

• 研究论文 •

非水介质中曲克芦丁乙烯酯的酶促合成

肖咏梅^{*,a} 栗俊田^a 毛璞^a 赵贞^a 林贤福^b

(^a河南工业大学化学化工学院 郑州 450001)

(^b浙江大学化学系 杭州 310027)

摘要 在非水介质中, 选择性催化曲克芦丁羟乙基上的伯羟基发生酯交换反应, 合成一系列曲克芦丁乙烯酯。同时考察了酶源、酶量、反应介质、酰化试剂链长、溶剂含水量、反应时间等因素对曲克芦丁酶促酯交换反应区域选择性的影响。结果表明: 以吡啶为溶剂, 其含水量<1%时, 枯草杆菌碱性蛋白酶催化活性最高, 随着酰基供体碳链的减少, 产率增大, 且反应达平衡的时间缩短。

关键词 曲克芦丁; 酶促合成; 区域选择性; 酯交换反应

Enzymatic Synthesis of Vinyl Troxerutin Esters in Nonaqueous Medium

Xiao, Yongmei^{*,a} Li, Juntian^a Mao, Pu^a Zhao, Zhen^a Lin, Xianfu^b

(^a College of Chemistry & Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001)

(^b Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Through regioselective acylation of the primary hydroxyl groups in troxerutin, a series of vinyl troxerutin esters were synthesized in nonaqueous medium. The influence parameters such as enzyme source, the amount of the enzyme, solvents, chain length of acyl donors, water content of solvents and reaction time were investigated. The results indicated that alkaline protease from *Bacillus subtilis* performed highest activity in pyridine with water content lower than 1%. As decreasing of the chain length of the acyl donor, the transesterification reached equilibrium more rapidly and yields were improved.

Keywords troxerutin; enzymatic synthesis; regioselective; transesterification

黄酮类化合物大量存在于植物中, 对哺乳动物和其它类型的细胞具有抗氧化、抗炎等重要的生理作用^[1]。由于部分黄酮类化合物的脂溶性或水溶性较差^[2], 致使生理活性的利用率受到很大限制^[3], 研究者通过对结构改性修饰, 以期增加其生理、药理活性。酶催化技术^[4]因操作条件温和、步骤简便、选择性高而成为天然化合物改性的研究热点^[5,6]。Danieli 等^[7]首次报道在 protease subtilisin 催化下, 黄酮类化合物(芦丁、橙皮苷、异槲皮素、槲皮素)与丁酸三氟乙酯的酯化反应; 近年来, Stevenson 等^[8]用 Novozym 435 催化合成了柚皮苷棕榈

酸酯; De Oliveira 等^[9]用分子模型研究 Novozym 435 催化芦丁和异槲皮素的酰化反应, Kazlauskas^[10]和 Braiuna 等^[11]应用计算机辅助研究酶催化的机理和反应的选择性, 给黄酮改性和酶分子改造提供了新的方法。曲克芦丁(troxerutin)是黄酮类重要衍生物之一, 具有降血脂、抗炎等药理活性。它的分子中含有羟基及糖基结构, 使其具有一定的亲水性和活泼的化学反应性。因此, 本文通过酶促酯交换反应对曲克芦丁进行结构优化, 把长碳链基团引入其中, 改变其亲水/疏水平衡。作为酰基供体的乙烯酯, 由于反应活性高而被广泛应用于酯交换反

* E-mail: henangongd@yahoo.com

Received August 6, 2009; revised October 29, 2009; accepted November 17, 2009.

河南省基础与前沿技术研究课题(No. 072300420070)、河南省科技攻关(No. 82102330014)资助项目。

应^[12]. 本文利用二乙烯酯作为酰化试剂与曲克芦丁反应得到的产物(Eq. 1), 含有仍可继续反应的乙烯酯基团, 可进一步作为高分子药物的单体或新型药物的前体. 同时本文考察了酶源、酰化试剂链长、反应介质、溶剂含水量、反应时间、底物/酰化试剂的物质的量比、酶量等因素对反应的影响.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

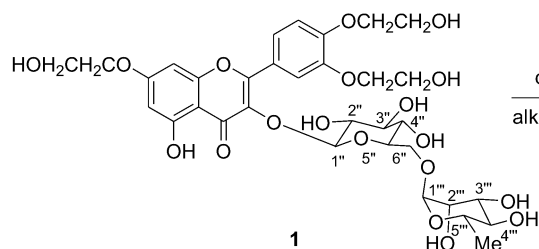
仪器: CHA-S 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); 真空泵(河南巩义市英谷予华仪器厂); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Varian INOVA-400MHz 核磁共振波谱仪(DMSO-*d*₆作溶剂, TMS作内标, 美国Varian公司); BS224S 赛多利斯电子天平(德国赛多利斯集团); LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Flash EA 1112 元素分析仪(美国热电集团); Esquire 6000 LC-MS (bruker).

试剂: 曲克芦丁(四川亚宝光太公司); 二酸二乙烯酯(纯度>98%, 实验室合成); Novozym 435 (Sigma 公司); 枯草杆菌碱性蛋白酶(BSAP, 无锡酶制剂厂); Lipase AY30(百灵威化学技术有限公司); Amano Lipase M (Aldrich 公司); 米曲霉蛋白酶(AOP, Fluka 公司); 猪胰脂肪酶(HPL, Fluka 公司); Lipozyme (Fluka 公司); 假丝酵母脂肪酶(CCL, Fluka 公司); 其它试剂均为分析纯.

1.2 曲克芦丁酯的酶促合成

在锥形瓶中加入一定量曲克芦丁, 分别加入二酸二乙烯酯, 吡啶作溶剂, 加入酶之后, 放入 50 °C 恒温振荡器中反应, 转速 250 r·min⁻¹. 反应过程用薄层层析(TLC)定性检测[展开剂: V(乙酸乙酯): V(甲醇): V(水)=15:3.6:1], 碘显色. 反应结束后, 过滤酶, 减压蒸出吡啶. 柱色谱分离[洗脱剂: V(乙酸乙酯): V(甲醇): V(水)=15:3.6:0.5], 分别得到黄色固体产物 **2a**~**2f**.

乙烯丁二酰曲克芦丁酯(**2a**): 黄色粉末, 产率



divinyl dicarboxylates: $\text{H}_2\text{C}=\text{HCOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}=\text{CH}_2$ ($n = 2, 3, 4, 7, 8, 11$)

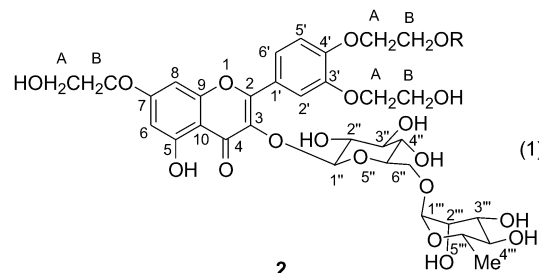
R: $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2a**); $\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2b**); $\text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2c**);

$\text{CO}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2d**); $\text{CO}(\text{CH}_2)_8\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2e**); $\text{CO}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOCH}=\text{CH}_2$ (**2f**)

59.2%, R_f 0.31; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.49 (s, 1H, OH⁵), 7.84 (s, 1H, H²), 7.77 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, H⁶), 7.21 (dd, $J=6.3, 14.0$ Hz, 1H, OCH=), 7.14 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, H⁵), 6.73 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.34 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, H^{1'}), 4.89~4.87 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.66~4.63 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.47~4.42 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32~4.29 (m, 1H, H^{1''}), 4.28~4.24 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.06 (m, 4H, H of A), 3.76~3.70 (m, 4H, H of B), 3.71~3.04 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.70~2.67 (m, 4H, CH₂-CH₂), 0.96 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3411 (OH), 1745 (C=O), 1646 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 891.2 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₃₉H₄₈O₂₂: C 53.92, H 5.57; found C 53.27, H 5.61.

乙烯戊二酰曲克芦丁酯(**2b**): 黄色粉末, 产率 57.9%, R_f 0.32; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.49 (s, 1H, OH⁵), 7.85 (s, 1H, H²), 7.74 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, H⁶), 7.22 (dd, $J=6.4, 14.1$ Hz, 1H, OCH=), 7.17 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, H⁵), 6.75 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.35 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, H^{1'}), 4.90~4.45 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.66~4.64 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.49~4.89 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32~4.31 (m, 1H, H^{1''}), 4.27~4.26 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.05 (m, 4H, H of A), 3.78~3.73 (m, 4H, H of B), 3.71~3.04 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.48~2.46 (m, 2H, CH₂COOCH=CH₂), 2.27~2.25 (m, 2H, CH₂COO-troloxerutin), 1.84~1.77 (m, 4H, other CH₂ of glutaridoyl part), 0.97 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3385 (OH), 1732 (C=O), 1645 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 905.1 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₀H₅₀O₂₂: C 54.42, H 5.71; found C 53.29, H 5.73.

乙烯己二酰曲克芦丁酯(**2c**): 黄色粉末, 产率 18.5%, R_f 0.32; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.49 (s, 1H, OH⁵), 7.84 (s, 1H, H²), 7.73 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, H⁶), 7.20 (dd, $J=6.2, 14.1$ Hz, 1H, OCH=), 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1H,



H⁵), 6.73 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.34 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, H^{1''}), 4.90~4.88 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.64~4.63 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.40~4.39 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32~4.30 (m, 1H, H^{1'''}), 4.27~4.25 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.06 (m, 4H, H of A), 3.76~3.71 (m, 4H, H of B), 3.71~3.06 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.46~2.43 (m, 2H, CH₂COOCH=CH₂), 2.39~2.37 (m, 2H, CH₂COO-troloxerutin), 1.59~1.56 (m, 4H, other CH₂ of hexanedioyl part), 0.99 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3412 (OH), 1726 (C=O), 1648 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 919.1 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₁H₅₂O₂₂: C 54.91, H 5.84; found C 54.70, H 5.89.

乙烯壬二酰曲克芦丁酯(2d): 黄色粉末, 产率 16.8%, R_f 0.33; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.50 (s, 1H, OH⁵), 7.85 (s, 1H, H²), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H⁶), 7.21 (dd, $J=6.0, 13.8$ Hz, 1H, OCH=), 7.15 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H⁵), 6.75 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.41 (d, $J=10.0$ Hz, 1H, H^{1''}), 4.91~4.90 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.62~4.25 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.41 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32 (m, 1H, H^{1'''}), 4.26 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.06 (m, 4H, H of A), 3.75 (m, 4H, H of B), 3.71~3.00 (m, 10H, H of rhamno-glucosyl), 2.39 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂COOCH=CH₂), 2.34 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂COO-troloxerutin), 1.52~1.25 (m, 10H, other CH₂ of nonoanedioyl part), 0.99 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3377 (OH), 1735 (C=O), 1647 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 961.3 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₄H₅₈O₂₂: C 56.29, H 6.23; found C 56.11, H 6.36.

乙烯癸二酰曲克芦丁酯(2e): 黄色粉末, 产率 16.5%, R_f 0.33; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.49 (s, 1H, OH⁵), 7.84 (s, 1H, H²), 7.72 (d, $J=7.0$ Hz, 1H, H⁶), 7.20 (dd, $J=6.2, 14.0$ Hz, 1H, OCH=), 7.14 (d, $J=7.4$ Hz, 1H, H⁵), 6.73 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.34 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, H^{1''}), 4.90~4.89 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.64~4.63 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.42~4.37 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.31~4.30 (m, 1H, H^{1'''}), 4.27~4.25 (m, 1H, H of B acylated), 4.12~4.06 (m, 4H, H of A), 3.74 (m, 4H, H of B), 3.71~3.08 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.40 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂COOCH=CH₂), 2.33 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, CH₂COO-troloxerutin), 1.58~1.22 (m, 12H, other CH₂ of decanedioyl part), 0.99 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3410 (OH), 1728 (C=O), 1649 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 975.2 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₅H₆₀O₂₂: C 56.72, H 6.35; found C 56.29, H 6.49.

56.29, H 6.49.

乙烯十三烷二酰曲克芦丁酯(2f): 黄色粉末, 产率 10.6%, R_f 0.34; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.50 (s, 1H, OH⁵), 7.85 (s, 1H, H²), 7.74 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, H⁶), 7.22 (dd, $J=6.2, 14.0$ Hz, 1H, OCH=), 7.15 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H⁵), 6.75 (s, 1H, H⁸), 6.38 (s, 1H, H⁶), 5.38 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, H^{1''}), 4.93~4.92 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.60~4.59 (m, 1H, OCH=CH₂), 4.44~4.41 (m, 3H, 2H of A acylated, 1H of B acylated), 4.32~4.31 (m, 1H, H^{1'''}), 4.27~4.25 (m, 1H, H of B acylated), 4.13~4.06 (m, 4H, H of A), 3.78~3.73 (m, 4H, H of B), 3.70~3.04 (m, 10H, H of rhamnoglucosyl), 2.42~2.40 (m, 2H, CH₂COOCH=CH₂), 2.34~2.32 (m, 2H, CH₂COO-troloxerutin), 1.52~1.21 (m, 18H, other CH₂ of tridecanoyl part), 0.96 (d, $J=6.2$ Hz, 3H, CH₃ of rhamnosyl); IR (KBr) ν : 3392 (OH), 1735 (C=O), 1647 (C=C) cm⁻¹; ESI-MS m/z : 1017.3 (M+Na)⁺. Anal. calcd for C₄₈H₆₆O₂₂: C 57.94, H 6.69; found C 57.78, H 6.77.

2 结果与讨论

2.1 曲克芦丁乙烯酯的酶促合成

产物的薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)分析结果表明是单一组分. 在曲克芦丁(1)中含三种不同类型的羟基: 一个酚羟基、三个伯羟基和六个糖环上的仲羟基. 以乙烯戊二酰-曲克芦丁(2b)为例, 在¹H NMR中, δ 12.49 是酚羟基的氢, δ 3.71~3.04 是糖环上的氢; δ 7.22, 4.89, 4.65 是乙烯基的三个氢, δ 2.47, 2.26, 1.80 是乙烯戊二酰烷基的氢. 根据反应产物中酰基部分 H 数与曲克芦丁 H 数的比例表明产物是单取代的, ESI-MS 数据同时也说明了产物是单酯. 从表 1 的碳谱数据看出, 曲克芦丁发生酰化前后, 酚羟基和糖环上碳的化学位移没有明显改变, 但在三个羟乙基中, 一个 A 碳的化学位移从 δ 70.8 移至 67.4, 同时一个 B 碳的化学位移从 δ 60.0 低移至 62.9. 根据大量的碳谱数据建立的酰化反应前后碳原子化学位移的变化规律^[13]: 发生酰化反应的碳原子的化学位移向低场移动, 受其影响, 相邻碳原子的化学位移向高场移动; ¹³C NMR 分析的结果说明取代发生在羟乙基的伯羟基上. 从¹H NMR, ¹³C NMR 和质谱数据得出, 合成的 6 种产物都是在羟乙基 CH₂CH₂OH 上单取代的酰化产物.

2.2 酶源的影响

酶的活性根据来源的不同差别很大, 并且溶剂、底物等多个因素也会影响酶的活性^[14]. 我们选择枯草杆

表1 曲克芦丁及产物的¹³C NMR的部分化学位移(δ , DMSO-*d*₆)
Table 1 Part of chemical shifts of ¹³C NMR of troxerutin and its derivatives (δ , DMSO-*d*₆)

Carbon number	Troxerutin	2a	2b	2c	2d	2e	2f
C-5	157.0	157.0	156.9	157.0	156.9	156.9	156.9
C-3"	76.8	76.8	76.8	76.9	76.8	76.8	76.8
C-2"	74.6	74.6	74.6	74.7	74.6	74.6	74.6
C-4	72.2	72.2	72.1	72.3	72.1	72.2	72.2
C-3'''	71.1	71.1	71.0	71.2	71.0	71.1	71.0
C-2'''	71.1	71.1	71.0	71.1	71.0	71.0	71.0
C-4"	71.0	70.8	70.9	71.0	70.9	70.9	70.9
C-A	70.8	70.8	70.8	70.9	70.8	70.8	70.8
C-A	70.8	67.2	67.4	67.4	67.4	67.3	67.4
C-A	70.7	70.6	70.6	70.7	70.6	70.6	70.6
C-6"	67.6	67.6	67.1	67.6	67.2	67.6	67.6
C-B	60.0	60.0	59.9	60.1	60.0	60.0	59.9
C-B	60.0	63.2	62.9	62.9	62.7	62.7	62.9
C-B	59.7	59.7	59.7	59.9	59.7	59.7	59.7
C=O		173.3	172.9	173.3	173.4	173.4	173.4
		170.0	170.5	170.9	170.8	170.9	170.9
OCH=CH ₂		141.6	141.6	141.8	141.6	141.7	141.7
OCH=CH ₂		98.6	98.6	98.6	98.4	98.4	98.4
(CH ₂) _n		28.8	33.4	33.6	33.8	33.9	33.8
		28.7	32.8	33.3	33.4	29.0	29.2
			32.5	24.3	24.8	24.8	24.8

菌碱性蛋白酶(BSAP), Novozym 435, Lipase AY30 等 8 种酶在吡啶中催化曲克芦丁与丁二酸二乙烯酯的反应, 测定 5 d 时的产率. 从图 1 看出, BSAP 显示了很好的催化活性, 产率达到 57.9%, 其次是 Novozym 435, 产率为 4.8%, 其它酶在反应中几乎没有活性. 因此本文在以后的各种影响因素研究中, 都选 BSAP 酶作催化剂.

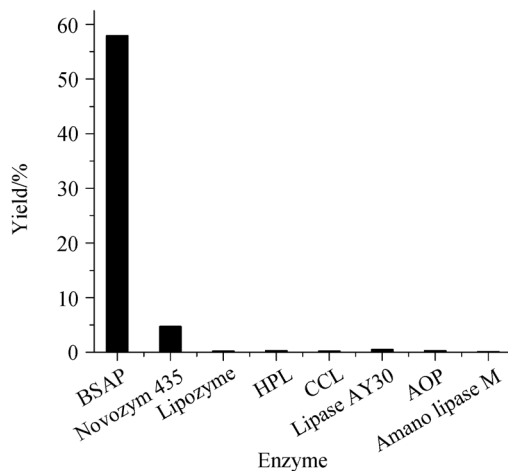


图1 不同酶催化曲克芦丁和戊二酸二乙烯酯的反应

Figure 1 Enzyme screen for transesterification of troxerutin and divinyl glutarate in pyridine

2.3 酶量的影响

我们考察了 5, 10, 20, 30, 50, 70 mg/mL 的酶量对反应的影响. 从图 2 看出, 加入的酶量超过 20 mg/mL 时, 产率明显提高. 酶量为 30 mg/mL, 反应仅需 58 h, 就能达平衡, 且产率达到 59.2%; 随着酶量进一步增大, 对产率的影响不显著. 故综合考虑催化效果和酶的价格, 最佳的酶量为 30 mg/mL.

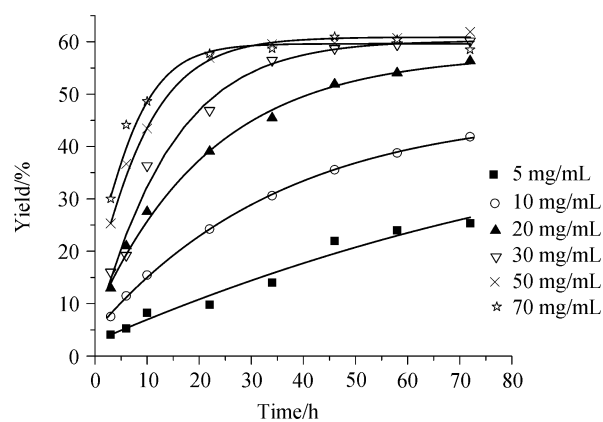


图2 酶量对吡啶中曲克芦丁与戊二酸二乙烯酯交换反应产率的影响

Figure 2 Effect of the amount of the enzyme on the transesterification of troxerutin and divinyl glutarate catalyzed by alkaline protease from *Bacillus subtilis* in pyridine

2.4 酰化试剂不同链长的影响

酰化供体的链长是酶促酯交换反应的主要影响因素之一。从图 3 看出, 不同碳链的二元酸二乙烯酯对曲克芦丁的酯交换反应的变化趋势为随着链长的增加, 产率随之下降。反应体系中所用的酶和酰化受体以及酰化供体不同时, 能表现出不同的规律^[15]。如 Vaysse^[16]和 Pedersen 等^[17]两个研究小组在酶促合成糖酯时发现, 碳链从 C₁₂ 增加到 C₁₈, 产率随之增加, 当碳数小于 12 时, 产率降低。有些研究结果表明中等链长的酰化供体(C₁₂ 到 C₁₄)反应最好^[18]。Otto 等^[19]认为酰化供体的疏水性越好, 越有利于酶与酰化试剂形成酶-底物复合物, 表现在随着链的增长, 其反应的转化率越高。

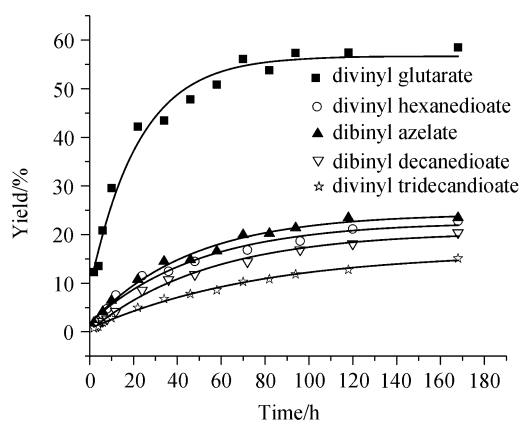


图 3 酰化供体链长对曲克芦丁酯交换反应产率的影响

Figure 3 Effect of acyl donor chain length on the enzymatic acylation of troxerutin

2.5 溶剂的影响

理想的溶剂不仅要保持酶的活力, 而且能增加底物的溶解性^[20]。我们选用对底物溶解性好的吡啶、DMF 和 DMSO 进行研究。由图 4(a)可以看出, 在吡啶中, 反应产率最高, 而在 DMF 和 DMSO 中效果较差。当吡啶与 DMF 的混合溶剂体积比为 8 : 2 时, 产率与纯吡啶为溶剂时相近。DMF 是万能溶剂, 因此, 我们考察了吡啶和 DMF 不同配比的混合溶剂, 从图 4(b)可以看出, 随着 DMF 所占比例的增大, 乙烯壬二酰曲克芦丁酯的产率逐渐降低。

2.6 溶剂含水量的影响

水可以作为放松未折叠和重复折叠酶分子的润滑剂, 使蛋白舒展, 活性部位暴露出来^[21], 溶剂中的水量应该适当, 才能确保酶的高催化活性。结果从图 5 看出当水含量为 0 和 1% 时, 反应的初始速率较小, 产量随着时间的延长而增加。在含水量较大的情况下, 枯草杆菌碱性蛋白酶作为一种水解酶, 导致了二酸二乙烯酯和已生成的曲克芦丁乙酯水解, 曲克芦丁乙酯产率呈明

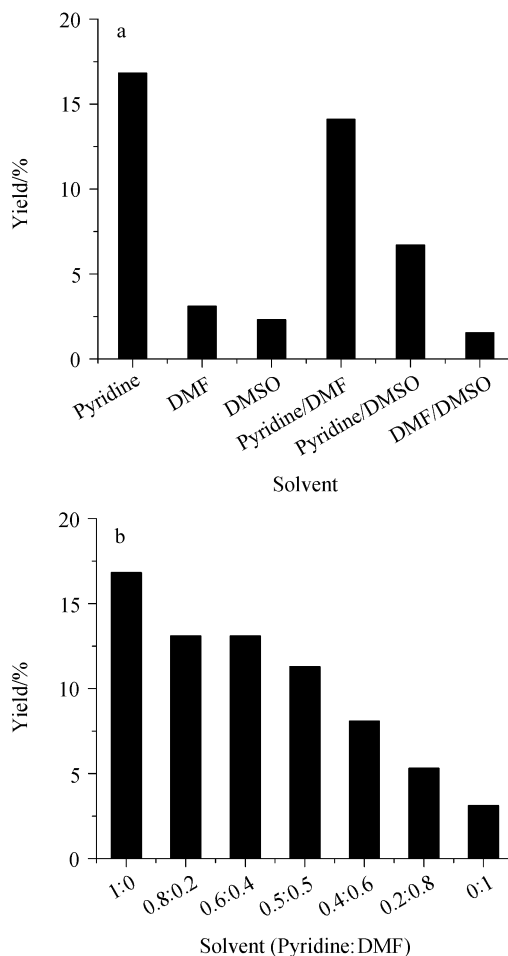


图 4 (a)不同溶剂对及配比对曲克芦丁与壬二酸二乙烯酯反应产率的影响; (b)吡啶与 DMF 不同配比对曲克芦丁与壬二酸二乙烯酯反应产率的影响

Figure 4 (a) Effect of solvent on the transesterification of troxerutin and divinyll azelate; (b) Effect of the ratio of pyridine and DMF on the transesterification reaction

显下降趋势。所以, 溶剂的含水量不应超过 1%。

2.7 反应时间的影响

我们考察了 6 种不同链长的酰化供体在不同时间内产率的变化。从图 6 看出, 最短链长的丁二酸二乙烯酯作酰化供体时, 反应速率最快, 13 h 产率就达 59%。随着酰化供体链长的增加, 在同一时间内, 反应产率呈下降趋势。值得注意的是在丁二酸二乙烯酯的反应过程中, 我们观察到, 单酯产物浓度增大到最大值后, 时间进一步延长, 将导致单酯含量的大幅下降。这是因为单酯与过量酰化供体反应, 进一步生成二酯的缘故。反应达到平衡的时间受酰基供体的影响而不同, 随着链长的增加, 达到平衡所需要的时间增加。

2.8 酰化供体/酰化受体摩尔比的影响

酯交换反应是一平衡反应。从图 7 明显看出, 二酸

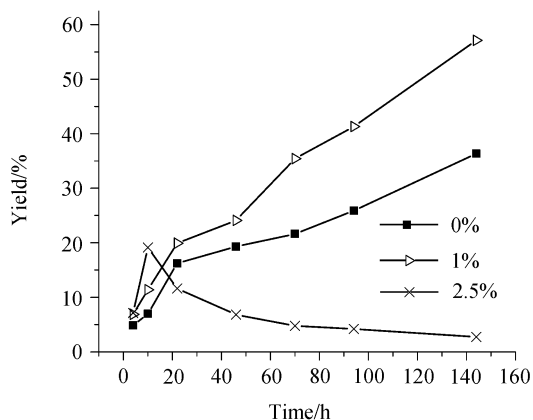


图5 吡啶中水含量对酶催化曲克芦丁与戊二酸二乙烯酯反应产率的影响

Figure 5 Effect of water content in pyridine on the yield of transesterification of troxerutin and divinyl glutarate catalyzed by alkaline protease from *Bacillus subtilis*

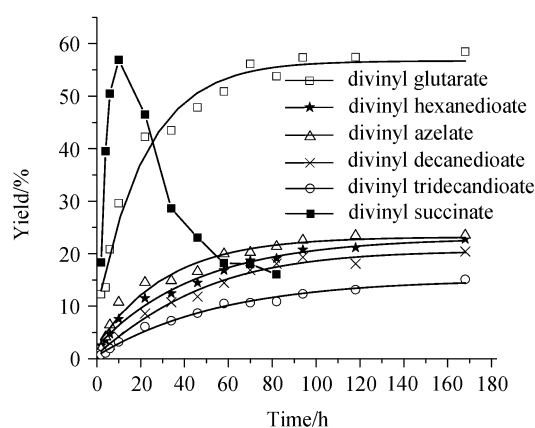


图6 反应时间对二酸二乙烯酯与曲克芦丁反应产率的影响

Figure 6 Effect of reactive time on the enzymatic acylation of troxerutin

二乙烯酯/曲克芦丁的物质的量的比增大, 反应产率增大, 达到6/1时, 产率增加逐渐趋于平缓. 这是因为物质的量的比对于反应的影响通常是通过改变平衡来实现的^[22]. 增加酰化供体浓度, 可以提高反应速率, 获得更高的产率. 另一方面, 两种反应物物质的量比增大可能也会影响反应体系的极性, 影响底物在酶催化中心附近的分布, 从而影响酶促反应的速率和产率.

3 结论

本文以6种具有不同链长的二酸二乙烯酯作为酰基供体, 在吡啶中用枯草杆菌碱性蛋白酶作催化剂, 合成了曲克芦丁羟乙基上单取代的乙烯酯衍生物; 同时考察了不同酶源、反应溶剂对反应产率、选择性的影响. 在

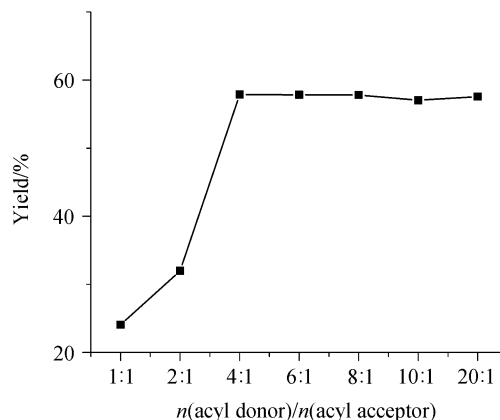


图7 戊二酸二乙烯酯与曲克芦丁的物质的量比对酯交换反应产率的影响

Figure 7 Effect of molar ratio of divinyl glutarate to troxerutin on transesterification

反应最佳条件 50 °C下, 溶剂含水量<1%, 曲克芦丁/酰化试剂物质的量的比为 1 : 4, 枯草杆菌碱性蛋白酶的用量 30 mg/mL 时, 丁二酸二乙烯酯作酰化供体时, 最高产率为 59.2%. 随着酰化供体碳链的增长, 反应产率下降, 达到反应平衡的时间延长.

References

- 1 Bandele, O. J.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6097.
- 2 Kongogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 59.
- 3 Patti, A.; Piattelli, M.; Nicolosi, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 577.
- 4 Zeng, J.-Q.; Zhang, Y.-M.; Liu, L.-M.; Zhang, J.-C. *Chin. J. Org. Chem.* **2000**, *20*, 195 (in Chinese).
(曾健青, 张耀谋, 刘莉玫, 张镜澄, 有机化学, **2000**, *20*, 195.)
- 5 Li, Z.-Y.; Liu, J.-J. *Chin. J. Org. Chem.* **1999**, *19*, 121 (in Chinese).
(李祖义, 刘俊杰, 有机化学, **1999**, *19*, 121.)
- 6 Wang, H.-Y.; Li, C.; Wang, N.; Li, K.; Feng, X.-W.; He, T.; Yu, X.-Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1905.
- 7 Danieli, B.; Bellis, P. D.; Carrea, G.; Riva, S. *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1837.
- 8 Stevenson, D. E.; Wibisono, R.; Jensen, D. J.; Stanley, R. A.; Cooney, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1236.
- 9 De Oliveira E. B.; Humeau, C.; Chebil, L.; Maia, E. R.; Dehez, F.; Maigret, B.; Ghoul, M.; Engasser, J.-M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 96.
- 10 Kazlauskas, R. *J. Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 81.
- 11 Braiuca, P.; Ebert, C.; Basso, A.; Linda, P.; Gardossi, L. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 419.
- 12 Li, C.; Wang, H.-Y.; Wang, N.; Fang, Y.-G.; Chen, X.; Yu, X.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6687.

- 13 Yoshimoto, K.; Itatani, Y.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 2065.
- 14 Chang, S.-W.; Yang, C.-J.; Chen, F.-Y.; Akoh, C. C.; Shieh, C.-J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 56, 7.
- 15 Ardhaoui, M.; Falcimaigne, A.; Engasser, J.-M.; Moussou, P.; Pauly, G.; Ghoul, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 29, 63.
- 16 Vaysse, L.; Ly, A.; Moulin, G.; Dubreucq, E. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 31, 648.
- 17 Pedersen, N. R.; Wimmer, R.; Emmersen, J.; Degn, P.; Pedersen, L. H. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 1179.
- 18 Sin, Y. M.; Cho, K. W.; Lee, T. H. *Biotechnol. Lett.* **1998**, 20, 91.
- 19 Otto, R. T.; Scheib, H.; Bornscheuer, U. T.; Pleiss, J.; Syldatk, C.; Schmid, R. D. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 8, 201.
- 20 Wu, Q.; Wang, M.; Chen, Z.-C.; Lu, D.-S.; Lin, X.-F. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 1258.
- 21 Duan, Y.; Du, Z.-L.; Yao, Y.-Y.; Li, R.-X.; Wu, D.-C. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6219.
- 22 Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H. *J. Biotechnol.* **2005**, 116, 295.

(Y0908063 Qin, X.; Lu, Z.)