

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP TOÀN PHẦN
HOẠT CHẤT PENTAPEPTID-3

Bùi Thị Phương Hải¹, Đoàn Ngân Hoa²
Hoàng Văn Hải^{1,3}, Truong Thanh Tùng^{1,3}, Lương Xuân Huy^{1,3*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Tổng hợp toàn phần hoạt chất Pentapeptid-3 sử dụng để làm nguyên liệu cho mỹ phẩm quy mô phòng thí nghiệm. **Phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptid pha rắn để tạo ra Pentapeptid-3, sau đó khẳng định và đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm bằng hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC) và sắc ký lỏng ghép khối phổ (liquid chromatography-mass spectrometry - LC-MS). **Kết quả:** Pentapeptid-3 thu được có hiệu suất > 61% và độ tinh khiết > 99%. **Kết luận:** Tổng hợp thành công Pentapeptid-3 với sản phẩm thu được đạt hiệu suất tốt hơn so với hiệu suất đã được công bố và đạt được độ tinh sạch cao.

Từ khóa: Peptid mỹ phẩm; Tổng hợp peptid pha rắn; Pentapeptide-3; Vialox.

TOTAL SYNTHESIS OF ACTIVE INGREDIENT PENTAPEPTIDE-3

Abstract

Objectives: To synthesize Pentapeptide-3 - an active ingredient, as a raw material for cosmetic preparation at the laboratory scale. **Methods:** Pentapeptide-3 was synthesized by solid-phase peptide synthesis technique, followed by evaluating the product's purity using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Results:** Pentapeptide-3 is obtained with a yield of over 61% and a purity of over 99%. **Conclusion:** Pentapeptide-3 was successfully synthesized, and the obtained product yielded better than the reported data with a high purity level.

Keywords: Cosmetic peptides; Solid phase peptide synthesis; Pentapeptide-3; Vialox.

¹Khoa Dược, Đại học Phenikaa, Hà Nội

²Khoa Kỹ thuật Y học, Đại học Phenikaa, Hà Nội

³Viện nghiên cứu tiên tiến Phenikaa (PIAS), Đại học Phenikaa, Hà Nội

*Tác giả liên hệ: Lương Xuân Huy (huy.luongxuan@phenikaa-uni.edu.vn)

Ngày nhận bài: 21/3/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 30/5/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v49i6.488>

ĐẶT VẤN ĐỀ

Pentapeptid-3 là một oligopeptid đã được thương mại hóa với tên Vialox[®]. Đây là một chuỗi peptid gồm 5 acid amin với trình tự chuỗi H – L-Gly – L-Pro – L-Agr – L-Pro – L-Ala – NH₂. Hoạt chất này được báo cáo lần đầu tiên vào năm 2015 với tác dụng làm giảm hoặc mờ nếp nhăn, giảm độ thô ráp của da, chống lão hóa [1, 2, 3, 4]. Liên quan đến cơ chế, peptid này có tác dụng như một chất đối kháng cạnh tranh với acetylcholine trên thụ thể nicotinic gây ức chế lành tính hoạt động của kênh natri và calci, qua đó đó ức chế sự co cơ bám da. Kết quả nghiên cứu *in vitro* cho thấy, Pentapeptid-3 có tác dụng giảm co cơ vân đến 71% sau khi sử dụng một phút và tác dụng này tiếp tục duy trì ở mức 58% sau khi sử dụng 2 giờ. Sau khi được sử dụng 28 ngày (2 lần/ngày) độ sâu của vết nhăn giảm tới 49% [5]. Do đó, Pentapeptid-3 được ưa chuộng và sử dụng nhiều trong các mỹ phẩm với mục đích chống lão hóa và làm mờ vết nhăn.

Pentapeptid-3 có thể thu được trực tiếp từ nọc rắn, hoặc gián tiếp thông qua tổng hợp trên pha rắn hay pha

lỏng. Tuy nhiên, nọc rắn có chi phí cao trong khi phương pháp tổng hợp pha lỏng có mức độ racemic hóa thấp, khó tinh sạch và không bảo vệ môi trường khi thực hiện với quy mô lớn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Tổng hợp Pentapeptid-3 dựa trên pha rắn giúp thu được nguồn sản phẩm có độ tinh sạch cao, hiệu suất ổn định, đảm bảo kiểm soát được quá trình tổng hợp, dễ thực hiện cũng như dễ tự động hóa, thời gian tổng hợp rút ngắn.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Các α -amino acid sử dụng là Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH (nhóm Fmoc - (9H-fluoren-9-ylmethoxy) carbonyl; nhóm Pbf - 2,2,4,6,7-pentamethyl-3H-1-benzofuran-5-yl)sulfonyl) và COMU (N-[1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy) dimethylamino (morpholino) uronium hexafluorophosphate) đều có độ tinh khiết > 98%, được mua từ hãng AK Scientific, Hoa Kỳ. Nhựa Rink Amide MBHA resin (100 - 200 mesh) (98%) được mua từ NovaBiochem, Đức. Các dung môi N,N-Diisopropylethylamine

(DIPEA, 99%), N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP, 99%), Dimethylformamide (DMF, 99%), Dichloromethane (DCM, 99,5%), Trifluoroacetic acid (TFA, 99%), Acetonitrile tiêu chuẩn HPLC (ACN 99,8%) được mua từ Daejung, Hàn Quốc. Triisopropylsilane (TIS, 98%) được mua từ Sigma-Aldrich, Đức.

* *Thiết bị:* HPLC Agilent 1260 và cột sắc kí đi kèm được mua từ Mỹ. Hệ thống đo phổ khối LC-MS Agilent 6400 Series Triple Quadrupole B.08.00 từ hãng Agilent, Mỹ. Ngoài ra, còn sử dụng các máy ly tâm, máy lắc, bộ phản ứng Vacuum manifold, bơm chân không, máy lắc xuất xứ từ Trung Quốc; máy lắc Vortex từ Ý; máy siêu âm từ Đức và các vật tư tiêu hao như ống polypropylen, đầu típ được mua từ Trung Quốc.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Nguyên tắc tổng hợp peptid pha rắn:* Quy trình tổng hợp và tinh chế hợp chất Pentapeptid-3 bao gồm các bước:

- Giải phóng gốc amin tự do từ chất mang rắn Rink amid MBHA resin bằng cách loại bỏ nhóm Fmoc bảo vệ.
- Gắn acid amin lên chất mang rắn thông qua phản ứng giữa nhóm cacboxyl

của acid amin và nhóm amin trên chất mang rắn (nhóm amin của acid amin được bảo vệ bằng nhóm Fmoc, ngoài ra, mạch nhánh của Arginin còn được bảo vệ bằng nhóm Pbf).

- Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc của acid amin vừa gắn vào chất mang rắn.

- Tiếp tục gắn acid amin tiếp theo bằng phản ứng cộng hợp amid để kéo dài mạch peptid và quay lại bước 3 cho đến khi gắn hết các acid amin.

- Cắt đoạn peptid sản phẩm ra khỏi resin, loại bỏ nhóm bảo vệ của Arginin và tiến hành tinh chế thu hợp chất Pentapeptid-3 tinh sạch.

* *Thực hiện chuỗi phản ứng tổng hợp Pentapeptid-3:* Resin (60 μ mol) được ngâm trong DMF 10 phút trước khi dùng. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng cách sử dụng 20% piperidin/DMF. Các acid amin theo thứ tự được gắn vào bằng xúc tác COMU (tỷ lệ resin/acid amin/COMU 1/5/5) với sự có mặt của DIPEA dư. Sau mỗi lần gắn acid amin hay loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa lần lượt bằng các dung dịch theo thứ tự DCM, DMF. Khối lượng các nguyên liệu sử dụng được trình bày cụ thể trong bảng 1.

Phản ứng được theo dõi bằng thuốc thử Kaiser.

Mục đích: Nhận biết amin bậc 1 tự do.

Thành phần:

- Dung dịch A: 40g Phenol pha trong 10mL ethanol.

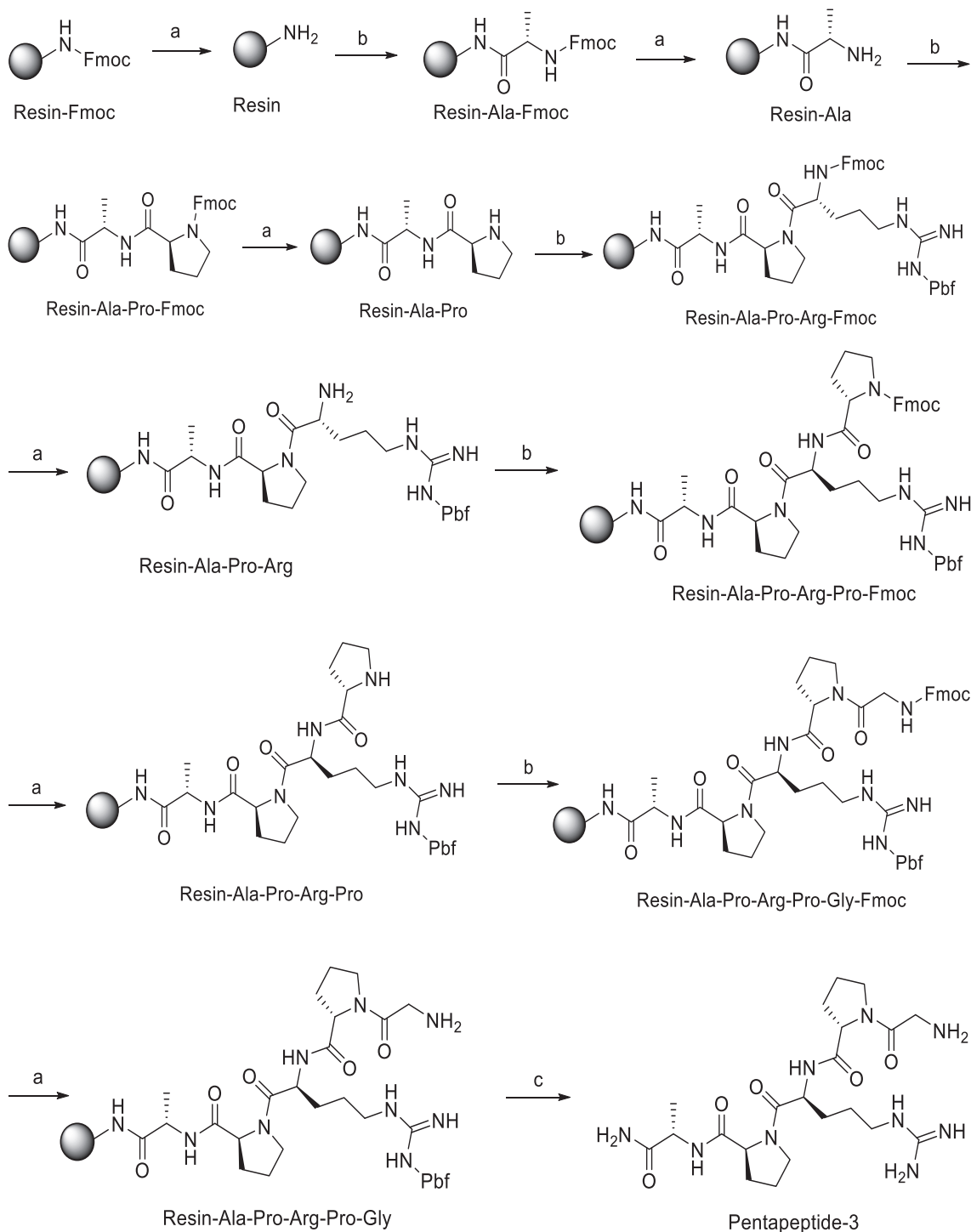
- Dung dịch B: 1g Nynhidrin pha trong 20mL ethanol.

- Dung dịch C: 16,5mg KCN pha trong 25mL H₂O. Sau đó pha 1mL dung dịch KCN trên với 49mL Pyridin.

Cách tiến hành: Lấy một lượng nhỏ hạt resin sau phản ứng. Rửa sạch hạt resin bằng DMF, DCM, MeOH. Cho resin vào ống nghiệm, thêm vào đó 2 giọt dung dịch A, 2 giọt dung dịch B và 2 giọt dung dịch C. Đun nóng ống nghiệm với nhiệt độ 110 - 115°C trong 2 phút. Nếu hạt resin không chuyển màu, dung dịch giữ nguyên màu vàng chứng tỏ không có amin bậc 1 tự do. Nếu hạt resin, dung dịch có màu xanh da trời nhẹ, chứng tỏ có amin bậc 1 tự do.

Bảng 1. Nguyên liệu tổng hợp Vialox.

Nguyên liệu	Khối lượng mol phân tử (g/mol)	Số lần cân	Khối lượng (mg)		Số mol (mmol)		Thể tích DMF tương ứng (mL)	
			Mỗi lần cân	Tổng số	Mỗi lần cân	Tổng số	Mỗi lần đong	Tổng số
Rink Amide MBHA resin	732,86	1	174	174				
Fmoc-Ala-OH	311,30	1	93	93	0,3	0,6	0,6	0,6
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,80	1	195	195	0,3	0,6	0,6	0,6
Fmoc-Pro-OH	337,40	2	101	202	0,3	0,6	0,6	1,2
Fmoc-Gly-OH	297,30	1	89	89	0,3	0,6	0,6	0,6
COMU	428,27	5	122	610	0,3	1,5	0,6	3,0
DIEA	129,25	5	0,27mL	1,35mL				



Hình 1. Quy trình tổng hợp Pentapeptid-3: Điều kiện và thuốc thử: (a) piperidin/DMF; (b) Fmoc- acid amin, COMU, DIPEA, DMF; (c) TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5).

* *Tinh chế và kiểm tra độ tinh sạch:* Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc, resin được rửa với DCM nhiều lần rồi làm khô qua đêm. Sau đó, các resin được cho vào hỗn hợp TFA/TIS/H₂O (tỷ lệ 95/2,5/2,5) trong 2 giờ để cắt peptid ra khỏi resin và loại bỏ các nhóm bảo vệ khác rồi làm khô qua đêm. Peptid sau đó được hòa tan bằng hỗn hợp acetonitril/nước (tỷ lệ 20/80) và lọc để loại resin. Các peptid tiếp tục được tinh chế bằng hệ thống HPLC với cột Zorbax C18 column (Agilent, 5 μ m, 9,4 x 250mm) với chương trình 5 - 15% B trong 10 phút, 15 - 100% B trong 3 phút, 100% B trong 8 phút, 100 - 5% B trong 2 phút, 5% B trong 1 phút, A: 0,1%TFA/ H₂O, B: 0,1%TFA/ Acetonitril (ACN), tốc độ dòng 4mL/phút; phân tích mẫu peptid trước và sau khi tinh chế với chương trình 0 - 30% B trong 8 phút, 30 - 100% B trong 3 phút, 100% B trong 1 phút, 100 - 0% B trong 2 phút, 0% B trong 2 phút; A: 0,1%TFA/ H₂O, B: 0,1%TFA/Acetonitrile (ACN); tốc độ dòng 1mL/phút và định tính bằng hệ thống LC-MS (Shimadzu LC-MS-2020) với chương trình 30 - 80% B

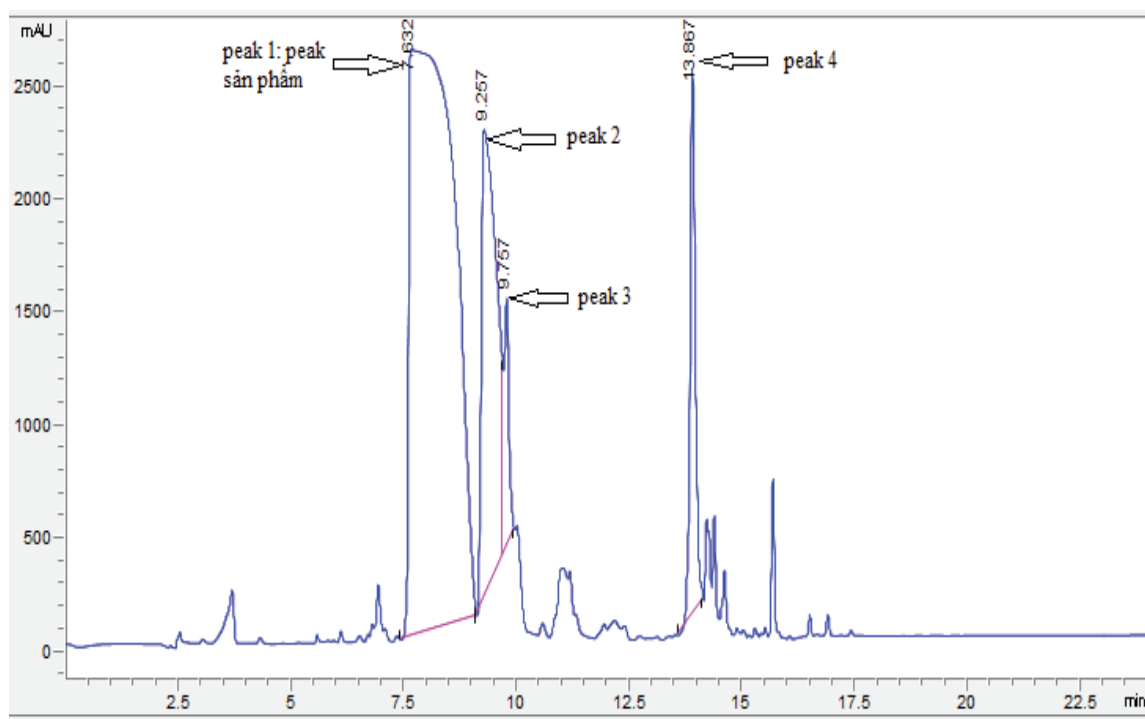
trong 2 phút, 80 - 30% B trong 2 phút; A: 0,1%HCOOH/H₂O, B: 0,1%HCOOH/ACN; tốc độ dòng 1mL/phút; vùng khối 400 - 2.000 Dalton. Nhận biết Pentapeptid-3 dựa vào bước sóng đặc trưng của liên kết amid ở 220nm.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong quá trình gắn các acid amin theo trình tự chuỗi của Pentapeptid, các phản ứng được theo dõi bằng thuốc thử Kaiser. Sau khi gắn 3 acid amin (*L*-Agr - *L*-Pro - *L*-Ala - resin), lấy vài hạt resin tiến hành kiểm tra với thuốc thử Kaiser. Kết quả cho thấy, hỗn hợp thu được có màu vàng nhạt, chứng tỏ acid amin Fmoc-Arg(Pbf)-OH đã kết nối vào chuỗi, đầu amin tự do trước đó (*L*-Pro - *L*-Ala - resin) không còn nữa, bước gắn acid amin Arginine đã thành công. Tương tự, tiến hành kiểm tra mẫu peptid sau khi xử lý loại Fmoc với piperidin/DMF 20%, hỗn hợp thu được có màu xanh đậm, chứng tỏ nhóm bảo vệ Fmoc bị cắt ra khỏi chuỗi peptid để giải phóng đầu amin tự do. Sau khi quá trình tổng hợp hoàn thành, sản phẩm thô được đem đi tinh chế bằng hệ thống HPLC.

1. Tinh chế peptid bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

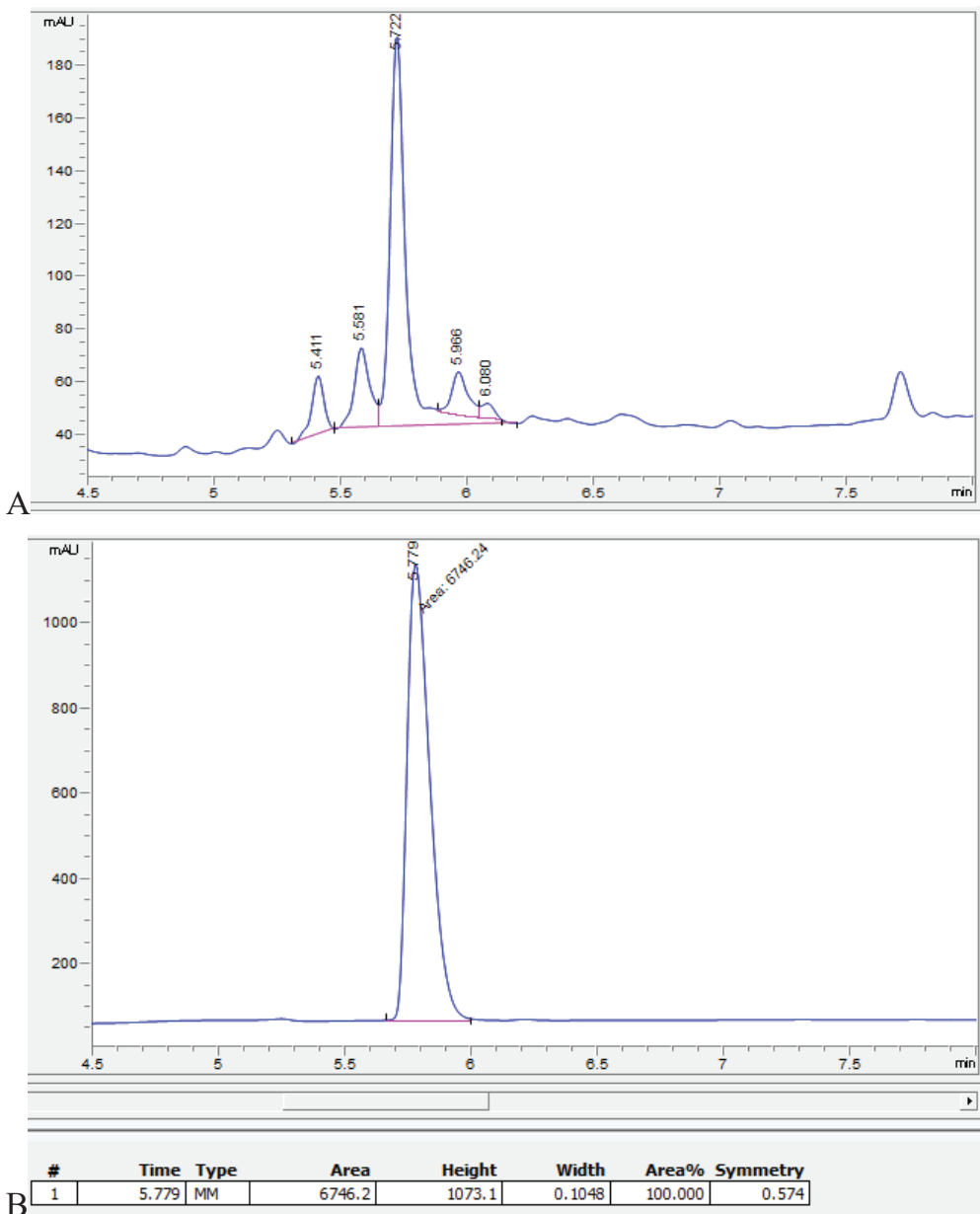
Chương trình tinh chế và kiểm tra độ tinh sạch của sản phẩm Pentapeptid-3 bằng hệ thống HPLC được thể hiện dưới đây.



Hình 2. Sắc ký đồ minh họa quá trình tinh chế Pentapeptid-3.

Các peak 1, 2, 3, 4 đã được hứng và chỉ có peak 1 có số khối trùng với số khối lý thuyết của Pentapeptid-3.

Peak sản phẩm được xác định là peak có chỉ số thời gian lưu 7,032 phút với chỉ số khối lượng phân tử xác định bằng hệ thống LC-MS trùng với giá trị lý thuyết. Sau đó, chúng tôi phân tích lại sản phẩm thu được (kết quả cho thấy một peak sạch trên HPLC với thời gian lưu trùng với thời gian lưu của peak lớn nhất trên sắc ký đồ của mẫu trước tinh chế (sắc ký đồ mẫu Pentapeptid-3 trước tinh chế và sắc ký đồ đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm ở hình 3).



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích mẫu Pentapeptid-3 trước tinh chế (A) và mẫu Pentapeptid-3 sau tinh chế (B) bằng hệ thống HPLC.

Peak sản phẩm thu được có thời gian lưu là 5,779 tương ứng với thời gian lưu 5,722 của peak chính trên sắc ký đồ mẫu trước tinh chế.

Độ tinh sạch là phần trăm diện tích peak sản phẩm trong tổng diện tích các peak trên sắc ký đồ (không tính các peak tạp hệ thống). Theo đó, độ tinh sạch của sản phẩm theo HPLC là 100%.

2. Xác định khối lượng phân tử của chất trung gian và sản phẩm

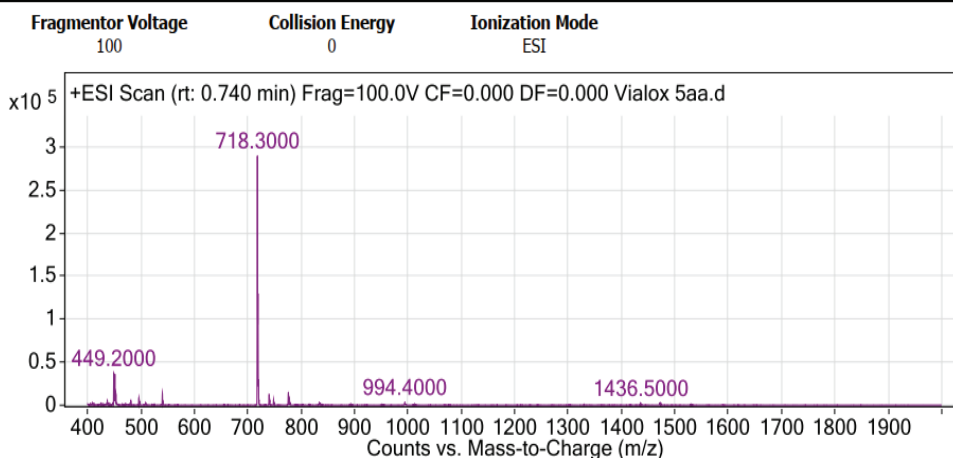
Trong quá trình tổng hợp, chất trung gian Pentapeptid-3-5aa thu được sau khi gắn đủ 5 amino acid và vẫn còn giữ nhóm Fmoc bảo vệ (cụ thể là Fmoc-Gly-Pro-Arg-Pro-Ala với công thức phân tử $C_{36}H_{47}N_9O_7$) được lấy mẫu để tiến hành xác định khối lượng phân tử bằng hệ thống LC-MS. Kết quả trong bảng 2, hình 4 cho thấy giá trị thu được

phù hợp với giá trị lý thuyết, qua đó giúp khẳng định sự có mặt của sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp. Sau đó, mẫu peptide đã được tinh chế và đánh giá độ tinh sạch bằng HPLC được đem đi xác định khối lượng phân tử bằng hệ thống phổ khối LC-MS. Kết quả được trình bày trong bảng 2, hình 4 cho thấy sản phẩm thu được đúng là Pentapeptid-3 với giá trị thu được khớp với giá trị lý thuyết.

Bảng 2. Kết quả xác định phổ khối của Pentapeptid-3 và chất trung gian.

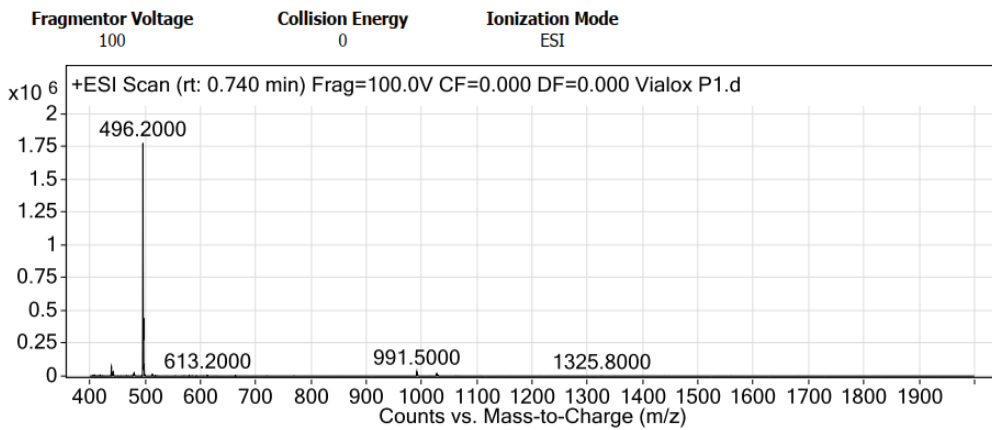
Sản phẩm	Công thức phân tử	Giá trị lý thuyết [M+H]	Giá trị thu được [M+H]	Sai số
Pentapeptid-3-5aa	$C_{36}H_{47}N_9O_7$	718,3677	718,3000	0,0094%
Sản phẩm thu được	$C_{21}H_{37}N_9O_5$	496,2996	496,2000	0,0200%

User Spectra



A

User Spectra

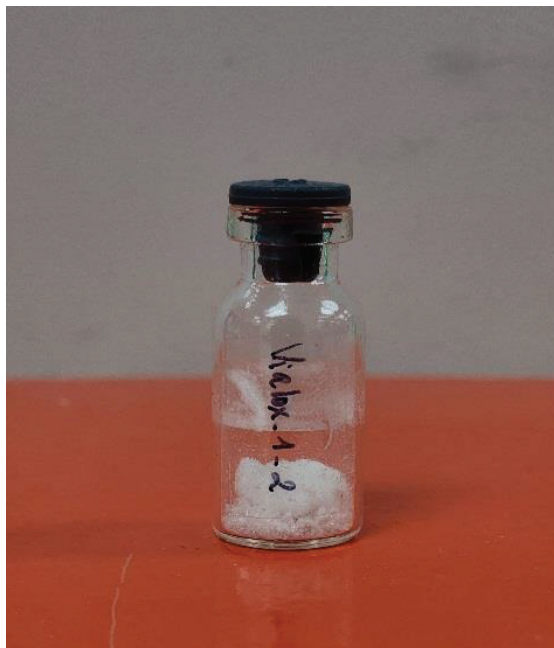


B

Hình 4. Phổ khối của Pentapeptid-3-5aa (A) và Pentapeptid-3 sau tinh chế (B).
Kết quả được tổng hợp lại trong bảng 2.

3. Làm khô sản phẩm

Pentapeptid-3 sau tinh chế được loại bỏ bớt dung môi bằng hệ thống cất quay và tiến hành đông khô. Sản phẩm thu được ở dạng bột trắng xốp, không mùi như hình 5 dưới đây. Kết quả thu được 26,7mg Pentapeptid-3 với hiệu suất của quy trình đạt 61,64%.



Hình 5. Pentapeptid-3 đông khô.

BÀN LUẬN

Nghiên cứu [6] trước đây đã cho thấy quá trình tổng hợp Pentapeptid-3 chỉ thu được hiệu suất ở mức trung bình (hiệu suất đạt 48,4 %). Trong nghiên cứu này, đã lựa chọn tác nhân tham gia vào phản ứng tạo liên kết peptid là COMU do được biết đến với tính an toàn, hiệu suất phản ứng cao hơn so với việc sử dụng các chất hoạt hóa như *O*-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HCTU), 1-[*Bis*(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3 oxid hexafluorophosphat (HATU) hay 6-Chloro-benzotriazol-1-yloxy-*tris*-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyCloCk). Hợp chất COMU không chứa gốc benzotriazol nên không gây nổ cũng như có độ tan tốt, ổn định, có thể theo dõi quá trình phản ứng cũng như dễ loại bỏ phụ phẩm. Ngoài ra, chất xúc tác sử dụng trong quá trình tổng hợp là DIPEA, đã được chỉ ra có hiệu quả cao khi kết hợp với COMU [7].

KẾT LUẬN

Hợp chất Pentapeptid-3 đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp peptid pha rắn và tinh chế bằng hệ thống HPLC. Sản phẩm thu được là hợp chất Pentapeptid-3 với độ tinh sạch 100% theo HPLC, với hiệu suất tổng quy trình đạt > 61% cao hơn với hiệu suất đã được công bố 48,4% trước đây [6]. Kết quả đạt được giúp

tạo tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển các sản phẩm mỹ phẩm chống lão hoá chứa thành phần Pentapeptide-3 trong tương lai.

Cam kết: Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H Husein el Hadmed, RFJJocd Castillo. *Cosmeceuticals: Peptides, proteins, and growth factors*. 2016; 15(4):514-519.
2. LT Nguyen, HX Luong, Y-W Kim. Helix nucleation via hydrocarbon cross-link Mimicking N-capping box. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2016; 37(4):566-570.
3. SKJC Schagen. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. 2017; 4(2):16.
4. F Errante, P Ledwoń, R Latajka, P Rovero, AMJFic Papini. *Cosmeceutical peptides in the framework of sustainable wellness economy*. 2020; 969.
5. F Gorouhi, HJJjocs Maibach. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. 2009; 31(5):327-345.
6. S Knauer, N Koch, C Uth, R Meusinger, O Avrutina, HJACIE Kolmar. Sustainable peptide synthesis enabled by a transient protecting group. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020; 59(31):12984-12990.
7. Chen Ke, Li Chen, Wang Hui Jia, Zhang Zhong Qi, Guo Tian, Yang Xiao Lin, Zhao Jin Li. *A liquid-phase synthesis method of Vialox*. 2018.