

五味子的环二肽及其合成

汪有初*, 周俊, 谭宁华, 丁中涛, 江蕊

(中国科学院昆明植物研究所植物化学开放研究实验室, 昆明 650204)

摘要 目的: 研究五味子中的环二肽成分。方法: 用薄层色谱, 硅胶及反向 RP-18 硅胶柱层析色谱和谱学方法。结果: 分离到 3 个天然的环二肽及由 3 个环二肽组成的一个混合物并鉴定为环(亮-脯)(1), 环(苯丙-脯)(2)和环(苯丙-亮)(3), 环(苯丙-缬)(4), 环(苯丙-异亮)(5), 环(苯丙-苯丙)(6), 另外, 合成了 14 个环二肽类似物。结论: 首次从五味子科植物北五味子中分离到环二肽。环二肽 2, 6~8, 14~20, 经活性筛选表明, 2, 16 及 18 有轻微的钙拮抗效应, 19 及 20 显示出增强高钾所致收缩效应。其它环二肽及它们的活性筛选工作正在进行中。

关键词 北五味子; 五味子科; 环二肽; 合成

北五味子 (*Schizandra chinensis* Baill) 的干燥果实为中药五味子的主要药材, 功效甚广。用于肺喘虚咳, 心悸失眠诸病^[1]。化学成分研究比较深入。已报道的有单萜、倍半萜、有机酸等。近年由于该药所含木脂素有很好的治疗肝炎功效, 因而发现近 30 个木脂素成分^[2], 如五味子素 (schizandrin)、去氧五味子素 (deoxyschizandrin) 和五味子醇 (schizandrol) 等。

从北五味子果实甲醇提取物的乙酸乙酯部位经正、反相色谱分离鉴定了 3 个环二肽, 即环(亮-脯)(1), 环(苯丙-脯)(2)和环(苯丙-亮)(3)和一个由 3 个环二肽组成的混合物, 即环(苯丙-缬)(4), 环(苯丙-异亮)(5)和环(苯丙-苯丙)(6)。这 3 个环二肽组成的混合物由于量少, 未能分离得到纯品。故在初步推定其结构后, 合成了这 3 个环二肽。用由这 3 个合成环二肽的混合物与分离的环二肽混合物进

行 MS 及 HPLC 比较, 二者是吻合的, 故得以证明。在五味子科发现环二肽尚属首次。

环二肽 (cyclic dipeptides) 有多种生物活性^[3-5]。参照 Ueda 和 Cook^[6,7]方法本文合成了北五味子中的 6 个环二肽和 14 个其它环二肽 (共 20 个), 它们是: 环(甘-脯)(7)^[8], 环(丙-脯)(8)^[5], 环(缬-脯)(9)^[10], 环(异亮-脯)(10)^[11], 环(丝-脯)(11), 环(苏-脯)(12), 环(N-甲色-脯)(13), 环(酪-酪)(14), 环(亮-亮)(15)^[9], 环(异亮-异亮)(16)^[10], 环(缬-缬)(17)^[10], 环(蛋-蛋)(18), 环(丙-丙)(19)^[6], 环(脯-脯)(20)^[6], 其中 11~14, 18 是新化合物。其结构 (图 1) 经波谱鉴定。环二肽 2, 6~8, 14~20 经活性筛选表明, 2, 16 及 18 随着浓度的增加, 具轻微的钙拮抗效应。19 及 20 显示增强高钾所致收缩效应。其它环二肽以及其它活性的筛选工作正在进行中。

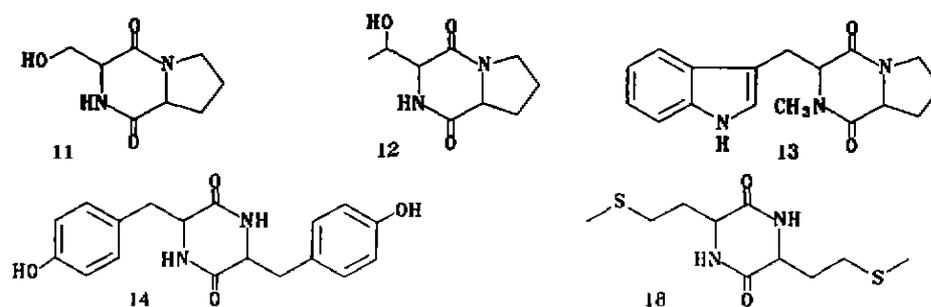


Fig 1 Structures of new compounds 11~14, 18.

实验部分

收稿日期: 1997-10-13

*联系人现址: 国家医药管理局上海医药工业研究院新药研究室, 上海 200437. Tel: (021) 65442731 - 22, Fax: (021) 62791715, E-mail: ychwang45@hotmail.com

熔点为 Koffler 显微熔点仪测定, 温度未校正。旋光用 Horiba Sepa-300 旋光测定仪测定。紫外光谱用岛津 UV-210A 型紫外光谱仪。红外光谱用

Perkin-Elmer 577 型红外光谱仪(KBr 压片)。核磁共振谱用 Bruker AM-400 (400 MHz) 和 DRX-500 (500 MHz) 型核磁共振仪(氘代溶剂峰作为内标)。EI 与 FAB-MS 用 VG AutoSpec-3000 型质谱仪测定。高效液相色谱用岛津 LC-4A 型仪器(色谱柱: *partisil* ODS-2 *alltech* 4.6 × 250 mm; 溶剂系统: CH₃CN—H₂O(3:7), 流速: 0.4 ml·min⁻¹; 紫外检测, 波长: 225 nm)。

五味子生药购自北京海淀区中心药店。

1 提取分离

五味子干果实 9.8 kg 经粉碎后, 用工业甲醇回流提取 4 次, 每次 5 h。减压浓缩得浸膏 3150 g。该浸膏悬浮于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。乙酸乙酯部分浓缩得 180 g, 经硅胶柱(200~300 目) 色谱, 用氯仿—甲醇(0~30%) 依次洗脱, 分成 4 个部分, 各部分经 TLC 检测, 显环肽阳性反应部分进一步经硅胶 H 和 RP-18 反复色谱分离, 得到 3 个单体化合物 1(38 mg), 2(25 mg), 3(22 mg) 和 1 个由化合物 4, 5, 6 组成的混合物(9 mg)。

2 鉴定

化合物 1 针状结晶, mp 155~156°C, $[\alpha]_D^{11.7} - 71.25^\circ$ (CHCl₃, 0.4), 茚三酮显阴性, 分子式为 C₁₁H₁₈N₂O₂ (m/z 210.1359, ∇ 1.0 mu)。IR(KBr) cm⁻¹: 3300, 1650。¹HNMR(CDCl₃, δ): 5.79(1H, br. s, NH), 4.10(1H, t, J = 8.0 Hz, α-H_{pro}), 4.00(1H, dd, J = 3.4, 9.4 Hz, α-H_{leu}), 3.63(2H, m, δ-H_{pro}), 2.33(1H, m, β-H_{pro}), 2.05(3H, m, β-H_{pro}, β-H_{leu}, γ-H_{pro}), 1.89(1H, m, γ-H_{pro}), 1.72(1H, m, γ-H_{leu}), 1.50(1H, m, β-H_{leu}), 0.98(3H, d, J = 6.5 Hz, δ-H_{leu}), 0.92(3H, d, J = 3.7 Hz, δ-H_{leu})。 ¹³CNMR(CDCl₃, δ): 170.0(CO), 166.2(CO), 59.0(CH, α-C_{pro}), 53.5(CH, α-C_{leu}), 45.5(CH₂, δ-C_{pro}), 38.8(CH₂, β-C_{leu}), 28.2(CH₂, β-C_{pro}), 24.8(CH, γ-C_{leu}), 23.2(CH₃, δ-C_{leu}), 22.8(CH₂, γ-C_{pro}), 21.3(CH₃, δ-C_{leu})_c。

化合物 2 白色粉末, mp 138.5~139°C, $[\alpha]_D^{11.6} - 192.59^\circ$ (CHCl₃, c 0.135)。茚三酮显阴性, 分子式为 C₁₄H₁₆N₂O₂ (m/z 244.1200, ∇ 1.2 mu)。IR(KBr) cm⁻¹: 3300, 1650。 ¹HNMR(CDCl₃, δ):

7.27(5H, m), 5.61(1H, br. s, NH), 4.25(1H, dd, J = 3.6, 10.7 Hz, α-H_{phe}), 4.06(1H, t, J = 7.3 Hz, α-H_{pro}), 3.59(1H, m, β-H_{phe}), 3.59(2H, m, δ-H_{pro}), 2.75(1H, dd, J = 10.7, 14.4 Hz, β-H_{phe}), 2.32(1H, m, β-H_{pro}), 1.98(2H, m, γ-H_{pro}), 1.89(1H, m, β-H_{pro})。 ¹³CNMR(CDCl₃, δ): 169.3(CO), 165.1(CO), 136.0(γ-C_{phe}), 129.3(δ-C_{phe}), 129.1(ε-C_{phe}), 127.6(ξ-C_{phe}), 59.2(CH, α-C_{pro}), 56.2(CH, α-C_{phe}), 45.5(CH₂, δ-C_{pro}), 36.9(CH₂, β-C_{phe}), 28.4(CH₂, β-C_{pro}), 22.5(CH₂, γ-C_{pro})。

化合物 3 白色粉末, mp 261~263°C, $[\alpha]_D^{25} + 21.0^\circ$ (CH₃OH, c 0.6), 茚三酮显阴性, 分子式为 C₁₅H₂₀N₂O₂ (m/z 260.1518, ∇ 1.7 mu)。IR(KBr) cm⁻¹: 3300, 1650。 ¹HNMR(CD₃OD, δ): 7.25(5H, m), 4.30(1H, t, J = 4.6 Hz), 3.65(1H, dd, J = 4.2, 10.8 Hz), 3.26(1H, m), 2.93(1H, dd, J = 4.8, 13.6 Hz), 1.41(1H, m), 0.84(2H, m), 0.72(3H, d, J = 6.6 Hz), 0.67(3H, d, J = 6.6 Hz)。 ¹³CNMR(CD₃OD, δ): 170.6(CO), 169.0(CO), 136.8(C), 131.8(CH), 129.7(CH), 128.5(CH), 57.5(CH), 54.2(CH), 45.3(CH₂), 40.3(CH₂), 24.7(CH), 23.3(CH₃), 21.5(CH₃)。

混合物 白色粉末, 茚三酮显阴性, 由于量少(9 mg), 未分离。在 HPLC 上有 3 个峰, 保留时间分别为 28.7, 46.1 及 51.9 min。从 EI 质谱分析为分子量 246, 260 及 294 的 3 个环二肽组成的混合物, 初步判定为环(苯丙-缬), 环(苯丙-异亮)和环(苯丙-苯丙)。我们合成了这 3 个化合物, 将这 3 个化合物及混和后分别做 HPLC, EI 质谱及高分辨 EI 质谱, 发现保留时间、分子量和分子式与天然混合物完全一致(表 1)。

3 环二肽(1~20)的合成

参照 Ueda^[6] 方法, 环二肽 1~5 及 7~13 合成通法如下:

在 L-氨基酸(20 mmol) 的无水甲醇溶液中, 于 -10°C 缓慢滴加亚硫酸氯(27.8 mmol), 在室温下搅拌 2 d 后, 减压除去溶剂得无色或淡黄色油状物。此油状物为 L-氨基酸甲酯盐酸盐, 无需纯化, 直接用于反应。

Tab 1 HPLC retention time, EI-MS and HREI-MS of natural and synthetic mixtures

	Natural mixture			Synthetic mixture		
	4	5	6	4	5	6
Retention time	28.8	46.0	51.8	28.7	46.1	51.9
EI-MS m/z / %	294(22), 260(32), 246(54), 204(30), 175(26), 155(20), 141(32), 127(47), 120(31), 113(44), 99(26), 91(100), 77(22), 72(28), 65(31), 57(40)			294(40), 260(10), 246(92), 204(31), 175(41), 155(35), 141(10), 127(72), 120(42), 113(44), 99(35), 91(100), 77(27), 72(63), 65(35), 57(35)		
HR-EI-MS	246.1372 (∇ , -0.3 mu)	260.1530 (∇ , -0.5 mu)	294.1371 (∇ , -0.3 mu)	246.1366 (∇ , 0.2 mu)	260.1520 (∇ , 0.4 mu)	294.1369 (∇ , -0.1 mu)

将 L-氨基酸(5 mmol), NaHCO₃(10 mmol)溶于蒸馏水(10 ml), 滴加苄氧酰氯(6 mmol)的二氧六环溶液(10 ml)。反应混合物在室温搅拌 2 d 后, 减压除去溶剂, 加蒸馏水(10 ml)稀释, 用乙酸乙酯(10 ml)萃取。水层用 0.5 mol·L⁻¹的柠檬酸酸化至 pH 5 左右, 然后再用乙酸乙酯(30 ml)分别萃取 3 次, 合并萃取物, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏得油状物。将油状物经柱色谱分离得白色粉末。此粉未经负离子 FAB-MS 证实为 N-苄氧羰基-L-氨基酸。将上述的 L-氨基酸甲酯(2.7 mmol), N-苄氧羰基-L-氨基酸和三乙胺(2.7 mmol)混合于二氯甲烷(10 ml)

中, 在 0℃ 反应 4 h, 然后在室温反应过夜, 过滤, 减压除去溶剂, 将残余物溶于乙酸乙酯, 依次用 2% HCl, 5% NaHCO₃ 和水洗, 无水硫酸钠干燥。减压蒸馏后, 在硅胶柱上纯化得白色粉末。将此粉末溶于甲醇(5 ml), 加 10% 钨炭催化下氢解, TLC 监测反应, 待反应毕, 过滤除去催化剂, 减压除去溶剂, 残余物经硅胶柱色谱纯化得环二肽。

参照 Cook^[7]方法, 环二肽 6, 14~20 合成通法如下: 将 L-氨基酸溶于无水乙二醇中, 加热回流 24 h, 冷却析出固体, 将固体在乙醇中重结晶或硅胶柱色谱得环二肽。结果见表 2。

Tab 2 Results of the synthesized cyclic dipeptides

Compds	Form	Yield / %	MP / °C	[α] _D ^c	EI-MS / 70 ev m/z (%)	HR-EI-MS / 70 ev calc.	¹ H NMR	¹³ C NMR
11	Needle crystal	89.1	-	-118.59 (CH ₃ OH, c 0.39)	184[M] ⁺ (6)	184.0833 (184.0848)	4.23(1H, m), 4.16(1H, m), 3.90(2H, m), 3.58(1H, m), 3.33(1H, m), 2.31(1H, m), 1.96(3H, m)	184.2(CO), 178.8(CO), 74.1(CH ₂), 72.6(CH), 70.6(CH), 58.6(CH ₂), 41.9(CH ₂), 35.6(CH ₂)
12	Needle crystal	85.2	-	-117.60 (CH ₃ OH, c 0.304)	199 [M+1] ⁺ (21)	198.1011 (198.1004)	7.35(1H, NH, br. s), 4.24(1H, m), 4.09(1H, m), 4.00(1H, br. s), 3.90(1H, m), 3.55(1H, m), 3.48(1H, m), 2.30(1H, m), 1.99(2H, m), 1.87(1H, m), 1.31(3H, d, J=6.5 Hz)	180.1(CO), 175.3(CO), 75.3(CH), 69.5(CH), 69.1(CH), 55.0(CH ₂), 38.2(CH ₂), 32.2(CH ₂), 29.7(CH ₃)
13	Needle crystal	73.5	-	+77.26 (CH ₃ OH, c 0.288)	297[M] ⁺ (41)	297.1456 (297.1477)	9.82(1H, NH, br. s), 8.40(1H, d, J=8.0 Hz), 8.06(1H, m), 7.91(1H, m), 7.82(1H, m), 7.64(1H, m), 5.02(1H, br. s), 4.48(2H, m), 4.17(1H, m), 4.02(1H, m), 3.89(3H, s), 3.69(1H, m), 2.44(1H, m), 2.05(1H, m), 1.45(1H, m), 0.54(1H, m)	166.4(CO), 164.1(CO), 135.8(C), 127.2(C), 123.8(CH), 122.1(CH × 2), 111.0(CH × 2), 107.8(C), 63.1(CH), 59.0(CH), 44.4(CH ₂), 32.2(CH ₂), 28.2(CH ₂), 27.2(CH ₂), 20.4(CH ₂)
14	White powder	58	280~282.5	-	326[M] ⁺ (12)	326.1260 (326.1267)	11.39(br. s, OH), 9.16(s, NH), 7.24(4H × 2, m), 4.50(1H × 2, m), 3.29(1H × 2, m), 2.73(1H × 2, m)	168.8(CO × 2), 159.2(C × 2), 133.1(CH × 2), 128.8(CH × 2), 117.6(C × 2), 58.9(CH × 2), 41.9(CH ₂ × 2)
18	White powder	54.6	228~228.5	-	262[M] ⁺ (49)	262.0805 (262.0810)	8.10(NH, s), 4.32(1H × 2, m), 2.15(2H × 2, m), 2.20(2H × 2), 1.90(3H × 2, s)	169.9(CO × 2), 60.3(C × 2), 31.0(CH ₂ × 2), 30.1(CH ₂ × 2), 16.9(CH ₃ × 2)

参 考 文 献

1 中华人民共和国卫生部药典. 英文版. 广州: 广东科技出版社, 1992: 82

- 2 Takeya T, Yamaki S, Itoh T, *et al.* A general synthesis of (±)-dibenzocyclooctadiene. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44: 909
- 3 秦文娟, 孔庆芬, 范志同, 等. 掌叶半夏化学成分的研究(III). *中草药*, 1984, 15: 490

- 4 Kimura Y, Tani K, Kojima A, *et al.* Cyclo-(L-tryptophyl-phenylalanyl), a new plant growth regulator from the fungus *Penicillium* sp.. *Phytochemistry*, 1996, 41:665
- 5 Massharu K. Cyclic dipeptides for stress resistance in plants. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 05 43, 408*, 1993(CA 1993, 119:295, 133454y)
- 6 Ueda T, Saito M, Kato T, *et al.* Facile synthesis of cyclic dipeptides and detection of racemization. *Bull Chem Soc Jpn*, 1983, 56:568
- 7 Cook B, Hill RR, Jeffs GE. Efficient one-step synthesis of diastereoisomeric cyclic dipeptides from amino acids; Three diastereoisomers of cyclo-L-isoleucyl-L-isoleucine. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1992, 10:1199
- 8 Vicar J, Smolikova J, Blaha K. Amino acids and peptides. CIX. Synthesis and infrared spectroscopy of 2, 5-piperazinediones derived from proline and pipercolic acid, *Collect Czech Chem Commun*, 1972, 37:864
- 9 Nitecti DE, Halpern B, Westley JW. A simple route to sterically pure diketopiperazines. *J Org Chem*, 1968, 33:864
- 10 Suzuki K, Sasaki Y, Endo N, *et al.* Acetic acid-catalyzed diketopiperazine synthesis. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29:233
- 11 Evzen K, Jiri K, Josef S, *et al.* 2, 5-Dioxopiperazine derivatives. *Czech CS*, 232, 319, 1986

CYCLIC DIPEPTIDES FROM *SCHIZANDRA CHINENSIS* AND THEIR SYNTHESSES

Wang Youchu(Wang YC), Zhou Jun(Zhou J), Tan Ninghua(Tan NH),
Ding Zhongtao(Ding ZT) and Jiang Xin(Jiang X)

(Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

ABSTRACT **AIM:** To investigate cyclopeptides from the fruits of *S. chinensis*. **METHODS:** Use thin layer chromatography, repeated silica gel and RP-18 column chromatography together with spectra as well as synthetic methods. **RESULTS:** Three naturally occurring cyclic dipeptides and a mixture composed of three other new naturally occurring cyclic dipeptides were obtained. Their structures were determined as cyclo-(leucyl-prolyl) (1), cyclo-(phenyl-alanyl-prolyl) (2), cyclo-(phenylalanyl-leucyl) (3), cyclo-(phenylalanyl-valyl) (4), cyclo-(phenylalanyl-isoleucyl) (5) and cyclo-(phenylalanyl-phenylalanyl) (6). In addition, fourteen analogous cyclic peptides (7 ~ 20) were synthesized. **CONCLUSION:** Cyclopeptides were isolated from *S. chinensis* (Schizandraceae) for the first time. The bioactivity of some cyclic dipeptides on the contraction of rabbit aorta strips with KCl (40 mmol·L⁻¹) depolarization was tested. Cyclic dipeptides 2, 6 and 18 showed slight calcium antagonism and 19, 20 can increase the contractile effect in high concentration of potassium. Studies on the bioactivities of other cyclic dipeptides are in progress.

KEY WORDS *schizandra chinensis*; schizandraceae; cyclic peptides; synthesis