

人参寡肽的合成

范崇旭^{* 1} 叶蕴华¹ 邢其毅

(北京大学化学与分子工程学院 生物有机与分子工程教育部重点实验室 北京 100871)

摘要 使用溶液法和有机磷肽缩合试剂 DEPBT 合成并从小人参中分离鉴定的三个寡肽, *N,N'*-双-(γ -谷氨酰甘氨酸)胱氨酸 **1**, *N,N'*-双- γ -谷氨酰胱氨酸甘氨酸 **2**, γ -谷氨酰胱氨酸-双-甘氨酸 **3**, 以及 γ -谷氨酰甘氨酸半胱氨酸 **4**. 产物经离子交换树脂柱或 HPLC 纯化, 用质谱、核磁共振谱、氨基酸分析进行了验证.

关键词 人参, 寡肽, 合成

Synthesis of Ginseng Oligopeptides

FAN Chong-Xu¹ YE Yun-Hua¹ XING Qi-Yi

(The Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering, Ministry of Education,
College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract In the course of our investigation of the water-soluble constituents of ginseng, some oligopeptides, oxidized glutathione, *N,N'*-bis-(γ -glutamylglycyl)cystine **1**, *N,N'*-bis- γ -glutamylcystinylglycine **2**, *N*- γ -glutamylcystinyl-bis-glycine **3** and γ -glutamylcystinylglycinamide disulfide were isolated for the first time from aqueous extracts of *Panax ginseng* root. Here the chemical synthesis of peptide **1**, **2**, **3**, and γ -glutamylglycylcystine **4** was described. All peptides were prepared by solution method and using an organophosphorus compound 3-(3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4-(3H)-one (DEPBT) as a coupling reagent. The synthesis of asymmetrical disulfides, peptide **2** and **3**, based on glutathione (GSH) thiolysis of the thiolsulfonate derivatives of corresponding peptides *N,N'*- γ -glutamylcystine and cystinyl-bis-glycine. The final products were separated from contaminating compounds by ion-exchange chromatography or HPLC and confirmed by MS, NMR and amino acid analysis.

Keywords *Panax ginseng*, oligopeptide, synthesis

人参(*Panax ginseng*)是我国名贵的中草药,功能大补元气、补脾益肺、生津安神. 研究表明人参具有调节中枢神经、调节心血管系统、改善学习记忆、增强免疫功能等作用^[1~4]. 有关人参化学成分研究已有近百年的历史,其中大部分工作是关于人参皂甙的研究,到目前已分离鉴定了 20 余种皂甙单体,

它们被认为是人参的主要药效成分. 有关人参水溶性化学成分,尤其是多肽、非蛋白氨基酸的研究报道却很少. 本实验室从 1986 年开始人参水溶性化学成分研究,已从人参中分离鉴定了多种非蛋白氨基酸和多肽^[5~7]. 非蛋白氨基酸有: β -草酰基- α,β -二氨基丙酸、 γ -氨基丁酸等. 寡肽有:氧化型谷胱甘

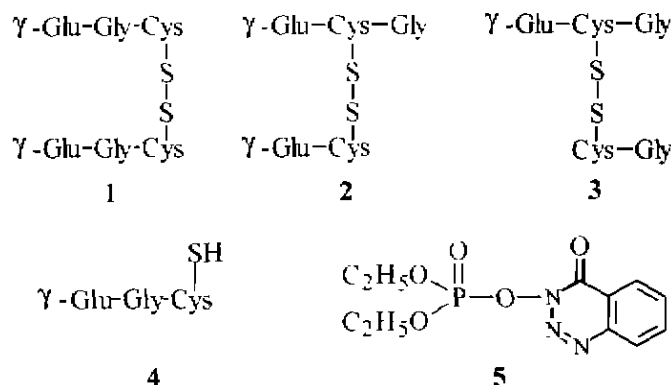
* E-mail: yhye@pku.edu.cn ** 作者现工作单位:中国人民解放军防化研究院,北京

收稿日期: 2001-06-25, 定稿日期: 2001-08-15, 高等学校博士点基金资助项目

(Received June 25, 2001. Accepted August 15, 2001)

肽, 氧化型谷胱胱肽[N, N' -双-(γ -谷氨酰甘氨酸)胱氨酸, 1], C -端缺少一个甘氨酸的氧化型谷胱胱肽(N, N' -双- γ -谷氨酰胱氨酸, 2), N -端缺少一个谷氨酸的氧化型谷胱胱肽(N - γ -谷氨酰胱氨酸-双-甘氨酸, 3)和氧化型谷胱胱肽

胺, 为进一步研究所分离鉴定的人参肽, 本文用溶液法及本实验室开发研究的有机磷肽缩合试剂 DEPBT 5⁸ 合成了人参肽 1, 2, 3 以及还原型谷胱胱肽(γ -谷氨酰甘氨酸半胱氨酸, 4)。



1 实验部分

1.1 仪器与试剂

FH8802-2 紫外检测器; Beckman 121MB 氨基酸自动分析仪; Waters 600E 高效液相色谱仪; ZAB-HS 质谱仪; Bruker ARX-400 核磁共振仪; Flexi-Dry 冷冻干燥机; 三氟甲磺酸, E. Merck 公司; 水合茚三酮, A. R., 上海试剂三厂; 醋酸汞, A. R., 上海试剂总厂第四分厂; 氨基酸及还原型谷胱胱肽, 生化试剂, 上海东风生化试剂厂; 其余化学试剂为 A. R. 级, 北京化工厂; 有机磷缩合试剂 DEPBT 为本实验室自制。

1.2 化合物的合成

所有保护氨基酸均按文献方法进行合成, 中间体的合成步骤类同, 不一一列出, 以下给出 DEPBT 催化肽合成采用的一般步骤:

等摩尔的羧基组分和氨基组分溶于适量的 N, N -二甲基甲酰胺中, 加入 2.5 倍量的三乙胺, 等摩尔的 DEPBT, 室温搅拌过夜, 向反应体系中加入饱和氯化钠溶液, 然后用乙酸乙酯提取三次, 酯层合并后分别用 5% 碳酸钠溶液, 1 mol/L 盐酸, 水(两次), 饱和氯化钠溶液洗涤, 加入无水硫酸镁干燥, 过滤, 蒸掉乙酸乙酯, 得到产物, 用适当的溶剂进行重结晶。

1.2.1 N, N' -双(苄氧羰基谷氨酸- α -苄酯- γ -甘氨酸)胱氨酸二苄酯 [Z -Glu(α -OBzl)GlyCysOBzl]₂ Z -Glu- α -OBzl 1.64 g (4.4 mmol), (GlyCysOBzl·HCl)₂ 1.34 g (2.2 mmol) 溶于 25

mL N, N -二甲基甲酰胺中, 加入三乙胺 1.4 mL (10 mmol), 加入 DEPBT 1.32 g (4.4 mmol), 室温搅拌过夜, 向反应体系中加入饱和氯化钠溶液 150 mL, 5% 碳酸钠 15 mL, 然后用乙酸乙酯提取三次 (50 mL \times 3), 酯层合并后分别用 5% 碳酸钠溶液, 1 mol/L 盐酸, 水(两次), 饱和氯化钠溶液洗涤, 用无水硫酸镁干燥, TLC 检测为单点 (R_f = 0.69, 氯仿: 甲醇 = 9:1 展开), 过滤, 蒸掉乙酸乙酯, 得到淡黄色固体, 用甲醇重结晶得到白色粉末状固体, 重 1.1 g, 产率 40.3%, m. p. 150 ~ 155°C, $[\alpha]_D^{20}$ = 41.9 (c 1.07, DMF), FAB-MS m/z : 1242 ($M + H$)⁺, Anal. Calcd for C₆₄H₆₈N₆O₁₆S₂: C 61.92, H 5.52, N 6.77; found C 61.50, H 5.50, N 6.71.

1.2.2 N, N' -双-(γ -谷氨酰甘氨酸)胱氨酸(1)

将上述保护肽 800 mg (0.6 mmol), 用液体 HF 脱保护, 冻干后得粗品约 300 mg, 使用 HCOO⁻ 型阴离子交换柱 (Dowex 1 \times 8, 100 ~ 200 mesh, 1 \times 15 cm) 对其进行纯化, 用 UV 检测器 220 nm 检测, 将样品溶于去离子水中 (300 mL) 上样, 然后用水洗至紫外检测无峰出现, 再用 0.05 mol/L 甲酸洗脱至紫外检测无峰出现, 改用 0.15 mol/L 的甲酸洗脱, 此时产品峰出现, 收集产品峰, 冻干得纯肽样品 180 mg. TCL 检测, R_f = 0.04 (正丁醇: 乙醇: 乙酸: 水 = 4:1:1:2 展开), $[\alpha]_D^{20}$ = 74.3 (c 0.56, H₂O), ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 2.16 ~ 2.19 (m, 4H, Glu- β H), 2.51 ~ 2.55 (m, 4H, Glu- γ H), 3.06 ~ 3.12 (m, 2H, Cys- β H), 3.29 ~ 3.34 (m, 2H, Cys- γ H), 3.84 ~ 3.87

(m, 2H, Glu- α H), 3.97(s, 4H, Gly- α H), 4.67~4.70(m, 2H, Cys- α H), FAB-MS m/z : 613(M+H)⁺, 氨基酸分析 Glu:Cys:Gly=1.15:1.00:0.95.

1.2.3 S-苄基-N-苄氧羰基谷氨酸- α -苄酯- γ -甘氨酸半胱氨酸苄酯 Z-Glu(α -OBzl)GlyCys(SBzl)Obzl GlyCys(SBzl)OBzl·HCl 1.45 g (3.7 mmol), Z-Glu- α -OBzl 1.37 g (3.7 mmol)溶于20 mL N,N-二甲基甲酰胺中,加入三乙胺 1.2 mL, DEPBT 1.11 g (3.7 mmol)室温搅拌过夜,加入饱和氯化钠溶液 100 mL, 5%碳酸钠溶液 10 mL,用乙酸乙酯提取,该肽在乙酸乙酯中溶解度不好,有固体不溶,滤出,酯层分别用 5%碳酸钠溶液, 1 mol/L 盐酸,水(两次),饱和氯化钠溶液洗涤,用无水硫酸镁干燥,蒸去乙酸乙酯,与过滤得到的固体合并,加丙酮溶解,滤掉不溶杂质,蒸干,得淡黄色固体,用甲醇(20 mL)重结晶得白色晶体 1.58 g,产率 60.4%, R_f =0.73(氯仿:甲醇=9:1展开), m.p. 126~128°C, $[\alpha]_D^{20}$ -29.1(c 0.96, DMF), FAB-MS m/z : 712(M+H)⁺, Anal. Calcd for C₃₉H₄₁N₃O₈S: C 65.80, H 5.81, N 5.90; found C 65.78, H 5.71, N 6.02.

1.2.4 γ -谷氨酰甘氨酸半胱氨酸(4) 1 g (1.4 mmol)的上述保护肽溶于约 70 mL 新蒸的液氨中,干冰冷却搅拌,加入新切的小块钠,至溶液呈蓝色并保持 4 min 以上不褪色,加入硫酸铵固体,使溶液蓝色褪掉,自然升温,蒸去氨得白色粉末,将其溶于 25 mL 10%乙酸溶液中,加入乙酸汞在 10%乙酸中的饱和溶液,有白色沉淀生成,加至无沉淀生成为止,放入冰箱过夜,离心,倾去上清液,用去离子水反复洗 3 次,最后将沉淀悬浮于 30 mL 去离子水中,通入过量硫化氢气体,有黑色沉淀生成,过滤除去沉淀,得无色液体,冻干后得肽 110 mg, R_f =0.26(正丁醇:乙醇:乙酸:水=4:1:1:2展开), $[\alpha]_D^{20}$ +7.96(c 0.54, H₂O), ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 2.17~2.21(m, 2H, Glu- β H), 2.51~2.56(m, 2H, Glu- γ H), 2.96~2.98(m, 2H, Cys- β H), 3.90~3.93(m, 1H, Glu- α H), 3.98(s, 2H, Gly- α H), 4.61~4.63(m, 1H, Cys- α H), FAB-MS m/z : 615(2M+H)⁺, 308(M+H), 氨基酸分析 Glu:Gly:Cys=1.09:1.00:0.90.

1.2.5 N,N'-双- γ -谷氨酰胱氨酸甘氨酸(2) (γ -GluCys)₂ 350 mg (0.703 mmol)溶于 35 mL 甲酸中,加入 0.14 mL 浓盐酸,冰浴冷却,加入 0.36 mL 3.7 mol/L 的 H₂O₂,反应 5 h, 40°C 水浴旋转蒸发除去甲酸,得油状物,溶于 3 mL 水中,用氨水将 pH 值

调至 4 左右,40°C 水浴蒸掉水分,得淡黄色油状物和少量固体,用 10 mL 0.01 mol/L 甲酸溶解,室温搅拌下加入还原型谷胱甘肽(GSH) 76.5 mg (0.25 mmol)反应 6 h,产物用 HCOO⁻型阴离子交换柱(Dowex 1×8, 100~200 mesh, 1×10 cm)进行分离纯化,紫外检测器 220 nm 检测,将反应混合物溶于 50 mL 水中上样,上样后用水洗脱出一峰,待峰出完,茚三酮检测流出液不显紫色后,改用 0.07 mol/L 甲酸洗脱,此时出峰为产物,收集,冻干得产品 64.5 mg, R_f =0.05(正丁醇:乙醇:乙酸:水=4:1:1:2展开), $[\alpha]_D^{20}$ -72.0(c 0.59, H₂O), ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 2.13~2.21(m, 4H, Glu- β H), 2.48~2.57(m, 4H, Glu- γ H), 2.92~3.04(m, 2H, Cys- β H), 3.23~3.33(m, 2H, Cys- β H), 3.82~3.87(m, 2H, Glu- α H), 3.97(s, 2H, Gly- α H), 4.65~4.75(m, 2H, Cys- α H), FAB-MS m/z : 556(M+H)⁺, 氨基酸分析, Glu:Cys:Gly=2.35:2.00:0.93.

1.2.6 γ - γ -谷氨酰胱氨酸-双-甘氨酸(3) 将 500 mg (1.41 mmol) (CysGly)₂ 溶于 7.1 mL 甲酸中,加 0.28 mL 浓盐酸,0.83 mL 3.7 mol/L 的 H₂O₂,冰浴冷却反应 2 h, 40°C 水浴旋转蒸发除去甲酸,加入 30 mL 水,冻干得到白色固体,将其溶于 20 mL 水中,此时 pH 值为 2,直接加入还原谷胱甘肽 150 mg,搅拌反应约 6 h,用氨水将 pH 值调至 7~8,稀释至 600 mL,用 HCOO⁻型阴离子交换柱(Dowex 1×8, 100~200 mesh, 1.0×15 cm)进行纯化,上样后水洗至茚三酮检测为阴性,然后用 0.1 mol/L 甲酸溶液洗脱,220 nm 紫外检测,很快出现一大峰,收集冻干,得白色粉末 150 mg,经 HPLC 分析,发现其中杂质含量较大,用 HPLC 纯化,得产品 50 mg, R_f =0.07(正丁醇:乙醇:乙酸:水=4:1:1:2展开), $[\alpha]_D^{20}$ -64.0(c 0.57, H₂O), ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 2.13~2.19(m, 2H, Glu- β H), 2.51~2.56(m, 2H, Glu- γ H), 2.96~3.02(m, 1H, Cys- β H), 3.09~3.14(m, 1H, Cys- β H), 3.24~3.29(m, 1H, Cys- β H), 3.32~3.37(m, 1H, Cys- β H), 3.97(d, J =1.6 Hz, 2H, Gly- α H), 4.02(d, J =2.3 Hz, 2H, Gly- α H), 3.88~3.91(m, 1H, Glu- α H), 4.36~4.39(m, 1H, Cys- α H), 4.73~4.77(m, 1H, Cys- α H), FAB-MS m/z : 484(M+H)⁺, 氨基酸分析 Glu:Cys:Gly=1.0:2.0:1.9.

2 结果与讨论

氧化型谷胱胱肽 **1** 的合成见图1,以胱氨酸为起始原料,采用苄氧羰基(Z)和苄酯(Bzl)保护策略,最终用液态氟化氢一次脱除保护。目标肽用阴离子交换树脂进行纯化,方便快捷,而且可以处理较大量的样品。还原型的谷胱胱肽 **4** 采用与氧化型谷胱胱肽同样的保护策略,以 S-苄基半胱氨酸为起始原料,最终产物用钠-液氨脱除所有的保护基。产物的提纯采用汞盐沉淀法,先用乙酸汞将还原型谷胱胱肽沉淀出来,沉淀洗涤后,再用硫化氢将其还原出来。

肽 **2,3** 有两条不对称的链构成,其合成方法见图2。首先使用溶液法采用苄氧羰基及苄酯保护策略,用 DEPBT 作为缩合试剂,合成两个氧化型的二肽 N,N'-双-γ-谷氨酰胱氨酸 **6** 和胱氨酸-双-甘氨酸 **7**,再用双氧水将二肽氧化成其相应的砷

氧化物,砷氧化物在酸性条件下与还原型谷胱胱肽(GSH)发生反应可得到目标肽 **2,3**。

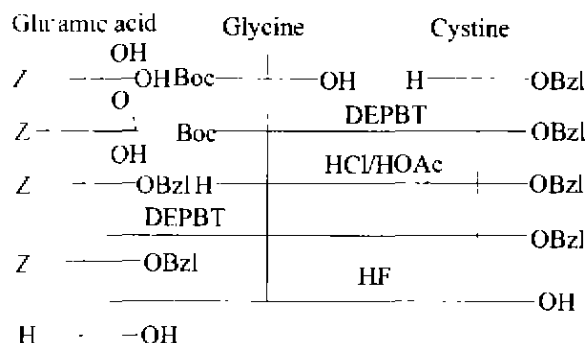


图1 氧化型谷胱胱肽 **1** 的合成路线图

Fig.1 Synthetic route of glutamylglycylcysteine disulfide

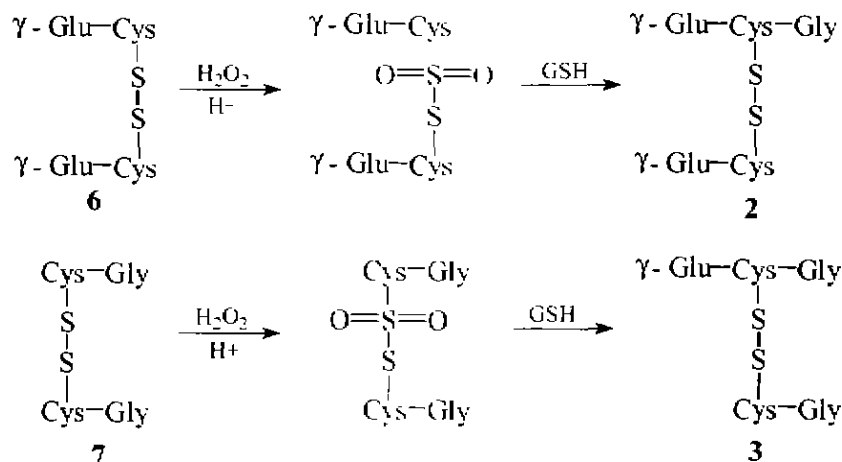


图2 肽 **2,3** 的合成路线图

Fig.2 Synthetic route of peptide **2,3**

肽**1,2,3**均为从人参中分离得到的新化合物。本文首次进行这些肽类化合物的合成。实验结果表明,以上合成方法均得到了目标产物。产物用质谱、核磁共振谱、氨基酸分析进行了验证,并且使用HPLC与天然样品进行了比较,结果表明合成样品与天然样品的出峰保留时间一致。

肽**1,2,3**中均含有二硫键,这给化学合成带来一定的困难。肽**1**具有对称结构,通常既可以先合成单个肽链,再经氧化形成链间二硫键;也可以用含有二硫键的胱氨酸为原料直接合成产物。但肽**2,3**是不对称结构的肽,如果采用先合成两条不同的肽链,再氧化形成产物的方法,产物比较复杂,理论上反应产物中只能有三分之一的目标物。Erikssen曾使用胱氨酸的砷氧化物与还原型谷胱胱肽反应得到了半胱氨酸与谷胱胱肽的混合二硫化物^[9],因此,本文合成

中使用了二肽的砷氧化物。先参照 Emiliozzi 和 Pichat 的方法^[10],将二肽**6,7**氧化成相应的砷,再与还原型谷胱胱肽反应得到产物。产物简单,容易纯化。

此外,肽键的形成使用了有机磷肽缩合试剂 DEPBT^[8],该试剂具有反应条件温和、消旋低、使用方便等特点,用于含胱氨酸的多肽合成中,不易引起二硫键的氧化,从而提高了产物的纯度和反应产率。

本文为“庆祝邢其毅教授九十华诞暨执教六十年”征文

References

1. Singh, V. K.; Gupta, B. M.; Agarwal, S. S. *Planta Med.*, 1984, 50, 462.

- 2 Cai, Z. - D. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **1989**, *14*, 628. (in Chinese)
- 3 Liu, C. - X.; Xiao, P. - G. *J. Ethnopharmacol.*, **1992**, *36*, 27.
- 4 Liu, J.; Xiao, P. - G. *Phytother. Res.*, **1994**, *8*, 445.
- 5 Yang, L.; Ye, Y. - H.; Yuan, H. - S.; Xing, Q. - Y. *Kejue Tongbao*, **1991**, *7*, 513 (in Chinese).
- 6 Long, Y. - C.; Ye, Y. - H.; Xing, Q. - Y. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1996**, *47*, 42.
- 7 Chen, Z. - K.; Fan, C. - X.; Ye, Y. - H.; Yang, L.; Jiang, Q.; Xing, Q. - Y. *J. Pept. Res.*, **1998**, *52*, 137.
- 8 Fan, C. - X.; Hao, X. - L.; Ye, Y. - H. *Synth. Commun.*, **1996**, *26*, 1455.
- 9 Eriksson, B.; Eriksson, S. A. *Acta Chem. Scand.*, **1967**, *21*, 1304.
- 10 Emiliozzi, R.; Prehat, L. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1959**, 1887.

(Ed. CHENG Biao)

(DONG Hua - Zhen)