

酶法合成 Kupffer 细胞靶向的半乳糖配体

聂华, 程怡*, 郑品劲, 赵菊香, 吴琼
(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 采用酶催化法在非水相介质中合成半乳糖配体。方法: 通过 IR, 质谱, 核磁共振(¹H-NMR, ¹³C-NMR)对产物结构进行表征; 以底物转化率为指标, 采用单因素试验考察酶种类、反应介质、酶加入量、底物摩尔比、反应温度等对配体合成的影响。结果: 通过表征分析显示经酶的催化反应, 半乳糖 C1' 位的羟基发生了酯化反应, 所得产物为目标产物。优选的反应条件为反应介质四氢呋喃(THF)-二甲基亚砜(DMSO)(3:1), Novozym 435 固定化脂肪酶为催化剂, 酶加入量 600 U·mL⁻¹, 半乳糖-硬脂酸乙烯酯的摩尔比 1:4, 于 55 °C 反应 8 h, 半乳糖的转化率达 >0%。结论: 酶促催化法可用于合成肝靶向脂质体配体。

[关键词] 酶促催化; 去唾液酸糖蛋白受体; 配体; 半乳糖

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0021-04

[doi] 10.11653/syfy2013100021

Enzyme-catalyzed Synthesis of Galactose Ligands Targeted Kupffer Cells

NIE Hua, CHENG Yi*, ZHENG Pin-jing, ZHAO Ju-xiang, WU Qiong

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize galactose ligand in non-aqueous medium by enzyme-catalyzed method. **Method:** Structure of the product was confirmed by IR, ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR; With conversion rate of substrate as index, effects of enzyme species, reaction medium, the amount of enzyme, molar ratio of substrate, reaction temperature on ligand synthesis was investigated by single factor tests. **Result:** Characterization by catalytic reaction, C1' bit hydroxyl of galactose occurred esterification, the received products was the target product. Optimized reaction conditions were as followings: tetrahydrofuran (THF) -dimethyl sulfoxide (DMSO) 3:1 as reaction medium, Novozym 435 immobilized lipase as catalyst, the amount of enzyme of 600 U·mL⁻¹, molar ratio of galactose to vinyl stearate at 1:4, and reacted at 55 °C for 8 h, the conversion rate of galactose reached more than 70%. **Conclusion:** Enzyme catalysis method could be used for synthesizing ligand of liver targeted liposomes.

[Key words] enzyme-catalysis; asialoglycoprotein receptor; ligand; galactose

配体靶向脂质体(LTLs)给药机制为在脂质体上连接识别分子(配体),通过配体分子的特异性和专一性,与靶细胞表面的受体分子相互作用而使脂

质体在靶区浓集、并释放药物。去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)是肝细胞膜上表达丰富的一种内吞性受体,存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜上^[1],该受体可专一性地识别末端含有半乳糖或半乳糖残基的糖蛋白^[2]。

合成一种相对低分子质量的半乳糖化脂质体作为配体已成为脂质体半乳糖化的主要途径^[3]。目前半乳糖的偶联多采用化学合成法,存在区域选择性低、副产物多、反应速率低、溶剂残留等问题;而酶法合成具有高效、高选择性、反应条件温和、产物单一、纯

[收稿日期] 20121127(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772790)

[第一作者] 聂华,博士,从事药物载体及其新型给药系统研究, Tel:13422158212, E-mail:niehua007@163.com

[通讯作者] *程怡,教授,博士生导师,从事药物载体及其新型给药系统研究, Tel:020-39358041, E-mail: vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

化工艺简单等优点。程怡等^[4]采用 Novozym435 酶促催化合成硬脂酸半乳糖脂,转化率 > 70%。本实验旨在对试验方法进行改进,同时改进转化率的计算方法,并通过碳谱确定硬脂酸与半乳糖的结合位点,以探讨 Novozym435 专一催化半乳糖 C₁' 羟基的机制。

1 材料

Thermo TSQ Quantum ACCESS 型三重四极杆液质联用仪(赛默飞世尔科技有限公司),Bruker 400M 型核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司),Nicolet 5DX 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicozet 公司),LC-20A 型色谱仪(日本岛津),SEDEX75 型 ELSD 检测器(法国 ALFORTVILLE),BS110s 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),DKZ-1 型电热恒温空气浴振荡仪(上海精宏实验设备有限公司)。

D-半乳糖(上海蓝季科技发展有限公司),硬脂酸乙烯酯(Sigma-Aldrich 公司)。诺维信固定化脂肪酶(Novozym 435, 14 U·mg⁻¹),Lipozyme TLIM 脂肪酶(50 U·mg⁻¹),Palatase 20000 L 奶酪香精脂肪酶(25 U·mg⁻¹)均购自诺维信生物技术有限公司。Candida rugosa Lipase CRL (739 U·mg⁻¹, SIGMA 公司),Papain PS1 木瓜蛋白酶 PS1 (8 U·mg⁻¹, 广州市华琪生物科技有限公司),Protamex 复合蛋白酶(18 U·mg⁻¹, 广州市天河区远天酶制厂),分子筛 4A 型(天津市福晨化学试剂厂)。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯(脱水处理)。

2 方法与结果

2.1 酶催化反应 取 10 mL 带塞小瓶,加入半乳糖(0.04 mmol) 0.015 g 和硬脂酸乙烯酯(0.16 mmol)0.32 g,再加入已脱水 DMSO + THF(1:3) 2 mL,0.1 g 分子筛,于恒温振荡器振摇 30 min,加酶 600 U,待反应结束后,滤除分子筛、酶,回收溶剂,即得产物。反应方程式见图 1。

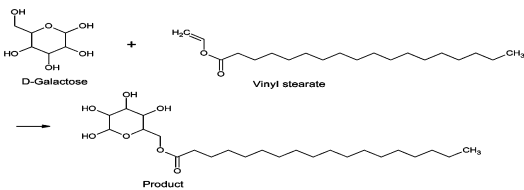


图 1 半乳糖配体合成路线

2.2 产物纯化处理 柱色谱硅胶(100 ~ 200 目)装填色谱柱,将酶促反应后的溶液用干法上样,用三氯甲烷-甲醇梯度(1:1, 1:2, 1:4)洗脱,洗脱液进行 TLC 分析,收集、合并产物部分,挥干,得产物。

2.3 结构表征

2.3.1 红外光谱 取 2.2 项下纯化产物,进行 IR 测定,结果显示在 3 400 cm⁻¹ 左右的宽峰是 O-H 的伸缩振动吸收峰,位于 2 948 cm⁻¹ 处为 -CH₃, 2 836 cm⁻¹ 处为 -CH₂-, 1 711 cm⁻¹ 处为酯类 γC = O 主要特征峰,说明有酯化产物生成。

2.3.2 质谱分析 质谱参数为 ESI 源(+),喷雾电压 3 kV,毛细管温度 350 °C,流动相为甲醇-水(90:10),流速 200 μL·min⁻¹,注射针经 5 μL 定量环直接进样。结果可见准分子离子峰 m/z 469.3 (M + Na),提示产物相对分子质量 446,与推测分子式 C₂₄H₄₆O₇ 质量相符合。

2.3.3 ¹H-NMR 分析 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 4.51 (1H, d, J = 8.0 Hz, 6' 糖端基氢), 4.07 (1H, m, 1' a-H), 4.05 (1H, m, 2' -H), 3.99 (1H, q, J = 20.0, 8 Hz, 1' b-H), 3.65 (1H, m, 3' -H), 3.54 (2H, m, 4' -H, 5' -H), 3.32 (3H, s, 3 × OH), 2.26 (2H, t, 2-H), 1.50 (2H, m, 3-H), 1.23 (1H, s, 6' -OH), 1.23 (28H, 14 × CH₂), 0.85 (3H, t, CH₃)。结合半乳糖和硬脂酸乙烯酯¹H-NMR 数据分析,产物在 δ: 0.85 ~ 2.26 有与硬脂酸乙烯酯相似的峰,在 δ: 3.54 ~ 4.51 有与半乳糖相似的峰。

2.3.4 ¹³C-NMR 分析 ¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ: 172.8 (C-1), 92.6 (C-6'), 69.2 (C-2'), 69.0 (C-3'), 68.5 (C-4'), 67.6 (C-5'), 64.0 (C-1'), 33.4 (C-2), 31.3 (C-16), 29.0 (C-6 ~ C-14), 28.9 (C-5), 28.7 (C-15), 28.4 (C-4), 24.4 (C-3), 22.1 (C-17), 13.9 (C-18)。见图 2。

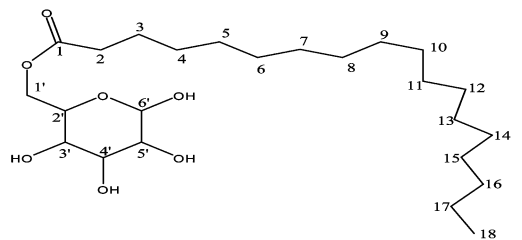


图 2 半乳糖配体结构

由以上结果可知,当糖类化合物的某一羟基发生酰化反应时,与该羟基直接相连的碳原子所对应的信号峰的化学位移会向低场移动,而与该碳原子相邻的碳原子的化学位移则会向高场移动,且位移量超过 δ: 2^[5]。通过查阅半乳糖¹³C-NMR 数据可知,C-1' 向低场移动了 δ: 2 (由 δ: 62.0 移至 64.0), C-2' 向高场移动了 δ: 10.68 (由 δ: 79.9 移至 δ: 69.2),显示 C-1' 羟基发生了酯化反应。通过 IR, ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 分析,表明经过酶催化反

应,在半乳糖 C1' 位羟基发生了酯化反应,所得产物为目标产物。

2.4 转化率的测定

2.4.1 色谱条件 载气 N_2 , 输出气压 3 Bar, 汽化温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~4 min, 15% A, 4~18 min, 90% A, 18~25 min, 15% A), 进样量 $50\text{ }\mu\text{L}$, 柱温 $35\text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取半乳糖 20 mg, 置于 2 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取酶催化反应产物液 $50\text{ }\mu\text{L}$, 用甲醇稀释 5 倍, 旋涡仪振荡 5 min, 离心 ($10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液, 即得。

2.4.4 反应初速度 (V_0) 测定 根据反应初始阶段单位时间内底物的减少量来计算初始反应速度。 $V_0 = (C_0 - C_t)/t$, 其中 C_0, C_t 分别表示反应前后半乳糖的摩尔浓度, t 为反应时间。

2.4.5 底物转化率 (C) 计算 根据底物的减少量与反应前底物量的比值来计算转化率。 $C = (C_0 - C_T)/C_0 \times 100\%$, 其中 C_0, C_T 分别表示反应前后半乳糖的摩尔浓度。

2.5 酶反应条件考察

2.5.1 酶种类 不同来源的脂肪酶, 虽然氨基酸残基的数量不等, 相对分子质量也各不相同, 但均具有典型的 α/β 水解酶结构^[6]。本实验采用乙烯酯作为活性酰基供体, 其产物乙醇可转化为不可逆的乙醛, 可能与酶中赖氨酸的末端氨基发生 Malillard 反应形成 Schiffs 碱, 从而使酶失活。当反应体系中有乙醛存在时, 有些酶(如 RCL 酶)会迅速失活; 而有些酶(如 Novozym 435, RMTL 等)则具有较强的抗乙醛性。按 2.1 项下方法加入不同来源的水解酶(Novozym435, TLIM, 胰蛋白酶、奶酪香精脂肪酶、木瓜蛋白酶和 CRL)各适量, 反应 8 h。结果测得 V_0 依次为 $14.8, 6.8, 4.2, 5.3, 5.1, 0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; C 分别为 $76.4\%, 58.5\%, 12.4\%, 51.7\%, 13.9\%, 5.85\%$ 。结果表明, 所考察的酶均能催化半乳糖与硬脂酸乙烯酯发生酯化反应, 但反应初速度 V_0 相差较大, 故选用 Novozym 435。

2.5.2 反应介质 Watanabe 发现加入在反应体系中加入适当的添加剂代替必需水, 有助于提高酶的柔性, 从而提高酶的立体选择性^[7]。按 2.1 项下方法加入 2 mL 不同脱水溶剂[二甲基亚砜(DMSO), 丙酮、吡啶, DMSO + THF(1:3), 富马酸二甲酯(DMF), 四氢呋喃(THF)], 测得底物转化率分别为

$42.1\%, 69.5\%, 65.3\%, 73.1\%, 50.2\%, 64.8\%$ 。故选取 DMSO + THF(1:3)。

2.5.3 加酶量 按 2.1 项下方法分别加入 200, 300, 400, 500, 600, 700 U 的 Novozym 435, 置于空气浴恒温振荡器内振荡 ($55\text{ }^\circ\text{C}, 250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 反应 8 h, 测得底物转化率分别为 $34.8\%, 36.1\%, 50.4\%, 62.3\%, 70.1\%, 71.5\%$; 故选取 $300\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为宜。

2.5.4 底物摩尔比 在本反应体系中, 硬脂酸乙烯酯的溶解性较好, 且能与酶形成中间四面体, 会直接影响整个反应速率, 因此选择硬脂酸乙烯酯过量, 有助于提高单位时间内转化率。按 2.1 项下方法分别加入半乳糖-硬脂酸乙烯酯(1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6), 反应 8 h, 测定底物转化率。结果表明, 当底物摩尔比增加, 单位时间内转化率增加, 当底物摩尔比为 1:4 时, 转化率达最高值。

2.5.5 反应温度 按 2.1 项下方法, 分别置于空气浴恒温振荡器内振荡 ($35, 40, 45, 50, 55\text{ }^\circ\text{C}, 250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 反应 8 h, 测定底物转化率。结果发现当温度 $<45\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 8 h 内转化率仅约 15%, 表明 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 为最佳反应温度。

3 讨论

本实验以酶法非水相催化合成具有靶向性脂质体材料, 通过实验得出最佳反应条件为以 Novozym 435 作催化剂, 半乳糖-硬脂酸乙烯酯摩尔比 1:4, 反应介质 DMSO + THF(1:3), $55\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 8 h, 酯化率 $>70\%$ 。反应体系为非水相, 反应条件温和, 产物单一, 几乎无副反应, 给后续纯化带来便利。

靶向脂质体与普通脂质体相比, 药物利用度更高, 药物全身毒副作用更小。陈志鹏等^[8]合成胆固醇-聚乙二醇-甘草次酸(Chol-PEG-GA)以修饰脂质体(CPGL), 用活体成像系统检测甘草次酸修饰脂质体在小鼠体内的分布, 发现与非靶向脂质体相比, CPGL 在体内有明显的长循环性和肝靶向性。本实验合成的半乳糖配体镶嵌于脂质体表面, 可提高脂质体药物肝靶向性, 有效提高肝癌药物的利用率, 同时减轻抗癌药物的全身性副作用, 为研制新型抗癌药物提供参考。

[参考文献]

- [1] Donati I, Gamini A, Vetere A, et al. Synthesis, characterization and preliminary biological study of glycoconjugates of poly(styrene-co-maleic acid) [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(4):805.

响应面法优选刺槐花中刺槐苷提取工艺

初正云^{1*}, 郑永芹¹, 程军²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 大连辉瑞制药有限公司, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 优化刺槐花中刺槐苷的提取工艺。方法: 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 采用响应面分析法优化乙醇体积分数、液料比、浸提时间及提取次数 4 个自变量对刺槐苷得率的影响, 利用 SAS 9.2 软件对试验数据进行回归分析。结果: 最佳提取工艺为加 23 倍量 76% 乙醇浸提 2 次, 每次 60 min。刺槐苷平均得率达 1.834%, 转移率 86.88%。结论: 优选的工艺条件稳定可行, 为刺槐花中刺槐苷的提取提供实验依据。

[关键词] 响应面法; 刺槐花; 刺槐苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0024-04

[doi] 10.11653/syfy2013100024

Optimization of Extraction Technology for Robinin from Flowers of *Robinia pseudoacacia* by Response Surface Method

CHU Zheng-yun^{1*}, ZHENG Yong-qin¹, CHENG Jun²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Pfizer Pharmaceutical, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of robinin from flowers of *Robinia pseudoacacia*. **Method:** According to the design principle of Box-Behnken, effects of ethanol volume fraction, liquid-material ratio, extraction time and extraction times on extraction rate of robinin were studied by response surface method, meanwhile regression analysis of these experimental data was used by SAS 9.2 software. **Result:** Optimum extraction conditions were obtained as follows: extracted 2 times with 23 times the amount of 76% ethanol, 60 min per time. Under these conditions, the average extraction rate of robinin could be up to 1.834% with the transfer

[收稿日期] 20121213(026)

[基金项目] 辽宁省科技攻关项目(2009209001)

[通讯作者] * 初正云, 教授, 从事中药资源与新药开发研究, Tel: 0411-87586003, E-mail: chuzhengyun@163.com

- [2] Wu J, Nantz M H, Zern M A. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications[J]. Front Biosci, 2002, 7: 717.
- [3] Wang S N, Deng Y H, Xu H, et al. Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 62(1): 32.
- [4] 程怡, 吴卫, 张冬青, 等. 非水相酶促催化合成去唾液酸糖蛋白配体修饰物 [J]. 药学学报, 2010, 45(9): 1134.
- [5] Yoshimoto K, Itatani Y, Tsuda Y. ¹³C-Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidation [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 28(7): 2065.
- [6] Pleiss J, Fischer M, Schmid R D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site [J]. Chem Phys Lipids, 1998, 93(1/2): 67.
- [7] Watanabe K, Koshiha T, Yasufuku Y, et al. Effects of substituent and temperature on enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy) propionic acids in organic solvents [J]. Bioorg Chem, 2001, 29(2): 65.
- [8] 陈志鹏, 肖璐, 李伟东, 等. 活体成像系统检测甘草次酸修饰脂质体在小鼠体内的分布 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 148.

[责任编辑 全燕]