

天然产物异紫堇二酮的半合成转化研究

张天才^{1,2}, 叶鹤琳², 柳军玺^{2*}, 邸多隆^{1,2*}

(1. 甘肃中医学院药理学系, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室, 甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 通过紫外分光光度法, 以异紫堇二酮的半合成转化产率为指标, 详细考察反应时间、反应温度和投料比 (异紫堇碱: 弗瑞米自由基) 对转化产率的影响, 确定异紫堇二酮的最佳合成条件: pH 值为 10 的磷酸氢二钠溶液为反应介质、反应温度 25 °C、投料比 (异紫堇碱: 弗瑞米自由基) = 1 : 2, 反应时间 12 h, 通过氧化异紫堇碱可以半合成转化制备异紫堇二酮, 产率可达到 50.0%, 并首次通过 X-ray 单晶衍射测定异紫堇二酮的化学结构。

关键词: 异紫堇二酮; 异紫堇碱; 半合成转化; 弗瑞米自由基

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1471-05

Study on semi-synthetic transforming technology for the natural product of isocorydione

ZHANG Tian-cai^{1,2}, YE He-lin², LIU Jun-xi^{2*}, DI Duo-long^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Transforming technology for semi-synthesized isocorydione from the natural product of isocorydine was studied. The factors affecting on the reaction yield were investigated. UV spectrophotometry was used to indicate the semi-synthesized yield of isocorydione. The optimum reaction conditions were determined as following: reacting for 12 h in the solution of sodium dihydrogen phosphate at pH 10, the temperature was 25 °C and the ratio of isocorydine to Fremy's radical was 1 : 2. Under the optimum conditions, the yield could reach up to 50.0%. The molecular structure of isocorydione was elucidated by X-ray single-crystal diffraction analysis for the first time.

Key words: isocorydione; isocorydine; semi-synthetic transforming; Fremy's radical

异紫堇二酮 (isocorydione, **1**) 为从罂粟科秃疮花属植物秃疮花 (*Dicranostigma leptopodum* (Maxim) Fedde) 中分离得到的一种阿普菲类生物碱, 文献资料^[1-5]及本研究室的前期生物活性筛选均表明该化合物具有较好的抗癌活性。在对秃疮花化学成分及

抗癌活性成分的筛选研究中, 发现该植物中含有大量的异紫堇碱 (**2**), 但化合物异紫堇二酮的含量特别低^[6, 7], 为进一步研究化合物异紫堇二酮的体内、外抗癌活性及作用机制, 有必要通过化学手段直接全合成异紫堇二酮, 但该类化合物的合成步骤比较复杂。鉴于异紫堇二酮与异紫堇碱同属阿普菲类生物碱, 具有相同结构的母核, 并且存在于同一植物中, 从生源合成途径考虑, 用异紫堇碱半合成转化为异紫堇二酮 (图 1) 具有一定的可行性。从化学结构分析, 两个化合物的差别在于异紫堇碱的 C-11 位为羟基取代,

收稿日期: 2011-09-20.

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目资助 (090NKCA127).

*通讯作者 Tel: 86-931-4968249, Fax: 86-931-8277088,

E-mail: liujx@licp.cas.cn

Tel: 86-931-4968248, Fax: 86-931-8277088,

E-mail: didl@licp.cas.cn

异紫堇二酮的 C-11 位为羰基取代, 且 C-11 位的对位 (C-8) 位也被羰基取代, 故可以通过氧化剂氧化 C-11 位羟基形成对醌结构达到合成转化的目的。

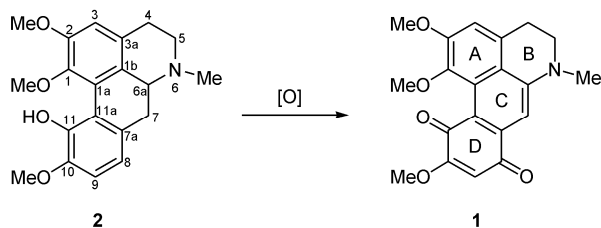


Figure 1 Oxidation of isocorydines by using Fremy's radical to generate isocorydione

Hans 用弗瑞米自由基 (Fremy's radical) 成功的将酚类化合物氧化成醌类化合物, 此为酚羟基氧化为对醌结构的典型合成反应。2000 年, Chia Yi-chen^[8] 在研究毛茛菪木与多脉毛茛菪木化学成分及异喹啉类生物碱抗血小板凝集作用时成功的运用弗瑞米自由基氧化 fissoldin 半合成制备出对醌类生物碱 norfissilandione, 并初步研究了对醌类生物碱的抗血小板凝集活性与细胞毒性。本研究利用弗瑞米自由基可以将酚羟基氧化转化为酮羰基的特点, 将其应用于化合物异紫堇碱的结构修饰, 成功的合成了异紫堇二酮, 通过 X-ray 单晶衍射技术鉴定了该化合物结构; 通过对工艺过程的研究, 确定了最佳合成工艺条件, 为制备异紫堇二酮及进行体内、外抗癌活性的研究奠定基础。

结果与讨论

1 反应条件对产率的影响

1.1 温度对产率的影响 投料比 (异紫堇碱 : 弗瑞米自由基) = 1 : 2, 反应时间为 12 h, 考察温度对氧化反应的影响, 结果见表 1。

由于弗瑞米自由基是一种相当不稳定的化合物, 在通常条件下能自发的发生分解反应, 甚至会发生剧烈的爆炸反应, 从而失去其氧化剂的化学特性, 但是在过低温度的条件下, 又会降低它的氧化性能。结合表 1 结果可知随着温度升高, 异紫堇二酮的转化产率增加, 但超过室温时, 产率急剧下降, 故选择 25 °C

(室温) 为最佳反应温度。

1.2 时间对产率的影响 投料比 (异紫堇碱 : 弗瑞米自由基) = 1 : 2, 反应温度为 25 °C (室温), 考察反应时间对该氧化反应的影响, 结果见表 1。

弗瑞米自由基的氧化性中等, 在氧化酚类到醌类的反应过程中, 需要较长的时间来达到反应平衡, 由表 1 可知, 随着反应时间的增长, 异紫堇二酮的转化产率提高, 在 12 h 到达平衡, 之后延长对产率几乎没有影响, 故最佳反应时间为 12 h。

1.3 投料比对产率的影响 反应时间为 12 h, 反应温度为 25 °C (室温), 考察投料比 (异紫堇碱 : 弗瑞米自由基) 对氧化反应的影响, 结果见表 1。

在酚类氧化成醌类的过程中, 弗瑞米自由基会自发的与酚羟基上的氢原子结合, 从而形成一个酮基, 理论上, 整个转化过程中, 弗瑞米自由基与酚羟基的量应该是等摩尔的, 但在反应介质中, 可能有一定的自由基灭活。结合表 1 结果可知投料比 (异紫堇碱 : 弗瑞米自由基) = 1 : 2 时, 反应收率最高。

2 异紫堇二酮的波谱数据

紫黑色针状结晶 (甲醇), mp 198~200 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (Log ϵ): 225 (3.55), 281 (2.78), 328 (3.01), 528 nm (1.01); IR (KBr) ν_{\max} : 2 922, 1 640, 1 603, 1 564, 1 511, 1 087, 1 031, 816 cm^{-1} ; HR-ESI-MS m/z 354.133 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ 为 354.133 6); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.95 (1H, s, H-7), 6.93 (1H, s, H-3), 5.90 (1H, s, H-9), 3.97 (3H, s, 1-OCH₃), 3.94 (3H, s, 10-OCH₃), 3.87 (3H, s, 2-OCH₃), 3.47 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-5), 3.17 (3H, s, N-CH₃), 3.13 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 143.8 (C-1), 126.9 (C-1a), 119.3 (C-1b), 152.1 (C-2), 112.7 (C-3), 128.3 (C-3a), 29.2 (C-4), 50.2 (C-5), 150.3 (C-6a), 98.2 (C-7), 136.4 (C-7a), 186.5 (C-8), 105.1 (C-9), 163.8 (C-10), 178.3 (C-11), 117.9 (C-11a), 126.8 (C-11b), 60.7 (1-OCH₃), 56.4 (2-OCH₃), 56.3 (10-OCH₃), 40.1 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献^[9, 10]报道一致, 故该化合物鉴定为异紫堇二酮。

3 异紫堇二酮的 X-ray 单晶衍射数据

晶胞参数: $a = 7.412$ (2), $b = 17.678$ (5), $c = 13.253$ (3), $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 107.956$ (13)°, $\gamma = 90^\circ$, 晶胞体积 $V = 1652.0$ (7) Å^3 , 空间群 P2 (1)/c, 单斜晶系, 晶

Table 1 Effects of temperature, reacting time and raw material ratio on yield

Project	Temperature/°C					Time/h						Molar ratio (isocorydine: Fremy's radical)					
	0	10	25	40	60	6	8	10	12	13	14	1:1	1:1.5	1:2	1:3	1:6	
Yield/%	42.3	46.2	49.9	31.7	30.0	36.3	40.6	42.5	50.0	50.7	49.5	24.3	41.6	49.6	36.9	34.6	

胞内分子数 $Z = 4$, 分子式 $C_{20}H_{19}NO_5$, 相对分子质量为 353.36, 分子密度 $D_x = 1.421 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。平均标准误差 $R_1 = 0.0468$ (1966), $wR_2 = 0.0958$ (2891), 相关系数 $S = 1.305$ 。化合物 **1** 的晶体数据存储于剑桥晶体数据中心 (No. CCDC-847703), 通过网站: https://www.ccdc.cam.ac.uk/services/structure_deposit 可免费获取化合物 **1** 的晶体数据。晶体结构见图 2。

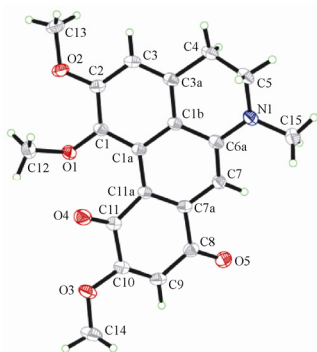


Figure 2 X-ray crystal structure of isocorydione

4 讨论

天然化合物种类繁多, 具有化学结构多样性、新颖性, 且许多具有特殊的生物活性, 是找寻新药的最佳途径。许多天然化合物具有较强的生物活性, 但植物体内的含量极低, 如紫杉醇^[11], 研究药物半合成转化的有效方法成为新药开发的重要途径。异紫堇二酮是从秃疮花中分离得到的一种阿普菲类生物碱, 在查阅文献资料及对秃疮花有效成分活性的初步研究中发现, 异紫堇二酮具有良好的药理活性。但鉴于异紫堇二酮在植物体内含量低且提取工艺繁琐, 无法对其体内、外活性做进一步的研究, 寻找一种半合成转化异紫堇二酮的方法具有一定的价值。

酚类化合物是存在于自然界中极不稳定的一类化合物, 在空气中放置即被氧化, 但自然氧化产物结构复杂。常见的氧化剂如高锰酸钾、重铬酸钾等强氧化剂在酸性介质中能轻易的将酚氧化成醌。但在有机合成中, 氧化性过强的氧化剂所参与的氧化反应往往有过多的副产物从而失去其价值, 而选择具有选择性的氧化剂便成为该类反应的关键。

在异紫堇碱氧化成异紫堇二酮的反应中, 可供选择的氧化剂种类繁多, 在强氧化剂如高锰酸钾的存在下, 异紫堇碱的母核结构容易被破坏, 发生开环降解反应, 致使反产物比较复杂。而氧化性较弱的氧化剂则不能顺利的将 C-11 位的羟基氧化成羰基而

达不到预期目标。弗瑞米自由基是一种有机合成中常见的选择性氧化剂, 尤其是在酚类到邻、对位醌类、苯胺到醌类的氧化反应中表现出绝对的优越性。弗瑞米自由基在氧化反应中所需条件温和, 反应程度适中, 能针对性的将酚羟基氧化成酮基而不与其他基团发生反应, 故在异紫堇碱氧化成异紫堇二酮的反应中选择弗瑞米自由基为氧化剂。

在溶液中, 弗瑞米自由基的化学结构见图 3 中化合物 **8**, 而在固态条件下, 弗瑞米自由基存在两种晶型, 一种是单分子三斜晶体, 颜色呈桔黄色, 另外一种二聚单斜晶体, 颜色呈黄褐色。作者认为该反应机制可能为自由基参与的氧化还原级联反应, 反应过程中 **2** 中酚羟基活泼氢与 **8** 自由基结合, 发生电子转移, 形成苯氧自由基 **4**, **4** 再与 **8** 作用生成中间体化合物 **5**, 化合物 **5** 脱氢, 失去 $-\text{HN}(\text{SO}_3\text{K})_2$ 形成对苯醌结构的化合物 **6**, 化合物 **6** 中 C-7 位的活泼苄基氢或超共轭的烯丙氢比较活泼, 与自由基发生反应, 分子内脱氢形成超共轭的对苯醌结构化合物 **1** (反应机制图解如图 3)。

在寻找异紫堇二酮半合成转化最佳工艺条件的试验中, 考察了氧化剂用量、反应温度等, 确定最佳工艺后发现转化产率偏低。通常情况下, 自由基氧化苯酚的化学反应中, 存在对醌和邻位醌的反应产物, 但异紫堇碱中 C-10 位甲氧基的存在, 理论上化合物异紫堇碱只有对位醌的单一反应产物^[12], 应该有比较高的收率。分析异紫堇二酮和异紫堇碱的结构发现, 化合物异紫堇碱的 D 环中 C-11 位-OH 转化为对醌结构片段的过程中, 并不是单纯的苯酚氧化成对苯醌的反应过程, 同时发生 C-6a 和 C-7 位之间的脱氢反应, 同时也有可能是在氧化剂的存在下, 发生氮原子上的脱甲基反应和 C-4、5 位的氧化或脱氢反应等副反应, 致使该反应的产率较低。寻找高选择性氧化剂及提高反应收率仍然是本反应的重要目标, 有待进一步的研究。

5 小结

秃疮花化学成分及药理活性研究中发现该植物含有微量且具有良好活性的异紫堇二酮, 借鉴天然产物生源性转化以及结构修饰的启发, 寻找一条由异紫堇碱半合成异紫堇二酮的合成方法具有重要的意义。本研究利用弗瑞米自由基成功的将异紫堇碱半合成转化得到异紫堇二酮, 为进一步研究异紫堇二酮体内、外生物活性奠定了基础。

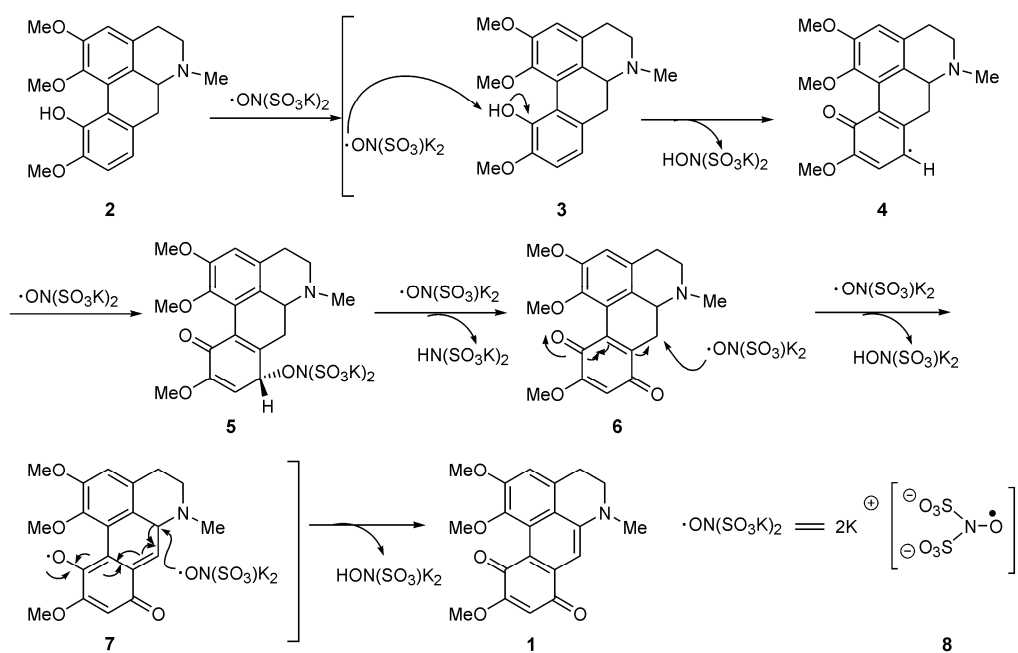


Figure 3 Oxidation mechanism of Fremy's radical

实验部分

仪器与材料

X-4 数字显微熔点测定仪; T-6 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), Varian Inova-400 MHz 核磁共振仪, 溶剂为 CDCl_3 ; Bruker APEX II 高分辨质谱仪; Nicolet NEXUS 670 FT-IR 型红外光谱仪, KBr 压片; Bruker D8 SMART APEX II 单晶衍射仪。

薄层色谱硅胶 (青岛谱科分离材料有限公司); 异紫堇碱由本实验室从秃疮花植物全草中分离得到, 经 IR、NMR、MS、X-ray 鉴定, HPLC 纯度为 98.0%。

1 弗瑞米自由基 (亚硝基过硫酸钾) 的制备

亚硝酸钠 ($5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 mL) 置于冰浴中, 加约 200 g 碎冰, 搅拌至完全溶解, 逐滴加入新配的亚硫酸氢钠 (100 mL, 35% w/v), 之后加冰醋酸 20 mL, 2~3 min 颜色变暗后, 再加氨水 25 mL, 将此溶液置于冰浴中, 将 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KMnO_4 溶液 400 mL 逐滴加入, 搅拌至颜色变为深棕色 (1 h 内完成), 滤去 MnO_2 沉淀, 取滤液 10~15 mL, 加入等体积的饱和 KCl 溶液, 得到少量弗瑞米自由基 (备用)。滤液一直搅拌, 同时滴加饱和 KCl 溶液 250 mL (45 min 内完成)。前面制得的少量弗瑞米自由基间隔加入, 直到有固体出现, 在冰浴中持续搅拌 45 min, 直到沉淀完全。收集桔色沉淀, 抽滤至近干时, 用含氨水的饱和氯化钾溶液 (5%, v/v, 氨水) 洗涤, 然后用含氨水的甲醇 (5%, v/v, 氨水) 洗涤两次, 最后用丙酮洗涤,

抽滤至无液体残留。固体放在表面皿上干燥 10~15 min, 完全干燥后将桔色晶体放在 CaO 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 的干燥器中保存待用。

2 异紫堇二酮的半合成转化

适量磷酸氢二钠置于圆底烧瓶中, 加入一定量蒸馏水, 搅拌至完全溶解后加入适量弗瑞米自由基, 混合均匀, 溶液呈紫色, 在此溶液中加入一定量的化合物异紫堇碱, 室温下磁力搅拌一定时间, 混合液用氯仿萃取 (20 mL×3), 萃取液干燥, 减压蒸馏回收溶剂, 残留物以石油醚 (60~90 °C)/丙酮 (3:1) 为流动相进行快速硅胶柱纯化, 得紫黑色化合物。MS、NMR 鉴定为异紫堇二酮, 紫外分光光度法测定化合物异紫堇二酮的合成产率。

3 合成转化产率检测方法的建立

3.1 最大特征吸收波长的确定 精密称取 0.40 mg 化合物异紫堇二酮溶于 1.0 mL 甲醇溶液中, 定容至 10 mL, 紫外分光光度法进行 100~900 nm 的全波长扫描, 可见光区吸收峰明显易辨, 与原料异紫堇碱没有相同的可见吸收, 便于化合物异紫堇二酮的含量测定, 故选择最大吸收波长 558 nm 为异紫堇二酮的特征吸收波长。

3.2 紫外分光光度法标准曲线的建立 精密称取 5.00 mg 异紫堇二酮, 用甲醇定容于 50 mL 容量瓶中, 分别取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 稀释至 10.0 mL, 558 nm 波长下测吸收度, 以化合物异紫堇二酮的

浓度为横坐标 (X), 吸收度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 11.125 X + 0.045 8$, $r = 0.998 5$; 线性范围: 目标化合物在 $0.02 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内具有良好的线性关系; 最低检测限为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 合成转化产率测定 步骤 2 中的反应产物, 定溶于 50 mL 容量瓶中, 精密量取 0.50 mL 稀释至 10.0 mL , 在 558 nm 波长下测吸收度, 依回归方程计算转化反应所得异紫堇二酮的含量, 通过化合物异紫堇二酮的实际产量和理论产量计算该化合物的转化产率。

References

- [1] Chen IS, Chen JJ, Tsai IL, et al. New *p*-quinonoid aporphine alkaloids and antiplatelet aggregation constituents of *Hernandia sonora* [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 537–539.
- [2] Lee SS, Chen CK, Chen IS, et al. Chemical constituents from *Dehaasia triandra*. 1. Three new alkaloids, isocorydione, norisocorydione, and dehatriline, from the leaves [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 55–58.
- [3] Chen JJ, Ishikawa T, Duh CY, et al. New dimeric aporphine alkaloids and cytotoxic constituents of *Hernandia nymphaeifolia* [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 528–533.
- [4] Wu YR, Zhao YX, Liu YQ, et al. Alkaloids from *Dactylicapnos scandens* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 622–626.
- [5] Zhao Q, Wang TP, Sun GL, et al. The research progress of component analysis pharmacological effects about *Dicranostigma leptopodum* (Maxim) Fedd's alkaloid [J]. *J Longdong Univ* (陇东学院学报), 2010, 21: 53–57.
- [6] Dang Y, Gong HF, Liu JX, et al. Alkaloid from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim) Fedde [J]. *Chin Chem Lett*, 2009, 20: 1218–1220.
- [7] Liu DH, Zhang TC, Liu JX, et al. Chemical constituents of alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 1505–1508.
- [8] Chia YC. Studies on the Chemical Constituents of *Fissistigma oldhamii* and *F. balansae* and the Antiplatelet Aggregation Activity of Isoquinoline Alkaloids [D]. Taiwan: Kaohsiung Medical University, 2000: 175–177.
- [9] Chang CC, Lien YC, Liu KC, et al. Lignans from *Phyllanthus urinaria* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63: 825–833.
- [10] Lee SS, Chen CK, Chen CH. Chemical constituents from *Dehaasia triandra*. II. Five new alkaloids, secocanthopline, dehydroisocorydione, 11, 8'-*O*-bisisocorydine, (8, 8'-*R*)- and (8, 8'-*S*)-bisisocorydine, isolated from the leaves [J]. *Tetrahedron*, 1996, 52: 6561–6568.
- [11] Deng CH, Mei XG, Yu GA. Modified taxol structure-activity relationships [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11: 72–80.
- [12] Xing QY, Pei WW, Xu RQ, et al. Basic organic chemistry (基础有机化学) [M]. 3 Ed. Beijing: Higher Education Press, 2005: 159–163.