

文章编号: 1004-1656(2008)11-1498-04

# 硒-甲基硒代半胱氨酸的合成与拆分研究

刘建群<sup>1\*</sup>, 刘芳<sup>2</sup>, 张小平<sup>3</sup>, 寇晓莉<sup>1</sup>

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西萍乡高等专科学校化工系, 江西 萍乡 337055;

3. 江西川奇药业有限公司, 江西 南昌 330029)

关键词: 硒-甲基硒代半胱氨酸; 2-乙酰氨基丙烯酸; 2-乙酰氨基丙烯酸甲酯; 合成; 拆分  
中图分类号: O627.6 文献标识码: A

天然硒-甲基硒代半胱氨酸为 L 型含硒氨基酸, 是第 21 种人体必须氨基酸——硒代半胱氨酸的甲基化衍生物。1960 年首次由 Trelease S F 等从美国黄芪中分离得到<sup>[1]</sup>, 它还广泛存在于大蒜、洋葱和椰菜等植物以及富硒酵母中。硒-甲基硒代半胱氨酸具有补硒、防治癌症、抗氧化、抗衰老、治疗心脑血管疾病、解重金属毒等作用, 特别是其抗癌和化学预防癌症作用得到国内外的广泛关注<sup>[2-5]</sup>。与硒代蛋氨酸等有机硒类补充剂相比, 硒-甲基硒代半胱氨酸具有毒性小、补硒效果好、抗癌等生物活性强等优点<sup>[6-7]</sup>, 应用前景广阔。硒-甲基硒代半胱氨酸主要有三种合成方法, 一是将氯丙氨酸与二硒化钠反应生成硒代半胱氨酸, 然后用金属钠/液氨(-70℃)还原裂解, 再用碘甲烷烷基化得硒-甲基硒代半胱氨酸<sup>[8]</sup>, 该法涉及超

低温(-70℃)和活泼危险金属钠, 反应条件苛刻, 工艺设备要求高, 原料氯丙氨酸价格高, 生产成本较高; 二是在三烷(芳)基磷或亚磷酸盐存在下, 叔丁氧酰基丝氨酸与偶氮二甲酸二酯反应生成 β 内酯, 然后与甲硒醇或其盐反应生成叔丁氧酰基保护的硒-甲基硒代半胱氨酸, 最后脱保护得硒-甲基硒代半胱氨酸<sup>[6]</sup>, 该法工艺冗长, 原料丝氨酸和保护试剂昂贵, 生产成本较高; 三是用甲硒醇钠取代氯丙氨酸或氯丙氨酸甲酯中的氯, 得硒-甲基硒代半胱氨酸<sup>[7]</sup>, 该法原料氯丙氨酸价格高, 生产成本较高。本研究开发了一种反应条件温和、操作方便、成本较低、适合工业化生产的 L 型和 D 型硒-甲基硒代半胱氨酸的制备方法, 其合成与拆分路线图示如下:

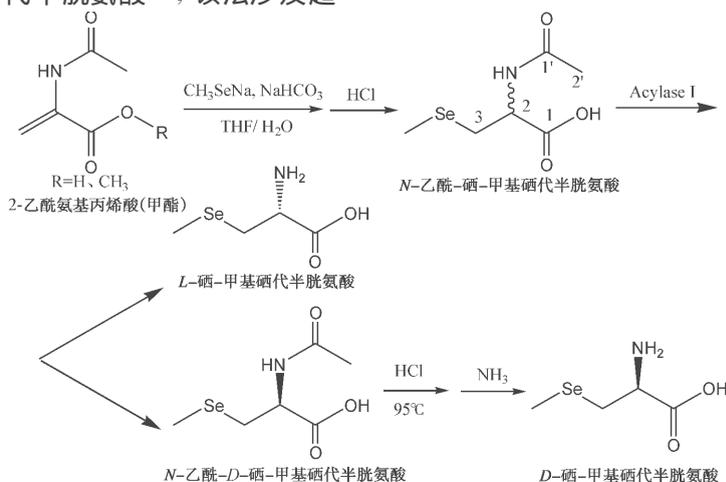


图 1 硒-甲基硒代半胱氨酸合成与拆分路线图

Fig 1 Synthesis and resolution routes of Se-methylselenocysteine

收稿日期: 2008-05-20 修回日期: 2008-09-01

基金项目: 南昌市科技型中小企业技术创新基金(2007)资助项目

联系人简介: 刘建群(1970-), 男, 副教授, 博士, 主要从事中药活性成分研究。Email: ljx308@sina.com

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

Elementar Varjo EL III 型元素分析仪; HP 5973 N 型质谱仪; Waters GCT CA176 高分辨质谱仪; Bruker 400 型核磁共振波谱仪; X4 显微熔点仪; WZZ-2A 型自动旋光仪; HHS-3C 型精密酸度计。2-乙酰氨基丙烯酸和 2-乙酰氨基丙烯酸甲酯 ( $\geq 98\%$ , Sigma aldrich), L-硒甲基硒代半胱氨酸对照品 ( $\geq 98\%$ , Sigma aldrich), 猪肾酰化酶 I (AcyLasq, EC Number 3.5.1.14 标示酶活力  $\geq 2000$  units/mg protein, Sigma aldrich), 二甲基二硒醚和甲硒醇钠按照文献<sup>[9]</sup>方法合成, 所用试剂均为分析纯。

### 1.2 N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸的合成

称取 50 g 二甲基二硒醚按照文献<sup>[9]</sup>方法制得甲硒醇钠的氢氧化钠水溶液, 在该溶液中依次加入 240 g 固体碳酸氢钠, 62 g 2-乙酰氨基丙烯酸 (或 69 g 2-乙酰氨基丙烯酸甲酯) 的四氢呋喃和水混合溶液 (200 mL 四氢呋喃和 200 mL 水)。密封于 35°C 搅拌反应约 48 h 至 2-乙酰氨基丙烯酸 (或 2-乙酰氨基丙烯酸甲酯) 反应完全 (TLC 监测)。将固体过滤除去后, 用 (1+1) 盐酸中和至 pH 约为 1-2 然后用等体积乙酸乙酯萃取多次, 将有机相合并后用无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得固体, 用甲醇溶解, 过滤除去不溶物, 减压蒸去溶剂得 N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸 (当原料为 2-乙酰氨基丙烯酸时, 得产物 94.13 g, 产率 87.43%; 当原料为 2-乙酰氨基丙烯酸甲酯时, 得产物 92.23 g, 产率 85.33%)。

### 1.3 N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸的酶解拆分

将 22.4 g N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸溶于 500 mL 0.01 mol/L 氯化钴水溶液中, 用 (1+1) 氨水调 pH 至 7, 加入猪肾酰化酶 I (EC Number 3.5.1.14) 0.448 g 控制温度 37°C, 每隔 1 h 取样用 HPLC 测定溶液中 L-硒甲基硒代半胱氨酸含量, 监控酶解进度, 反应约 4 h 后完成。然后将溶液于 90°C 加热使酶变性沉淀, 抽滤, 用 732 型阳离子交换树脂分离, 依次用水和 5% 氨水洗脱。将水洗脱液减压蒸干后, 用甲醇重结晶得 N-乙酰-D-硒甲基硒代半胱氨酸 12.57 g。将 5% 氨水洗脱液减压蒸干后, 用水-甲醇混合溶剂重结晶得 L-硒甲基硒代半胱氨酸 7.08 g, 光学纯度 97.37%, 产率

38.90% (根据原料中含有的硒甲基硒代半胱氨酸的量来计算)。

将所得 N-乙酰-D-硒甲基硒代半胱氨酸溶于 200 mL (1+1) 盐酸中, 于 95°C 回流 3 h 至 N-乙酰-D-硒甲基硒代半胱氨酸水解完全 (TLC 监测)。减压蒸干溶剂, 除去未反应的盐酸, 得固体, 用甲醇溶解。在甲醇溶液中通氨气至 pH 约为 10, 再减压蒸干溶剂, 除去剩余氨气, 得固体, 用甲醇溶解, 将不溶物滤掉, 滤液减压蒸干后, 用水-甲醇重结晶, 得 D-硒甲基硒代半胱氨酸 8.42 g, 光学纯度 96.20%, 产率 46.26% (根据原料中含有的硒甲基硒代半胱氨酸的量来计算)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产物的理化性质及表征

N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸: 白色针状结晶, 易溶于甲醇和水, <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  4.65 (1H, dd, J=8.4, 4.8 Hz, H<sub>2</sub>), 3.02 (1H, dd, J=13.0, 4.8 Hz, H<sub>3</sub>), 2.85 (1H, dd, J=13.0, 8.4 Hz, H<sub>3</sub>), 2.02 (3H, s, Me<sub>2</sub>'), 2.05 (3H, s, SeCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  172.5 (C-1), 52.4 (C-2), 21.0 (C-3), 171.9 (C-1'), 25.5 (C-2'), 3.2 (SeCH<sub>3</sub>)。

L-硒甲基硒代半胱氨酸: 白色固体, 易溶于水, mp 164°C ~ 166°C,  $[\alpha]_D^{20} = -13.31$  (c=3, H<sub>2</sub>O); C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>Se 元素分析 (%): C 26.39, H 4.98, N 7.69, HR-EMSI 测定值 182.9805 [M]<sup>+</sup>, 计算值 182.9798 (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>Se); EIMS m/z (rel. int): 183 [M]<sup>+</sup> (67), 181 (31), 138 (44), 122 (6), 110 (51); <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.80 (1H, t, J=5.2, 6.0 Hz, H-2), 2.89 (2H, m, H-3), 1.89 (3H, s, SeCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  173.0 (C-1), 53.6 (C-2), 24.7 (C-3), 4.3 (SeCH<sub>3</sub>); <sup>77</sup>Se-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  240.1 (SeCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>基本一致。

D-硒甲基硒代半胱氨酸: 白色固体, 易溶于水,  $[\alpha]_D^{20} = +13.15$  (c=3, H<sub>2</sub>O); TLC <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O) 数据与 L-硒甲基硒代半胱氨酸基本一致。

### 2.2 N-乙酰-硒甲基硒代半胱氨酸的合成条件

考察了加成反应温度和原料摩尔比 (甲硒醇钠: 2-乙酰氨基丙烯酸 (甲酯)) 对产率的影响, 结果见图 2 和图 3。

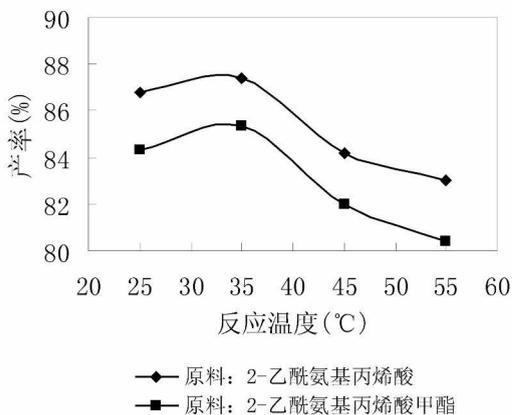


图 2 反应温度对产率的影响

Fig 2 The influence of reaction temperature on Yield

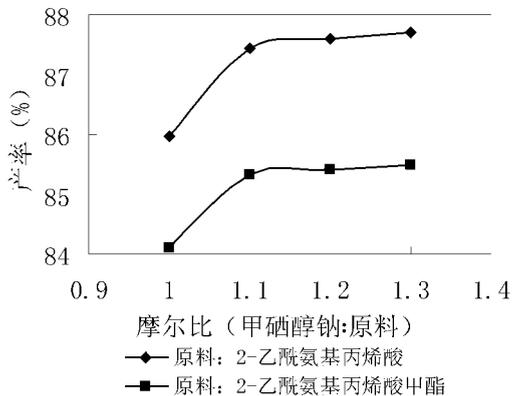


图 3 原料摩尔比对产率的影响

Fig 3 The influence of ratio of reactants on Yield

从图 2和 3可以看出, 较佳的加成反应温度为 35°C。当原料摩尔比大于 1.1时, 产率基本不增加, 为了降低原料消耗, 确定较佳的原料摩尔比为 1.1。碳酸氢钠可促使甲硒醇钠缓慢释放甲硒醇参与加成反应, 在常压加成且可不通 N<sub>2</sub>保护。加成反应产物 N-乙酰硒甲基硒代半胱氨酸的产率大于 80%, 说明甲硒基主要加成在羰基 β 位上, 该反应区域选择性高, 可能是因为羰基的共轭效应造成的。

### 2.3 N-乙酰硒甲基硒代半胱氨酸的酶解拆分条件

固定底物浓度 0.2mol/L 反应时间 4h 条件

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results of resolution

No	A	B	C	D	Yield%	Optic Purity%
1	5	32	0	50	10.05	93.78
2	5	37	0.001	100	19.56	94.21
3	5	42	0.01	200	8.23	94.12
4	7	32	0.001	200	32.18	96.86
5	7	37	0.01	50	38.90	97.37
6	7	42	0	100	18.54	96.02
7	9	32	0.01	100	12.98	94.34
8	9	37	0	200	20.79	95.27
9	9	42	0.001	50	9.21	93.59
K <sub>1</sub> /3	12.61(94.07)*	18.40(94.99)*	16.46(95.02)*	19.39(94.91)*		
K <sub>2</sub> /3	29.87(96.75)*	26.42(95.62)*	20.32(94.89)*	17.03(94.86)*		
K <sub>3</sub> /3	14.33(94.40)*	11.99(94.58)*	20.04(95.28)*	20.40(95.42)*		
R	17.26(2.68)*	14.43(1.04)*	3.86(0.39)*	3.37(0.56)*		

注: \* 括号内外数据分别为光学纯度和收率结果分析。

由表 2可以看出, 影响酶解收率的顺序为 pH > 温度 > C<sup>δ+</sup> 浓度 > 底物与酶质量比, 溶液 pH 和温度对酶解收率影响显著。影响酶解产物光学纯度的主要因素为 pH 其它三个因素影响较小。根

据产物收率和光学纯度确定较佳的酶解条件为: pH、温度 37°C、C<sup>δ+</sup> 浓度 0.01mol/L 底物与酶质量比为 50。

表 1 实验因素水平表

Table 1 The factors and levels for orthogonal experiment

Level	A	B	C	D
1	5	32	0	50
2	7	37	0.001	100
3	9	42	0.01	200

注: A pH B 酶解温度 (°C); C C<sup>δ+</sup> 浓度 (mol/L); D 底物与酶质量比。

## 参考文献:

- [ 1 ] Trelease S F, Di Somma A A, Jacobs A L. Seleno amino acid found in astragalus bisulcatus [ J ]. Science, 1960, 132: 618
- [ 2 ] Medina D, Thompson H, Ganther H C. S-methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer [ J ]. Nutr Cancer, 2001, 40(1): 12-17
- [ 3 ] Yeo J K, Cha S D, Cho C H. S-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation and Bax cleavage mediated by calpain in SKOV-3 ovarian cancer cells [ J ]. Cancer Lett, 2002, 182(1): 83-92
- [ 4 ] 史传兵, 卢航青, 郑杰. 硒甲基硒代半胱氨酸对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用 [ J ]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(3): 286-291
- [ 5 ] 裴小娟, 苏敏, 田东萍. 硒甲基硒代半胱氨酸对人食管癌 EC109 细胞 Ki67 及 Bcl2/Bax 蛋白表达的影响 [ J ]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(2): 65-68
- [ 6 ] Spallholz J E, Reid T W, Walkup R D. A method of using synthetic L-S-methylselenocysteine as a nutraceutical and a method of its synthesis [ P ]. EP 1205471, 2002-05-15
- [ 7 ] Muhammed M, Kalyanam N, Rajendran R. Manufacturing processes for S-methyl-L-selenocysteine [ P ]. US 6794537 B1, 2004-09-21
- [ 8 ] Andreadou I, Menge W M, Commandeur J N. Synthesis of novel Se-substituted selenocysteine derivatives as potential kidney selective prodrugs of biologically active seleno compounds: evaluation of kinetics of  $\beta$ -elimination reactions in rat renal cytosol [ J ]. Journal of Medicinal Chemistry, 1996, 39(10): 2040-2046
- [ 9 ] 王江, 刘丽萍, 杨燕. 硒代蛋氨酸的合成 [ J ]. 化学工程师, 1997, 1: 49-50

## Synthesis and resolution of S-methylselenocysteine

LIU Jian-qun<sup>1</sup>, LIU Fang<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ping<sup>3</sup>, KOU Xiao-li<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM Ministry of Education, Jiangxi University

of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Department of Chemistry, Pingxiang College, Pingxiang 337055, China

3. Chuanqi Pharmaceutical Company, Nanchang 330029, China)

Abstract: 2-Acetamidoacrylic acid or methyl 2-acetamidoacrylate is reacted with solution of sodium of methylselenol to give N-acetyl-S-methylselenocysteine. The L- and D)-S-methylselenocysteine have been prepared in high optical purity by treating N-acetyl-S-methylselenocysteine in water using acylase I from porcine kidney as a catalyst. The influencing factors on the resolution reaction are discussed by orthogonal experiment including pH value, reaction temperature, concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and amount of acylase I. Under the optimizing resolution conditions, L- and D)-S-methylselenocysteine are obtained with > 96% optical purity in about 40% yield.

Key words: S-methylselenocysteine; 2-acetamidoacrylic acid; methyl 2-acetamidoacrylate; synthesis; resolution

(责任编辑 罗娟)