

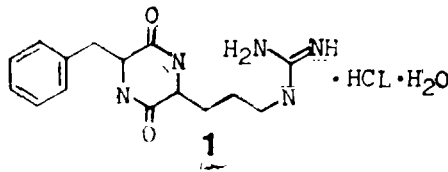
环苯丙-精二肽盐酸盐水合物的 合成及生理活性研究

林永成 龙康侯 王 军 许实波 邓冬梅
(化学系) (生物学系)

摘 要 本文报道了环苯丙-精二肽盐酸盐水合物1的合成及其生理活性研究。作者首次使用DCC/Na₂CO₃合成肽键,无需复杂的纯化,产品纯度较高,产率达83%。本文用此法合成了另外6种二肽。药理试验显示,1对免疫系统有广泛的增强作用并显示出较强的抗肿瘤活性,其机制可能与其免疫促进作用有关。

关键词 软珊瑚, 环苯丙-精二肽, DCC/Na₂CO₃法, 合成, 抗肿瘤, 免疫

环苯丙-精二肽盐酸盐水合物1是作者等从南海珊瑚*Sinularia* sp.中分离得到的。这是第一次发现1在自然界中以游离态状态存在⁽¹⁾。



本文研究的环二肽属海洋天然产物,从生理活性方面看,其结构颇有特色:分子中含有活泼的胍基;其一端是亲水的,另一端苯环是亲脂的。这一特点令其在生物体内具有良好的溶解性和通透性,故此对1进行合成研究将有助于深入进行药理试验和开发利用。

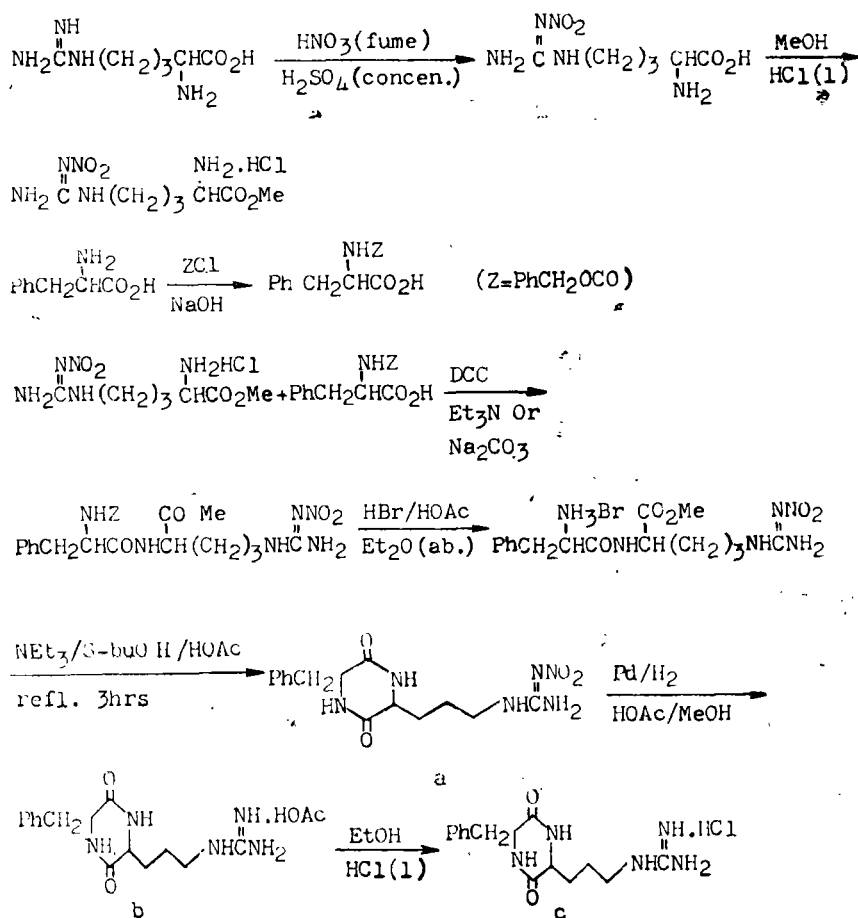
1 合成路线

本路线选择硝基作为胍基的保护基团,操作比较简单,在引入硝基时分子中的氨基和羧基不需另加保护,而硝基则可通过催化氢解除去。

合成中的一个关键步骤是两个氨基酸的成肽反应,曾有文献报道采用混酐法,活泼酯法,叠氮法和DCC/Et₃N/1-羟基苯并二氮唑/DMF等,未见采用DCC/Et₃N法的。上述方法大多操作复杂或试剂昂贵。本文采用DCC/Et₃N法以及后来创立的DCC/Na₂CO₃法,对于该二肽来说,后一种方法是十分有效的(见后),本文还利用DCC/Na₂CO₃法研究了另外6个二肽的合成: R-NO₂-Arg-OMe(R = Z-Pro, Z-Cys(Bzl), Z-Trp,

本文1991年11月15日收到

Z-Leu, Z-Gly).



2 结果与讨论

2.1 DCC/Et₃N法合成二肽

在DCC/Et₃N法中,考虑到硝基精氨酸甲酯较难溶于氯仿,选用DMF作为溶剂,此法的产率约20%,产品mp149~150℃,其MS谱(FB)M+1峰515,与二肽分子量一致,¹HNMR谱有二肽所有的特征吸收信号,同时产品与茚三酮不显色,由此证实了它的结构。我们对DCC/Et₃N法作了5次选择条件的试验:①重现性,②增加Et₃N量1倍,③DCC的量增加1倍,④用Z-Phe先与DCC反应40min,然后与硝基精氨酸甲酯偶合,⑤用Z-Phe先与DCC反应2h,再与硝基精氨酸甲酯反应,结果所有反应产率均在20%~30%。TLC证明,该法反应复杂,要用柱层析纯化,操作繁琐,减压蒸除高沸点溶剂困难。

2.2 DCC/Na₂CO₃法

本法为作者所创立,使用一种特殊的处理方法和找到了一种含醇溶剂,这种溶剂对

于反应原料和副产物DCU的溶解性能较好,而产物二肽却能以高纯度的固体析出,这与经典的DCC法恰好相反。其产率高达66%~83%,熔点为149~150℃, $[\alpha]_D^{25} - 15^\circ$ (文献值 -16.2°),其它波谱数据与DCC/ Et_3N 法的产品完全一致。对DCC/ Et_3N 和DCC/ Na_2CO_3 法已进行多次试验,重现性很好,部分结果列于表1。

表1 DCC/ Et_3N 和DCC/ Na_2CO_3 对照实验Tab.1 The comparative experiment of the methods of DCC/ Na_2CO_3 and DCC/ Et_3N

Base	NO.	Material(g)	Reaction	Yield	m.p.
1		Z-Phe 0.5	stirred 48h, r-t		145~
		$\text{NO}_2\text{-Arg-OMe.HCl}$ 0.12	column chromatography	23%	150℃
		Et_3N 0.1ml			
		DCC 0.1, DMF 3ml			
TEA	2	Z-Phe 0.3	as above	19%	150℃
		$\text{NO}_2\text{-Arg-OMe.HCl}$ 0.24			
		Et_3N 0.1ml			
		DCC 0.4, DMF 5ml			
3		(a)Z-Phe 0.3	first (a) 40min, then	25%	148℃
		DCC 0.21, DMF 5ml	added(b), stirred 48h,		
		(b) Et_3N 0.1	column chromatography		
		$\text{NO}_2\text{-Arg-OMe.HCl}$ 0.24			
1		Z-Phe 0.3	stirred, 12h filtered	66%	148~
		$\text{NO}_2\text{-Arg-OMe.HCl}$ 0.24	washed, without further		
		DCC 0.20, Na_2CO_3 0.1	purification		
		Solv. 5ml			
SC	2	as above	stirred 6h, other as above	77%	150℃
	3	as above	stirred 4h, other as above	83%	150℃

TEA = Triethylamine, SC = Sodium Carbonate
rt = room temperature

2.3 DCC/ Na_2CO_3 法的推广

用DCC/ Na_2CO_3 法合成Z-Val- $\text{NO}_2\text{-Arg-OMe}$ 取得同样好的效果,产率50%~60%,此外还合成了R- $\text{NO}_2\text{-Arg-OMe}$ (R = Z-Gly, Z-Pr, Z-Cys(Bzl), Z-Trp, Z-Leu)结果将另文报道。

2.4 环化

作者试验了3种环化方法:①用苦味酸催化环合,操作如文献[4],未能得到产品,②用MeOH/ NH_3 环化^[5]产率30%,③用仲丁醇/N-甲基吗啡啉体系及HOAC催化环合^[6],这里改用 Et_3N 代替吗啡啉,产率80%,第三种方法优于前两种。

2.5 盐酸盐的制备

用把黑在醋酸和甲醇介质中催化氢解硝基,得环二肽醋酸盐,再用稀或浓盐酸转化

为盐酸盐,用稀盐酸得水合盐和非水合盐混合物mp 170~198℃,用浓盐酸得无水盐,mp 228℃。合成品的¹HNMR,¹³CNMR和MS谱与天然物完全一致^[1]。

3 环苯丙-精二肽盐酸盐的生理活性

3.1 免疫功能试验结果

1能显著增加免疫器官的重量;提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能;提高小鼠外周血ReS系统廓清功能;提高血清溶血素的形成;增加小鼠空斑形成细胞数量,促进IgM型抗体的形成,对体液免疫有兴奋作用;促进体外PHA诱导的外周血淋巴细胞转化;在3H-胸腺嘧啶核苷(3HTdR)掺入的淋巴细胞转化中,使cpm值升高,转化率增至133.1%在SRBC诱导的迟发型超敏反应(DTH)实验中,有显著减轻DTH反应的作用,推测与其激活辅助型T细胞(TH)亚群有关。

3.2 抗肿瘤试验结果

在抗肿瘤试验中,1对体外培养的肿瘤细胞总数有显著减少作用,并且使肿瘤细胞cAMP水平显著下降,对饮水治疗艾氏腹水肿瘤小鼠无效;对活体ip给药100mg/kg·d的剂量,不仅可使每毫升腹腔液中S180腹水型肿瘤细胞总数明显减少,而且显著延长肿瘤小鼠存活期,详见另报。

4 实验部分

4.1 仪器

JEOL FX90Q NMR, ZAB VG-ANAIY有机质谱仪,显微熔点测定仪(国产),旋光仪(国产)。

4.2 实验步骤

4.2.1 Z-L-Phe的合成 参照[7], mp 87℃,产率98%。

4.2.2 NO₂-Arg的合成 取3g精氨酸溶于6ml浓硫酸中,加3ml发烟硝酸,冰浴中摇振30min,余见[4],产率80%, mp 254~255℃。

4.2.3 NO₂-Arg-OMe·HCl的合成 参照[4], mp 174~155℃,产率90%。

4.2.4 Z-L-Phe-NO₂-L-Arg-OMe的合成

a. DCC/Et₃N法。取等当量Z-Phe,NO₂-Arg-OMe·HCl,Et₃N,DCC溶于DMF中,室温搅拌48h,滤去固体,减压蒸干溶剂,残余物热溶于CHCl₃中,用少量Na₂CO₃水溶液、水、稀盐酸和水洗涤,经硅胶柱层析,用石油醚-丙酮溶剂洗脱,收集70%~80%丙酮-石油醚流分,在CHCl₃中重结晶得产品,产率20%~30%,mp 149~150℃;¹HNMR

(CDCl₃,TMS)δppm 1.6(m,4H,CH₂×2),3.0~3.3(m,4H,CH₂Ph和CH₂-NHC(=O)NH₂),3.7(s,3H,OCH₃),4.4(m,2H,CHNHCO×2),5.07(s,2H,Ph-CH₂OCO),6.2(d,1H,CNH-Z),7.1~7.7(m,14H,CONH,胍基和苯环上的氢);MS(FB)(m+1)515。

b. DCC/Na₂CO₃法。用含醇溶剂处理等当量的Na₂CO₃,Z-Phe,NO₂-Arg-OMe·HCl和DCC,室温搅拌3~5h,析出大量固体,过滤,水洗,收集产品,产率70~80%,mp 149~150°, [α]_D²⁵ = -15°(C,1,MeOH),¹HNMR和MS谱法与a法相同。

4.2.5 环化

a. 保护二肽Z-Phe-NO₂-Arg-OMe水解去甲酯, 催化氢解去Z和硝基, 然后用苦味酸催化环合^[4], 据报道产率20%, 但作者没有获得产品。

b. 保护二肽经HBr/HOAc去Z, 于MeOH/NH₃中环化, 产率30%^[5]。

c. 保护二肽经HBr/HOAc去Z, 在仲丁醇/Et₃N中用HOAc催化环合, 这里以Et₃N代替文献中的N-甲基吗啡啉^[6]。产率80%, mp 218°C, MS(FB)M+1 349, ¹HNMR δppm 7.6~8.2, (d, 2H), 7.15(m, 8H), 4.1(m, 2H), 2.6~3.1(m, 4H), 0.6~1.2(m, 4H)。

4.2.6 盐酸盐的生成 用Pd黑在HOAc/MeOH中催化氢解除NO₂, 得环肽醋酸盐, 如果用稀盐酸转换为盐酸盐, 得无水盐与水合盐混合物, mp170~198°, 用浓盐酸转换得无水盐, mp228°C, 二者所有波谱图一致。最终产品1的¹HNMR, ¹³CNMR和MS与天然物完全相同^[1]。

参 考 文 献

- 1 龙康侯, 林永成, 林源华. 中山大学学报(自然科学)论丛, 化学论文集(2), 1990, 9(3):77
- 2 Suzuki *et al.* Jp 62,36,331(87,36,331)
- 3 Klaus Hofmann *et al.* J Am Chem Soc, 1956, 78:238
- 4 Norio Ishibashi *et al.* Agric Biol Chem, 1988, 52(3):819
- 5 Yusuke Sasaki *et al.* Chem Pharm Bull, 1982, 30(12):4435
- 6 Robert W Holley. J Am Chem Soc, 1952, 74(3):3073

The Study on the Synthesis and Pharmacological Activities of Cyclo-Phe-Arg Hydrochloride from the Chinese Soft Coral *Sinularia* sp.

Lin Yongcheng* Long Kanghou Wan Jun Xu Shibo Deng Dongmei

Abstract Cyclo-Phe-Arg hydrochloride 1 from the Chinese soft coral *sinularia* sp. was synthesized from Z-Phe and NO₂-Arg-OMe with the method of DCC/Na₂CO₃, which haven't been reported. The product had high purity without complicated purification. The yield was 70~80%. The synthesis of seven dipeptides containing NO₂-Arg-OMe with the same method was studied. Pharmacological tests showed that 1 had marked immunopotential and antitumor activity in animals. We suggest that there might be a relation between these two activities.

Keywords soft coral, cyclo-Phe-Arg dipeptide, DCC/Na₂CO₃ method, synthesis, antitumor, immunopotential

* Department of Chemistry