



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114350737 B

(45) 授权公告日 2023.09.15

(21) 申请号 202210041687.8

CN 1966711 A, 2007.05.23

(22) 申请日 2022.01.14

US 2003044885 A1, 2003.03.06

CN 107602652 A, 2018.01.19

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114350737 A

Chahines Aouf et al. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. Green Chemistry. 2014, 全文.

(43) 申请公布日 2022.04.15

(73) 专利权人 台州仙琚药业有限公司

地址 317016 浙江省台州市化学原料药基地临海区块

Cecilia et al. Lipase mediated simultaneous esterification and epoxidation of oleic acid for the production of alkylepoxystearates. Biotechnology. 2006, 全文.

(72) 发明人 于旭超 金旦妮 隋志红

(74) 专利代理机构 台州市南方商标专利代理有限公司 33225

专利代理师 白家驹

Nighat Sultana. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation. 《Steroids》. 2018, 第136卷 全文. (续)

(51) Int. Cl.

C12P 33/20 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2019127772 A1, 2019.05.02

CN 108048212 A, 2018.05.18

CN 109735582 A, 2019.05.10

CN 110063360 A, 2019.07.30

CN 101250565 A, 2008.08.27

审查员 谭小飞

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

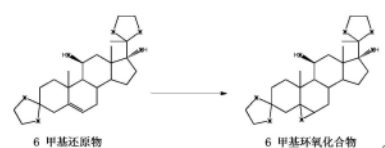
(54) 发明名称

5 α , 6 α -环氧-11 β , 17 α -二羟基孕甾-3, 20-二乙二醇缩酮的制备方法

(57) 摘要

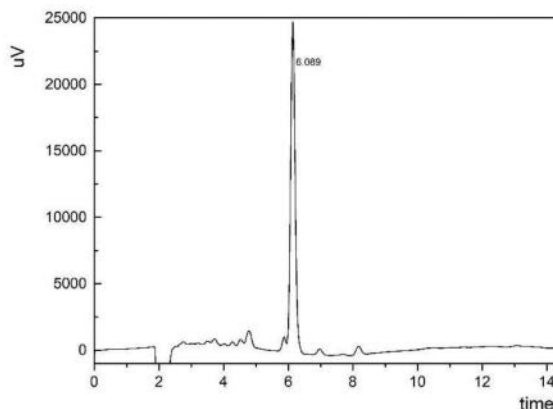
本发明公开了一种5 α , 6 α -环氧-11 β , 17 α -二羟基孕甾-3, 20-二乙二醇缩酮的制备方法, 以缓冲液或者纯水作为反应体系, 加入底物6-甲基还原物、氧供体以及氧载体, 使用脂肪酶进行生物催化合成反应; 反应结束后, 将反应物分离、纯化得到产物6-甲基环氧化合物即为5 α , 6 α -环氧-11 β , 17 α -二羟基孕甾-3, 20-二乙二醇缩酮, 反应式如下

CN 114350737 B



本发明使用酶法

生物催化合成6-甲基环氧化合物, 可以避免化学合成对环境带来的不利影响, 且酶法可原位合成用于环氧反应的过氧酸, 可避免化学合成过程中双氧水添加存在的风险。



[转续页]

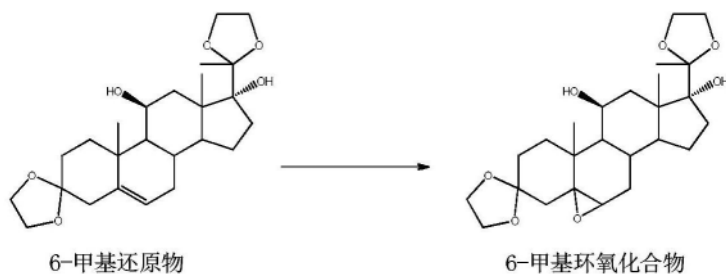
[接上页]

(56) 对比文件

应明华等. 6 β -甲基泼尼松龙的合成.《中国现代应用药学》.2018,第35卷(第8期),全文.

周鹏飞. 酯酶/脂肪酶在天然低共熔溶剂中催化环氧化反应的研究.《中国博士学位论文全文数据库工程科技I辑》.2018,(第06期),全文.

1. 一种5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,以缓冲液或者纯水作为反应体系,加入底物6-甲基还原物、氧供体以及氧载体,使用脂肪酶进行生物催化合成反应,所述脂肪酶的用量以底物质量百分比计2.5%-17.5%,所述反应温度为15℃-45℃,所述脂肪酶为生物柴油NS81006和脂肪酶LIPF中的一种;反应结束后,将反应物分离、纯化得到产物6-甲基环氧化合物即为5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮,反应式如下



2. 根据权利要求1所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,反应结束后,反应液在4℃、4000rpm离心,砂芯漏斗抽滤得滤饼,滤饼经有机溶剂乙酸乙酯洗涤提纯至检测纯度为97%,60℃真空干燥至恒重。

3. 如权利要求2所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,所述缓冲液为磷酸钠缓冲液、乙酸钠缓冲液和柠檬酸钠缓冲液中的一种。

4. 如权利要求3所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,所述脂肪酶为LIPF。

5. 如权利要求1所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,所述氧供体为H₂O₂,氧供体与底物的摩尔比为1:2-1:8。

6. 如权利要求1所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,所述氧载体为乙酸乙酯、丙酮、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、癸酸、柠檬酸和棕榈酸中的一种或一种以上的混合物;所述氧载体与底物的摩尔比为1:2-1:5。

7. 如权利要求1所述的5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,其特征在于,还在所述反应体系中添加助溶剂,所述助溶剂为疏水溶剂和/或亲水溶剂;所述疏水溶剂为正己烷、四氢呋喃、丙酮、甲苯和乙酸乙酯中的一种或一种以上的混合物,所述亲水溶剂为乙醇、异丙醇、乙腈和甲醇中的一种或一种以上的混合物。

5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法

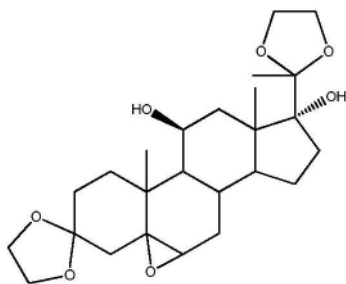
技术领域

[0001] 本发明涉及一种5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,属于生物催化领域。

背景技术

[0002] 甲泼尼龙为中效合成品,属于内分泌系统药物中的肾上腺皮质激素类药,用于危重疾病的急救,还可用于内分泌失调、风湿性疾病、胶原性病、皮肤疾病、过敏反应、眼科疾病、胃肠道疾病、血液疾病、白血病、休克、脑水肿、多发性神经炎、脊髓炎及防止癌症化疗引起的呕吐等。专利CN 108912192公开了一种6 β -甲基泼尼松龙的合成方法,其中5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮为合成甲泼尼龙的中间体,5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮即为6-甲基环氧化合物,结构式如下

[0003]

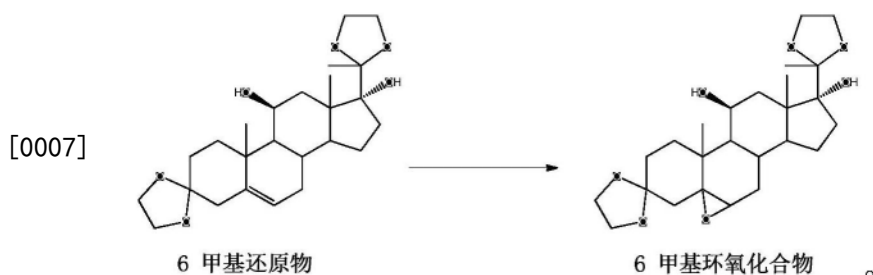


[0004] 目前,6-甲基环氧化合物的合成仅有化学法,具体可参见专利CN 107602652。这种方法在反应过程中会产生大量有毒的副产物,对环境有毒害作用,生产过程中具有一定的风险性。

发明内容

[0005] 本发明的目的是解决上述背景技术中提及的缺陷,利用生物催化的方法进行氧化反应,在相对温和的反应条件下制备所需的氧化产物,不会对环境造成很大的毒害作用。脂肪酶催化过程不需要依赖辅因子催化氧化反应,且原位生产过氧酸可解决过酸储存过程中的风险性。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明提供一种5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的制备方法,以缓冲液或者纯水作为反应体系,加入底物6-甲基还原物、氧供体以及氧载体,使用脂肪酶进行生物催化合成反应;反应结束后,将反应物分离、纯化得到产物6-甲基环氧化合物即为5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮,反应式如下



[0008] 进一步地,反应结束后,反应液在4℃、4000rpm离心,砂芯漏斗抽滤得滤饼,滤饼经有机溶剂乙酸乙酯洗涤提纯至检测纯度为97%,60℃真空干燥至恒重,其中提纯方法可采用有机溶剂萃取。

[0009] 进一步地,所述缓冲液为磷酸钠缓冲液、乙酸钠缓冲液和柠檬酸钠缓冲液中的一种。优选乙酸钠缓冲液。

[0010] 进一步地,所述脂肪酶为、固定化脂肪酶IM、生物柴油NS81006和脂肪酶LIPF中的一种。优选为脂肪酶LIPF。

[0011] 进一步地,所述脂肪酶的用量以底物质量百分比计2.5%-17.5%。优选7.5%。

[0012] 进一步地,所述反应温度为15℃-45℃。优选30℃。

[0013] 进一步地,所述氧供体为H₂O₂,氧供体与底物的摩尔比为1:2-1:8,优选1:8。

[0014] 进一步地,所述氧载体为乙酸乙酯、丙酮、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、癸酸、柠檬酸和棕榈酸中的一种或一种以上的混合物;优选为辛酸;所述氧载体与底物的摩尔比为1:2-1:5,优选1:5。

[0015] 进一步地,还在所述反应体系中添加助溶剂,所述助溶剂为疏水溶剂和/或亲水溶剂;所述疏水溶剂为正己烷、四氢呋喃、丙酮、甲苯和乙酸乙酯中的一种或一种以上的混合物,所述亲水溶剂为乙醇、异丙醇、乙腈和甲醇中的一种或一种以上的混合物。所述助溶剂优选为异丙醇(2.5%-10%,v/v)。

[0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0017] 使用酶法生物催化合成6-甲基环氧化合物,可以避免化学合成对环境带来的不利影响,且酶法可原位合成用于环氧反应的过氧酸,可避免化学合成过程中双氧水添加存在的风险。

附图说明

[0018] 图1是5α,6α-环氧-11β,17α-二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的对照品色谱图;

[0019] 图2是本发明一个实施例反应过程的色谱图。

具体实施方式

[0020] 下面结合附图和具体实施例,对本发明的技术方案做进一步说明。

[0021] 实施例1:

[0022] (1) 催化剂筛选:筛选市售固定化脂肪酶NOV 40086,生物柴油NS81006,Vland 8340,固定化脂肪酶IM,脂肪酶LIP F,分别进行催化环氧反应。

[0023] (2) 生物转化流程:催化环氧反应体系包含50mM底物6-甲基还原物,1M乙酸/乙酸钠缓冲液(pH 5.8),乙酸乙酯7.5%(v/v),底物:辛酸:双氧水为1:5:8,双氧水(30%的H₂O₂)

水溶液)一次添加完毕,再加入不同的催化剂(相较于底物的质量百分比,w/w,酶液以体系体积比计,固定化酶或者酶粉以质量计),30℃,220rpm开始反应。

[0024] (3)液相检测流程:转化结束后通过液相检测其产率或者纯度,液相检测条件为示差检测器的,ODS柱(35 μ m,4.6 $\times$ 250mm),乙腈:水(60:40),流速:1ml/min。

[0025] 产率计算:

[0026] $\text{产率} = C_a / C_b * 100\%$

[0027] C_a 、 C_b 分别为初始添加底物100%转化后相比于产物的质量浓度、反应结束时产物的质量浓度

[0028] 液相检测其产率,其中有产物生成的酶为生物柴油NS81006,脂肪酶LIP F等。选择催化效率最佳的两种酶:固定化脂肪酶IM,脂肪酶LIP F分别优化最适添加量,结果如表1,优选脂肪酶LIP F作为环氧反应的催化剂进行后续反应。

[0029] 表1不同催化剂催化效率的比较

	脂肪酶	催化剂加量	产率/%
[0030]	固定化LIP F	20 g/L	33.12 $\pm$ 2.21
	固定化IM	16 g/L	31.55 $\pm$ 1.77

[0031] 实施例2:

[0032] 1M的乙酸/乙酸钠缓冲液(pH 5.8)中包含200g/L底物6-甲基还原物,乙酸乙酯7.5%(v/v),底物:辛酸:双氧水为1:5:8,双氧水(30%的H₂O₂水溶液)一次添加完毕,添加65%(w/w)的固定化脂肪酶LIP F加入反应体系中,于不同反应温度下反应。反应结束后,采用实施例1中的液相检测方法测产率,结果如表2所示,优选30℃为最佳反应温度。

[0033] 表2不同反应温度的比较

	反应温度/℃	产率/%
	25	75.07 $\pm$ 2.73
	30	80.25 $\pm$ 3.01
[0034]	37	67.70 $\pm$ 2.64
	40	64.91 $\pm$ 1.91
	42	63.75 $\pm$ 1.44
	45	52.44 $\pm$ 1.52

[0035] 实施例3:

[0036] 为缩减成本,使用酶粉替代固定化脂肪酶LIP F,并优化适宜的催化剂加量。优化体系为1M的乙酸/乙酸钠缓冲液(pH 5.8)中包含200g/L底物6-甲基还原物,乙酸乙酯7.5%(v/v),底物:辛酸:双氧水为1:5:8,双氧水(30%的H₂O₂水溶液)一次添加完毕,添加不同质量的LIP F酶粉加入反应体系中,30℃,220rpm开始反应。反应结束后,采用实施例1中的液相检测方法测反应液中产物纯度,结果如表3所示,综合考虑成本和杂质含量,优选7.5%

(w/w)的LIP F酶粉加量,此时产率为75.62%。

[0037] 表3催化剂加量对环氧反应的影响

酶粉加量/%	产率/%
2.50%	63.7±1.98
3%	72.15±2.79
5%	75.08±2.66
7.5%	75.62±1.83
10%	79.38±3.12
12.50%	81.88±3.31
17.50%	81.88±2.98
40%	79.06±2.68

[0039] 实施例4:

[0040] 1M的乙酸/乙酸钠缓冲液 (pH 5.8) 中包含200g/L底物6-甲基还原物,乙酸乙酯7.5% (v/v),底物:不同种类的氧载体:双氧水为1:5:8,双氧水(30%的 H_2O_2 水溶液)一次添加完毕,添加7.5% (w/w) LIP F酶粉加入反应体系中,30℃,220rpm开始反应。反应结束后,采用实施例1中的液相检测方法测产率,结果如表4所示,相较于其它氧载体,优选辛酸作为环氧反应的氧载体。

[0041] 表4氧载体类型对环氧反应的影响

氧载体种类	产物纯度/%
丙酸	3.7±0.05
丁酸	6.23±0.26
戊酸	11.25±0.93
己酸	39.49±1.01
庚酸	59.14±1.39
辛酸	75.62±1.83
癸酸	57.42±1.42

[0043] 实施例5:

[0044] 1M的乙酸/乙酸钠缓冲液 (pH 5.8) 中包含200g/L底物6-甲基还原物,乙酸乙酯7.5% (v/v),采用不同的底物:辛酸:双氧水摩尔比,双氧水(30%的 H_2O_2 水溶液)一次添加完毕,添加7.5% (w/w) LIP F酶粉加入反应体系中,30℃,220rpm开始反应。反应结束后,采用实施例1中的液相检测方法测产率,结果如表5所示,辛酸与 H_2O_2 比例对催化效率影响较为显

著,优选辅料底物:辛酸: H_2O_2 添加比例为1:5:8。

[0045] 表5辅料比例对环氧反应的影响

	底物: 辛酸: H_2O_2 比例	产物纯度/%
	1: 2: 2	16.01±0.84
	1: 2: 6	39.46±0.94
[0046]	1: 2: 8	51.59±1.16
	1: 3: 2	23.85±0.75
	1: 3: 4	45.18±1.02
	1: 3: 5	51.83±1.17
	1: 3: 6	59.83±1.32
[0047]	1: 3: 8	73.25±1.65
	1: 5: 8	75.62±1.83

[0048] 实施例6:

[0049] 1M的乙酸/乙酸钠缓冲液 (pH 5.8) 中包含200g/L底物6-甲基还原物,助溶剂加量疏水溶剂7.5% (v/v),亲水溶剂5% (v/v),底物:辛酸:双氧水添加比例为1:5:8,双氧水(30%的 H_2O_2 水溶液)一次添加完毕,添加7.5% (w/w) LIP F酶粉加入反应体系中开始反应。反应结束后,采用实施例1中的液相检测方法测产率,结果如表6所示,优选异丙醇作为本研究的助溶剂,且对异丙醇添加比例进行优选(如表7),选择7.5%作为该反应溶剂的最适加量。

[0050] 表6助溶剂类型对环氧反应的影响

	助溶剂类型	产物纯度/%
	乙醇	82.70±2.20
	乙腈	83.64±2.31
	异丙醇	84.05±2.65
[0051]	乙酸乙酯	75.62±1.83
	甲醇	80.06±2.04
	甲苯	79.75±1.85
	丙酮	79.90±2.00
	四氢呋喃	80.40±2.05
	正己烷	81.18±2.12

[0052] 表7助溶剂加量对环氧反应的影响

	异丙醇加量/%	产物纯度/%
	2.5	81.20±2.42
[0053]	5	83.05±2.95
	7.5	84.05±2.65
	10	80.18±1.98

[0054] 实施例7:

[0055] 添加原料(200g/L底物6-甲基还原物,底物:辛酸:双氧水(30%的H₂O₂水溶液)为1:5:8(摩尔比),7.5%异丙醇(v/v),7.5%的催化剂脂肪酶LIP F酶粉(相较于底物的质量百分比,w/w),所有辅料一次添加完毕,于30℃,245rpm下反应。反应完毕后,离心,取离心后沉淀经砂芯漏斗抽滤得滤饼,滤饼使用合适比例的乙酸乙酯洗涤除杂至产物液相检测纯度为97%,并于60℃下真空干燥至恒重,重量收率为75%。

[0056] 将图1所示5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮的对照品液相色谱与图2所示本发明实施例反应过程的液相色谱进行比对,二者出峰时间一致,证明本发明实施例制得的产物为目标产物5 α ,6 α -环氧-11 β ,17 α -二羟基孕甾-3,20-二乙二醇缩酮。

[0057] 最后应当说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解:依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者等同替换,而未脱离本发明精神和范围的任何修改或者等同替换,其均应涵盖在本发明的权利要求保护范围之内。

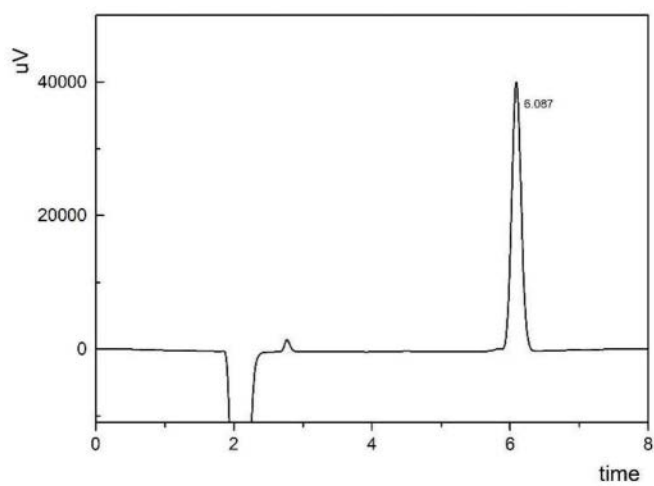


图1

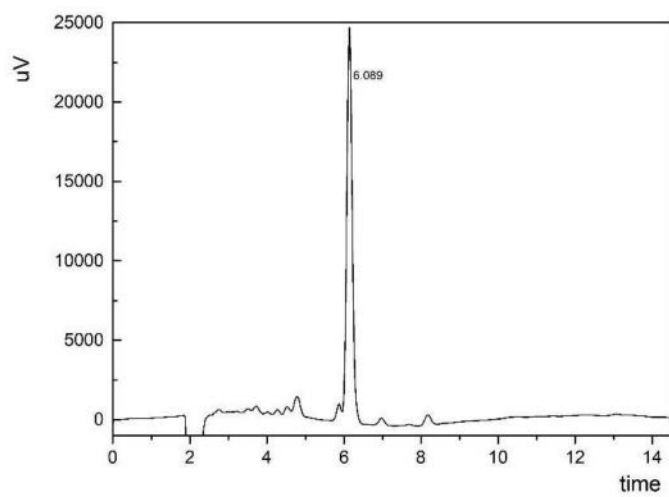


图2