁酰澳栗精胺的得率为 39.2%。用半制备型 HPLC 纯化了 6-*O*-丁酰澳栗精胺, 得到的产物与标准品在分析型 HPLC 中的保留时间相同, 均为 0.45 min。

3 参考文献

- [1] Hohenschutz L D, Liza D, Bell E A, et al. Castanospermine, A 1,6,7,8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid from seeds of *Castanospermum australe* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(6): 811-814.
- [2] Stevens K L, Molyneux R J. Castanospermine: a plant growth regulator [J]. *J Chem Ecol*, 1988, 14(6): 1467-1473.
- [3] Hong Yupu, Chen Chen, Guo Wenyi, et al. Effects of castanospermine on inflammatory response in a rat model of experimental severe acute pancreatitis [J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(6): 436-445.
- [4] Chang Jinhong, Guo Jutao, Du Yanming, et al. Imino sugar glucosidase inhibitors as broadly active anti-filovirus agents [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(e77): 1-7.
- [5] Chang Jinhong, Block T M, Guo Jutao. Antiviral therapies targeting host ER α -glucosidases: current status and future directions [J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(3): 251-260.
- [6] Hibberd A D, Trevillian P R, Clark D A, et al. The effects of Castanospermine, an oligosaccharide processing inhibitor, on mononuclear/endothelial cell binding and the expression of cell adhesion molecules [J]. *Transpl Immunol*, 2012, 27(1): 39-47.
- [7] Yee C S, Schwab E D, Lehr J E, et al. The effect of castanospermine on the metastatic properties of prostate cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(5A): 3659-3663.
- [8] Delinck D L, Margolin A L. Enzyme-catalyzed acylation of castanospermine and 1-deoxynojirimycin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31(22): 3093-3096.
- [9] Taylor D L, Sunkara P S, Liu P S, et al. 6-*O*-butanoylcastanospermine (MDL 28,574) inhibits glycoprotein processing and the growth of HIVs [J]. *AIDS*, 1991, 5(6): 693-698.
- [10] Taylor D L, Kang M S, Brennan T M, et al. Inhibition of α -glucosidase I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-*O*-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(8): 1780-1787.
- [11] Whitby K, Pierson T C, Geiss B, et al. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo [J]. *J Virol*, 2005, 79(14): 8698-8706.
- [12] Rathore A P, Paradkar P N, Watanabe S, et al. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model [J]. *Antiviral Res*, 2011, 92(3): 453-460.
- [13] Whitby K, Taylor D, Patel D, et al. Action of celgosivir (6-*O*-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVDV: implications for the treatment of hepatitis C [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2004, 15(3): 141-151.
- [14] Brás N F, Cerqueira N M, Ramos M J, et al. Glycosidase inhibitors: a patent review (2008-2013) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24(8): 857-874.
- [15] Ruprecht R M, Bernard L D, Bronson R, et al. Castanospermine vs. its 6-*O*-butanoyl analog: a comparison of toxicity and antiviral activity in vitro and in vivo [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1991, 4(1): 48-55.
- [16] Durantel D. Celgosivir, an α -glucosidase I inhibitor for the potential treatment of HCV infection [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(8): 860-870.
- [17] González-Sabín J, Morán-Ramallal R, Rebolledo F. Regioselective enzymatic acylation of complex natural products: expanding molecular diversity [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(11): 5321-5335.
- [18] Liu P S, Hoekstra W J, Kinga C H R. Synthesis of potent anti-HIV agents: Esters of castanospermine [J]. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31(20): 2829-2832.
- [19] Anderson W K, Coburn R A, Gopalsamy A, et al. A facile selective acylation of castanospermine [J]. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31(2): 169-170.
- [20] Margolin A L, Delinck D L, Whalon M R. Enzyme-catalyzed regioselective acylation of castanospermine [J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 112(8): 2849-2854.
- [21] 李迅, 邓若冰, 段成元, 等. 复合脂肪酶协同催化制备生物柴油的研究 [J]. *微生物学通报*, 2016, 43(3): 471-478.
- [22] Simoes T, Valero F, Tecelao C, et al. Production of human

- milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase and commercial lipases [J]. J Am Oil Chem Soc 2014 ,91(3) : 411-419.
- [23] 张之建,李鸣海,张耀华,等. 脂肪酶 Novozyme435 手性拆分(*R*/*S*)-扁桃酸 [J]. 国外医药: 抗生素分册 2016 , 37(2) : 81-83.
- [24] 胡蒋宁,张超,邓泽元,等. Lipozyme RM IM 脂肪酶催化苦瓜籽油和癸酸合成功能性油脂 [J]. 食品科学 , 2011 ,32(24) : 92-97.
- [25] 祝雨筱,王盈盈,金青哲,等. 酶法合成 1,2-甘油二酯的工艺研究 [J]. 中国油脂 2017 ,42(1) : 56-59.
- [26] Jiang Liyan ,Xie Xiaona ,Yue Hong ,et al. Highly efficient and regioselective acylation of arbutin catalyzed by lipase from *Candida* sp [J]. Process Biochem ,2015 ,50(5) : 789-792.
- [27] Phillips R S. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation [J]. Trends Biotechnol ,1996 ,14(1) : 13-16.
- [28] Zhang Hong ,Wang Zhi ,Wang Chunyu ,et al. A new method for the enamination of 1,3-dicarbonyl compounds catalyzed by laccase in water [J]. RSC Adv 2014 ,4: 19512-19515.
- [29] Peng Ren ,Lin Jinping ,Wei Dongzhi. Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase [J]. Appl Biochem Biotechnol 2011 ,165(3) : 926-937.
- [30] Yang Rongling ,Li Ning ,Li Rifeng ,et al. A highly regioselective route to arbutin esters by immobilized lipase from *Penicillium expansum* [J]. Bioresource Technol 2010 ,101(1) : 1-5.

The Enzymatic Synthesis of Castanospermine Derivatives

PENG Ren ,YAO Qingwen ,HONG Binwen

(College of Life Science ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: Castanospermine holds potential in the regulation of plant growth and the treatment of inflammatory disorder ,viral infection ,immunosuppressive deficiency and tumor metastasis. Some derivatives of castanospermine are more active than castanospermine itself in the inhibition of HIV and HCV. Enzymatic synthesis of castanospermine derivatives in organic solvent is studied by systematic trials of various parameters and 6-*O*-butanoyl castanospermine is purified. The synthesis of castanospermine derivatives by Lipozyme RM IM at 30 °C for 60 min in THF gives the best conditions ,in which conversion rate of castanospermine is 84.3% and yield rate of 6-*O*-butanoyl castanospermine is 39.2% . The purified 6-*O*-butanoyl castanospermine has the same retention time as the standard in HPLC.

Key words: castanospermine derivatives; lipase; enzymatic synthesis; HPLC

(责任编辑: 刘显亮)