

## 一种硒代蛋氨酸衍生物的合成表征与安全性评价

唐灿, 樊庆涛, 王文龙, 刘俊奇, 刘梁, 赵玲, 陈新\* (武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023)

**摘要** 以 L-硒代蛋氨酸、月桂酰氯和油酰氯为主要原料通过肖顿-鲍曼缩合和酯化反应得到了 N-酰基-L-硒代蛋氨酸衍生物, 产物运用核磁共振(NMR)技术( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR)表征确认。采用噻唑蓝(MTT)比色法研究了目标化合物对人体正常肝细胞(HL-7702)和大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)的细胞毒性。结果表明, 合成的目标化合物对人体正常肝细胞(HL-7702)和大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)细胞毒性较低, 当 2 种目标化合物的浓度达  $1\ 920\ \mu\text{mol/L}$  时, 细胞存活率均大于 75%, 证明合成的硒代蛋氨酸衍生物是一种低毒的硒代化合物, 对于扩大硒代蛋氨酸在油脂类食品和农产品加工领域的应用具有一定潜力。

**关键词** L-硒代蛋氨酸衍生物; 合成; 核磁共振表征; 细胞存活率

**中图分类号** O 621.3 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2020)13-0162-03

**doi:** 10. 3969/j. issn. 0517-6611. 2020. 13. 045



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Synthetic Characterization and Safety Evaluation of a Selenomethionine Derivative

TANG Can, FAN Qing-tao, WANG Wen-long et al (School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

**Abstract** N-acyl-L-selenomethionine derivatives were synthesized by Schotten-Baumann condensation using L-selenomethionine, lauroyl chloride and oleoyl chloride as the main raw materials, and then esterified with methanol to obtain the N-acyl-L-selenomethionine methyl ester. The product was characterized and confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) technology ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR). In addition, the cytotoxicity of the target compound on human normal liver cells (HL-7702) and rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E) was studied by MTT colorimetry. The results showed that two synthesized target compounds were less cytotoxic to human normal liver cells (HL-7702) and rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E). When the concentration of two target compounds reached  $1\ 920\ \mu\text{mol/L}$ , the cell survival rate was greater than 75%, which proved that the synthetic selenomethionine derivative is a low-toxic selenomethionine compound and has certain potential for expanding selenomethionine in the field of oily food and agricultural products processing.

**Key words** L-selenomethionine derivative; Synthesis; NMR characterization; Cell survival rate

硒是一种重要的生命必需元素。目前一些研究发现, 动物和人体硒元素的摄取率与一些癌症的死亡率呈负相关<sup>[1]</sup>。硒元素的缺乏还与我国一些常见的地方病如克山病和大骨节病密切相关, 并且动物体或人体长期处于缺硒状态, 会导致白内障患病率升高<sup>[2-3]</sup>。另外, 在一些报道中, 硒在人体内还具有清除自由基、抗衰老和提高免疫力的功能<sup>[4-5]</sup>, 并且还能预防心血管疾病等慢性疾病<sup>[6-8]</sup>。目前, 对于人体或动物体的补硒产品, 以有机硒为主要应用方式。有机硒生物相容性更好, 利用率且毒性小, 而其中的硒代氨基酸类更容易被动物体和人体吸收<sup>[9-10]</sup>。硒代氨基酸是自然界中硒以有机形式存在于动植物中的一种化合物, 是利用率最高的一种有机硒化物<sup>[11-12]</sup>, 它广泛存在于一些富硒产地的天然植物中, 可以作为补硒氨基酸的重要来源。在恩施地区生长的一些植物种中, 硒存在的主要形态为硒代胱氨酸和硒代蛋氨酸<sup>[13]</sup>。这些富硒地区的植物可以为硒代蛋氨酸的应用提供丰富的来源。然而, 硒代蛋氨酸作为补硒氨基酸的应用存在一些问题, 由于氨基酸的脂溶性较差, 所以无论在食品饲料还是在医药等应用领域, 都以水溶性氨基酸来添加应用, 限制了其在油脂基食品和药物等方面的应用, 因此通过增加氨基酸脂溶性基团, 使其脂溶性增强, 可以在保持其原有活性的基础上, 扩大其在油脂类食品医药和农业等方面的应用范围。

该研究选取 L-硒代蛋氨酸为原料, 通过 Schotten-Baumann 缩合反应<sup>[14-16]</sup>和甲酯化反应<sup>[17]</sup>合成一种 N-酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯衍生物, 通过增加 L-硒代蛋氨酸疏水基团, 改变硒代氨基酸的表面活性, 增强其脂溶性, 从而增加其对生物膜的通透性。通过对硒代蛋氨酸这种修饰, 不仅可扩大硒代蛋氨酸的应用范围, 还能为富硒植物中硒代蛋氨酸的加工应用提供一种新的思路。

### 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** L-硒代蛋氨酸(湖北信康医药化工有限公司); 月桂酰氯(上海阿拉丁生化科技股份); 油酰氯(上海阿拉丁生化科技股份); 四氢呋喃(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硫酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 含有 10% 胎牛血清 DMEM(高糖)培养液(北京索莱宝科技有限公司); 人体正常肝细胞(HL-7702)、大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)[上海吉凯基因生物科技有限公司(10 000/孔), 来源 CTCC]; MTT 溶液(5 g/L, 北京索莱宝科技有限公司); 其他试剂均为分析纯; 试验用水为二次蒸馏水。

**1.2 仪器与设备** OHAUS STARTER 3100 pH 计(奥豪斯仪器(上海)有限公司); DF-101B 集热式磁力加热搅拌器(常州市金坛友联仪器研究所); BUCHI R-100 旋转蒸发器(瑞士步琦有限公司); Bruker-500 型核磁共振波谱仪(布鲁克(北京)科技有限公司); PerkinElmer EnSpire 多功能酶标仪(珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司)。

**1.3 合成方法** 目标化合物的合成路线如图 1 所示, 以 6a 的合成例。取 500 mg 的 L-硒代蛋氨酸溶于 10 mL 的

**基金项目** 来凤凤菊综合利用生产关键技术的研究(2018ABA077)。  
**作者简介** 唐灿(1995—), 男, 安徽太和人, 硕士研究生, 研究方向: 药物化学。\* 通信作者, 教授, 博士, 从事天然产物化学研究。  
**收稿日期** 2019-12-20

KOH 溶液中,将此溶液加入到 100 mL 的三颈烧瓶中置于冰浴条件下搅拌。量取月桂酰氯 1.2 mL 使其溶解于 10 mL THF 溶液并置于分液漏斗中。向三颈烧瓶中以 5 s/滴的速度滴加月桂酰氯的 THF 溶液,并同时向其中缓慢滴加 KOH 溶液,使 pH 保持在 9。滴加完毕后,置于 25 °C 水浴条件下搅拌反应 2 h,随后向其中滴加稀盐酸溶液使 pH 达 1~2。反应完成后取出到分液漏斗中,加入乙酸乙酯 30 mL 萃取 3 次,合并有机相后,将萃取液用饱和食盐水洗涤 2 次后减压浓

缩。蒸干后经快速硅胶柱层析纯化后得到 5a N-月桂酰基-L-硒代蛋氨酸白色固体 386.2 mg,产率为 77.24%。取 500 mg N-月桂酰基-L-硒代蛋氨酸于反应烧瓶中,加入 10 mL 5% 的硫酸-甲醇溶液,振摇均匀后,在 60 °C 加热 30 min,反应完毕后,用正己烷萃取 2 次,取上层清液后减压浓缩,过柱层析纯化后得到 6a N-月桂酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯白色固体 374.2 mg,产率为 74.84%。

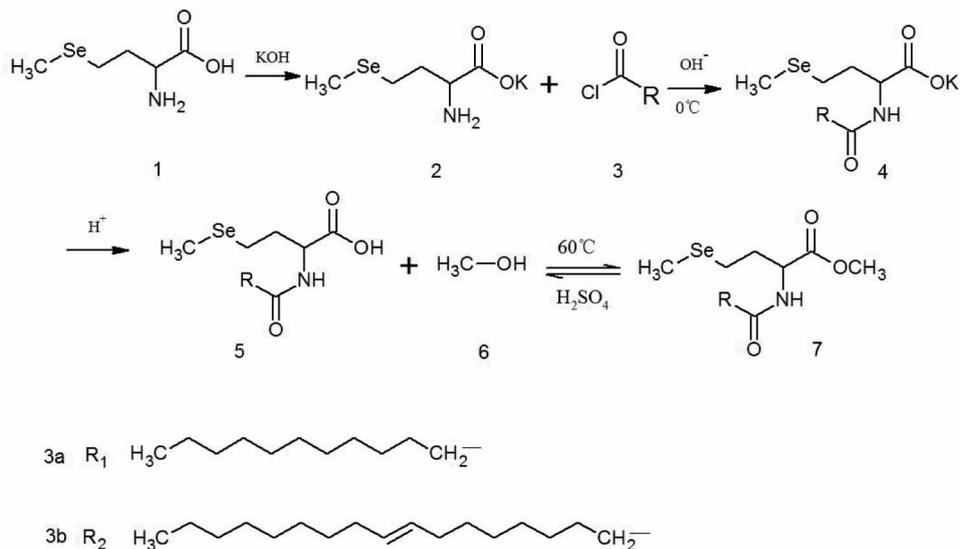


图 1 目标化合物合成路线

Fig. 1 Route of synthesis of target compounds

**1.4 N-酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯对人体正常肝细胞(HL-7702)和大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)的细胞毒性评价** 采用噻唑蓝(MTT)<sup>[18-19]</sup>比色法对合成的 N-酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯的细胞毒性进行测试。取对数生长期的人体正常肝细胞(HL-7702)和大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)悬浮于含 10% 胎牛血清培养液的 DMEM 高糖细胞培养基中,接种于 96 孔板中,每孔大约  $1 \times 10^4$  个细胞,将 96 孔板放置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,经过 24 h 后取出,分别加入 0、80、160、240、320、640、1 280、1 920  $\mu\text{mol/L}$  浓度的合成目标化合物,各组设平行重复的 6 孔进行试验。在给药后,将 96 孔板继续置于二氧化碳培养箱中培养 24 h,然后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 液(5 g/L)进行染色,在培养箱中继续培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲亚砜(DMSO),摇匀后,用酶标仪检测每孔在 490 nm 处的吸光度值,按如下公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_1 - A_{\text{con}}) / A_0 \times 100\%$$

式中, $A_1$  为给药组吸光度值; $A_{\text{con}}$  为空白对照组吸光度值; $A_0$  为阴性对照组吸光度值。

## 2 结果与分析

**2.1 产物的结构表征** 运用 NMR 核磁共振技术分别对产物进行了 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 结构确认,化合物 5a 白色固体,产率为 77.24%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  10.30(s, 1H), 6.67(d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.66(td, J = 7.4, 5.0 Hz,

1H), 2.52(t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.27-2.20(m, 2H), 2.20-2.01(m, 2H), 1.95(s, 3H), 1.64-1.54(m, 2H), 1.35-1.14(m, 16H), 0.84(t, J = 6.8 Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR(101 MHz, cdcl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.66, 174.47, 52.59, 36.41, 32.50, 31.86, 29.60, 29.58, 29.48, 29.31, 29.30, 29.21, 25.70, 22.63, 20.23, 14.07, 4.11。

化合物 5b 黄色油状液体,产率为 68.77%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  9.78(s, 1H), 6.62(d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.32(ddt, J = 15.9, 5.7, 2.9 Hz, 2H), 4.67(td, J = 7.4, 5.0 Hz, 1H), 2.52(t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.26-2.22(m, 2H), 2.13-2.00(m, 2H), 1.98(d, J = 10.5 Hz, 2H), 1.96(s, 3H), 1.92(dd, J = 11.3, 6.6 Hz, 2H), 1.65-1.53(m, 2H), 1.33-1.19(m, 20H), 0.89-0.80(t, 3H)。<sup>13</sup>C NMR(101 MHz, cdcl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.55, 174.46, 129.95, 129.63, 52.55, 36.40, 32.57, 32.51, 31.86, 29.72, 29.69, 29.62, 29.48, 29.28, 29.22, 29.13, 27.19, 27.15, 25.67, 22.64, 20.21, 14.08, 4.12。

化合物 6a 白色固体,产率为 74.84%。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  6.26(d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.68(td, J = 7.6, 5.1 Hz, 1H), 3.71(s, 3H), 2.48(ddd, J = 8.5, 6.6, 3.2 Hz, 2H), 2.24-2.14(m, 3H), 2.06-1.98(m, 1H), 1.95(s, 3H), 1.63-1.55(m, 2H), 1.29-1.18(m, 16H), 0.83(t, J = 6.8 Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR(101 MHz, cdcl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.10, 172.56, 52.40, 52.14, 36.47, 32.87, 31.84, 29.55, 29.54, 29.44,

29.29, 29.27, 29.20, 25.57, 22.61, 20.24, 14.05, 4.15。

化合物 6b 黄色油状液体,产率为 68.71%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  6.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.42–5.20 (m, 2H), 4.67 (td, J = 7.6, 5.1 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.54–2.41 (m, 2H), 2.20–2.16 (m, 2H), 2.04–1.96 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 1.90 (dd, J = 10.0, 5.2 Hz, 2H), 1.62–1.55 (m, 2H), 1.23 (d, J = 14.3 Hz, 20H), 0.86–0.80 (t, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, cdcl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.04, 172.53, 129.88, 129.63, 52.35, 52.12, 36.40, 32.82, 32.53, 31.83, 29.69, 29.64, 29.58, 29.45, 29.24, 29.20, 29.08, 27.14, 27.10, 25.55, 22.61, 20.26, 14.05, 4.11。

**2.2 目标化合物细胞毒性结果** 图 2 和 3 分别为目标化合物 6a 和 6b 在 0.80、160、240、320、640、1280、1920  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对于 HL-7702 细胞和 NRK-52E 细胞存活率的影响,由图可以看出,当 6a 和 6b 浓度在 0~1920  $\mu\text{mol/L}$  时对细胞存活率的影响不显著。6a 和 6b 对于 HL-7702 细胞和 NRK-52E 细胞存活率均具有浓度依赖性,随着 2 种化合物浓度的升高,细胞存活率均下降。但在化合物浓度为 1920  $\mu\text{mol/L}$  时,细胞存活率均在 75% 以上,证明 2 种化合物的细胞毒性较小。

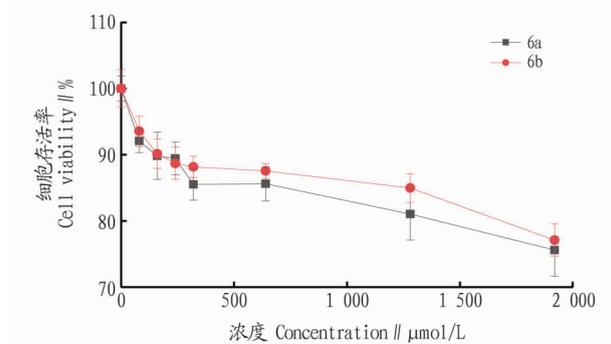


图 2 化合物 6a 和 6b 对人正常肝细胞的细胞毒性

Fig. 2 Cytotoxicity of 6a and 6b for HL-7702

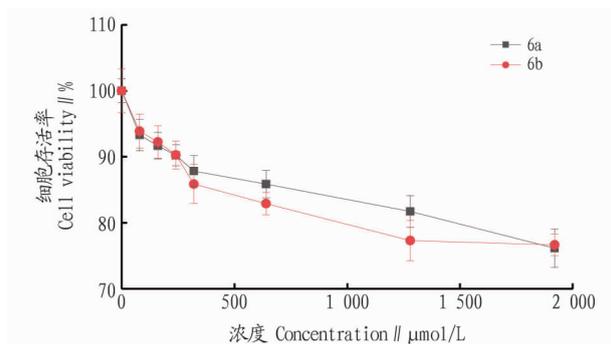


图 3 化合物 6a 和 6b 对大鼠肾小管上皮细胞的细胞毒性

Fig. 3 Cytotoxicity of 6a and 6b for NRK-52E

### 3 结论

(1) 以 L-硒代蛋氨酸、月桂酰氯和油酰氯为主要原料通过肖顿-鲍曼缩合合成了 N-酰基-L-硒代蛋氨酸,经酯化反应得到 N-酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯,产物运用核磁共振技术

(<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) 进行表征确认。

(2) 对合成的目标产物 N-月桂酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯和 N-油酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯进行了细胞毒性评价,应用 MTT 比色法研究了 2 种化合物对 HL-7702 和 NRK-52E 细胞存活率的影响。2 种化合物随着浓度的增加,细胞存活率逐渐降低,但在 1920  $\mu\text{mol/L}$  浓度时,总体细胞存活率都高于 75%,表明 N-月桂酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯和 N-油酰基-L-硒代蛋氨酸甲酯的细胞毒性均不显著。

该试验合成的目标化合物可以作为一种补充动物或人体的硒元素潜在化合物,合成工艺简便,目标产物不具有细胞毒性。与以往的硒代氨基酸产品相比,目标化合物具有较强的脂溶性,可应用添加于一些食用油类或油脂类食品饲料中,扩大了硒代蛋氨酸的应用范围,为富硒植物农产品中硒代蛋氨酸的加工生产提供了一种新的思路。

### 参考文献

- [1] RAYMAN M P. Selenium and human health[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1256–1268.
- [2] YANG G Q, CHEN J S, WEN Z M, et al. The role of selenium in Keshan disease[J]. Advances in nutritional research, 1984, 6: 203–231.
- [3] 黄开勤, 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009: 344–379.
- [4] HOFFMANN P R. Mechanisms by which selenium influences immune responses[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2007, 55(5): 289–297.
- [5] RAYMAN M P. The importance of selenium to human health[J]. Lancet, 2000, 356(9225): 233–241.
- [6] NAVAS-ACIEN A, BLEYS J, GUALLAR E. Selenium intake and cardiovascular risk: What is new? [J]. Current opinion in lipidology, 2008, 19(1): 43–49.
- [7] 邹宇, 于俊林, 徐晶, 等. 硒及微生物富硒研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(9): 171–173.
- [8] 郑建仙, 李璇. 硒的天然有机化及富硒谷物食品[J]. 食品工业, 1997(3): 25–27.
- [9] 孟田田, 刘怡琳, 张彬, 等. 硒代蛋氨酸的生物学功能及在蛋鸡生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2017, 29(12): 4281–4286.
- [10] 徐丰圆, 刘董莹, 余婕婷, 等. 富硒食用油的研发现状及展望[J]. 食品工业科技, 2017(15): 319–323.
- [11] SURAI P F, FISININ V I. Selenium in poultry breeder nutrition: An update[J]. Animal feed science and technology, 2014, 191: 1–15.
- [12] SCHRAUZER G N. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine[J]. Advances in food and nutrition research, 2003, 47(3): 73–112.
- [13] 米秀博, 邵树勋, 张静, 等. HPLC-ICP-MS 在植物有机硒形态分析中的应用现状[J]. 地球与环境, 2014, 42(4): 574–581.
- [14] SOO E L, SALLEH A B, BASRI M, et al. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants[J]. Process biochemistry, 2004, 39(11): 1511–1518.
- [15] TAN H, XIAO H N. Synthesis and antimicrobial characterization of novel L-lysine gemini surfactants pended with reactive groups[J]. Tetrahedron letters, 2008, 49(11): 1759–1761.
- [16] SREENU M, NAYAK R R, PRASAD R B N, et al. Synthesis, surface and micellar properties of sodium N-oleoyl amino acids[J]. Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects, 2014, 449: 74–81.
- [17] 黄峰, 盛灵慧, 马康, 等. 5 种脂肪酸甲酯化方法的酯化效率研究[J]. 中国油脂, 2013(9): 86–88.
- [18] KAJANDER E O, HARVIMA R J, ELORANTA T O, et al. Metabolism, cellular actions, and cytotoxicity of selenomethionine in cultured cells[J]. Biological trace element research, 1991, 28(1): 57–68.
- [19] 刘娟娟, 卢言菊, 陈玉湘, 等. 异海松基水杨酰脲的合成及细胞毒性评价[J]. 林产化学与工业, 2017(4): 35–39.