



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115216510 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 21

(21) 申请号 202211049715.7

(22) 申请日 2022.08.30

(71) 申请人 湖北葛店人福药业有限责任公司

地址 436032 湖北省鄂州市葛店经济技术  
开发区聚贤路25号

(72) 发明人 何鑫 金海程 陈海林 汪声晨  
刘林 杨艳青 郑承刚 邓霞飞

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283  
专利代理师 陈卓

(51) Int. Cl.

C12P 33/06 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

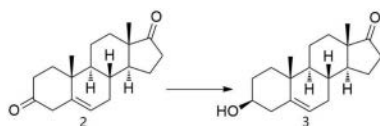
权利要求书4页 说明书6页

### (54) 发明名称

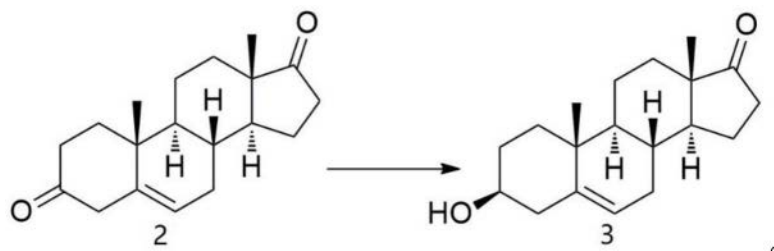
水相酶催化制备去氢表雄酮的方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种水相酶催化制备去氢表雄酮的方法。本发明提供的如式3所示化合物的制备方法,其包括如下步骤:在水相缓冲体系中,在非离子型助剂、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD的存在下,将式2所示化合物进行如下所示的还原反应,得到如式3所示的化合物;所述的非离子型助剂为聚氧乙烯醚类助剂和/或聚山梨酯类助剂。本发明的制备方法,在水相中进行酶催化反应,酶不易失活,可以被多次套用,减少了生产成本,同时水相中生成的杂质较少。



1. 一种如式3所示化合物的制备方法, 其特征在于, 其包括如下步骤: 在水相缓冲体系中, 在非离子型助剂、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD的存在下, 将式2所示化合物进行如下所示的还原反应, 得到如式3所示的化合物; 所述的非离子型助剂为聚氧乙烯醚类助剂和/或聚山梨酯类助剂;



2. 如权利要求1所述的如式3所示化合物的制备方法, 其特征在于, 所述的如式3所示化合物的制备方法满足如下条件中的一个或多个:

- (1) 所述的还原反应中, 所述的缓冲体系为磷酸盐缓冲溶液;
- (2) 所述的还原反应中, 所述的缓冲体系的pH为6.0~7.0;
- (3) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的缓冲体系的质量体积比为100mg/mL~200mg/mL;
- (4) 所述的还原反应中, 所述的聚氧乙烯醚类助剂为曲拉通X-100;
- (5) 所述的还原反应中, 所述的聚山梨酯类助剂为吐温60或吐温80;
- (6) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的非离子型助剂的质量比为(2~3):1;
- (7) 所述的还原反应中, 所述的反应在消泡剂的存在下进行;
- (8) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的葡萄糖的质量比为1:(2~3);
- (9) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的3-酮基还原酶的质量比为(15~22):1;
- (10) 所述的还原反应中, 所述的3-酮基还原酶与所述的葡萄糖脱氢酶的质量比为(3~7):1;
- (11) 所述的还原反应中, 所述的3-酮基还原酶与所述的NAD的质量比为(20~30):1;
- 和(12) 所述的还原反应中, 所述的反应温度为20~40℃。

3. 如权利要求2所述的如式3所示化合物的制备方法, 其特征在于, 所述的如式3所示化合物的制备方法满足如下条件中的一个或多个:

- (1) 所述的还原反应中, 所述的磷酸盐为磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸氢二钾中的一种或多种;
- (2) 所述的还原反应中, 所述的缓冲体系的pH为6.5~7.0;
- (3) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的缓冲体系的质量体积比为140mg/mL~160mg/mL;
- (4) 所述的还原反应中, 所述的聚山梨酯类助剂为吐温80;
- (5) 所述的还原反应中, 所述的式2所示化合物与所述的非离子型助剂的质量比为(2.2~2.5):1;
- (6) 所述的还原反应中, 所述的消泡剂为聚硅氧烷消泡剂、聚氧丙烯甘油醚消泡剂和硅

醚类消泡剂中的一种或多种；

(7) 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的消泡剂的质量比为(30~60):1;

(8) 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的葡萄糖的质量比为1:(2.2~2.5);

(9) 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的3-酮基还原酶的质量比为(18~20):1;

(10) 所述的还原反应中,所述的3-酮基还原酶与所述的葡萄糖脱氢酶的质量比为5:1;

(11) 所述的还原反应中,所述的3-酮基还原酶与所述的NAD的质量比为25:1;

和(12)所述的还原反应中,所述的反应温度为30℃。

4. 如权利要求3所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的如式3所示化合物的制备方法满足如下条件中的一个或多个:

(1) 所述的还原反应中,所述的缓冲体系的pH为7.0;

(2) 所述的还原反应中,所述的消泡剂为硅醚类消泡剂;

和(3)所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的消泡剂的质量比为(45~50):1。

5. 如权利要求4所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的如式3所示化合物的制备方法满足如下条件中的一个或多个:

(1) 所述的3-酮基还原酶为苏州汉酶生物技术有限公司生产的型号为DH-2(EW-KRED-kit1)的3-酮基还原酶;

(2) 所述的葡萄糖脱氢酶为苏州汉酶生物技术有限公司生产的型号为SW-PT的葡萄糖脱氢酶;

(3) 所述的NAD为苏州汉酶生物技术有限公司生产的型号为NAD(CAS 53-84-9)的NAD;

(4) 所述的消泡剂为烟台恒鑫化工科技有限公司生产的型号为THI®X-298的复合高效消泡剂;

(5) 反应结束后,直接过滤,滤液循环套用于所述的反应;

和(6)所述反应的原料为所述的非离子型助剂、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD,以及所述的水相缓冲体系,或者,所述的非离子型助剂、消泡剂、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD,以及所述的水相缓冲体系。

6. 如权利要求2所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的如式3所示化合物的制备方法为方案1或方案2:

方案1、

所述的缓冲体系为磷酸盐缓冲溶液;

所述的缓冲体系的pH为7.0;

所述的式2所示化合物与所述的缓冲体系的质量体积比为140mg/mL~160mg/mL;

所述的非离子型助剂为曲拉通X-100和/或吐温80;

所述的式2所示化合物与所述的非离子型助剂的质量比为(2.2~2.5):1;

所述的式2所示化合物与所述的葡萄糖的质量比为1:(2.2~2.5);

所述的式2所示化合物与所述的3-酮基还原酶的质量比为(18~20):1;

所述的3-酮基还原酶与所述的葡萄糖脱氢酶的质量比为5:1;

所述的3-酮基还原酶与所述的NAD的质量比为25:1;

所述的反应温度为30℃;

方案2、

所述的缓冲体系为磷酸盐缓冲溶液;

所述的缓冲体系的pH为7.0;

所述的式2所示化合物与所述的缓冲体系的质量体积比为140mg/mL~160mg/mL;

所述的非离子型助剂为曲拉通X-100;

所述的式2所示化合物与所述的非离子型助剂的质量比为(2.2~2.5):1;

所述的消泡剂为硅醚类消泡剂;

所述的式2所示化合物与所述的消泡剂的质量比为(45~50):1;

所述的式2所示化合物与所述的葡萄糖的质量比为1:(2.2~2.5);

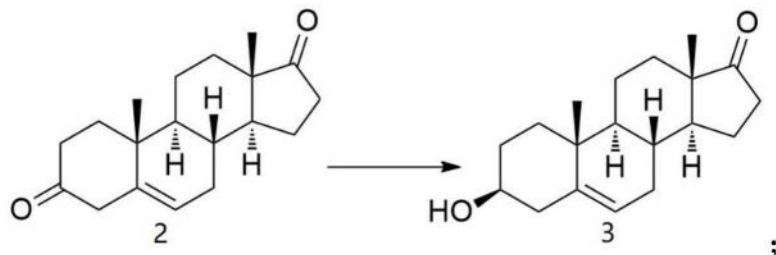
所述的式2所示化合物与所述的3-酮基还原酶的质量比为(18~20):1;

所述的3-酮基还原酶与所述的葡萄糖脱氢酶的质量比为5:1;

所述的3-酮基还原酶与所述的NAD的质量比为25:1;

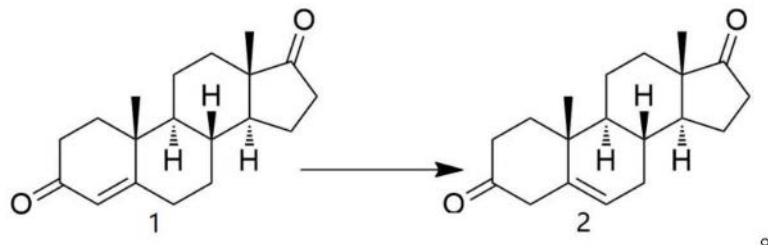
所述的反应温度为30℃。

7.如权利要求5所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的循环套用包括如下步骤:所述的还原反应结束后,将反应体系过滤,滤液中,在葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD的存在下,pH值为7.0时,将式2所示化合物进行如下所示的还原反应,得到如式3所示的化合物;



较佳地,所述的式2所示化合物、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD的定义及条件如权利要求1-6中任一项所述。

8.如权利要求1-7中任一项所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,进一步包括如下步骤:在保护气氛下,溶剂中,在碱的存在下,将式1所示化合物进行如下所示的双键转位反应,得到如式2所示的化合物;



9.如权利要求8所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的如式3所示化合物的制备方法满足如下条件中的一个或多个:

(1)所述的双键转位反应中,所述的保护气氛为氮气或惰性气体,例如氮气;

(2) 所述的双键转位反应中,所述的溶剂为醇类溶剂,例如叔丁醇;

(3) 所述的双键转位反应中,所述的式1所示化合物与所述的溶剂的质量比为1:(3~4),例如1:3.9;

(4) 所述的双键转位反应中,所述的碱为有机碱,例如叔丁醇钾;

(5) 所述的双键转位反应中,所述的式1所示化合物与所述的碱的质量比为(1~1.5):1,例如1.2:1;

和(6)所述的双键转位反应中,所述的反应温度为20~40℃,例如30℃。

10. 如权利要求9所述的如式3所示化合物的制备方法,其特征在于,所述的双键转位反应中,进一步包括后处理,所述的后处理包括如下步骤:所述的双键转位反应结束后,将反应体系进行淬灭,过滤,得到式2所示化合物;

较佳地,所述如式3所示化合物的制备方法满足如下条件:

(1) 所述的淬灭可为将反应体系加入淬灭体系;

(2) 所述的淬灭体系可为酸与水的混合溶液;

(3) 所述的酸可为有机酸,例如冰乙酸;

和(4)所述的酸与所述的水的质量比可为(15~20):1,例如16.4:1。

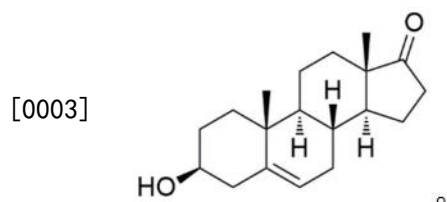
## 水相酶催化制备去氢表雄酮的方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种水相酶催化制备去氢表雄酮的方法。

## 背景技术

[0002] 去氢表雄酮,别名脱氢表雄酮,英文名称为dehydroepiandrosterone,简称DHEA。化学名称为3 $\beta$ -羟基雄甾-5-烯-17-酮,分子式为C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>,分子量288.43,CAS号53-43-0。结构式如下:

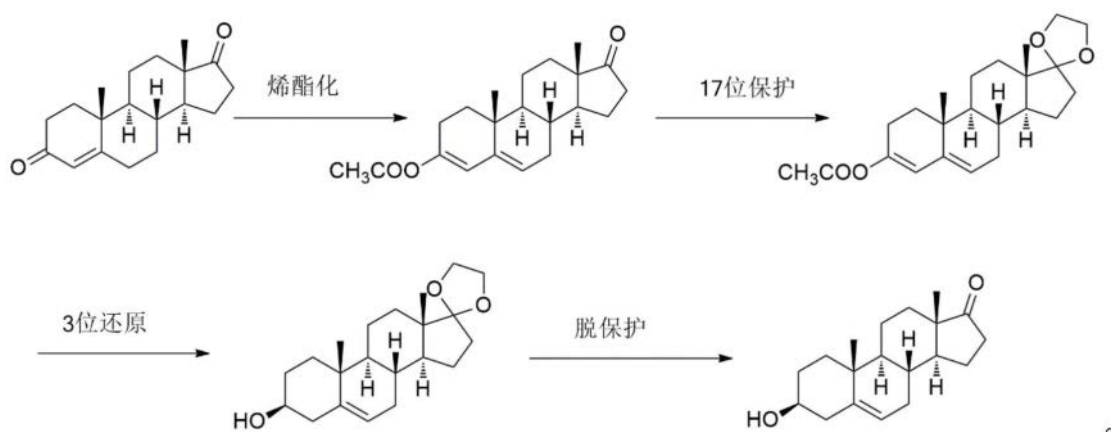


[0004] 去氢表雄酮是人体肾上腺皮质网状层分泌的一种肾上腺激素前体物质,具有调节肥胖、防糖尿病、抗致癌和病毒感染、提高记忆、免疫反应和应激反应、减轻紧张等生理活性,能够参与合成肾上腺分泌多种激素,是制造甾体激素的中间体。

[0005] 据文献和专利报道,目前合成去氢表雄酮的路线,主要有如下几种:

[0006] 1) 化学法

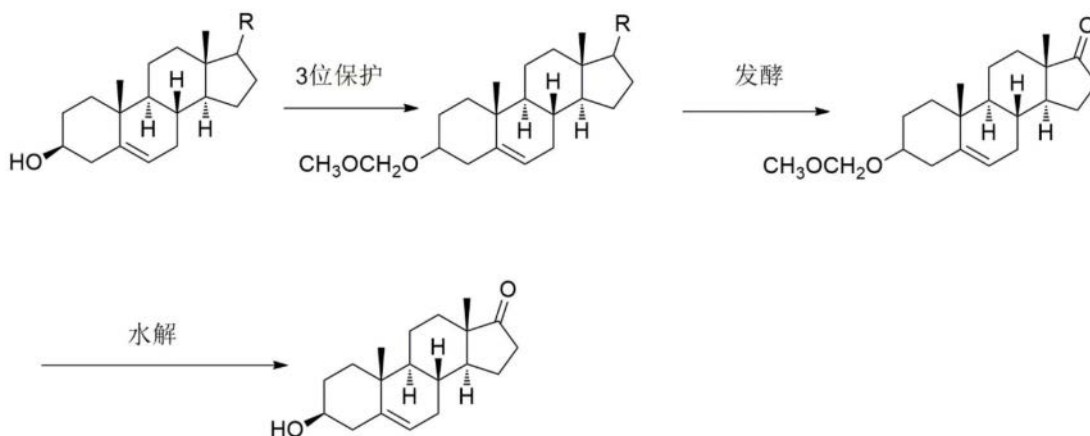
[0007] 以4-雄烯二酮(4-AD)为原料,先对三位酮基进行烯酯化,再保护17位的酮基,随后还原得到三位羟基,最后进行17位脱保护,最终得到去氢表雄酮。反应式如下:



[0009] 本方法为纯化学合成方法,涉及的步骤多,需要金属催化剂,产生大量废水,生产成本也偏高。

[0010] 2) 生物发酵法

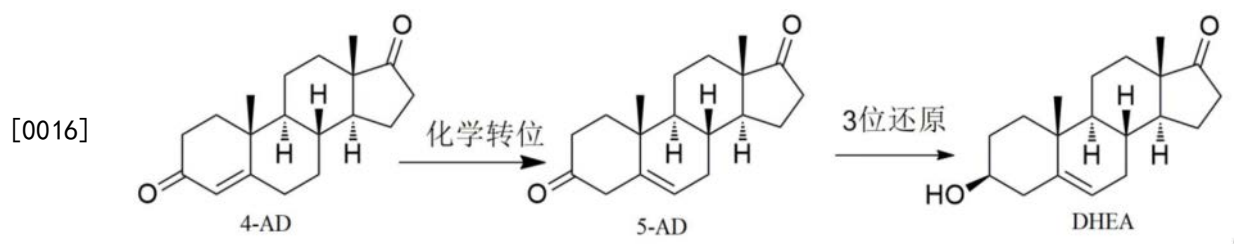
[0011] 以甾醇为起始物,先保护三位的羟基,再通过发酵,切除17位的侧链,得到17位的酮基,最后水解得到去氢表雄酮。反应式如下:



[0013] 本方法需要用到发酵方法,发酵的稳定性和后处理一直是制约产业化的关键因素。

[0014] 3) 生物酶催化方法

[0015] 以4-雄烯二酮为起始物,经过双键转位,再通过3位酮基还原酶得到去氢表雄酮。如专利CN 106086148 A、CN 109312382 A、CN 105695551 A报道,5-雄烯二酮(5-AD)合成后,均采用有机相体系进行酶催化转化,会使产品的杂质增多,有机溶剂会使酶失活,增加生产的成本。反应式如下:

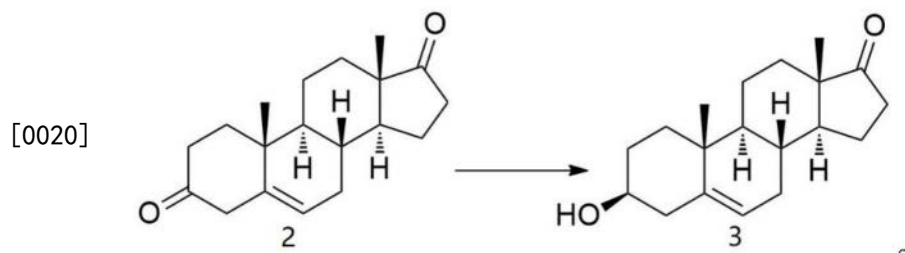


## 发明内容

[0017] 本发明所要解决的技术问题是现有的酶催化反应在有机相中进行,会使酶失活,且产品杂质增多,为此,本发明提供一种水相酶催化制备去氢表雄酮的方法。本发明在水相中进行酶催化反应,酶不易失活,可以被多次套用,减少了生产成本,同时水相中生成的杂质较少。

[0018] 本发明通过以下技术方案解决上述技术问题。

[0019] 本发明提供了一种如式3所示化合物的制备方法,其包括如下步骤:在水相缓冲体系中,在非离子型助剂、葡萄糖、3-酮基还原酶、葡萄糖脱氢酶和NAD的存在下,将式2所示化合物进行如下所示的还原反应,得到如式3所示的化合物;所述的非离子型助剂为聚氧乙烯醚类助剂和/或聚山梨酯类助剂;





[0021] 所述的还原反应中,所述的缓冲体系可为磷酸盐缓冲溶液,所述的磷酸盐可为磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、和磷酸氢二钾中的一种或多种。

[0022] 所述的还原反应中,所述的缓冲体系的pH可为6.0~7.0,优选6.5~7.0,例如7.0。

[0023] 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的缓冲体系的质量体积比为为本领域常规的质量体积比,优选100mg/mL~200mg/mL,更优选140mg/mL~160mg/mL。

[0024] 所述的还原反应中,所述的聚氧乙烯醚类助剂优选曲拉通X-100。

[0025] 所述的还原反应中,所述的聚山梨酯类助剂优选吐温60或吐温80,例如吐温80。

[0026] 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的非离子型助剂质量比可为(2~3):1,优选(2.2~2.5):1。

[0027] 所述的还原反应中,所述的反应在消泡剂的存在下进行,所述的消泡剂可为聚硅氧烷消泡剂、聚氧丙烯甘油醚消泡剂和硅醚类消泡剂中的一种或多种,优选硅醚类消泡剂,例如烟台恒鑫化工科技有限公司生产的型号为THI<sup>®</sup>X-298的复合高效消泡剂。

[0028] 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的消泡剂质量比为本领域常规的质量比,优选(30~60):1,更优选(45~50):1。

[0029] 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的葡萄糖的质量比可为1:(2~3),优选1:(2.2~2.5)。

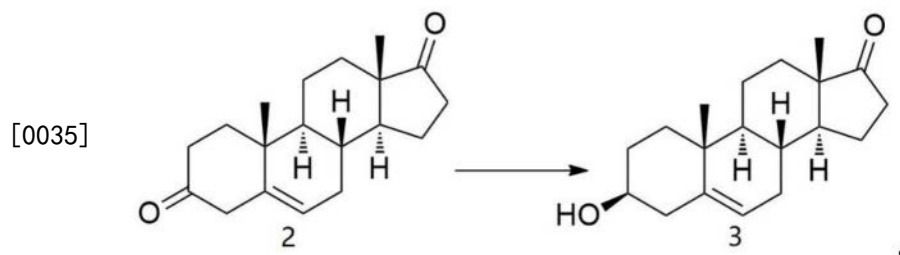
[0030] 所述的还原反应中,所述的式2所示化合物与所述的3-酮基还原酶的质量比可为(15~22):1,优选(18~20):1。

[0031] 所述的还原反应中,所述的3-酮基还原酶与所述的葡萄糖脱氢酶的质量比可为(3~7):1,例如5:1。

[0032] 所述的还原反应中,所述的3-酮基还原酶与所述的NAD的质量比可为(20~30):1,例如25:1。

[0033] 所述的还原反应中,所述的反应温度为本领域该反应常规的温度,优选20~40℃,例如30℃。

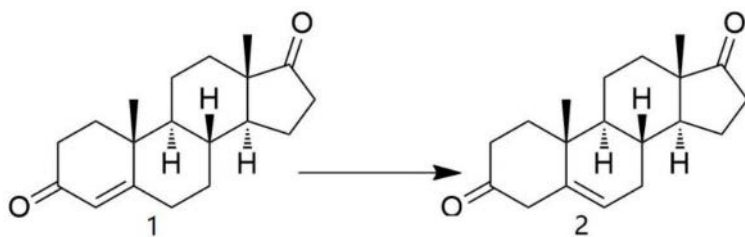
[0034] 所述的还原反应中,还可进一步包括如下步骤:所述的还原反应结束后,将反应体系过滤,滤液中,在葡萄糖的存在下,pH值为7.0时,将式2所示化合物进行如下所示的还原反应,得到如式3所示的化合物:



[0036] 所述的式3所示化合物的制备方法,还可进一步包括如下步骤:在保护气氛下,溶剂中,在碱的存在下,将式1所示化合物进行如下所示的双键转位反应,得到如式2所示的化合物,即可:



[0037]



[0038] 所述的双键转位反应中,所述的保护气氛可为氮气或惰性气体,优选氮气。

[0039] 所述的双键转位反应中,所述的溶剂优选醇类溶剂,例如叔丁醇。

[0040] 所述的双键转位反应中,所述的式1所示化合物与所述的溶剂的质量比为本领域常规质量比,优选1:(3~4),例如1:3.9。

[0041] 所述的双键转位反应中,所述的碱优选有机碱,例如叔丁醇钾。

[0042] 所述的双键转位反应中,所述的式1所示化合物与所述的碱的质量比优选(1~1.5):1,例如1.2:1。

[0043] 所述的双键转位反应中,所述的反应温度为本领域该反应常规的温度,优选20~40℃,例如30℃。

[0044] 所述的双键转位反应中,还可进一步包括后处理,所述的后处理包括如下步骤:所述的双键转位反应结束后,将反应体系进行淬灭,过滤,得到式2所示化合物。

[0045] 所述的双键转位反应中,所述的淬灭可为将反应体系加入淬灭体系。

[0046] 所述的双键转位反应中,所述的淬灭体系可为酸与水的混合溶液。

[0047] 所述的双键转位反应中,所述的酸优选有机酸,例如冰乙酸。

[0048] 所述的双键转位反应中,所述的酸与所述的的水的质量比可为(15~20):1,例如16.4:1。

[0049] 在不违背本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0050] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0051] 本发明的积极进步效果在于:本方法中5-雄烯二酮的酶催化转化反应在水相体系中进行,避免了酶的失活,使酶可以循环套用,大幅减少了酶的使用量,并提高了反应收率。

### 具体实施方式

[0052] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0053] 实施例中所用酶和消泡剂:

[0054]	名称	型号	厂家
	3-酮基还原酶	DH-2 (EW-KRED-kit1)	苏州汉酶生物技术有限 公司
	葡萄糖脱氢酶	SW-PT	
	NAD	NAD (CAS 53-84-9)	
	复合高效消泡剂	THI <sup>®</sup> X-298	烟台恒鑫化工科技有限 公司

[0055] 实施例1:5-AD的制备

[0056] 在250mL的三口烧瓶内加入叔丁醇钾(32.8g,0.29mol)和叔丁醇(156g,2.10mol),氮气保护,在60℃下溶清。随后将4-AD(40g,0.14mol)倒入瓶内,保持氮气氛,30℃反应1小时。反应期间配置反应淬灭体系,冰水保持5℃,淬灭体系中加入15.4g冰乙酸,936mL水。将反应后混合液缓慢倒入淬灭体系,低温搅拌0.5小时。过滤,得到5-AD固体。样品直接用于下一步酶催化反应。

[0057] 实施例2:DHEA的制备

[0058] 按实施例1操作,将得到的5-AD固体全部倒入1L的三口烧瓶,加入88g葡萄糖,16g曲拉通X-100,再用0.1M的PBS补至400mL,搅拌均匀,pH控制在7.0,加入3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD 0.08g,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:36.4g,收率91%,HPLC纯度97%。

[0059] 实施例3:DHEA酶催化母液的套用

[0060] 将实施例2中滤液倒入1L的三口烧瓶,加入按实施例1操作得到的5-AD固体,加入88g葡萄糖,搅拌均匀,pH控制在7.0,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液舍弃。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:38.5g,收率96.3%,HPLC纯度97%。

[0061] 实施例4:DHEA的制备

[0062] 按实施例1操作,将得到的5-AD固体全部倒入1L的三口烧瓶,加入88g葡萄糖,16g吐温80,再用0.1M的PBS补至400mL,搅拌均匀,pH控制在7.0,加入3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD0.08g,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:34g,收率85%,HPLC纯度97%。

[0063] 实施例5:DHEA酶催化母液的套用

[0064] 将实施例4中滤液倒入1L的三口烧瓶,加入按实施例1操作得到的5-AD固体,加入88g葡萄糖,搅拌均匀,pH控制在7.0,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液舍弃。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:38.8g,收率97%,HPLC纯度97%。

[0065] 实施例6:DHEA的制备

[0066] 按实施例1操作,将得到的5-AD固体全部倒入1L的三口烧瓶,加入88g葡萄糖、16g曲拉通X-100和0.8g复合高效消泡剂(THI<sup>®</sup>X-298,购自烟台恒鑫化工科技有限公司),再用

0.1M的PBS补至400mL,搅拌均匀,pH控制在7.0,加入3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD 0.08g,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:38g,收率95%,HPLC纯度97%。

[0067] 实施例7:DHEA酶催化母液的套用

[0068] 将实施例6中滤液倒入1L的三口烧瓶,加入按实施例1操作得到的5-AD固体,加入88g葡萄糖,搅拌均匀,pH控制在7.0,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:39.2g,收率98%,HPLC纯度97%。

[0069] 实施例8:DHEA酶催化母液的套用

[0070] 按实施例7制得滤液,将其倒入1L的三口烧瓶,加入按实施例1操作得到的5-AD固体,加入88g葡萄糖,加入3-酮基还原酶1g、葡萄糖脱氢酶0.2g和NAD 0.04g,搅拌均匀,pH控制在7.0,在30℃反应12小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液舍弃。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:39.3g,收率98.3%,HPLC纯度97%。

[0071] 对比例1:DHEA的制备(参照CN106086148B的实施例)

[0072] 将实施例1得到的5-AD固体溶解于200mL 2-甲基四氢呋喃中,加入200mL 0.1M pH 6.5的PBS溶液开始搅拌,依次加入葡萄糖88g、3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD 0.08g,30℃下反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料。用200mL乙酸乙酯萃取两次,水相舍弃,萃取液合并浓缩至无液滴,得固体干燥后称重。产品重量:28.5g,收率71.25%,HPLC纯度96%。

[0073] 对比例2:DHEA的制备

[0074] 按实施例1操作,将得到的5-AD固体全部倒入1L的三口烧瓶,加入葡萄糖88g和大豆油16g,再用0.1M的PBS补至400mL,搅拌均匀,pH控制在7.0,加入3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD 0.08g,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:23.2g,收率58%,HPLC纯度65%。

[0075] 对比例3:DHEA的制备

[0076] 按实施例1操作,将得到的5-AD固体全部倒入1L的三口烧瓶,加入葡萄糖88g和软磷脂16g,再用0.1M的PBS补至400mL,搅拌均匀,pH控制在7.0,加入3-酮基还原酶2g、葡萄糖脱氢酶0.4g和NAD 0.08g,在30℃反应4小时。根据点板结果,确认底物完全转化后收料,直接过滤,滤液保留套用。滤饼水洗后干燥称重。产品重量:28g,收率70%,HPLC纯度82%。