

青蒿素生物合成的研究

II. 前体 $[15-^2\text{H}]$ -和 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸的化学合成

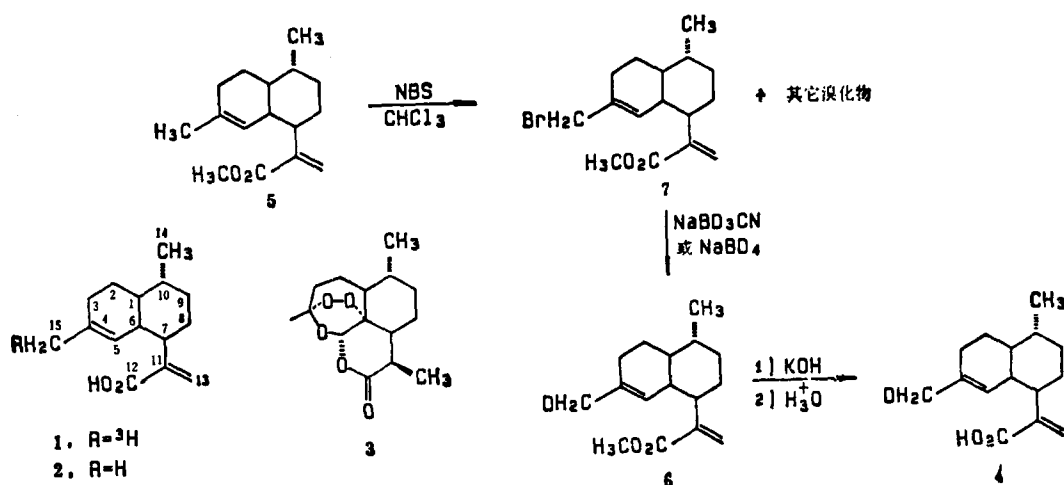
夏志强 黄敬坚 汪猷*

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海, 200032)

青蒿酸甲酯(5)用 NBS 溴化产生的溴化物, 经 NaBD_3CN 或 NaBD_4 氘解, 生成 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸甲酯(6), 其结构由 MS, ^1H , ^2H 和 ^{13}C 的 NMR 确定. (6)经水解生成 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸(4), 用同样方法以 NaB^3H_4 为氘代试剂与溴化物反应, 合成了 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸(1).

前文^[1]应用 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸(1), 证明青蒿匀浆能以青蒿酸(2)^[2]为前体, 生物合成青蒿素(3). 本文报道 $[15-^1\text{H}]$ -和 $[15-^3\text{H}]$ -青蒿酸(4 和 1)的化学合成. 我们先进行 2 的 4-OH₃ 氘标记, 然后用同样的方法制备氘标记的 1.

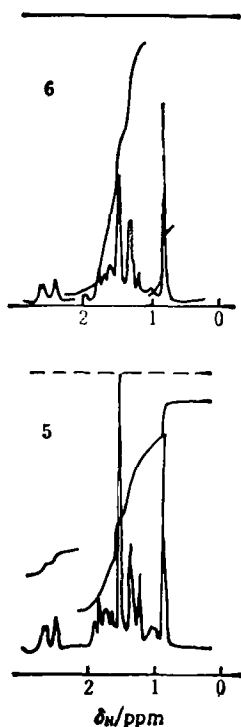
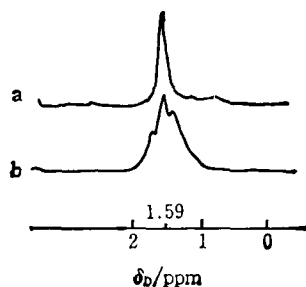
NBS 是较常用的烯丙基溴化试剂^[3], 我们用青蒿酸甲酯(5)^[4]与 NBS 反应, 产物经 TLC 检定显示多条色带. 从第一条色带分离出的产物再经 HPLC 分离, 得 I 和 II 两个峰. 峰 I 经 MS 测试 m/z 为 244, 不含溴, 可能为脱溴产物, 因此, 以后未进一步处理. 峰 II 为无色油状物, 经与 AgNO_3 反应检定^[5], 表明其含溴, 其 MS 的分子离子峰是 326 和 328, 为典型的一元溴化物的分子离子峰. 其 ^1H NMR 谱由于溴的取代使 $\alpha\text{-H}$ 的化学位移移向低场, 而出现 δ 3.25 和 3.90 ppm 两个新的质子峰, 表明可能存在两个溴化合物(证明见后). 此含溴产物因不稳定, 未加进一步分离, 即用 NaBD_3CN 氘解^[6]. 氘解产物用 TLC 分离后, 再用 HPLC 纯化. 得无色油状物.



由高分辨质谱确定其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{DO}_2$. MS 谱有 249 强峰, 为氘代青蒿酸甲酯(6)的分子离子峰, 其碎片峰也比 5 的相当碎片的质量数多 1. 其 ^1H NMR 谱与 5 的相比大部分相

1990 年 11 月 29 日收到. 第 I 报见 *Acta Chimica Sinica (English Edition)*, 1988, 386.

似, 只是 δ 1.60 ppm 的 4-CH_3 峰明显降低(图 1). 其 ^1H NMR 全去偶谱只出现 δ 1.59 ppm 一个峰, 表明分子内仅有一处被氘标记, 且在 4-CH_3 上, 而未去偶的谱图则为三重峰, 表明一个氘和两个孪位氢在同一 C 原子上(图 2). 这也与 4-CH_3 上被氘代相符合, 故可推定氘解产物为 **6**. 在 ^{13}C NMR 中, C 上 H 被 D 取代后, 其峰的强度减弱, 且发生 D-C 裂分, **6** 的 ^{13}C NMR 和 **5** 的相似, 只是 15-C 峰 (23.72 ppm) 明显降低, 且增加一个化学位移向高场移动 0.20 ppm 的三重峰. 根据 NMR 裂分规律^[7], D 的 I 为 1, 三重峰的 C 表明它只与一个 D 原子连接, 这结果也证实了只一个氘原子标记在 15-C 上. **6** 经水解得 **4**. 由于 D 连接在 15-C 上, 因此二个溴化物中, 其一应为 15- 溴代青蒿酸甲酯(**7**), 另一溴化物的溴则可能在 3-C 位. 后者及 **5** 与 NBS 反应可能产生的其他产物, 因非主要产物, 未进一步分离纯化和测定其结构.

图 1 **5** 和 **6** 的 ^1H NMR图 2 **6** 的 ^2H NMR

a—全去偶; b—未去偶

以 DMSO 作溶剂, 用氘代试剂 NaBD_4 代替 NaBD_3CN , 氘解溴化物, 产物经 TLC 和 ^1H NMR 鉴定, 也得到 **6**.

完成了青蒿酸的氘标记以后, 用同样的方法, 但以 NaB^3H_4 为氘代试剂, 由 **5** 得到 **1**.

实 验

熔点用 Kofler 熔点仪测定. 温度计未校正. 比旋度用 Perkin-Elmer 旋光仪测定. NMR 用 Varian XL-200 型仪测定, CDCl_3 作溶剂, TMS 为内标. MS 用 Finnigan 4021 型仪和 Finnigan MAT 8430 型仪测定. HPLC 用 Waters 246 型液相层析仪, 配 UV 441 型检测器, 检测 214 nm 吸收, 纸速 0.5 cm/min; 鉴定柱 Radial Pak C_{18} 8 mm \times 10 cm; 制备柱 $\mu\text{-Bondpak C}_{18}$ 7.8 mm \times 30 cm. 液体闪烁计数器为 Beckman LS 9800; 闪烁液, 0.6% 2-(4-

叔丁基苯)-5-(4-双苯基)-1, 3, 4-噁唑的甲苯溶液。TLC用自制硅胶板, 用青岛海洋化工厂产硅胶 HF₂₅₄, 25 g加0.4%羧甲基纤维素钠水溶液70 mL铺制, 室温阴干后, 110°C活化1 h。层析板可直接在紫外灯下观察色带或用3% 香兰素显色^[8]。NaBD₈CN为Aldrich公司产品, NaBD₄为Merck公司产品, NaB³H₄为New England Nuclear公司产品。

5 的溴化产物 300 mg **5**^[4]溶于10 mL氯仿, 加300 mg NBS, 加热回流数分钟。反应完后, 减压蒸去氯仿, 加少量乙醚, 经少量硅胶过滤, 蒸去溶剂。残余物用TLC分离, 8:2石油醚-苯展开, 紫外灯下观察有数条色带。挖下第一色带(*R_f* 0.40), 用CH₂Cl₂洗脱。蒸去溶剂, 得250 mg无色油状物。TLC显示一点, HPLC有两峰(I和II)。用制备柱分离, 流动相, 83:17 甲醇-水(v/v), 流速2 mL/min。进样量, 每次40 μL(含样品2 mg)。保留时间; 峰I 15'0", 峰II 19'12"。分别收集峰I和峰II。蒸去峰II的溶剂, 得200 mg油状物。此油状物与硝酸银反应^[5], 产生淡黄色溴化银沉淀, 不溶于硝酸, 证明为含溴化合物。δ_H: 0.90(3H, d, *J* = 6 Hz, 14-H), 1.58(s, 15-H), 3.25[s, 15-H(-Br)], 3.90[br, 3-H(-Br)] ppm. *m/z*: 328, 326[M]⁺, 297, 295[M-OCH₃]⁺, 269, 267[M-CO₂CH₃]⁺, 247[M-Br]⁺, 246[M-HBr]⁺。

蒸去峰I的溶剂, 得40 mg油状物, 不含溴。λ_{max}(EtOH): 266(log ε 2.95), 274(2.93) nm. δ_H: 1.24(3H, d, *J* = 8 Hz, 14-H), 2.23(3H, s, 15-H), 3.78(3H, s, CO₂CH₃), 5.01(1H, s, 5-H), 6.27, 6.76(2H, br, 13-H), 6.96, 7.07(2H, d×d, 2, 3-H) ppm. FD-MS *m/z*: 244(M⁺). *m/z*: 244[M⁺], 229[M-CH₃]⁺, 213[M-OCH₃]⁺, 185[M-CO₂CH₃]⁺。

6 200 mg上述峰II油状物用5 mL HMPA溶解, 再加120 mg NaBO₃CN搅拌4 h, 温度30°C, 加40 mL环己烷提取。提取液用少量水洗, 无水Na₂SO₄干燥。蒸去溶剂, 残留物经TLC分离。展开剂8:2石油醚-苯, 展开两次(*R_f*: 0.70)。挖下第一色带, 用CH₂Cl₂洗脱。洗脱液蒸干, 得**6**的粗产物。用HPLC制备柱提纯(条件与上述相同), 得40 mg **6**(总产率13%)。C₁₆H₂₃O₂D(M⁺, 249.1849, 计算值: 249.1839), *m/z*: 249(M⁺), 218([M-OCH₃]⁺), 190([M-CO₂CH₃]⁺), δ_H: 0.90(3H, d, *J* = 6 Hz, 14-H), 1.60(2H, s, 15-H), 3.75(3H, s, CO₂CH₃), 5.00(1H, s, 5-H), 5.44, 6.28(2H, br, 13-H) ppm. δ_D: 1.59(t, 15-D) ppm. δ_C: 19.86(q, 14-C), 23.52(t, 15-C), 23.72(q, 15-C), 51.83(q, COOCH₃), 120.40(d, 5-C), 124.16(t, 13-C), 134.02(s, 4-C), 143.34(s, 11-C), 167.84(s, 12-C) ppm。

4 40 mg **6**用KOH的甲醇-水溶液水解, 得35 mg **4**[参考11*R*(-)-双氢青蒿酸甲酯的水解]^[9]。用石油醚重结晶, m. p. 126—129°C, [α]_D²⁰ 31.1° (c, 0.01, CHCl₃), [2_D²⁰]的 m. p. 130°C, [α]_D^{28.5} 31.3° (c, 0.0093, CHCl₃)。δ_H: 0.92(3H, d, *J* = 6 Hz, 14-H), 1.60(2H, s, 15-H), 5.00(1H, s, 5-H), 5.58, 6.47(2H, br, 13-H) ppm. δ_D(全去偶): 1.60(15-D) ppm。

1 40 mg溴化产物峰II油状物(参见上文)加入2 mL HMPA中, 再加2 mg NaB³H₄[13.5×10⁷Bq(5mCi)], 30°C搅拌4 h。用15×3 mL环己烷提取, 提取液经水洗, 无水Na₂SO₄干燥, 蒸去溶剂, 残留物用TLC分离。展开剂8:2石油醚-苯, 展开两次。挖下[15-³H]-青蒿酸甲酯色带, 用CH₂Cl₂洗脱, 蒸去洗脱液。残留物加1 mL甲醇和0.5 mL的50% KOH溶液, 加热回流2 h, 冷却, 加5 mL CH₂Cl₂, 稀盐酸酸化至pH值为2。分出CH₂Cl₂层。水层再用5×2 mL CH₂Cl₂提取。合并CH₂Cl₂溶液, 用少量水洗, 经无水Na₂SO₄干燥, 加10 mg非标记的天然青蒿酸, 蒸去溶剂, 残留物用硅胶TLC分离, 展开剂6:4石油醚-乙醚。挖下**1**的色带(*R_f* 0.52), CH₂Cl₂洗脱, 蒸去溶剂, 得13 mg **1**。将它溶于25 mL丙酮溶液中, 取10 μL溶入闪烁液中, 用液体闪烁计数器测量, 为317, 000 cpm, [15-³H]-青蒿酸放射总量为8×10⁸

$\text{cpm} = 1.3 \times 10^9 \text{ dpm}$, 放射比强, 10^8 dpm/mg . 放射产率为 12%.

致谢: 周凤仪副教授, 王执中副教授, 吴莲芬和严亦君等同志对本工作给予热情支持和帮助, 特此致谢.

参 考 文 献

- [1] Wang, Y.; Xia, Z. Q.; Zhou, F. Y.; Wu, Y. L.; Huang, J. J.; Wang, Z. Z., *Acta Chim. Sin. (English Edition)*, **1988**, 386.
- [2] 邓定安, 朱大元, 高耀良, 戴金绶, 徐任生, 科学通报, **1981**, 19, 1209.
- [3] Ziegler, K.; Spaeth, A.; Schaaf, E.; Schumann, W.; Winkelmann, F., *Liebigs Ann Chem.*, **1942**, 551, 80.
- [4] 吴照华, 王燕燕, 化学学报, **1984**, 42, 596.
- [5] 大连工学院有机化学教研室, “有机化学实验”, 人民教育出版社, 北京, **1979**, 第 96 页.
- [6] Hutchins, R. O.; Maryanoff, B. E.; Milewski, O. A., *Chem. Commun.*, **1971**, 1097.
- [7] Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C., “*Spectrometric Identification of Organic Compounds*”, 4th Edn., John Wiley & Sons New York, **1981**, p. 192.
- [8] 田井樱, 魏振兴, 吴照华, 中草药, **1982**, 13, 249.
- [9] 黄敬坚, 夏志强, 吴莲芬, 化学学报, **1987**, 45, 609.

Studies on the Biosynthesis of Arteannuin

II. The Chemical Synthesis of the Precursors $[15\text{-}^2\text{H}]$ -and $[15\text{-}^3\text{H}]$ -Arteannuic Acid

Xia, Zhi-Qiang Huang, Jing-Jian** Wang, Yu*

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200032)

Abstract

The bromination of methyl arteannuate (**5**) with NBS in CHCl_3 gave a mixture of **6** with another monobromo-compound which was obtained by TLC and HPLC (yield: 62%). The mixture was deuterized by NaBD_3ON or NaBD_4 in HMPA. From the product $[15\text{-}^2\text{H}]$ -methyl arteannuate (**6**) was isolated and purified by TLC and HPLC (total yield: 13%). Its structure was determined by MS, and ^1H , ^2H and ^{13}C NMR. The ^1H NMR peak of 15-H of **6** is lower than that of **5**. The other peaks of **5** and **6** are same. The ^{13}C NMR spectrum difference between **5** and **6** is characterized by 15-C peak. The chemical shift of peak of **6** is $\delta 23.52(\text{t})\text{ppm}$, and, that of **5**, $23.72(\text{q})\text{ppm}$. The hydrolysis of **6** gave $[15\text{-}^2\text{H}]$ -arteannuic acid (**4**) [m. p. $126\text{--}129^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} 31.1^\circ(c, 0.01, \text{CHCl}_3)$; 2. m. p. 130°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{28.5} 31.3(c, 0.0093, \text{CHCl}_3)^{[2]}$]. $[15\text{-}^3\text{H}]$ -arteannuic acid was also synthesized by the same method but using NaB^3H_4 instead of NaBD_4 as a tritiating agent (radioactivity yield: 12%; specific radioactivity: 10^8 dpm/mg).

** deceased