

# 富马酸氨基酸酯类衍生物的合成及其抑菌活性研究

宁正祥, 苏兰, 廖文镇, 袁尔东, 韦庆益

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究以马来酸酐和氨基酸酯为原料, 以无水氯化铝为异构化催化剂, 经酰胺化、异构化合成了八种富马酸氨基酸酯类衍生物。在以马来酸酐:氨基酸酯:无水氯化铝为 0.2 mol:0.2 mol:1.0 g 的合成条件下, 它们合成的产率均超过 75%。经熔点测定和核磁共振氢谱分析对产品的结构进行了确定。通过对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌和牛奶酸败混合菌的抑菌活性实验和涂抹皮肤实验, 结果表明: 富马酸氨基酸酯类衍生物的最低抑菌摩尔浓度与富马酸二甲酯的最低抑菌摩尔浓度相当, 但富马酸氨基酸酯类衍生物对人体皮肤没有过敏现象, 而富马酸二甲酯具有很强红斑过敏作用。另外还研究了富马酸氨基酸酯类衍生物对正常肝细胞 (L02) 和肝癌细胞 (HepG2) 存活率实验, 结果发现它们对这两种细胞都没有毒害作用。

**关键词:** 富马酸氨基酸酯类衍生物; 抑菌活性; 细胞存活率实验; 皮肤过敏测试

文章编号: 1673-9078(2014)10-47-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.009

## Synthesis and Antimicrobial Activity of Fumaric Acid Amino Acid Ester Derivatives

NING Zheng-xiang, SU Lan, LIAO Wen-zhen, YUAN Er-dong, WEI Qing-yi

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, eight kinds of fumaric acid amino acid ester derivatives were synthesized through amidation and isomerization, by using maleic anhydride and amino acid ester as raw materials and anhydrous aluminium chloride as an isomerization catalyst. Using a ratio of maleic anhydride to amino-acid ester to anhydrous aluminum chloride as 0.2 mol:0.2 mol:1.0 g, the yield of these products was more than 75%. The molecular structure of the compounds was determined by melting point determination and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance imaging. Antimicrobial activity of these compounds against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp., bacteria causing milk spoilage, as well as skin smear tests were conducted. The results showed that the minimum inhibitory concentration of fumaric acid amino acid ester derivatives were comparable to that of dimethyl fulminate. Moreover, fumaric acid amino acid ester derivatives did not cause skin allergy, while dimethyl fumarate caused strong skin allergic reactions (red rash). Cell viability of normal liver cells (L02) and hepatoma cells (HepG2) exposed to fumaric acid amino acid ester derivatives was also evaluated, which showed no toxic effect on either cell type.

**Key words:** fumaric acid amino acid ester derivatives; antimicrobial activity; cell viability experiment; skin allergy test

富马酸二甲酯 (DMF) 是国外 80 年代开发出来的一种新型食品防腐剂, 其可适用的 pH 范围较宽, 具有广谱、高效、低毒、稳定等优点, 而且能在人体内被酯酶快速水解为富马酸 (机体内的一种正常代谢产物)。DMF 对大鼠 (口服) 的半数致死量  $\text{LD}_{50}=2240 \text{ mg/kg}$ , 因而具有蓄积性低、慢性毒性低等特点, 并且无致畸性, 也不会致突变, 因此富马酸二甲酯曾被归

收稿日期: 2014-04-08

基金项目: 中央高校华南理工大学中央高校基本科研业务费项目 (2013ZZ0080, 2014ZZ0058)

作者简介: 宁正祥 (1954-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学

通讯作者: 韦庆益 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品化学及功能性食品领域

类为低毒类物质<sup>[1]</sup>。研究发现, 当富马酸二甲酯作为防腐剂在食品中应用时, 它会对人体皮肤产生强烈的刺激性<sup>[2]</sup>; 它作为防霉剂在皮革家具、鞋业和家具业中应用时, 也会引起一些皮肤炎症<sup>[3]</sup>, 因此目前已限制或禁止其在相关行业中的使用。由于富马酸含有两个  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羰基结构, 故其衍生物可能会具有一定程度的抑菌活性<sup>[4]</sup>。国内关于富马酸酯类防腐剂的研究主要是合成出同时具备抑菌和其它功能的多功能富马酸酯类衍生物。已有研究表明, 若在富马酸分子上引入维生素 C 或没食子丙酯 (PG), 可合成出同时具有抑菌和抗氧化功能的富马酸酯类衍生物。此外还报道了反丁烯二酸淀粉甲酯、反丁烯二酸甘露糖甲酯以及富马酸桂醇甲酯等具有多功能的富马酸酯类衍生物。但是它

们的应用或受到分离提纯困难、活性不好或受到价格昂贵等因素的限制<sup>5]</sup>。

同时,氨基酸酯是含有酯和氨基的双官能团化合物,是有机合成的重要中间体。氨基酸酯的合成方法有很多种<sup>[6-7]</sup>,参考相关方法,本课题组合成了一系列的氨基酸酯,如甘氨酸甲酯盐酸盐、甘氨酸乙酯盐酸盐、甘氨酸异丙酯盐酸盐、甘氨酸丙酯盐酸盐、苯丙氨酸甲酯盐酸盐、苯丙氨酸乙酯盐酸盐、苯丙氨酸异丙酯盐酸盐和苯丙氨酸丙酯盐酸盐。

此外,本实验以马来酸酐和氨基酸酯为原料、无水  $AlCl_3$  为异构催化剂,合成了具有良好抗菌活性,却对皮肤无致敏性的富马酸氨基酸酯类衍生物(结构见图1)。

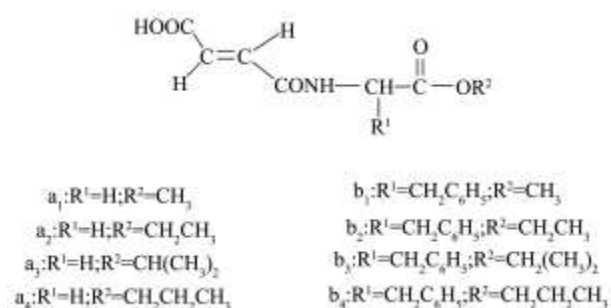


图1 富马酸氨基酸酯类衍生物的结构式

Fig.1 The structure of fumaric acid amino acid ester derivatives

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

顺丁烯二酸酐、富马酸二甲酯、甘氨酸、苯丙氨酸、吡啶、二氯亚砷、无水氯化铝(AR)、DMEM培养基与磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)(Invitrogen); MTT、DMSO(sigma)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);青霉素-链霉素溶液(100X)(碧云天生物技术研究所);大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),沙门氏菌(*Salmonella*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),乳酸菌(*Lactobacillus*),以上菌种由均华南理工大学生物与科技学院提供,牛奶酸败混合菌(*Milk spoilage bacteria*)则用新鲜牛奶自制而得。人肝癌细胞 HepG2 与正常肝细胞 L02 来着中山大学肿瘤研究所。其他试剂均为分析纯。

SPX-100B-Z 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;KDC-40 低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;SW-CJ-1D 型净化工作台,苏州净化设备有限公司;酶标仪 Varioskan Flash、二氧化碳培养箱 Hepa Class 100,美国 hermo 公司;倒置

荧光显微镜 BX51,日本 Olympus 光学工业株式会社。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 富马酸氨基酸酯类衍生物的合成

根据韩秋敏<sup>[6]</sup>和 Jiabo Li<sup>[7]</sup>的方法,以氨基酸和醇为原料反应合成了一系列的氨基酸酯盐酸盐。将 0.02 mol 的氨基酸酯盐酸盐和 0.02 mol (约 1.96 g) 顺丁烯二酸酐溶解在吡啶中进行酰胺化反应,反应温度 55 °C,反应时间 3 h。待反应结束后再加入异构化剂无水氯化铝 1.0 g (催化量)进行异构化反应,立即升温至 95 °C 并搅拌反应 2 h<sup>[8]</sup>。

待反应结束后,将反应液进行旋转蒸发,除去吡啶,得到棕色固体。用乙醇将产物溶解,随后加入适量的饱和碳酸氢钠,溶液中产生大量沉淀,离心得上清液,用一定浓度的盐酸将其调至 pH 为 3~5。将此溶液旋转蒸发,得到固体和液体的混合物,用无水乙醇萃取液体部分以除去混合物中的盐及不溶物,再次旋转蒸发,即可得到富马酸氨基酸酯类衍生物的粗产物。将粗产物用硅胶层析柱分离提纯(流动相为乙酸乙酯:乙醇=3:1)。

熔点测定,采用毛细管法测定产品熔点。

核磁共振氢谱测定,以氘代 DMSO 为溶剂,400 MHz。

#### 1.2.2 最低抑菌摩尔浓度的测定(琼脂稀释法)

供试菌种经牛肉膏蛋白胨斜面培养基接种、培养后,采用比浊法和平板计数法制得浓度为  $10^4 \sim 10^6$  CFU/mL 的菌悬液备用。

准确称取一定质量的富马酸氨基酸酯类衍生物,用含量为培养基 2% (V/V) 的无水乙醇将其溶解配成不同的浓度。然后将其倒入已溶化好的培养基中,混合均匀,即得到一系列不同浓度 (mV: 0.01%、0.05%、0.10%、0.12%、0.15%) 的富马酸氨基酸酯类衍生物溶液,趁热倒入 20 mL 此培养基于各个培养皿中。并用同等浓度的富马酸二甲酯 (DMF) 作为对照组。待冷却凝固后,每个培养皿加入 100  $\mu$ L 菌悬液涂匀,于 37 °C 恒温箱中培养 18~24 h,观察结果。最后,将不长菌的富马酸氨基酸酯类衍生物和富马酸二甲酯最低质量浓度转化成富马酸氨基酸酯类衍生物的最小抑菌摩尔浓度<sup>[9-10]</sup>。

#### 1.2.3 皮肤敏感性测试及 MTT 比色实验

##### 1.2.3.1 皮肤敏感性测试

将八种纯化后的富马酸氨基酸酯类衍生物和富马酸二甲酯 (DMF) 用无水乙醇配成 5 g/L 的溶液,用棉签沾取适量此溶液,分别涂在健康试验者 (4 名男士和 4 名女士且年龄在 18~26 岁之间) 的手背上,观

察所涂部位 2 h 内的变化<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3.2 MTT 比色法

用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 DMEM 培养基配制得到细胞培养基。用胰蛋白酶消化对数期的人正常肝细胞 L02 和肝癌细胞 HepG2, 终止后离心收集, 制成细胞悬液, 采用细胞计数的方法调整其浓度至  $5\sim 10\times 10^4$  个/mL。

将人正常肝细胞 L02 和肝癌细胞 HepG2 各 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中, 使待测细胞的密度为 5000~10000 个/孔 (边缘孔用无菌 PBS 填充)。将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养, 加入富马酸氨基酸酯类衍生物, 使人肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 L02 最终浓度分别为 50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 12.5、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 再于 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$  的条件下孵育 48 h, 用倒置显微镜下观察药物的作用效果。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5  $\text{mg}/\text{mL}$ , 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 然后吸取上清液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 摇床振荡 10 min 后, 将 96 孔板置于酶标仪, 570 nm 测定 OD 值。同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜)<sup>[11-13]</sup>。并根据如下公式计算存活率:

$$\text{细胞存活率}/\% = [\text{样品OD} - \text{空白OD}] / (\text{对照组OD} - \text{空白组OD}) \times 100\%$$

注: 对照组 OD、空白组 OD 和样品 OD 分别表示对照组、空白组和样品组的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 富马酸氨基酸酯类衍生物的结构表征

富马酸单氨基酸甲酯 ((E)-4-[(2-methoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, a<sub>1</sub>), 淡黄色固体, 产率 78.91%, m.p. 190~191  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.95 (s, 1H, NH), 6.98~7.02 (d, 1H, J=18.4 Hz, HC=C), 6.54~6.58 (d, 1H, J=18.4 Hz, C=CH), 3.98~3.99 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>)。

富马酸单甘氨酸乙酯 ((E)-4-[(2-ethoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, a<sub>2</sub>), 淡黄色固体, 产率 82.53%, m.p. 169~171  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.92 (s, 1H, NH), 6.97~7.01 (d, 1H, J=17.6 Hz, C=CH), 6.54~6.57 (d, 1H, J=17.60 Hz, CH=C), 4.12 (q, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.96 (d, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.20 (t, 3H, CH<sub>3</sub>)。

富马酸单甘氨酸异丙酯 ((E)-4-[(2-isopropoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, a<sub>3</sub>), 白色固体, 产率 80.32%, m.p. 183~184  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.94 (s, 1H, NH), 6.98~7.02 (d, 1H, J=18.00

Hz, C=CH), 6.54~6.57 (d, 1H, J=18 Hz, CH=C), 4.93 (m, 1H, -OCH), 3.93~3.94 (d, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.20~1.21 (d, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)。

富马酸单甘氨酸丙酯 ((E)-4-[(2-propoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, a<sub>4</sub>), 白色固体, 产率 86.46%, m.p. 181~182  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.92 (s, 1H, NH), 6.97~7.01 (d, 1H, J=17.6 Hz, C=CH), 6.54~6.57 (d, 1H, J=17.60 Hz, CH=C), 4.03 (t, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.97~3.99 (d, 2H, -NCH<sub>2</sub>), 1.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>)。

富马酸单苯丙氨酸甲酯 ((E)-4-[(1-phenmethyl-2-methoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, b<sub>1</sub>), 白色固体, 产率 87.33%, m.p. 157~158  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.96~8.98 (d, 1H, NH), 7.27~7.31 (t, 2H, ArH), 7.22~7.23 (s, 3H, ArH), 6.94~6.98 (d, 1H, J=18.80 Hz, C=CH), 6.47~6.51 (d, 1H, J=18.80 Hz, CH=C), 4.59 (m, 1H, NCH), 3.62 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.02 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ar)。

富马酸单苯丙氨酸乙酯 ((E)-4-[(1-phenmethyl-2-ethoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, b<sub>2</sub>), 白色固体, 产率 90.2%, m.p. 167~168  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.98~9.00 (d, 1H, NH), 7.28~7.31 (t, 2H, ArH), 7.23~7.24 (d, 3H, ArH), 6.96~6.99 (d, 1H, J=19.60 Hz, C=CH), 6.48~6.52 (d, 1H, J=19.60 Hz, CH=C), 4.57 (m, 1H, NCH), 4.08 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.02 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.12 (t, 3H, CH<sub>3</sub>)。

富马酸单苯丙氨酸异丙酯 ((E)-4-[(1-phenmethyl-2-isopropoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, b<sub>3</sub>), 白色固体, 产率 91.15%, m.p. 170~171  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.96~8.98 (d, 1H, NH), 7.28~7.24 (t, 2H, ArH), 7.23~7.24 (d, 3H, ArH), 6.97~7.00 (d, 1H, J=19.20 Hz, C=CH), 6.48~6.52 (d, 1H, J=19.20 Hz, CH=C), 4.89 (m, 1H, -OCH), 4.51~4.53 (m, 1H, NCH), 3.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.11 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)。

富马酸单苯丙氨酸丙酯 ((E)-4-[(1-phenmethyl-2-propoxy-2-oxoethyl) amino]-4-oxobut-2-enoic acid, b<sub>4</sub>), 白色固体, 产率 88.67%, m.p. 153~154  $^\circ\text{C}$ 。<sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 8.99~9.01 (d, 1H, NH), 7.28~7.30 (t, 2H, ArH), 7.23~7.25 (d, 3H, ArH), 6.95~6.99 (d, 1H, J=18.80 Hz, C=CH), 6.48~6.52 (d, 1H, J=18.80 Hz, CH=C), 4.56~4.58 (q, 1H, -NCH), 3.98 (t, 2H, -OCH<sub>2</sub>), 3.03 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 1.51~1.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.82 (t, 3H, CH<sub>3</sub>)。

从以上的核磁数据中, 双键的耦合常数都是 18 Hz 左右, 可以看出合成的 8 个富马酸氨基酸酯衍生物

均成功的进行了异构化，都是反式结构的富马酸氨基酸酯衍生物。

## 2.2 富马酸氨基酸酯类衍生物的抑菌活性实验

表 1 富马酸氨基酸酯类衍生物抑菌活性的最低抑菌浓度 (MIC)

**Table 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) of fumaric acid amino acid ester derivatives**

防腐剂种类	最低抑菌浓度(MIC)/(mmol/L)					
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.sp.</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>M.s.bacteria</i>
a <sub>1</sub>	6.42	6.42	6.42	6.42	6.42	6.42
a <sub>2</sub>	5.97	5.97	5.97	5.97	5.97	5.97
a <sub>3</sub>	5.58	5.58	5.58	5.58	5.58	5.58
a <sub>4</sub>	5.58	5.58	5.58	5.58	5.58	5.58
b <sub>1</sub>	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43
b <sub>2</sub>	4.12	4.12	4.12	4.12	4.12	4.12
b <sub>3</sub>	3.93	3.93	3.93	3.93	3.93	3.93
b <sub>4</sub>	3.93	3.93	3.93	3.93	3.93	3.93
DMF	2.78	4.17	4.86	4.17	4.17	4.17

注: *Escherichia. coli*-大肠杆菌; *Staphylococcus. aureus*-金黄色葡萄球菌; *Salmonella. sp*-沙门氏菌; *Bacillus subtilis*-枯草杆菌; *Lactobacillus*-乳酸菌; Milk spoilage bacteria-牛奶酸败菌。

由表 1 可知,富马酸氨基酸酯类衍生物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌和牛奶酸败混合菌均有一定的抑制作用,但不同的富马酸氨基酸酯类衍生物对不同试用菌的最低抑制浓度是不同的。如 a<sub>1</sub> 对实验所用的细菌的最低抑制摩尔浓度都为 6.42 mmol/L; a<sub>2</sub> 对实验所用的细菌的最低抑制摩尔浓度都为 5.97 mmol/L; a<sub>3</sub> 和 a<sub>4</sub> 对实验所用的细菌的最低抑制摩尔浓度都为 5.58 mmol/L; b<sub>1</sub> 对实验所用的细菌的最低抑菌摩尔浓度都为 4.43 mmol/L; b<sub>2</sub> 对实验所用的细菌的最低抑菌摩尔浓度都为 4.12 mmol/L; b<sub>3</sub> 和 b<sub>4</sub> 对实验所用的细菌的最低抑菌摩尔浓度都为 3.93 mmol/L。对比 DMF 的抑菌试验结果可知, a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>3</sub> 和 a<sub>4</sub> 比 DMF 对实验所用的细菌的抑菌活性稍差, b<sub>1</sub> 和 b<sub>2</sub> 对实验所用的细菌的的抑菌活性与 DMF 相当,但是 b<sub>3</sub> 和 b<sub>4</sub> 对实验所用的细菌的的抑菌活性比 DMF 稍优。

## 2.3 皮肤过敏性结果

经过皮肤敏感性测试,由表 2 可得,所合成的一系列富马酸氨基酸酯类衍生物对皮肤无致敏性,而富马酸二甲酯在实验进行 5 min 后就出现了过敏现象,由此可以表明富马酸一侧的羧基与氨基酸酯发生了酰

胺化反应后,通过结构的改变,消除了富马酸类衍生物的致敏现象,所得到新的富马酸氨基酸酯类衍生物无致敏现象。

表 2 富马酸氨基酸酯类衍生物对皮肤过敏性的测试

Table 2 Skin allergy test results of fumaric acid amino acid

ester derivatives

	0 min	30 min	60 min	120 min	致敏率/%
a <sub>1</sub>	0	0	0	0	0
a <sub>2</sub>	0	0	0	0	0
a <sub>3</sub>	0	0	0	0	0
a <sub>4</sub>	0	0	0	0	0
b <sub>1</sub>	0	0	0	0	0
b <sub>2</sub>	0	0	0	0	0
b <sub>3</sub>	0	0	0	0	0
b <sub>4</sub>	0	0	0	0	0
DMF	0	4	6	5	100

注: (1) 皮肤过敏性反应评分标准: ①红斑: 无红斑, 0 分; 勉强可见, 1 分; 明显可见, 2 分; 中度到严重红斑, 3 分; 紫红色红斑并有焦痂形成, 4 分; ②水肿: 无水肿, 0 分; 勉强可见, 1 分; 可见(边缘高出周围皮肤), 2 分; 皮肤隆起约 1 mm, 轮廓清楚, 3 分; 皮肤隆起约 1 mm 以上且范围扩大, 4 分。最高总分为 8 分。

(2) 致敏率 = 出现症状 / 参加实验人数 × 100%。

## 2.4 富马酸氨基酸酯类衍生物的细胞存活率

### 实验研究

本论文还研究了富马酸氨基酸酯类 a<sub>2</sub>、a<sub>4</sub>、b<sub>1</sub>、b<sub>2</sub> 对正常肝细胞株 L02 和 a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>4</sub>、b<sub>1</sub> 对人体肝癌细胞株 HepG2 的细胞存活率实验。从图 2 可以看出,当药物的浓度都为 12.5 μg/mL 时, a<sub>2</sub> 对人体正常肝细胞(L02)的细胞存活率为 93.43%; a<sub>4</sub> 对人体正常肝细胞(L02)的细胞存活率为 94.31%; 当药物浓度为 200 μg/mL 时, a<sub>2</sub> 对人体正常肝细胞(L02)的细胞存活率为 76.76%; a<sub>4</sub> 对人体正常肝细胞(L02)的细胞存活率为 68.72%; 根据已有的文献报道<sup>[4]</sup>可得,在 0~200 μg/mL 的浓度范围内,除了浓度为 200 μg/mL 的 a<sub>4</sub> 的细胞存活率是 68.72% 而小于 75% 被归类为毒性 2 级(毒性不大)之外,其余的评分都为 1 级,均属无毒型。因此,虽随着 a<sub>2</sub>、a<sub>4</sub>、b<sub>1</sub> 和 b<sub>2</sub> 浓度的升高,正常肝细胞(L02)存活率依次有所减弱,但它们对正常肝细胞(L02)的毒害作用不大。同理,从图 3 的结果看出,不同浓度的 a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>、a<sub>4</sub> 和 b<sub>1</sub> 对人体肝癌细胞株 HepG2 的毒害作用非常微小,如浓度分别为 50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 和 400 μg/mL 是的

$a_2$ , 其对肝癌细胞的存活率分别为 93.77%、92.48%、92.81% 和 91.83%, 它们的存活率均大于 75%, 可评分为 1 级, 均属无毒型。在 0~400  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内,  $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_4$  和  $b_1$  均可评分为 1 级, 均属无毒型。因此, 通过细胞存活率实验可知合成的富马酸氨基酸酯类衍生物对细胞的毒性作用相对较小。

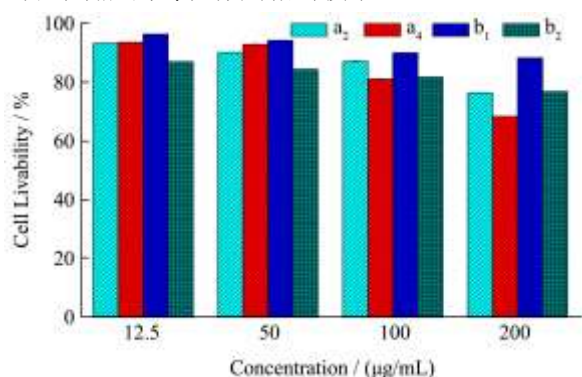


图2  $a_2$ 、 $a_4$ 、 $b_1$ 、 $b_2$  对肝细胞株 L02 细胞存活率

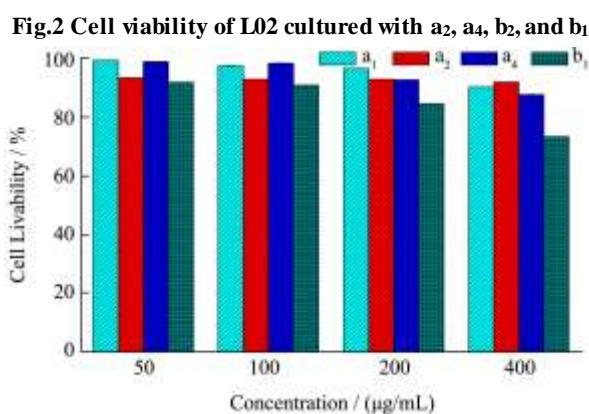


图3  $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_4$ 、 $b_1$  对人体肝癌细胞 HepG2 细胞存活率

Fig.3 Cell viability of HepG2 cultured with  $a_2$ ,  $a_1$ ,  $b_2$ , and  $b_4$

### 3 结论

3.1 本文以氨基酸酯和马来酸酐为原料合成了一系列的富马酸氨基酸酯类衍生物, 本文的合成方法不仅改善了传统方法对设备腐蚀和三废处理等方面的缺点, 而且还大大提高了产率<sup>[7]</sup>。此外, 还建立了合成产物的纯化方法, 并通过熔点测定和核磁共振光谱等对合成产物进行了结构鉴定。

3.2 通过最低抑制浓度实验结果发现合成的富马酸氨基酸酯类衍生物均有效地抑制各种实验所用细菌生长; 另外经初步的皮肤过敏试验测试, 发现其对人体皮肤无致敏性; 最后还发现富马酸氨基酸酯类衍生物对人体正常肝细胞株 L02 和肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性作用较小。本研究成果将为富马酸氨基酸酯类衍生物的广泛应用提供了良好的理论依据与数据支撑。

### 参考文献

- [1] Islam N M. Inhibition of mold in bread by dimethyl fumarate [J]. Food Science, 1982, 47: 1710-1712
- [2] LU Yang, ZHU Yan. Combination of accelerated solvent extraction and vortex-assisted liquid-liquid microextraction for the determination of dimethyl fumarate in textiles and leathers by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Talanta, 2014, 119: 430-434
- [3] Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama, Atsuko M, et al. Determination of dimethyl fumarate and other fumaric and maleic acid diesters in desiccants and consumer products in Japan [J]. Journal of Health Science, 2011, 57(3): 236-244
- [4] 宁正祥, 谭龙飞, 张德聪, 等.  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羧基化合物的分子结构特性与抗菌活性间的关系[J]. 应用化学, 1996, 13(1): 38-42
- [5] NING Zheng-xiang, TAN Long-fei, ZHANG De-cong, et al. Correlation between molecular structure and antibacterial activity of ethylenedicarboxylic acids and esters [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 1996, 13(1): 38-24
- [6] 杨恒. 富马酸丙二醇甲酯的酶法合成及性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012
- [7] YANG Heng. Lipase-catalyzed synthesis and characterization research of propylene glycol methyl fumarate [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [8] 韩秋敏, 李登超.  $\beta$ -氨基酸乙酯盐酸盐的合成与表征[J]. 广州化工, 2011, 39(20): 37-38
- [9] HAN Qing-min, LI Deng-chao. Synthesis and characterization of  $\beta$ -amino acid ethyl ester hydrochlorides [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2011, 39(20): 37-38
- [10] LI Jia-bo, SHA Yao-wu. Convenient synthesis of amino acid methyl esters [J]. Molecules, 2008, 13: 1111-1119.
- [11] 刘倩. 富马酸酯的合成及抗菌特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011
- [12] LIU Qian. The synthesis of fumaric acid esters and study of antibacterial properties [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [13] N S Al-Zoreky. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum*L.) fruit peels [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 134: 244-248
- [14] Abel Guarda, Javiera F Rubilar, Joseph Miltz. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146: 144-150
- [15] Dalip Kumar, N Maruthi Kumar, CHANG Kuei-hua, et al.

- Synthesis and anticancer activity of 5-(3-indolyl)-1, 3, 4-thiadiazoles [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 45: 4664-4668
- [12] LU Qun, JIANG Ming-hua, JIANG Jian-guo, et al. Isolation and identification of compounds from penthonum chinense pursh with antioxidant and antihepatocarcinoma properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 11097-11103
- [13] ZHU Qin-qin, JIANG Yue-ming, LIN Sen, et al. Structural identification of (1→6)- $\alpha$ -D-Glucan, a key responsible for the health benefits of longan, and evaluation of anticancer activity [J]. Biomacromolecules, 2013, 14(6):1999-2003
- [14] 吴海燕.MTT法评价羧甲基葡甘露聚糖的体外细胞毒性[J]. 食品科技,2008,7:172-174
- WU Hai-yan. Study on cytotoxicity of carboxymethyl glucomannan to L929 mouse fibroblasts in vitro [J]. Food Science, 2008, 7: 172-174

现代食品科技