

· 论著 ·

天然环肽 auyiutuamide A 的全合成研究

耿晨晨^{1,2}, 汪甜甜^{1,2}, 李翔², 王小彦³, 姜云云^{1,4} (1. 安徽医科大学无锡临床学院, 江苏 无锡 214044; 2. 海军军医大学药理学系天然药物化学教研室, 上海 200433; 3. 重庆市妇幼保健院, 重庆 400010; 4. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院, 江苏 无锡 214044)

【摘要】 目的 用 Fmoc 固相直链合成和液相环合的方法合成天然环肽 auyiutuamide A。**方法** 以 2-氯三苯甲基氯 (CTC) 树脂为固相载体, 1,3-二异丙基碳二亚胺(DIC)和 1-羟基苯并三氮唑(HOBT)为缩合剂, 9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)保护的氨基酸, 按照序列依次缩合, 以三氟乙醇(TFE)作为切割试剂, 获得全保护直链肽。以六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)和 1-羟基苯并三氮唑(HOBT)为环合试剂, 全保护直链肽在二氯甲烷(DCM)溶液中环合, 以三氟乙酸(TFA)为脱保护试剂, 获得天然环肽 auyiutuamide A。用高效液相制备色谱进行纯化, 采用 HR-Q-TOF-MS, 500MHz ¹H-NMR 进行表征分析。**结果** 获得纯度大于 95% 的天然环肽 auyiutuamide A, 总收率 5.48%。**结论** 此法合成步骤简单, 产率较高, 首次建立天然环肽 auyiutuamide A 的全合成方法, 为 auyiutuamide A 的进一步研究奠定基础。

【关键词】 auyiutuamide A; 多肽固相合成; 环肽

【中图分类号】 R914

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2022)01-0053-04

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202105087

The total synthesis of natural cyclopeptide auyiutuamide A

GENG Chenchen^{1,2}, WANG Tiantian^{1,2}, LI Xiang², Wang Xiaoyan³, JIANG Yunyun^{1,4} (1. Wuxi Clinical Medical School, Anhui Medical University, Wuxi 214044, China; 2. Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Chongqing Maternal and Child Health Hospital, Chongqing 400010, China; 4. No. 904 Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA, Wuxi 214044, China)

【Abstract】 Objective To synthesize the natural cyclopeptide auyiutuamide A by Fmoc-based solid phase linear synthesis and liquid phase cyclization. **Methods** Using 2-chlorotriphenylmethyl chloride (CTC) resin as the solid support, 1,3-diisopropylcarbodiimide (DIC) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) as the condensing agents, 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) to protect amino acids were assembled in sequence, and then the linear peptide bearing the protected groups was obtained in presence of trifluoroethanol (TFE) cutting reagent. The protected linear peptide was cyclized with the aid of benzotriazole hexafluorophosphate (PyBOP) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) in dichloromethane (DCM) solution, followed by trifluoroacetic acid (TFA) deprotection to obtain the cyclic peptide, auyiutuamide A that was purified by preparative HPLC and characterized by HR-MS and 500MHz ¹H-NMR. **Results** The purity of auyiutuamide A was more than 95% and the total yield was 5.48%. **Conclusion** This method has simple synthesis steps and high yield. It is the first to establish a fully synthesis method for the natural cyclic peptide auyiutuamide A, which lays the foundation for further research of auyiutuamide A.

【Key words】 auyiutuamide A; solid phase peptide synthesis; cyclopeptide

环肽主要源于植物、真菌, 以及海洋天然产物和绝大多数生物有机体中^[1]。环肽是具有特殊的生物活性和较强的药理活性的一类化合物^[2-3]。而且大多数环肽结构比直链肽更加稳定, 且脂溶性高、

穿膜性强、体内半衰期长等优点^[4-5], 从而使环肽在抗肿瘤、抗病毒、天然领域中起着重要的作用^[6-9]。

Auyiutuamide A 是从极地海洋天然产物微孢子菌属(RKAG186)中分离得到的一种环肽化合物, 它是由 10 个氨基酸残基组成。Russell 等^[10]从 *Sesquicillium microsporium* 中分离得到四个环十肽 auyiutuamide A-D。该类肽有一定的天然活性和对人体低毒性^[11-12]。auyiutuamide A 经过核磁共振光谱法和串联质谱法证明了这类化合物的结构。用 Marfey 法^[13]确定了氨基酸的绝对结构。然

【基金项目】 无锡市科技卫生指导性项目, 锡科计(2018)255 号

【作者简介】 耿晨晨, 硕士研究生, 研究方向: 多肽合成研究, Email: gcc0315@126.com

【通信作者】 王小彦, 硕士研究生, 健康教育科副科长, 研究方向: 临床药学, Email: 554036846@qq.com; 姜云云, 博士, 副主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: 20791374@qq.com

而,天然产物中分离提取的 auyiutuamide A 的含量很低,很难推进构效关系和下一步的研究与应用。因此,采用固相合成法合成环十肽具有成本低、时间短、操作简单等优点^[14-16]。

本文用 2-氯三苯甲基氯(CTC)树脂为固相载体,通过 HOBT/DIC 为缩合体系,依次缩合氨基酸,完成全保护直链肽的合成。再以 PyBOP/HOBT/DIPEA 为缩合体系,在 DCM 溶液中液相环合^[17-19],随后利用 TFA 进行保护基的脱除,进而得到环十肽 auyiutuamide A(图 1)。

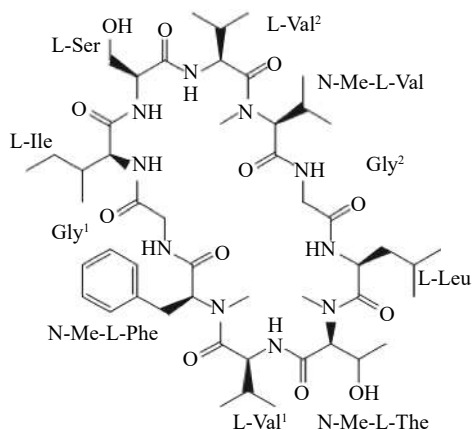


图 1 Auyiutuamide A 的结构式

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

Fmoc-L-亮氨酸(Fmoc-Leu-OH)、Fmoc-甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Fmoc-L-缬氨酸(Fmoc-Val-OH)、Fmoc-O-叔丁基-L-丝氨酸(Fmoc-Ser(tBu)-OH)、Fmoc-L-异亮氨酸(Fmoc-Ile-OH)、N-(9-苄氧羰基)-N-甲基-L-苯丙氨酸(Fmoc-N-Me-L-Phe-OH)、Fmoc-N-甲基-L-缬氨酸(Fmoc-N-Me-L-Val-OH)、N-Fmoc-N-甲基-O-叔丁基-L-苏氨酸(Fmoc-N-Me-Thr(tBu)-OH)[希施生物科技(上海)有限公司];2-氯三苯甲基氯(CTC)树脂(上海吉尔生化有限公司);N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)、1-羟基苯并三氮唑(HOBT)、1,3-二异丙基碳二亚胺(DIC)、三氟乙醇(TFE)、三氟乙酸(TFA)购自北京百灵威科技有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)(国药集团化学试剂有限公司);乙腈为色谱纯。

CHA-S 气浴恒温振荡器(江苏金坛国胜实验仪器厂);SK7200BT 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);LD5-2A 低速离心机(北京京立离心

机有限公司);低温恒温反应浴(槽)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(上海东玺制冷仪器设备有限公司);WSZ-50A 轨道式振荡器(上海一恒科技有限公司);Waters2695/E2695 高效液相色谱仪(美国沃特世公司);LC-1 型反向制备液相色谱仪(北京创新恒通科技有限公司);6538 UHD Accurate Mass Q-TOF LC/MS 质谱仪(美国安捷伦公司)。

1.2 实验方法

按图 2 路线,固相合成天然环肽 auyiutuamide A。

1.2.1 直链肽固相合成

用称量纸称取 2-氯三苯甲基氯(CTC)树脂 1 g(载样量为 0.45 mmol/g)于多肽固相合成反应管中,加入 DCM(10 ml)和 DMF(10 ml)溶胀树脂,20 min 后抽干。用 DMF 和 DCM 冲洗 5 遍,加 Fmoc-Gly-OH(600 mg, 2 mmol)和 DIPEA(666 μ l)的 DMF 溶液入反应管中,反应管固定于 CHA-S 气浴恒温振荡器中常温震荡 4 h。再用 DCM 和 DMF 各洗涤 5 遍,抽干之后再加入 20% 哌啶的 DMF 溶液(10 ml),重复 2 遍,每一遍 10 min,从而脱去氨基酸上的 Fmoc 保护基,再依次使用 DMF 和 DCM 各洗涤 5 遍。之后将已经配置好的 Fmoc-氨基酸-OH(2 mmol, 5 倍当量),HOBT(2 mmol, 5 倍当量),DIC(2 mmol, 5 倍当量)的 DMF 溶液加入到反应管中,反应管固定于 CHA-S 气浴恒温振荡器中常温震荡 2 h,反应完成之后,再使用 DMF 和 DCM 冲洗 5 遍。重复上述步骤,依次偶联氨基酸 Fmoc-N-Me-L-Val-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-N-Me-L-Phe-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-N-Me-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH。

1.2.2 直链肽的切割与纯化

所有氨基酸完成偶联之后,获得直链肽-树脂复合物,使用无水乙醚将其挥干,加入 TFE/DCM(1:4, V/V)混合溶液 10 ml,放置在轨道式振荡器,常温震荡 4 h。过滤并收集滤液,滤液用旋转蒸发器蒸干,获得直链肽粗品,粗品用制备型 RP-HPLC 进行纯化,再使用冻干机将其干燥,获得纯品直链肽。

1.2.3 直链肽的环合

在 0 $^{\circ}$ C 的条件下将直链肽溶于 50 ml 的 DCM 溶液缓慢滴加入 HOBT(3 eq)、PyBOP(5 eq)、DIPEA(10 eq)溶于 DCM 50 ml 中,滴加完成之后,于常温搅拌反应过夜。反应结束后,使用旋转蒸发器蒸干反应溶剂,获得目标粗品,再将粗品用制备

型 RP-HPLC 纯化,再使用冻干机将其干燥,获得纯品环肽。

1.2.4 环肽侧链保护基的脱除与纯化

先配置脱除侧链保护基溶液 12 ml(TFA/DCM=1/3),将溶液加入到环肽冻干后的纯品中,固定于轨道式振荡器,常温震荡反应 4 h。

1.2.5 纯化条件

色谱条件: Ryoung C₁₈ 色谱柱(20mm×250 mm, 10 μm); 流动相 A: 水+0.1%TFA, 流动相 B: 乙腈+0.1%TFA, 梯度洗脱: (0~5 min, 40% B; 5~60 min, 40%~70% B); 流速: 20ml/min; 紫外检测波长 214 nm。

2 结果与讨论

2.1 Auyuittuqamide A 直链肽的 HPLC 和高分辨质谱表征

本步是将直链肽从树脂上切割,得到油状物粗品 360 mg,再将粗品进行纯化,得到纯品 100 mg,收率为:[实际值 100mg/(理论值 1144×0.45 mmol)]×100%=19.42%, HPLC 图谱如图 3 所示, HR-Q-TOF-MS 质谱图中对应的 [M+H]⁺峰 1145.7444, [M+Na]⁺峰 1167.7266 显示的分子量与直链肽 auyuittuqamide A 相吻合。

本步是将直链肽纯品进行环合,得到油状物粗

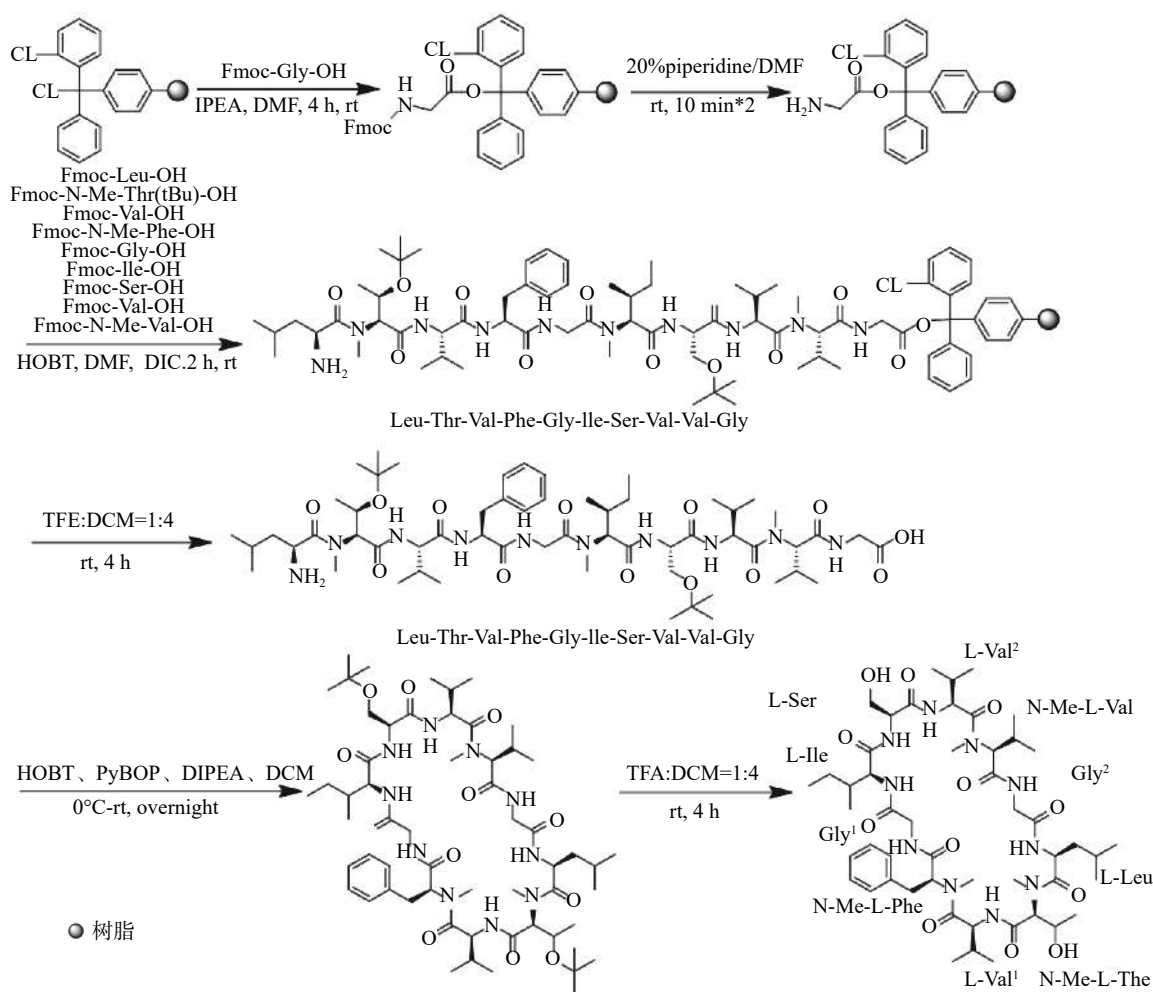


图 2 Auyuittuqamide A 的合成路线

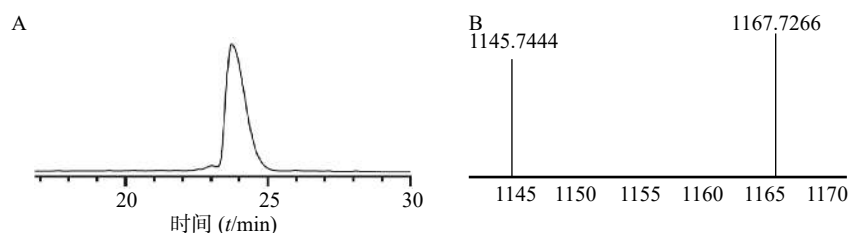


图 3 Auyuittuqamide A 全保护直链肽 HPLC (A) 和 HR-Q-TOF-MS (B) 谱图

[M+H]⁺: 1145.7444; [M+Na]⁺: 1167.7266

品,再将粗品进行纯化,得到纯品 30 mg,此步收率为: [实际值 30mg/(理论值 $1126 \times 0.45 \text{ mmol}$)] $\times 100\% = 5.92\%$, HPLC 图谱如图 4 所示, HR-Q-TOF-

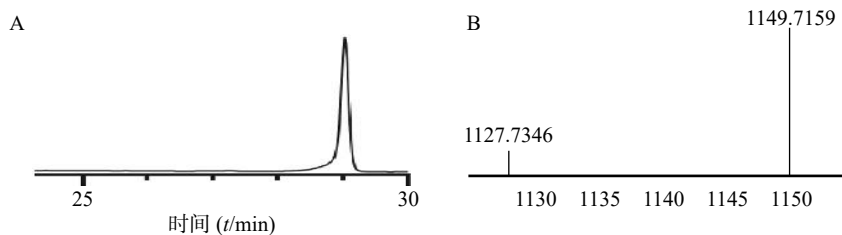


图 4 直链肽环合后 HPLC (A) 和 HR-Q-TOF-MS (B) 谱图

[M+H]⁺: 1127.7346; [M+Na]⁺: 1149.7159

本步是将环合后纯品脱除侧链保护基,得到油状物粗品,再用乙腈和水溶解,最后冻干得到纯品 25 mg,收率为: [实际值 25mg/(理论值 $1014 \times 0.45 \text{ mmol}$)] $\times 100\% = 5.48\%$, HPLC 图谱如图 5 所

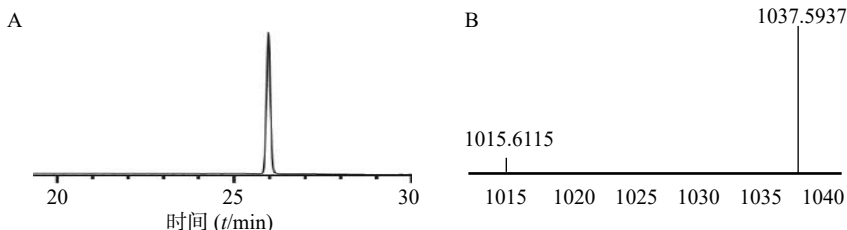


图 5 Auyuittuqamide A 纯品的 HPLC(A) 和 HR-Q-TOF-MS(B) 谱图

[M+H]⁺: 1015.6115; [M+Na]⁺: 1037.5937

2.2 Auyuittuqamide A 的核磁共振氢谱表征

本研究通过 500MHz 核磁共振氢谱对环肽进一步表征,确认与文献中 auyuittuqamide A 的核磁共振氢谱相符。¹H-NMR (500MHz, d-DMSO) δ : 8.91 (d, $J = 9.85 \text{ Hz}$, 1H), 8.70 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$, 1H), 8.55 (d, $J = 6.95 \text{ Hz}$, 1H), 7.75 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.47–7.43 (m, 3H), 7.27–7.17 (m, 5H), 5.01 (d, $J = 9.75 \text{ Hz}$, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.59–4.52 (m, 2H), 4.45 (t, $J = 9.15 \text{ Hz}$, 1H), 4.39 (t, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.32 (dd, $J = 4.3 \text{ Hz}$, 1H), 3.88–3.82 (m, 2H), 3.78 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H), 3.74 (d, $J = 4.45 \text{ Hz}$, 1H), 3.33–3.27 (m, 4H), 3.22 (s, 3H), 3.17–3.13 (m, 4H), 2.98–2.93 (m, 1H), 2.48–2.45 (m, 7H), 1.97 (m, 1H), 1.87–1.82 (m, 2H), 1.64–1.60 (m, 2H), 1.20–1.13 (m, 3H), 1.01 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H), 0.86 (d, $J = 5.75 \text{ Hz}$, 3H), 0.82–0.78 (m, 17H), 0.76–0.72 (m, 5H), 0.70 (d, $J = 6.45 \text{ Hz}$, 3H)。

3 讨论

本法采用先固相合成直链肽,再液相进行环合获得目标产物 auyuittuqamide A。并且采用先环合,再脱除侧链保护基,从而有效地避免了侧链裸

MS 质谱图中对应的 [M+H]⁺峰 1127.7346, [M+Na]⁺峰 1149.7159 显示的分子量与 auyuittuqamide A 直链肽环合后分子量相吻合。

示, HR-Q-TOF-MS 质谱图中对应的 [M+H]⁺峰 1015.6115, [M+Na]⁺峰 1037.5937 显示的分子量与环肽 auyuittuqamide A 分子量相吻合。

露的羟基对环合时的影响^[20]。使用高效液相色谱进行纯化,得到纯品纯度大于 95%,收率为 5.48% 的目标产物 auyuittuqamide A。本研究首次完成了对 auyuittuqamide A 的全合成,本法优点:更为省时,方法简单,易于操作,且经济实用。缺点:产率还有待提高,方法需进一步优化。总的来说,本方法为该环肽化合物的全合成提供了参考。

【参考文献】

- [1] CASCALES L, CRAIK D J. Naturally occurring circular proteins: distribution, biosynthesis and evolution[J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(22): 5035-5047.
- [2] PIFFERI C, BERTHET N, RENAUDET O. Cyclopeptide scaffolds in carbohydrate-based synthetic vaccines[J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(5): 953-965.
- [3] ANDAVAN G S, LEMMENS-GRUBER R. Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research[J]. *Mar Drugs*, 2010, 8(3): 810-834.
- [4] LI Q J, MA L, YI D R, et al. Novel cyclo-peptides inhibit Ebola pseudotyped virus entry by targeting primed GP protein[J]. *Antiviral Res*, 2018, 155: 1-11.
- [5] VASCO A V, BRODE M, MÉNDEZ Y, et al. Synthesis of lactam-bridged and lipidated cyclo-peptides as promising anti-phycopathogenic agents[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): E811.

(下转第 61 页)

经煮制加工的延胡索药材样品中 3 种生物碱的含量总体低于蒸制加工所得的延胡索药材,其结果为延胡索药材蒸制炮制工艺的确定提供了物质基础和研究依据^[13]。

在现有文献的基础上,经实验研究分析,醋蒸延胡索具备现行版《中国药典》一部收载的醋炙延胡索质量要求,且延胡索乙素的含量明显高于药典中醋炙延胡索的要求,延胡索乙素可以作用于中枢神经系统,止痛、镇静,降低成瘾性、保护大脑的作用;也可以作用于心血管系统,抗心律失常、改善血流动力学、降低血脂^[14]。延胡索乙素含量的增加符合醋制增强行气、止痛之功的炮制目的。因此制定醋蒸延胡索质量标准要求应为:性状为不规则的圆形厚片,表面黄褐色,有不规则网状皱纹。质硬而脆,断面黄褐色,角质样,有蜡样光泽,微具醋香气,味苦;水分不超过 15%;总灰分不超过 5%;以稀乙醇作溶剂,浸出物不少于 11.0%;延胡索乙素($C_{21}H_{25}NO_4$)含量,按干燥品计算不少于 0.050%。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2015年版[S].

北京:中国医药科技出版社,2015.

- [2] 冯自立,赵正栋,刘建欣.延胡索化学成分及药理活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2018,30(11):2000-2008.
- [3] 何晓凤,张晶,张梅.延胡索化学成分、药理活性及毒副作用研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(11):97-100.
- [4] 董庆海,吴福林,王涵,等.延胡索药理学研究进展[J].中国野生植物资源,2019,38(1):48-53,79.
- [5] 龚千锋.中药炮制学[M].4版.北京:中国中医药出版社,2016.
- [6] 黄小平.不同的炮制方法对延胡索中延胡索乙素含量的影响[J].当代医药论丛,2019,17(18):167-168.
- [7] 肖辉.不同炮制方法对延胡索中延胡索乙素含量的影响[J].中国药业,2016,25(4):29-31.
- [8] 孟德阳.延胡索醋炙前后饮片和煎剂中延胡索乙素含量变化对比[J].吉林中医药,2018,38(2):198-201.
- [9] 谢明.延胡索醋制前后总生物碱含量测定及对小鼠的镇痛作用比较[J].海峡药学,2014,26(3):33-34.
- [10] 江国荣,褚雪梅,潘雪莲,等.不同炮制方法对中药延胡索中有效成分含量的影响[J].北方药学,2016,13(11):5,121.
- [11] 李春,蒋晓煌,蒋孟良,等.正交试验优选延胡索醋蒸法炮制工艺[J].中医药导报,2015,21(6):53-55.
- [12] 郑军献,徐雁,洪春霞,等.延胡索不同加工工艺的研究[J].浙江中医杂志,2012,47(5):379-380.
- [13] 龙全江,张颖,徐雪琴.不同加工方法对延胡索3种生物碱含量的影响[J].中国中医药信息杂志,2017,24(7):90-93.
- [14] 王安铸,马晓昌.延胡索乙素的研究进展[J].中华中医药杂志(原中国医药学报),2020,35(4):1927-1929.

[收稿日期] 2021-02-20 [修回日期] 2021-12-10

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 56 页)

- [6] ESMAEILIMA, ABAGHERI-MAHABADIN, HASHEMPOUR H, et al. *Viola* plant cyclotide vigno 5 induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome C release and caspases activation in cervical cancer cells[J]. *Fitoterapia*, 2016, 109: 162-168.
- [7] KANG K B, MING G, KIM G J, et al. Jubanines F-J, cyclopeptide alkaloids from the roots of *Ziziphus jujuba*[J]. *Phytochemistry*, 2015, 119: 90-95.
- [8] THEVENARD J, RAMONT L, DEVY J, et al. The YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin inhibits tumor angiogenesis by down-regulating endothelial cell migration[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1055-1066.
- [9] ZHOU X, HUANG H B, CHEN Y C, et al. Marthiapeptide A, an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60 L scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospira thermotolerans* SCSIO 00652[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(12): 2251-2255.
- [10] GRUNWALD A L, CARTMELL C, KERR R G. auyuituqamide A-D, cyclic decapeptides from *Sesquicillium microsporum* RKAG 186 isolated from Frobisher bay sediment[J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(1): 56-60.
- [11] MAESTÁ I, NITECKI R, DESMARAIS C C F, et al. Effectiveness and toxicity of second-line actinomycin D in patients with methotrexate-resistant postmolar low-risk gestational trophoblastic neoplasia[J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 157(2): 372-378.
- [12] ZORZI A, DEYLE K, HEINIS C. Cyclic peptide therapeutics: past, present and future[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 38: 24-29.
- [13] SETHI S, MARTENS J, BHUSHAN R. Assessment and applic-

ation of Marfey's reagent and analogs in enantioseparation: a decade's perspective[J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(1): e4990.

- [14] AGOURIDAS V, DIEMER V, MELNYK O. Strategies and open questions in solid-phase protein chemical synthesis[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 58: 1-9.
- [15] GIESLER R J, ERICKSON P W, KAY M S. Enhancing native chemical ligation for challenging chemical protein syntheses[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 58: 37-44.
- [16] LAPS S, SATISH G, BRIK A. Harnessing the power of transition metals in solid-phase peptide synthesis and key steps in the (semi)synthesis of proteins[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(4): 2367-2387.
- [17] GODOI K R R, BASSO R C, MING C C, et al. Crystallization, microstructure and polymorphic properties of soybean oil organogels in a hybrid structuring system[J]. *Food Res Int*, 2020, 137: 109460.
- [18] HENZEL S, BECKER S, HENNEN D, et al. Highly strained nanoscale bicyclopentane monolayers entering the third dimension: a combined synthetic and scanning tunneling microscopy investigation[J]. *Chempluschem*, 2021, 86(6): 797.
- [19] LUTZ C, SIMON W, WERNER-SIMON S, et al. Total synthesis of α - and β -amanitin[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(28): 11390-11393.
- [20] AHARONI N, MAMANE H, BIRAN D, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to hydroxyl-radicals[J]. *Chemosphere*, 2018, 199: 243-250.

[收稿日期] 2021-05-19 [修回日期] 2021-09-22

[本文编辑] 陈盛新