

青蒿素 10 位碳取代优势构型的立体选择性合成及不同酸碱性基团对其抗疟活性的影响

张玉婷¹, 魏春燕^{2*}, 张崇敬^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院病原学系, 北京 100005)

摘要: 青蒿素是一种含过氧桥键结构的倍半萜内酯类天然产物, 具有抗疟、抗肿瘤、抗病毒和抗纤维化等药理活性。由于青蒿素原药的药代性质较差, 目前在临床使用及在科研中报道的都是青蒿素的衍生物。尽管有很多青蒿素衍生物的报道, 但是不同酸碱性基团对青蒿素抗疟活性的影响并没有报道。此外, 青蒿素 10 位以 C-C 键相连的衍生物经常报道, 并且 10 位 C-C 键衍生物 10 β 异构体的抗疟活性是其 10 α 异构体的 20 倍。但是, 目前并没有高效的不对称合成方法用于合成 10 位 C-C 键衍生物的优势构型 (10 β 异构体)。针对这两个科学问题, 首先优化反应条件确立了青蒿素 10 位碳取代衍生物的优势构型的不对称合成方法, 显著提高了 10 β 异构体的比例 (98:2 d.r.)。其次, 利用优化的合成方法, 在青蒿素 10 位通过 C-C 键引入了酸性、碱性和中性基团。抗疟活性测试表明, 含有中性取代基的化合物 DHA-O1、DHA-O2 和含有碱性取代基的短链化合物 DHA-N2 具有与双氢青蒿素 (DHA) 相当的抗疟活性, IC₅₀ 值分别为 11.39 \pm 4.66、14.04 \pm 3.14 和 9.17 \pm 4.57 nmol·L⁻¹。酸性取代基显著降低青蒿素的抗疟活性, 其对应化合物 DHA-A1 和 DHA-A2 的活性相比双氢青蒿素降低了 22 倍多。本研究为获得抗疟活性更高的青蒿素衍生物和类似物提供了理论依据和技术基础。

关键词: 青蒿素; 酸碱性; 立体选择性合成; 差向异构体; 抗疟药

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3691-10

The stereoselective synthesis of privileged epimer of C-10 carba artemisinins and the effect of substituted groups with different acid-base properties on the antimalarial activity

ZHANG Yu-ting¹, WEI Chun-yan^{2*}, ZHANG Chong-jing^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: Artemisinin is a sesquiterpene lactone natural product that contains an endoperoxide bond. Artemisinin has various biological activities including antimalarial, anti-tumor, antiviral and anti-fibrotic activity. Owing to the poor pharmacokinetic properties of artemisinin, its derivatives are currently used in clinic and frequently reported in literature. Although numerous derivatives of artemisinin have been reported, no study has

收稿日期: 2023-11-11; 修回日期: 2023-11-21.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (22007101); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-12M-2-002).

*通讯作者 Tel: 13161073739, E-mail: zhangchongjing@imm.ac.cn; weicypumc@pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1276

been carried out yet to study the effect of substituted groups with different acid-base property on the antimalarial activity. Among these derivatives, the C-10 carbon artemisinin derivatives are often reported, and their corresponding 10β epimer show much better antimalarial activity than 10α epimer with large-sized substitute. However, there is currently no stereoselective synthesis to efficiently prepare the privileged 10β epimer of C-10 carba artemisinin. To address these two scientific questions, we herein first report an optimized method to stereoselectively synthesize the 10β epimer of C-10 carba artemisinin (98:2 d.r.). Second, we employed the optimized method to synthesize a series of C-10 carba artemisinin derivatives with different acid-base properties. The antimalarial examination indicated that those derivatives with neutral groups or basic group of short chain showed similar antimalarial activity as dihydroartemisinin (DHA). The acidic group could dramatically decrease the antimalarial effect and was more than 22-fold less effective than DHA or the neutral ones. This study will shed light on the development of new generation of artemisinin derivatives with potent activity.

Key words: artemisinin; acid-base property; stereoselective synthesis; epimer; antimalarial

青蒿素是一种从菊科植物黄花蒿的叶子和花蕾中提取得到的含过氧桥结构的倍半萜内酯类天然产物^[1]。目前,青蒿素衍生物包括双氢青蒿素(DHA)、青蒿琥酯(ART)、蒿甲醚,在临床上对疟疾表现出很好的治疗效果^[2,3](图1)。但是,随着青蒿素及其衍生物的长期使用,疟原虫已经出现了耐药性^[4,5]。为了解决这个问题,世界卫生组织提出了青蒿素的联合治疗(ACTs)策略^[6],但是仍然没有办法阻止疟原虫耐药性的产生^[7,8]。有研究表明疟原虫的耐药性与药物药效降低有关^[9],因此,研发更高效的新型青蒿素衍生物至关重要。目前,随着世界各国的深入研究,在第一代青蒿素衍生物的基础上,已经研发了许多第二代青蒿素衍生物。并且,发现这些青蒿素衍生物还具有抗肿瘤、抗病毒、抗纤维化和免疫调节等作用^[10-13]。在这些衍生物中,青蒿素10位以C-C键相连的衍生物经常报道^[14-16],因为不会发生缩醛与醛的可逆反应,所以它们在酸性条件下更稳定^[17],并且也不会发生脱烷基生成具有神经毒性的双氢青蒿素^[18]。

在药物研发过程中,酸碱性与其他药理学参数同样重要。除了对化合物的溶解性有影响外,还会对化

合物的ADMET性质及药理学性质等产生影响^[19]。例如,中性药物较酸性或碱性药物组织渗透性更好。最早的Schanker等^[20]在“pH分配学说”中提出,化合物 $pK_a < 3$ 的酸性物质和 $pK_a > 8$ 的碱性物质在体内的吸收都不好。Palm等^[21]也发现非解离状态的分子更容易跨膜转运。但是,截至目前,有关青蒿素类衍生物的研究中并没有明确酸碱性对其抗疟活性的影响。

手性是自然界的基本属性,与化学、生命科学等多个领域息息相关^[22]。分子中手性中心的构型对于该分子的化学和物理性质起着决定性的作用。立体异构体往往存在优势异构体,它与手性受体(酶和蛋白质等)表现出更加明显的相互作用。因此各个手性异构体在药代动力学和药效上具有明显的差异^[23]。例如,地塞米松和倍他米松,它们均属于糖皮质激素类药物,二者的差异仅为C-16位的差向异构体,但是,研究表明,倍他米松是地塞米松疗效的1.5倍^[24](图2)。对帽柱木碱的研究中发现化合物mitragynine是阿片受体激动剂,而它C-20位的差向异构体spciogynine对阿片受体无激动剂作用,而是平滑肌松弛剂^[25](图2)。因此,在药物研发过程中,获得手性纯的化合物至关重要。

目前,10位以C-C键相连的青蒿素衍生物是通过双氢青蒿素与苯甲酰氯反应得到中间体,然后再与烯丙基三甲基硅烷在路易斯酸的作用下合成的。但是,这种方法得到的终产物存在差向异构体的问题,即得到的主要产物是 10β 异构体,但是仍然含有大约10%左右的无法分离的 10α 异构体^[26,27]。本课题组最近利用重结晶的方法对这两种异构体成功进行了分离,并发现当10位碳连接的是大基团时, 10β 异构体的抗疟活性是 10α 异构体的20多倍^[28]。但是,目前并没有高效的不对称合成方法用于合成10位C-C键衍生物的优势构型(10β 异构体)。

针对以上两个研究空白,首先优化反应条件确立

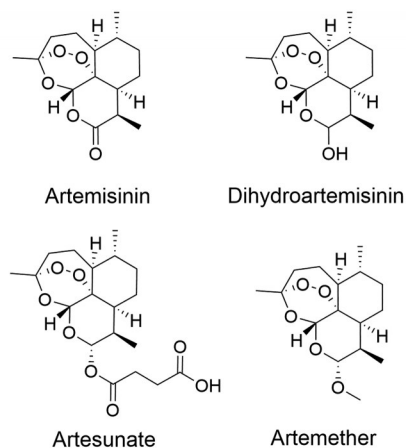


Figure 1 Chemical structures of artemisinin and its derivatives

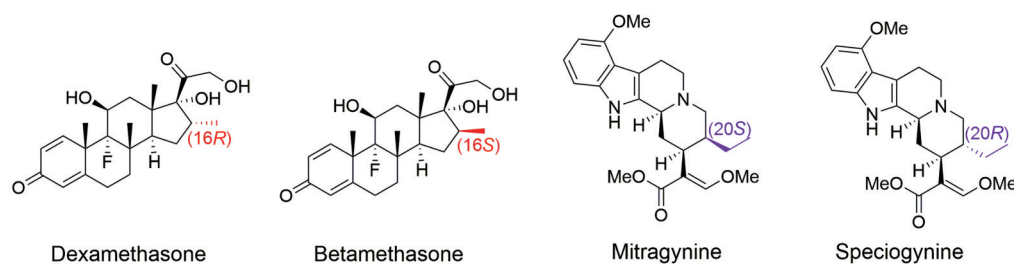


Figure 2 Chemical structures of dexamethasone, betamethasone, mitragynine, and speciogynine

了青蒿素 10 位碳取代衍生物的优势构型的不对称合成方法, 显著提高了 10β 异构体的比例。其次, 利用优化的合成方法, 在青蒿素 10 位通过 C-C 键引入了酸性、碱性和中性基团。抗疟活性测试表明含有中性取代基的化合物 DHA-O1、DHA-O2 和含有碱性取代基的短链化合物 DHA-N2 具有与双氢青蒿素相当的抗疟活性, IC_{50} 值分别为 11.39 ± 4.66 、 14.04 ± 3.14 和 $9.17 \pm 4.57 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。酸性取代基显著降低青蒿素的抗疟活性, 其对应化合物 DHA-A1 和 DHA-A2 的活性相比双氢青蒿素降低了 22 倍多。因此, 本研究为获得抗疟活性更高的青蒿素衍生物和类似物提供了理论和技术基础, 也为新型抗疟药的开发提供了思路。

结果与讨论

1 反应条件优化

在路易斯酸 ZnCl_2 的催化下, 烯丙基三甲基硅烷与 DHA-1 发生 Sakurai 烯丙基化反应的反应机制如图 3 所示, 在这一步产生了 10 位的两个差向异构体: 10β 异构体和 10α 异构体。

DHA-1 在路易斯酸 ZnCl_2 的催化下形成氧鎓离子中间体, 随后, 亲核试剂烯丙基三甲基硅烷可以从双键平面的两侧进攻, 但是位于双键平面下方的过氧桥结构形成的位阻影响, 阻碍了亲核试剂从平面下方进攻, 因此, 从平面上方进攻形成的 β 异构体是主要产物, 而从平面下方进攻形成的 α 异构体所占比例较少。基于这一反应机制, 通过将反应条件逐步变得更加严苛或增加亲核试剂位阻等策略优化反应条件。反应条

件的改变包括硅烷试剂 (2a) 的选择、反应原料的投料比、反应温度、分子筛的有无等方面, 具体的实验结果如表 1 所示。最终, 在反应条件为: -20°C 情况下, 在路易斯酸 ZnCl_2 催化下, 烯丙基二甲基苯基硅烷 (5 当量) 作为亲核试剂时, 将 10β 异构体的比例提高到了 98.1% (图 4)。

2 含有酸性、中性和碱性基团的青蒿素 10 位碳取代化合物的合成

在本研究中, 设计的酸性、中性和碱性基团分别为脂肪酸、羟基和氨基。这些基团通过不同长度的烷基连接在 10 位, 设计的化合物如图 5 所示。

目标化合物的合成如合成路线 1 所示。DHA 首先与苯甲酰氯发生亲核取代反应得到 DHA-1; 接着在路易斯酸 ZnCl_2 的催化下, 烯丙基三甲基硅烷作为亲核试剂与 DHA-1 发生 Sakurai 烯丙基化反应, 经过后处理的粗品, 通过反复重结晶得到光学纯的中间体 DHA-2。

在超干 THF 中, DHA-2 与硼烷二甲硫醚发生硼氢化反应, 反应完全后, 移至室温, 直接在反应体系中加入 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 和 30% H_2O_2 发生氧化反应, 最终得到目标产物 DHA-O1。

在 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (6:1) 为溶剂的情况下, 利用 RuCl_3 (35 mol%) 和 NaIO_4 将 DHA-2 的双键氧化断裂形成醛基, 随后经过后处理, 得到的粗品不纯化, 直接加入无水乙醇和 NaBH_4 发生还原反应得到目标产物 DHA-O2。

在 $\text{EA}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1.5) 为溶剂的情况下, 用合成的目标产物 DHA-O1 和 DHA-O2 为原料, 用 RuCl_3 和 NaIO_4 氧化, 分别得到目标产物 DHA-A1 和

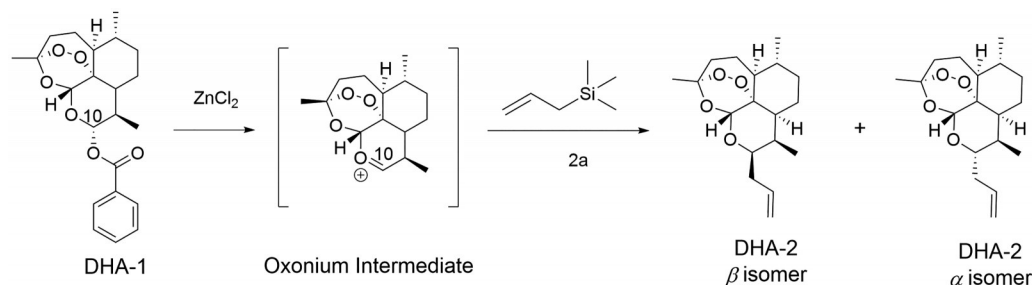
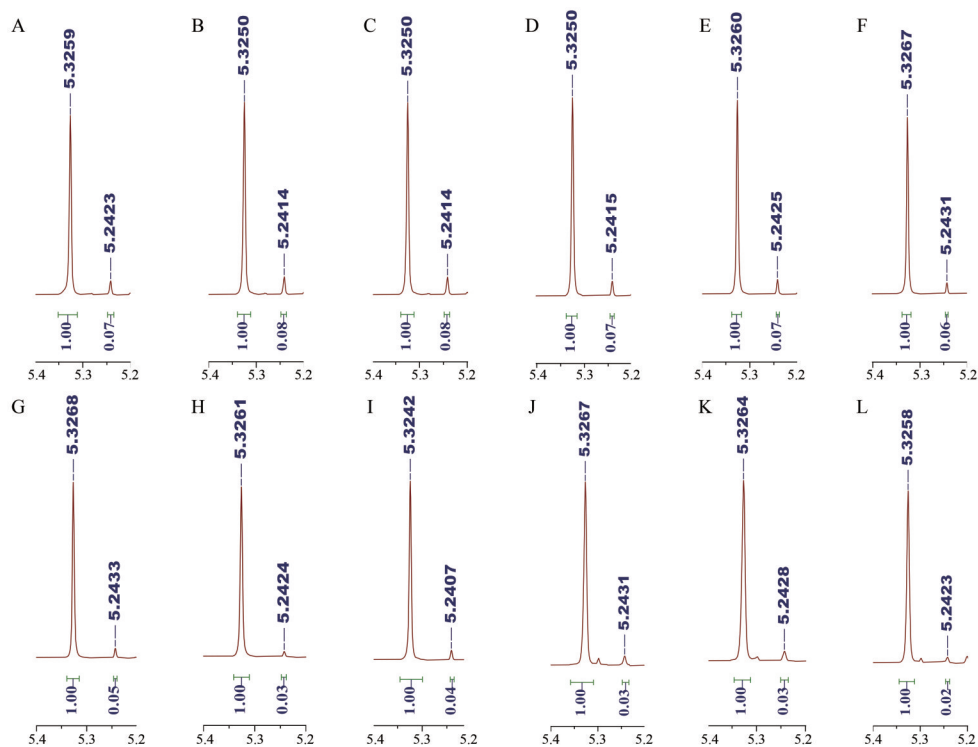


Figure 3 The mechanism of Hosomi-Sakurai reaction

Table 1 The optimization of Hosomi-Sakurai reaction to obtain the high ratio of 10 β epimer. The R group in 2a is allyl. Temp: Temperature. MS: Molecular sieve

Entry	DHA-1	2a	DHA-1:2a	Temp/°C	DHA-1:ZnCl ₂	4Å MS/mg	Yield/%	Ratio of 10 β /%
1	1 g	RSiMe ₃	1:5	0	1:1.2	600	80.5	93.5
2	1 g	RSiMe ₃	1:5	0	1:1.2	0	78.0	92.6
3	1 g	RSiMe ₃	1:5	-5	1:1.2	600	84.9	92.6
4	1 g	RSiMe ₃	1:5	-5	1:1.2	0	85.3	93.5
5	1 g	RSiMe ₃	1:5	-10	1:1.2	600	-	-
6	1 g	RSiMe ₃	1:5	-10	1:1.2	0	90.2	93.5
7	1 g	RSiMe ₃	1:5	-15	1:1.2	0	89.5	94.3
8	1 g	RSiMe ₃	1:5	-20	1:1.2	0	87.2	95.2
9	1 g	RSiMe ₃	1:5	-25	1:1.2	0	17.6	97.1
10	1 g	RSiMe ₃	1:2.5	-20	1:1.2	0	77	96.2
11	1 g	RSiEt ₃	1:2.5	-20	1:1.2	0	66.8	97.1
12	1 g	RSiEt ₃	1:5	-20	1:1.2	0	73.4	97.1
13	1 g	RSiMe ₂ Ph	1:5	-20	1:1.2	0	46.1	98.1

**Figure 4** The proportion of β configuration at C-10 position. A–L: The cropped ¹H NMR spectra of proton 12 in DHA-2 for the different conditions in the table 1. A for entry 1, B for entry 2, C for entry 3, D for entry 4, E for entry 6, F for entry 7, G for entry 8, H for entry 9, I for entry 10, J for entry 11, K for entry 12, L for entry 13

DHA-A2。

以 THF 为溶剂,用合成的 DHA-O1 作为原料与商业来源的邻苯二甲酰亚胺发生 Mitsunobu 反应(光延反应),经过硅胶柱色谱纯化得到含有少量苯甲酰亚胺的粗品中间体后,直接加入无水乙醇和 NH₂NH₂·H₂O 发生肼解反应得到目标产物 DHA-N1。

以 THF 为溶剂,用合成的 DHA-O2 作为原料与商业来源的邻苯二甲酰亚胺发生 Mitsunobu 反应(光延反应),经过硅胶柱色谱纯化得到含有少量苯甲酰亚胺的粗品中间体后,直接加入无水乙醇和 NH₂NH₂·H₂O

发生肼解反应得到目标产物 DHA-N2。

3 抗疟活性评估

用 5% D-山梨糖醇对恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 3D7 虫株进行两次连续同步化处理,使虫体处于环形期发育阶段^[29]。用基于 SYBR Green I 的疟原虫生长抑制试验^[25]检测 DHA-O1、DHA-O2、DHA-A1、DHA-A2、DHA-N1 和 DHA-N2 对 *P. falciparum* 3D7 的抗疟活性,并用 GraphPad Prism 9.5 软件分析其半数最大抑制浓度 (IC₅₀)。结果如图 6 所示。

从检测结果可以看到,含有中性取代基的 DHA-

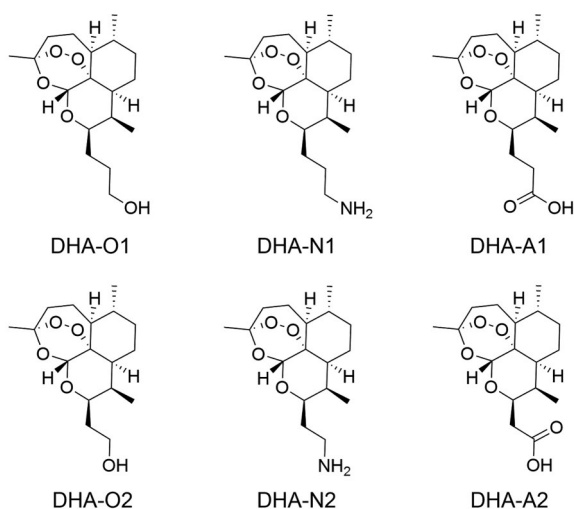


Figure 5 The structures of target compounds

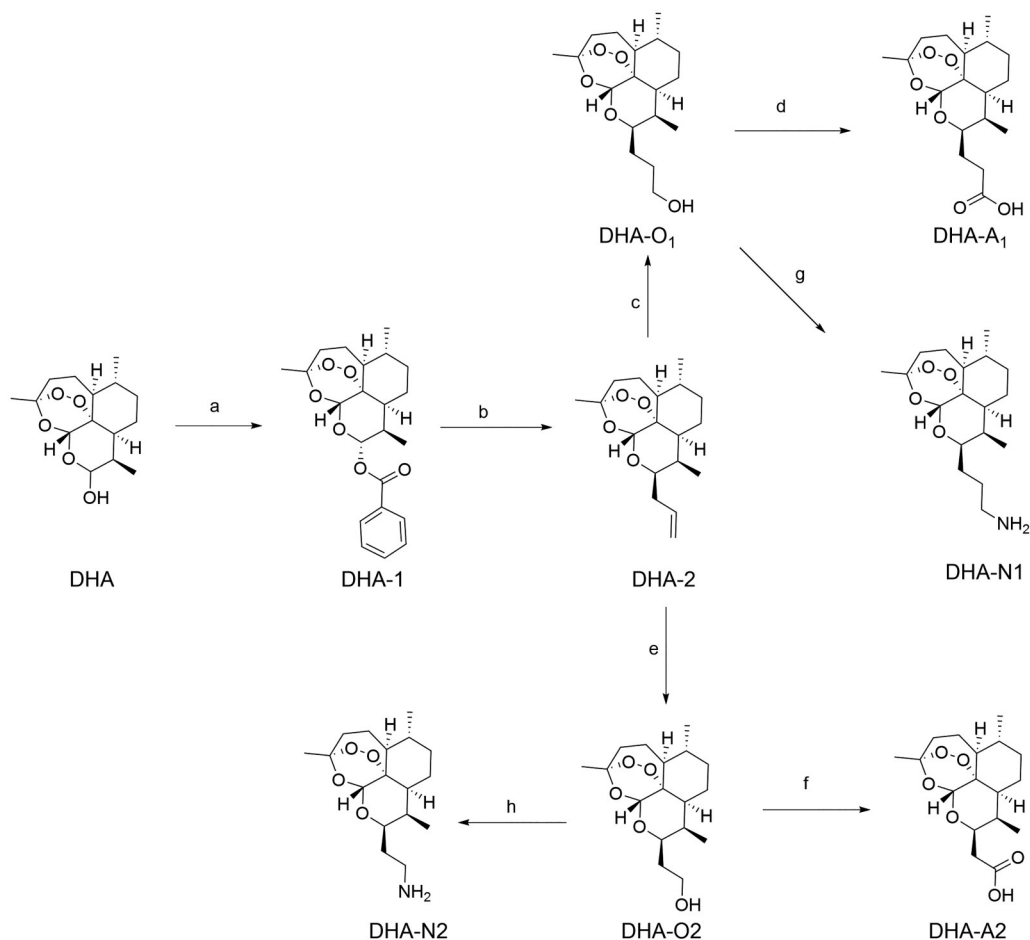
O1、DHA-O2 和含有碱性取代基的短链化合物 DHA-N2 的抗疟活性与双氢青蒿素无显著性差异, IC_{50} 值分

别为 11.39 ± 4.66 、 14.04 ± 3.14 和 9.17 ± 4.57 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而比 DHA-N2 多一个 C 原子的 DHA-N1 的抗疟活性与双氢青蒿素的活性相比降低了 6 倍。引入酸性取代基的 DHA-A1 和 DHA-A2 的抗疟活性显著降低, 比双氢青蒿素低了 22 倍以上。

青蒿素类衍生物能够产生抗疟活性主要是因为它们能够透过红细胞膜、纳虫空泡膜和疟原虫的细胞膜而进入疟原虫胞质中, 并与虫体细胞内积累的亚铁血红素反应, 形成自由基, 破坏虫体内的各种蛋白质, 从而导致虫体死亡。研究表明引入中性基团或者引入短链的碱性基团, 能够使青蒿素更好地通过多层细胞膜而具有更好的抗疟活性。

小结

本文基于 10 位以 C-C 键相连的青蒿素衍生物的合成机制, 对反应条件进行了优化, 最终在反应条件为:



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) Benzoyl chloride, pyridine, CH_2Cl_2 , RT. (b) AllylTMS, ZnCl_2 , 4 Å molecular sieves, anhydrous 1,2-dichloroethane, -10 °C, recrystallization with *n*-hexane. (c) 1) $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$, anhydrous THF, -20 °C; 2) $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 , 30% H_2O_2 , RT. (d) RuCl_3 , NaIO_4 , EA/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1.5), RT. (e) 1) RuCl_3 (35 mol%), NaIO_4 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (6:1), RT; 2) NaBH_4 , EtOH, RT. (f) RuCl_3 , NaIO_4 , EA/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1.5), RT. (g) 1) Ph_3P , phthalimide, DIAD, THF, 50 °C, 4 h; 2) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 50 °C. (h) 1) Ph_3P , phthalimide, DIAD, THF, RT, 4 h; 2) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 50 °C

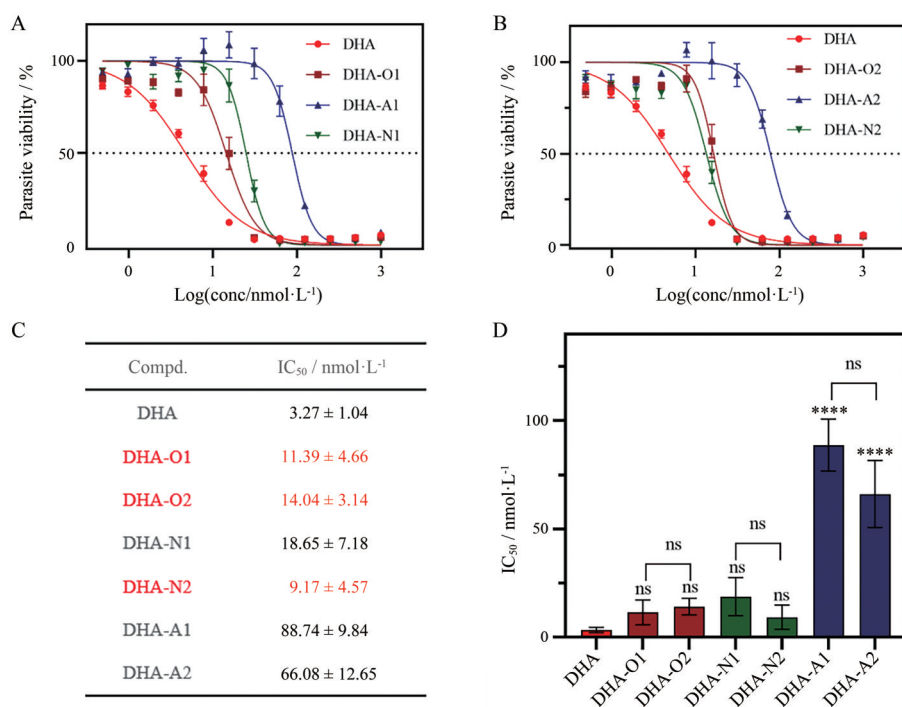


Figure 6 The viability of malaria parasite was measured in the presence of different concentrations of compound DHA, DHA-O1, DHA-A1 and DHA-N1 (A); DHA, DHA-O2, DHA-A2 and DHA-N2 (B). (C) The calculated IC₅₀ of the seven compounds (mean ± standard deviation). (D) Significant difference between target compound and DHA. Bar indicates the average of IC₅₀, *****P* < 0.000 1

-20 °C情况下, 路易斯酸 ZnCl₂催化下, 烯丙基二甲基苯基硅烷 (5 equiv) 作为亲核试剂时, 抗疟活性更高的 10β 异构体的比例可以提高到 98.1%。其次, 合成了 6 个 C-10 位连接中性、酸性和碱性取代的青蒿素衍生物, 并且对其抗疟活性进行了比较, 发现连接中性取代基的 DHA-O1、DHA-O2 和含有碱性取代基的短链化合物 DHA-N2 具有更好的抗疟活性, IC₅₀ 值分别为 11.39 ± 4.66、14.04 ± 3.14 和 9.17 ± 4.57 nmol·L⁻¹。因此, 引入中性基团或者是引入短链的碱性基团能够使青蒿素更好地通过多层细胞膜而具有更好的抗疟活性。本研究为获得抗疟活性更高的青蒿素衍生物和类似物提供了理论依据和技术基础。

实验部分

柱色谱硅胶 (200~300 目) 为北京步琦科技有限公司生产, 有紫外吸收的化合物用 254 nm 紫外灯监测, 无紫外吸收的化合物用碱性高锰酸钾显色监测。NMR 采用 QOne 400 MHz 核磁共振仪/ JEOL 500 MHz 核磁共振仪测定。所有试剂均为市售分析纯或化学纯, 除特别说明外, 一般不经纯化直接使用。

1 反应条件优化

加样顺序: 将含有 DHA-1 (1 g, 2.57 mmol) 的无水 1,2-二氯乙烷 (24 mL) 混合溶液通过恒压漏斗, 滴加

到含有 **2a**、无水氯化锌和 4 Å 粉末状分子筛 (600 mg 或 0 mg) 的无水 1,2-二氯乙烷 (24 mL) 搅拌混合物中, 用 TLC 监测反应情况。

后处理: 反应混合物用乙酸乙酯 (100 mL) 稀释, 并依次用 5% 的柠檬酸水溶液 (20 mL) (去除 4 Å 分子筛)、饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 和饱和食盐水 (20 mL) 洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。粗残余物通过快速柱色谱法 (硅胶, 石油醚: 乙酸乙酯 = 50:1~30:1) 纯化得到白色固体。

10α 异构体和 10β 异构体比例确定: 通过之前的研究, 了解到占比更多的 10β 异构体的 12 位 H 的化学位移为 5.31, 占比少的 10α 异构体的 12 位 H 的化学位移为 5.23^[28]。通过计算 10α 异构体在这两种差向异构体中所占的比例来反映实验结果。

2 目标化合物合成

2.1 合成 DHA-1 在冰水浴条件下, 向含有 DHA (10 g, 35.17 mmol) 的二氯甲烷 (109.0 mL) 中加入吡啶 (17.6 mL), 在搅拌的同时, 滴加苯甲酰氯 (6.5 mL, 56.27 mmol)。室温下搅拌 2 h 后, 通过 TLC 监测到 DHA 反应完全, 加入 7% 的柠檬酸水溶液 (96.8 mL)。随后, 分离有机层, 水层用二氯甲烷 (30 mL×2) 萃取。合并的有机相依次用 7% 的柠檬酸水溶液 (100 mL×4)、饱和碳酸氢钠 (100 mL) 和饱和食盐水 (100 mL) 洗涤。

合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩得到黄色油状物。粗品用无水乙醇(95 °C, 10 mL)重结晶纯化得到 9.374 g 白色固体 DHA-1, 收率为 68.6%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.01 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 2.79~2.71 (m, 1H), 2.39 (td, *J* = 14.1, 4.2 Hz, 1H), 2.05 (dt, *J* = 14.5, 4.3 Hz, 1H), 1.95~1.87 (m, 1H), 1.86~1.79 (m, 1H), 1.79~1.72 (m, 1H), 1.72~1.65 (m, 1H), 1.55~1.45 (m, 2H), 1.43 (s, 3H), 1.40~1.24 (m, 2H), 1.09~1.00 (m, 1H), 0.98 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 8.0, 3H)。

2.2 合成 DHA-2 将含有 DHA-1 (1 g, 2.57 mmol) 的无水 1,2-二氯乙烷 (24 mL) 混合溶液通过恒压漏斗滴加到含有烯丙基三甲基硅烷 (2 mL, 12.9 mmol)、无水氯化锌 (0.421 g, 3.1 mmol) 和粉末状分子筛 (600 mg) 的无水 1,2-二氯乙烷 (24 mL) 搅拌混合物中。在 0 °C 下搅拌 5 h 后,通过 TLC 监测到反应完全。随后,用乙酸乙酯 (100 mL) 稀释反应体系,并依次用 5% 的柠檬酸水溶液 (20 mL)、饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 和饱和食盐水 (20 mL) 洗涤。合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。随后在 50 °C 条件下,搅拌加入正己烷 (1 mL),冷凝回流直到粗品被完全溶解,冷却至室温后,放入 -4 °C 冰箱中冷却析晶,抽滤,用冷的正己烷洗涤晶体,随后,将滤液旋干,重复上述操作,经过 3 次重结晶,最终共得到 318 mg 白色固体 DHA-2, 收率为 40%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.0~5.9 (m, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.15~5.03 (m, 2H), 4.31 (ddd, *J* = 10.0, 6.1, 3.7 Hz, 1H), 2.73~2.63 (m, 1H), 2.45~2.35 (m, 1H), 2.32~2.15 (m, 2H), 2.03 (dt, *J* = 14.2, 4.2 Hz, 1H), 1.95~1.87 (m, 1H), 1.86~1.79 (m, 1H), 1.79~1.65 (m, 2H), 1.50~1.44 (m, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.38~1.20 (m, 3H), 1.00~0.91 (m, 3H), 0.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H)。

2.3 合成 DHA-O1 在 -20 °C 下,向含有 DHA-2 (5 g, 16.21 mmol) 的无水四氢呋喃 (81 mL) 搅拌溶液中滴加硼烷二甲硫醚 [2.0 mol·L⁻¹ in THF] (8.1 mL, 32.42 mmol), 滴加完毕后,在冰水浴下反应,5 h 后通过 TLC 监测到 DHA-2 反应完全,随后,除去冰水浴,在室温下缓慢加入饱和碳酸钠 (32.42 mL), 然后加入 30% 过氧化氢 (16.21 mL), 在室温下搅拌 30 min 后,用水 (200 mL) 稀释,用二氯甲烷 (50 mL×2) 萃取。合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到无色油。粗残余物通过硅胶柱色谱法 (石油醚:乙酸乙酯 = 4:1~2:1) 进行纯化,得到 3.488 g 白色固体 DHA-O1, 收率为 61.3%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.33 (s, 1H), 4.24 (ddd, *J* = 10.3, 6.1, 2.6 Hz, 1H), 3.77~3.64 (m, 2H), 2.71~

2.61 (m, 1H), 2.33 (ddd, *J* = 14.6, 13.4, 4.0 Hz, 1H), 2.03 (ddd, *J* = 14.6, 4.9, 3.1 Hz, 1H), 1.95~1.88 (m, 1H), 1.85~1.77 (m, 4H), 1.75~1.69 (m, 1H), 1.68~1.53 (m, 4H), 1.48~1.37 (m, 4H), 1.35~1.30 (m, 1H), 1.30~1.21 (m, 2H), 1.00~0.92 (m, 4H), 0.87 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 103.41, 89.41, 81.24, 75.19, 52.39, 44.30, 40.54, 37.45, 36.68, 34.56, 30.49, 27.35, 26.92, 26.22, 24.88, 24.84, 19.95, 13.01。HR-MS (ESI) for C₁₈H₃₀O₅ *m/z* [M+H]⁺: calcd, 327.216 6; found, 327.215 7。

2.4 合成 DHA-O2 在冰水浴条件下,向 100 mL 单口瓶中加入三氯化钨 (0.024 g, 0.113 mmol, 溶解在 250 μL 水中), 随后,在搅拌的情况下,依次加入水 (8.3 mL)、乙腈 (50 mL) 和 DHA-2 (1 g, 3.24 mmol), 最后加入高碘酸钠 (1.4 g, 6.48 mmol), 撤去冰水浴,在室温下反应,1 h 后监测到 DHA-2 反应完全。在反应体系中加入乙酸乙酯 (20 mL), 有机相依次用水 (14 mL×2) 和饱和食盐水 (10 mL) 洗,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,得到了 1.433 g 黄色的油状物,不纯化,在冰水浴中,直接在反应体系中加入无水乙醇 (19 mL), 在搅拌情况下,缓慢加入硼氢化钠 (0.349 g, 9.24 mmol), 撤去冰水浴,在室温下反应 30 min 后,通过 TLC 监测到反应完全。缓慢加入水 (15 mL) 淬灭反应,用二氯甲烷 (20 mL×2) 萃取水相,合并有机相,用饱和食盐水 (15 mL) 洗,用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩,通过硅胶柱色谱法 (石油醚:乙酸乙酯 = 4:1~2:1) 进行纯化,得到 430 mg 白色固体 DHA-O2, 收率为 42.6%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.36 (s, 1H), 4.45 (ddd, *J* = 11.5, 6.2, 2.2 Hz, 1H), 3.93~3.65 (m, 2H), 2.72~2.61 (m, 1H), 2.38~2.28 (m, 1H), 2.07~2.00 (m, 1H), 1.97~1.87 (m, 2H), 1.84~1.76 (m, 1H), 1.70~1.56 (m, 4H), 1.47~1.37 (m, 4H), 1.36~1.31 (m, 1H), 1.31~1.23 (m, 2H), 1.01~0.92 (m, 4H), 0.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 103.37, 89.34, 81.21, 74.49, 52.37, 44.24, 40.63, 37.44, 36.63, 34.52, 30.38, 30.19, 26.20, 24.83, 24.82, 20.30, 13.00。HR-MS (ESI) for C₁₇H₂₈O₅ *m/z* [M+H]⁺: calcd, 313.201 0; found, 313.200 0。

2.5 合成 DHA-A1 在冰水浴条件下,向 25 mL 单口瓶中加入三氯化钨 (0.002 8 g, 0.013 mmol), 随后,依次加入乙酸乙酯 (2.4 mL)、乙腈 (2.4 mL)、水 (3.6 mL) 和 DHA-O1 (0.2 g, 0.613 mmol), 最后在搅拌情况下,加入高碘酸钠 (0.397 g, 1.839 mmol), 撤去冰水浴,在室温下反应,1 h 后监测到 DHA-O1 反应完全,体系由黑棕色变成了橙色。用乙酸乙酯 (15 mL) 稀释反应体系,用饱和氯化铵溶液 (12 mL) 萃取,随后用乙酸乙酯 (6 mL)

萃取水相, 合并有机相, 用饱和食盐水 (10 mL) 洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 2:1) 进行纯化, 得到 184 mg 白色固体 DHA-A1, 收率为 88.2%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.31 (s, 1H), 4.87 (ddd, *J* = 11.6, 6.2, 2.3 Hz, 1H), 2.75~2.64 (m, 2H), 2.46 (ddd, *J* = 16.7, 8.6, 6.7 Hz, 1H), 2.32 (ddd, *J* = 14.6, 13.4, 4.0 Hz, 1H), 2.03 (ddd, *J* = 14.6, 4.8, 3.0 Hz, 1H), 1.97~1.85 (m, 2H), 1.85~1.71 (m, 2H), 1.69~1.59 (m, 2H), 1.48~1.41 (m, 1H), 1.40 (s, 1H), 1.35~1.31 (m, 1H), 1.31~1.22 (m, 2H), 1.00~0.92 (m, 4H), 0.89 (d, *J* = 7.6, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 179.49, 103.39, 89.08, 81.23, 74.91, 52.43, 44.39, 37.55, 36.65, 34.55, 32.10, 30.28, 26.14, 24.99, 24.82, 24.70, 20.30, 13.04。HR-MS (ESI) for C₁₈H₂₈O₆ *m/z* [M-H]⁻: calcd, 339.180 2; found, 339.179 4。

2.6 合成 DHA-A2 在冰水浴条件下, 向 10 mL 单口瓶中加入三氯化钨 (0.001 g, 0.005 mmol), 随后, 依次加入乙酸乙酯 (0.9 mL)、乙腈 (0.9 mL)、水 (1.35 mL) 和 DHA-O2 (0.072 g, 0.230 mmol), 最后在搅拌情况下, 加入高碘酸钠 (0.149 g, 0.69 mmol), 撤去冰水浴, 在室温下反应, 1 h 后监测到 DHA-O2 反应完全, 体系由黑棕色变成了橙色。用乙酸乙酯 (5 mL) 稀释反应体系, 用饱和氯化铵溶液 (5 mL) 萃取, 随后用乙酸乙酯 (6 mL) 萃取水相, 合并有机相, 用饱和食盐水 (6 mL) 洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:1) 进行纯化, 得到 58 mg 白色固体 DHA-A2, 收率为 77.1%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.37 (s, 1H), 4.88 (ddd, *J* = 10.6, 6.2, 3.3 Hz, 1H), 2.76~2.62 (m, 2H), 2.51 (dd, *J* = 15.8, 3.3 Hz, 1H), 2.33 (ddd, *J* = 14.6, 13.3, 4.0 Hz, 1H), 2.04 (ddd, *J* = 14.5, 4.8, 3.1 Hz, 1H), 1.98~1.90 (m, 1H), 1.83~1.76 (m, 1H), 1.74~1.65 (m, 2H), 1.46~1.37 (m, 4H), 1.32~1.24 (m, 3H), 1.01~0.93 (m, 4H), 0.88 (d, *J* = 7.6, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 176.15, 103.40, 89.50, 80.97, 71.07, 52.21, 43.99, 37.57, 36.57, 35.99, 34.48, 29.88, 25.95, 24.84, 24.79, 20.22, 12.85。HR-MS (ESI) for C₁₇H₂₆O₆ *m/z* [M-H]⁻: calcd, 325.164 6; found, 325.163 9。

2.7 合成 DHA-N1 向 25 mL 单口瓶中加入 DHA-O1 (0.1 g, 0.306 mmol)、三苯基膦 (0.161 g, 0.612 mmol) 和四氢呋喃 (10 mL), 在 50 °C 搅拌下加入邻苯二甲酰亚胺 (0.090 g, 0.612 mmol), 随后, 滴加偶氮二甲酸二异丙酯 (DIAD) (0.121 mL, 0.612 mmol), 50 °C 下反应 6 h 后, 冷却至室温, 旋干, 随后用乙酸乙酯 (15 mL) 和水 (10 mL) 萃取, 随后用饱和食盐水 (10 mL) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱

法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 15:1~10:1) 除去极性大的杂质, 得到了 130 mg 白色固体粗品。随后, 加入无水乙醇 (10 mL), 50 °C 下加入水合肼 (0.5 mL), 2 h 后通过 TLC 监测到反应完全, 冷却至室温, 将混合物倒入到 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 (50 mL) 中, 并用二氯甲烷 (25 mL×2) 萃取, 随后用饱和食盐水 (20 mL) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱法 (二氯甲烷: 甲醇: 氨水 = 10:1:0.02), 得到了 55 mg 白色固体, 收率为 55%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.36 (s, 1H), 4.25 (ddd, *J* = 9.6, 6.1, 2.9 Hz, 1H), 3.16~2.99 (m, 2H), 2.67~2.57 (m, 1H), 2.36~2.26 (m, 1H), 2.03 (dt, *J* = 14.5, 4.1 Hz, 1H), 1.98~1.84 (m, 3H), 1.81~1.74 (m, 1H), 1.70~1.59 (m, 4H), 1.45~1.36 (m, 4H), 1.35~1.20 (m, 5H), 1.00~0.92 (m, 4H), 0.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 103.41, 89.41, 81.24, 75.19, 52.39, 44.31, 40.54, 37.44, 36.68, 34.56, 30.49, 27.35, 26.91, 26.22, 24.87, 24.84, 20.33, 13.01。HR-MS (ESI) for C₁₈H₃₁NO₄ *m/z* [M+H]⁺: calcd, 326.232 6; found, 326.232 1。

2.8 合成 DHA-N2 向 25 mL 单口瓶中加入 DHA-O2 (0.104 g, 0.335 mmol)、三苯基膦 (0.176 g, 0.67 mmol) 和四氢呋喃 (10 mL), 在室温搅拌下加入邻苯二甲酰亚胺 (0.099 g, 0.67 mmol), 随后, 滴加偶氮二甲酸二异丙酯 (DIAD) (0.132 mL, 0.67 mmol), 室温下反应 6 h 后, 旋干, 随后用乙酸乙酯 (15 mL) 和水 (10 mL) 萃取, 随后用饱和食盐水 (10 mL) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱法 (石油醚: 乙酸乙酯 = 20:1~10:1) 除去极性大的杂质, 得到了 129 mg 白色固体粗品。随后, 加入无水乙醇 (10 mL), 50 °C 下加入水合肼 (1 mL), 2 h 后通过 TLC 监测到反应完全, 冷却至室温, 将混合物倒入到 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 (50 mL) 中, 并用二氯甲烷 (25 mL×2) 萃取, 随后用饱和食盐水 (20 mL) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 通过硅胶柱色谱法 (二氯甲烷: 甲醇: 氨水 = 10:1:0.02), 得到了 70 mg 白色固体, 收率为 67.1%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.40 (s, 1H), 4.39 (ddd, *J* = 11.4, 6.2, 2.2 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 3.31~2.80 (m, 2H), 2.69~2.59 (m, 1H), 2.07~1.97 (m, 2H), 1.97~1.89 (m, 1H), 1.81~1.74 (m, 1H), 1.70~1.58 (m, 3H), 1.48~1.39 (m, 4H), 1.38~1.21 (m, 4H), 0.98~0.92 (m, 4H), 0.87 (d, *J* = 7.5, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 103.37, 89.34, 81.21, 74.49, 52.37, 44.24, 40.63, 37.44, 36.63, 34.52, 30.38, 30.18, 26.20, 24.82, 20.30, 13.00。HR-MS (ESI) for C₁₇H₂₉NO₄ *m/z* [M+H]⁺: calcd, 312.216 9; found, 312.216 5。

3 抗疟活性评估

采用已报道的基于 SYBR Green I 的疟原虫生长抑制测定方法^[28,30]对化合物进行抗疟活性测定: 将培养的恶性疟原虫 3D7 虫株用 5% *D*-山梨醇进行两次连续同步化处理, 并用未感染红细胞和完全培养基将其稀释至 0.5% 的虫血率和 2% 红细胞压积, 之后铺于 96 孔板。将被检测化合物用疟原虫完全培养稀释至工作浓度, 和上述疟原虫培养物共孵育于疟原虫培养箱, DMSO 作为空白对照, DHA 作为阳性对照; 作用 72 h 后, 加入含有 SYBR Green I (Invitrogen) 的裂解缓冲液, 在培养箱中静置 45 min 后使用 Synergy H1 Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) 测荧光, 激发和发射波长分别为 485 和 528 nm。所有样品共进行了 3 次生物学重复, 每次每个样品分别设 3 个平行组。荧光检测结果用软件 GraphPad Prism 9.5 绘制剂量-反应曲线, 并计算化合物对 *P. falciparum* 3D7 恶性疟原虫的半数最大抑制浓度 (IC₅₀)。

作者贡献: 张玉婷完成了合成实验和论文的初稿; 魏春燕完成了化合物抗疟活性检测; 张崇敬设计了整个课题的设计、实验结果的讨论与论文的修改。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Miller LH, Su XZ. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden [J]. Cell, 2011, 146: 855-858.
- [2] Yang J, He YK, Li YB, et al. Advances in the research on the targets of anti-malaria actions of artemisinin [J]. Pharmacol Ther, 2020, 216: 107697.
- [3] Woodrow CJ, White NJ. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41: 34-48.
- [4] Noedl H, Se Y, Schaefer K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia [J]. N Engl J Med, 2008, 359: 2619-2620.
- [5] Dondorp AM, Yi P, Silamut K, et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum Malaria [J]. N Engl J Med, 2009, 361: 455-467.
- [6] Guo ZR. Artemisinin anti-malarial drugs in China [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6: 115-124.
- [7] Amaratunga C, Dhorda M, Dondorp AM, et al. Triple artemisinin-based combination therapies for malaria - a new paradigm? [J]. Trends Parasitol, 2021, 37: 15-27.
- [8] Das S, Manna S, Saha B, et al. Novel *pfkelch13* gene polymorphism associates with artemisinin resistance in eastern India [J]. Clin India Dis, 2019, 69: 1144-1152.
- [9] Wicht JW, Mok S, Fidock DA. Molecular mechanisms of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria [J]. Annu Rev Microbiol, 2020, 74: 431-454.
- [10] Li Y, Zeng ZW, Chen D, et al. Facilitated drug repurposing with artemisinin-derived PROTACs: unveiling PCLAF as a therapeutic target [J]. J Med Chem, 2023, 66: 11335-11350.
- [11] Efferth T. Beyond malaria: the inhibition of viruses by artemisinin-type compounds [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36: 1730-1737.
- [12] Dolivo D, Weathers P, Dominko T. Artemisinin and artemisinin derivatives as anti-fibrotic therapeutics [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 322-339.
- [13] Yao WB, Wang F, Wang H. Immunomodulation of artemisinin and its derivatives [J]. Sci Bull, 2016, 61: 1399-1406.
- [14] Ma JY, Katz E, Kyle DE, et al. Syntheses and antimalarial activities of 10-substituted deoxyartemisinins [J]. J Med Chem, 2000, 43: 4228-4232.
- [15] O'Dowd H, Ploypradith P, Xie SJ, et al. Antimalarial artemisinin analogs. Synthesis *via* chemoselective C-C bond formation and preliminary biological evaluation [J]. Tetrahedron, 1999, 55: 3625-3636.
- [16] Posner GH, Parker MH, Northrop J, et al. Orally active, hydrolytically stable, semisynthetic, antimalarial trioxanes in the artemisinin family [J]. J Med Chem, 1999, 42: 300-304.
- [17] Jung M, Li, X, Bustos DA, et al. Synthesis and antimalarial activity of (+)-deoxyartemisinin [J]. J Med Chem, 1990, 33: 1516-1518.
- [18] Nontprasert A, Marika NB, Sasithon P, et al. Assessment of the neurotoxicity of parenteral artemisinin derivatives in mice [J]. Am J Trop Med, 1998, 59: 519-522.
- [19] Manallack DT, Prankerd RJ, Yuriev E, et al. The significance of acid/base properties in drug discovery [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42: 485-496.
- [20] Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, et al. Absorption of drugs from the rat small intestine [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1958, 123: 81-88.
- [21] Palm K, Luthman K, Ros J, et al. Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 291: 435-443.
- [22] Cheng QS, Ma Q, Pei HB, et al. Chiral membranes for enantiomer separation: a comprehensive review [J]. Sep Purif Technol, 2022, 292: 121034.
- [23] Dou XQ, Wu BB, Liu JY, et al. Effect of chirality on cell spreading and differentiation: from chiral molecules to chiral self-assembly [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11: 38568-38577.
- [24] Garrud TAC, Teulings NEWD, Niu YG, et al. Molecular mechanisms underlying adverse effects of dexamethasone and betamethasone in the developing cardiovascular system [J]. FASEB J, 2023, 37: 22887.
- [25] Schotte C, Jiang YD, Grzech D, et al. Directed biosynthesis of mitragynine stereoisomers [J]. J Am Chem Soc, 2023, 145: 4957-4963.

- [26] O'Neill PM, Pugh M, Stachulski AV, et al. Optimisation of the allylsilane approach to C-10 deoxy carba analogues of dihydroartemisinin: synthesis and *in vitro* antimalarial activity of new, metabolically stable C-10 analogues [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 2001, 20: 2682-2689.
- [27] Hindley S, Ward SA, Storr RC, et al. Mechanism-based design of parasite-targeted artemisinin derivatives: synthesis and antimalarial activity of new diamine containing analogues [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 1052-1063.
- [28] Wang FG, Xu SQ, Zhang CJ, et al. Stereochemistry and antimalarial activity of C-10 carba analogues of artemisinin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023, 93: 129414.
- [29] Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture [J]. *J Parasitol*, 1979, 65: 418-420.
- [30] Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1807-1810.