

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^{1*}, 刘芳², 张小平³, 寇晓莉¹

(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^[1], 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^[2-5]。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^[6-7], 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^[8], 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^[6], 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^[7], 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:

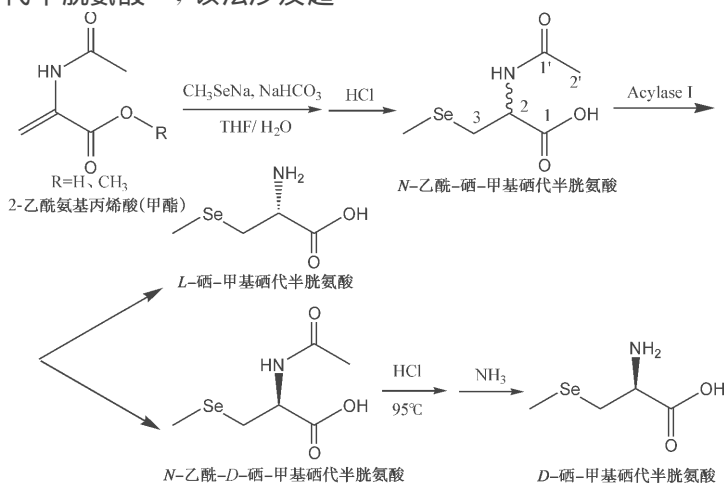


图 1 硒-甲基硒代半胱氨酸合成与拆分路线图

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。E-mail: 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 ≥ 2000 units/mg protein Sigma aldrich), 二甲基二硒醚和甲硒醇钠按照文献^[9]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^[9]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, $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 4.65 (1H dd $J=8.4, 4.8\text{Hz}$ H₂), 3.02 (1H dd $J=13.0, 4.8\text{Hz}$ H₃), 2.85 (1H dd $J=13.0, 8.4\text{Hz}$ H₃), 2.02 (3H s Me₂'), 2.05 (3H s SeCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ 172.5 (C-1), 52.4 (C-2), 21.0 (C-3), 171.9 (C-1'), 25.5 (C-2'), 3.2 (SeCH₃)。

L 硒甲基硒代半胱氨酸: 白色固体, 易溶于水, mp 164°C ~ 166°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.31$ ($c=3$ H₂O); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 4.65 (1H dd $J=8.4, 4.8\text{Hz}$ H₂), 3.02 (1H dd $J=13.0, 4.8\text{Hz}$ H₃), 2.85 (1H dd $J=13.0, 8.4\text{Hz}$ H₃), 2.02 (3H s Me₂'), 2.05 (3H s SeCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ 172.5 (C-1), 52.4 (C-2), 21.0 (C-3), 171.9 (C-1'), 25.5 (C-2'), 3.2 (SeCH₃)。以上数据与文献^[7]基本一致。

D 硒甲基硒代半胱氨酸: 白色固体, 易溶于水, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.15$ ($c=3$ g H₂O); TLC ^1H 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) 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。

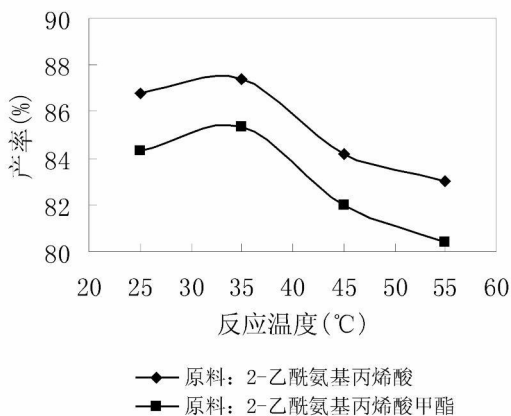


图 2 反应温度对产率的影响

Fig 2 The influence of reaction temperature on Yield

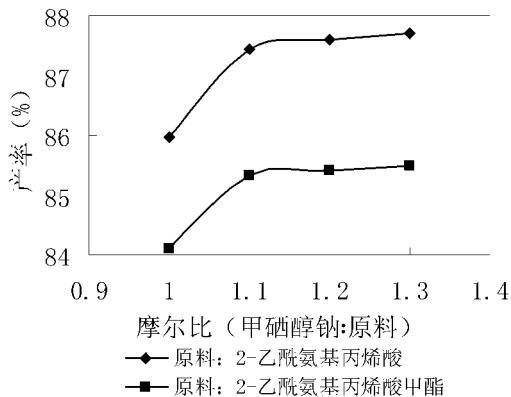


图 3 原料摩尔比对产率的影响

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 N₂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 ₁ /3	12.61(94.07)*	18.40(94.99)*	16.46(95.02)*	19.39(94.91)*		
K ₂ /3	29.87(96.75)*	26.42(95.62)*	20.32(94.89)*	17.03(94.86)*		
K ₃ /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^{δ+} 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^{δ+} 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^{δ+} 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 β -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-qun¹, LIU Fang², ZHANG Xiao-ping³, KOU Xiao-li¹

(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 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)