DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.039
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

文章编号:1000-5404(2001)05-0571-02

论著

L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的合成及初步鉴定

李永新[1],覃 军[2],赵树铭[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院药剂科;[2]基础医学部化学教研室;[3]附属西南医院输血科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨L-丙氨酰-L-谷氨酰胺双肽的化学合成方法。方法 以L-谷氨酰胺和2-D-氯丙酰氯为原料,通过缩合、胺化等反应,合成L-丙氨酰-L-谷氨酰胺双肽;采用熔点、氨基酸组分分析、元素分析、质谱等方法对其结构进行鉴别,用高效液相色谱法确定其纯度。结果 合成的双肽经理化检测,质量高。结论 采用本法合成谷氨酰胺双肽具有简便、快速、质量高等优点。

关键词:L-丙氨酰-L-谷氨酰胺;合成
中图法分类号:Q503;Q516 文献标识码:A

Synthesis and preliminary identification of L-alanyl-L-glutamine dipeptide

LI Yong-xin, QIN Jun, ZHAO Shu-ming (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the method of chemical synthesis of L-alanyl-L-glutamine dipeptide. Methods L-alanyl-L-glutamine dipeptide was prepared by condensation and ammoniation reaction of L-glutamine and 2-D-chloropropionyl chloride. The physico-chemical properties of this dipeptide were identified with melting point determination, amino acid analysis, elements analysis and MS and its purity was determined with HPLC. Results This dipeptide was confirmed good in quality by physico-chemical determination. Conclusion Dipeptide synthetized by this method is simple, convenient and with good quality.

Key words: L-alanyl-L-glutamine; synthesis

大量研究证明,L-谷氨酰胺为一种条件必需氨基酸,对机体免疫功能和创伤修复等具有重要作用。但由于其对酸碱、高温等不稳定,导致其临床应用受限,可通过将其转变为双肽的形式提高稳定性。已有经过化学法和双肽特异性合成酶合成L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、甘氨酰-L-谷氨酰胺和L-谷氨酰-L-谷氨酰胺等双肽报道[1~3]。我们参考文献[4,5],用L-谷氨酰胺和2-D-氯丙酰氯为原料,通过缩合、胺化等反应,合成了L-丙氨酰-L-谷氨酰胺双肽,并对其进行了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 仪器

高压釜,北京仪器厂;ZX-91型旋转蒸发仪,中国科学院上海有机化学研究所;DF-101B集热式恒温磁力搅拌器,浙江乐清市乐成电器厂;氨基酸分析仪,Beckman公司;高效液相色谱仪,Waters公司;质谱分析仪(KYKY-QP);元素分析仪,德国Hearews公司。

1.2 试剂

无水甲苯的制备:于市售甲苯中加入金属钠,加热回流2 h,蒸馏收集110~111 ℃馏份。其余试剂均为市售,分析纯,无需另外处理。

1.3 试验步骤

1.3.1 N-(2-D-氯)丙酰基-L-谷氨酰胺的合成 48.2 g(0.33 mol)L-谷氨酰胺于室温下加入水150 ml、甲苯150 ml,冷至0~5 ℃,加入66 ml(0.33 mol)5 mol/L NaOH,搅拌,溶解L-谷氨酰胺于此溶液中,分别逐次滴加90 ml含有42.0 g(0.33 mol)2-D-氯丙酰基氯(允许纯度误差为92.8%)的无水甲苯溶液和74 ml 5 mol/L NaOH,2 h内加完,维持pH达10。在0~5 ℃搅拌1 h,通过液相分离除去甲苯。在室温下加入60 g NaCl于水相层中,加入22 ml浓盐酸,混匀,调节pH至2.5。于混合溶液中加入自制晶种,搅拌30 min,再加入8 ml浓盐酸,将pH调至1.0。

所得液体放置于室温达1 h,滤出生成的晶体,减压干燥,得N-(2-D-氯)丙酰基-L-谷氨酰胺71.6 g。

1.3.2 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的合成 60.0g(0.24 mol)N-(2-D-氯)丙酰基-L-谷氨酰胺,600 ml 28%氨水,于室温下混于1 L圆底烧瓶中,将此反应瓶放入高压釜中升温至60 ℃,内压达2 kg/cm^{2}反应8 h。反应混合物再冷至室温,减压浓缩,加入30 ml水于残留物中。在室温下,将450 ml甲醇于1 h内滴加入上述水溶液。混匀后放置2 h,有沉淀析出,抽滤得结晶粗品35.4 g。

1.3.3 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的精制 将30 g L-丙氨酰-L-谷氨酰胺粗品溶于50 ml水中,加入0.6 g活性炭,混合物经搅拌10 min,过滤,除去活性炭。于30 ℃加入42 ml甲醇于滤液中,放入晶种。混合液放置2 h。再于30 ℃ 1 h内加入138 ml甲醇,搅拌2 h。抽滤析出的结晶,低压干燥,得26.38 g产品。

1.3.4 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的初步鉴定 对合成的本品参照标准方法初步进行含量、纯度等测定。

2 结果

2.1 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的合成

N-(2-D-氯)丙酰基-L-谷氨酰胺的合成,收率85.5%,熔点(分解)148 ℃;L-丙氨酰-L-谷氨酰胺粗品的合成,收率69.0%;L-丙氨酰-L-谷氨酰胺精品的制备,收率88.0%,溶点(分解)216 ℃。

2.2 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的鉴定(按照中国药典附录规定的方法)

2.2.1 理化性质分析 溶点(分解)216 ℃,比旋度$[\alpha]_D^{20}$为-3.49°(C=10.1 mol/L HCl)。

作者简介:李永新(1963-),男,四川省眉山市人,主管药师,主要从事医院制剂方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68754286
收稿日期:2001-01-18;修回日期:2001-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.2 杂质分析 采用薄层色谱法(硅胶 G 板,冰醋酸∶正丁醇∶水= 2∶2∶1,茚三酮显色),结果为单一斑点。

2.2.3 氨基酸组分分析 采用氨基酸分析仪,结果为丙氨酸∶谷氨酰胺为 1∶1.01,见图 1。

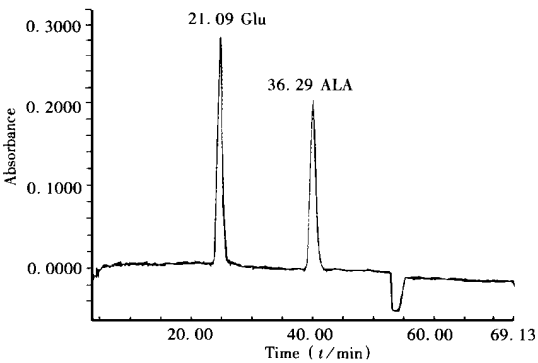


图 1 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺氨基酸组分分析图

Fig 1 Chromatogram of amino acids of L-alanyl-L-glutamine dipeptide

2.2.4 纯度测定 采用高效液相分析仪,结果为 98.94%。

2.2.5 质谱分析(m/z) 218(M+1),130(Gln+1, base peak),与 $C_8H_{15}N_3O_4$ 相符。

2.2.6 元素分析 实测值(理论值)为 N 19.52(19.35)、H 7.15(6.91)、O 29.52(29.49)、C 43.82(44.24)。

3 讨论

L-谷氨酰胺是机体内含有两个氮原子的特殊氨基酸。这一化学结构的特殊性决定了其具有独特的性质,近年来的研究表明,L-谷氨酰胺是一种条件必需氨基酸,在蛋白质、核酸合成中具有重要作用,是肠粘膜上皮细胞、肾小管上皮细胞和免疫活性细胞等代谢活跃细胞的能量来源,被认为是机体的氮源运载工具,在体内各组织间转运氮源,发挥清除氨等有毒物质等重要功能。临床研究表明,使用 L-谷氨酰胺对严重分解代谢疾病(如烧伤/外伤/大手术、急慢性感染、骨髓移植和多器官功能障碍综合症)、肠道功能不全(如肠炎、短肠综合症和放化疗所致粘膜损害)、免疫缺陷综合症(如艾滋病、危重病或骨髓移植后伴发的免疫功能低下)等疾病具有良好的治疗效果[1~3]。但由于 L-谷氨酰胺溶解度小,在水溶液中不稳定,临床上还未有含 L-谷氨酰胺的胃肠外营养制剂广泛使用。我们通过改进报道的化学合成法,将 L-谷氨酰胺制备为双肽,中间体及粗品的合成和精品的制备均易控制,产物收率较高,该法简便、快速,可望开发为临床安全、稳定、有效的 L-谷氨酰胺双肽制剂。

(致谢:本研究所用分析方法承蒙本校高原军事医学系中心实验室、一坪油化分析实验室、西南师范大学化学系实验室等单位大力支持,特表感谢。)

参考文献:

[1] Powell-Tuck J. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide shortened hospital stays and improved immune status and nitrogen economy after major abdominal surgery[J]. Gut, 1999, 44(2): 155.

[2] 白满喜, 蒋朱明, 刘跃武, 等. 谷氨酰胺双肽保护肠粘膜屏障[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(6): 370—373.

[3] Kohler H, Ruggeberg J, Langer K, *et al*. Glycyl-glutamine improves *in vitro* lymphocyte proliferation in AIDS patients[J]. Eur J Med Res, 2000, 5(6): 263—267.

[4] Klassen P, Mazariegos M, Solomons N W, *et al*. The pharmacokinetic responses of humans to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with the dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute Dengue fever[J]. J Nutr, 2000, 130(2): 177—182.

[5] Stehle P, Kuhne B, Kubin W, *et al*. Synthesis and characterization of tyrosine-and glutamine-containing peptides[J]. J Appl Biochem, 1982, 4: 280—286.

(编辑 陈聪连)

(上接 570 页)

它易透过血脑屏障进入中枢,本实验中毒 15 min 后即出现酶活性明显抑制($P<0.01$),120 min 未见恢复。当中毒剂量增大,酶活性抑制亦加重,提示梭曼通过抑制中枢 AChE 活性干扰中枢功能,中枢为梭曼毒理作用的主要靶器官之一。本研究结果初步证明,梭曼对 AChE 抑制过程与脑含水量变化并无直接关系。Flynn 等[3]认为,梭曼能增加脑磷脂酰胆碱水解,同时伴有 FFA 增加,严重影响中枢能量代谢,引起血脑屏障通透性和膜离子梯度改变,使水进入细胞内。因此,有人认为 FFA 可诱发组织水肿[4]。正常情况下,中枢 FFA 含量很少,但在缺氧、损伤、肿瘤周围组织发生水肿的同时,FFA 浓度也往往明显高于正常。这可能是组织结合脂肪酸遭到破坏而释出的结果。本实验两种中毒剂量梭曼中毒时,15 min 后 FFA 均明显高于正常值,以后出现波动变化,60 min 时又呈现高于正常值水平($P<0.05$)。脑组织含水量呈现中毒后逐渐增加且超出正常水平($P<0.05$),FFA 浓度改变对脑组织水肿至少有诱发推动作用。似乎并不显示其之间呈正比关系,究竟脑组织水肿与 FFA 浓度之间有何关系仍有待进一步研究。

关键词:高原;梭曼;游离脂肪酸

中图法分类号:R339.54;R914.4 文献标识码:B

参考文献:

[1] Banks W A. Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders[J]. J Neurovirol, 1999, 5(6): 538—555.

[2] Sinton C M, Fitch T E, Petty F, *et al*. Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the rat[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 165(1): 99—105.

[3] Flynn C J, Wecker L. Concomitant increases in the levels of choline and free fatty acids in rat brain: evidence supporting the seizure-induced hydrolysis of phosphatidylcholine[J]. J Neurochem, 1987, 48(4): 1 178—1 184.

[4] Katayama Y, Kawamata T, Maeda T, *et al*. Free fatty acid liberation and cellular swelling during cerebral ischemia: the role of excitatory amino acids [J]. Acta Neurochir Suppl Wien, 1994, 60: 242—245.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net