

5-氟尿苷的微生物转化*

阮期平 周长林** 窦洁 吴梧桐

(中国药科大学生物制药学院 南京 210009)

关键词: 5-氟尿苷, 微生物转化, 分离纯化

中图分类号: Q525 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0117-04

5-氟尿苷(简称 FUR)是抗肿瘤核苷药物脱氧氟尿苷(Floxuridine, 简称 DFUR)的合成中间体。脱氧氟尿苷是一种抗代谢类抗肿瘤药,在体内可以部分转化为氟尿嘧啶(简称 FU),二者具有相似的作用途径和抗肿瘤谱。与 FU 相比,由于 DFUR 的抗肿瘤活性高且毒副反应小,主要用于治疗晚期结直肠癌和各种类型肝癌。在国内,采用化学法合成的 DFUR 业已进入临床研究阶段^[1]

采用化学合成法生产 DFUR 时,由于反应过程中需将碱基或核糖残基的部分基团进行保护,而且产物为多种核苷异构体和其它副产品的混合物,需要进一步分离,因此耗时费力、收率很低(约 10%)。1980 年,Utagawa 等首次报道了一种比化学方法更为简单、迅速的酶合成法^[2]。这种方法主要是利用某些微生物中存在核苷磷酸化酶^[3],它能催化一种核苷的碱基与另一种碱基互换,生成新的核苷。近年来,这种方法已应用于抗病毒药物的合成^[4-7]。本文首次报道利用产气肠杆菌突变株 EAM-Z1 为酶源酶法合成 DFUR 的中间体 5-氟尿苷。此项研究可望为抗病毒和抗肿瘤药物的合成提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)突变株 EAM-Z1,由本实验室经诱变筛选。

1.1.2 试剂:标准品尿苷、5-氟尿嘧啶、尿嘧啶、5-氟尿苷为美国 Sigma 公司产品;尿苷为上海太平洋生物高科技公司产品;5-氟尿嘧啶为南通第二制药厂产品;柱层层析硅胶 G-60 为中国青岛海洋化工集团产品;高效层析硅胶板(GF-254)为浙江四青生化厂产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器:日本岛津 SPD-10A 高效液相色谱仪;美国 Beckman 公司 J2-HS 冷冻高速离心机;梅特勒-托利多 Delta 320-S pH 计;8823A-紫外检测仪为北京新技术应用研究所产品;752-G 分光光度计为上海第三分析仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 湿菌体制备:产气肠杆菌接种于含蛋白胨 10g、牛肉浸膏 10g、酵母浸膏 5g、NaCl 5g 定容至 1L 的 pH7.0 的培养基中,31.5℃ 恒温培养 18~24h,培养液于 4℃、8000r/min 离心 15min,10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤、离心得湿菌体。

1.2.2 酶法转化:将湿菌体加入含有 10mmol/L 尿苷和 30mmol/L 氟尿嘧啶的 30mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.8)中(菌体浓度为 10%),于 60℃ 的水浴振荡器中恒温振荡反应 8~16h,用 3mmol/L HCl 终止反应,

* 前国家医药管理局资助项目

作者简介:阮期平(1961-),男,副教授,中国药科大学生物制药学院博士研究生,主要从事分子生物学研究,已发表学术论文十余篇。

** 通信联系人

收稿日期:2001-04-11,修回日期:2001-08-14

离心(8000r/min, 10min)得上清液。

1.2.3 分离纯化: 上清液于 75℃ 下浓缩 10 倍, 在 4℃ 下静置 24h, 离心(3500r/min, 20min), 取上清液过硅胶柱 I (C = 2.5cm × 80cm), 用洗脱系统 I (三氯甲烷: 甲醇: 水 = 61: 13: 1) 洗脱。收集核苷部分, 浓缩后过硅胶柱 II (C = 2.5cm × 80cm), 用洗脱系统 II (乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水 = 12: 3: 3: 2) 洗脱。收集氟尿苷部分, 经精制、结晶, 得白色晶体样品。

1.2.4 TLC 法鉴定: 将样品溶液点样于 GF254 硅胶板(10cm × 10cm)上, 分二次展开(展开剂 I 为氯仿: 甲醇 = 95: 5, 展开剂 II 为正丁醇: 乙醇: 水 = 4: 1: 1), 当第一次展开到离上缘 0.5cm 处, 取出干燥, 再进行第二次展开, 用紫外检测仪(254nm)检测, 计算 R_f 值。

1.2.5 HPLC 测定: 采用 Shim-Pack CLS-ODS 柱(C = 250mm × 4.6mm), 0.05mmol/L 磷酸二氢钠: 甲醇(2: 1) 作流动相, 流速 1ml/min, 进样量 1 μ L, 波长 254nm。

2 实验结果

2.1 5-氟尿苷的微生物转化条件

微生物转化率测定采用 HPLC, 即先以用 UR 和 FUR 标准品作出标准曲线, 酶反应液中 FUR 的浓度由峰面积从标准曲线计算得出, 再根据产物 FUR 和底物 UR 的初始摩尔数, 求出转化率。由表 1 可知, 产气肠杆菌突变株 EAM-Z1 的最佳转化条件为: pH 7.8, 反应温度 60℃, 反应时间 10h, 磷酸盐缓冲液浓度 30mmol/L, 菌体用量 10% (w/v)。在此反应条件下, UR 的转化率为 59.7%, FUR 浓度为 1.57mg/mL。

表 1 pH、温度、时间、磷酸盐浓度及菌体用量对转化率的影响

酸碱度		反应温度		反应时间		磷酸盐浓度		菌体用量	
pH	转化率/%	温度/℃	转化率/%	时间/h	转化率/%	磷酸盐/(mmol/L)	转化率/%	菌体/%	转化率/%
4.7	9.0	40	37.0	1	32.0	5	11.0	2	17.0
5.7	11.5	45	38.5	2	39.0	10	16.0	4	28.0
6.7	18.6	50	50.0	5	47.0	15	18.0	5	29.0
7.7	37.0	55	51.0	10	49.0	25	27.0	8	38.0
7.8	39.0	60	59.7	15	41.0	30	30.0	10	44.0
7.9	38.2	65	49.0	20	36.0	35	24.0	12	39.0
8.7	34.0	70	47.0	25	31.0	40	21.0	15	31.0

2.2 分离与纯化

2.2.1 洗脱系统的选择: 洗脱系统是根据溶剂的极性、化合物的吸附性和它在溶剂中的分配系数来选择。洗脱系统极性愈大, R_f 值愈大; 样品在洗脱系统溶解度愈大, R_f 值愈大。本研究的酶反应液中尿嘧啶和 5-氟尿嘧啶的极性较弱, 而尿嘧啶核苷和 5-氟尿嘧啶核苷的极性较强。在极性较弱的洗脱系统 I (三氯甲烷: 甲醇 = 61: 13: 1) 中, 嘧啶和核苷的 R_f 值分别为 0.67 和 0.34, 在极性较强的洗脱系统 II (乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水 = 12: 3: 3: 2) 中, 氟尿苷和尿苷的 R_f 值分别为 0.59 和 0.46。

2.2.2 硅胶柱层析: 通过多次薄层层析实验证明, 采用分次洗脱效果较好。首先用极性较弱的洗脱系统 I 先将尿嘧啶、5-氟尿嘧啶与尿嘧啶核苷、5-氟尿嘧啶核苷完全分开, 然后将尿嘧啶核苷、5-氟尿嘧啶核苷混合溶液浓缩后再上第二根硅胶柱, 以极性较强的洗脱系统 II 将尿嘧啶核苷和 5-氟尿嘧啶核苷分开, 结果见图 1 和图 2。

2.3 产物纯度分析

从 HPLC 图谱上可以看出, 所得到的样品中仅含极少量的杂质(1.98%), 5-FUR 的纯度为 98.02%。结果见图 3。

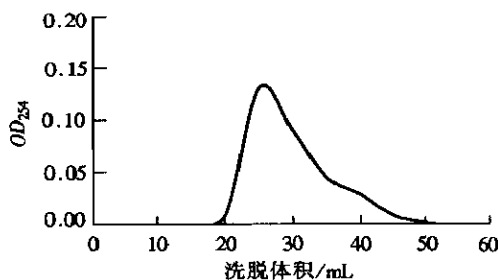


图1 嘧啶洗脱曲线 (C = 2.5cm × 80cm)

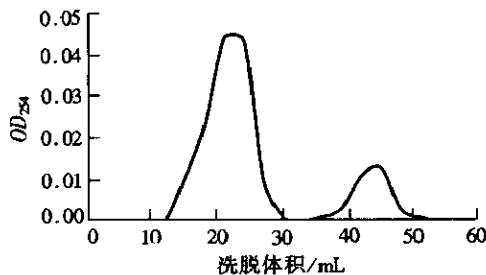


图2 核苷洗脱曲线 (C = 2.5cm × 80cm)

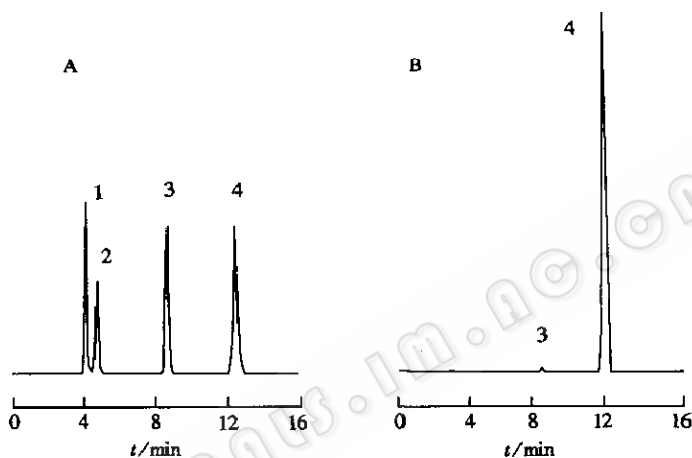


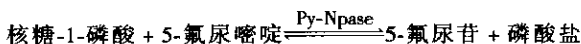
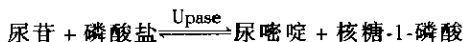
图3 样品的 HPLC 图谱

A. 标准品; B. 样品.

1. Fu; 2. U; 3. UR; 4. FUR.

3 讨论

利用微生物转化法合成氟尿苷, 主要是由于在某些微生物中的尿嘧啶核苷磷酸化酶 (UPase, EC 2.4.2.3) 和嘧啶核苷磷酸化酶 (Py-NPase, EC 2.4.2.2), 这两种酶催化如下反应^[8]:



我们通过物理化学方法诱变产气肠杆菌 (*E. aerogenes*), 筛选出一种突变株。这种突变株的转化率比大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、乙酰短杆菌 (*Brevibacterium acetylicum*) 等都高, 可能是由于这种突变株中 Py-Npase 对 5-氟尿嘧啶的亲合力较其它菌株高。目前, 我们正在研究该酶的结构和性质。

微生物转化条件的优化是实现高效转化主要因素。研究表明, 磷酸盐缓冲液浓度 25 ~ 30mmol/L (pH7.8), [UR]/[5-FU] = 1/3 或 1/2, 反应温度 55℃ ~ 60℃, 反应时间 8 ~ 10h, 菌体用量 8% ~ 10% 时, UR 的转化率达到最大, 产物 5-氟尿苷的浓度最高。由于 5-FU 的水溶性差和 Py-Npase 的可逆性催化, 使转化率不能继续提高。我们目前正在构建工程菌株, 并拟采用固定化细胞技术和水-有机溶剂相系统, 以

进一步提高转化率。

从反应液中分离纯化 FUR 时,必须除去与 FUR 结构类似的 UR 和另外两种碱基(FU,U)。通过摸索我们建立了一套切实可行的 FUR 纯化工艺。酶反应液经过 2 次硅胶柱层析和两种洗脱系统洗脱,可得到纯度为 98.02%,收率为 86% 的 FUR。这套工艺不仅纯度高、收率高,而且有机溶剂用量少,未反应的底物(UR,FU)可继续利用,工艺简单、迅速、处理量大,进一步优化工艺后,可适合于 FUR 的大规模制备。

参 考 文 献

- [1] 王 鹏,朱 林,付 强,等. 中国药学杂志,2001,36(2):118~120.
- [2] Utagawa T, Morisawa H, Miyoshi T, *et al.* *FEBS Lett*, 1980, 109(2):263.
- [3] Thomas A K. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 429:352.
- [4] 周长林,邱蔚然,俞俊棠,等. 药物生物技术,1995,2(4):24~27.
- [5] 周长林,邱蔚然,俞俊棠,等. 华东理工大学学报,1997,23(5):530~534.
- [6] 周长林,邱蔚然,俞俊棠,等. 华东理工大学学报,1997,23(5):535~539.
- [7] Jane R H, David W H. *J Biotechnology*, 1992, 23:193~210.
- [8] Nobuaki H, Mutsumi W, Sunakawa K, *et al.* JP 01, 320, 995.

Studies on Biotransformation of 5-FUR

Ruan Qiping Zhou Changlin Dou Jie Wu Wutong

(*School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*)

Abstract: Conditions for biotransformation and purification of FUR were investigated. The result showed that when the cell concentration of *E. aerogenes* was 10% (w/v), the temperature and pH were 7.8 and 60°C respectively, 59.7% UR was converted to FUR. It also demonstrated that the ideal procedure for the purification of FUR is silica gel column chromatography by two elution systems (S_1 : CHCl_3 : CH_3OH : H_2O = 61:13:1, and S_2 ; $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$: CH_3OH : CH_3COOH : H_2O = 12:3:3:2) with the purity and yield of 98.0% and 86.0% respectively.

Key words: FUR, Biotransformation, Isolation and purification