

## 聚戊烯基磷酸酯的合成机理与化学特征



WANG C Z

王成章, 郑光耀, 高彩霞, 张思访, 曹志庆, 沈兆邦

(中国林业科学研究院 林产化学工业研究所, 江苏 南京 210042)

**摘 要:** 从银杏叶中分离制备聚戊烯醇混合物( $C_{75} \sim C_{110}$ ), 纯度为 87.2%, 选择  $POCl_3$  为磷酸化剂和三乙胺为碱性水解剂, 经过磷酸化和水解二步反应, 聚戊烯基氯磷酸酯在三乙胺碱性溶液中转化成聚戊烯基磷酸酯, 产品得率在 65% 以上。聚戊烯醇与  $POCl_3$  的摩尔比为 1:5~10, 反应温度低于 10℃; 室温水解 20 h, 反应产物经柱层析纯化和 HPLC 制备聚戊烯基磷酸酯, 由 IR、 $^1H$  NMR、

$^{13}C$  NMR 和高分辨质谱(HRMS)鉴定其化学结构为聚戊烯基单磷酸酯。

**关键词:** 银杏叶; 聚戊烯醇; 聚戊烯基磷酸酯

中图分类号: TQ91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2006)01-0023-05

## Synthesis Mechanism and Chemical Characterization of Polyprenyl Phosphate

WANG Cheng-zhang, ZHENG Guang-yao, GAO Cai-xia, ZHANG Si-fang,  
CAO Zhi-qing, SHEN Zhao-bang

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** Polyprenols ( $C_{75} - C_{110}$ ) of purity over 87.2% were separated and prepared from leaves of *Ginkgo biloba* L. Polyprenyl phosphate dichlorate was synthesized by choosing phosphorus oxychloride ( $POCl_3$ ) as phosphate, and was converted into polyprenyl phosphate with triethanilamide as hydrolytic reagent with yield more than 65%. The molar ratio of polyprenols to  $POCl_3$  was 1:5-10. Phosphate ester reaction temperature was below 10°C, and hydrolysis for 20 h at room temperature. The hydrolysate was purified by silicon gel chromatography and polyprenyl phosphate was obtained by HPLC, and its chemical structure was identified as polyprenyl monophosphate with IR,  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR and HRMS.

**Key words:** leaves of *Ginkgo biloba* L.; polyprenol; polyprenyl phosphate

聚戊烯醇磷酸酯是存在于动植物体内具有生物活性的天然类脂化合物, 在体内可代谢为多萜醇磷酸酯, 参与生物细胞膜糖蛋白的合成, 改善膜的流动性、稳定性和渗透性<sup>[1-2]</sup>; 其药理作用主要用于抗病毒、免疫调节、诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>。而植物聚戊烯醇是合成多萜醇及其磷酸酯等衍生物的最佳中间体, 因为动物体内多萜醇含量仅为其脏器鲜重的 0.02%~0.03%, 难以大量制备生产。研究表明: 人体中多萜醇及其磷酸酯不足将会对细胞免疫功能及细胞分裂和再生产生影响, 引起脂质代谢、糖类代谢和蛋白代谢的紊乱, 并导致细胞的病变。因此可以通过摄入外源性植物聚戊烯醇及其磷酸酯来补充体内多萜醇磷酸酯的不足。

利用植物聚戊烯醇合成聚戊烯醇磷酸酯国外已有报道<sup>[6-7]</sup>, 早期研究用双-(三乙胺)磷酸酯为磷酸化剂, 对法呢醇、茄尼醇进行磷酸化反应, 制备其磷酸酯, 但得率仅有 20%; 随后 Danilov 等人采用单四-正丁胺基-磷酸替代正磷酸铵盐进行磷酸化反应, 再用氨水和 4-二甲胺吡啶或 N-甲基咪唑水溶液处理, 制备聚戊烯醇单磷酸酯, 其得率提高到 60% 左右, 但反应繁锁, 还需要先进行磷酸化剂的合成。

本研究从银杏叶中分离制备聚戊烯醇油状物, 纯度为 80% 以上。选择三氯氧磷为磷酸化剂, 经过

收稿日期: 2005-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170755)

作者简介: 王成章(1966-), 男, 湖北汉川人, 研究员, 硕士生导师, 从事植物活性成分的提取和药物开发; E-mail: wangczhs@sina.com。

磷酸化和水解反应,生成聚戊烯醇单磷酸酯,反应步骤少,产品得率在65%以上。并在国内首先探讨银杏叶聚戊烯醇单磷酸酯的合成机理及其光谱特征。在此基础上,进行抗肿瘤生物活性的研究,对比聚戊烯醇与聚戊烯醇磷酸酯抑制肿瘤活性的差异。因此,开展聚戊烯醇磷酸酯合成和纯化机理研究,将为聚戊烯醇磷酸酯的药用提供基础。

## 1 实验部分

### 1.1 原料

银杏叶聚戊烯醇( $C_{75} \sim C_{110}$ )样品,由15个异戊烯基单元构成的聚戊烯醇( $PP_{15}$ )至22个异戊烯基单元构成的聚戊烯醇( $PP_{22}$ )组成的混合物,其中 $PP_{17}$ 和 $PP_{18}$ 含量最高,其总聚戊烯醇含量为87.2%,由中国林科院林产化学工业研究所从银杏叶中提取分离制备。

$G_3$ 和 $G_4$ 分别为从银杏叶中分离和鉴定为异戊烯基单元数为17和18桦木聚戊烯醇乙酸酯,自备<sup>[8]</sup>。

### 1.2 仪器与试剂

**仪器:**岛津LC-10A液相色谱仪,配有SCL-10A系统控制,LC-10AD泵,SPD-10A紫外检测器,C-RTA自动积分仪,色谱分析柱为Spherisorb  $C_{18}$ 柱( $5.0 \mu\text{m} \times 200 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$ ),大连化物所生产;红外光谱仪,PE公司FT-IR Spectrometer;INOVA-500核磁共振仪,高分辨质谱仪MAT95 Mass spectrometer为美国Finnigan公司。**试剂:**柱层析硅胶为100~200目,薄层色谱(TLC)板为硅胶F254(自制);显色剂碘为细小颗粒; $\text{POCl}_3$ 、三乙胺、正己烷、丙酮、苯等化学试剂为市售分析纯试剂;水为蒸馏水。

### 1.3 聚戊烯醇样品的精制

取银杏叶聚戊烯醇样品10g,溶于少量石油醚,加入硅胶柱( $\phi 3.4 \text{cm} \times 50 \text{cm}$ )层析。用不同浓度乙醚-石油醚洗脱柱子,TLC检测,收集聚戊烯醇馏分,回收溶剂,精制聚戊烯醇样品纯度为87.2%。TLC检测,聚戊烯醇 $R_f$ 0.35;展开剂为石油醚-乙酸乙酯(体积比9:1, $I_2$ 显色,下同);HPLC条件:流动相为甲醇-异丙醇(体积比1:2,下同),UV 210 nm,流速1 mL/min。

### 1.4 聚戊烯基氯磷酸酯的合成

取精制的聚戊烯醇样品5g(大约相当于3.87 mmol),溶于100 mL正己烷溶液中。取 $\text{POCl}_3$ 溶剂2.8 mL(相当于30 mmol)溶于100 mL正己烷溶液中,转入500 mL三口烧瓶,冰浴搅拌。三乙胺4.2 mL(相当于30 mmol)溶于30 mL正己烷溶液中,慢慢滴加三乙胺正己烷溶液。滴加过程中,有大量白雾产生时,真空搅拌,真空度大于80 kPa,反应30 min。再将聚戊烯醇正己烷溶液100 mL慢慢滴入反应器,速度3~4 mL/min,继续冰浴反应1 h,反应产物为聚戊烯基氯磷酸酯混合物。TLC检测,聚戊烯基氯磷酸酯 $R_f$ 0.90,聚戊烯醇点消失。

### 1.5 聚戊烯基磷酸酯的合成

将1.4节反应混合物加入到400 mL水解液中,水解液中丙酮、水、三乙胺的体积比为88:10:2,室温下搅拌20 h,聚戊烯基氯磷酸酯转化成聚戊烯基磷酸酯。

### 1.6 聚戊烯基磷酸酯的纯化

将1.5节反应液真空浓缩,回收有机溶剂,残留物为乳状液,再加入80 mL苯和20 mL水混合溶液中,搅拌1 h,转入到分液漏斗,静置10 h分层。上清液用饱和NaCl水溶液反洗至中性,有机层用无水 $\text{MgSO}_4$ 干燥,回收溶剂苯,得到黄色聚戊烯基磷酸酯油状物3.75 g。将此油状物溶于少量乙醚,再进行硅胶柱( $\phi 2.0 \text{cm} \times 30 \text{cm}$ )层析,用不同浓度的乙醚-石油醚洗脱,TLC检测,收集聚戊烯基磷酸酯馏分( $R_f$ 0.75),真空浓缩,得到浅黄色的油状物3.2 g,为纯化聚戊烯基磷酸酯样品。

### 1.7 聚戊烯基磷酸酯 HPLC 制备

取1.5节纯化样品少许,溶于正己烷溶液,用HPLC色谱制备聚戊烯基磷酸酯单峰6个,编号为 $P_1 \sim P_6$ ,其中 $P_3$ 和 $P_4$ 的质量为30 mg。HPLC制备柱为Spherisorb  $C_{18}$ 柱( $5 \mu\text{m} \times 200 \text{mm} \times 10 \text{mm}$ )。

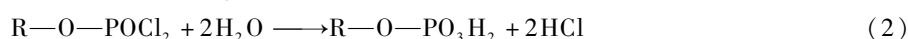
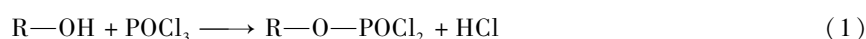
### 1.8 聚戊烯基磷酸酯的检测

取样品 P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 进行 TLC、HPLC、IR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS 检测,根据其化学特征确定其结构。并与已知结构和链长的 G<sub>3</sub> 和 G<sub>4</sub> 相对照,比较其化学特征的差异。

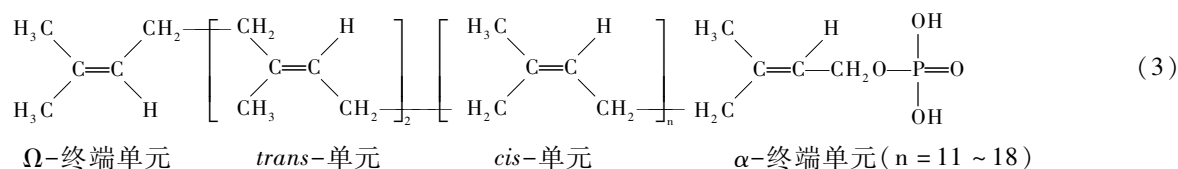
## 2 结果与讨论

### 2.1 磷酰化剂的选择

POCl<sub>3</sub>、PCl<sub>3</sub>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和聚磷酸等为常用的磷酰化剂,最常用的磷酰化试剂是 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,易与低碳醇 (< C<sub>30</sub>) 反应生成磷酸单、双及三酯混合物,而与高碳醇 (> C<sub>50</sub>) 反应,由于高碳醇疏水基团大,P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 易聚合生成高碳醇基聚磷酸酯,并且在少量水存在时易生成偏磷酸酯和焦磷酸酯。PCl<sub>3</sub> 与长链醇反应首先生成长链醇亚磷酸酯,然后与氯气反应首先生成长链醇的氯磷酸酯,再水解为长链醇磷酸酯,反应步骤多,而采用 POCl<sub>3</sub> 与长链醇反应多为二氯磷酸酯,再经水解反应生成单磷酸酯。反应简单,其反应历程如下:



银杏叶聚戊烯醇是一类由一系列异戊烯基单元和终端异戊烯醇单元组成的类脂化合物。具有 ω-(trans)<sub>2</sub>-(cis)<sub>n</sub>-α 桉木醇型结构,异戊烯基单元数为 15 ~ 22,其中 PP<sub>17</sub> (C<sub>85</sub>) 和 PP<sub>18</sub> (C<sub>90</sub>) 的聚戊烯醇为主,C<sub>85</sub> 占 25 % ~ 30 %,C<sub>90</sub> 占 30 % ~ 40 %,平均相对分子质量 (M<sub>w</sub>) 约 1 100,远大于一般脂肪醇及其衍生物的 M<sub>w</sub>。α 为不饱和异戊醇,有一个亲水的羟基,而聚戊烯醇疏水基团较大,因此应选用 POCl<sub>3</sub> 为磷酰化剂,由于空间位阻,其反应产物为单聚戊烯基二氯磷酸酯,很难形成二聚戊烯基氯磷酸酯和三聚戊烯基氯磷酸酯,再水解为单聚戊烯基磷酸酯,其结构式如下:



### 2.2 催化剂的选择

聚戊烯醇及其衍生物为脂溶性类脂化合物,在正己烷、氯仿、乙醚、苯、丙酮中有较好的溶解性,而不溶于乙醇、水等极性溶剂。在式(1)和(2)的反应中,均有 HCl 气体产生,因此在反应体系中加入少量的碱,中和 HCl,可以促进反应进行。选择无机碱溶液中和 HCl,一方面无机碱溶液与 POCl<sub>3</sub> 反应,产生更多的 HCl,同时减少了 POCl<sub>3</sub> 的摩尔数,不利于 R-O-POCl<sub>2</sub> 的生成;另一方面无机碱溶液较难进入有机相。三乙胺是有机碱,能溶于正己烷等有机溶剂,因此磷酰化反应物选择三乙胺作碱催化剂,正己烷为反应稀释溶剂,三乙胺与 HCl 反应形成三乙胺盐酸盐,能溶于丙酮、水等溶剂。同样在式(2)的反应中,水解剂选用丙酮-水,三乙胺也是作为催化剂,中和反应产生的 HCl。

### 2.3 反应温度、时间和分离条件的影响

在式(1)中,因为 POCl<sub>3</sub> 极易分解,产生 HCl 和 PCl<sub>3</sub>,PCl<sub>3</sub> 与聚戊烯醇反应生成聚戊烯醇亚磷酸酯副产物,因此反应温度选择冰浴;在式(2)的反应中,聚戊烯基二氯磷酸酯转化成聚戊烯基单磷酸酯是一个极慢的过程,经 TLC 检测,至少 18 h 反应才能完全。TLC 检测下,聚戊烯醇 R<sub>f</sub> 0.35,聚戊烯基氯磷酸酯 R<sub>f</sub> 0.90,聚戊烯基磷酸酯 R<sub>f</sub> 0.75;因此极性大小为:聚戊烯醇 > 聚戊烯基磷酸酯 > 聚戊烯基氯磷酸酯。

聚戊烯基磷酸酯同系物采用一般柱层析难以分离,而采用反相 HPLC 可以很好地分开。通过 HPLC 制备聚戊烯基磷酸酯同系物 (P<sub>1</sub> ~ P<sub>7</sub>) 中 7 个单体,对应于银杏叶聚戊烯醇乙酸酯同系物 G<sub>1</sub> ~ G<sub>7</sub>,P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub> 与 G<sub>3</sub>、G<sub>4</sub> 相对应,峰面积大,均为主要单体。P<sub>1</sub> ~ P<sub>7</sub> 的保留时间明显滞后于 G<sub>1</sub> ~ G<sub>7</sub>。

### 2.4 聚戊烯基磷酸酯的光谱特征和结构鉴定

通过分析聚戊烯基磷酸酯的 IR、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS,并与已知结构的银杏叶聚戊烯醇乙酸酯 G<sub>3</sub> (PP<sub>17</sub>) 的光学特征对比<sup>[8]</sup>,从而确定 P<sub>1</sub> ~ P<sub>7</sub> 聚戊烯基磷酸酯的化学结构。

**2.4.1 红外光谱**  $G_3$ : IR(液膜,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3030, 2950, 2850, 1750, 1670, 1455, 1385, 1240 以及 835;  $P_3$ : IR(液膜,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3500, 3389, 3036, 2923, 2858, 2732, 1664, 1459, 1387, 1320, 1087, 836 及 752,  $P_4$ 、 $P_5$  与  $P_3$  红外光谱一致, 说明  $P_1 \sim P_7$  为结构相同的同系物。

对比  $P_3$  和  $G_3$  的 IR 可知,  $P_3$  和  $G_3$  都为聚戊烯醇酯类化合物, 具有相同的光谱特征是: 3030 和  $835 \text{ cm}^{-1}$  左右为  $=\text{CH}$  中化学键  $\text{C}-\text{H}$  的伸缩和弯曲振动峰, 2950 和  $2860 \text{ cm}^{-1}$  左右为  $-\text{CH}_3$  和  $-\text{CH}_2$  的伸缩振动峰,  $1670 \text{ cm}^{-1}$  左右为  $\text{C}=\text{C}$  的伸缩振动峰, 1455 和  $1385 \text{ cm}^{-1}$  为  $-\text{CH}_3$  和  $-\text{CH}_2$  的弯曲振动峰。  $P_3$  和  $G_3$  的差异在于:  $G_3$  中有  $1750 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的强伸缩振动峰,  $1240 \text{ cm}^{-1}$  左右(乙酰基  $\text{C}-\text{O}$  化学键) 伸缩振动, 表明  $G_3$  为聚戊烯醇乙酸酯;  $P_3$  中有 1320 和  $1087 \text{ cm}^{-1}$  伸缩振动峰, 它们分别是化学键  $\text{P}=\text{O}$  和  $\text{P}-\text{OH}$  的伸缩振动特征吸收峰, 在  $3500 \sim 3380 \text{ cm}^{-1}$  有强的振动峰, 是化学键  $\text{O}-\text{H}$  特征峰, 表明  $P_3$  为聚戊烯醇磷酸酯。

**2.4.2  $^1\text{H}$  NMR 谱**  $P_3$ :  $^1\text{H}$  NMR( $\delta$ ): 0.87, 1.25, 1.60(*trans*- $\text{CH}_3$ ), 1.68(*cis*- $\text{CH}_3$ ), 1.87( $\alpha$ - $\text{CH}_3$ -*cis*), 2.04( $-\text{CH}_2-$ ), 4.75( $-\text{CH}_2\text{OP}=\text{O}(\text{OH}_2)$ ), 5.12( $\text{C}=\text{CH}$ ), 5.38( $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OP}=\text{O}(\text{OH}_2)$ ), 7.45( $-\text{CH}_2\text{OP}=\text{O}(\text{OH}_2)$ )。  $P_4$ 、 $P_5$  与  $P_3$  的  $^1\text{H}$  NMR 一致, 说明  $P_1 \sim P_7$  为结构相同的同系物。  $G_3$ :  $^1\text{H}$  NMR( $\delta$ ): 1.60(*trans*- $\text{CH}_3$ ), 1.68(*cis*- $\text{CH}_3$ ), 1.74( $\alpha$ - $\text{CH}_3$ -*cis*), 2.04( $-\text{CH}_2-$ ), 4.55( $-\text{CH}_2\text{OC}=\text{OCH}_3$ ), 5.12( $\text{C}=\text{CH}$ ), 5.43( $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OC}=\text{OCH}_3$ )。

对比  $P_3$  和  $G_3$  的  $^1\text{H}$  NMR, 除有相同的光谱特征外, 不同之处在于  $\alpha$  终端单元的甲基和亚甲基信号峰。  $P_3$  中  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}=\text{O}$  亚甲基信号峰出现在  $\delta$  4.75, 处于 *cis* 位上甲基信号峰出现在  $\delta$  1.87; 而  $G_3$  中  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$  亚甲基信号出现在  $\delta$  4.55, 甲基信号峰出现在  $\delta$  1.74。  $\delta$  1.60 和 1.68 为  $\omega$ -终端单元、*trans* 和 *cis* 中间单元中分别位于反式和顺式甲基信号峰。

**2.4.3  $^{13}\text{C}$  NMR 谱**  $P_3$ :  $^{13}\text{C}$  NMR( $\delta$ ): 15.97, 17.65, 23.41, 23.84, 25.67, 26.37, 26.56, 26.69, 31.95, 32.18, 39.70, 107.07, 120.73, 124.15, 124.32, 124.96, 131.1, 134.9, 135.13, 135.6, 154.1。  $P_4$ 、 $P_5$  与  $P_3$  的  $^{13}\text{C}$  NMR 一致, 说明  $P_1 \sim P_7$  为结构相同的同系物。  $G_3$ :  $^{13}\text{C}$  NMR( $\delta$ ): 16.0, 17.6, 23.4, 25.6, 26.4, 26.7, 26.9, 32.0, 32.24, 39.8, 61.0, 119.34, 124.3, 124.6, 125.1, 131.07, 134.8, 135.1, 135.8, 142.31, 170.7。

在  $P_3$  和  $G_3$  的  $^{13}\text{C}$  NMR 光谱中, 均在  $\delta$  32.0 左右和  $\delta$  32.2 左右出现信号, 表明分子中顺反式异戊烯基以 *trans-cis* 和 *cis-cis* 方式连接;  $\delta$  39.8 左右出现信号, 表明分子中存在 *trans-trans* 和  $\omega$ -*trans*;  $\delta$  131.1 左右信号进一步表明分子中存在  $\omega$ -*trans*, 而无  $\omega$ -*cis* 连接。结果表明,  $P_3$  分子构型与  $G_3$  一致。其差异在于  $\alpha$ -终端单元的亚甲基信号峰。  $P_3$  中  $\delta$  107.0 左右信号为  $-\text{CH}_2\text{OP}=\text{O}(\text{OH}_2)$ ,  $\delta$  154.1 左右信号为  $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OP}=\text{O}(\text{OH}_2)$ , 而  $G_3$  在  $\delta$  59.0 ~ 61.0 和  $\delta$  142.3 左右分别出现  $-\text{CH}_2\text{OC}=\text{OCH}_3$  和  $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OC}=\text{OCH}_3$  信号,  $\delta$  170.0 为  $G_3$  中  $\text{C}=\text{O}$  信号。表明  $P_3$  分子中  $\alpha$ -终端单元不是游离醇和乙酸酯, 而是磷酸酯, 并且与  $G_3$  分子构型相同, 均为桦木型结构。如式 3。

**2.4.4 高分辨质谱**  $P_1 \sim P_7$  高分辨质谱(HRMS,  $m/e + \text{Na}$ ): 1141, 1209, 1277, 1345, 1413, 1481; 1125, 1193, 1261, 1329, 1397, 1465。

在  $P_1 \sim P_7$  的 HRMS 中, ( $M-23$ ) 的  $M_w$  依次为 1118, 1186, 1254, 1322, 1390, 1458。其相差均为 68, 正好为每一个异戊烯基  $M_w$ , 因此,  $P_1 \sim P_7$  对应于 15 ~ 22 个异戊烯基磷酸酯同系物。另外一组同系物  $M_w$  ( $M-23$ ) 依次为 1102, 1170, 1238, 1306, 1374, 1442。其相差也为 68, 正好为每一个异戊烯基  $M_w$ , 因此对应于 15 ~ 22 个异戊烯基亚磷酸酯同系物。因此在合成聚戊烯磷酸酯的产物中含有少量的亚磷酸酯。在产物中存在聚戊烯醇亚磷酸酯, 主要是由于  $\text{POCl}_3$  在与聚戊烯醇磷酸酯化时, 部分分解为  $\text{PCl}_3$ , 从反应机理看, 选择反应条件和催化剂要促进反应式(1)向右进行, 因此, 低温磷酸化反应和三乙胺中和  $\text{HCl}$  非常关键, 应加大三乙胺的摩尔数。

### 3 结论

**3.1** 以精制银杏叶聚戊烯醇混合物(聚戊烯醇含量为 87.2%)为原料, 采用  $\text{POCl}_3$  为磷酸化剂和三乙

