

TỔNG HỢP VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXID HÓA CỦA CÁC PEPTID TRYPTOPHYLLIN L

TRẦN THỊ THANH NHÃ, TRẦN THÁI HOÀNG, LÊ MINH HIẾU, VÃNG GIA HUY

*Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh
tranthithanhnh@iuh.edu.vn*

Abstract. Hai tetrapeptid Tryptophyllin L gồm Phe-Pro-Trp-Leu(OH) và Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) được tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp peptid trên pha rắn sử dụng kỹ thuật Fmoc. Cơ cấu hai peptid được xác nhận bằng phương pháp đo phổ khối lượng (MS) và phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), cùng với độ tinh khiết hơn 95% được xác nhận bằng sắc ký lỏng cao áp C-18 (RP-HPLC). Khảo sát hoạt tính kháng oxid hóa của hai peptid bằng hai phản ứng DPPH và FRAP cho thấy Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) có khả năng kháng oxid hóa vượt trội và là một hợp chất tiềm năng để phát triển peptid kháng oxid hóa.

Keywords. Tổng hợp peptid trên pha rắn, Fmoc, Tryptophyllin L, chất kháng oxid hóa, DPPH, FRAP.

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TRYPTOPHYLLIN L PEPTIDES

Abstract. Two Tryptophyllin L tetrapeptides including Phe-Pro-Trp-Leu(OH) and Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) were successfully synthesized using Fmoc solid-phase peptide synthesis technique. The structures of two peptides were confirmed by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) measurements. Purity of more than 95% for both peptides were revealed by Reverse Phase Liquid Chromatography (RP-HPLC). Screening for antioxidant activities of the two peptides by DPPH and FRAP assays showed a high antioxidant potency of Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) which is in contrast with Phe-Pro-Trp-Leu(OH) and required further investigation for its potential application as an antioxidant for domestic or medicinal purpose.

Keywords. Peptide solid-phase synthesis, Fmoc, Tryptophyllin L, antioxidants, DPPH, FRAP.

1 GIỚI THIỆU

Vai trò của peptid ngày càng trở nên quan trọng trong các nghiên cứu dược phẩm, hóa mỹ phẩm và gần đây là công nghệ thực phẩm [1-5]. Các công trình nghiên cứu cho thấy, các peptid phân lập từ tự nhiên thể hiện đa dạng các hoạt tính sinh học bao gồm khả năng kháng oxid hóa, hạ huyết áp, kháng vi sinh và kháng khuẩn [6]. Peptide kháng oxid hóa đặc biệt được chú ý khi chúng là hợp chất tiềm năng góp phần quan trọng vào việc ngăn ngừa và chữa trị các căn bệnh như tim mạch, tiểu đường, ung thư, viêm khớp...[6-9]. Hơn nữa chúng còn có khả năng tạo phức hiệu quả với các ion kim loại như Fe²⁺ hoặc Cu²⁺ và làm chậm quá trình peroxid hóa của lipid. Điều này khiến peptid ly trích từ tự nhiên trở thành các hợp chất được nghiên cứu rộng rãi nhằm ứng dụng trong công nghiệp bảo quản thực phẩm thực phẩm và chất kháng oxid hóa trong nghiên cứu dược phẩm [10-12].

Đa số các peptid với hoạt tính sinh học thu được từ các nguồn protein khác nhau bằng phương pháp thủy giải dùng vi sinh hay dùng các enzym thủy giải (protease). Rất nhiều công trình nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu quả của quy trình thủy giải, khử, tinh chế, xác định cơ cấu và hoạt tính của các peptid đã được công bố. Qua đó, số lượng peptid với hoạt tính kháng oxid hóa được phát hiện cũng ngày nhiều và đa dạng về cơ cấu [10, 13-19].

Ngoài việc phân lập và xác định cơ cấu của các peptid có hoạt tính kháng oxid hóa, các nghiên cứu khác về mối quan hệ giữa cơ cấu và hoạt tính bao gồm ảnh hưởng của thành phần amino acid, vị trí và số lượng của các amino acid đến khả năng kháng oxid hóa của các peptid này cũng được tiến hành, nhằm làm cơ sở cho việc dự đoán và thiết kế các peptid có hoạt tính kháng oxid hóa [10, 11, 16]. Trong một nghiên cứu tổng kê trên 42 peptid kháng oxid hóa của nhóm nghiên cứu của Xia từ Trường đại học Y

khoa Guangdong [11] cho thấy chúng có độ dài 3-16 amino acid, trong đó nhóm có hoạt tính kháng oxid hóa cao nhất có độ dài dưới 7 amino acid và khối lượng phân tử nhỏ hơn 1000 đvC. Sự có mặt với mật độ cao của các amino acid hương phượng như Tyr, His, Trp và Phe; amino acid kỵ nước như Val, Leu, Ile, Pro, Ala, Met và Gly được cho là có ảnh hưởng lớn đối với tính kháng oxid hóa của các peptid đã được nghiên cứu [11, 20]. Nghiên cứu mối quan hệ cơ cấu-tính chất sử dụng mô hình định lượng (QSAR) cho thấy sự có mặt của amino acid kỵ nước tại vị trí C3 của vùng đuôi carboxylic giúp tăng khả năng phá hủy gốc peroxi của peptid, từ đó tăng khả năng kháng oxid hóa của chúng [21].

Khả năng thể hiện hoạt tính kháng oxid hóa của các α -amino acid đơn lẻ cũng được nghiên cứu để tìm kiếm mối liên hệ trực tiếp giữa sự có mặt và số lượng các amino acid này đối với hoạt tính của peptid kháng oxid hóa. Cụ thể, khả năng bị oxid hóa cao hơn của các amino acid Cys, Met, Trp, Tyr và His so với các amino acid khác được giải thích bởi khả năng dễ bị oxid hóa của dây nhánh thiol trong Cys, tioeter trong Met, indol trong Trp, hidroxil phenol trong Tyr, và imidazol trong His [22]. Nhận định này được kiểm chứng lại lần nữa vào đầu năm 2018 khi nhóm của Matsui tiến hành khảo sát khả năng bảo vệ myoglobin của 20 α -amino acid chống lại các gốc chứa oxigen và nitrogen hoạt động. Nghiên cứu này cho thấy Trp đứng đầu trong các amino acid chống lại các tác nhân oxid hóa chứa oxigen như hipoclorit và gốc peroxi, trong khi các amino acid như Asp, Asn, Glu và Gln lại thể hiện tốt khả năng chống lại gốc oxid hóa chứa nitrogen như peroxinitrit [23].

Ngoài yếu tố thành phần amino acid, sự ảnh hưởng của số lượng và trình tự sắp xếp của các amino acid đến khả năng kháng oxid hóa của các peptid cũng được nghiên cứu bởi một số nhóm. Trình tự sắp xếp của các amino acid được nhận định có ảnh hưởng quyết định đến tính oxid hóa của các peptid [24]. Cụ thể sự thay đổi vị trí hay loại bỏ của các amino acid được cho là sẽ làm thay đổi khả năng oxid hóa của peptid tương ứng [25]. Tuy nhiên khuynh hướng thay đổi cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng.

Việc khảo sát hoạt tính kháng oxid hóa của các peptid ly trích từ thiên nhiên cùng với việc ảnh hưởng của các yếu tố cơ cấu đến khả năng kháng oxid hóa của các chúng sẽ góp phần mở rộng ngân hàng các peptid thuộc nhóm này, đồng thời làm cơ sở cho việc dự đoán và thiết kế peptid ứng dụng vào trong các ngành như công nghệ thực phẩm và dược phẩm. Chính vì mục đích này mà nhóm nghiên cứu tổng hợp và xác định khả năng kháng oxid hóa của một số peptid Tryptophyllin.

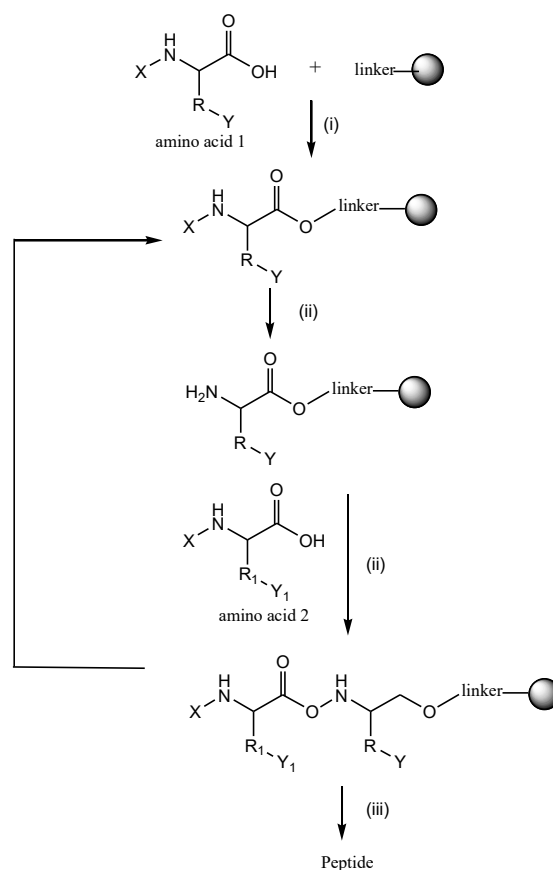
Tryptophyllin L là các peptid được cô lập từ dịch tiết qua da của loài ếch *Litoria rubella*. Một số Tryptophyllin L tiêu biểu được trình bày trong Bảng 1. *Litoria rubella* tiết một lượng lớn các Tryptophyllin ra khi có kích thích xung điện thấp 10-15V qua da. Các Tryptophyllin L là peptid chứa từ 4-7 amino acid với chuỗi Pro-Trp gắn liền nhau [26, 27]. Trong khi các họ peptid phân lập từ loài lưỡng cư khác như caeridin, aurein, citropin, signiferin, tachykinin sở hữu hàng loạt hoạt tính sinh học như tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống co cơ, giảm đau... nghiên cứu vẫn chưa chỉ ra hoạt tính sinh học nổi bật của nhóm Tryptophyllin [26, 28]. Mặt khác, một nghiên cứu gần đây cho thấy trong dịch tiết của loài này tại một số địa phương của Úc có chứa các chất chuyển hóa của tryptophan như kynurenine, 5-hydroxytryptophan và N-formylkynurenine [29]. Điều này có thể lý giải do khả năng dễ bị oxid hóa của tryptophan có trong các peptid này nhưng cũng đồng thời đặt ra câu hỏi, liệu các peptid Tryptophyllin L này có phải là những hợp chất có hoạt tính kháng oxid hóa và cấu trúc của chúng có thể được sử dụng như nền tảng để phát triển các peptid kháng oxid hiệu quả trong công nghệ thực phẩm và dược phẩm. Giả thuyết này được củng cố khi các peptid ngắn này đều chứa các amino acid được đánh giá có mặt nhiều trong các peptid kháng oxid hóa như Pro, Phe và Leu [14, 29, 30]. Để trả lời câu hỏi trên, nhóm nghiên cứu đã tổng hợp 2 peptid Tryptophyllin L1.2 và Tryptophyllin L1.2.1 (Bảng 1), khảo sát hoạt tính kháng oxid hóa của chúng qua các thí nghiệm với các tác nhân oxid hóa chứa oxigen như DPPH và FRAP, so sánh khả năng kháng oxid hóa của chúng với chất chuẩn Trolox từ đó đánh giá tiềm năng sử dụng chúng như chất nền cho tổng hợp các peptid kháng oxid hóa.

Bảng 1. Một số Tryptophyllin L peptid phân lập từ dịch tiết qua da của loài ếch *Litoria rubella*

Tên	KLPT	Cơ cấu peptid
Tryptophyllin L 1.1.1	415	Pro-Trp -Leu(OH)
Tryptophyllin L 1.2	560	Phe- Pro-Trp -Leu (NH ₂)
Tryptophyllin L 1.2.1	561	Phe- Pro-Trp -Leu(OH)
Tryptophyllin L 1.5	501	Ser- Pro-Trp -Leu(OH)
Caeridin type Rubellidin	882	Ala-Gly-Leu-Gly-Asp-
Caeridin type Rubellidin	1038	Gly-Leu-Gly-Asp-Ile-

Tổng hợp peptid trên pha rắn (solid phase peptide synthesis SPPS) là phương pháp được thiết lập và phát triển bởi Merifield [31] và hiện đang là phương pháp được sử dụng phổ biến trong phòng thí nghiệm nghiên cứu cũng như trong công nghiệp để điều chế peptid. Được gọi là phương pháp tổng hợp peptid trên pha rắn vì nó gắn amino acid đầu tiên lên trên các hạt polymer không tan trong dung môi phản ứng còn gọi là resin, rồi lần lượt gắn các amino acid theo trình tự để tạo dây peptid mong muốn (Hình 1) [32-33].

Trong nghiên cứu này các peptid sẽ được tổng hợp trên hai loại resin là 2-chlorotrityl chloride resin và rink amide resin với các chất ghép đôi N-[(1H-benzotriazole-1-yl)-(dimethylamino)methylene]-N-methylmethanaminium hexafluoro-phosphate N-oxide (HBTU)/ 1-hydroxybenzotriazole (HOBT). Peptid được tinh chế sử dụng phương pháp ly trích và cấu tạo được xác định bằng phương pháp phổ nguyên tử (NMR) và phổ khối lượng (MS). Khả năng kháng oxid hóa của các peptid sẽ được xác định với hai thí nghiệm DPPH và FRAP.



Hình 1: Quy trình tổng hợp peptid trên pha rắn
X, Y là nhóm bảo vệ đầu amin và dây nhánh tương ứng
Linker là nhóm chức nối amino acid và resin

2 HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP

2.1 Hóa chất

1-Hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt), Piperidine, Tetrachloro-1,4-benzoquinone (Chloranil), Picrylsulfonic acid (TNBS), N,N – Diisopropylethylamine (DIPEA), Trifluoroacetic acid (TFA), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) được mua từ công ty hóa chất Sigma Aldrich.

Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, và Fmoc-Trp(Boc)-OH, 2-Chlorotriyl chloride resin (100-200 mesh, 1,0-1,5 mmol/g), Rink amide resin (50-90 mesh, 0,8-1,0 mmol/g), (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) (HBTU) được mua từ công ty GL BioChem, Thượng Hải, Trung Quốc với độ tinh khiết > 95%. Dung môi methylene chloride (DCM) và dimethylformamide (DMF) với độ tinh khiết > 99.5% được mua từ công ty hóa chất Duksan, Hàn Quốc.

Độ tinh khiết của tác chất và dung môi được yêu cầu nghiêm ngặt trong phản ứng tổng hợp peptid. DIPEA và piperidin được chưng cất sau khi làm khô bằng KOH, được lưu trữ trong bình đựng rây phân tử Linde 4 Å và sử dụng trong vòng 2 tuần. Dimethylformamide (DMF) và dichloromethane (DCM) được làm khô bởi bột Linde 4 Å ít nhất 2 ngày trước khi sử dụng. Tất cả các hóa chất phải được lưu trữ ở nhiệt độ dưới 4 °C. Các thuốc thử TNBS and chloranil phải được pha mới ở mỗi lần thử nghiệm.

2.2. Xác định cơ cấu

Điểm chảy được đo trên Mel-Temp melting point (IA9100). Phổ IR được đo trên thiết bị Bruker Tensor 27. Phổ ^1H , ^{13}C -NMR và DEPT được ghi trên phổ kế Bruker Advance III hoạt động tại tần số 500 MHz cho ^1H và 125 MHz cho phổ ^{13}C -NMR và DEPT, dung môi DMSO-*d*₆. Độ dời cho ^1H , ^{13}C -NMR được trình bày dưới đơn vị ppm (δ) và mô tả như singlet (s), doublet (d), quartet (q), multiplet (m), double doublet (dd) và coupling constants *J* tính bằng Hz.

Phổ khối lượng phun sương điện tử (ESI MS) được tiến hành trên thiết bị Finigan LCQ Advantage Max LC-ESMS. Nguồn ion hóa: ion trap, ion hóa dương và âm, dãy khối lượng: 80,0-1000,0 m/z, thế ion hóa 12 eV, loại scan: full, thời gian (acquisition time) 15 phút. Dung môi để chạy RP-HPLC là 0,0% dung môi B đến 100% dung môi B (dung môi B: acetonitril + 0,1% TFA và dung môi A: 100% water + 0.1% TFA), cột Cosmosil C18, 4,6 x 250 mm, 5 μm , 100 Å tốc độ 1,0 ml/phút.

2.3. Quy trình tổng hợp peptid

Cả hai peptid đều được tổng hợp trên thiết bị lắp tự động sử dụng kỹ thuật bảo vệ Fmoc (Hình 1). Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) được tổng hợp trên 2-chlorotriyl chloride resin và quy trình được tóm tắt trong Bảng 1. Với HBTU/HOBt là tác nhân kích hoạt phản ứng ghép đôi của các amino acid. Các test màu trong Bước 8 được tiến hành để xác định sự còn lại (sau phản ứng ghép đôi) hay sự xuất hiện (sau khi cắt Fmoc) của gốc amin trong quá trình phản ứng. Hỗn hợp (10% DIPEA/DMF và TNBS/DMF) được sử dụng phát hiện amin nhất cấp, còn hỗn hợp (2% acetaldehyde/DMF và 2% chloranil/ DMF) được dùng để nhận biết sự có mặt của amin nhị cấp.

Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(OH) được tổng hợp trên Rink amid resin và dung môi được sử dụng là DMF. Trước khi gắn amino acid đầu tiên lên resin, Fmoc được cắt ra khỏi Rink amid bởi dung dịch 20% piperidin trong DMF. Sau đó tiến hành che bằng dung dịch anhidrid acetic: pyridin tỉ lệ thể tích 3:2. Các amino acid được gắn lên Rink amid theo quy trình tương tự như trong Bảng 1. Hỗn hợp TFA/H₂O/ TIPS (triisopropyl silane) 18:1:1 được sử dụng để cắt các peptid ra khỏi resin trong 1 giờ.

Peptid được rửa sạch khỏi resin sẽ được làm lạnh trong dietil eter và tách khỏi dung dịch dưới dạng kết tủa. Hỗn hợp được đem ly tâm và lọc. Chất rắn được hoàn tan trong dung môi 10% ACN/H₂O rồi đông khô. Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂), công thức phân tử là C₃₁H₄₀N₆O₄ được tổng hợp với hiệu suất 80%. Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂), công thức phân tử là C₃₁H₃₉N₅O₅ được tổng hợp với hiệu suất 73%.

Các peptid được tổng hợp theo quy trình được tóm tắt ở Bảng 2. Quy trình này là kết quả của sự tối ưu hóa tất cả các yếu tố liên quan gồm dung môi, thời gian lắp và thể tích của các tác chất và dung môi cho tổng hợp các tetrapeptid (peptid gồm bốn amino acid), được tiến hành trong điều kiện của phòng thí nghiệm tại Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh. Quy trình này được kiểm chứng cho tổng hợp Tryptophyllin L1.2 và một số tetrapeptid đã cho kết quả tương tự và hiệu suất đều trên 70%.

Bảng 2. Quy trình tổng hợp peptid sử dụng 2-chlorotrityl chloride resin (với khả năng tải lý thuyết của resin là 1 mmol peptid/1 g resin)

Tên bước	Hóa chất sử dụng	Lượng chất	Thời gian	Lặp lại
1. Ngâm resin	2-Chlorotrityl chloride DCM	500 mg 5 ml	1 h	x 1
2. Tải AA1 lên resin	Thêm Fmoc-AA ₁ (1.1mol), DIPEA (5.5 mol) trong DCM	6 ml	3-8 h	x 1
3. Rửa lần 1	DCM	6 ml		x 3
4. Che resin	CH ₂ Cl ₂ :MeOH :DIPEA (17:2:1)	5 ml	30 min	x 1
5. Rửa lần 2	Rửa bằng DCM/DMF/DCM	6 ml		x 3
6. Cắt Fmoc	20 % piperidin/DMF (tỉ lệ 1:4)	6 ml	1 h	
7. Rửa lần 2	Rửa bằng DCM/DMF/DCM	5 ml		x 3
8. Test màu	Amin nhất cấp: (10% DIPEA/ DMF) và (5 mg TNBS + 0.5 mL DMF) →đỏ/ cam đỏ Amin nhị cấp: (2% acetaldehyd/DMF) và (2 % cloranil/DMF) → xanh đậm/lá			
9. Ghép đôi các AA tiếp theo	Thêm Fmoc-AA _n (3 mol), HBTU (3mol), HOBT (3mol), DIPEA (6 mol), dung môi DCM: DMF (1:1)	5 ml	6 h	x 2
10. Lặp lại	Từ bước 7-9 cho các Fmoc-amino acid tiếp theo			
11. Cắt peptid ra khỏi resin	TFA/ H ₂ O/ TIPS (18:1:1)	5 ml	1 h	x 1 x 2

2.4. Thí nghiệm bắt gốc tự do DPPH

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của peptid được đo lường bởi phương pháp đo quang [34]. Dung dịch chứa 2 ml của peptid trong etanol ở nồng độ giảm dần từ 800-50 µg/ml được trộn với 2 ml của dung dịch DPPH nồng độ 0,2 mM trong etanol. Hỗn hợp phản ứng được để tại nhiệt độ phòng trong bóng tối trong 30 phút. Độ hấp thụ của dung dịch được đo tại 517 nm bởi máy đo quang Thermo Scientific Genesys 20. Dung dịch DPPH: H₂O (v/v 1:1) được sử dụng như đối chứng âm. Khả năng bắt gốc tự do của hai peptide được tính sử dụng công thức sau:

$$\text{Khả năng bắt gốc tự do (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

Trong đó A_{control} là độ hấp thụ của đối chứng âm.

A_{sample} là độ hấp thụ của peptid ở các nồng độ khác nhau.

Tất cả các peptid được tiến hành 3 lần và lấy giá trị trung bình. Giá trị nồng độ tại đó peptid thể hiện khả năng bắt 50% gốc tự do (IC₅₀) được suy ra từ phương trình hồi quy tuyến tính mô tả sự phụ thuộc của phần trăm bắt gốc tự do theo nồng độ của peptid. Khả năng bắt gốc DPPH của glutathione được xác định giống như đối với các peptid.

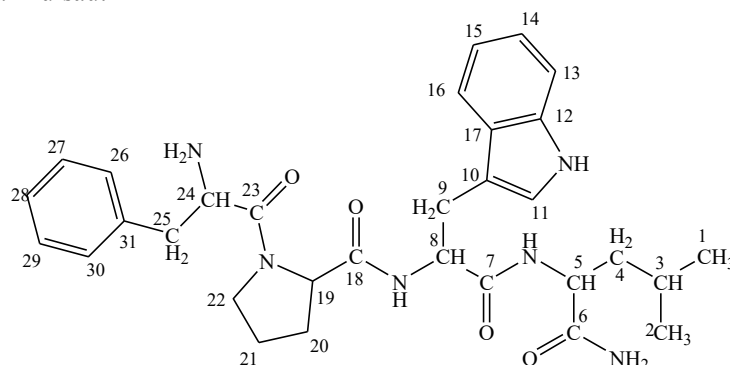
2.5. Thí nghiệm khử FRAP

Thí nghiệm FRAP được thực hiện theo phương pháp của Benzie và Strain [35]. Thuốc thử FRAP được điều chế bằng cách trộn dung dịch đệm acetat 0,3 M, TPTZ 10 mM trong 40 mM HCl, 20 mM FeCl₃ pH 3,6 theo tỷ lệ 10:1:1 về thể tích. Các peptid được hòa tan trong dung dịch etanol: H₂O (1: 1) để đạt nồng độ 2 mg/ml. Dung dịch peptid và thuốc thử FRAP được ủ ở 37 °C trong bể ổn nhiệt. Peptid và dung dịch FRAP được trộn với nhau theo tỉ lệ 1:5, để ổn nhiệt và độ hấp thụ được đo ở 593 nm sau 30 phút. Đường chuẩn được tạo ra bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch FeSO₄ nồng độ 100-1000 µM.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tryptophyllin L 1.2 Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂)

Hai peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) và Phe-Pro-Trp-Leu(OH) có cấu tạo được mô tả lần lượt trong Hình 2 và 3. Phân tích cơ cấu hai sản phẩm peptid bằng phương pháp ghi phổ FTIR, phổ khối lượng và phổ NMR cho kết quả như sau:

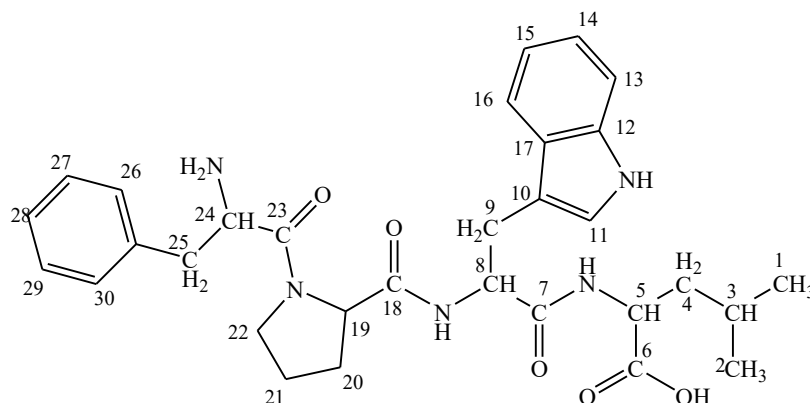


Hình 2: Cấu tạo phân tử Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) (Tryptophyllin L 1.2)

Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂), công thức phân tử là C₃₁H₄₀N₆O₄, thể rắn, hiệu suất 80%. Nhiệt độ nóng chảy 108-120 °C. Phổ dương ESI HRMS của peptid cho peak [M+H]⁺ 561.30. IR (KBr, ν_{max}, cm⁻¹): 3294 (N-H), 1648 (CO-NH), 1516 (C-N).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.78 (dd, *J* = 23.1, 11.0 Hz, 1H, NH indole), 8.29 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CO-NH-CH), 7.89 (dd, *J* = 8.1, 4.8 Hz, 1H, CO-NH-CH), 7.61 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.32 (dd, *J* = 12.8, 5.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.31 – 7.20 (m, 4H, Ar-H), 7.18 (s, 1H, CH-NH indole), 7.13 (s, *J* = 7.3 Hz, 2H, CO-NH₂), 7.09 – 7.02 (m, 1H, Ar-H), 6.98 (m, 2H, Ar-H), 4.62 – 4.52 (m, 1H, NH-CH-CONH₂), 4.44 (dd, *J* = 8.1, 3.8 Hz, 1H, NH-CH-CO pyrrolidine), 4.33 – 4.19 (m, 2H, NH-CH-CO), 3.27 – 3.10 (m, 1H, CH₂ pyrrolidine), 3.10 – 2.86 (m, 4H, CH₂-CH-CO), 2.52 – 2.47 (m, 4H, CH₂ pyrrolidine), 2.05 – 1.95 (m, 1H, CH₂ pyrrolidine), 1.91 (s, 1H, CH-NH₂), 1.73 (m, *J* = 30.5 Hz, 2H, CH₂-CH(CH₃)₂), 1.60 – 1.50 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 0.87 (dd, *J* = 6.5, 3.4 Hz, 3H, CH-(CH₃)₂), 0.83 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH-(CH₃)₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.35 (C6), 171.34 (C7), 171.24 (C18), 167.27 (C23), 136.52 (C12), 135.09 (C31), 130.32, 129.88, 129.11, 128.96, 127.65 (C26-30), 127.88 (C17), 124.15, 121.28, 118.88, 118.70, 111.70 (C11, C13-16), 110.21 (C10), 60.09 (C19), 54.05 (C8), 52.71 (C24), 51.34 (C5), 47.23 (C22), 41.61 (C4), 36.55 (C25), 29.41 (C20), 27.86 (C21), 24.84 (C9), 24.59 (C3), 23.51 (C1-2), 22.10(C1-2).



Hình 3: Cơ cấu phân tử Phe-Pro-Trp-Leu(OH) (Tryptophyllin L 1.2.1)

Peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂), công thức phân tử là C₃₁H₃₉N₅O₅, thể rắn, hiệu suất 73%. Nhiệt độ nóng chảy 108-120 °C. Phổ dương ESI MS của peptid cho mũi [M+H]⁺ 562.10. IR (KBr, ν_{max}, cm⁻¹): 3294 (N-H), 1648 (CO-NH), 1516 (C-N).

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.81 (t, *J* = 18.7 Hz, 1H, NH indole), 8.11 – 7.99 (m, 1H, CO-NH-CH), 7.94 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, CO-NH-CH), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH-NH indole), 7.56 (dt, *J* = 7.5, 5.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 – 7.17 (m, 5H, Ar-H), 7.12 – 7.06 (m, 1H, Ar-H), 7.04 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz, 1H, Ar-H), 4.62 – 4.53 (m, 1H, NH-CH-CONH₂), 4.36 (dd, *J* = 8.2, 3.5 Hz, 1H, NH-CH-CO pyrrolidine), 4.22 (dd, *J* = 14.6, 7.5 Hz, 1H, NH-CH-CO), 4.17 – 4.08 (m, 1H, NH-CH-CO), 3.01 (ddd, *J* = 28.6, 16.0, 9.8 Hz, 1H), 2.87 – 2.76 (m, 2H, CH₂-CH-CO), 2.71 (m, *J* = 26.6, 13.8 Hz, 1H, CH₂-CH-CO), 2.50 (m, 5H, CH₂ pyrrolidine), 1.74 (m, 2H, CH₂-CH(CH₃)₂), 1.70 – 1.55 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 1.56 – 1.46 (m, 2H), 1.45 – 1.22 (m, 3H), 0.88 (dd, *J* = 10.8, 4.7 Hz, 3H, CH-(CH₃)₂), 0.84 (dd, *J* = 6.4, 4.3 Hz, 3H, CH-(CH₃)₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.55 (C6), 171.39 (C7), 171.63 (C18), 171.47 (C23), 136.50 (C12), 135.09 (C31), 130.09, 129.67, 128.72, 128.61, 127.08 (C26-30), 127.95 (C17), 126.81, 124.11 121.24, 118.74, 111.69 (C11, C13-16), 110.60 (C10), 60.16 (C19), 54.35 (C8), 51.72 (C24), 51.07 (C5), 46.99 (C22), 40.78 (C4), 39.69 (C25), 31.40 (C20), 29.21 (C21), 24.75 (C9), 24.67 (C3), 23.35, 22.19 (C1-2),

Cơ cấu của hai peptid được xác định qua các phép đo phổ khối lượng và phổ NMR. Sự có mặt nhóm chức amid được minh chứng bởi phổ FTIR và phổ ¹H NMR, với số lượng nguyên tử C các bậc khác nhau được thể hiện qua phổ ¹³C và các phổ DEPT. Tuy nhiên đối với loại hợp chất trên, sự có mặt của nhóm chức carboxylic và amido (CO-NH₂) rất khó khẳng định bởi phổ NMR và vì vậy phương pháp phổ khối lượng đã được sử dụng. Kết quả phổ khối lượng cho thấy hai mũi ứng với khối lượng phân tử hai chất tại 561 và 562 *m/z*. Phổ khối lượng MS/MS cho kết quả sự mất amoniac (NH₃) từ [M+H]⁺ của peptid Phe-Pro-Trp-Leu(NH₂) và sự mất CO₂ từ [M+H]⁺ của peptid Phe-Pro-Trp-Leu(OH)

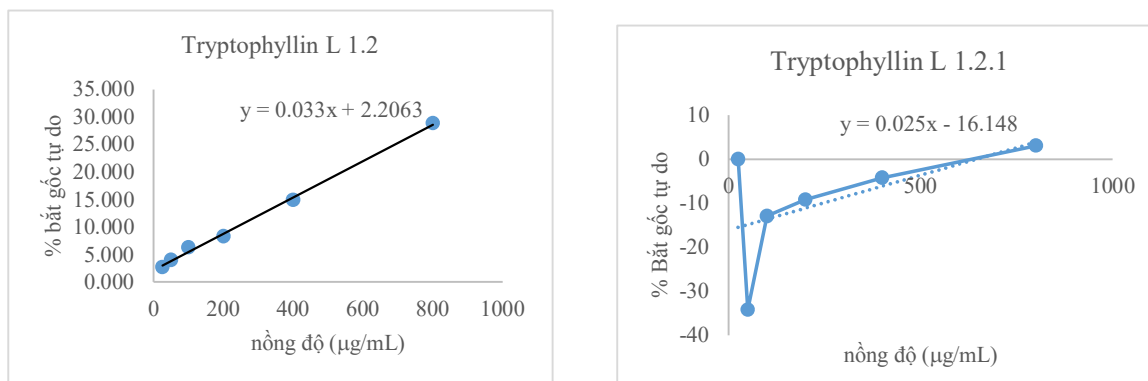
3.2. Hoạt tính kháng oxid hóa qua thí nghiệm DPPH

Thử nghiệm hoạt tính kháng oxid hóa của hai peptid sử dụng gốc tự do DPPH, đây là gốc tự do bền, màu xanh tím và hấp thu mạnh ở bước sóng 517 nm. Bởi vì độ hấp thu của dung dịch phản ứng có giá trị phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ ban đầu của DPPH, tỉ lệ DPPH-peptid và dung môi, cho nên thay vì sử dụng sự giảm độ hấp thụ để biểu thị cho khả năng phản ứng của peptid, chỉ số IC₅₀ gọi là chỉ số bất 50% gốc DPPH, được sử dụng để đặc trưng cho hoạt tính kháng oxid hóa của các peptid [36].

Kết quả thí nghiệm DPPH cho thấy có sự khác biệt lớn trong hoạt tính kháng oxid hóa của hai peptid Tryptophyllin L. 1.2 và Tryptophyllin L. 1.2.1. Phản ứng của Tryptophyllin L. 1.2 với DPPH diễn ra nhanh hơn Tryptophyllin L. 1.2.1 rất nhiều, biểu hiện bằng sự giảm cường độ màu của dung dịch DPPH ngay lập tức khi cho Tryptophyllin L. 1.2 vào so với sự mất màu rất chậm của dung dịch phản ứng Tryptophyllin L. 1.2.1. Biểu đồ biểu thị sự phụ thuộc của phần trăm bất gốc tự do vào nồng độ của Tryptophyllin L 1.2 là tuyến tính còn biểu đồ của Tryptophyllin L 1.2.1 cho thấy, peptid này không phản ứng với DPPH ở nồng độ nhỏ hơn 200 µg/ml, ngược lại còn làm tăng độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng (Hình 3). Tuy nhiên, để thu được giá trị IC₅₀, đường thẳng hồi quy đã được sử dụng cho cả hai peptid trên, cho thấy IC₅₀ của Tryptophyllin L. 1,2 là 2,59 mM trong khi Tryptophyllin L. 1.2.1 gần gấp đôi là 4.56 mM (Bảng 2). Với sự khác nhau duy nhất trong cơ cấu của 2 peptid này là gốc amid và gốc carboxilic, có thể suy luận rằng sự thay thế gốc amid bởi gốc carboxilic làm giảm khả năng bắt gốc DPPH. Hay nói cách khác, sự khác biệt về cơ cấu ảnh hưởng đến cơ chế trao đổi điện tử hoặc cho nhận proton của peptid với DPPH. Để làm rõ hơn về khả năng trao đổi điện tử, hai peptid đã được cho thử nghiệm với dung dịch FRAP (phần 3.3).

Bảng 3. Nồng độ bất 50% gốc DPPH của hai peptid và chất chuẩn glutathione

IC 50		
Tryp L 1.2 mM	Tryp L 1.2.1 mM	Glutathione mM
2.59 ± 0.078	4.56 ± 0.43	0.16 ± 0.01

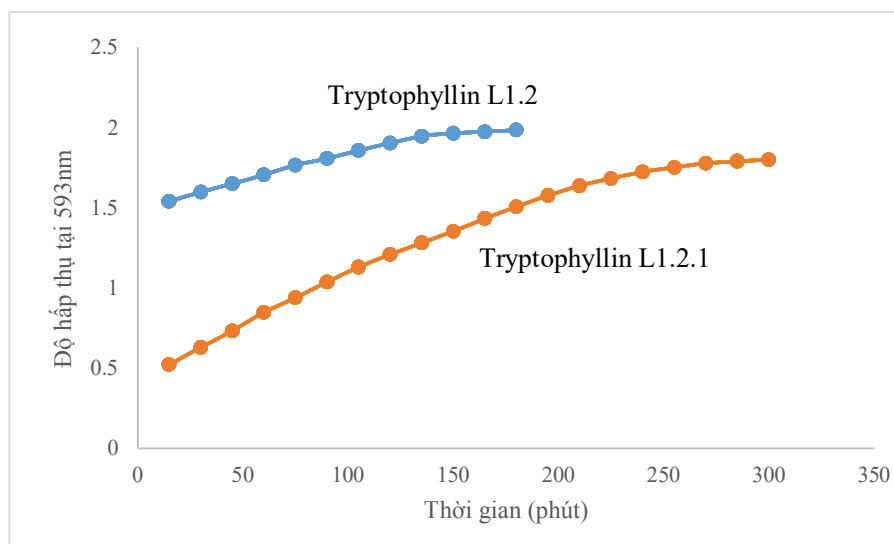


Hình 4: Phần trăm bắt gốc DPPH của hai peptid theo nồng độ

So sánh khả năng bắt gốc tự do của hai peptid với glutathione, một peptid nội sinh kháng oxid hóa, cho thấy khả năng kháng oxid hóa của các peptid Tryptophyllin L kém so với glutathione khoảng 10 lần (Bảng 3). Tuy nhiên khi so sánh khả năng kháng oxid hóa của các Tryptophyllin L với các peptid được ly trích từ thiên nhiên phổ biến như từ β -lactoglobulin, thịt, tảo và sản phẩm phụ thực phẩm [17, 25, 37, 38], giá trị này là một giá trị nằm ở ngưỡng cao của peptid kháng oxid hóa.

3.3. Hoạt tính kháng oxid hóa qua thí nghiệm FRAP

Thí nghiệm FRAP dựa vào khả năng khử $\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2$ tạo phức $\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2$ có màu xanh đặc trưng để xác định khả năng hoàn nguyên của peptid, tỉ lệ thuận với khả năng nhường điện tử với chất oxid hóa. Thí nghiệm cho thấy hai peptid này phản ứng theo chiều hướng tương tự với DPPH, trong đó khả năng tham gia phản ứng hoàn nguyên phức $\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2$ của Tryptophyllin 1.2 lớn hơn so với Tryptophyllin 1.2.1 với giá trị là tương ứng 87,55 và 5,23 mM $\text{Fe}^{2+}/\text{mol}$ peptid. Giá trị hoàn nguyên FRAP này được lấy tại 30 phút như trong hầu hết các phản ứng FRAP của peptid nhằm mục đích so sánh. Tuy nhiên, phản ứng thật sự không kết thúc tại thời điểm này, đồ thị biểu thị sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào thời gian cho thấy, phản ứng của Tryptophyllin 1.2 kết thúc ở khoảng 150 phút và của Tryptophyllin 1.2.1 ở khoảng 250 (Hình 4). Tuy nhiên giá trị hoàn nguyên tại hai thời điểm này không được sử dụng do hai lý do, thứ nhất trong phản ứng oxid hóa khử để thử hoạt tính kháng oxid hóa, tốc độ phản ứng sẽ đóng vai trò quan trọng khi phải tương tác với chất oxid hóa nhanh hơn chất cần được bảo vệ (chẳng hạn lipid) và vì vậy việc chọn thời điểm kết thúc phản ứng quá dài là không hợp lý và không phản ánh được tiềm năng kháng oxid hóa của chúng. Tuy nhiên phải nhấn mạnh rằng, khả năng hoàn nguyên của hai peptid thay đổi rất đáng kể khi kéo dài thời gian phản ứng, với giá trị lần lượt là 119,78 và 104,25 mM $\text{Fe}^{2+}/\text{mol}$ peptid.



Hình 5: Khả năng khử FRAP theo thời gian của hai peptid

4 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này hai peptid Tryptophyllin L bao gồm Phe-Pro-Tryp-Leu(NH₂) và Phe-Pro-Tryp-Leu(OH) đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp peptid trên pha rắn sử dụng 2-chlorotriethyl chloride và Rink amid resin. Cơ cấu của hai peptid đã được xác định qua các phương pháp đo phổ FTIR, phổ khối MS và MS/MS và phổ ¹H, ¹²C NMR và DEPT. Khảo sát hoạt tính kháng oxid hóa của hai peptid bằng hai thí nghiệm DPPH và FRAP cho thấy Tryptophyllin L 1.2 là một chất có kháng oxid hóa tiềm năng và cũng giải thích cho việc tiết ra một lượng lớn chất này trên da của loài *Litoria rubella* khi bị kích thích bằng xung điện cường độ rất thấp, nhằm chống lại stress do môi trường tạo nên. Tuy nhiên có một sự khác biệt lớn trong hoạt tính kháng oxid hóa của hai Tryptophyllin L trong khi chúng chỉ khác nhau ở đuôi carboxylic và amid. Việc nghiên cứu mối quan hệ giữa cơ cấu và hoạt tính kháng oxid hóa của hai peptid trong tương lai sẽ cho làm rõ lý do của sự khác biệt này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Fosgerau, T. Hoffmann, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discovery Today*, 20 (2015) 122-128.
- [2] A. Henninot, J.C. Collins, J.M. Nuss, The current state of peptide drug discovery: Back to the future?, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, (2017) 1382-1414.
- [3] J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26, (2018) 2700-2707.
- [4] S. Lohan, G. Singh Bisht, Recent approaches in design of peptidomimetics for antimicrobial drug discovery research, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13 (2013) 1073-1088.
- [5] P. Hashim, D. Mat Hashim, A review of cosmetic and personal care products: Halal perspective and detection of ingredient, *Pertanika Journal of Science and Technology*, 21 (2013) 281-292.
- [6] H. Admassu, M.A.A. Gasmalla, R. Yang, W. Zhao, Bioactive peptides derived from seaweed protein and their health benefits: antihypertensive, antioxidant, and antidiabetic properties, *Journal of Food Science*, 83 (2018) 6-16.

- [7] A. Montoya-Rodríguez, E.G. de Mejía, Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development in vitro, *Food Research International*, 77 (2015) 204-214.
- [8] A. Sánchez, A. Vázquez, Bioactive peptides: A review, *Food Quality and Safety*, 1 (2017) 29-46.
- [9] S. Chakrabarti, F. Jahandideh, J. Wu, Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress, *BioMed Research International*, 2014 (2014).
- [10] J.M. Lorenzo, P.E. Munekata, B. Gómez, F.J. Barba, L. Mora, C. Pérez-Santaescolástica, F. Toldrá, Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review, *Trends in Food Science & Technology*, (2018).
- [11] T.-B. Zou, T.-P. He, H.-B. Li, H.-W. Tang, E.-Q. Xia, The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins, *Molecules*, 21 (2016) 72.
- [12] M. Sohaib, F.M. Anjum, A. Sahar, M.S. Arshad, U.U. Rahman, A. Imran, S. Hussain, Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A comprehensive review, *International Journal of Food Properties*, 20 (2017) 2581-2593.
- [13] B.T. Clarke, The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications, *Biological Reviews*, 72 (1997) 365-379.
- [14] M.A. Apponyi, T.L. Pukala, C.S. Brinkworth, V.M. Maselli, J.H. Bowie, M.J. Tyler, G.W. Booker, J.C. Wallace, J.A. Carver, F. Separovic, Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance, *Peptides*, 25 (2004) 1035-1054.
- [15] R.J. Lewis, M.L. Garcia, Therapeutic potential of venom peptides, *Nature reviews drug discovery*, 2 (2003) 790.
- [16] K. Sato, Structure, Content, and Bioactivity of Food-Derived Peptides in the Body, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (2018) 3082-3085.
- [17] R. Liu, L. Xing, Q. Fu, G.-h. Zhou, W.-g. Zhang, A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products, *Antioxidants*, 5 (2016) 32.
- [18] J. Yang, L. Hu, T. Cai, Q. Chen, Q. Ma, J. Yang, C. Meng, J. Hong, Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (*Perilla frutescens* L. Britton) seed protein hydrolysates, *PloS one*, 13 (2018) e0200021.
- [19] P.A. Harnedy, M.B. O'Keeffe, R.J. FitzGerald, Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed *Palmaria palmata* protein isolate, *Food Research International*, 100 (2017) 416-422.
- [20] T. Wang, Q. Zhao, Q. Wang, Production and antioxidant properties of marine- derived bioactive peptides, *Marine proteins and peptides. Biological Activities and Applications*, (2013) 385-406.
- [21] Y.-W. Li, B. Li, Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key sequence positions and their amino acid properties, *Journal of Theoretical Biology*, 318 (2013) 29-43.
- [22] J.L. Hougland, Darling, J., & Flynn, S. , *Protein posttranslational modification*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2013.
- [23] R. Matsui, R. Honda, M. Kanome, A. Hagiwara, Y. Matsuda, T. Togitani, N. Ikemoto, M. Terashima, Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains, *Food Chemistry*, 245 (2018) 750-755.
- [24] K. Saito, D.-H. Jin, T. Ogawa, K. Muramoto, E. Hatakeyama, T. Yasuhara, K. Nokihara, Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 3668-3674.

- [25] Y. Ohashi, R. Onuma, T. Naganuma, T. Ogawa, R. Naude, K. Nokihara, K. Muramoto, Antioxidant properties of tripeptides revealed by a comparison of six different assays, *Food Science and Technology Research*, 21 (2015) 695-704.
- [26] S.T. Steinborner, The observation of evolutionary trends in amphibians and the analysis of negative ion fragmentations in large peptide systems by mass spectrometry, Department of Chemistry, The University of Adelaide, Adelaide, SA, 1997, 43-62.
- [27] S.T. Steinborner, P.A. Wabnitz, R.J. Waugh, J.H. Bowie, C. Gao, M.J. Tyler, J.C. Wallace, The structures of new peptides from the Australian red tree frog 'Litoria rubella'. The skin peptide profile as a probe for the study of evolutionary trends of amphibians, *Aust. J. Chem.*, 49 (1996) 955-963.
- [28] R.J. Jackway, V.M. Maselli, I.F. Musgrave, M.J. Maclean, M.J. Tyler, J.H. Bowie, Skin peptides from anurans of the Litoria rubella Group: sequence determination using electrospray mass spectrometry. Opioid activity of two major peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23 (2009) 1189-1195.
- [29] S.T. Ellis- Steinborner, D. Scanlon, I.F. Musgrave, T.N. Tran, S. Hack, T. Wang, A.D. Abell, M.J. Tyler, J.H. Bowie, An unusual kynurenine- containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog Litoria rubella. Sequence determination by electrospray mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25 (2011) 1735-1740.
- [30] T.L. Pukala, J.H. Bowie, V.M. Maselli, I.F. Musgrave, M.J. Tyler, Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity, *Natural Product Reports*, 23 (2006) 368-393.
- [31] R.B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (1963) 2149-2154.
- [32] R. Behrendt, P. White, J. Offer, Advances in Fmoc solid- phase peptide synthesis, *Journal of Peptide Science*, 22 (2016) 4-27.
- [33] J.M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Advances*, 4 (2014) 32658-32672.
- [34] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181 (1958) 1199.
- [35] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239 (1996) 70-76.
- [36] S.B. Kedare, R. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48 (2011) 412-422.
- [37] M. Tian, B. Fang, L. Jiang, H. Guo, J. Cui, F. Ren, Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from β -Lactoglobulin using QSAR modeling, *Dairy Science & Technology*, 95 (2015) 451-463.
- [38] W. Liao, L. Gu, Y. Zheng, Z. Zhu, M. Zhao, M. Liang, J. Ren, Analysis of the quantitative structure-activity relationship of glutathione-derived peptides based on different free radical scavenging systems, *MedChemComm*, 7 (2016) 2083-2093.

Ngày nhận bài: 02/07/2019

Ngày chấp nhận đăng: 25/10/2019