

## · 药剂与工艺 ·

## 有机相脂肪酶催化合成脂质体修饰物胆固醇癸二酸单烯酯

聂 华, 郑品劲, 罗利华, 程 怡\*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 在非水相中利用酶法合成胆固醇癸二酸单烯酯, 并对其最优合成工艺条件进行研究。方法 利用 TLC、MS 和 NMR 法对合成产物进行结构鉴定; 通过正交试验对合成处方工艺进行优化。结果 最佳反应条件为胆固醇与癸二酸二乙酯物质的量之比为 1 : 6, *Candida rugosa* Lipase 10 mg/mL, 异辛烷 5 mL, 温度 35 °C, 反应时间 24 h。结论 该条件下酯化率可达 95% 以上。

**关键词:** 胆固醇; 去唾液酸糖蛋白受体; 酶催化; *Candida rugosa* Lipase; 胆固醇癸二酸单烯酯

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2013)23 - 3289 - 07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.007

## Lipase-catalyzed synthesis of cholesteryl vinyl hemi-sebacate for selective targeting of liposomes in organic media

NIE Hua, ZHENG Pin-jin, LUO Li-hua, CHENG Yi

College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To synthesize cholesteryl vinyl hemi-sebacate from cholesterol and divinyl sebacate in non aqueous phase. **Methods** TLC, MS, and NMR were used to identify the structure of production; the technological conditions of enzymatic esterification were determined through orthogonal test. **Results** The best condition: isooctane 5 mL, reaction temperature 35 °C, reaction time 24 h, *Candida rugosa* Lipase 10 mg/mL, molar ratio of cholesterol to divinyl sebacate 1 : 6. **Conclusion** The highest esterification rate is above 95%.

**Key words:** cholesterol; asialoglycoprotein receptor; lipase-catalyzed; *Candida rugosa* Lipase; cholesteryl vinyl hemi-sebacate

去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, 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<sup>[1]</sup>。ASGPR 是一种高效的内吞受体, 对末端含有半乳糖残基或 *N*-乙酰半乳糖胺基的化合物, 可特异性识别, 通过细胞内吞作用, 转运至细胞内<sup>[2]</sup>。已有研究者将半乳糖与药物偶联, 或者将半乳糖与药物载体偶联, 通过 ASGPR 内吞作用, 将药物转运到肝细胞内, 达到治疗肝病的目的。相对于传统药物, 带有半乳糖配体的药物, 肝靶向性更好, 利用效率更高, 全身副作用更小。

脂质体是良好的药物载体<sup>[3]</sup>, 如果将脂质体连

接半乳糖配基, 能极大提高脂质体在肝脏的聚集, 同时减少在血液中的滞留时间, 以及在其他脏器的分布。将半乳糖与脂质体偶联的方法已有诸多报道: Guo 等<sup>[4]</sup>将半乳糖与长链碳烃偶联, 使之具有双亲性, 然后亲油端与脂质体表层镶嵌, 半乳糖基伸向外部, 使脂质体具有靶向性, 通过对小鼠的体内代谢研究, 相对摄取率比普通脂质体提高了 1.5 倍。另有研究者通过化学合成的方法将胆固醇与半乳糖偶联, 得到 1 个胆甾半乳糖苷衍生物, 然后与卵磷脂一起制备脂质体。这种胆甾半乳糖苷衍生物可以取代胆固醇, 并且发挥与胆固醇相同的稳膜作用, 而且与脂质体的接合率大大提高。通过肝细胞摄取实

收稿日期: 2013-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772790)

作者简介: 聂 华 (1979—), 男, 湖北人, 博士研究生, 研究方向为药物载体及其新型给药系统。Tel: 13422158212 E-mail: niehua007@163.com

\*通信作者 程 怡, 教授, 博士生导师。E-mail: vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

验, 带有这种胆甾半乳糖配体的脂质体与普通脂质体相比, 相对摄取率提高 200 倍<sup>[5]</sup>。

一般认为 ASGPR 对半乳糖配体脂质体的识别能力受 3 方面影响: 一是半乳糖基在脂质体表面的分布密度<sup>[6]</sup>; 二是半乳糖基与脂质体的空间距离<sup>[7]</sup>; 三是半乳糖基与脂质体结合的稳定性。根据以上 3 个特点, 本实验设计合成一种新的胆固醇-癸二酸-半乳糖苷 (CHS-SE-LA) 配体分子, 其结构由“靶头”、“桥”、“锚” 3 部分构成。乳糖醇 (lactitol, LA) 是一种常见的双糖, 一端含有半乳糖基, 可以作为 ASGPR 受体的“靶头”, 另一端是开链的多元醇结构, 可以提供连接“桥”的活性醇羟基。胆固醇 (cholesterol, CHS) 被认为是脂质体的膜稳定剂<sup>[8]</sup>, 因为其立体空间构象可以使胆固醇与磷脂亲油端相互紧密嵌合而发挥稳膜作用, 这种立体的嵌合结构可以使 CHS 作为“锚”牢固镶嵌于脂质体膜表层。本实验选取癸二酸二乙烯酯 (divinyl sebacate, DS) 作为中间连接“桥”, 其碳链长度可以满足半乳糖基与脂质体的空间距离; 两端的乙烯酯是一种具有活性的酰基供体<sup>[9]</sup>, 与醇羟基发生酯交换反应时, 副产物乙烯醇会互变异构成为乙醛, 使反应易于向生成产物的方向进行。

生物酶如脂肪酶、蛋白酶等, 是一种高效的生物催化剂, 特别在糖酯的选择性合成方面极具优势<sup>[10-11]</sup>。酶催化具有高效、高选择性, 而且绿色环保, 被称之为绿色化学。本实验利用脂肪酶催化合成了胆固醇-半乳糖苷配体分子前半部分——胆固醇癸二酸单烯酯 (CHS-SE), 探讨了酶促合成的最优条件, 为进一步合成配体分子 (CHS-SE-LA) 奠定实验基础。

## 1 仪器与材料

Thermo TSQ Quantum ACCESS 三重四极杆液质联用仪 (赛默飞世尔科技有限公司); Bruker 400M 核磁共振波谱仪 (瑞士布鲁克公司); Nicolet 5DX 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Nicozet 公司); 高效液相色谱仪 (P680 型四元泵, PDA—100 型检测器, ASI—100 自动进样器, 美国戴安公司); BS110s 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); DKZ—1 电热恒温空气浴振荡槽 (上海精宏实验设备有限公司)。

DS (实验室自制, 质量分数 > 95%); CHS (Sigma-Aldrich 公司); Novozym 435 固定化脂肪酶、Lipozyme TLIM 脂肪酶 (均购自诺维信生物技术有限公司); *Candida rugosa* Lipase RCL 酶 (Sigma 公

司), *Penicillium expansum* PEL 酶 (深圳绿微康生物工程有限公司), 分子筛 4Å 型 (天津市福晨化学试剂厂)。

甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 丙酮、正己烷、异辛烷等试剂均为分析纯 (已脱水处理)。

## 2 方法与结果

### 2.1 CHS-SE 酶催化反应

取 10 mL 带塞锥形瓶, 加入 DS、CHS 和溶剂适量, 置于恒温振荡器振摇 30 min, 加入酶适量启动反应, 反应结束后, 滤过除去酶, 回收溶剂, 即得产物。

### 2.2 产物纯化处理

葡聚糖凝胶 LH-20 装填色谱柱, 将酶促反应后的溶液用洗脱液溶解上样, 利用氯仿-甲醇 (1:1) 洗脱, 洗脱液以 TLC 分析, 收集合并产物部分, 挥干, 得白色固体产物。

### 2.3 酯化率的测定

**2.3.1 液相色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-正己烷 (9:1), 等度洗脱; 进样量 10 μL; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min。

**2.3.2 CHS 标准曲线制备** 精密称取 CHS, 甲醇溶解, 分别制得质量浓度分别为 0.5、1、3、5、7、9、10、15 mg/mL 的溶液, 进液相分析。以 CHS 峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 得回归方程为  $Y=29.044 X+14.658$ ,  $r^2=0.994 8$ , 结果表明 CHS 在 0.5~15 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

**2.3.3 酯化率的计算** 根据底物的减少量与反应前底物量的比值来计算酯化率。酯化率 =  $(\rho_0 - \rho_t) / \rho_0$ , 其中  $\rho_0$ 、 $\rho_t$  分别表示反应前后 CHS 的质量浓度 (mg/mL) <sup>[12]</sup>。

### 2.4 酶活力测定

脂肪酶酯化活性的测定参照 Petkar 等<sup>[13]</sup>的方法并稍作改进。在 50 mL 带塞三角瓶中加入 3 mL 水饱和的异辛烷、1 mmol 月桂酸、2 mmol 十八醇混合均匀, 置于恒温振荡器内 (37 °C, 250 r/min), 预热 20 min, 加入一定量的酶振荡, 计时 20 min 后, 加入 10 mL 乙醇淬灭反应, 立即用 0.05 mol/L NaOH 醇溶液进行滴定, 以酚酞试剂作指示剂。1 U 定义为在 37 °C 下, 1 min 内合成 1 μmol 月桂酸十八酯所需要的酶量。Novozym 435、Lipozyme TLIM、*P. expansum* PEL、*C. rugosa* RCL 酶活性分别为 798、330、69、628 U/g。

## 2.5 癸二酸二乙烯酯的制备

癸二酸二乙烯酯的制备参照王利娟等<sup>[14]</sup>的方法并稍作改进。取 72.8 g (0.36 mol) 癸二酸、150 mL 醋酸乙烯酯 (1.62 mol)、2.1 g 醋酸汞及微量醋酸铜, 加入 250 mL 三口颈烧瓶中。将盛有上述物质的三口颈烧瓶在 50 °C 的恒温水浴中加热并搅拌, 几分钟后滴加 0.25 mL 浓硫酸, 反应 8 h。反应完毕后, 加入约 2 g 醋酸钠充分振荡以中和硫酸。水泵减压蒸馏除去过量醋酸乙烯酯后, 将剩余蓝色溶液上柱分离。以硅胶为固定相, 流动相为石油醚-醋酸乙酯 (9:1), 分离得到纯品。结构经 MS、NMR 鉴定, 质量分数 >95%。MS:  $[M+Na]^+$  277;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.32~7.25 (m, 2H), 4.87 (dd,  $J = 14.0, 1.2$  Hz, 2H), 4.56 (dd,  $J = 6.3, 1.2$  Hz, 2H), 2.37 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H), 1.81~1.47 (m, 4H), 1.33 (d,  $J = 15.9$  Hz, 8H);  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 171.21,

141.58, 97.85, 34.29, 29.37, 29.32, 24.93。

## 2.6 单因素试验考察酶促反应条件

**2.6.1 酶和反应溶剂的影响** 根据文献报道<sup>[15-19]</sup>, 本研究考察了 4 种常见脂肪酶 (表 1), 这些脂肪酶已商品化, 廉价易得, 均有相关文献报道用于胆固醇酯的合成。反应条件: 酶 30 U, 底物 CHS 与 DS 物质的量之比为 1:2, 溶剂 5 mL, 反应温度 45 °C, 搅拌转速 250 r/min, 反应时间 3 h。一般来说, 溶剂的疏水性对酶促反应至关重要, 因为极性溶剂容易夺去酶表面的必需水, 造成酶失活; 而在非极性溶剂中, 酶能保持较高的稳定性, 不易失活。溶剂的疏水性能通常用  $\log P$  值表示,  $\log P$  值越大, 疏水性越强, 但是并非选择溶剂极性越小越好, 还要考虑反应底物在溶剂中的溶解度。实验中, 以  $\log P$  值来表示所用溶剂极性大小, 分别考察了 3 种不同极性的溶剂, 结果见表 1。

表 1 酶的种类和溶剂极性对酯化反应的影响

Table 1 Effect of lipase types and organic solvents on esterification

溶剂	$\log P$	酯化率 / %			
		Novozym 435	Lipozyme TLIM	<i>P. expansum</i> PEL	<i>C. rugosa</i> RCL
正己烷	3.5	1.24	8.82	4.53	69.34
丙酮	-0.23	1.05	4.46	1.76	6.11
异辛烷	4.7	1.38	8.90	3.98	77.01

实验结果显示, 不同的酶酯化率差异很大, 而且溶剂的极性对酯化率影响也很显著。众所周知, 酶的各种催化特性取决于酶的结构, 特别是活性中心的结构。X 射线衍射研究结果表明, Novozym 435 活性中心呈窄长的烟囱状<sup>[20]</sup>, 其活性中心的有效底物键合空间非常有限, 因此对短链的脂肪酸酯催化活性较高, 当碳链长大于 4 时, 催化活性急剧下降, DS 碳链长为 10, 由于空间位阻, 不易进入 Novozym 435 活性中心, 因此反应 3 h, 仅检测到微量产物。Lipozyme TLIM 活性中心位于蛋白质表面的疏水性裂缝中, 包括 1 个疏水性的酰基键合区域和 1 个亲水性的醇基键合区域<sup>[21]</sup>, 相对于 Novozym 435, 其活性中心区域比较宽广, 对于催化长链的酰基供体比较有利, 因此酯化率高于 Novozym 435; 但是醇羟基位于胆固醇核的碳环上, 胆固醇核的立体空间结构带来较大位阻, 使底物不易进入醇基键合区, 导致 Lipozyme TLIM 催化酯化率仍然偏低。*P. expansum* PEL 为碱性脂肪酶, 最适宜 pH 值为 9.3, 本反应体系为中性略偏酸性, 使其反应活性较低;

而且 *P. expansum* PEL 为酶粉, 稳定性差, 较易失活, 因此 3 h 最高酯化率仅有 4%。*C. rugosa* RCL 在反应中表现出最高的催化活性, 在异辛烷中 3 h 达到 77% 的转化率。X 射线衍射研究表明, *C. rugosa* RCL 活性中心非常宽广, 可以容纳体积较大的底物分子, 而且活性中心结构能与 CHS 分子较精确嵌合<sup>[22]</sup>, 因此对胆固醇酯有特别高的催化活性; 但在丙酮等中等极性的溶剂中却表现出很低的催化活性, 这可能与丙酮容易夺去酶表面必需水, 导致酶失活有关; *C. rugosa* RCL 的活性中心被  $\alpha$ -螺旋型盖子所覆盖, 盖子面向活性位点的一面是疏水的, 而背向一面是亲水的<sup>[23]</sup>, 当在异辛烷这类疏水性介质中时, 盖子打开, 暴露出活性中心, 发挥催化作用; 而在丙酮这类亲水性溶剂中, 盖子是闭合的, 底物不易进入活性中心而不能发挥催化作用。因此, 最适合的反应溶剂与酶是异辛烷与 *C. rugosa* RCL。

**2.6.2 酶量及反应时间的影响** 为了考察酶的用量对酯化率的影响, 选取酶的用量为 2~10 mg/mL, 考察酯化率变化情况。反应条件: *C. rugosa* RCL 酶,

底物 CHS-DS 物质的量之比 1:2, 异辛烷 5 mL, 反应时间 36 h, 搅拌转速 250 r/min, 反应温度 45 °C。结果见图 1。很明显, 在没有加酶的情况下, 几乎没有酯化产物生成。随着酶量的增加, 酯化反应速率和酯化率都在不断增加。当酶量增加到 4 mg/mL 时候, 酯化率已达到 90%以上, 当增加到 6 mg/mL 以后, 酯化率没有明显提升, 继续增加酶用量, 酯化率趋于平缓, 不再增加。虽然更高酶量 10 mg/mL 能稍微提高酯化率, 4 mg/mL 已经达到 93% 以上酯化率, 与 10 mg/mL 酯化率 (95%) 相比, 没有显著性差异。因此从经济实用来说 4 mg/mL 的酶量是最佳选择。从时间-酯化率曲线图上看, 前 1.5 h, 酯化率随时间呈线性增长关系, 其斜率为反应初速度, 酶浓度越大, 初速度越大; 到 6 h 左右, 酯化率趋于平缓, 到 24 h 后, 酯化率基本不再增加, 达到平衡。进一步增加反应时间, 观测到少量二元酯化产物生成, 因此, 24 h 为最佳反应时间。

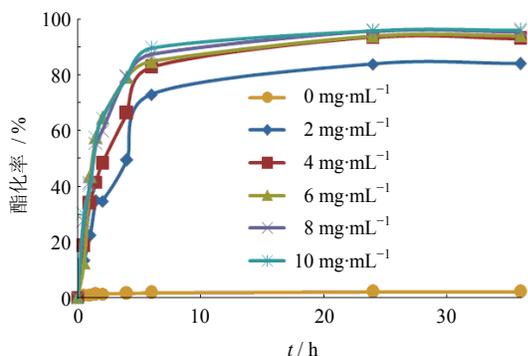


图 1 酶量及反应时间对酯化反应的影响  
Fig. 1 Effect of lipase types and reaction time on esterification

**2.6.3 酰基供体的影响** 本实验考察了癸二酸和 DS 作为酰基供体时对酯化率的影响。反应条件: 4 mg/mL *C. rugosa* RCL, 底物 CHS-DS 物质的量之比为 1:2, 异辛烷 5 mL, 反应时间 36 h, 搅拌转速 250 r/min, 反应温度 45 °C。结果见图 2。很明显, DS 的酯化率和反应速率远远高于癸二酸。因为癸二酸的酯化副产物是水, 当反应体系中水达到一定量, 反应达到平衡, 酯化率不再增加。曾考虑加入分子筛以除去反应生成的水, 但是酯化率急剧下降, 推测可能是分子筛夺去酶 *C. rugosa* RCL 表层必需水而导致酶迅速失活; 反应中监测到大量二元酯化产物生成, 可能因为癸二酸为二元酸, 在异辛烷中溶解性较差, 癸二酸与胆固醇单酯化产物因为易溶于异辛烷而进一步酯化生成二元酯副产物, 导致目

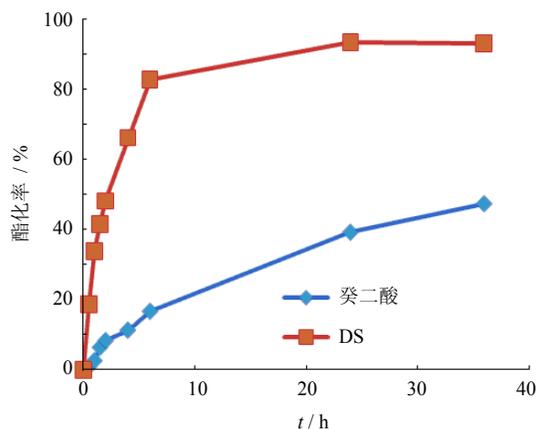


图 2 酰基供体对酯化反应的影响  
Fig. 2 Effect of acyldonors on esterification

标产物得率下降。DS 在常温下为液体, 在异辛烷中有良好的溶解度, 并且其副产物乙烯醇会迅速转变成乙醛而挥发掉, 导致反应不可逆转, 有利于反应向生成产物的方向移动。因此 DS 是合适的酰基供体。

**2.6.4 温度的影响** 酶促反应同其他化学反应一样, 受温度影响较大, 在一定温度范围内, 温度升高, 底物分子的能量增加, 单位时间内有效碰撞次数相应增加, 因而酶促反应速度加快; 但酶蛋白属于生物大分子, 当温度超出一定范围后, 随着温度的升高, 部分酶蛋白开始失活变性, 酶促反应速度下降。文献报道 *C. rugosa* RCL 在温度 55 °C 以内具有活性<sup>[24]</sup>, 因此本实验考察了反应温度分别为 30、35、40、45、50 °C 对酯化率的影响。反应条件: 4 mg/mL *C. rugosa* RCL 酶, 底物 CHS-DS 物质的量之比为 1:2, 异辛烷 5 mL, 反应时间 36 h, 搅拌转速 250 r/min。结果酯化率分别为 48.13%、59.40%、66.75%、74.93%、52.40%。很显然, 酶 *C. rugosa* RCL 的最佳反应温度为 45 °C。

**2.6.5 底物物质的量之比的影响** 酶催化胆固醇酯化反应属于双底物反应, DS 作为酰基供体, 其浓度必然对反应有一定的影响。同时, 在此反应中还存在 2 个副反应, 酶促酰基供体水解反应和单酯的进一步酯化反应。因此 DS 过量是必须的。为研究底物物质的量之比对酯化率的影响, 将胆固醇物质的量固定为 26 mmol, 加入 CHS 物质的量的 1、2、3、4 倍量的酰基供体, 反应条件: 4 mg/mL *C. rugosa* RCL 酶, 异辛烷 5 mL, 反应时间 36 h, 搅拌速度 250 r/min, 反应结果酯化率分别为 79.01%、93.14%、94.23%、94.85%。物质的量之比为 1:1 时, 酯化

率只有 80%左右,这可能与部分酰基供体被水解有关,当增加到 1:2 时,酯化率急剧增加到 93%,继续增加比例,酯化率变化趋于平缓。物质的量之比为 1:3 和 1:4 时酯化率基本稳定在 95%左右,达到最大值。

## 2.7 正交试验设计

**2.7.1 试验设计** 前期实验中以 CHS 的酯化率为指标,对酶促反应条件进行了单因素考察,发现时间、酶量和底物 CHS-DS 物质的量之比 3 个因素对酯化率影响较大,而温度的影响不显著。因此固定反应温度为 35 °C,以酶量(A)、反应时间(B)和底物 CHS-DS 物质的量之比(C)为主因素,以 CHS-SE 的产率为评价指标,对酶促反应条件进行优化,因素与水平安排见表 2,所有实验均重复 3 次。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	B/h	C	D (空白)	CHS-SE 产率 / %
1	6 (2)	14 (2)	1:3 (1)	2 (2)	38.04
2	2 (1)	14 (2)	1:9 (3)	3 (3)	85.11
3	2 (1)	4 (1)	1:3 (1)	1 (1)	33.89
4	10 (3)	24 (3)	1:3 (1)	3 (3)	49.94
5	6 (2)	24 (3)	1:9 (3)	1 (1)	92.08
6	10 (3)	14 (2)	1:6 (2)	1 (1)	95.21
7	10 (3)	4 (1)	1:9 (3)	2 (2)	88.39
8	2 (1)	24 (3)	1:6 (2)	2 (2)	89.43
9	6 (2)	4 (1)	1:6 (2)	3 (3)	84.22
K <sub>1</sub>	208.43	206.50	121.87	221.18	
K <sub>2</sub>	214.34	218.36	268.86	215.86	
K <sub>3</sub>	233.54	231.45	265.58	219.27	
R	25.11	24.95	146.99	5.32	

**2.7.2 CHS-SE 产率的测定** 产率测定方法:吸取 100 μL 反应体系上清液,用 400 μL 乙醇稀释后,通过 0.45 μm 滤膜后注入液相色谱测定。液相色谱条件同“2.3.1”项。

产率计算方法:精确称量不同质量的 CHS-SE 纯品,通过液相色谱分析,得到 CHS-SE 质量与液相色谱峰面积的标准曲线和归一化方程,采用归一化方程计算 CHS-SE 的生成量,换算为 CHS 的消耗量,以 CHS 消耗量与 CHS 初始量的比值来表示 CHS-SE 产率<sup>[25]</sup>。

**2.7.3 正交试验结果分析** 试验结果利用 SPSS 软

件进行方差分析,结果见表 3。3 个因素对酶促反应结果均有显著性影响,作用显著性的顺序依次为底物物质的量之比>酶量>反应时间。最优反应条件是酶量为 10 mg/mL,底物 CHS-DS 物质的量之比为 1:6,反应时间为 24 h。根据正交优化结果,对最优条件进行实验验证,3 批 CHS-SE 产率分别为 95.4%、96.8%、96.1%。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	III 型平方和	自由度	F 值	显著性
校正模型	4 915.330	6	338.377	P<0.01
截距	47 860.313	1	19 768.548	P<0.01
酶量	114.898	2	23.729	P<0.05
反应时间	103.834	2	21.444	P<0.05
底物物质的 量之比	4 696.598	2	969.957	P<0.01
空白列	4.842	2		
总计	52 780.485	9		
校正的总计	4 920.172	8		

$R^2=0.999$  (调整  $R^2=0.996$ )

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$   $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

## 2.8 产物结构表征

取反应液 100 μL,用乙醇稀释 5 倍,供 TLC 分析。展开剂为环己烷-醋酸乙酯(95:5),显色剂为 5%硫酸乙醇,喷板后置于 110 °C 烘箱 5 min 显色。CHS、DS 和 CHS-SE Rf 值分别为 0.2~0.4、0.6~0.7、0.7~0.8。

MS: ESI (+) 源模式;喷雾电压 3 kV;毛细管温度为 350 °C。MS 谱图显示 [M+Na] 峰: 619.5,揭示产物相对分子质量为 596.5,与目标物相对分子质量 596.2 相吻合。

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 173.57 (C-28), 171.15 (C-37), 141.50 (C-38), 140.02 (C-6), 122.90 (C-9), 97.76 (C-39), 74.01 (C-2), 56.99 (C-14), 56.43 (C-15), 50.32 (C-7), 42.61 (C-13), 40.03 (C-12), 39.82 (C-22), 38.46 (C-4), 37.30 (C-3), 36.90 (C-5), 36.48 (C-20), 36.09 (C-18), 34.97 (C-29), 34.22 (C-36), 32.21 (C-10), 32.16 (C-8), 29.34 (C-31), 29.32 (C-32), 29.26 (C-34), 28.53 (C-16), 28.32 (C-23), 28.12 (C-1), 25.30 (C-30), 24.85 (C-35), 24.58 (C-17), 24.13 (C-21), 23.12 (C-25), 22.86 (C-24), 21.33 (C-11), 19.63 (C-27), 19.01 (C-19), 12.16 (C-26)。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.28 (m, 1H), 5.37 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.87 (dd,  $J = 14.0, 1.5$  Hz, 1H), 4.65~4.53 (m, 2H), 2.38 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.35~2.22 (m, 4H), 2.06~1.93 (m, 2H), 1.93~1.81 (m, 3H), 1.81~1.58 (m, 5H), 1.58~1.22 (m, 20H), 1.22~0.83 (m, 22H)。 $\delta$  173.57 与 171.15 为 DS 羰基碳 (C=O) 特征峰,  $\delta$  141.50 与 97.76 归属为乙烯酯双键碳对应峰, 说明 DS 只有一端与 CHS 发生的酯交换反应;  $\delta$  140.02 与 122.90 分别为 CHS 环内 C=C 所对应的峰,  $\delta$  71.81 (来源 AIST) 原为 CHS OH-C 峰位移值, 酯化后, 位移值偏移至  $\delta$  74.01。 $^1\text{H-NMR}$  中  $\delta$  7.28 为末端乙烯酯双键碳上的氢,  $\delta$  5.37 归属为产物 CHS 部分环内双键碳上氢, 与 CHS 双键碳上氢  $\delta$  5.349 (来源 AIST) 相吻合。 $\delta$  4.65 为产物羟基碳上氢, 较 CHS 羟基碳上氢  $\delta$  3.524 (来源 AIST) 向低场偏移约 1 个  $10^{-6}$ , 符合酯化反应位移特征。综上所述, 确定合成产物为目标产物。

### 3 讨论

通过对酶促反应条件的研究, 得出最优条件为 *C. rugosa* RCL 10 mg/mL, 异辛烷 5 mL, CHS-DS 物质的量之比为 1 : 6, 搅拌速度 250 r/min, 35 °C 下反应 24 h, 最高酯化率为 96.8%。本实验利用酶催化合成了 CHS-SE, 收率高, 质量分数可达 95% 以上, 几乎无副反应, 纯化简单, 而且反应条件温和, 绿色环保。

CHS 作为脂质体的组成部分之一, 因其具有“锚”的作用而能固定于脂质体表层<sup>[4,26-27]</sup>, 经常用于与各种配基偶联。本实验室合成的 CHS-SE, 因其末端仍保留有活性的烯醇酯结构, 能方便与其他带有亲核基团的底物偶联, 为制备带不同配基的脂质体提供了有益的思路。在后续实验中, 将以 CHS-SE 和 LA 为反应底物, 进一步探讨非水相中利用酶法催化合成 CHS-SE-LA 分子的反应条件。

### 参考文献

- [1] Fallon R J, Schwartz A L. Receptor-mediated delivery of drugs to hepatocytes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1989, 4(1): 49-63.
- [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: 717-725.
- [3] 程怡, 吴琼, 余秋强, 等. Box-Behnken 效应面法优化多西他赛长循环脂质体处方 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1946-1950.
- [4] Guo B H, Cheng Y, Lin L P, *et al.* Preparation and characterization of galactose-modified liposomes by a nonaqueous enzymatic reaction [J]. *J Liposome Res*, 2011, 21(3): 255-260.
- [5] Slidregt L A J M, Rensen P C N, Rump E T, *et al.* Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. *J Med Chem*, 1999, 42(4): 609-618.
- [6] Nishikawa M, Miyazaki C, Yamashita F, *et al.* Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5 Pt 1): G849-G856.
- [7] Biessen E A L, Beuting D M, Roelen H C P F, *et al.* Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(9): 1538-1546.
- [8] Grit M, Crommelin D J. Chemical stability of liposomes: Implications for their physical stability [J]. *Chem Phys Lipids*, 1993, 64(1/3): 3-18.
- [9] Kita Y, Takebe Y, Murata K, *et al.* Convenient enzymatic resolution of alcohols using highly reactive, nonharmful acyl donors, 1-ethoxyvinyl esters [J]. *J Org Chem*, 2000, 65(1): 83-88.
- [10] Gross R A, Kumar A, Kalra B. Polymer synthesis by *in vitro* enzyme catalysis [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(7): 2097-2124.
- [11] Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic polymerization [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(12): 3793-3818.
- [12] 毛勇, 徐达, 杨博, 等. 有机相脂肪酶催化合成棕榈酸植物甾醇酯 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(12): 25-27.
- [13] Petkar M, Lali A, Caimi P, *et al.* Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis [J]. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2006, 39(1/4): 83-90.
- [14] 王利娟, 刘淮, 郭登峰, 等. 乙烯基交换合成壬酸乙酯工艺研究 [J]. *热固性树脂*, 2012, 27(4): 29-32.
- [15] Villeneuve P, Turon F, Caro Y, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2005, 37(1): 150-155.
- [16] Kim B H, Akoh C C. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1): 336-342.
- [17] Weber N, Weitkamp P, Mukherjee K D. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification *in vacuo* using *Candida rugosa* lipase as catalyst [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(1): 67-71.

- [18] He W S, Jia C S, Ma Y, *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media [J]. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2010, 67(1/2): 60-65.
- [19] Weber N, Weitkamp P, Mukherjee K D. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(1): 67-71.
- [20] Uppenberg J, Oehrner N, Norin M, *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(51): 16838-16851.
- [21] Lawson D M, Brzozowski A M, Rety S, *et al.* Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling [J]. *Protein Eng*, 1994, 7(4): 543-550.
- [22] Ghosh D, Wawrzak Z, Pletnev V Z, *et al.* Structure of uncomplexed and linoleate-bound *Candida cylindracea* cholesterol esterase [J]. *Structure*, 1995, 3(3): 279-288.
- [23] Lee G C, Lee L C, Sava V, *et al.* Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* LIP2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris* [J]. *Biochem J*, 2002, 366(Pt 2): 603-611.
- [24] Tenkanen M, Kontkanen H, Isoniemi R, *et al.* Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(1/2): 120-127.
- [25] 赵江, 胡松青. 响应曲面法优化非水相酶催化合成乳酸乙酯 [J]. *现代食品科技*, 2009, 25(11): 1320-1322.
- [26] Kawakami S, Wong J, Sato A, *et al.* Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1524(2/3): 258-265.
- [27] 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): 32-38.