

金丝桃素与乙基金丝桃素的全合成 及对人免疫缺陷病毒逆转录酶的抑制活性

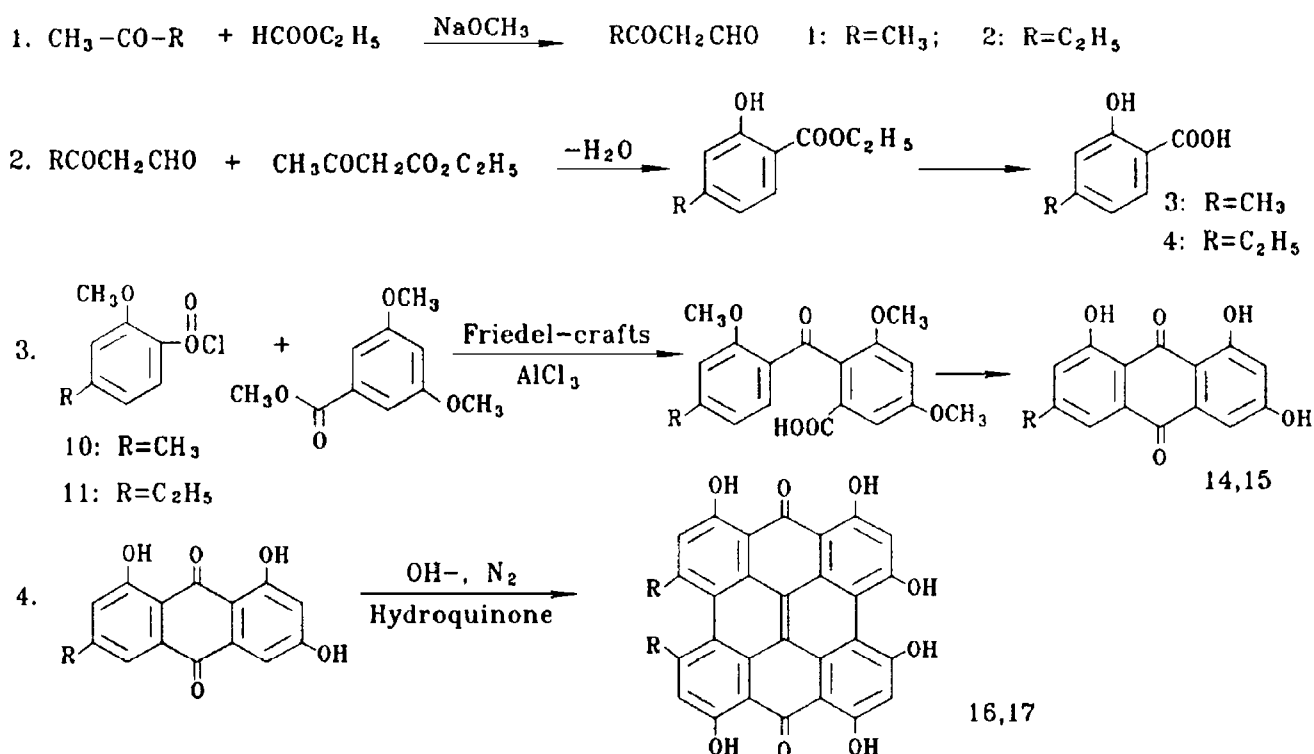
赵 晶 张致平 陈鸿珊* 陈湘红

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

近年发现由贯叶金丝桃(*Hypericum perforatum*), 三棱三叶金丝桃(*H. triquetrifolium* Turra)等金丝桃属植物的鲜花中提取出来的金丝桃素(Hypericin)有抗艾滋病病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的作用。它在细胞培养中可抑制逆转录病毒的复制^[1,2]。纽约大学医学中心 Daniel 等的研究指出: 金丝桃素是通过阻断病毒的脱壳, 出芽或装配而干扰 HIV-1 复制, 但对病毒转录, 翻译和病毒蛋白运送至细胞膜无明显作用, 对 DNA 多聚酶亦无直接作用^[3]。这种作用方式与大多数核苷类似物不同。有的报道认为金丝桃素在细胞内的 HIV-1 抑制作用是由于其与感染细胞中残留的毒粒成分相结合, 是一种有杀病毒作用的药物^[2]。金丝桃素可通过血脑屏障, 在 19 世纪 50 年代曾用作抗抑郁药^[4]。鉴于在感染者中

已发现有脑部和中枢神经系统的感染, 这一点对 HIV 感染病人也有一定意义。纽约大学医学中心和以色列 Weizman 科学研究所的研究结果也表明金丝桃素在体内外都有很强的抗病毒活性, 且与叠氮胸苷(AZT)有协同作用^[3]。

金丝桃素是由两分子大黄素(Emodin, 6-甲基-1,3,8-三羟基蒽醌)缩合而成的稠芳环类化合物, 分子上下对称, 一侧有疏水性的甲基, 而另三侧都连接有亲水性的取代基, 部分二聚蒽醌类化合物的抗 HIV 活性表明金丝桃素结构中的甲基若为 H 取代则活性降低, 若为羟基取代则活性丧失, 因此推测烷基侧链与活性相关。为验证这一推测, 寻找活性更高的化合物, 设计合成了烷基侧链为乙基的乙基金丝桃素。我们用后形成苯环的方法, 参考有关文献^[5,6]设计了如下合成路线:



Scheme 1 Route of synthesis of compounds 16 and 17.

以丁酮为起始原料,与甲酸乙酯缩合得丙酰乙醛,再与乙酰乙酸乙酯缩合得4-乙基水杨酸,以甲基作为羟基保护基,制备4-乙基-O-甲基水杨酰氯,与3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯通过两步Friedel-Crafts酰化得1,6,8-三羟基-3-乙基蒽醌,最后采用碱缩合法合成二聚体蒽醌。

Donald W. 等报道^[7],金丝桃素的质谱分析得不到分子离子峰。同样,我们合成的金丝桃素和乙基金丝桃素的质谱中也未给出分子离子峰。

乙基金丝桃素在丙酮中溶解呈樱桃红色溶液,紫外光下显强烈亮红色荧光,在氮气存在下于KOH溶液中很稳定,形成绿色溶液,加连二硫酸钠还原为蓝色,硫酸酸化后重新氧化为樱红色溶液。

生物活性初步实验结果表明,乙基金丝桃素体外抑制HIV逆转录酶活性优于金丝桃素。

实 验 部 分

熔点用RY-1型显微熔点仪测定,温度计未校正。紫外光谱用岛津UV-400型仪器测定,乙醇作溶剂。IR用岛津IK-435型红外光谱仪测定,溴化钾压片。NMR用JEOL FX-100A90兆核磁共振仪测定,TMS为内标。MS用JC-MSDX300型仪器测定。元素分析用CARLO ERBA 1106型元素分析仪。柱色谱用青岛海洋化工厂¹ 200~300目薄层色谱用硅胶装填低压柱。

1 甲酰丙酮钠(1)和2-羟基-4-甲基苯甲酸(3)

参照文献^[8]方法合成(1),(1)为强吸湿性淡黄色固体。参照文献^[7]合成(3),mp 168~170°C(169~171°C)^[9]。IR(KBr) cm^{-1} : 3200~2800(分子内氢键,bs),2600(Fermi),1650(C=O,分子内氢键),1620(芳环骨架);MS m/z : 152(M^+);¹HNMR(CD_3Cl) δ ppm: 10.36(1H,s, D_2O 交换消失),7.78(1H,d, $J_{5,6} = 8$ Hz,6-H),6.81(1H,s,3-H),6.75(1H,d, $J_{5,6} = 8$ Hz,5-H),2.57(3H,s,pH- CH_3)。

2 丙酰乙醛钠(2)

甲酸乙酯 27.5 g(0.37 mol),丁酮 27.4 g(0.38 mol)混合,缓缓滴入含新切钠丝 9.2 g(0.38 mol)的无水乙醚 200 ml 中,避水条件下搅拌,待钠丝反应完全后,放置过夜。滤出灰黄色强吸湿性固体,无水乙醚洗涤,真空干燥后称重为 38.4 g,产率 85%。mp 72~74°C。

3 2-羟基-4-乙基苯甲酸(4)

丙酰乙醛钠(2) 30 g(0.246 mol),悬于 280 ml 绝对乙醇中,加入乙酰乙酸乙酯 32.5 g(0.25 mol),温热使全溶,混合物于室温下放置 12 h,加入含 5.8 g 钠的无水乙醇 150 ml,4 Å 分子筛 40 g。回流 8 h,TLC 监测反应不再进行,放置过夜,滤出沉淀,乙醇洗涤,抽干。滤饼加水 80 ml 溶解,滤出分子筛,少量水洗,水层以 6N 盐酸调 pH 3,析出灰白色沉淀。硅胶 VLC 分离,得白色针状结晶(4) 21 g。收率 51.6%,mp 118~120°C。IR(KBr) cm^{-1} : 3400~2800(分子内氢键,bs),2600(Fermi),1660(C=O),1620(芳环骨架),1380(CH_3);MS m/z : 166(M^+ , 100), 148($M - \text{H}_2\text{O}$);¹HNMR(CD_3Cl) δ ppm: 10.34(1H,s,OH, D_2O 交换消失),7.82(1H,d, $J_{5,6} = 7.8$ Hz,6-H),6.83(1H,s,3-H),6.72(1H,d, $J_{5,6} = 7.8$ Hz,5-H),2.65(2H,q, $J = 7.5$ Hz,- CH_2 -),1.25(3H,t, $J = 7.5$ Hz,- CH_3)。

4 2-甲氧基-4-甲基苯甲酸(6)

参照文献^[9]方法由(3)合成。无色片状结晶,mp 104~106°C。

5 2-甲氧基-4-乙基苯甲酸(7)

2-羟基-4-乙基苯甲酸(4) 20 g(0.12 mol),溶于 40% NaOH 30 ml(12 g,0.3 mol),滴入(CH_3O)₂SO₂ 30 g(23 ml,0.24 mol),滴加过程中维持 40°C 以下,加完后升温至 90~100°C,回流 30 min,放冷,以 6N HCl 调 pH 3,乙醚萃取(50 ml×3),饱和 NaHCO₃ 洗,水洗醚层至中性,无水硫酸钠干燥,蒸去部分溶剂,放置,无结晶析出。硅胶 VLC 分离,二氯甲烷-石油醚(6:1)洗脱,收集前沿不与 FeCl₃ 显色部分,蒸去溶剂,加入少量乙醚,放置冷冻室,析出片状结晶 7.5 g,室温下熔化,收率 34.7%。MS m/z :

180 (M^+), 163 ($M - 17$), 151 ($M - C_2H_5$), 18 (100); 1H NMR (CD_3Cl) δ ppm: 1.27 (3H, t, $J = 7.81$ Hz, CH_3), 2.72 (2H, qd, $J = 7.81$ Hz, $ph-CH_2-$), 4.07 (3H, s, $-OCH_3$), 6.84 (1H, s, 3-H), 6.96 (1H, d, $J = 7.81$ Hz, 5-H), 8.07 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 6-H)。

6 3,5-二甲氧基苯甲酸(8)

按文献^[9]方法由 3,5-二羟基苯甲酸制备, 为白色针状结晶。mp 182~184°C。

7 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯(9)

参照文献^[10]方法由(8)制备。为白色坚硬簇晶。mp 40°C。

8 2-甲氧基-4-甲基苯甲酰氯(10)和 2-甲氧基-4-乙基苯甲酰氯(11)

参照文献^[10]方法由(6)制备(10), 由(7)制备(11), 分别加入 1,1,2,2-四氯乙烷 20 ml 密塞, 待下步反应用。

9 3,5-二甲氧基-2(4'-甲基-2'-甲氧基苯甲酰基)苯甲酸(12)及 3,5-二甲氧基-2(4-乙基-2-甲氧基苯甲酰基)苯甲酸(13)

3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯(9) 8 g (0.041 mol), 溶于 1,1,2,2-四氯乙烷 200 ml, 加入无水 $AlCl_3$ 12 g (0.09 mol), 避水装置, 冰盐浴冷至 $-5^\circ C$, 搅拌下滴入溶于 $CHCl_2CHCl_2$ 20 ml 的 2-甲氧基-4-甲基苯甲酰氯(10) 0.042 mol, 室温下搅拌 24 h, 倾入稀盐酸冰水中, 分出有机层, 减压蒸去溶剂, 乙醚溶解, 水洗, 无水 Na_2SO_4 干燥, 滤出干燥剂, 蒸去乙醚, 沉淀物加 Me_2OSO_4 14 ml, 无水碳酸钾 16 g, 丙酮 150 ml, 回流, 过滤, 滤液浓缩, 残基以 100 ml 2N NaOH 回流 1 h, 放冷, 6N HCl 酸化, 析出灰白色沉淀 13.2 g, 硅胶柱色谱, 石油醚—四氢呋喃(3:1)洗脱, 得无色棒状结晶(12) 4.1 g, 产率 31%。mp 220~221°C (219°C)^[9]。IR (KBr) cm^{-1} : 2950, 2600, 1680, 1645, 1595; MS m/z : 353 ($M + Na$), 331 ($M + 1$); 1H NMR (CD_3Cl) δ ppm: 7.57 (1H, s), 7.48 (1H, s), 6.97~6.76 (3H, m, 3'5'6'-H), 3.83 (6H, s, OCH_3), 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.52 (3H, s, OCH_3), 2.32 (3H, s, CH_3)。

同法由 2-甲氧基 4-乙基苯甲酰氯(11)

0.033 mol 与 3,5-二甲氧基苯甲酸甲酯(9) 6.3 g (0.032 mol) 反应, 产物相继以 Me_2OSO_4 甲基化, 2N NaOH 水解, HCl 酸化, 得灰白色沉淀 8.6 g, 硅胶 VLC, 石油醚—四氢呋喃(3:1)洗脱, 得白色方晶(13) 3 g, 收率 26.4%。mp 182~184°C; IR (KBr) cm^{-1} : 2600, 1680 ($V_{C=O}$ 共轭羧酸), 1645, 1595; MS m/z : 383 ($M + K$), 345 ($M + 1$); 1H NMR (CD_3Cl) δ ppm: 7.26~6.7 (5H, m), 3.84 (6H, s, OCH_3), 3.76 (3H, s, OCH_3), 2.62 (2H, q, $-CH_2-$), 1.23 (3H, t, $-CH_3$)。

10 1,6,8-三羟基-3-甲基蒽醌(14)及 1,6,8-三羟基-3-乙基蒽醌(15)

$NaCl$ 2 g (0.0342 mol), 无水 $AlCl_3$ 10 g (0.075 mol) 混匀, 避水条件下加热至 $120^\circ C$ 使熔融, 剧烈搅拌下分次加入 0.01 mol 3,5-二甲氧基-2(4-乙基-2-甲氧基苯甲酰基)苯甲酸(12) 或 3,5-二甲氧基-2(4-乙基-2-甲氧基苯甲酰基)苯甲酸(13), 加完后升温至 $160^\circ C$, 搅拌 30 min, 放冷, 加入冰水稀 HCl, 滤集沉淀, 水洗至中性, 硅胶 VLC 分离, 得(14), (15)。1,6,8-三羟基-3-甲基蒽醌(Emodin)(14), 橙色针状结晶 1.3 g, 产率 49%, mp $256 \sim 260^\circ C$ ($254 \sim 256^\circ C$)^[7]。IR (KBr) cm^{-1} : 3300, 3100~2600, 1628 (非螯合 $C=O$), 1618 (螯合 $C=O$)。MS m/z : 271 ($M + 1$); 1H NMR (CD_3Cl) δ ppm: 7.59 (1H, s, 5-H), 7.33 (1H, s, 7-H), 7.23 (1H, d, $J = 0.98$ Hz, 4-H), 6.66 (1H, d, $J = 0.98$ Hz, 2-H), 2.45 (3H, d, CH_3)。1,6,8-三羟基-3-乙基蒽醌(15), 桔红色针状结晶 1.2 g, 产率 49%, mp $166 \sim 168^\circ C$ 。MS m/z : 285 ($M + 1$), 286 ($M + 2$), 287 ($M + 3$); 1H NMR (CD_3Cl) δ ppm: 7.59 (1H, s, 5-H), 7.25 (1H, d, $J = 2.85$ Hz, 4-H), 7.14 (1H, s, 7-H), 6.65 (1H, d, $J = 2.85$ Hz, 2-H), 2.92~2.86 (2H, q, $J = 7.61$ Hz, CH_2), 1.37~1.21 (3H, t, $J = 7.61$ Hz, CH_3)。

11 金丝桃素(Hypericin)(16)

按文献^[5]方法合成, 得黑色粉状结晶, 收率 26% (29%), mp $> 350^\circ C$ (dec.)。元素分析: $C_{30}H_{16}O_8$ 计算值%: C 71.40, H 3.17; 实测

值%: C 69.89, H 3.13; UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 590, 548 (C₂H₅OH)。文献值: 600, 557(Py)^[7]; IR(KBr) cm⁻¹: 3500 ~ 3000, 2900, 1585; ¹HNMR (CD₃Cl) δ ppm: 7.36(s, 2, 5-H), 6.64(s, 9, 12-H), 2.72(s, -CH₃)。

12 乙基金丝桃素(Ethylhypericin)(17)

1, 6, 8-三羟基-3-乙基蒽醌(15) 0.9 g (3.16 mmol), 氢醌 0.7 g (6.33 mmol), KOH 0.5 g (9.5 mmol), 加水 20 ml 通氮气下封管, 于 120~130°C 光照反应两周, 以 6N HCl 调至 pH 3, 滤出沉淀, 水洗至中性, 凉干得黑色固体, 硅胶 VLC, 丙酮-乙酸乙酯(2:5)洗脱, 收集亮红色部分, 蒸去溶剂得黑色粉状结晶 130

mg, 收率 16%, mp >350°C (dec.)。元素分析: C₃₂H₂₀O₈ 计算值%: C 72.18, H 3.75; 实测值%: C 71.39, H 3.79; UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm: 589, 546 (C₂H₅OH); IR(KBr) cm⁻¹: 3550~3000, 1660; ¹HNMR (CD₃Cl) δ ppm: 7.35 (1H, s), 6.62 (1H, s), 2.9~2.68 (2H, dd), 1.19~1.04 (3H, t)。

13 生物活性测定

金丝桃素的半数有效量 IC₅₀ 为 108.23 ± 4.19 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 乙基金丝桃素的半数有效量为 89.34 ± 0.71 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 乙基金丝桃素 HIV-1 逆转录酶的抑制作用优于其母体化合物金丝桃素, 活性强 17.45%。

Tab 1 Inhibitory activity of 16 and 17 on HIV-1 RT

Sample	Inhibitory rate (%)				IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Mean IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$)
	Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
	1000	200	40	8		
16	98.06	60.34	4.26	0	105.27	108.23 ± 4.19
	98.41	78.35	0.63	0	111.19	(0.215 ± 0.0083)
17	96.58	93.25	6.27	1.91	89.84	89.34 ± 0.71
	96.58	93.75	6.98	2.32	88.84	(0.168 ± 0.0013)

关键词 金丝桃素; 乙基金丝桃素; 抗人免疫缺陷病毒

参 考 文 献

- Tang J, Colacino JM, Larsen SH, *et al.* Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res*, 1990, **13**:313
- Hudson JB, Bazzocchi L, Towers GHN. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res*, 1991, **15**:101
- Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:5230
- Lenard J, Rabson A, Vanderoef R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:158
- Brockmann H, Kluge F, Muxfeldt H. Total synthese des hypericins. *Chem Ber*, 1957, **90**:2032
- Hirose Y, Kroiwa M, Yamashita H, *et al.* Chemical studies on the natural anthraquinones. I. Synthesis of munjistin, emodin and 3-hydroxy-2-methyanthraquinone. *Chem Pharm Bull*, 1973, **21**:2790
- Hoststtmann K, Pettei MJ, Kubo I, *et al.* Direct obtention of pure compounds from crude plant extracts by preparative liquid chromatography. *Helv Chim Acta*, 1977, **60**:670
- Mariella R. 3-Cyan-6-methyl-2-pyridone. *Organic Syntheses, New York: John Wiley Sons Inc*, 1963:210
- 李述文, 范如霖. 实用有机化学手册. 上海: 上海科技出版社, 1981:159
- Furniss BS, Hannaford AJ, Roger V, *et al.* Vogel's textbook of practical organid chemistry including qualitative organic anallysis. *New York: Lognman Inc*, 1978:814

STUDIES ON SYNTHESIS AND ANTI-HIV RT ACTIVITY OF HYPERICIN AND ETHYLHYPERICIN

Zhao Jing(Zhao J), Zhang Zhiping(Zhang ZP), Chen Hongshan(Chen HS) and Chen Xianghong(Chen XH)

(*Institute of Medicinal Biotechnology Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT Condensed polycyclic anthraquinone hypericin and its analogues showed activity against several retroviruses, including human immunodeficiency virus (HIV). Another condensed polycyclic anthraquinone ethylhypericin was synthesized from butanone in order to compare its biological activity with hypericin. Biological activity showed that ethylhypericin was slightly more effective than hypericin in HIV-RT inhibitory test.

KEY WORDS Hypericin; Ethylhypericin; Anti-HIV-RT activity