

15-<sup>14</sup>C 标记青蒿素的合成\*

李 英 杨正修 陈一心 章 辛

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

青蒿素是从菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 中分离到的带有过氧基团的倍半萜内酯。青蒿素及其衍生物对各种疟疾(包括抗氯喹恶性疟和脑型疟)有强效、速效和对人类低毒的特点。因此,它们在体内的吸收、分布、排泄、代谢及对疟原虫的作用机制很快成为药理学家新的研究课题。青蒿素类化合物在体内易于代谢、降解,血药浓度很低,难于检测。一般认为,同位素标记化合物会有助于这类研究。至今已有<sup>14</sup>C,<sup>2</sup>H 或<sup>3</sup>H 标记的青蒿琥酯、蒿甲醚和蒿乙醚被合成和使用(图1,1~7)。

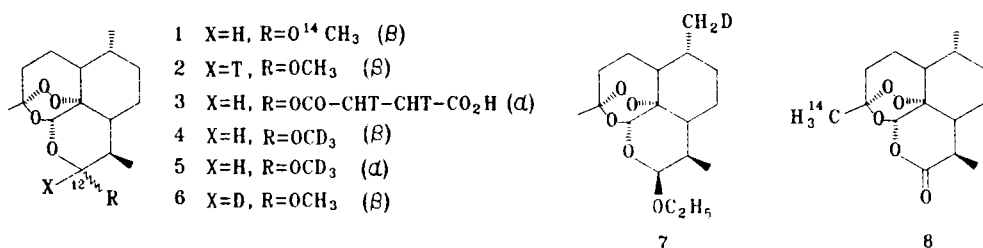


Fig 1 Labeled artemisinin and its derivatives.

我们注意到青蒿素的各种化学转化产物与代谢物中15-甲基都得以保留,因此[15-<sup>14</sup>C]青蒿素(8)应比在12位标记的化合物(1~6)更稳定,更有使用价值。于是,8成了合成目标物(图1)。

采用青蒿素酸性降解产物双酮作初始原料,参照文献<sup>(1,2)</sup>制成化合物9,9的酮基为引进<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>提供了机会。9与[<sup>14</sup>C]碘甲烷发生格氏反应生成由一对差向异构体组成的混合物10。在下步的酸性脱水反应中生成化合物11与12。不经分离,将它们水解成游离酸13和[15-<sup>14</sup>C]二氢青蒿酸14(图2)。从二氢青蒿酸合成青蒿素的方法早有报道<sup>(3)</sup>,但我们在重复这一工作时发现它需多次层析纯化和产率不稳定,不符合同位素合成的要求,因此转而选择生物转化的方法。汪猷等曾将[15-<sup>3</sup>H]青蒿酸在黄花蒿叶匀浆中成功地转化得[15-<sup>3</sup>H]青蒿素<sup>(4)</sup>,我们在此基础上改进了某些操作,完成了从[15-<sup>14</sup>C]二氢青蒿酸(14)至[15-<sup>14</sup>C]青蒿素(8)的转化,由9制备13与14的研究论文已经发表<sup>(5)</sup>。本文着重介绍从14转化成8的实验情况。

本文于1993年12月13日收到。

\*国家自然科学基金资助项目。

本文部分内容已在 WHO 召开的疟疾化疗科学工作组会议(1989年4月,北京)和第一次中加双边有机化学讨论会(1992年5月,加拿大朋夫)上报告。

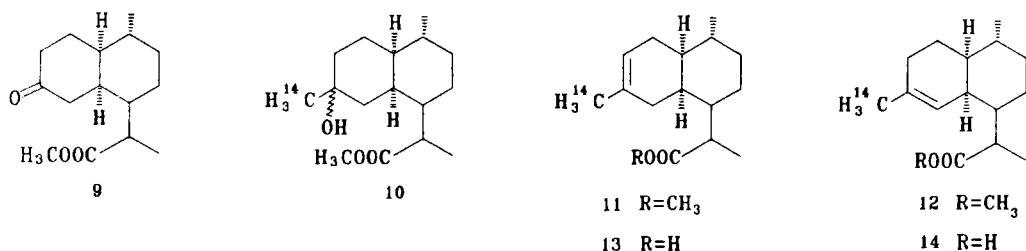


Fig 2 The chemical structures of some intermediates.

## 实验部分

[15-<sup>14</sup>C]二氢青蒿酸由本所合成,黄花蒿嫩叶取自种植于本所庭院内的植株,Tris-缓冲液由0.2 mol/L 三羟甲基氨基甲烷与0.1 mol/L HCl 配置而成,放射性采用 LKB 1219型液体闪烁仪测定。

取新鲜采集的黄花蒿成熟期的顶端嫩叶20 g,用水洗净、剪细、加入 Tris-缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.0或7.3)50 ml,掺加石英砂后在研钵中充分研磨。用离心机离心15 min(3000 g/min),吸取上清液,立即使用或放置低温冰箱(-30℃)备用。

将化合物13与14的混合物(1:1,总放射活性3.26 MBq)100 mg,溶于少量50% Triton 100的水溶液与上述制备的上清液40~50 ml,在30℃或37℃孵育4 h,然后加入天然青蒿素100 mg,将此混合物在100℃加热5 min后冷却,分离纯化。我们试用过两种纯化方法,A法:用氯仿提取二次,提取液用无水 MgSO<sub>4</sub>干燥,浓缩后的残存物用制备性薄层层析纯化[硅胶,石油醚-乙酸乙酯(7:3)]。以天然品作对照,取 R<sub>f</sub> 值相同的色带,用乙酸乙酯充分洗脱,洗脱液浓缩后所得的粗产品为黄绿色固体。B法:用石油醚(bp. 60~90℃)提取二次,有机层用无水 MgSO<sub>4</sub>干燥,浓缩后的残余物即为白色固体。由于B法简洁,不影响收率,故大多数实验采用该法。二种方法得到的粗产品用二氯甲烷-石油醚反复重结晶3~5次,直至比放射性恒定。最后计算放射性掺入率。[15-<sup>14</sup>C]青蒿素的平均回收率约为30%,所得产品用 TLC 检测[硅胶,石油醚-乙酸乙酯(7:3)],R<sub>f</sub> 值与天然标准品的相同,经用放射性法测定其放射性分布与 R<sub>f</sub> 值完全符合。其比放射性在193 Bq/mg 或54 KBq/mmmole 以上(根据所用的[15-<sup>14</sup>C]二氢青蒿酸的比放射性和用量多少而异)。

我们推测这一生物转化过程比较复杂,影响因素较多,如采集黄花蒿叶的日期不同对叶内酶含量的影响,缓冲液的 pH 值,孵育温度,光照及周围气氛对生物转化的影响。因而设计了多因子的实验。结果见表1。

Tab 1 The results of incorporation of 14 compounds to 8

Run No	Collection season	Buffer pH	Incubation temp(°C)	Irradiation	Atmosphere	Isolation method	Rate of incorporation (%)	Mean rate of incorporation (%)
1	July	7	30	no	oxygen	A	1.40	
2	July	7	30	no	oxygen	A	0.70	
3	July	7	30	no	oxygen	A	1.40	
4	August *	7	30	yes	oxygen	B	1.29	
5	early Sept. **	7	30	yes	oxygen	B	1.37	1.17
6	Sept.	7	30	yes	oxygen	B	0.63	
7	early Sept. ***	7	30	yes	air	B	1.28	
8	early Sept. ***	7.3	30	yes	air	B	1.29	
9	August	7.3	37	no	air	B	0.23	
10	August	7.3	37	no	air	B	0.38	0.26
11	early Sept.	7.3	37	no	air	B	0.18	

\* The supernatant liquid kept at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 2 months was used

\*\* The supernatant liquid kept at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 12 months was used

\*\*\* The supernatant liquid kept at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 6 months was used

## 讨 论

我们从青蒿素降解产物双酮出发,用化学方法合成到 $[15-^{14}\text{C}]$ 二氢青蒿酸(14),继而用生物转化法得到 $[15-^{14}\text{C}]$ 青蒿素(8),在孵育温度 $30^{\circ}\text{C}$ ,缓冲液 pH 7.0或7.3时,平均放射性掺入率为1.17%。

比较第1~8批的实验结果,我们认为,黄花蒿叶采集月份(7月~9月初)、缓冲液 pH 值(7.0或7.3)、反应是否用100瓦钨灯光照或反应容器中是否通氧气都不是影响这一生物转化的主要因素。

从第9~11批的实验结果可以看出,孵育温度是关键的影响因素。

黄花蒿叶中的酶在低温( $-30^{\circ}\text{C}$ )保存数月甚至一年后仍保持原有活力。这些稳定性能好的酶值得进一步探讨研究。

本实验中化合物10的酸性脱水反应没有区域选择性,同时生成了生物转化前体14和它的异构体13。我们发现13的存在并不影响14转化为标记青蒿素。

生物转化的实验将为合成高比放射性的 $[^{14}\text{C}]$ 青蒿素提供有益的参考数据。

**关键词** 标记青蒿素;生物合成;黄花蒿叶

## 参 考 文 献

- 1 Li Y, et al. Studies on analogs of qinghaosu VI. Synthesis of dihydroartemisinic acid from the degradation product of qinghaosu-diketone. *Acta Pharm Sin* 1986;21:899.
- 2 Wu YL, et al. Studies on the synthesis of qinghaosu and its analogs-reconstruction of qinghaosu from its degradation product. *Acta Chim Sin* 1985;43:901.
- 3 Xu XX, et al. Studies on the structure and synthesis of arteannuin and related compounds X. Stereoccontrolled syntheses of arteannuin and deoxyarteannuin from arteannuin acid. *Ibid* 1983;41:574.

- 4 Wang Y, et al. Studies on the biosynthesis of arteannuin III. Arteannuic acid as a key intermediate in the biosynthesis of arteannuin and arteannuin B. *Ibid* 1988;46:386.
- 5 Zhang X, et al. Synthesis of [ $^{15}\text{-}^{14}\text{C}$ ] dihydroartemisilactone. *Nucl Techniques* 1993;16:759.

## SYNTHESIS OF [ $^{15}\text{-}^{14}\text{C}$ ] LABELED ARTEMISININ

Y Li, ZX Yang, YX Chen and X Zhang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** [ $^{15}\text{-}^{14}\text{C}$ ] Artemisinin (**8**) was prepared by the biosynthesis of [ $^{15}\text{-}^{14}\text{C}$ ] dihydroartemisic acid (**14**) which was synthesized from diketone in 6 steps. A supernatant liquid prepared from the tender leaves of ripe Shanghai Qinghao (*Artemisia annua* L.) was incubated with the mixture of compounds **13** and **14** (100 mg, total activity 3.26 MBq,  $^{13}\text{:}^{14}=1\text{:}1$ ) at 30°C or 37°C for 4 hr. After the addition of natural artemisinin (100 mg), the mixture was heated at 100°C for 5 min, and extracted with chloroform (method A) or petroleum ether (bp. 60~90°C, method B). The extract was evaporated and the residue was recrystallized (method B) or purified by preparative thin layer chromatography (method A). The crude product was recrystallized from methylene chloride—petroleum ether to yield **8** with constant specific radioactivity. The mean rate of incorporation in runs 1~8 was 1.17%.

The possible influence factors of the biotransformation were studied. The incubation temperature was considered as a key factor.

**Key words** Labeled artemisinin; Biosynthesis; Leaves of *Artemisia annua*