

反-玉米素的制备

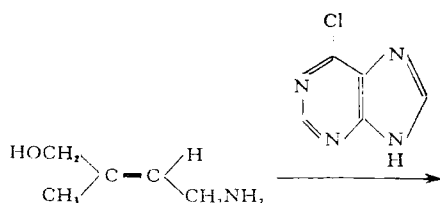
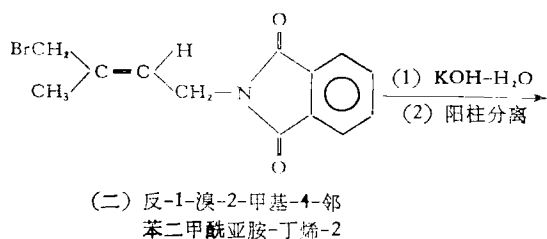
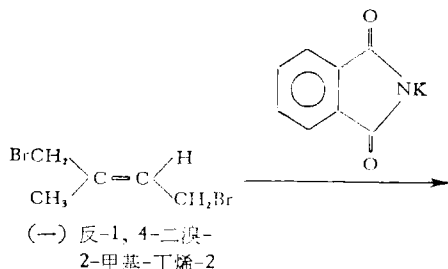
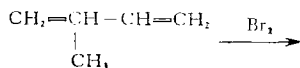
戎积圻 山四妹 马建国

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

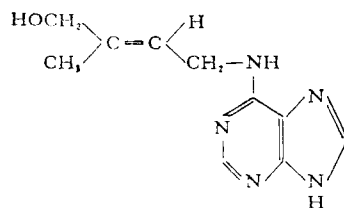
反-玉米素是第一个从植物组织中分离出来的细胞分裂素类 (Cytokinins) 物质。玉米素在植物激素的生理、生化研究、植物原生质体的培养、融合细胞的培养以及单倍体育种工作应用非常广泛。

1964年确定玉米素的结构后,已有人开始进行人工合成^[1]。1971年 Letham^[2]改进合成方法,可得到纯品,但总产率仅1.5%。我们根据 M. Ohsugi 的方法^[3],并作了改进,设备简单,操作方便,较适于玉米素的大量制备。产品经熔点、薄板层析、核磁共振和生物活性等鉴定表明为反-玉米素。

合成路线



(三) 反-4-氨基-1-羟基-2-甲基-丁烯-2



(四) 反-玉米素

制备方法

所用原料,除异戊二烯为瑞士 Fluka 厂出品外,均为国产试剂级。

反-1-溴-2-甲基-4-邻苯二甲酰亚胺-丁烯-2 的制备:

2.50 克 (1.50 克分子) 溴溶于 250 毫升四氯化碳中, 逐滴加入到 $0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$ 的 109 克 (1.6 克分子) 异戊二烯溶于 640 毫升四氯化碳的溶液中。滴加时不断在氮气流下搅拌, 约两个小时加毕。在 30°C 水浴中旋转蒸发到干。为除去残留物中低沸点杂质, 升高水浴温度到 70°C ; 当已无低沸液明显蒸出时立即停止蒸发。得暗黄色油状物 346 克, 即为二溴化物混合物, 其中含有约 70% (一) 反-1, 4-二溴-2-甲基-丁烯-2。使溶于 1450 毫升二甲基甲酰胺中, 冷却到 $0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$, 在剧烈搅拌下缓缓加入 216 克 (1.17 克分子) 细粉状邻苯二甲酰亚胺钾^[4]; 约三个小时加毕。继续搅拌两小时。把反应混合

物加入到三升冰水混合物中，析出重的油状物逐渐转变成固体。抽滤收集，用水洗三次。在滤干的固体中加入 250 毫升正己烷，充分搅匀后放冰箱过夜。抽滤收集，用正己烷和很少量的甲醇各洗一次后室温真空干燥。得粗制(二)反-1-溴-2-甲基-4-邻苯二甲酰亚胺-丁烯-2 约 250 克。熔点：84—90℃。产率按异戊二烯计算为 52.4%。不需进一步提纯。

反-4-氨基-1-羟基-2-甲基-丁烯-2 的制备

上述粗制中间体(二) 70 克(9.24 克分子)和 480 毫升 20% 氢氧化钾水溶液，搅拌加热回流三小时。反应混合物在冰浴冷却下用 2*N* 硫酸中和到 pH6.0—6.2。抽滤除去无机盐。滤液旋转蒸发到干。残留物用无水乙醇热抽提三次，每次 350 毫升。合并乙醇抽提液，旋转蒸发到干，得油状残留物约 52 克。使溶于 100 毫升水中，用 1*N* 硫酸调节到 pH2.0—2.2，有邻苯二甲酸沉淀析出，抽滤除去。滤液加水稀释到 36 升，上华东强酸 1 × 8(100—200 目) 氢型阳离子交换树脂(上海化工学院树脂厂)层析柱(树脂层高 26 厘米；直径 8.2 厘米)。流速每分钟 40 毫升。上柱完毕后，用 15 升水洗柱，再用 98 升 0.05*N* 氢氧化铵、46 升 0.1*N* 氢氧化铵和 12 升 0.5*N* 氢氧化铵洗脱，除去各种异构体。最后，用 1.5*N* 氢氧化铵将(三)反-4-氨基-1-羟基-2-甲基-丁烯-2 洗脱下来。收集的各瓶取样点于滤纸条上(各约 15 次)，吹干，喷以 0.5% 茚三酮的丙酮溶液，100℃ 加热 10 分钟。凡无

显色反应者弃去之，呈黄色反应的再作纸层析检定。层析柱分离提纯情况(洗出液 pH 值的变化和纸层析检定结果)如图 1 所示。

合并第 22—36 瓶部分(约 7.5 升)。旋转蒸发到干，在五氧化二磷上室温真空干燥到恒重。得(三) 5.7—6.4 克(23.5—26.2%)。纸层析及其硫酸盐熔点检定表明和用 M. Ohsugi 等报道的方法所制得的数据相一致。

反-玉米素的制备

11.6 克(114 毫克分子)(三)反-4-氨基-1-羟基-2-甲基-丁烯-2 使溶于 266 毫升正丁醇中。加 14.6 克(94.5 毫克分子) 6-氯嘌呤^[1]和 14.7 毫升三乙胺。搅拌加热回流三小时，缩合反应即告完成。因玉米素在热正丁醇中溶解度较在冷正丁醇中大得多，趁热抽滤除去少量不溶物，少量热正丁醇洗涤一次。合并滤液，冷却后即有大量玉米素结晶析出。抽滤收集结晶，用少量正丁醇和乙醚各洗两次，真空干燥，得粗制玉米素 18 克。粗品再先后用正丁醇和水各重结晶一次，得鳞片状白色玉米素结晶 13.4 克(53.6%)。

重结晶母液合并浓缩后，可回收约 1 克质量稍差的玉米素。

反-玉米素的分析鉴定

1. 熔点 206—208℃(美国 Sigma 公司的反-玉米素为 204—206℃；两者之混合熔点为 204—205℃)。

2. 硅胶薄板层析 材料：Kieselgel HF₂₅₄

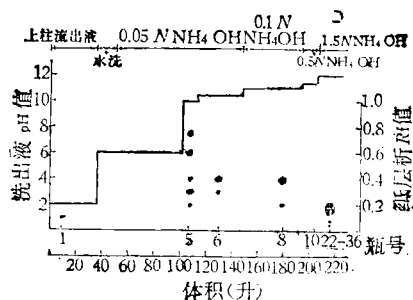


图 1 层析柱分离提纯中间体(三)的情况
各瓶取样分别浓缩 50—100 倍后作纸层析检定；纸层析(上行)溶剂系统：正丁醇：甲酸：水(15:3:2)

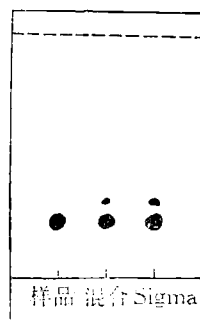


图 2 玉米素的硅胶薄板层析
(a) 1.66(s); (b) 3.84(s);
(c) 4.21(m); (d) 5.58(t)

nach stahl E. Merck (Typ. 60) 溶剂系统: 氯仿: 甲醇 (9:1); 展层后, 在 2537 Å 紫外分析仪中观察。结果 (图 2) 表明样品为反-玉米素。 $(R_f = 0.24)$ 。不含顺-玉米素 ($R_f = 0.32$)^[6]。

3. 核磁共振 (溶剂: d_6 -DMSO, HMDS 作为内参考)。

4. 细胞分裂素苋红生物鉴定^[7] 玉米素、激动素 (N^6 -呋喃甲基腺嘌呤) 活性比较测定结果如图 3 所示。前者活性为后者的十倍。

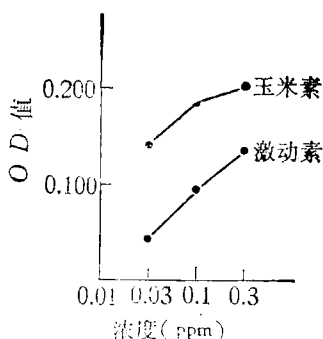


图 3 玉米素与激动素的活性比较

5. 玉米素在烟草叶组织培养中器官形成的研究^[8]中的应用表明, 它对烟草叶组织芽形成的促进作用活性最高; 浓度在 0.02 毫克/升时, 即明显促进芽的形成。6-苄基腺嘌呤次之, 激动素的促进作用较弱。

讨 论

到目前为止, 玉米素的合成方法, 仍较繁琐。本文参照 M. Ohsugi^[4] 方法, 四步可得到玉米素。我们发现: 在合成中间体 (二) 反-1-溴-2-甲基-4-邻苯二甲酰亚胺-丁烯-2 时, 经氯仿抽提, 5% 氢氧化钠和盐水洗涤等一系列反复提纯后, 粗产物 (二) 得率仅为 39.5%, 未能达到 M. Ohsugi 等所描述的 72%。可能是因合成中间体 (一) 反-1, 4-二溴-2-甲基-丁烯-2 时, 产物中混有约 30% 的三种异构体, 影响中间体 (二) 产率。

为此, 我们简化了提纯操作, 把含有各种副产物的粗制中间体 (二) 直接用氢氧化钾水溶液皂化、脱盐、再行阳离子交换树脂分离提纯,

可有效地分去各种异构体及残留的邻苯二甲酸, 得到纯度较高的中间体 (三) 反-4-氨基-1-羟基-2-甲基-丁烯-2。与茚三酮作用呈黄色反应, 可借纸层析法检验其纯度。由于这些异构体其氨基位置各不相同, 氨基的 pK 值各异, 对树脂的亲合力各有强弱, 可被不同浓度的氢氧化铵分别洗脱下来, 达到提纯目的。我们发现强酸型树脂较弱酸型为好, 细粒 (100—200 目) 较粗粒、氢型较铵型为好。

此外, 我们也曾另自反-1-乙酰氧基-2-甲基-4-邻苯二甲酰亚胺-丁烯-2 经氢氧化钡皂化而得到中间体 (三) 的硫酸盐。分别试作纸层析检定和树脂分离的对比实验, 结果表明在不同溶剂系统中展层后其 R_f 值与上述所得之中间体 (三) 完全一致。在树脂分离实验中, 中间体 (三) 可在 pH12 左右被洗脱下来, 结果完全与上述情况相同。两者的硫酸盐其熔点和混合熔点完全一致。由此说明, 在柱层析分离提纯工作中, 可在洗出液 pH 值上升到 11 时, 再开始分瓶收集之, 以简化操作。

关于异戊二烯, 吉林化工研究院和兰州化工研究所均曾有生产; 也可自热裂天然橡胶或柠檬萜制取。

承上海药物所分析室测定核磁共振谱, 上海植生所激素室鉴定生物活性, 上海植生所倪晋山和有机所陈海宝同志提出宝贵意见, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Letham, D. S. et al.: *Proc. Chem. Soc.*, **231**, 1964.
- [2] Letham, D. S. et al.: *Phytochemistry*, **10**, 2077, 1971.
- [3] Ohsugi, M. et al.: *Biol. Chem.*, **38**, 1925, 1974.
- [4] H. 盖尔曼等: 《有机合成》, 第一集, 94 页, 1957 年。
- [5] Kyowa Fermentation Industry Co.: Fr. 1464533, 1966; *CA*, **68**, 49655K, 1968.
- [6] Leonard, N. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3056, 1971.
- [7] Biddington, N. L. et al.: *Planta*, **111**, 183, 1973.
- [8] 许智宏、王熊、刘桂云: 《植物生理学报》, 1978 年, 4 卷 2 期, 177 页。

[本文于 1979 年 8 月 10 日收到]