

Wilzbach气曝法氟标记三尖杉酯碱的 定位效应研究

孟昭兴 刘伯里

(北京师范大学化学系)

本文首次采用CNDO/2法研究了Wilzbach(气曝)法氟化三尖杉酯碱的定位效应,计算了三尖杉酯碱的各个部位的亲电超离位度 $S_r^{(E)}$,亲核超离位度 $S_r^{(N)}$ 和自由基超离位度 $S_r^{(S)}$ 。理论计算能很好地与实验结果符合。还证实了Wilzbach自辐照-诱导标记是一种亲电反应,参加反应的质点(粒子)是 HeT^+ , T_2^+ , T^+ , T_3^+ ,而不是氟原子和氟分子。Wilzbach高频气曝氟化法是从外部输入能量并活化、解离氟分子成原子、自由基等,参加反应的质点(粒子)是电子、氟原子。二者的反应机理不同,导致 3H 标记位置的不同。该法可作为预测氟标记中草药定位效应的一种参考办法。

关键词 三尖杉酯碱,超离位度(S_r),氟标记位置,自辐照,气曝。

一、引言

自1957年Wilzbach^[1]首次提出自辐照-诱导氟化机制和方法以来,世界各国学者^[2-4]作了大量的研究工作,后由Grosse等人^[5]作了改进,用高频气曝活化氟气的办法成功地标记了放线菌素(Actinomycin)。该技术在七十年代得到进一步的完善,成为目前唯一能够氟化天然产物复杂分子的重要手段,但是有关天然产物有效成分定位效应的研究未见报道。刘伯里等人^[6]用Wilzbach气曝法首次成功地标记 3H -三尖杉酯碱,结果表明有86%的 3H 集中在母核的某(几)个位置上。丛浦珠^[7]报道的三尖杉碱酯类质谱的特征,指出在该类化合物质谱中主要离子峰(m/e 314)占的丰度为最大(其中母核的 m/e 为315)。这是由于该化合物母核的某个位置失去了一个氢原子所致。但上述实验结果均未指出 3H 、 2H 在母核上的具体标记位置。氟标记的定位问题是Wilzbach氟标记的主要缺点之一^[2-4],因此限制了该法的应用范围。

本文根据文献[8—16]提出的氟化机制与实验事实,在Siemens 7760机和IBM-PC机上,采用半经验自洽场方法^[17]——CNDO/2法计算了三尖杉酯碱母核各个碳原子部位的取代活性,探讨了在Wilzbach气曝法的实验条件下,氟与底物结构的定位氟化机制及其相互作用关系,得出一些有益的结果。计算表明,用Wilzbach高频气曝法 3H 应集中在三尖杉酯碱母核的 C_{20} 部位的几率最大,可能占母核 3H -H同位素交换反应总和的53%。而对于Wilzbach自辐照-诱导标记的计算表明, 3H 应集中在三尖杉酯碱的 C_{18} , C_{20} 部位的几率为最大。

1986年11月16日收到。

二、实验部分

1. ^3H -三尖杉酯碱的制备

称取20mg三尖杉酯碱,溶于4ml无水甲醇中,把溶液均分为二份,一份留作鉴定用,另一份用5mg玻璃棉浸沾、避光、凉干,再把玻璃棉放入曝射瓶中(见图1)并将曝射瓶接到氟化系统上,抽真空至0.7Pa (5×10^{-3} mmHg),然后充氟气到压力为5.6kPa(42mmHg),每天曝10min(高频放电100V),共8天。用冷冻干燥法洗脱游离氟,在FJ-353G1型双道液体闪烁计数器上测量,获得 ^3H -三尖杉酯碱样品,总活度为 $3.7 \times 10^8 \text{ Bq}$ 。



图1 曝射瓶

1——阴阳10号标准磨口;
2——真空活塞; 3——钨棒。

2. 分析鉴定

(1) 样品纯化 用氧化铝薄板层析法纯化,收集 $R_f=0.56$ 处的氧化铝,用甲醇溶解产品,吸取上层清液,反复3次,得提纯液总体积为11.3ml,放射性比活度为 $3.7 \times 10^8 \text{ Bq/mg}$ 。

(2) ^3H -三尖杉酯碱的水解 为了研究 ^3H 在三尖杉酯碱母核和支链上的分布,取几滴提纯溶液,加入1—2ml 0.5mol/l 乙醇钠溶液(溶剂为乙醇),放置12h进行水解,然后分别用层析法在氧化铝干板及硅胶板上测定 ^3H 在支链和母核上的标记率,结果如图2和图3所示。由图2可见,在 $R_f=0.6$ 处的母核位置上出现明显的标记峰,所占标记率为88%。在母核峰值的上面, $R_f=0.77$ 处出现一个较小的峰,它可能是支链的标记峰,包括本

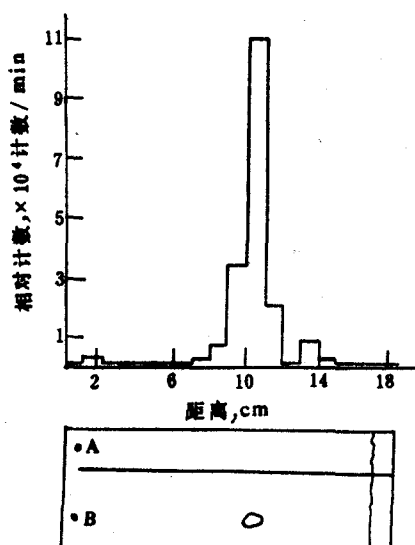


图2 氧化铝干板层析提纯样品的放射性谱
氧化铝16—200目, 120°C 下烘2h;
展开剂为氯仿:甲醇(V/V)=5:0.2;
显色剂为碘铈酸钾;由原点至前沿,每隔1cm刮取一个样进行测量。A——提纯样品; B——标准母核样品。

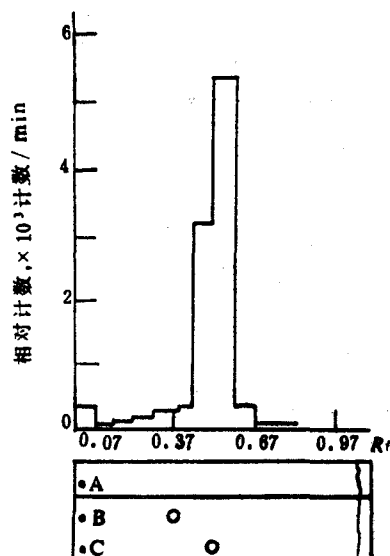


图3 硅胶板层析提纯样品的放射性谱
展开剂为乙醚:丙酮(V/V)=2:1;
显色剂为碘铈酸钾;由原点至前沿,每隔1cm刮取一个样进行测量。A——提纯水解液; B——标准三尖杉酯碱, $R_f=0.31$;
C——标准母核, $R_f=0.48$ 。

底在内标记率为12%。图3结果也表明母核标记占总活度的86%，同时还可看出 ^3H 标记在母核上的峰值与标准母核样品的显色点一致。在标准三尖杉样品显色点处未出现放射性峰值，这就进一步说明水解是完全的。经四次实验结果分别为86%，88%，89%，86%的 ^3H 标记在母核上。

(3) 对照实验 为了进一步验证上述分离分析方法的可靠性，又用萃取法加以对照，在酸性条件下，用氯仿萃取支链，母核留在水相，然后分别测水相和有机相放射性活度。具体步骤如下：在分液漏斗中加入5%乙酸15ml，氯仿15ml和少许三尖杉提纯水解液，摇动10min，萃取后有机相用15ml 5% Na_2CO_3 洗涤三次（防止支链对母核测定的影响），各取水相和有机相1ml用于测定，其结果：支链活度为1%，母核活度为99%。实验表明，萃取测定结果与碱板、氧化铝干板层析结果基本一致。由于萃取测量误差较小，所以结果比板层析结果为好。

三、CNDC计算

在本文的计算中，C, H, O, N的AO取价基集合，CNDO/2参数取自文献[18]，并列于表1。

表1 CNDO计算中采用的参数

原 子	n	ξ	$-\frac{1}{2}(I_{\mu} + A_{\mu})$	β^*
C	2s	1.6250	14.0510	-21.0000
C	2p	1.6250	5.5720	-21.0000
N	2s	1.9237	19.2070	-12.5000
N	2p	1.9170	6.9620	-12.5000
O	2s	2.2000	24.8175	-15.5000
O	2p	1.9750	7.7955	-15.5000
H	1s	1.2000	7.1710	-4.5000

计算所用的结构参数取自文献[26, 27]。

计算所依据的三尖杉酯碱^[18-21] (Harringtonine) 的几何构型示意图示于图4。结构式上的数码系为计算时所用的原子编号，以表示其部位。

计算母核结果列入表2、表3。支链结果列入表4。

从表2中可看出在三尖杉酯碱母核上：

(1) 带有相对较大正电荷的碳原子有： C_{18} , C_6 , C_{17} , C_{20} , C_{10} ；而带有较大

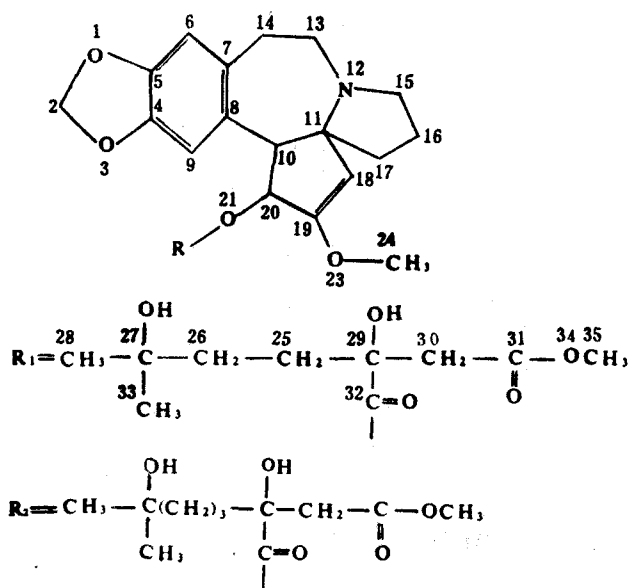


图4 三尖杉酯碱的几何构型示意图

表2 三尖杉酯碱(母核)的净电荷、 π 电荷、最高占据轨道(HOMO)、最低占据轨道(LUMO)及某部位碳原子的超离位度 $S_r^{(22)}$

原子	净电荷	π 电荷	HOMO	LUMO	$\Delta E_{LUMO-HOMO}$	$S_r^{(E)*}$	$ S_r^{(N)**} $	$ S_r^{(R)***} $
C ₂	0.297		-0.0026	0.0004	0.0030	1.188	1.188	0.000
C ₆	0.619	0.033	-0.0835	0.0478	0.1313	2.225	2.446	0.142
C ₉	0.226	-0.191	-0.2075	-0.0022	0.2053	2.361	2.362	0.001
C ₁₀	0.380		0.0264	-0.0057	-0.0321	1.544	1.551	0.004
C ₁₃	0.021		0.0017	-0.0036	-0.0053	1.271	1.274	0.001
C ₁₄	-0.010		0.0057	-0.0041	-0.0098	1.533	1.542	0.002
C ₁₆	0.226		-0.0059	-0.1093	-0.1034	1.693	4.317	1.309
C ₁₈	0.798		-0.0278	0.1349	0.1627	1.312	5.301	1.850
C ₁₇	0.577		0.0163	-0.1372	-0.1541	0.807	4.966	2.080
C ₁₅	-0.124		0.0367	-0.1740	-0.2107	1.687	8.326	3.319
C ₂₀	0.377		0.0537	-0.3000	-0.3536	1.536	21.252	9.858
Σ						17.1680	54.525	18.566

超离位度⁽²²⁾ (Superdelocalizability) 是度量分子内反应难易程度的尺度,也是目前量子化学最常用的指标之一。

其三种表达形式: * 亲电反应时: $S_r^{(E)} = 2 \sum_i^{Occ} \frac{(c_r^i)^2}{E_i}$; ** 亲核反应时: $S_r^{(N)} = 2 \sum_i^{Vac} \frac{(c_r^i)^2}{-E_i}$;

*** 自由基反应时: $S_r^{(R)} = \sum_i^{Occ} \frac{(c_r^i)^2}{E_i} + \sum_i^{Vac} \frac{(c_r^i)^2}{-E_i}$ 。

式中, c_r^i —第 i 个MO中的 r 原子的 $2p_z$ 原子轨道系数; E_i —该MO的能级; $\sum_i^{Occ}$ —对全部占据轨道加和; $\sum_i^{Vac}$ —对全部空轨道加和。

负电荷的碳原子只有C₁₈, C₁₄。

(2) 最低空轨道能量LUMO值较低的碳原子有: C₂₀, C₁₈, C₁₇。

(3) $\Delta E_{LUMO-HOMO}$ 绝对值相差较大的碳原子有C₂₀, C₁₈, C₁₆。

(4) $S_r^{(E)}$ 值除了C₂, C₁₃, C₁₆, C₁₇外均相差不很大。

(5) $S_r^{(N)}$ 值在C₂₀部位明显大,约占可能进行³H-H同位素交换反应总和的39%,其次是C₁₈,约占总和的15.3%。

(6) $S_r^{(R)}$ 值也是以C₂₀部位最大,约占³H-H同位素交换反应总和的53%;其次是C₁₈约占交换总和的17.9%。

表3结果表明,母核的整个M, B, O的分布是C₂₀部位的C—O键的键级最小,故在此部位易被取代和断裂的几率最大。同样仅考虑C—H键的键级时,也是以C₂₀—H的键级最弱,其次是C₁₆—H,再次之为C₉。另外还发现C₁₈—H键的键级还相当大。

表3 三尖杉酯碱母核的M, B, O的分布

碳—氢键部位	M, B, O	碳—氢键部位	M, B, O
C ₈ —H	0.6833	C ₁₇ —H	0.4905
C ₉ —H	0.2953	C ₁₇ —H	0.3975
C ₁₀ —H	0.5811	C ₁₈ —H	0.6722
C ₁₃ —H	0.6440	C ₁₉ —O	0.5809
C ₁₃ —H	0.6696	C ₂₀ —H	0.2684
C ₁₄ —H	0.4005	C ₂₀ —O	0.0136
C ₁₄ —H	0.4002	C ₂₃ —C ₂₄	0.5593
C ₁₅ —H	0.4920	C ₂₄ —H	0.6827
C ₁₅ —H	0.4013	C ₂₄ —H	0.6848
C ₁₆ —H	0.2567	C ₂₄ —H	0.6840
C ₁₆ —H	0.2875		

表4 三尖杉酯碱(支链)的计算结果

原子	净电荷	HOMO	LUMO	$\Delta E_{LUMO-HOMO}$	$S_r(E)$	$S_r(N)$	$S_r(R)$
C ₂₅	0.177	-0.0034	-0.0222	-0.0188	0.400	0.400	
C ₂₆	1.07	-0.0021	-0.0019	0.0002	0.477	0.477	
C ₂₈	0.046	-0.0038	-0.0015	0.0023	3.395	3.395	
C ₃₀	0.042	-0.0050	-0.0026	0.0025	3.141	3.141	
C ₃₃	0.134	-0.0032	-0.0572	-0.0540	2.662	2.674	0.012
C ₃₅	0.224	-0.0053	-0.0157	-0.0104	0.338	0.339	0.001
Σ					10.413	10.426	0.013

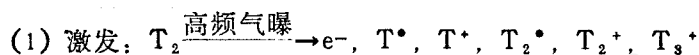
四、讨 论

实验表明: 1、Wilzbach高频气曝氚化三尖杉酯碱时, ^3H 主要集中在母核上的某个活泼位置, 约占总标记的86%以上, 支链仅占标记的很少部分。

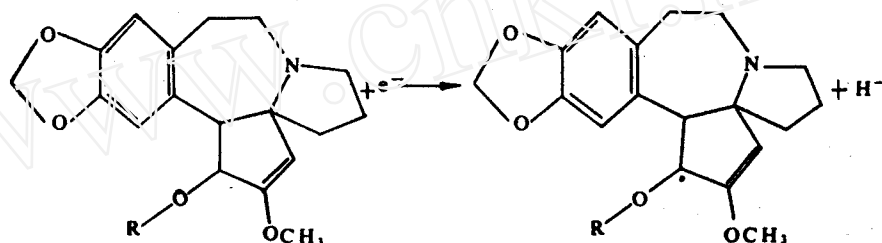
2、Wilzbach自辐照-诱导标记是一种亲电反应, 引发剂为反冲氚原子(其转化能为1.65 eV), 氚在 β 衰变中产生 T^+ 和 T_2^+ , 因此参加反应的质点(粒子)是 HeT^+ , T_2^+ , T^+ 和 T_3^+ , 而不是氚原子和氚分子^[17]。这些正离子作为亲电试剂, 相对集中在底物以负电荷占优势^[17]的交换部位(即该交换反应以电荷效应为主), 或其相对集中在以底物的最高占据轨道HOMO较高的周围(即该交换反应以轨道效应为主), 均是引发自辐照-诱导 ^3H 标记的先决条件。而度量分子内各个原子的反应活性大小应取决于 $S_r(E)$ 。计算结果表明, 符合于 $S_r(E)$ 及HOMO都较大者只有C₂₀, C₁₈部位, 因此 ^3H 应集中在母核的这两个部位的几率为最大。尽管C₆, C₉, C₁₅, C₁₀都具有较大的 $S_r(E)$, 但由于在这些部位均带有较大的正电荷, 同时它们各自的

最高占据分子轨道能量HOMO均很低,这说明这些部位电离势很小。另一方面发现在这些部位的C-H键的键级又都很大,说明该部位的C-H键变形或断裂几率减小,故与进攻试剂氚正离子成键的可能性减小,这是自辐照-诱导标记在这几个部位难发生 ^3H -H同位素交换反应的根本原因。

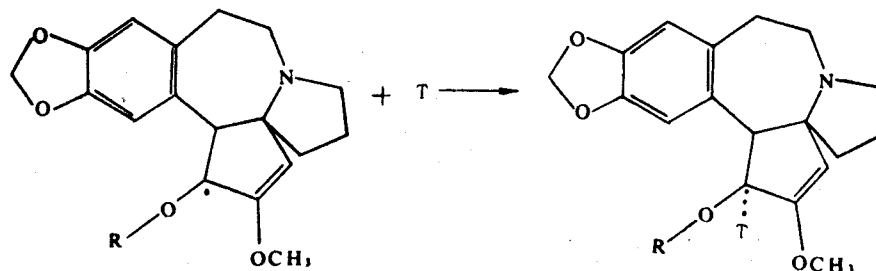
改进的Wilzbach高频气曝氚化法,是以外部输入能量,并能够活化,解离氚分子成为原子,自由基和其它作用,因此更易形成氚化产品^[8]。其机理与微波激发 ^3H 氚化法极为相似。在气曝过程中形成氚的等离子体,含有电子、氚原子、氚正离子,整个体系是电中性的,此时的氚化机理^[25]为:



(2) 提取:



(3) 原子团复合



高能电子是引发 ^3H -H同位素交换反应的引发剂^[23,24],而引发 ^3H 氚化反应的先决条件是被标记化合物某碳原子必须具有明显的正电荷(电荷效应为主时),或其相应的LUMO最低者(即轨道效应为主时)。高能电子首先进攻带正电荷较大的碳原子部位(见表2),且优先进入能量最低的LUMO轨道(以 C_{20} 为最低,其值为 -0.3000),使底物的该部位的氢以 $\text{H}^\bullet$ 的形式被提取,提取效率高低取决于该部位的键级大小,大者提取反应难于发生。我们发现 C_{20} 部位的C-H键的键级最小只有 0.2684 ,而该部位的C-O键的键级更小(0.0136)(见提取反应式)。这说明当高能电子引发底物进行氚化反应时,在该部位提取 $\text{H}^\bullet$ 的效率最高(若此步反应为决速步的话,提取效率也可用该部位的 $S_r^{(N)}$ 度量,否则不可)。最后氚是以氚原子形式与底物的原子团进行复合,达到 ^3H -H同位素交换的目的。但度量底物分子内 ^3H -H同位素交换活性指标为 $S_r^{(R)}$ 的大小(主要指气曝过程)。计算结果, C_{20} 部位的 $S_r^{(R)}$ 最大为 9.858 ,约占母核可能进行交换部位的 53% ,其次有少量 ^3H 在 C_{17} , C_{16} 部位。至于在不气曝时的反应机制与自辐照-诱导反应机制相同,不过自发反应慢, ^3H 氚化比活度也低,根据自

辐照-诱导标记机制理论分析也会有少量 ^3H 会在 C_{18} 部位出现,此部分作为高频气曝的Wilzbach法不应占很大的比重,故讨论在该实验条件下的定位氚化效应时可忽略。

3、同理,从表4也可看出,即带相对较大正电荷而LUMO值又相对较低的碳原子部位只有 C_{33} , C_{35} 。从它们的 $S_r^{(R)}$, $S_r^{(N)}$ 的指标估算出 ^3H 标记在支链上的放射性仅占总放射性的1%,与萃取法实验结果一致。

我们还发现:

$$\Sigma S_r^{(O)} / \Sigma S_r^{(O)} = 38\%; \quad \Sigma S_r^{(N)} / \Sigma S_r^{(N)} = 16\%; \quad \Sigma S_r^{(R)} / \Sigma S_r^{(R)} = 1\%.$$

式中, $\Sigma S_r^{(O)}$, $\Sigma S_r^{(N)}$, $\Sigma S_r^{(R)}$ 分别表示该化合物支链上可能进行 ^3H -H同位素交换反应的所有碳原子相应超离位度的加和。 $\Sigma S_r^{(O)}$, $\Sigma S_r^{(N)}$ 和 $\Sigma S_r^{(R)}$ 分别表示该化合物分子上可能进行 ^3H -H同位素交换反应的所有碳原子相应的超离位度的加和。

由此可以看出,若上述反应历程的决速步为提取反应时,则母核的标记率应占总活度的84%;若该历程的决速步为复合反应时,则母核标记应占总活度的99%;而我们的实验结果恰恰在此范围波动。

总之, Wilzbach法 ^3H 氚化底物的定位效应是相当复杂的,它与氚的浓度,底物的性质及其结构信息(包括电离势、电子亲和势、电荷分布、相应的超离位度值、构象等)都有很大关系,需综合考虑各方面的指标才能得出较为可靠的结论,由于计算的分子中原子数较多,其相关性又比较复杂,上述计算只是一种近似定性结果。

4、用分子轨道法预测Wilzbach氚标记三尖杉酯碱的定位效应看来似乎是一种可参考的办法。

参 考 文 献

- [1] Wilzbach, N.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1013 (1957).
- [2] Schmidt, K.H. et al., *J. Labelled Compds.*, 1, 229 (1965); 1, 304 (1965).
- [3] Werner, G. et al., *J. Labelled Compds.*, 3, 47 (1967).
- [4] Parmentier, J.H., *J. Labelled Compds.*, 1, 93 (1965); *Ibid.*, 2, 367 (1966).
- [5] Grosse, N. et al., *J. Labelled Compds.*, 1, 283 (1965).
- [6] 刘伯里等, 北京师范大学学报, (1), 59 (1979).
- [7] 丛浦珠, 药学报, 18 (3), 227 (1983).
- [8] Riesz, P. et al., *J. Phys. Chem.*, 62, 6 (1958).
- [9] Gant, P.L. et al., *J. Chem. Phys.*, 30, 1108 (1959).
- [10] Gant, P.L. et al., *J. Chem. Phys.*, 31, 1589 (1959).
- [11] Gant, P.L. et al., *J. Chem. Phys.*, 32, 1757 (1960).
- [12] Gant, P.L. et al., *J. Phys. Chem.*, 66, 1619 (1962).
- [13] Pratt, T.H. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 10 (1961).
- [14] Ache, H.J., *J. Phys. Chem.*, 71, 3388 (1967).
- [15] Somma, C.T. et al., *Radiochem. Acta*, 10, 49 (1968).
- [16] Peng, C.T., *J. Phys. Chem.*, 70, 1297 (1966).

- [17] J.A. 波普尔, D.L. 贝弗里奇著, 江元生译, 分子轨道近似方法理论, 科学出版社, 1976年, 42—47, 64—71, 83—87页.
- [18] 中国科学院药物研究所, 化学学报, **34**, 283(1976).
- [19] 中国科学院药物研究所, 中华肿瘤杂志, **1**, 176(1979).
- [20] 陆永宁, 中草药通讯, (4), 50 (1974).
- [21] Paudle, W.W., *J.Org.Chem.*, **38**, 2110 (1973).
- [22] Fukui, K. et al., *J.Chem.Phys.*, **22**, 1433 (1954).
- [23] Gosztanyi, T.J., *J.Label led Compds*, **5**, 196 (1969).
- [24] Beennakker, C.I., *M.Spectrochim.Acta*, **32b**, 173 (1977).
- [25] Peng, C.T. et al., *Int.J.Appl.Radiat.Isotop.*, **33**, 419 (1982).
- [26] 鲍光宏等, 中国医学科学院学报, **5**(2), 4(1983).
- [27] Tables of Interatomic Distances and Configuration. In Molecules and ions, Supplement 1956-1959. Burlington House, **1** (1956).
- [28] White, F.H. et al., *J.Label led Compds*, **5**, 295 (1969).

A STUDY ON THE LOCATION OF TRITIUM- LABELLING OF HARRINGTONINE BY WILZBACH METHOD

MENG ZHAOXING LIU BOLI

(Department of Chemistry, Beijing Normal University)

ABSTRACT

The mechanism of tritium-labelling by Wilzbach method has been investigated using CNDO/2 method. The results show that in the case of radiation-induced labelling, the species such as HeT^+ , T_2^+ , T^+ , T_3^+ , participate in the tritiation of harringtonine, but in the case of labelling by electric discharge, the species are electron, tritium atom, and other reactive species. The calculated results agree with experimental values. It seems that calculation of the superdelocalizability $S_r^{(E)}$, $S_r^{(N)}$, and $S_r^{(R)}$ using CNDO/2 method may be used as a useful tool for the location of tritium labelling on Chinese medicinal herbs.

Key words Harringtonine, Superdelocalizability, Self-irradiation, Electrical discharge, Location of tritium-labelling.