

谷胱甘肽的合成与其活性初步评价

代 涛, 李松涛, 赵红玲, 王小青, 王良友*

河北省中药研究与开发重点实验室 承德医学院中药研究所, 承德 067000

摘要: 先采用 Fmoc 固相多肽合成法, 以 2-Chlorotriyl chloride (2-CTC) 树脂做载体, DIC/HOBt 做缩合剂, 逐步缩合得到全保护谷胱甘肽树脂, 以 TFA/EDT/m-Cresol 为裂解液脱除保护基团, 粗肽经半制备反相高效液相色谱法纯化得 α -GSH、 γ -GSH 纯品, 后将所得 γ -GSH 纯品分别采用空气, 双氧水, 碘氧化得 GSSG, 经纯化得 GSSG 纯品, 合成的 α -GSH、 γ -GSH 纯品纯度达 99%, GSSG 纯度达 98%, 利用标准品, 经外标法计算总收率分别为 60%、64%、57%。并观察三者对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的治疗效果结果显示都能显著降低 ALT 与 AST 的活性, 且与注射用 γ -GSH 没有显著性差异, 可以为工业化生产提供借鉴。

关键词: 谷胱甘肽; 固相多肽合成; 二硫键形成; 生物活性

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.003

Synthesis of Glutathione and Preliminary Evaluation of Their Biological Activities

DAI Tao, LI Song-tao, ZHAO Hong-ling, WANG Xiao-qing, WANG Liang-you*

The Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development of Hebei Province, Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Abstract: In this study, α -GSH and γ -GSH were synthesized by Fmoc solid phase peptide synthesis method, using 2-chlorotriyl chloride (2-CTC) resin as solid carrier and DIC/HOBt as condensing agents. The protected peptide was obtained by cleavage with TFA/EDT/m-Cresol. The crude GSSG peptide was then formed by air, H_2O_2 or I_2 oxidation of γ -GSH separately. After semi-preparative RP-HPLC purification, three pure peptides were obtained. The purities of α -GSH, γ -GSH, GSSG pure peptide were 99%, 99%, 98%, and the total yields were 60%, 64%, 57%, respectively. Finally, their hepatoprotective effect on CCl_4 -induced acute liver injury in mice was observed. The result showed that three synthetic pure peptides can significantly decrease ALT and AST activities in mice serum, and there were no significant differences with γ -GSH for injection, which may provide reference for industrial production.

Key words: glutathione; Fmoc solid phase peptide synthesis; disulfide bond formation; biological activity

谷胱甘肽是广泛存在于生物细胞内, 具有重要生理功能的天然活性肽。其在体内以两种形态存在, 还原型谷胱甘肽 (γ -GSH, **2**) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG, **3**), 还原型谷胱甘肽由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸及甘氨酸组成, 氧化型谷胱甘肽是由两分子 **2** 的巯基 (-SH) 经氧化脱氢得到, 其化学结构式见图 1。在机体中大量存在并起主要作用的是还原型谷胱甘肽, 但两者可在酶的作用下相互转化, 有报道 **3** 对 **2** 清除自由基有协同作用^[1]。现都成为效果较好的药物。因其较好的抗氧化, 清除自由基作用, 现已广泛应用于医疗、保健品、食品工业、化妆品等领

域^[2-4]。

药理学研究表明, **2** 中的巯基 (-SH) 是发挥抗氧化等作用的活性位点, 故将其结构中的 γ -谷氨酸替换为 α -谷氨酸, 得到 **2** 的类似物 α -GSH (**1**), 其化学结构式见图 1。动物实验表明, 其也有较好的抗氧化, 清除自由基作用。

目前对于 **2** 的制备方法的研究, 国内外报道的主要有溶剂提取法、酶合成法、液相合成法、发酵法^[5-9]。其中溶剂提取法生产工艺比较落后、生产规模小且产量低, 产品质量不高。酶合成法操作较复杂、且需要底物氨基酸和昂贵的 ATP, 成本高。液相合成法反应步骤多、反应时间长、操作复杂、需光学拆分且产品纯度不高, 环境污染严重。缺点都较明显, 使用较少, 目前工业生产以发酵法为主, 但因其所得的目标产物含量不高、提取困难、成本造价高、

收稿日期: 2014-12-08 接受日期: 2015-04-13

基金项目: 河北省海外高层次人才“百人计划”(E2012100002); 承德医学院博士基金 (201303)

* 通讯作者 Tel: 86-314-2290474; E-mail: liangyiwang@gmail.com

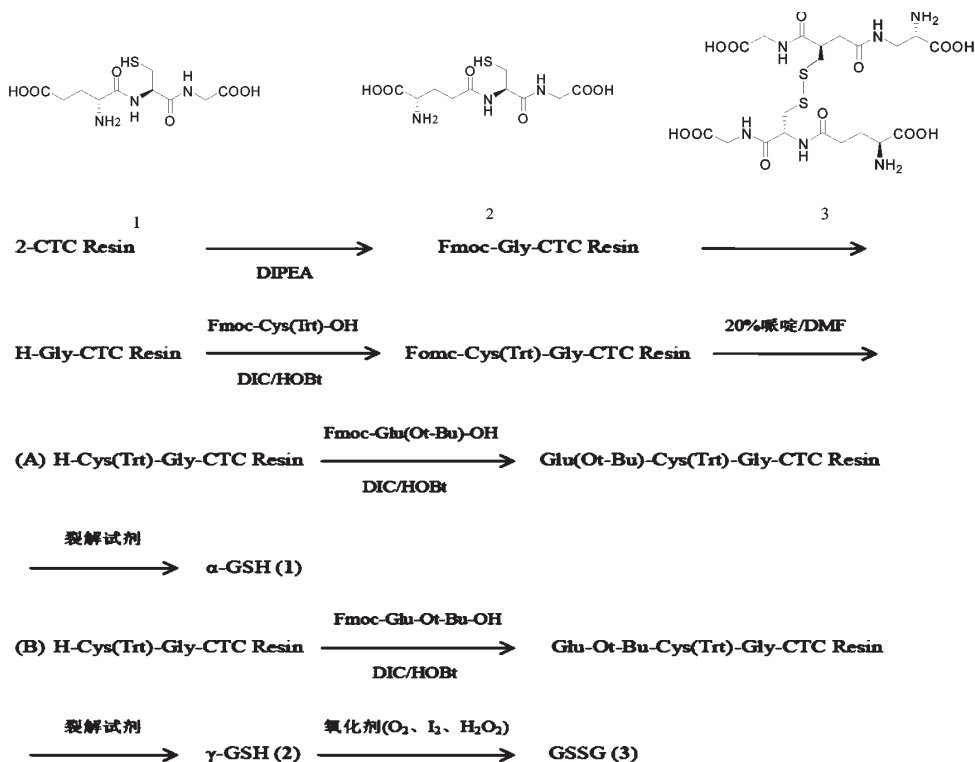


图1 三种谷胱甘肽化学结构式和合8成路线图

Fig. 1 Structure and synthetic route of 1, 2 and 3

产率不稳定,生产周期长等原因,应用也受到限制。而 **1** 因其不是体内天然产物,发酵法无法直接获得,合成方法目前报道较少。本研究采用 Fmoc 固相多肽合成法,用逐步缩合的方式合成高纯度 **1**、**2**,再将 **2** 经氧化得高纯度的 **3**,并研究了三者对四氯化碳 (CCl_4 , **4**) 诱导的小鼠急性肝损伤的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent Technologies 1200 型高相液相色谱 (HPLC, 美国 Agilent 公司); Newstyle 型反相半制备 HPLC (江苏汉邦科技有限公司); Christ 冷冻干燥机 (德国); TDL-40B 型大容量离心机 (上海安亭科学仪器厂); Heal Force Easy 20 纯水机 (香港力康公司); 752 型 UV 分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); Agilent Technologies 6310 Ion trap LC/MS (美国 Agilent 公司)。

2-氯三苯甲基氯树脂 (2-CTC 树脂, 替代度 1.3 mmol/g, 天津南开合成科技有限公司); Fmoc 保护的氨基酸有 Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys (Trt)-OH, Fmoc-Glu-Ot-Bu-OH, Fmoc-Glu (Ot-Bu)-OH 全部购自成都诚诺新技术有限公司; 缩合试剂 1-羟基苯并

三氮唑 (HOBt), N,N-二异丙基碳二亚胺 (DIC), N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) 由苏州天马医药集团有限公司提供; 哌啶、甲醇 (MeOH)、二氯甲烷 (DCM)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、三氟乙酸 (TFA)、苯甲硫醚、乙二硫醇 (EDT)、苯甲醚、间甲酚 (m-Cresol)、三异丙基硅烷 (TIS)、碘 (I_2)、双氧水 (30% H_2O_2)、无水乙醇、冰乙酸、碳酸氢钠, 维生素 C 均为分析纯; 乙腈 (高效液相色谱纯), 超纯水, **4** (CCl_4 , 含量 99.5%, 批号 20120722), **1**、**2** 对照品 (日本 TCI 公司, 含量 >98.0%), **3** 对照品 (上海源聚生物科技有限公司, 进口分装, 含量 99.0%), 注射用还原型谷胱甘肽 (**2**, 阳性对照药, 上海复旦复华药业有限公司, 规格 0.6 g), ALT、AST 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

雄性清洁级昆明小鼠 [体重 (20 ± 2) g, 北京华阜康生物科技有限公司, 实验动物生产许可证 SCXK (京) 2009-0004]。

1.2 还原型谷胱甘肽 (1, 2) 的制备

1.2.1 Fmoc-Gly-CTC Resin 的制备

将 3.846 g (5 mmol) 2-CTC 树脂两份分别投入反应柱 a、b 中, DCM 溶胀 0.5 h, 抽干。DMF 洗涤 (50 mL \times 5, 每次 1 min) 后, 抽干。将 4.460 g (15

mmol) Fmoc-Gly-OH、5.239 mL (30 mmol) DIPEA 两份分别用 50 mL DMF 在冰浴下溶解后投入两反应柱中,氮气均匀吹拂,30 °C 反应 1.5 h,DMF 洗涤 (50 mL × 5,每次 1 min),除去过量反应原料,制得 Fmoc-Gly-CTC 树脂。两反应柱中分别加入 50 mL MeOH 封闭液 (体积比为 DCM: MeOH: DIPEA = 80:15:5) 封闭两次,每次 10 min,抽干,DMF 洗涤 (50 mL × 5,每次 1 min),无水 MeOH 洗涤 (25 mL × 3,每次 10 min),减压干燥至恒重,取少量所得树脂进行替代度检测。由替代度测定方法^[10],测得 Fmoc-Gly-CTC 树脂替代度分别为 0.94 mmol/g, 0.93 mmol/g。

1.2.2 Glu(Ot-Bu)-Cys(Trt)-Gly-CTC 与 Glu-Ot-Bu-Cys(Trt)-Gly-CTC 树脂的制备

将 5.400 g (5 mmol) 制备好的 Fmoc-Gly-CTC 树脂两份分别加入到反应柱 a、b 中,用 DCM 溶胀 0.5 h,抽干。加入 30 mL 20% 的哌啶/DMF 溶液,N₂ 均匀吹拂反应 15 min,脱除 Fmoc 基团,用 DMF 洗涤 (50 mL × 3,每次 1 min),抽干,茚三酮检测阳性。将 8.786 g (15 mmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH、2.432 g (18 mmol) HOBt、2.787 mL (18 mmol) DIC 两份分别用 DMF 在冰浴下溶解,预反应 10 min 后,投入两反应柱中,N₂ 吹拂,30 °C 反应 2 h 后取少量树脂洗涤后滴加茚三酮检测液,检测阴性,反应完全。DMF 洗涤 (50 mL × 5,每次 1 min),除去多余的氨基酸等。再按照谷胱甘肽的氨基酸序列,用上述方法分别偶联 Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH 与 Fmoc-Glu-Ot-Bu-OH。

1.2.3 Glu-Ot-Bu-Cys(Trt)-Gly-CTC 树脂的裂解

分别将 1.36 g 干燥至恒重的 Glu(Ot-Bu)-Cys(Trt)-Gly-CTC 与 Glu-Ot-Bu-Cys(Trt)-Gly-CTC 树脂置于两圆底烧瓶中,冰浴搅拌下分别加入 13.6 mL 经冷冻的 TFA-EDT-m-Cresol (体积比为 95:4:1) 裂解液,反应 0.5 h 后,逐渐升至室温,于室温下继续反应 1.5 h。经粗过滤后将母液倾入 120 mL 无水冰乙醚中,析出白色沉淀,4000 rpm 离心 5 min,弃去上清液,重复 5 次,减压真空干燥至恒重,得粗肽分别为 266、289 mg。

1.2.4 1、2 粗品的 HPLC 鉴定分析

1、2 粗品进行 HPLC 分析,色谱柱为 Innoval C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% TFA/H₂O (A), 0.1% TFA/5% H₂O/CH₃CN (B), B 相 1% ~ 21%, 梯度洗脱 20 min, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 215 nm, 样品浓度为 1 mg/mL, 进

样量 5 μL。

1.2.5 1、2 纯品的制备

分别称取干燥至恒重的 1、2 粗品各 200 mg 分别溶于 5 mL 超纯水中,用反相半制备 HPLC 分离纯化,半制备柱 Heder ODS-2 反相硅胶柱 (250 mm × 10 mm, 10 μm)。收集主峰纯度达 99% 的组分。冷冻干燥,得 1、2 纯品 130 mg、136 mg。

1.3 3 的制备

1.3.1 3 粗品的制备

1.3.1.1 空气氧化法

将 100 mg 2 纯品溶于 5 mL 超纯水中,用饱和碳酸氢钠水溶液调 pH 6,混匀,恒温摇动 (30 °C), HPLC 监测反应进程,反应 72 h 达终点,冰乙酸调 pH 3 以终止反应。

1.3.1.2 双氧水氧化法

将 100 mg 2 纯品溶于 1 mL 超纯水中,用饱和碳酸氢钠水溶液调 pH 6,加入 0.2 mL、30% 的过氧化氢溶液,混匀,恒温摇动 (30 °C), HPLC 监测反应进程,30 min 达到反应终点,冰乙酸调 pH 3 以终止反应。

1.3.1.3 碘氧化法

将 100 mg 2 纯品溶于 1 mL 超纯水中,加入 2.758 mL、20 mg/mL 碘的乙醇溶液,使得碘与 2 的摩尔比为 1:1.5,混匀,恒温摇动 (30 °C), HPLC 监测反应进程,10 min 达到反应终点,饱和维生素 C 水溶液除去过量的碘以终止反应。

1.3.2 3 纯品的制备

将 1.3.1.3 所得溶液注入反相半制备 HPLC 中,半制备柱 Heder ODS-2 反相硅胶柱 (250 mm × 10 mm, 5 μm)。分段收集,合并主峰纯度达 98% 的组分,减压真空干燥,得 3 91.8 mg。取少量干燥至恒重的 3 进行 HPLC 分析,分析条件同 1.2.4。

1.4 1、2 与 3 纯品的 ESI-MS 分析

分别取 1、2 与 3 纯品各 1 mg 分别溶于 1 mL 超纯水中,加少许乙腈,进样 5 μL,ESI-MS 分析。

离子阱质谱仪离子源:ESI;电离模式:正/负离子模式;质量扫描范围: m/z 50 ~ 1500 amu;毛细管电压:-130.2 V。

1.5 三种谷胱甘肽保肝活性研究

将 112 只雄性昆明小鼠随机分为 14 组,每组 8 只,分别作为正常对照组、4 (0.1%) 致肝损伤模型组,注射用 2 对照组 (20、40、80 mg/kg),肝损伤 + 合成 1 组 (20、40、80 mg/kg),肝损伤 + 合成 2 组 (20、

40、80 mg/kg), 肝损伤 + 合成 **3** 组 (20、40、80 mg/kg)。用生理盐水将购买的注射用 **2**、合成化合物 **1** (α -GSH)、合成化合物 **2** (γ -GSH)、合成化合物 **3** (GSSG) 分别配得浓度为 0.2%、0.4%、0.8% 的溶液, **4** 配成 0.1% 的花生油稀溶液。正常组和 **4** 肝损伤模型组以 10 mL/kg 剂量连续 7 d 腹腔注射生理盐水, 其余 12 组则以腹腔注射给予等剂量的相应药物。第 7 d 给药后, 除正常组外各组按 20 mL/kg 剂量腹腔注射给予 0.1% **4** 溶液, 动物禁食 24 h 后摘眼球取血 600 ~ 800 μ L, 现制备血清并测定 ALT 和 AST 活性^[11,12]。对试验数据进行统计学处理, 各组分间的比较采用两样本均数的 *t* 检验。

2 结果与讨论

2.1 目标产物 **1**、**2**、**3** 的表征与图谱

还原型谷胱甘肽 **1** (α -GSH): 白色固体, 总收率 60%, 粗品保留时间 5.254 min, 纯品保留时间 5.252 min, ESI-MS m/z : 306.5 [M-H]⁻, 见图 2、图 3、图 5。

还原型谷胱甘肽 **2** (γ -GSH): 白色固体, 总收率 64%, 粗品保留时间 5.443 min, 纯品保留时间 5.394 min, ESI-MS m/z : 307.3 [M-H]⁺, 见图 2、图 3、图 5。

氧化型谷胱甘肽 **3** (GSSG): 白色固体, 总收率 57%, 纯品保留时间 7.964 min, ESI-MS m/z : 611.7 [M-H]⁻, 见图 4、图 5。

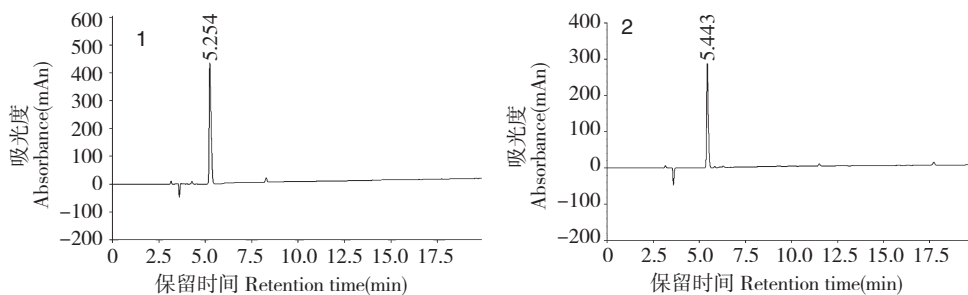


图 2 1、2 粗品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of **1** and **2** before purification

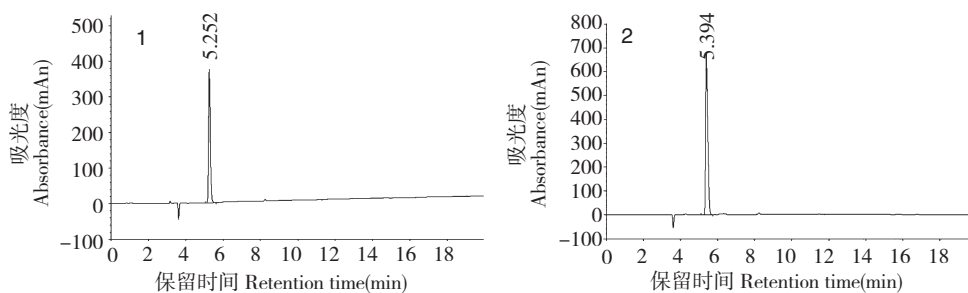


图 3 1、2 纯品的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of **1** and **2** after purification

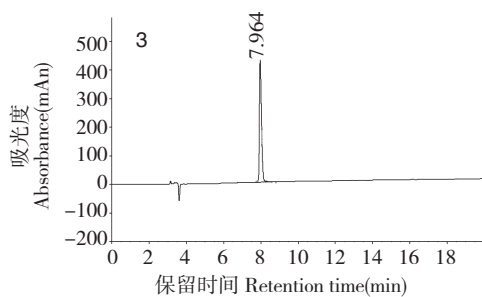


图 4 3 纯品 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of purified **3**

2.2 合成条件的优化

本研究采用 Fmoc 固相合成法合成 **1**、**2**, 在全保护肽合成过程中, 选择合适的树脂, 缩合剂及替代度对提高纯度、得率十分重要。由于两者肽链较短, 故选用了适合短肽合成, 且合成速率较快的 2-CTC 树脂。缩合试剂选用缩合能力较强, 价格低廉的 DIC/HOBt 体系。替代度选用较高的 1.3 mmol/g, 这样不仅可以提高收率, 降低成本, 还可以避免因替代度

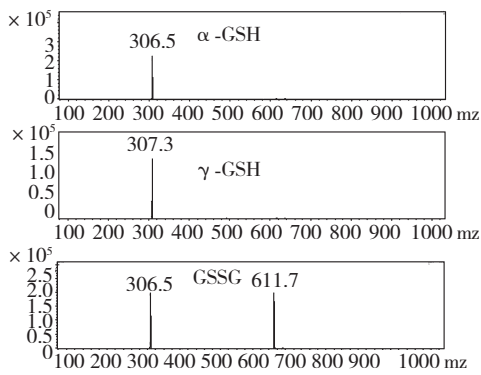


图5 三种谷胱甘肽 ESI-MS 分析图谱

Fig. 5 ESI-MS spectra of **1**, **2** and **3**

过高导致的相邻分子间的相互作用,影响产品的纯度和后处理。

在两者合成过程中另一个影响产品纯度和收率的重要因素就是切割条件的选择。

2.2.1 裂解试剂

固相合成中切割反应是在各种酸条件下完成的,一般不同的树脂需要不同的切割试剂,同一树脂也因肽侧链保护基的不同而需要不同的试剂配方,以减少副反应,提高纯度。称取干燥至恒重的 **2** 树脂,室温下以不同配比的裂解试剂反应 2 h,结果见表 1。结合纯度、收率与成本确定 C 配方为较优的裂解试剂,**1** 树脂裂解效果与之类似。

表 1 不同裂解试剂的切割效果比较

Table 1 Comparison of different cleavage cutting effect

配方 Formula	裂解试剂组成 Cracking composition (V/V)	切割前树脂重量 Resin weigh before cutting (mg)	粗肽重量 Crude peptide weight (mg)	收率 Yield (%)	纯度 Purity (%)
A	TFA-H ₂ O (95:5)	500	89	34	84
B	TFA-TIS-H ₂ O (95:2.5:2.5)	500	126	56	88
C	TFA-EDT-m-Cresol (95:4:1)	500	106	64	94
D	TFA-EDT-Thioanisole-Phenyl ether (90:3:5:2)	500	117	50	95

2.2.2 裂解温度

一般认为,低温可以抑制副反应的发生,适度提高温度可以加快反应速度,但不可过高,否则会使多肽降解,副反应增多,严重影响产品纯度。本实验选用不同裂解温度进行试验,发现先将树脂在冰浴条件下裂解 0.5 h 后,再缓慢升至室温 (30 ℃),较直接于室温下裂解效果好。

2.2.3 裂解时间

通常情况下,适度延长反应时间有利于反应完

全,提高得率,但若时间过长在脱除树脂和保护基时会发生许多副反应,同时当多肽长时间处于强酸性环境中时,也会影响到肽的稳定性。实验中发现当裂解 2 h 时,反应基本完全,且纯度和收率都较高。

此外,本实验还利用不同的氧化方法^[13],通过氧化巯基为二硫键得到 **3**,氧化在各自较优的条件下进行,并对氧化效果进行了比较,结果见表 2。

表 2 不同氧化法氧化效果的比较

Table 2 Comparison of different oxidation effect

氧化剂 Oxidizing agent	氧化前 2 质量 Quality of 2 before oxidation (mg)	氧化后所得 3 质量 Quality of 3 after oxidation (mg)	氧化时间 Oxidation Time (h)	收率 Yield (%)	纯度 Purity (%)
空气 O ₂	100	73	72	70	90
碘 I ₂	100	92	0.2	90	98
双氧水 H ₂ O ₂	100	94	0.5	91	95

从表中可知,空气氧化的纯度虽然较高,但收率较差,同时反应时间长,且底物浓度必须较低,否则副产物较多,较为繁琐。故工业多采用双氧水氧化法,本实验除采用此法以外,还尝试了碘氧化法,由

表 2 知,效果与双氧水法相似,且用时更短,效率更高。

2.3 目标产物的保肝活性

由表 3 知,合成 **1** (α-GSH)、**2** (γ-GSH) 和 **3** (GSSG) 与注射用 **2** 在 80、40 mg/kg 剂量下都可以

显著降低小鼠肝脏血清中 ALT 和 AST 水平,而低剂量(20 mg/kg)作用稍弱。

表3 连续给予合成化合物1、2、3与注射用2后对4致急性肝损伤小鼠血清ALT与AST的影响($\bar{x} \pm S, n=8$)

Table 3 Effects of synthetic compounds 1, 2, 3 and 2 for injection on serum ALT and AST of 4-induced acute liver injury in mice ($\bar{x} \pm S, n=8$)

组别 Group	ALT (u/L)	AST (u/L)
正常组 Normal group	24.63 ± 8.12	21.26 ± 6.17
肝损伤模型组 Model group	165.08 ± 60.43	121.75 ± 51.53
注射用2组 Injection of 2 group (20 mg/kg)	89.12 ± 36.78 *	74.67 ± 28.65 *
注射用2组 Injection of 2 group (40 mg/kg)	38.64 ± 17.87 **	30.37 ± 12.22 **
注射用2组 Injection of 2 group (80 mg/kg)	25.37 ± 11.75 **	22.23 ± 10.17 **
肝损伤+合成化合物1组 Synthesis of compound 1 group (20 mg/kg)	102.03 ± 43.87 *	77.45 ± 33.32
肝损伤+合成化合物1组 Synthesis of compound 1 group (40 mg/kg)	41.16 ± 16.34 **	34.24 ± 13.49 **
肝损伤+合成化合物1组 Synthesis of compound 1 group (80 mg/kg)	27.01 ± 9.36 **	26.11 ± 14.23 **
肝损伤+合成化合物2组 Synthesis of compound 2 group (20 mg/kg)	77.13 ± 35.46 *	59.21 ± 32.54 *
肝损伤+合成化合物2组 Synthesis of compound 2 group (40 mg/kg)	35.89 ± 15.76 **	30.70 ± 12.13 **
肝损伤+合成化合物2组 Synthesis of compound 2 group (80 mg/kg)	25.32 ± 12.47 **	25.26 ± 11.24 **
肝损伤+合成化合物3组 Synthesis of compound 3 group (20 mg/kg)	94.16 ± 39.34 *	69.37 ± 30.42 *
肝损伤+合成化合物3组 Synthesis of compound 3 group (40 mg/kg)	46.56 ± 18.17 **	37.67 ± 12.45 **
肝损伤+合成化合物3组 Synthesis of compound 3 group (80 mg/kg)	27.18 ± 13.19 **	24.36 ± 9.64 **

注:与肝损伤模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: compare with liver injury model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 结论

通过与注射用 γ -GSH比较,小鼠急性肝损伤试验结果表明,合成化合物1(α -GSH)、2(γ -GSH)和3(GSSG)的高、中剂量组都可以显著降低小鼠肝脏ALT和AST水平,其治疗效果与同等剂量的注射用 γ -GSH无显著差异。初步说明可以考虑此方法用于谷胱甘肽的合成。

参考文献

- Jin CY (金春英), Cui JL (崔京兰), Cui SY (崔胜云), et al. Synergistic effect of oxidized glutathione to glutathione and scavenging free radicals. *Chem Anal (分析化学)*, 2009, 37: 1349-1353.
- Raghunathan VK, Ellis EM, Justice NAT, et al. Involvement of reduced glutathione and glutathione reductase in the chronic toxicity of hexavalent chromium to monocytes *in vitro*. *Toxicology*, 2007, 23: 105-106.
- Every D, Morrison SC, Simmons LD, et al. Distribution of glutathione in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chem*, 2006, 83: 57-61.
- Jiang J (江洁), Shan LF (单立峰). Preparation and application of glutathione. *Feed Ind (饲料工业)*, 2007, 28: 15-17.
- Liu GQ (刘国琴), Chen J (陈洁), Zhao L (赵雷), et al. Discussion of optimization method and technological conditions for extracting glutathione from wheat germ. *J Henan Univ Tech (河南工业大学学报)*, 2007, 28: 1-5.

- Wu WT (吴梧桐), Lao XZ (劳兴珍), Zheng X (郑珩), et al. By the method of enzyme engineering technology of bio-synthesis of glutathione (通过酶工程法生物合成谷胱甘肽). CN200710020902.1, 2007-10-17.
- Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B*, 2002, 781: 181-206.
- Chen J (陈坚), Wei GY (卫功元), Li Y (李寅), et al. Glutathione production by microbial fermentation. *J Food Sci Biotech (食品与生物技术学报)*, 2004, 23: 104-110.
- Chen X (陈雪), Zhao WJ (赵文杰), Feng J (冯军), et al. Strain screening of glutathione producing strain. *Chin J Pharm Ind (中国医药工业杂志)*, 2007, 38: 481-483.
- Han Y (韩月), Yin ZF (尹志峰), Zhao HL (赵红玲), et al. Solid phase synthesis of pramlintide. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2012, 21: 1046-1049.
- Xu SY (徐淑云), Bian RL (卞如谦), Chen X (陈修), et al. Methodology of pharmacological experiment (药理实验方法). Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. 1346.
- Sun J (孙键), Xu HJ (徐宏江), Zhu YH (朱裕辉), et al. Preparation and hepatoprotective activity of oxidized glutathione system. *Chin J Pharm Ind (中国医药工业杂志)*, 2013, 44: 265-268.
- Wang LY (王良友), Pan HP (潘和平), Chen ZY (陈正英). The formation of several two disulfide bonds in peptide synthesis method is introduced. *Organ Chem (有机化学)*, 1998, 18: 576-580.