

文章编号: 1000-4556(2007)01-0085-06

大豆苷元磷酰化产物的结构确定

陈晓岚^{1*}, 石晓娜¹, 屈凌波¹, 袁金伟¹, 卢建莎¹, 赵玉芬^{1,2}

(1. 河南省化学生物与有机化学重点实验室, 郑州大学 化学系, 河南 郑州 450052;

2. 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 清华大学 生命工程科学院, 北京 100084)

摘 要: 将二烷基亚磷酸酯和四氯化碳混合液滴加到由大豆苷元, N, N-二甲基甲酰胺, 三乙胺组成的混合液中, 结果表明在该条件下大豆苷元和二烷基亚磷酸酯发生了磷酰化反应, 利用核磁共振(NMR)技术, 确认单磷酰化大豆苷元为 7-二烷基大豆苷元磷酸酯, 证明了大豆苷元的 7-位羟基在磷酰化反应过程中较 4'-位羟基具有更高的反应活性, 其目标化合物的结构进一步被电喷雾质谱(ESI-MS/MS), 特别是 X-ray 晶体衍射结果所证实。

关键词: NMR; ESI-MS; 大豆苷元; 磷酰化; X-ray 晶体衍射

中图分类号: O627.51 文献标识码: A

异黄酮类化合物具有广泛的生物活性, 大豆苷元(daidzein, 7, 4'-二羟基异黄酮)是其中很重要的一种。据报道, 作为葛根和大豆的主要有效成分之一, 它对多种肿瘤细胞的生长有抑制作用^[1], 例如, 研究发现大豆苷元对白血病, 乳腺癌, 前列腺癌等癌细胞的生长有抑制作用^[2-6], 对 human colon tumor (HCT) 细胞的生长也有抑制作用^[7]。磷酸酯类化合物在生物多样性和具有生物活性的化合物方面都扮演着非常重要的角色, 引入一个磷酸酯基常常能从本质上改变母体分子的化学或物理性质, 使分子的极性和分子间力发生变化。在现代的制药工业中, 磷酸酯常被用作前药来增加药物的水溶性进而提高它的生物利用度^[8]。为了改善大豆苷元的溶解性, 解决临床应用中存在的生物利用度低、吸收差、显效慢的缺点, 国内外研究报道合成的大豆苷元衍生物有几十种^[9-11], 但是对大豆苷元的磷酰化还未见报道。本文采用改造后的 Atherton-Todd 反应, 首次对大

收稿日期: 2006-03-01; 收修改稿日期: 2006-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20472076); 河南省杰出青年科学基金资助项目(0512001400); 河南省创新人才工程资助项目。

作者简介: 陈晓岚(1965-), 女, 河南郑州人, 博士, 教授, 从事天然产物, 磷化生物学方面的研究。电话: 0371-65727578。 * 通讯联系人; E-mail: chenxl@zzu.edu.cn.

大豆苷元进行了磷酰化结构改造,发现所选磷酰化试剂对大豆苷元的 7-位和 4'-位具有选择性,利用 NMR 技术,确认单磷酰化大豆苷元为 7-二烷基大豆苷元磷酸酯,证明了大豆苷元的 7-位羟基在磷酰化反应过程中较 4'-位羟基具有更高的反应活性,NMR 对单磷酰化大豆苷元结构确认的结论又进一步被 X-ray 晶体衍射结果所证实。

1 实验部分

1.1 试剂

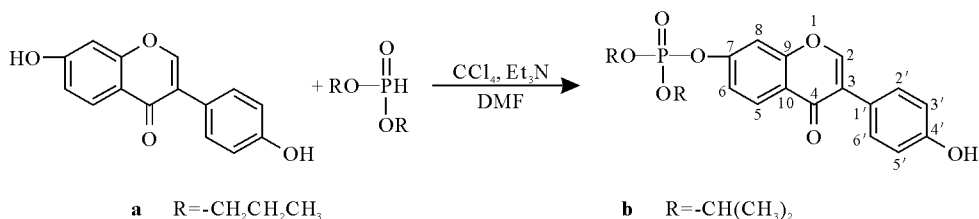
甲醇(分析纯 北京化工厂),三乙胺(分析纯 天津市化学试剂三厂),四氯化碳(分析纯 天津市科密欧化学试剂开发中心),氯仿(分析纯 天津市化学试剂三厂),N,N-二甲基甲酰胺(分析纯 天津市德恩化学试剂有限公司),大豆苷元(陕西慧科植物开发有限公司),二丙基亚磷酸酯,二异丙基亚磷酸酯(本实验室自制)。

1.2 仪器

核磁共振波谱仪(Bruker DTX-400),ESI-MS/MS 用 Bruker-Esquire 3000 离子阱液相色谱质谱仪测定,X-ray 晶体衍射仪。

1.3 合成方法

取 0.6 g 大豆苷元,置于 50 mL 圆底烧瓶中,加 6 mL DMF,0.8 mL 三乙胺,冰浴(5℃以下),磁力搅拌下,用恒压滴液漏斗缓慢加入 6 mL 四氯化碳和适量的二烷基亚磷酸酯的混合液,约 3 h 滴完,继续室温反应过夜。抽滤除盐,旋蒸除氯仿。加冷水 30 mL,抽滤,烘干,得白色粉末状固体。用硅胶柱层析提纯(洗脱剂 CHCl_3 , CH_3OH),所得化合物经 NMR, X-ray 确认结构。



2 结果与讨论

通过和四氯化碳及三乙胺的反应,二烷基亚磷酸酯首先转化为活性较高的二烷基磷酰氯,随后高活性的二烷基磷酰氯与大豆苷元反应,生成相应的磷酰化产物。化合物 a: 7-二丙基大豆苷元磷酸酯,即 7-DNPP-大豆苷元($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{P}$)为无色粉末状固体, mp: 153~155℃, ^{31}P NMR $\delta_{\text{p}} - 6.34$ 。

化合物 b: 7-二异丙基大豆苷元磷酸酯,即 7-DIPP-大豆苷元($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{P}$)为无色晶体, mp: 177~178℃, ^{31}P NMR $\delta_{\text{p}} - 8.90$ 。

表 1 显示了化合物 a, b 的 ^1H NMR 数据: H-2', 6', H-3', 5' 的 δ_{H} 值(7.38, 6.81)和文献[12]报道的大豆苷元数据一致,而 H-5, H-6, H-8 的 δ_{H} 值与大豆苷元 H-5, H-6, H-8 的 δ_{H} 值(7.97, 6.94, 6.86)变化较大,因而认为磷酰基连在 7-位氧上,才使 H-5, H-6, H-8 的化学位移发生了较大改变。另外表 1 显示了化合物 a, b 的 ^{13}C NMR 数

据:与文献[12]中大豆苷元的 δ_C 数据相比, B 环上各个 C 的 δ_C 值变化不大, 而 A 环上 C-6, C-7, C-8 的 δ_C 值与大豆苷元 C-6, C-7, C-8 的 δ_C 值(114.9, 162.5, 102.1)相比有较大变化, 进一步确认了单磷酰化反应发生在大豆苷元的 7-位羟基上。

在这里值得一提的是:由于 P 原子的存在, 使得和它相近的丙基(异丙基)上的氢出现了更加复杂的偶合裂分。如果没有 P 的影响, 通常的丙基上的 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ -氢应裂分为三重峰, 异丙基上的 CH-氢应裂分为四重峰, 事实上, 由于 P 的影响, 这里的正丙基上的 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$ -氢裂分为四重峰, 异丙基上的 CH-氢裂分为六重峰。

表 1 化合物 a, b 的 NMR 数据

Table 1 NMR data of Compounds a, b in d_6 -DMSO

No.	δ_H		δ_C	
	Compound a	Compound b	Compound a	Compound b
2	8.45(s)	8.44(s)	154.2	153.9
3	/	/	122.4	122.1
4	/	/	174.9	174.9
5	8.17(d, $J=8.81$ Hz)	8.17(d, $J=8.81$ Hz)	128.0	127.9
6	7.37(dd, $J=2.11, 8.99$ Hz)	7.37(dd, $J=1.83, 8.81$ Hz)	118.2	118.2
7	/	/	154.3	154.4
8	7.51(d, $J=1.15$ Hz)	7.48(s)	109.1	108.8
9	/	/	157.5	157.5
10	/	/	121.2	121.1
1	/	/	124.2	124.2
2', 6'	7.41(d, $J=8.51$ Hz)	7.41(d, $J=8.49$ Hz)	130.3	130.2
3', 5'	6.83(d, $J=8.46$ Hz)	6.83(d, $J=8.46$ Hz)	115.2	115.2
4'	/	/	156.5	156.4
CH(DIPP)		4.72(m)	74.0	
CH ₃ (DIPP)	0.89(t)	1.30(m)	10.06	23.4
CH ₃ CH_2CH_2 (DNPP)	1.65(m)		23.29	
CH ₃ CH ₂ CH_2 (DNPP)	4.11(m)		70.3	

化合物 b 的甲醇溶液经 ESI-MS/MS 正离子检测, 图 1 显示产物的 ESI-MS/MS 的裂解途径, 和预测结果吻合, 再次证明了此化合物的结构。ESI-MS/MS: m/z 419[M+H]⁺, 377[M+H-C₃H₆]⁺, 335[M+H-2C₃H₆]⁺, 255[M+H-2C₃H₆-HO-PO₂]⁺, 255[M+H-C₃H₆-(CH₃)₂CHOPO₂]⁺。

通过晶体培养得到了单晶, X-ray 晶体衍射化合物结构如图 2 所示, 证明化合物为 7-二异丙基大豆苷元磷酸酯, 大豆苷元的 7-位羟基在磷酰化反应过程中较 4'-位羟基具有更高的反应活性, 证实了 NMR 对单取代磷酰化大豆苷元结构的确认。

我们知道, 被磷酰化的羟基的酸性往往影响到其磷酰化的反应活性^[13], 大豆苷元中有两个酸性不同的羟基, 和 4'-位羟基相比, 7-位羟基对位强的吸电子基团-C=O 的存在

使其酸性增强, 间位基团-O-的吸电子诱导效应也使酸性进一步增强, 结果 7-位羟基的酸性大于 4'-位羟基的酸性, 因而在和磷酸化试剂进行反应时, 具有更强的亲核性, 这样就解释了磷酸化试剂对 7-位羟基磷酸化反应的高选择性。

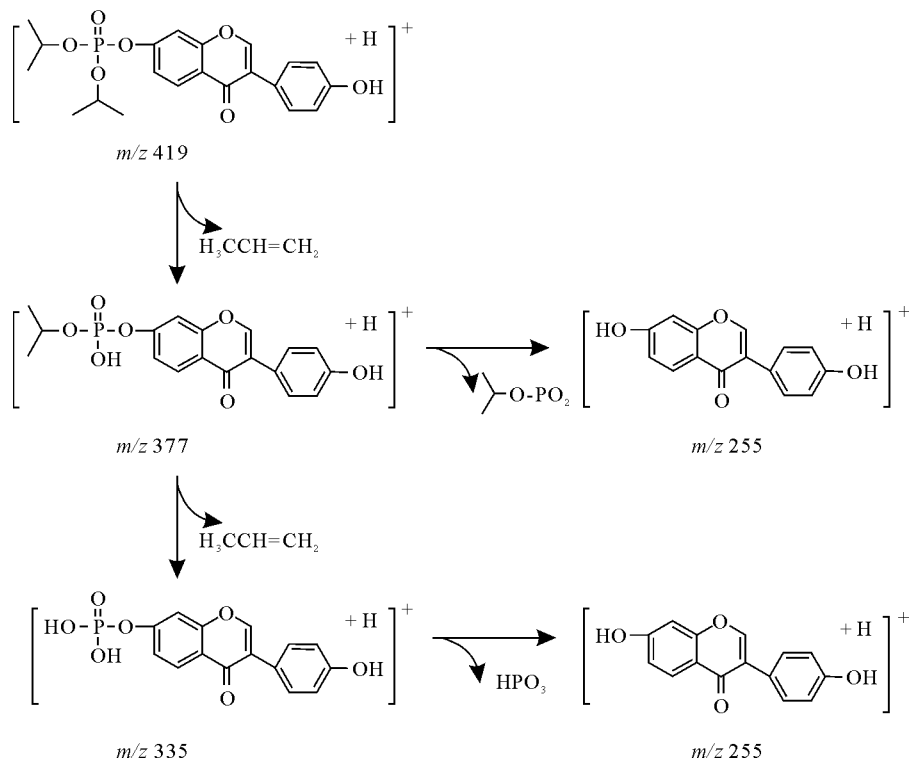


图 1 7-DIPP-大豆苷元的加氢离子 ESI-MS/MS 裂解示意图

Fig. 1 The fragmentation pathway of the hydrogen adduct 7-DIPP-daidzein as revealed by ESI-MS/MS

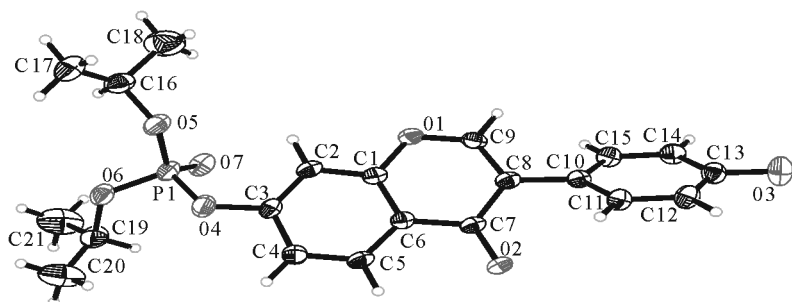


图 2 化合物 7-DIPP-大豆苷元的 X-ray 晶体衍射图

Fig. 2 Molecular structure of 7-DIPP-daidzein as shown by X-ray

$C_{21}H_{23}O_7P$ (7-DIPP-daidzein): 无色针状晶体, 单斜晶系, $Z=4$, $FW=450.41$, $T=291(2)K$, $\lambda=0.071\ 073\ nm$, $a=0.625\ 68(13)\ nm$, $b=2.410\ 7(5)\ nm$, $c=1.537\ 1(3)\ nm$, $\alpha=90\ deg$, $\beta=95.99(3)\ deg$, $\gamma=90\ deg$, $Volume=2.305\ 7(8)\ nm^3$, $F(000)=952$.
 本文结果显示, 大豆苷元在合适条件下可以进行磷酸化结构改造, 得到新的磷酸化

产物 7-二烷基大豆苷元磷酸酯, 并通过 NMR, ESI-MS, 及 X-ray 晶体衍射验证其结构.

参考文献:

- [1] Wang H Z, Zhang Y, Xie L P, *et al.* Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13: 421–426.
- [2] Li W, Weber G. Synergistic action of tiazofurin and genistein on growth inhibition and differentiation of K562 human leukemic cells [J]. *Life Sci*, 1999, 22: 1 975–1 981.
- [3] Shao Z M, Wu J, Shen Z Z, *et al.* Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 4 851–4 857.
- [4] Balabhadrapathruni S, Thomas T J, Yurkow E J, *et al.* Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDAMB-468 human breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2000, 1: 3–12.
- [5] Zhou J R, Gugger E T, Tanaka T, *et al.* Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice[J]. *J Nutr*, 1999, 129: 1 628–1 635.
- [6] Choi Y H, Lee W H, Park K Y, *et al.* P53-independently induced p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 2: 164–173.
- [7] Yu J T, Cheng Y, Xie L P, *et al.* Effect of genistein and daidzein on membrane characteristics of HCT cells[J]. *Nutr Cancer*, 1999; 33 100–33 104.
- [8] Simon Jones, Steven M. An improved method for lewis acid catalyzed phosphoryl transfer with $\text{Ti}(\text{t-BuO})_4$ [J]. *J Org Chem*, 2003, 68: 5 211–5 216.
- [9] Li Y F(李永福), Ji Q E(纪庆娥). Synthesis of 2-amino- isoflavones (2-氨基异黄酮化合物的合成)[J]. *Acta Phar Sini (药学报)*, 1987, 22: 655–660.
- [10] Cheng E, Yoder L, Story C D, *et al.* Estrogenic activity of some isoflavone derivatives[J]. *Science*, 1954, 120: 575–576.
- [11] Zhang Z T(张尊听), Liu Q G(刘谦光), Liu X H(刘小红), *et al.* Synthesis, crystal structure and biological activity of monomethylated daidzein sulfonates(单甲基化大豆苷元磺酸盐的合成、晶体结构及活性研究)[J]. *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2002, 60: 1 846–1 853.
- [12] Sung J H, Choi S J, Lee S W, *et al.* Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2004, 68(5): 1 051–1 058.
- [13] Silverberg L J, John L D, Purushotham Vemishetti. A simple, rapid and efficient protocol for the selective phosphorylation of phenols with dibenzyl phosphate [J]. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37(6): 771–774.

The Phosphorylation Reaction between Daidzein and Di-isopropyl Phosphite Studied by NMR and ESI-MS/MS

CHEN Xiao-lan^{1*}, SHI Xiao-na¹, QU Ling-bo¹, YUAN Jin-wei¹,
LU Jian-sha¹, ZHAO Yu-fen^{1,2}

(1. Key Laboratory of Chemical Biology Department of Chemistry, Zhengzhou University,
Zhengzhou 450052, China;

2. The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology (Tsinghua University),
Ministry of Education, Beijing 100084, China)

Abstract: The Atheron-Todd reaction has been used extensively for synthesis of phosphates and phosphoramidates. In this study, we showed that daidzein can be phosphorylated by a modified Atheron-Todd procedure in which dialkyl phosphite and tetrachloromethane mixture was dropped into a mixed solution of daidzein, triethylamine and DMF. The reaction product was obtained with good yield, whose structure was determined by NMR, ESI-MS and X-ray crystallography.

Key words: NMR, ESI-MS, daidzein, phosphorylation, X-ray crystallography

* Corresponding author: Chen Xiao-lan, Tel:0371-65727578, E-mail:chenxl@zzu.edu.cn.