

·研究论文·

## 紫草萘醌类物质与巯基亲核试剂的反应研究

段志芳 黄志舒 卜宪章 谢文林 古练权\*

(中山大学化学与化学工程学院 广州 510275)

**摘要** 从中药紫草中提取了其有效成分 $\beta$ - $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁,研究了其与含巯基亲核试剂的反应,探讨了这类反应的作用机制。

**关键词**  $\beta$ - $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁, 巯基试剂, 氧化迈克尔加成

## Study on the Reaction of Natural Naphthazarin Compounds with Thiol Nucleophiles

DUAN Zhi-Fang, HUANG Zhi-Shu, BU Xian-Zhang, XIE Wen-Lin, GU Lian-Quan\*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, 510275 Guangzhou)

**Abstract**  $\beta$ - $\beta$ -Dimethylacrylalkannin (1), a naphthazarin compound isolated from the root of *Arnebia euchroma*, reacts with 2-mercaptoethanol, ethanethiol and glutathione to afford products 2~8. It is concluded that nucleophiles add to the side chain (1'-C) via a reductive alkylation and to the quinone ring via an oxidative Michael addition.

**Key words**  $\beta$ - $\beta$ -dimethylacrylalkannin, thiol nucleophiles, oxidative Michael addition

中药紫草具有凉血、活血、解毒和透疹的功能<sup>[1]</sup>。紫草的主要有效成分为萘醌类化合物,这类物质不仅具有多种生理活性如抗炎、杀菌、抗肿瘤、抗凝血等,而且它作为天然色素可应用于医药、化妆品和印染工业中。目前,普遍为人们所接受的紫草萘醌类物质细胞毒性的作用机理是它可作为亲电试剂与体内亲核分子或基团(如 GSH、DNA、Protein 等)作用导致细胞功能破坏。但这种机理从化学反应上进行模拟研究的很少<sup>[2]</sup>,黄志舒等研究了紫草萘醌类化合物与芳香胺的反应,报道了其可能的反应机理<sup>[3]</sup>。这类化合物与脂肪亲核试剂反应的研究尚未见有文献报道。考虑到人体内许多重要的生物分子含有脂肪氨基和巯基,这些基团对于生物分子的生物功能起着重要的作用。为此,我们以脂肪巯基化合物为代表,研究了天然紫草萘醌类化合物与脂肪亲核试剂的反应,通过化学模型及其反应机制的研究在分子水平上探讨了这类活性物质的生理活性作用

机制。

### 1 结果与讨论

紫草萘醌类化合物可看作是由母体萘茜(5,8-二羟基-1,4-萘醌)与侧链相连而成,萘茜与亲核试剂反应比较复杂,通常包括 1,2 和 1,4 加成产物<sup>[4]</sup>,我们从中药新疆软紫草根中分离得到紫草萘醌类化合物 $\beta$ - $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁{3-甲基-2-丁烯酸-[1'S-(1'',4''-二氢-5'',8''-二羟基-1'',4''-二氧-2''-萘茜基)-4'-甲基-3'-戊烯基]酯}<sup>[5]</sup>,研究了其与含巯基亲核试剂的反应。

$\beta$ - $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁(1)和过量的 2-巯基乙醇在室温下反应,TLC 跟踪显示原料点消失,得到两个  $R_f$  值小于原料点的紫红色产物 2 和 3;反应 5 h 后,开始出现第三个紫红色点 4;反应 3 d,TLC 显示仅有 3 和 4;反应 6 d,TLC 显示无明显变化。我们通过对 3 的波谱数据 FAB-MS,UV,IR,NMR(<sup>1</sup>HNMR,

\* Received 2001-01-12; Revised 2001-05-29; Accepted 2001-06-18.

国家自然科学基金( Nos. 29872061, 20002009 )和广东省自然科学基金( No. 980320 )资助项目。

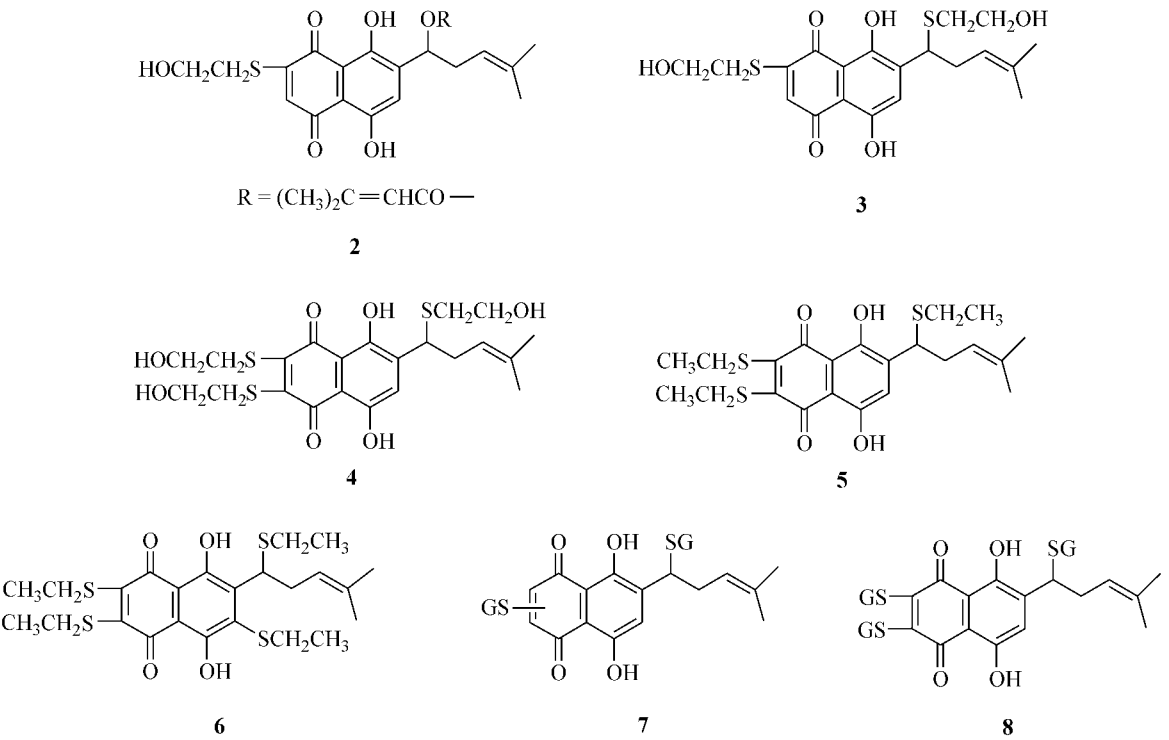


图 1 化合物 2 3 4 5 6 7 8 的结构

Figure 1 Structures of compounds 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 and 8

$^{13}\text{C}$  NMR ,DEPT ,HMBC ,HMQC )进行分析 ,发现 3 的红外光谱 , $^1\text{H}$  NMR 和 $^{13}\text{C}$  NMR 谱显示与丁烯酰氧基有关的信号消失 ,同时核磁中 1'-C 位的信号变为  $\delta_{\text{H}}$  4.38(t ,1H)和  $\delta_{\text{C}}$  41.4(3 °C )原来的信号是 6.00 和 68.6 ) ,FAB-MS 显示分子量为 424 ,结合 $^1\text{H}$  NMR 和 $^{13}\text{C}$  NMR 表明产物中有两个  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  基团。同时化合物 1 在  $\delta_{\text{H}}$  7.00(d ,1H)和 7.22(s ,2H)处的三个质子信号在化合物 3 中表现为两个质子信号  $\delta_{\text{H}}$  6.71(s ,1H)和  $\delta_{\text{H}}$  7.39(s ,1H) ,说明萘茜环上有一个  $\alpha$  6"-C 或 7"-C )上的质子被  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  取代。化合物 3 的 HMBC 谱指出信号  $\delta_{\text{H}}$  6.71(2"-H)与  $\delta_{\text{C}}$  182.1 (1"-C ) ,110.2(10"-C)和 153.8(3"-H)之间 ; $\delta_{\text{H}}$  7.39 (7"-H)与  $\delta_{\text{C}}$  159.7(5"-C ) ,110.2(10"-C)和 41.4(1'-C)之间 ; $\delta_{\text{H}}$  4.38(1'-H)与 159.7(5"-C ) ,144.5(6"-C)和 129.0(7"-C)之间 ,以及  $\delta_{\text{H}}$  12.55(8"-OH)与  $\delta_{\text{C}}$  129.0 (7"-C)之间存在远程相关 ,这表明化合物 1 中 7"-C 上的氢被  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  取代 ,另一  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  则取代了丁烯酰氧基 ,确定 3 的结构如图1。仔细研究 2 和 4 的 $^1\text{H}$  NMR ,FAB-MS 和 UV。2 的 IR , $^1\text{H}$  NMR 显示丁烯氧基存在 ,结合分子量为 446 ,UV 与 3 的相近 4 的 $^1\text{H}$  NMR 表明与丁烯酰氧基有关的信号已消失 结合分子量为 500 ,UV 与 3 的相似 将这两个化合物的结构定为图 1 中的 2 和 4。

2-巯基乙醇与紫草萘醌类物质发生的这种反应实际上是氧化迈克尔加成反应<sup>[6]</sup> ,反应的可能机理如下 :化合物 1 可互变异构<sup>[7]</sup> ,A 环由还原态转变成氧化态 2-巯基乙醇在 6"-C 或 7"-C 位发生 1,4 加成反应 ,中间体在  $\text{O}_2$  存在下自发地发生氧化反应而生成 2 2 可能比化合物 1 活泼 ,易于被 2-巯基乙醇还原加成<sup>[8]</sup> ,生成 3 3 进一步发生氧化加成得到 4(图 2)。

$\beta$   $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁(1)和过量的乙硫醇在甲醇中室温密闭搅拌反应 7 d ,生成两个  $R_f$  值非常相近的紫红色产物 ,其 UV 谱和 3 的非常相似 ,研究其质谱 ,我们将其结构定为 5 和 6(图 1) ,从 6 的质谱图上可以看到  $m/z$  :513( $\text{M}^+ + 1$  ,22) ,451( $\text{M}^+ - \text{SC}_2\text{H}_5$  ,73) ,390( $\text{M}^+ - 2\text{SC}_2\text{H}_5$  ,14) ,329( $\text{M}^+ - 3\text{SC}_2\text{H}_5$  ,4)以及 268( $\text{M}^+ - 4\text{SC}_2\text{H}_5$  ,44)等各个碎片峰的存在 ,证明了结构合理的一面。黄志舒等<sup>[3]</sup>曾提出此类化合物发生氧化迈克尔加成反应的位点应该有三个(3"-C ,6"-C ,7"-C) ,但他们研究此类化合物与芳香胺的反应结果只得到 6"-C 或 7"-C 的反应产物 ,推测其反应机理 ,可能由于芳香胺位阻较大 ,使第二次加成反应不容易进行所致 ,而乙硫醇分子量小 ,空间位阻小 ,发生氧化迈克尔加成反应的位点可以有三个(3"-C ,6"-C 和 7"-C) 。同时由于它的

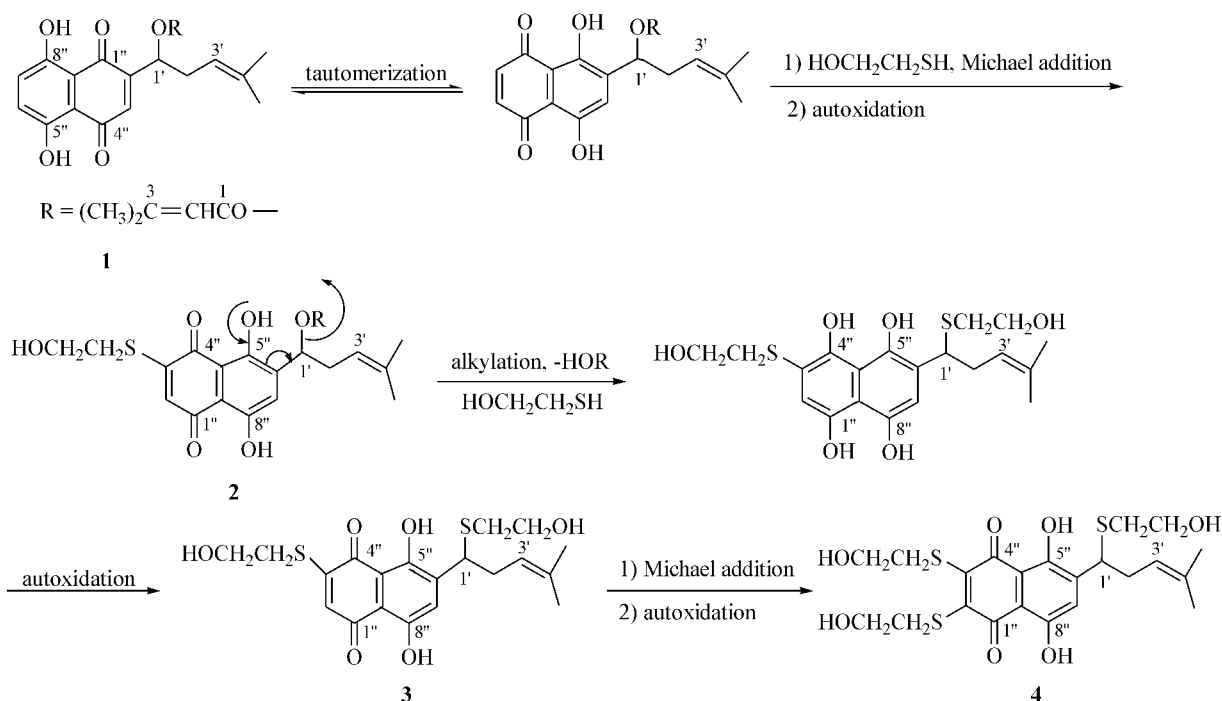


图2 化合物2 3 4的生成机理推测

Figure 2 Reaction mechanism of compounds 2, 3 and 4

还原性,发生还原加成取代了丁烯酰氧基,该取代物在硅胶柱、氧化铝柱和空气中会变成黑色聚合物,这可能是亲核分子取代后的萘茜衍生物更活泼,更易发生氧化还原反应所致。

谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是存在于细胞中的一种主要的含巯基非蛋白类物质,可以起到保护细胞的作用。由于 GSH 具有强的亲核性和还原性,它可以与醌类物质发生还原加成反应,防止醌类物质与细胞内起重要作用的生物大分子相互作用的发生,从而保护细胞以免受伤害<sup>[9]</sup>。鉴于 GSH 在生物化学和药理学中的重要性,我们研究了它与紫草萘醌类化合物的反应。向化合物 1 的甲醇溶液中滴加 GSH 水溶液时,反应液的颜色逐渐由鲜红向茶红、棕红、黑红变化,最后产生黑红色沉淀,该沉淀不溶于有机溶剂、水,微溶于醋酸,易溶于稀盐酸和稀碱,经有机溶剂和水多次洗涤后的沉淀进行电子喷雾质谱 (ESI-MS) 分析 (如图 3),初步确定黑色沉淀主要含有双谷胱甘肽代紫草萘醌 (7), GSSG (GSH 的氧化产物) 和三谷胱甘肽代紫草萘醌 (8) (结构如图 1) 三种成分。质谱解析验证了结构的合理性。由于该化合物溶解度的问题,给沉淀的进一步纯化带来了很大的困难,强酸和强碱都会引起萘茜环的变化和肽键

的断裂,因此我们未能得到纯的化合物 7 和 8 (图 3)。

从混合物的紫外光谱可以看到萘茜的特征吸收峰 ( $\lambda_{\text{max}} = 529 \text{ nm}$ ) 的存在,另外在  $\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}$  处的吸收峰说明半醌游离基和氢醌的存在。这一结果验证了文献<sup>[10]</sup>所提出的 GSH 与醌类化合物的作用机理。同时在侧链上发生烷基化反应的这一新结果是对以前学说的很好的补充,也就是说, GSH 在与紫草萘醌类化合物发生作用时,同时扮演了两种角色:一方面通过与紫草萘醌的 6''-C 或 7''-C 和 1'-C 发生反应来捕捉有害的醌类化合物以保护细胞受到损害;另一方面在与醌类发生作用的同时形成氢醌,从而导致对细胞有害的超氧负离子游离基的产生。

从  $\beta$ - $\beta$ -二甲基丙烯酰阿卡宁与含巯基亲核试剂的反应可以看出,迈克尔加成反应不仅在 6''-C 或 7''-C 上发生,而且在 1'-C 上发生了烷基化反应。Moor<sup>[11]</sup>曾假想,紫草萘醌类物质在体内可被生物还原,导致 1'-C 位酯基的离去,产生高活性的烷基化中间体,该中间体能捕捉细胞内的亲核试剂,从而引起细胞的一系列病变,最终导致细胞死亡,我们的结果从化学上证明了这种假想合理的一面。

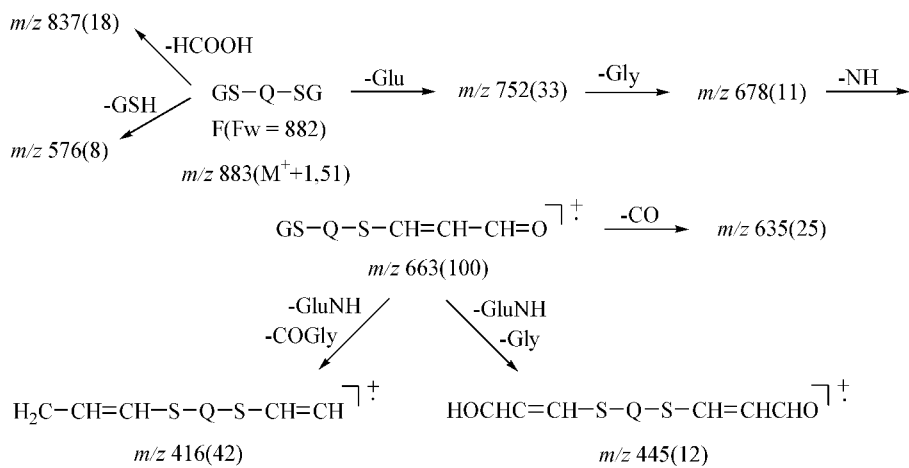


图 3 化合物 7 的质谱解析  
Figure 3 MS analysis of compound 7

2 实验

2.1 仪器和试剂

熔点用 X-4 显微熔点仪测定 , 温度计未校正 ; UV 用岛津 UV-160A 型紫外光谱分光光度计测定 ; IR 用 Bruker EQUINOX 55 - 型仪测定 , KBr 压片 ; <sup>1</sup>H NMR , <sup>13</sup>C NMR 及相关谱用 USA Varian 公司 UNITYNOVA 500 型仪测定 , TMS 为内标 , CDCl<sub>3</sub> 为溶剂 ; 元素分析用 Perkin Elmer 240C 型仪测定 ; 所用试剂均为分析纯 , 青岛海洋化工厂 200 ~ 300 mesh 柱层析用硅胶 G , 薄层层析用硅胶 60GF<sub>254</sub> ; Merck 铝制薄层层析板。

2.2 β β-二甲基丙烯酰阿卡宁的分离

新疆软紫草根的石油醚粗提物经硅胶柱层析多次分离 , 得紫红色针状晶体 , m.p 107 ~ 108 °C (文献值<sup>[4]</sup> 106 ~ 107 °C ) , IR , MS 和 NMR 数据与文献<sup>[4]</sup>报道一致。

2.3 β β-二甲基丙烯酰阿卡宁和 2-巯基乙醇反应生成 2 3 4

β β-二甲基丙烯酰阿卡宁 ( 1 ) ( 100 mg , 0.27 mmol ) 和 2-巯基乙醇 ( 1 mL , 14.3 mmol ) 的甲醇溶液 ( 10 mL ) 在室温下搅拌反应 0.5 h , TLC 跟踪反应表明原料点消失 , 反应液中的溶剂用 N<sub>2</sub> 气吹除 , 剩余物进行快速柱层析 , 再用制备 TLC 纯化 , 得 2 ( 30% ) 和 3 ( 20% ) 。 β β-二甲基丙烯酰阿卡宁 ( 1 ) ( 100 mg , 0.27 mmol ) 和 2-巯基乙醇 ( 1 mL , 14.3 mmol ) 的甲醇溶液 ( 10 mL ) 在室温下搅拌反应 3 d , 反应液中的溶剂用 N<sub>2</sub> 气吹除 , 剩余物进行快速柱层析 , 选用石油醚 : 乙酸乙酯溶剂洗脱系统 , 在 V ( 石油醚 ) : V ( 乙酸

乙酯 ) = 2 : 1 分别冲出紫红色产物 3 和 4 , 再用制备 TLC 纯化 , 3 和 4 的产率分别为 35% 和 25% 。 2 3 4 的 R<sub>f</sub> 值分别为 0.74 , 0.50 , 0.30 ( 乙酸乙酯 : 石油醚 = 2 : 1 ) 。

紫红色不定形固体 2 , C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>S : UV-vis ( MeOH ) λ<sub>max</sub> ( lge ) : 214 ( 4.4 ) , 245 ( 4.28 ) , 320 ( 3.66 ) , 508 ( 3.83 ) nm ; <sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub> , 500 MHz ) δ : 1.55 ( s , 3H , 4'-CH<sub>3</sub> ) , 1.68 ( s , 3H , 4'-CH<sub>3</sub> ) , 1.92 ( s , 3H , 3-CH<sub>3</sub> ) , 2.15 ( s , 3H , 3-CH<sub>3</sub> ) , 2.55 ~ 2.64 [ m , 2H , 2 × 2'-H ] , 5.14 ( t , J = 7.1 Hz , 1H , 3'-H ) , 5.79 ( s , 1H , 2-H ) , 6.11 ( dd , J = 7.2 Hz , 4.0 Hz , 1H , 1'-H ) , 6.72 ( s , 1H , 3''-H ) , 7.18 ( s , 1H , 7''-H ) , 3.12 ( t , J = 6.0 Hz , 2H , 3''-SCH<sub>2</sub> ) , 3.97 ( t , J = 5.0 Hz , 2H , 3''-CH<sub>2</sub>OH ) , 12.20 ( s , 1H , 8''-OH ) , 13.04 ( s , 1H , 5''-OH ) ; IR ( KBr ) ν : 3427 , 2963 , 2924 , 2854 , 1724 , 1640 , 1602 , 1546 , 1435 , 1381 , 1226 , 1141 cm<sup>-1</sup> ; FAB-MS m/z ( % ) : 447 [ ( M<sup>+</sup> + 1 ) 8 ] , 435 ( 6 ) , 379 ( 4 ) , 347 ( 74 ) , 309 ( 6 ) , 301 ( 7 ) , 83 ( 100 ) , 55 ( 55 ) 。

紫红色针状结晶 3 , C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> : m.p. 138.0 ~ 140.0 ; UV-vis ( MeOH ) λ<sub>max</sub> ( lge ) : 214 ( 4.30 ) , 246 ( 4.36 ) , 318 ( 3.75 ) , 520 ( 3.97 ) nm ; <sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub> , 500 MHz ) δ : 1.59 ( s , 3H , 4'-CH<sub>3</sub> ) , 1.68 ( s , 3H , 4'-CH<sub>3</sub> ) , 2.68 ( t , J = 6.5 Hz , 2H , 1'-SCH<sub>2</sub> ) , 2.57 ~ 2.73 [ m , 2H , 2 × 2'-H ] , 3.11 ( t , J = 6.0 Hz , 2H , 3''-SCH<sub>2</sub> ) , 3.71 ( t , J = 6.5 Hz , 2H , 1'-CH<sub>2</sub>OH ) , 3.97 ( t , J = 6.0 Hz , 1H , 3''-CH<sub>2</sub>OH ) , 4.38 ( t , J = 5.0 Hz , 1H , 1'-CH ) , 5.09 ( t , J = 6.5 Hz , 1H , 3'-CH ) , 6.71 ( s , 1H , 2''-H ) , 7.40 ( s , 1H , 7''-H ) , 12.55 ( s , 1H , 8''-OH ) , 12.79 ( s , 1H , 5''-OH ) ; <sup>13</sup>C NMR ( CDCl<sub>3</sub> , 125 MHz ) δ : 18.0 , 25.7 , 33.4 , 33.7 , 35.1 , 41.4 , 59.7 , 60.6 , 110.2 , 111.3 ,

119.9, 127.2, 129.0, 135.1, 144.5, 153.8, 159.7, 160.3, 181.6, 182.1; IR(KBr)  $\nu$ : 3398, 2957, 2922, 2853, 1601, 1546, 1433, 1262, 1049, 787  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS  $m/z$ (%) : 425[( $M^+ + 1$ ), 13], 347(23), 149(41), 91(29), 55(96); Anal. calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{S}_2$ : C 56.60, H 5.66, found C 56.63, H 5.70.

紫红色不定形固体 4,  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{S}_3$ : UV-vis (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ (lg $\epsilon$ ): 217(4.42), 265(4.30), 368(3.54), 506(3.99);  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 1.57(s, 3H,  $A'$ -CH<sub>3</sub>), 1.67(s, 3H,  $A'$ -CH<sub>3</sub>), 2.67~2.71(m, 2H, 2 $\times$ 2'-H), 2.59(t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, 1'-SCH<sub>2</sub>), 3.72(t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>OH), 3.46(t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, 3''-SCH<sub>2</sub>), 3.80(t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H, 3''-CH<sub>2</sub>OH), 3.49(t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, 2''-SCH<sub>2</sub>), 3.79(t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H, 2''-CH<sub>2</sub>OH), 4.37(t,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, 1'-CH), 5.09(t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, 3'-CH), 12.61(s, 1H, 8''-OH), 13.23(s, 1H, 5''-OH); FAB-MS  $m/z$ (%) : 501[( $M^+ + 1$ ), 10], 423(12).

## 2.4 $\beta$ $\beta$ 二甲基丙烯酰阿卡宁和乙硫醇反应生成 5 和 6

$\beta$   $\beta$  二甲基丙烯酰阿卡宁(1) (100 mg, 0.27 mmol) 和乙硫醇(1 mL) 的甲醇(10 mL) 溶液在室温下密闭搅拌反应 7 d, TLC 跟踪反应完全, 反应液中的溶剂用  $\text{N}_2$  气吹除, 剩余物进行快速柱层析, 用制备 TLC 纯化, 得 5 和 6。

紫红色不定形固体 5,  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{S}_3$ : UV-vis (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ (lg $\epsilon$ ): 215(4.3), 268(4.1), 323(3.5), 506(3.9) nm. FAB-MS  $m/z$ (%) : 453( $M^+ + 1$ , 26), 391(100), 383(80), 361(12), 91(28), 69(46), 55(45).

紫红色不定形固体 6,  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{S}_4$ : UV-vis (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$ (lg $\epsilon$ ): 214(4.4), 272(4.3), 349(3.4), 536(3.9) nm. FAB-MS  $m/z$ (%) : 513( $M^+ + 1$ , 22), 451(73), 390(14), 329(4), 268(44), 130(68), 69(78), 55(100).

## 2.5 $\beta$ $\beta$ 二甲基丙烯酰阿卡宁与谷胱甘肽反应生成 7 和 8

化合物 1(0.15 mmol) 用 6 mL 甲醇溶解后, 在室温搅拌下滴加 0.5 mL 谷胱甘肽(0.33 mmol) 水溶液, 继续搅拌 1 h, 溶液颜色由红到棕红, 最后产生黑色沉淀, 沉淀用甲醇, 水洗涤多次, 抽滤及真空干燥, 得 7 和 8 及 GSSG 的混合物。UV-vis(HOAc + HCl)  $\lambda_{\text{max}}$ : 253, 415, 529 nm. 7 ESI-MS  $m/z$ (%) : 883[( $M^+ + 1$ ), 51], 837(18), 752(33), 663(100), 635(25), 416(42). 8 ESI-MS  $m/z$ (%) : 1188( $M^+$ , 8), GSSG ESI-MS  $m/z$ (%) : 513[( $M^+ + 1$ ), 49].

## References

- Yin, J.; Guo, L.-G. *Modern Research and Clinical Practice of Traditional Medicine I*, Xueyuan Press, Beijing, 1993, 634 (in Chinese).
- Papageorgiou, V. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 270.
- Huang, Z.-S.; Gu, L.-Q.; Che, Z.-T.; Zhang, M. *Acta Chim. Sinica* 2000, 58, 1043 (in Chinese).
- Couladouros, E. A.; Plyta, Z. F.; Papageorgiou, V. P. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 3031.
- Fu, S.-L.; Xiao, P.-G. *Zhongcaoyao* 1986, 17, 434 (in Chinese).
- Kitson, T. M. *Bioorg. Chem.* 1998, 26, 63.
- Elove, G. A.; Schauble, J. H. *Magn. Reson. Chem.* 1987, 25, 194.
- Lin, A. J.; Cosby, L. A.; Shansky, C. W. *J. Med. Chem.* 1972, 15, 1247.
- Monks, T. J.; Lau, S. S. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998, 38, 229.
- Takahashi, N.; Schreiber, J.; Fischer, V. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 252, 41.
- Moore, H. W. *Science* 1977, 197, 527.

(Y0101201 QIN X. Q.; FAN Y. Y.)