

青蒿素衍生物的油水分配系数与抗疟活性之间的 Hansch 分析

吴吉安 嵇汝运 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用 HPLC 法测定了 50 个酯型和醚型青蒿素衍生物的正辛醇-水体系的 $\log P$ 值, 结果表明所测 $\log P$ 值符合 Hansch 加和法规则. 将 $\log P$ 值与抗疟活性值进行 Hansch 分析, 分别在酯型、醚型和两种类型联合三方面导得相关性甚佳的 Hansch 方程, 它们都指示了 $(\log P)^2$ 项的引入是重要参数, 并将显著提高相关性, 计算所得 $\log P_0 = 2.60-2.90$. 可初步认为青蒿素衍生物的抗疟活性与油水分配系数值大小有重要关系, 并符合抛物线模型的定量关系式.

关键词 青蒿素衍生物; 抗疟活性; 油水分配系数; 定量结构活性相关; Hansch 分析; 高效液相

青蒿素是新型结构的抗疟药, 临床试验表明它有速效、低毒等优点, 特别是在抢救凶险型疟疾和治疗抗氯喹恶性疟方面具有特色. 本所曾对青蒿素进行结构改造, 合成了一系列醚型和酯型衍生物⁽¹⁻³⁾. 经药理筛选获得一批定量生物活性数据, 用 SD_{50} 表示⁽⁴⁾.

定量结构活性相关 (QSAR) 研究近十年来获得迅速发展, 其中线性自由能相关法——Hansch 分析已成为最重要和最常用的方法⁽⁵⁾. 本文报告对这一系列青蒿素衍生物与定量抗疟活性进行广泛的 Hansch 分析, 探索其生物活性与化合物油水分配系数、取代基的电子效应常数 σ 、克分子折射率 MR 及空间效应常数

Es 之间的定量关系, 从中对构效关系找出一些定量依据, 为进一步搞清青蒿素的作用机制及设计效能更高的化合物提供线索.

油水分配系数值的测定

1. 实验方法 用中国科学院上海科学仪器厂出品高效液相 HPLC 往复注射泵, 层析柱采用长 50 cm 内径 3 mm 的不锈钢管, 采用干法装柱, 装填 Permaphase ODS 作固定相, 样品用 EtOH 溶解, 溶液浓度根据吸收峰大小决定. 样品由微量注射器 (10 μ l) 直接注入到层析柱填充剂顶端. 冲洗液分别为 60% 和 30% MeOH-H₂O, MeOH 经过加定量 AgNO₃ 和 NaOH 回流 1 h 后重蒸过. 控制冲洗液流量为 1.4 ml/min 配日立 635 型 UV 可变波长检测器进行测量试验, 检测器波长 210 nm, 灵敏度相当于 0.04 消光值满偏度, 详细操作见文献⁽⁶⁻⁸⁾.

2. 实验结果及讨论 青蒿素衍生物 $\log P$ 值在 3.0-5.0 时用 60% MeOH-H₂O 冲洗

液, 3.0 以下用 30% MeOH-H₂O 冲洗液. 这两种不同浓度移动相分别用已知 log P 值的化合物在每个阶段(1-2 d)测量时预先测定 log P 与 log K' 的相关方程, 其中之一为:

30% MeOH-H₂O;

$$\log P = 2.416 + 1.187 \log K'$$

$$n = 8; r = 0.9904; s = 0.0781$$

60% MeOH-H₂O;

$$\log P = 3.548 + 1.618 \log K'$$

$$n = 8; r = 0.9928; s = 0.0734$$

r 为相关系数, s 为 SD.

以这些相关方程为基点来计算未知化合物的 log P 值, 在青蒿素衍生物(图 1)中, 分别选取还原青蒿素为醚型衍生物母体, 即 R = H, 选取 SM-105(α)为酯型衍生物母体, 即 R = CO-CH₃. 用 Hansch 提出的 log P 加和法

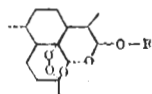


Fig 1. Artemisinin analogues

Table 1. log P values of artemisinin analogues

	R		log P Obs.	log P Cal.	Relative error (%)
DA	-H	(α)	1.58	—	—
DA	-H	(β)	2.19	—	—
SM-224	-CH ₃	(β)	2.86	2.75	+ 3.85
SM-229	-CH ₃	(α)	2.05	2.14	- 4.39
SM-227	-CH ₂ CH ₃	(β)	3.29	3.21	+ 2.43
SM-220	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	(β)	3.65	3.74	- 2.47
SM-245	-CH(CH ₃) ₂	(β)	3.49	3.72	- 6.59
SM-247	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	(β)	4.07	4.49	- 10.32
SM-232	-CH ₂ C ₆ H ₅	(β)	4.20	4.20	—
SM-277	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₃	(β)	3.51	3.51	—
SM-105	-CO-CH ₃	(α)	2.08	—	—
SM-242	-CO-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	(α)	2.78	2.57	+ 7.55
SM-108	-CO-CH ₂ CH ₃	(α)	2.33	2.54	- 9.01
SM-269	-CO-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	(β)	3.11	3.18	- 2.25
SM-233	-CO-CH=CH-C ₆ H ₅	(α)	3.83	4.20	- 9.66
SM-223	-CO-OCH ₂ CH ₃	(α)	2.37	2.09	+ 11.81
SM-276	-CO-OC ₆ H ₅	(α)	3.38	3.60	- 6.51
SM-276	-CO-OC ₆ H ₅	(β)	4.41	4.21	+ 4.54
SM-241	-CO-CH ₂ CH ₂ CH ₃	(α)	2.99	3.07	- 2.68


规则进行验算. $\log P = \log P_{\text{母体}} + \pi_{\text{取代基}}$. 经反复测定, 还原青蒿素 (α) log P 值为 1.58; (β) log P = 2.19. SM-105(α) log P = 2.08, 减去 π_{OH_3} 为 1.52 即为计算酯型 α 构型衍生物母体的 log P. β 构型衍生物母体的 log P = 1.52 + (2.19 - 1.58) = 2.13.

青蒿素衍生物物的 log P 值与计算值列表 1.

除个别样品外, 实验值与计算值相对误差在 ±10% 以下. 因此, 青蒿素衍生物物的 log P 值符合 Hansch 加和法规则. 所测衍生物中没有含氨基及胺类取代基, 这样洗脱样品与 Permaphase ODS 的硅羟基形成氢键的可能性很小⁽⁷⁾. 所以, 我们的实验中并未在冲洗液中添加 NH₄Cl 以防止上述影响的产生.

Hansch 方程的推导

Hansch 方程的计算用自行设计的 BASIC 语言程序⁽⁸⁾在 DJS-131 型计算机上进行. 热

力学参数为油水分配系数(以 $\log P$ 表示), 克分子折射率 MR, Taft 极性取代基常数 σ^* , 芳环上取代基电子效应常数 σ_p , σ_m , 取代基空间效应常数 E_s , 取代基诱导场效应及共轭效应常数 F 和 R. 除 $\log P$ 选自实验值外, 所有取代基常数均引自文献(10). 指示变量 $I_{\alpha,\beta}$ 指示了青蒿素衍生物为 α 构型时 $I_{\alpha,\beta}=0$, β 构型时 $I_{\alpha,\beta}=1$. 指示变量 $I_{o,p}$ 指示了在酯型衍生物  中 R 在邻位时, $I_{o,p}=1$, 其余

位置 $I_{o,p}=0$. 生物活性数据 $\log 1/C = \log(1/SD_{50}/\text{mol})$, 部分计算数据见表 2.

首先将醚型和酯型衍生物共 49 个一起进行 $\log 1/C - \log P$ 相关分析, 得二个 Hansch 方程:

$$\log 1/C = 1.120 - 0.198 (\log P)^2 + 1.155 \log P - 0.612 I_{\alpha,\beta} \quad [1]$$

$$n = 49; r = 0.911; s = 0.153; \log P_0 = 2.91$$

$$t_1 = 6.08; t_2 = 5.36; t_3 = 12.78$$

$$\log 1/C = 3.112 - 0.142 \log P - 0.559 I_{\alpha,\beta} \quad [2]$$

$$n = 49; r = 0.829; s = 0.205$$

$$t_1 = 3.59; t_2 = 8.89$$

从[1,2]可知, 青蒿素衍生物生物活性与 $\log P$ 值相关密切, 二个方程各项参数的 t 检验均远大于 2, 统计学检验证明为重要参数⁽¹¹⁾. 从[1]可知 $(\log P)^2$ 项的引入提高了方程的相关性, 证明抛物线型的 Hansch 方程是必须的.

其次将酯型与醚型分别进行推导:

酯型: 将 30 个酯型衍生物的生物活性与 $\log P$, σ^* , MR, $I_{\alpha,\beta}$ 进行计算得:

$$\log 1/C = 1.625 - 0.159 (\log P)^2 + 0.872 \log P - 0.360 I_{\alpha,\beta} \quad [3]$$

$$n = 30; r = 0.923; s = 0.130; \log P_0 = 2.74$$

$$t_1 = 8.22; t_2 = 6.46; t_3 = 2.69$$

$$\log 1/C = 3.355 - 0.220 \log P - 0.223 I_{\alpha,\beta} \quad [4]$$

$$n = 30; r = 0.681; s = 0.243$$

$$t_1 = 4.79; t_2 = 0.899$$

$$\log 1/C = 1.568 - 0.162 (\log P)^2 + 0.894 \log P + 0.0278 \sigma^* + 2.824 \times 10^{-4} MR - 0.383 I_{\alpha,\beta} \quad [5]$$

$$n = 30; r = 0.924; s = 0.134; \log P_0 = 2.76$$

$$t_1 = 7.38; t_2 = 6.24; t_3 = 0.56; t_4$$

$$= 0.044; t_5 = 2.54$$

由方程[3,4]可知, 在酯型衍生物中, $(\log P)^2$ 项的引入显著地提高相关性(r 由 0.681 上升至 0.923), t 检验均证明 $\log P$ 与 $(\log P)^2$ 两参数为重要参数, 也证明抛物线型 Hansch 方程的可靠和可信. 由方程[5]可知, 在方程[3]基础上再引进 σ^* 和 MR 两个参数进行计算所得结果与原方程相差无几, 相关性也只有细微变化, 统计学 t 检验表明 MR 和 σ^* 两参数的 t 值均小于 1 可删去⁽¹¹⁾.

将酯型衍生物中芳环取代酯 15 个单独进行计算, 考察 $\log 1/C$ 与 $\log P$ 及芳环取代基 σ_p , σ_m , MR, E_s , $I_{o,p}$, F, R 几个参数之间的关系, 计算结果表明 $\log 1/C$ 仅与 $\log P$ 值有明显的线性关系, 且增加了 $(\log P)^2$ 项后亦可提高方程的相关性.

$$\log 1/C = 1.823 - 0.155 (\log P)^2 + 0.825 \log P \quad [6]$$

$$n = 15; r = 0.912; s = 0.122; \log P_0 = 2.59$$

$$t_1 = 2.16; t_2 = 1.48$$

$$\log 1/C = 4.020 - 0.375 \log P \quad [7]$$

$$n = 15; r = 0.875; s = 0.138$$

最后将醚型衍生物 14 个进行计算, 选用参数为 $\log P$, σ^* 和 $I_{\alpha,\beta}$

$$\log 1/C = 0.958 - 0.223 (\log P)^2 + 1.162 \log P - 0.837 \sigma^* - 0.145 I_{\alpha,\beta} \quad [8]$$

$$n = 14; r = 0.906; s = 0.168; \log P_0 = 2.60$$

$$t_1 = 2.55; t_2 = 2.12; t_3 = 5.27; t_4 = 1.89$$


$$\log 1/C = 3.078 - 0.261 \log P - 0.786 \sigma^* - 0.0952 I_{\alpha,\beta} \quad [9]$$

$$n = 14; r = 0.847; s = 0.201$$

$$t_1 = 2.69; t_2 = 4.10; t_3 = 0.620$$

$$\log 1/C = 1.100 - 0.154 (\log P)^2 + 0.900 \log P - 0.335 I_{\alpha,\beta} \quad [10]$$

Table 2. Parameters for Hansch equations of artemisinin derivatives

	R	SD ₉₀	log 1/C	log P	(log P) ²	σ*	MR	I _{α,β}	log 1/C calculated from equations											
									[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[8]	[9]					
SM-269	-CO-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	1.32	2.45	3.11	9.67	1.57	17.04	1												
SM-105	-CO-CH ₃	1.20	2.44	2.08	4.33	0	5.65	0							2.66	2.82	2.76	2.90	2.73	
SM-242	-CO-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	0.50	2.87	2.78	7.73	1.57	17.04	0							2.80	2.72	2.83	2.74	2.84	
SM-108	-CO-CH ₂ CH ₃	0.66	2.71	2.33	5.43	-0.10	10.33	0							2.73	2.78	2.80	2.84	2.77	
SM-233	-CO-CH = CHC ₆ H ₅	0.74	2.75	3.83	14.67	0.41	34.17	0							2.63	2.57	2.64	2.51	2.64	
SM-223	-CO-OCH ₂ CH ₃	0.63	2.75	2.37	5.62	1.64	24.22	0							2.74	2.77	2.81	2.83	2.83	
SM-241	-CO-CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.65	2.74	2.99	8.94	-0.12	14.96	0							2.80	2.69	2.82	2.70	2.80	
SM-276	-CO-OC ₆ H ₅	0.63	2.81	3.38	11.42	2.24	27.68	0(a)							2.76	2.63	2.76	2.61	2.81	
SM-273	-CO-C ₆ H ₅ -CH ₃ (p)	1.73	2.37	3.92	15.37	0.48	29.98	0							2.60	2.55	2.61	2.49	2.61	
SM-232	-CH ₂ -C ₆ H ₅	3.42	2.04	4.20	17.64			1							1.86	1.96				
SM-270	-CH ₂ - 	4.70	1.89	3.15	9.92			1							2.18	2.10				
SM-277	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₃	3.71	2.02	3.51	12.32			1							2.12	2.05				
SM-247	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	5.60	1.80	4.07	16.56	-0.16	24.24	1							1.92	1.97			1.98	
DA	-H	3.65	1.89	2.19	4.80	0.49	1.0	1(a)							2.09	2.24			1.88	
SM-224	-CH ₃	1.02	2.47	2.86	8.18	0	5.65	1							2.19	2.14			2.31	
SM-229	-CH ₃	1.16	2.41	2.05	4.20	0	5.65	0							2.65	2.82			2.40	
SM-227	-CH ₂ CH ₃	1.95	2.21	3.29	10.82	-0.10	10.30	1							2.16	2.03			2.18	
SM-220	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.70	2.28	3.65	13.32	-0.12	14.96	1							2.08	2.03			2.18	
SM-245	-CH(CH ₃) ₂	2.24	2.16	3.49	12.18	-0.19	14.96	1							2.12	2.06			2.31	
SM-249	-CH ₂ CH ₂ OCH ₃	4.10	1.92	3.13	9.80	0.24	16.68	1							2.18	2.11			2.06	
SM-280	-CH ₂ CH ₂ OCH ₃	2.28	2.18	2.52	6.35	0.24	16.68	0												2.27

(a) α or β-epimer indicated by the peaks of HPLC

$$n = 14; r = 0.540; s = 0.317$$

由方程[8,9]可知,在醚型化合物中 $(\log P)^2$ 项引入提高了方程的相关性,也说明抛物线模型比直线型好。从[8,9] t 检验中看出 σ^* 参数 t 值最大,且取消 σ^* 参数后的方程相关性大大降低($r = 0.540$ 见[10])。可见在醚型衍生物中除 $\log P$ 值的影响外,还必须考虑取代基的电子效应的影响。

讨 论

由实验测得醚型和酯型青蒿素衍生物的正辛醇——水系统的油水分配系数,说明HPLC测定 $\log P$ 值的确有准确、迅速、操作简便的优点。经用 Hansch 加和法规则对 $\log P$ 值进行计算验证,绝大多数化合物 $\log P$ 值相对误差在 $\pm 10\%$ 以下。由于冲洗液 MeOH 浓度为 60%,所以对 $\log P$ 值在 4.5 以上的化合物洗脱时间较长,可能会引入一定误差。我们还对还原青蒿素分别重复二次实验,每次作 3 个以上平行试验,结果相符,还原青蒿素 (α) $\log P = 1.58$; (β) $\log P = 2.19$, 这些数值可供其他作青蒿素衍生物作用机制和构效关系研究的参考。

使用经典的 Hansch 分析的方法对酯型和醚型衍生物的 $\log P$ 值以及取代基常数 σ^* , MR, E_s , σ_p , σ_m , F, R 和指示变量 $I_{\alpha,\beta}$, $I_{\alpha,p}$ 等参数进行广泛计算,从已导得的 10 个 Hansch 方程可知,用 SD_{60} 计算所得的青蒿素衍生物生物活性数据 $\log 1/C$ 与它们的油水分配系数和 α 、 β 构型密切相关,醚型和酯型单独计算及联合计算,均清楚表明 $(\log P)^2$ 项的引入会显著提高方程的相关性。且统计学 t 检验说明 $(\log P)^2$ 项在所有计算的方程中 t 值均大于 2,为重要参数。以此可以认为青蒿素衍生物的作用机制与该类化合物在体内的亲脂疏水作用有密切关系,它们的亲脂疏水作用主要地影响了疟原虫受体的结合,这与药理试验⁽⁴⁾估计相符。从推导的方程看,它们的作用模型符合 Hansch 抛物线模型。由方程[1,3,

5,6,8]通过式 $\log P_0 = K_2/2K_1$ 计算的 $\log P_0$ 分别为 2.91, 2.74, 2.76, 2.59, 2.60。(其中 K_2 , K_1 分别为方程式中 $\log P$, $(\log P)^2$ 项前的系数)可见引起在其他影响相同的条件下,产生最大生物活性的 $\log P$ 值在 2.60—2.90 范围之内。所有方程中 $I_{\alpha,\beta}$ 参数前的负系数表明就整个衍生物系统来看, α 构型要比 β 构型有效。由此,设计新的类型青蒿素衍生物时,首先要预算其油水分配系数,控制在 $\log P_0$ 范围之内。从已合成的衍生物中已有醚型 SM-242 (β), 酯型 SM-224 (α), 它们的 $\log P$ 值均在 $\log P_0$ 范围内,而且生物试验确有较高活性,本文计算与这相符。从方程[8-10]可知,醚类衍生物中除 $\log P$ 外,取代基电子效应影响是不可忽略的。 σ^* 参数前的负系数表明应在醚型结构中引入推电子效应的取代基,当在整个化合物油水分配系数保持在 $\log P_0$ 范围的前提下,具有负值 σ^* 的取代基的引入将获得生物活性更大的青蒿素衍生物。

致谢 蒙徐修容和张仁斌同志帮助,徐松林和唐易全同志协助HPLC工作,本所电子室计算机组配合计算。

参 考 文 献

- 1 李英、虞佩琳、陈一心、李良泉、盖元珠、王德生、郑亚平。科学通报 1979 年 7 月 30 日; 24 (14):667
- 2 李英、虞佩琳、陈一心、嵇汝运。药学通报 1980 年 12 月; 15 (12):38
- 3 虞佩琳、陈一心、李英、嵇汝运。药学通报 1980 年 8 月; 15 (8):44
- 4 顾浩明、吕宝芬、瞿志祥。中国药理学报 1980 年 9 月; 1 (1):48
- 5 窪田種一、山川真透、寺田 弘、吉本昌文。化学の领域 1979 年 1 月; 增刊 122 号:43
- 6 徐 珩、徐修容。药学通报 1981 年 1 月; 16 (1):34
- 7 徐修容、徐 珩、陈洁、唐琴梅。药学学报 1981 年 3 月; 16 (3):34
- 8 徐修容、徐 珩、陆一安、陈洁。药学学报 1979 年 4 月; 14 (4):246
- 9 吴吉安、嵇汝运。药学通报 1980 年 9 月; 15 (9):45
- 10 Hansch C, Leo A. *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. 1st ed, New York: Wiley Press, 1979:6
- 11 北京大学数学力学系概率统计组编。正交设计法。第 1 版。北京:石油化学工业出版社, 1976:118

A QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY STUDY ON ARTEMISININE ANALOGUES

WU Ji-an, JI Ru-yun (Z Y Kyi)

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Artemisinin is a natural constituent with antimalarial activity. Various ethers and esters were synthesized in our Institute. Their antimalarial activities were expressed in terms of SD_{90} . Attempts were made to study the QSAR through Hansch analysis.

We determined the $\log P$ values of various compounds from 1-octanol/water system by HPLC. For compounds of higher $\log P$ values (3.0-5.0), 60% methanol was employed for elution, and for those of lower $\log P$ values (<3.0), 30% methanol was used. The values so determined were found to be consistent with those calculated based on the additive rule shown by Hansch. The molar refraction MR, aliphatic electronic parameters σ^* , aromatic electronic parameters σ_p and σ_m , steric effects E_s , field effect F, resonance effect R of the substituents were adopted from literature. Indicator variables $I_{\alpha,\beta}$, were given the value of 1 for β -epimers, and 0 for α -epimers. A second indicator variable $I_{o,p}$ assumed the value 1 for *o*-substituted groups, and 0 for *p*- or *m*-substi-

tuent. The following equations were derived by the regression of such data:

$$\log 1/C = 1.120 - 0.198 (\log P)^2 + 1.155 \log P - 0.612 I_{\alpha,\beta} \quad [1]$$

$$n = 49; r = 0.911; s = 0.153; \log P_0 = 2.91$$

$$\log 1/C = 3.112 - 0.142 \log P - 0.599 I_{\alpha,\beta} \quad [2]$$

$$n = 49; r = 0.830; s = 0.205^1$$

Regression of the data of 14 ethereal compounds gave the following equation:

$$\log 1/C = 0.958 - 0.223 (\log P)^2 + 1.162 \log P - 0.837 \sigma^* - 0.145 I_{\alpha,\beta} \quad [3]$$

$n = 14; r = 0.906; s = 0.168; \log P_0 = 2.60$
From these equations, variations of antimalarial activities are well explained by lipid-soluble properties. A comparison between eq(1) and (2) illustrates the superiority of eq(1) with a $(\log P)^2$ term. The ideal lipophilic character was calculated to be $\log P = 2.60 - 2.90$. However, in the series of ethereal compounds, the electronic parameter of various substituents also have significant effect for the antimalarial activity of the compounds.
KEY WORDS artemisinin analogues; antimalarial activity; partition coefficient; QSAR; Hansch analysis; HPLC