

新型青蒿素-酯类衍生物的合成及其抗癌活性研究

魏梦雪^a 徐建^a 张和^a 李学强^{*,a,b}^(a) 宁夏大学化学化工学院 银川 750021)^(b) 宁夏天然药物工程技术研究中心 银川 750021)

摘要 以双氢青蒿素为起始原料,经胺化、氧化、烷基化、酯化反应,快速、高效地合成了一系列青蒿素系列衍生物,目标化合物的结构通过 IR、¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 得到了确证;以四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法),研究了该类化合物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抗癌活性。初步研究结果表明,该类化合物具有明显地抑制人肝癌细胞增殖、诱导其凋亡的细胞活性,给药 72 h,半数抑制浓度 IC₅₀ 最优值为 0.06 μmol/L。同时采用 Annexin/PI 流式细胞分析法检测化合物 **7b** 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡情况,结果显示实验组与正常对照组相比人肝癌细胞早期凋亡率和总凋亡率均显著增加。在与青蒿素、双氢青蒿素(DHA)和青蒿素的对比实验中发现,该类化合物的抗肿瘤活性明显提高,表现出了该类化合物在抗癌药物开发方面具有潜在的应用价值。

关键词 青蒿素; 青蒿素; 酯类; 合成; 抗癌活性

Synthesis and Anti-tumor Effect of Artemisone Derivatives

Wei, Mengxue^a Xu, Jian^a Zhang, He^a Li, Xueqiang^{*,a,b}^(a) School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)^(b) Ningxia Engineering Research Center for Natural Medicines, Yinchuan 750021)

Abstract The artemisone was rationally designed to be attached with an ester unit, and a series of such artemisone derivatives were practically prepared from dihydroartemisinin. The synthetic route was combined with amination, oxidation, alkylation and esterification. All the new artemisone derivatives were identified by NMR, IR and HRMS technology. The anti-tumor activities of artemisone derivatives against human hepatoma SMMC-7721 cell lines were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric method. It revealed that they could obviously exert their inhibition of proliferation of the liver cancer cells by inducing apoptosis. Compound **7b** exhibited the most potent antiproliferative activity with IC₅₀ value of 0.06 μmol/L treatment for 72 h. Compared with artemisinin, dihydroartemisinin and artemisone, the new artemisone derivatives are superior to each of them in antitumor activity. These results are significant to the potential application of artemisone derivatives in the further development of new anticancer drugs.

Keywords artemisinin; artemisone; esters; synthesis; anti-tumor activity

青蒿素(Artemisinin)是从菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)叶中提取分离得到的一种具有过氧桥结构的倍半萜内酯类化合物^[1]。该类化合物具有高效、快速、低毒、安全等特点^[2],目前是一类非常重要的抗疟药物^[3]。双氢青蒿素(DHA)是青蒿素的一个重要衍生物,它不仅是青蒿素类药物的体内主要活性代谢产物之一,而且还是合成其它青蒿素类衍生物的重要中间体^[4~6]。据国内外研究报道,青蒿素及其衍生物除具有比较显著

的抗疟活性外,还表现出良好的抗肿瘤活性,如抗宫颈癌、抗肺癌、抗肝癌、抗卵巢癌、抗肠癌等^[7~14]。虽然青蒿素类化合物具有广谱生物活性,但是其在临床方面表现出来的神经毒性和细胞毒性却不容忽视^[15~20]。青蒿素作为青蒿素的一个重要衍生物,不仅具有优于青蒿素的抗疟活性,而且还表现出很低的细胞毒性^[21~26]。尽管其在抗疟方面的研究受到了广泛的关注,但是在抗肿瘤方面的研究却很少见^[27]。因此,青蒿素及其衍生物在

* E-mail: lixq@nxu.edu.cn

Received September 24, 2014; revised October 28, 2014; published online January 28, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21462032, 21062014) and the Research Starting Funds for Imported Talents of Ningxia University (No. 80020241).

国家自然科学基金(Nos. 21462032, 21062014)和宁夏大学人才引进科研启动基金(No. 80020241)资助项目。

抗肿瘤方面的研究具有重要的价值和意义。

现代药理学研究表明,许多含杂原子的化合物具有特殊的生物活性,特别是含氮杂环类化合物,如含哌嗪、硫代吗啉等杂原子基团的化合物均表现出良好的抗肿瘤活性^[28-30],含杂原子的青蒿素衍生物也表现出丰富的生物活性^[7,31,32]。另外,据文献报道,许多含羧基官能团的青蒿酯类化合物相应的钠盐表现出良好水溶性,从而增加药物的活性^[33-35]。这些报道对我们寻求活性更优的青蒿酯类抗癌药物具有重要的指导意义。

基于以上思路,我们希望以青蒿酮为母核,设计快速、高效地构筑酯基、羧基结构片段的方法,从而合成出既含有酯基、羧基结构,又含有青蒿素骨架的新型青蒿酮-酯类衍生物。试图通过这样的活性片段优化叠加,实现高效、低毒抗肿瘤药物的合成,从而为抗癌药物的筛选提供可靠的先导化合物。

1 结果与讨论

1.1 青蒿酮-酯类衍生物的合成

本文对新型青蒿酮-酯类衍生物的合成及其抗癌活性的研究进行了首次报道,目标化合物的具体合成路线如 Scheme 1 所示。

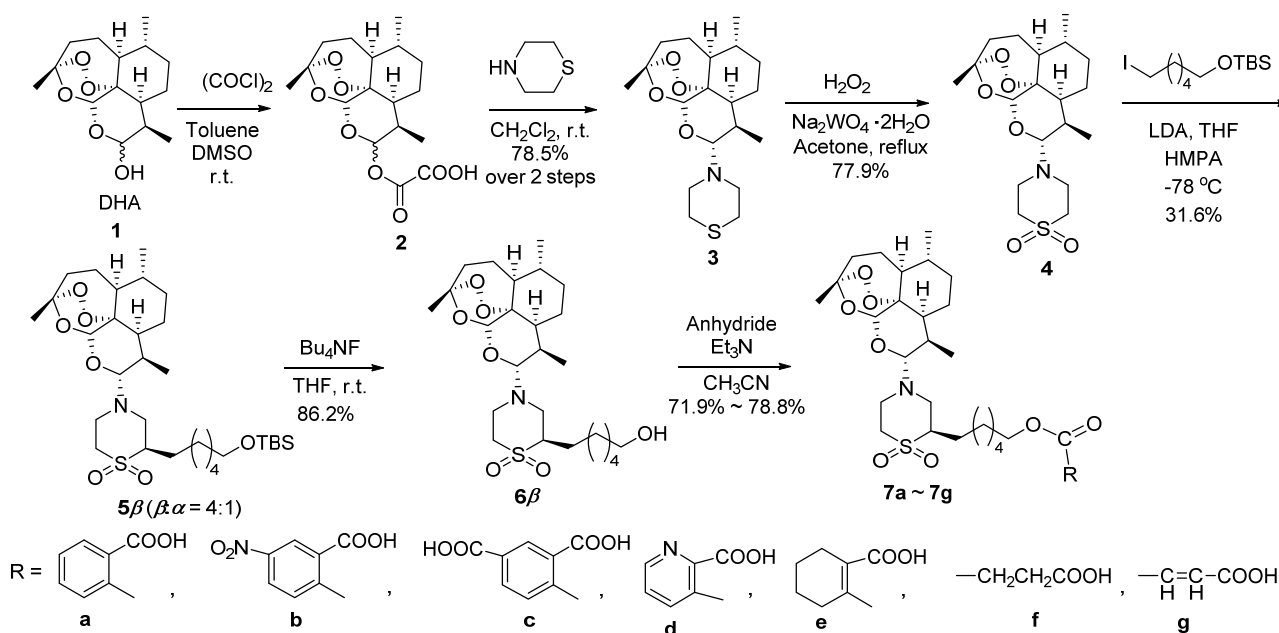
根据文献[36]方法,在溴化钠条件下双氢青蒿素(1)的羟基发生取代,鉴于该反应条件比较苛刻,产率低;经过不断改进,我们以草酰氯为酰化试剂,以硫代吗啉为亲核试剂,在“一锅煮”条件下,以 78.5% 产率方便地制备了化合物 3。在化合物 3 氧化制备青蒿酮(4)的过

程中,文献[36]采用的氧化体系是 NMO/TPAP(*N*-甲基吗啉-*N*-氧化物/四正丙基过钨酸铵);考虑到该催化剂价格比较昂贵,氧化成本较高;鉴于化合物 3 分子中的过氧桥键在强酸强碱强氧化条件下会发生断裂,经查阅大量文献和多次尝试,最终以 H_2O_2 为氧化剂,丙酮为溶剂,在钨酸钠为催化剂的条件下,以 77.9% 的产率得到了青蒿酮 4,且该反应条件温和、副产物少、分离纯化简单。

对于化合物 5 的合成,关键步骤是如何实现合适的立体选择性和区域选择性控制。在 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 、LDA 条件下青蒿酮 4 与 TBS 保护的 1,6-乙二醇碘代化合物作用,利用 TBS 庞大的空间位阻来控制立体构型,同时也为后期的衍生化创造了条件,产物最终以空间构型占优势的 β 构型^[37]化合物 5 为主。反应生成的差向异构体(5 α 和 5 β)可以通过柱层析方便地实现分离。化合物 5 β 脱保护得化合物 6 β ,以三乙胺为催化剂,6 β 与酸酐反应,以中等偏上的产率(71.9~78.8%)得到了一系列青蒿酮-酯类衍生物 7a~7g。

1.2 体外抗肝癌活性测试

采用 MTT 法^[38]对青蒿素,双氢青蒿素(1),青蒿酮(4)及目标化合物 7a~7g 进行体外人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制活性测试。不同浓度的单体化合物各时点对人肝癌细胞 SMMC-7721 的半数抑制浓度见表 1。由表 1 可以看出,青蒿素、DHA、青蒿酮(4)以及青蒿酮-酯类衍生物 7a~7g 对 SMMC-7721 细胞株增殖都起到了较好地抑制作用。且 7a~7g 比青蒿素和 DHA 的 IC_{50}



图式 1 青蒿酮-酯类衍生物的合成
Scheme 1 Synthesis of artemisone-esters derivatives

表 1 青蒿素、DHA、4 和 7a~7g 对人肝癌细胞的半数抑制浓度

Table 1 *In vitro* anticancer activities against SMMC-7721 cell lines with artemisinin, DHA and compounds 4 and 7a~7g

Compound	$IC_{50}^a/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
青蒿素	0.72	0.57	0.44
DHA	0.65	0.45	0.40
4	0.52	0.31	0.30
7a	0.15	0.12	0.08
7b	0.08	0.07	0.06
7c	0.14	0.12	0.10
7d	0.20	0.14	0.09
7e	0.09	0.08	0.07
7f	0.14	0.11	0.09
7g	0.12	0.10	0.07

^a The IC_{50} values represent the compound concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) required to inhibit tumor cell proliferation by 50%.

值小很多, 抑制效果有明显提升; 给药 72 h, 7b 的半数抑制浓度最优值仅为 0.06 $\mu\text{mol/L}$. 同一浓度下, 随着作用时间的不断延长, 各化合物对 SMMC-7721 细胞的抑制作用逐渐增强.

我们进一步在倒置显微镜下观察了化合物 7b 给药 24、48、72 h 后 SMMC-7721 细胞形态的变化情况(图 1). 用药后, 圆形 SMMC-7721 细胞呈现不同程度的晚期凋亡特征, 随着药物作用时间的延长, 凋亡特征表现显著. 而空白对照组, 未给药的 SMMC-7721 细胞仍具有完整细胞膜, 呈片状堆积增殖的恶性状态.

1.3 体外正常细胞的毒性活性测试

我们进一步测试了化合物 7b 对正常细胞的毒性活性, 并与青蒿素、双氢青蒿素对比, 结果见表 2. 结果表明, 化合物 7b 有较大的 IC_{50} 值, 说明该物质对正常细胞的毒副作用较小, 但与青蒿素和双氢青蒿素相比毒副作用降低不明显.

表 2 化合物 7b、青蒿素、双氢青蒿素对正常细胞的半数抑制浓度

Table 2 *In vitro* anticancer activities against Normal cell lines with compound 7b, artemisinin and DHA

Compound	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
7b	597.1	465.6	362.2
青蒿素	337.3	314.1	216.2
双氢青蒿素	533.3	388.2	310.4

1.4 流式细胞分析法检测人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡

采用 Annexin/PI 流式细胞分析法检测化合物 7b 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡情况, 实验分为实验组和正常对照组. 实验组是加入化合物 7b 至终浓度为 20

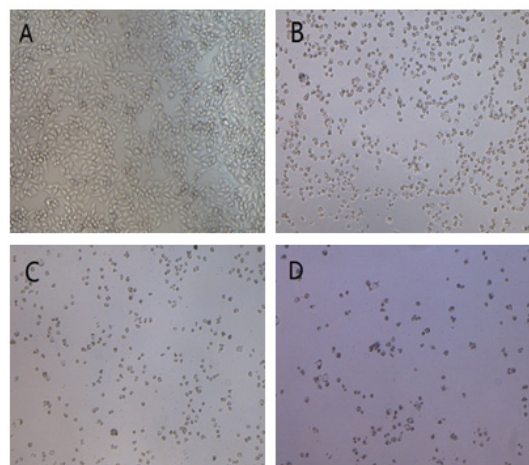


图 1 化合物 7b 不同给药作用时间下 SMMC-7721 细胞形态变化及空白对照

Figure 1 Morphological changes of SMMC-7721 cells induced by 7b in different intervals of time

(A) Normal SMMC-7721 cells; (B) Induced by 7b, 24 h; (C) Induced by 7b, 48 h; (D) Induced by 7b, 72 h

ng/mL, 分别作用 24、48、72 h 后进行细胞检测; 正常对照组是加入等量的 PBS; 最后以 FITC 和 PI 荧光作双参数细胞凋亡散点图(图 2).

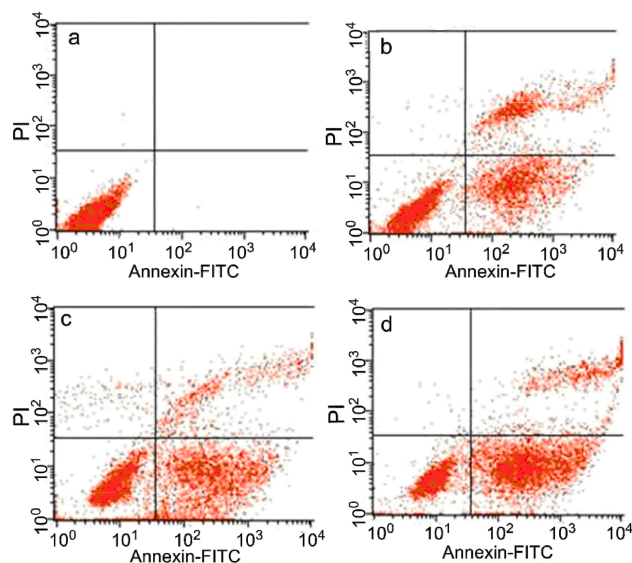


图 2 Annexin/PI 流式细胞分析检测人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡

Figure 2 Hepatocyte apoptosis detected by Annexin/PI with flow cytometry

(a) Normal SMMC-7721 cells; (b) Induced by 7b, 24 h; (c) Induced by 7b, 48 h; (d) Induced by 7b, 72 h.

图 2 显示, 正常活细胞 Annexin 及 PI 均低染, 分布在流式细胞分析图的左下区(LL); 给药不同时间细胞均出现了凋亡现象, 早期凋亡细胞 Annexin 高染而 PI 低染, 分布在图的右下区(RL); 晚期凋亡或死亡细胞 Annexin

及 PI 均高染, 分布在图的右上区(RU). 将早期凋亡细胞百分数(RL)和晚期凋亡细胞百分数(RU)之和称为总凋亡率. 结果显示实验组与正常对照组相比人肝癌细胞早期凋亡率与总凋亡率均显著增加(表 3). 这与化合物 **7b** 在不同给药作用时间下, SMMC-7721 细胞形态变化结果相吻合, 进一步证明了该类化合物的药物活性.

表 3 Annexin/PI 流式细胞分析检测化合物 **7b** 对人肝细胞凋亡的结果

Table 3 The results of hepatocyte apoptosis with compound **7b** by annexin/PI with flow cytometry

	作用时间/h	总凋亡率/%	早期凋亡率/%
正常对照组	24	0.02	0.02
实验组	24	40.61	8.86
实验组	48	44.77	9.95
实验组	72	58.69	14.63

2 结论

该类结构新颖的青蒿素-酯类衍生物的合成及生物活性研究, 国内外文献尚未见报道. 目标化合物 **7a~7g** 的合成过程中, 先导化合物青蒿素(**4**)是合成的关键. 通过多次尝试, 最终由双氢青蒿素(**1**)出发, 在“一锅煮”条件下以较高收率得到化合物 **3**; 在双氧水-丙酮体系中化合物 **3** 方便地氧化为青蒿素化合物 **4**, 该反应条件温和、反应速度快、后处理简便. 青蒿素 **4** 经烷基化、酯化等反应方便地制备了一系列新型青蒿素-酯类衍生物 **7a~7g**. 该类化合物的合成为新型抗肝癌类药物的拓展开辟了新的途径. 新型青蒿素-酯类衍生物对肝癌细胞 SMMC-7721 有较强的抑制性, 其较小的 IC_{50} 值预示着该类化合物具有潜在应用价值. 更大适用范围的抗癌活性测试以及毒、副作用机制研究还在进一步探索中.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-24 型数字显示显微熔点仪(北京泰克仪器有限公司, 温度计未校正); 日本岛津 FTIR-8400S 型红外光谱仪; Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标, $CDCl_3$ 为溶剂); API QSTAR Pulsar 飞行时间高分辨质谱仪(ESI 源上测定); DHA(山西太远兴远生物科技有限公司); 硫代吗啉(苏州同创医药有限公司); 常规色谱柱硅胶为青岛海洋化工厂生产; 其余试剂均为国产分析纯或化学纯, 所用溶剂均采用标准方法处理后使用.

人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自中科院上海细胞库; 二氧化碳培养箱(Thermo 3111, 美国热电); 超净工作台(SW-CJ-IFD 型, 苏州净化设备厂); 多功能酶标仪(Anthos Zenyth3100); 倒置光学显微镜(XD-101 型, Olympus 公司); 台式冷冻离心机(Thermo fisher, 德国).

四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司; 胰酶、1640 培养基购自美国 Gibco 公司; RPMI-1640 培养基为美国 Sigma 公司产品; 标准胎牛血清购自美国 Hyclone 公司.

3.2 化合物的合成及表征

3.2.1 双氢青蒿素-硫代吗啉(**3**)的合成

将(2.00 g, 7 mmol)双氢青蒿素(**1**)溶于 50 mL 干燥的甲苯中, 滴加 DMSO (50 μ L, 55 mg), 室温搅拌至原料溶解, N_2 保护下注入草酰氯(0.65 mL, 7 mmol), 搅拌 30 min 后, 再加入到溶有硫代吗啉(2.83 g, 28 mmol)的无水二氯甲烷溶液中. 室温搅拌, TLC 跟踪反应, 反应结束后, 产物倾入 20 mL 饱和 Na_2CO_3 溶液, 乙酸乙酯(20 mL $\times$ 2)萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱色谱分离 [V (石油醚) : V (乙酸乙酯)=6 : 1], 得 2.03 g 淡黄色黏稠固体化合物 **3**^[36], 产率 78.5%. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.78 (d, $J=7.20$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J=6.00$ Hz, 3H), 0.97~1.02 (m, 1H), 1.19~1.35 (m, 3H), 1.37~1.39 (m, 3H), 1.42~1.44 (m, 1H), 1.47~1.53 (m, 1H), 1.58~1.60 (m, 2H), 1.66~1.71 (m, 1H), 1.82~1.90 (m, 1H), 2.33~2.41 (m, 1H), 2.57~2.70 (m, 5H), 2.89~2.95 (m, 2H), 3.24~3.29 (m, 2H), 3.95 (d, $J=10.00$ Hz, 1H), 5.26 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.86, 20.25, 21.80, 24.30, 25.25, 29.60, 34.25, 35.95, 37.21, 44.59, 47.20, 51.81, 52.85, 80.46, 91.26, 93.69, 105.35.

3.2.2 青蒿素(**4**)的合成

将化合物 **3** (1.00 g, 2.71 mmol)溶于 30 mL 丙酮, 加入 100 mg 二水合钨酸钠, 慢慢滴加双氧水(1.39 mL, 13.55 mmol), 55 $^{\circ}C$ 下回流 5 h, TLC 跟踪反应, 反应结束后, 减压除去丙酮溶剂, 再加入 30 mL 饱和 $Na_2S_2O_3$ 溶液, 用乙酸乙酯萃取(25 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱色谱分离 [V (石油醚) : V (乙酸乙酯)=10 : 1], 得 0.85 g 白色固体化合物 **4**, 产率 77.9%. m.p. 123.1~123.4 $^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{20}$ -3 (c 0.50, CH_2Cl_2); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.77 (d, $J=7.20$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J=6.00$ Hz, 3H), 0.98~1.01 (m, 1H), 1.21~1.32 (m, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.38~1.48 (m, 1H), 1.53~1.56 (m, 1H), 1.67~1.72 (m, 2H), 1.72~1.84 (m, 1H), 1.962~1.998 (m, 1H), 2.28~2.35 (m, 1H), 2.53~2.58 (m, 1H), 3.18 (s, 4H), 3.32~3.38 (m, 2H), 3.43~3.48 (m, 2H), 4.19 (d, $J=10.40$ Hz, 1H), 5.25 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.46, 20.23, 21.60, 24.80, 25.91, 29.05, 34.18, 36.15, 37.45, 45.59, 46.96, 51.41, 51.87, 80.18, 91.00, 92.09, 104.27; IR (KBr) ν : 2928, 2881, 1647, 1467, 1383, 1307, 1258, 1126, 1025, 931, 850, 750 cm^{-1} . HRMS calcd for

$C_{19}H_{31}NO_6SNa [M+Na]^+$ 424.1770, found 424.1764.

3.2.3 青蒿素-烷基氧硅醚(**5 β**)的合成

−78 °C 条件下, 向 100 mL 圆底烧瓶中加入 THF 50 mL、二异丙胺(0.4 mL, 3 mmol)和正丁基锂(2.0 mL, 2.6 mmol). 搅拌反应 1 h 后, 缓慢加入化合物 **4** (802 mg, 2 mmol). 继续反应 1 h 后, 加入 TBS 保护的 1-羟基-6-碘代物(821 mg, 2.4 mmol)和 1 mL HMPA. 反应体系在 −78 °C 下继续反应 3 h 后, 关闭制冷, 温度缓慢升至室温, 继续反应 10 h, TLC 跟踪反应, 反应结束后, 加入 30 mL 饱和 NH_4Cl 溶液, 用乙醚萃取(25 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱色谱分离[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=15:1], 得 0.363 g 棕黄色黏稠固体化合物 **5 β** , 产率 31.6%. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.04 (s, 6H), 0.82 (d, J =3.40 Hz, 3H), 0.886 (s, 9H), 0.95 (d, J =3.00 Hz, 3H), 0.97~1.05 (m, 1H), 1.27~1.41 (m, 11H), 1.46~1.60 (m, 6H), 1.69~1.75 (m, 2H), 1.84~1.90 (m, 1H), 1.97~2.06 (m, 2H), 2.30~2.38 (m, 1H), 2.52~2.60 (m, 1H), 2.91~2.94 (m, 1H), 3.08~3.11 (m, 1H), 3.30~3.48 (m, 5H), 3.58 (t, J =6.64 Hz, 2H), 4.20 (d, J =10.40 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : −5.20, 13.53, 18.46, 20.21, 21.65, 23.32, 24.83, 25.58, 25.90, 26.04, 26.75, 29.02, 29.30, 32.70, 34.22, 36.16, 37.44, 45.65, 51.46, 51.77, 60.66, 63.13, 76.64, 80.02, 90.95, 91.87, 104.08.

3.2.4 青蒿素-烷基醇(**6 β**)的合成

将化合物 **5 β** (885 mg, 1.44 mmol)溶于 20 mL THF 中, 加入 Bu_4NF (1.87 g, 7.19 mmol), 室温下反应 10 h, TLC 跟踪反应, 反应结束后, 加入 20 mL 蒸馏水, 用乙酸乙酯萃取(25 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱色谱分离[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=3:1], 得 0.57 g 淡黄色黏稠固体化合物 **6 β** , 产率 86.2%. $[\alpha]_D^{20} + 11.2$ (c 0.50, CH_2Cl_2); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.77 (d, J =7.20 Hz, 3H), 0.92 (d, J =6.00 Hz, 3H), 0.97~0.99 (m, 1H), 1.20~1.34 (m, 11H), 1.39~1.56 (m, 6H), 1.67~1.71 (m, 2H), 1.82~1.86 (m, 1H), 1.95~1.99 (m, 2H), 2.27~2.31 (m, 1H), 2.51~2.53 (m, 1H), 2.88 (d, J =11.60 Hz, 1H), 2.98 (t, J =12.24 Hz, 1H), 3.32~3.42 (m, 5H), 3.59 (t, J =6.40 Hz, 2H), 4.17 (d, J =10.00 Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 5.26 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.58, 20.33, 21.68, 23.26, 24.86, 25.44, 26.00, 26.71, 29.12, 29.17, 32.63, 34.24, 36.23, 37.52, 45.69, 51.50, 51.77, 60.51, 62.88, 80.24, 91.14, 91.95, 104.31; IR (KBr) ν : 2929, 2873, 1651, 1447, 1383, 1261, 1120, 1113, 1039, 987, 865,

750 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{25}H_{43}NO_7SNa [M+Na]^+$ 524.2658, found 524.2650.

3.2.5 青蒿素-酯类衍生物 **7a~7g** 的合成

在室温条件下, 将化合物 **6 β** (100 mg, 0.199 mmol)溶于 10 mL 绝对无水乙腈中, 滴加三乙胺 0.15 mL, 搅拌下分别加入不同结构的酸酐 0.259 mmol, 继续反应. 直至 TLC 跟踪反应结束后, 产物倾入 20 mL 饱和 NH_4Cl 溶液淬灭, 用乙酸乙酯萃取(10 mL $\times$ 2), 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱色谱分离[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=(5:1~3:1)], 得化合物 **7a~7g**.

青蒿素-邻苯二甲酸单酯(**7a**): 白色固体, 收率 78.8%. $[\alpha]_D^{20} + 5.2$ (c 0.50, CH_2Cl_2); m.p. 94.4~94.6 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.77 (d, J =8.00 Hz, 3H), 0.92 (d, J =6.00 Hz, 3H), 0.95~1.04 (m, 1H), 1.23~1.41 (m, 11H), 1.42~1.54 (m, 4H), 1.66~1.73 (m, 4H), 1.81~1.88 (m, 1H), 1.99~2.02 (m, 2H), 2.27~2.35 (m, 1H), 2.50~2.56 (m, 1H), 2.90 (d, J =12.40 Hz, 1H), 2.99 (t, J =12.62 Hz, 1H), 3.29~3.46 (m, 5H), 4.19 (d, J =10.00 Hz, 1H), 4.30 (t, J =6.20 Hz, 2H), 5.27 (s, 1H), 7.53~7.56 (m, 2H), 7.66~7.68 (m, 1H), 7.86~7.88 (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.52, 20.29, 21.68, 23.10, 24.87, 25.56, 25.95, 26.38, 28.27, 28.77, 29.15, 34.27, 36.26, 37.52, 45.73, 51.54, 51.83, 60.55, 65.98, 80.32, 91.15, 91.98, 104.37, 128.87, 129.86, 130.46, 130.83, 131.96, 133.51, 168.42, 170.36; IR (KBr) ν : 2929, 2873, 1724, 1612, 1555, 1448, 1374, 1261, 1126, 1039, 932, 875, 746 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{33}H_{47}NO_{10}SNa [M+Na]^+$ 672.2818, found 672.2817.

青蒿素-4-硝基邻苯二甲酸单酯(**7b**): 淡黄色固体, 收率 75.4%. $[\alpha]_D^{20} + 4.6$ (c 0.50, CH_2Cl_2); m.p. 100.0~100.3 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.82 (d, J =7.20 Hz, 3H), 0.95 (d, J =5.62 Hz, 3H), 0.99~1.07 (m, 1H), 1.32~1.47 (m, 11H), 1.51~1.60 (m, 4H), 1.61~1.76 (m, 4H), 1.87~1.91 (m, 1H), 2.00~2.05 (m, 2H), 2.36~2.37 (m, 1H), 2.55~2.61 (m, 1H), 2.93 (d, J =13.20 Hz, 1H), 3.04 (t, J =11.80 Hz, 1H), 3.41~3.58 (m, 5H), 4.26 (d, J =10.00 Hz, 1H), 4.36 (t, J =6.42 Hz, 2H), 5.32 (s, 1H), 7.67 (t, J =8.00 Hz, 1H), 8.31 (dd, J =1.00, 8.20 Hz, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.48, 20.34, 21.78, 23.00, 24.88, 25.57, 26.01, 26.10, 28.09, 28.45, 29.28, 34.25, 36.30, 37.62, 45.75, 51.54, 51.75, 60.04, 66.96, 80.93, 91.19, 92.06, 104.63, 128.11, 130.14, 130.67, 135.91, 146.60, 164.37, 167.21; IR (KBr) ν : 2929, 2865, 1732, 1538, 1448, 1350, 1274, 1124, 1039, 924, 867, 750 cm^{-1} .

HRMS calcd for $C_{33}H_{47}N_2O_{12}S [M+H]^+$ 695.2850, found 695.2853.

青蒿素-4-羧基邻苯二甲酸单酯(**7c**): 淡黄色固体, 收率 76.9%. $[\alpha]_D^{20} + 7$ (c 0.50, CH_2Cl_2); m.p. 117.1~118.2 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.77 (d, $J=7.20$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J=5.62$ Hz, 3H), 0.96~1.00 (m, 1H), 1.22~1.41 (m, 11H), 1.48~1.56 (m, 4H), 1.70~1.72 (m, 4H), 1.84 (s, 1H), 1.96~2.04 (m, 2H), 2.32 (d, $J=13.84$ Hz, 1H), 2.53 (s, 1H), 2.92 (d, $J=12.40$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J=18.42$ Hz, 1H), 3.36~3.48 (m, 5H), 4.196 (d, $J=10.00$ Hz, 1H), 4.29~4.35 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 7.81 (dd, $J=8.02, 70.82$ Hz, 1H), 8.23~8.29 (m, 1H), 8.50 (d, $J=70.40$ Hz, 1H), 9.03 (s, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.54, 20.31, 21.69, 23.12, 24.86, 25.53, 25.95, 26.72, 28.25, 28.80, 29.16, 34.25, 36.25, 37.52, 45.72, 51.52, 51.83, 60.61, 66.35, 80.37, 91.16, 91.99, 104.46, 129.71, 132.32, 132.56, 133.54, 135.89, 138.31, 167.11, 169.28, 169.38; IR (KBr) ν : 2929, 2866, 1718, 1622, 1447, 1382, 1261, 1120, 1033, 931, 858, 748 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{34}H_{47}NO_{12}SNa [M+Na]^+$ 716.2717, found 716.2714.

青蒿素-2,3-吡啶邻二甲酸单酯(**7d**): 黄色固体, 收率 78.5%. $[\alpha]_D^{20} + 15$ (c 0.50, CH_2Cl_2); m.p. 77.8~81.7 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.78 (d, $J=6.84$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J=6.40$ Hz, 3H), 0.96~1.01 (m, 1H), 1.23~1.41 (m, 11H), 1.44~1.57 (m, 4H), 1.68~1.76 (m, 4H), 1.83~1.88 (m, 1H), 1.96~2.03 (m, 2H), 2.32~2.33 (m, 1H), 2.51~2.56 (m, 1H), 2.92 (d, $J=12.40$ Hz, 1H), 3.00 (t, $J=12.84$ Hz, 1H), 3.31~3.48 (m, 5H), 4.19 (d, $J=10.40$ Hz, 1H), 4.40 (t, $J=6.24$ Hz, 2H), 5.28 (s, 1H), 7.49~7.52 (m, 1H), 8.30 (dd, $J=1.20, 8.02$ Hz, 1H), 8.7 (dd, $J=1.20, 8.04$ Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.56, 20.32, 21.69, 22.91, 24.87, 25.33, 25.96, 26.21, 28.20, 28.62, 29.15, 34.26, 36.26, 37.53, 45.72, 51.52, 51.83, 60.61, 66.34, 80.36, 91.16, 91.99, 104.42, 124.81, 125.47, 138.65, 152.04, 152.17, 166.65, 166.70; IR (KBr) ν : 2929, 2859, 1735, 1629, 1578, 1462, 1389, 1261, 1128, 1033, 916, 812, 748 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{32}H_{46}N_2O_{10}SNa [M+Na]^+$ 673.2771, found 673.2779.

青蒿素-3,4,5,6-四氢邻苯二甲酸单酯(**7e**): 淡黄色固体, 收率 72.5%. $[\alpha]_D^{20} + 9.2$ (c 0.50, CH_2Cl_2); m.p. 94.1~94.7 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.78 (d, $J=6.84$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J=6.00$ Hz, 3H), 0.97~1.01 (m, 1H), 1.21~1.42 (m, 11H), 1.46~1.58 (m, 4H), 1.66~1.72 (m, 6H), 1.78~1.80 (m, 2H), 1.83~1.88 (m, 1H), 1.97~2.02 (m, 2H), 2.28~2.41 (m, 5H), 2.50~2.56 (m,

1H), 2.89 (d, $J=11.60$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J=12.42$ Hz, 1H), 3.33~3.42 (m, 5H), 4.13 (t, $J=6.00$ Hz, 2H), 4.18 (d, $J=10.00$ Hz, 1H), 5.27 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.56, 21.20, 21.69, 23.10, 24.88, 25.43, 25.55, 25.79, 25.97, 26.38, 27.01, 28.21, 28.81, 29.14, 32.54, 34.27, 36.26, 37.53, 45.73, 51.54, 51.83, 60.56, 65.33, 80.32, 91.14, 91.98, 104.36, 132.41, 138.75, 169.35, 171.47; IR (KBr) ν : 2929, 2867, 1754, 1667, 1446, 1352, 1268, 1129, 1040, 914, 875, 768 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{33}H_{51}N-O_{10}SNa [M+Na]^+$ 676.3131, found 676.3132.

青蒿素-丁二酸单酯(**7f**): 棕色粘稠固体, 收率 71.9%. $[\alpha]_D^{20} + 6$ (c 0.50, CH_2Cl_2); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.79 (d, $J=7.20$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J=6.00$ Hz, 3H), 0.99~1.05 (m, 1H), 1.22~1.39 (m, 11H), 1.43~1.62 (m, 6H), 1.69~1.72 (m, 2H), 1.84~1.89 (m, 1H), 1.98~2.02 (m, 2H), 2.29~2.37 (m, 1H), 2.52~2.57 (m, 1H), 2.59~2.62 (m, 2H), 2.65~2.67 (m, 2H), 2.90 (d, $J=11.20$ Hz, 1H), 3.02 (t, $J=12.42$ Hz, 1H), 3.37~3.44 (m, 5H), 4.09 (t, $J=6.40$ Hz, 2H), 4.20 (d, $J=10.42$ Hz, 1H), 5.28(s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.52, 20.28, 21.66, 23.28, 24.85, 25.40, 25.95, 26.70, 28.48, 28.96, 29.12, 29.17, 32.52, 34.25, 36.24, 37.50, 45.70, 51.52, 51.83, 60.57, 62.82, 80.23, 91.11, 91.99, 104.3, 172.33, 176.08; IR (KBr) ν : 2926, 2859, 1732, 1651, 1594, 1454, 1375, 1261, 1127, 1033, 924, 865, 750 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{29}H_{47}NO_{10}SNa [M+Na]^+$ 624.2818, found 624.2815.

青蒿素-顺丁烯二甲酸单酯(**7g**): 黄色粘稠固体, 收率 73.2%. $[\alpha]_D^{20} + 10.2$ (c 0.50, CH_2Cl_2); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.76 (d, $J=6.84$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J=6.00$ Hz, 3H), 0.96~1.02 (m, 1H), 1.22~1.41 (m, 11H), 1.43~1.55 (m, 4H), 1.65~1.71 (m, 4H), 1.81~1.87 (m, 1H), 1.95~2.00 (m, 2H), 2.29~2.30 (m, 1H), 2.48~2.54 (m, 1H), 2.86 (d, $J=12.84$ Hz, 1H), 2.96 (t, $J=12.60$ Hz, 1H), 3.32~3.46 (m, 5H), 4.17 (d, $J=10.40$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J=6.42$ Hz, 2H), 5.25 (s, 1H), 6.30~6.39 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 13.49, 20.25, 21.63, 23.17, 24.82, 25.38, 25.92, 26.40, 28.05, 28.75, 29.10, 34.21, 36.21, 37.47, 45.68, 51.49, 51.81, 60.39, 66.76, 80.25, 91.06, 91.96, 104.26, 129.70, 134.82, 164.89, 167.42; IR (KBr) ν : 2929, 2866, 1717, 1647, 1462, 1367, 1261, 1126, 1018, 916, 807, 750 cm^{-1} . HRMS calcd for $C_{29}H_{45}NO_{10}SNa [M+Na]^+$ 622.2662, found 622.2668.

3.3 体外抗肝癌活性测试

人肝癌 SMMC-7721 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养, 取

对数生长期的细胞用于实验。对青蒿素、DHA、青蒿琥以及目标化合物 **7a**~**7g** 采用 MTT 法^[38]进行体外人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制活性测试。以空白对照组调零, 实验平行重复 3 次, 取平均值。

辅助材料(Supporting Information) 所有新化合物的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References and note

- [1] Tu, Y. Y. *Artemisia Annuua and Artemisinin Drugs*, Chemical Industry Press, Beijing, **2009**, pp. 1~4 (in Chinese). (屠呦呦, 青蒿及青蒿素类药物, 化学工业出版社, 北京, **2009**, pp. 1~4.)
- [2] Klayman, D. L. *Science* **1985**, 228, 1049.
- [3] Xu, Z. H. *Anhui J. Prev. Med.* **2004**, 10, 181 (in Chinese). (徐振海, 安徽预防医学杂志, **2004**, 10, 181.)
- [4] Liu, N.; Yang, L. H.; Zhang, Z. X.; Yu, R. Y. *J. Pharm. Anal.* **2002**, 22, 303 (in Chinese). (刘宁, 杨腊虎, 张正行, 俞如英, 药物分析杂志, **2002**, 22, 303.)
- [5] Pacorel, B.; Leung, S. C.; Stachulski, A. V.; Davies, J.; Vivas, L.; Lander, H.; Ward, S. A.; Kaiser, M.; Brun, R.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 633.
- [6] Hindley, S.; Ward, S. A.; Storr, R. C.; Searle, N. L.; Bray, P. G.; Park, B. K.; Davies, J.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1052.
- [7] Ribeiro, I. R.; Oliaro, P. *Med. Trop.* **1998**, 58, 50.
- [8] Lin, A. J.; Klayman, D. L.; Milhous, W. K. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 2147.
- [9] Du, Y. Q.; Xiao, C. Y. *J. Clin. Exp. Med.* **2009**, 8, 8 (in Chinese). (杜幼芹, 肖长义, 临床和实验医学杂志, **2009**, 8, 8.)
- [10] Wang, Q.; Wu, L. M.; Li, A. Y.; Zhao, Y.; Wang, N. P. *Chin. Med. Trad.* **2001**, 26, 707 (in Chinese). (王勤, 吴理茂, 李爱媛, 赵一, 王乃平, 中国中药杂志, **2001**, 26, 707.)
- [11] Li, Y.; Shan, F.; Wu, J. M.; Wu, G. S.; Ding, J.; Xiao, D.; Yang, W. Y.; Atassi, G.; Leonce, L.; Caignard, D. H.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 5.
- [12] Li, Y.; Wu, J. M.; Shan, F.; Wu, G. S.; Ding, J.; Xiao, D.; Han, J. X.; Atassi, G.; Leonce, L.; Caignard, D. H.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 977.
- [13] Singh, N. P.; Lai, H. *Life Sci.* **2001**, 70, 49.
- [14] Zhou, H. J.; Wang, Z.; Li, A. *Anti-Cancer Drugs* **2008**, 19, 247.
- [15] Genovese, R. F.; Newman, D. B. *Arch. Toxicol.* **2008**, 82, 379.
- [16] Wesche, M. A.; DeCoster, F. C.; Tortella, F. C.; Brewer, T. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, 1813.
- [17] Fishwick, J.; McLean, W. G.; Edwards, G.; Ward, S. A. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, 96, 263.
- [18] Nontprasert, A.; Pukrittayakamee, S.; Prakongpan, S.; Supanaranond, W.; Looareesuwan, S.; White, N. J. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 96, 99.
- [19] Nontprasert, A.; Pukrittayakamee, S.; Nosten-Bertrand, M.; Vanijanonta, S.; White, N. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, 62, 409.
- [20] Nontprasert, A.; Nosten-Bertrand, M.; Pukrittayakamee, S.; Vanijanonta, S.; Angus, B. J.; White, N. J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, 59, 19.
- [21] Haynes, R. K.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Rieckmann, K.; Heilmann, H. D.; Chan, H. W.; Cheung, M. K.; Lam, W. L.; Wong, H. N.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Ra-tray, L.; Stewart, L.; Peters, W.; Robinson, B. L.; Edstein, M. D.; Kotecka, B.; Kyle, D. E.; Beckermann, B.; Gerisch, M.; Radtke, M.; Schmuck, G.; Steinke, W.; Wollborn, U.; Schmeer, K.; Axel, R. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 2082.
- [22] Nagelschmitz, J.; Voith, B.; Wensing, G.; Roemer, A.; Fugmann, B.; Haynes, R. K.; Kotecka, B. M.; Rieckmann, K. H.; Edstein, M. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 3085.
- [23] Schmuck, G.; Temerowski, M.; Haynes, R. K.; Fugmann, B. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 3, 35.
- [24] Waknine-Grinberg, J. H.; Hunt, N.; Bentura-Marciano, A.; McQuillan, J. A.; Chan, H. W.; Chan, W. C.; Barenholz, Y.; Haynes, R. K.; Golenser, J. *Malar. J.* **2010**, 9, 227.
- [25] Dunay, I. R.; Chan, W. C.; Haynes, R. K.; Sibley, L. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 4450.
- [26] Schmuck, G. V.; Keutz, E. I.; Haynes, R. K. *Med. Health Trop.* **2005**, 28, 11.
- [27] Gravett, A. M.; Liu, W. M.; Krishna, S.; Chan, W.-C.; Haynes, R. K.; Wilson, N.; Dalglish, A. G. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 67, 569.
- [28] Nandurdikar, R. S.; Maciag, A. E.; Citro, M. L.; Shami, P. J.; Keefer, L. K.; Saavedra, J. E.; Chakrapani, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2760.
- [29] Gillet, R.; Jeannesson, P.; Sefraoui, H.; Arnould-GueArin, M. L.; Kirkiacharian, S.; Jardillier, J. C.; Pieri, F. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **1998**, 41, 252.
- [30] Gabriel, F. E.; Gu, J.; Slater, L. M.; Hara, K.; Jacobs, J. W. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, 45, 183.
- [31] Hindley, S.; Ward, S. A.; Storr, R. C.; Searle, N. L.; Bray, P. G.; Park, B. K.; Davies, J.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1052.
- [32] Oh, S.; Shin, W. S.; Ham, J.; Lee, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4112.
- [33] Lin, A. J.; Klayman, D. L.; Milhous, W. K. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 2147.
- [34] Lin, A. J.; Lee, M.; Klayman, D. L. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 249.
- [35] Lin, A. J.; Miller, R. E. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 764.
- [36] Haynes, R. K.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Rieckmann, K.; Heilmann, H.-D.; Chan, H.-W.; Cheung, M.-K.; Lam, W.-L.; Wong, H.-N.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Rattray, L.; Stewart, L.; Peters, W.; Robinson, B. L.; Edstein, M. D.; Kotecka, B.; Kyle, D. E.; Beckermann, B.; Gerisch, M.; Radtke, M.; Schmuck, G.; Steinke, W.; Wollborn, U.; Schmeer, K.; Römer, A. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2136.
- [37] The configuration is determined according to the single crystal of its structural analogues.
- [38] Wei, M.-X.; Feng, L.; Li, X.-Q.; Zhou, X.-Z.; Shao, Z.-H. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 3340.

(Cheng, F.)