

青蒿素分子和立体结构测定的历史回顾

梁 丽

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0166

2015 年以屠呦呦为代表的“青蒿素的发现”获得诺贝尔生理/医学奖，这是我国科学研究首次获得这一全球享有盛誉的科学大奖，在我国科技发展历史中记下了浓墨重彩的一笔，也是我国科技工作者共享的光荣。青蒿素抗疟新药的研究历程及其所取得的成功，反映了我国相关科学工作者的执着与坚韧，集体的智慧与才能，开拓进取不畏艰难，群策群力追求科学，留下一段历史的精神。在这一历史进程中，运用 X 射线衍射分析确定青蒿素分子的化学和三维结构^[1]及其具有活性的绝对构型^[2]，发挥了重要作用，因为任何新药的认定，其精确的立体结构(即以原子为单位组成的三维结构和具有药物活性构型)作为其药理效应的结构基础，不可或缺。

1977 年，以青蒿素结构研究协作组为主体的研究人员成功解析并报道了《一种新型倍半萜内酯——青蒿素》^[3]，为青蒿素成功开发成为抗疟创新药物发挥了关键作用。值此论文发表 40 周年之际，简要回顾这一段研究历史，重温其中蕴含的学术与技术、精神与体验，以表对这一历史成就的祝贺，以及对参与这一研究历程的全体成员的历史敬意。

1 群策群力，无私合作

20 世纪 60 年代美国和中国都卷入越南战争，由于疟疾猖獗，兵力减员，各自投入了大量的财力和人力，开展了抗疟疾新药的研究。从 1967 年起，在国家成立的 523 任务办公室的统一计划下，先后有 60 多个科研单位、500 多名科研人员分工合作，共同承担了疟疾防治药物的研究任务。寻找抗恶性疟疾药物从两个方面着手，一方面是寻找化学抗疟药，另一方面是发掘祖国医药学宝库。中草药的筛选是从开展民间祖传秘方、验方的调查入手。北京、广东、广西、四川、云南、江苏等地区组织多个科研小分队，同时查阅整理医著古籍及现代医药资料。由军事医学科学院和卫生部中医研究院中药研究所(下简称北京中药所)合作在经实验室水煎、醇提，送军事医学科学院以鼠疟为模式系统筛选了近百个药(方)后，1971~1972 年，北京中药所使青蒿研究迈出了重要的一步。青蒿提取物有一定的抗疟作用，但不稳定。在北京中药所青蒿素的研究工作受挫的时候，1973 年云南省药物研究所和山东省中医药研究所分别从植物大头黄花蒿和黄花蒿中，一步到位拿到了黄蒿素的结晶，黄蒿素临床试

作者简介: 梁丽(女), 1943 年出生于河南洛阳。1965 年毕业于北京大学化学系并分配至冶金部北京地质研究所。1973 年调至中国科学院物理研究所胰岛素晶体结构研究组。1974 年合并至中国科学院生物物理研究所晶体结构研究室, 从事青蒿素等一系列小分子晶体结构和方法的研究, 创立了最初的汇编语言晶体学软件库, 并建立了条斑紫菜光合蛋白研究课题。曾获科研津贴和青年自然科学基金, 以及国家、军队、科学院等科研成果奖。1981~1983 年作为访问学者在纽约州立大学布法罗分校, 从事电荷密度分布及化学键理论研究。1989 年作为客座副教授在德克萨斯州西南医学院从事蛋白质晶体学工作。1990~1999 年转至新奥尔良大学和泽维尔大学从事晶体结构和功能研究。1999~2013 年在新奥尔良信息技术中心从事 Oracle 和 PeopleSoft 的开发和应用, 任项目负责人。成功地建立和更新了若干系统, 因而获得多项不同层次奖项。2013 年退休。

收稿日期: 2016-05-18, 接受日期: 2017-01-03

验的抗疟作用令人振奋. 此后云南省药物研究所和四川中药研究所又进一步创立了工业分离提纯黄蒿素的流程. 为此, 523 办公室组织了云南省药物所和山东省中医药研究所及北京中药所进行技术交流, 前二所分别无私提供数十克黄蒿素(1978 年扬州鉴定会决定此后统称为青蒿素)给北京中药所^[3]. 至此, 有效成分的结构鉴定才有可能提到议事日程上.

1973 年, 北京中药所请中国医学科学院药物研究所帮助测定了青蒿素的成分, 并推算了青蒿素的分子式. 1974 年在全国 523 办公室的协调下, 经验丰富的中国科学院上海有机化学研究所(下简称上海有机所)也受邀参加, 帮助进一步确定了青蒿素的分子式, 并获得了青蒿素分子的若干片段, 然而测定青蒿素整体分子结构仅局限于采用 20 世纪 70 年代的波谱和化学反应, 只能排列组合出多个可能性而不能得到唯一客观的结果. 哪个是真? 哪个是假? 需待有机全合成实验证实, 方可确认. 时不待人, 前辈科学家梁晓天教授等深知 X 射线衍射技术在化学结构分析中的可靠性, 促成全国 523 办公室当即调动了曾在成功解析胰岛素晶体结构中涌现出的中国科学院生物物理研究所(下简称生物物理所). 由北京中药所提供青蒿素单晶和上海有机所确定的分子式, 时任胰岛素晶体结构室领导的徐秀璋承接了测定青蒿素晶体结构的任务. 李鹏飞研究组发扬了攻克胰岛素结构的精神, 年轻人不畏险阻, 勇于创新, 在动乱封闭的时代, 大胆引进国外 3 个新方法. 在这刻苦奋战中, 组长病故, 梁丽扛下重任, 按 523 规划的任务和进程, 生物物理所终于完成了青蒿素晶体结构和分子绝对构型测定的任务. 作为一类抗疟新药^[4], 青蒿素的活性构型的立体结构解析, 不仅展示了中国科技水平, 而且为“青蒿素的发现”奠定了科学基础. 同时, 从化学结构测定的全过程不难看出中国科学家的拼搏精神. 523 办公室组织了一个梯队又一个梯队相继接上去, 各种科技手段不断尝试, 调集了全国不同部门、不同地区、不同学科的科研工作者, 发挥各自专长, 锲而不舍地追求, 这一成果是中国人的坚韧不拔精神的体现和集体智慧的结晶.

2 困难中抉择, 挑战下立题

1975 年 3 月, 中国科学院生物物理研究所 X 射线胰岛素晶体结构研究室李鹏飞课题组着手用常规的魏森堡 X 射线衍射照相法确定了青蒿素结晶具有对映体的 $P2_12_12_1$ 空间群, 并且测得晶胞参数^[2].

虽然已有了 X 射线衍射试验必需的青蒿素单晶和刚刚进口的现代化 X 射线衍射仪, 可以快速得到准确的衍射强度实验数据. 但化学结构的确定仍是困难重重. 首先, 从分子式 $C_{15}H_{22}O_5$ 看出, 青蒿素不含重原子, 而国内常规是用重原子方法来解决单晶分析中棘手的相角问题. 面对这一难题, 李鹏飞课题组查阅了大量国外文献, 一致认为这是引进直接法的好课题. 现在, 对于大多数的小分子结构这个难解的相角问题, 晶体学者可以用现成的晶体学计算机程序诸如 SHELX^[5], 常规地经过“黑匣子”似的直接法, 很快就可以解决了. 但是当时, 直接法^[6]是国外刚刚兴起的可以解决不含重原子的晶体衍射相角的方法, 在国内没有实践经验可循, 更谈不到计算机程序. 对于直接法的数理统计原理, 没有俄文文献. 那个年代的人大都是被安排学了俄文, 只能各自搬着字典查阅英文文献, 靠组内讨论、争辩、推敲去搞懂数学原理, 探讨从哪里下手, 如何应用. 在得到中国 X 射线晶体学奠基人唐有祺先生的首肯后, 梁丽向组长李鹏飞提出, 在众多直接法中, 由于没有大型计算机, 涉及太多数理概率推导的直接法的多解法难以实现. 唯一可行的是采用 Karle 夫妇^[7]已经成功解出了分子结构的直接法中的符号附加法. 我们可以选 3 个衍射相角为零来规定晶胞原点和第四个衍射以人为的指定相角 $\pi/2$ 来固定对映体, 并加上 7 个衍射的相角给予符号, 由此开始从三重相角关系方程式^[8]推导初始相角, 再辅以三角函数正切(Tangent)公式^[9]叠代修正相角, 解得分子结构后, 再确定构型^①. 组长李鹏飞很高兴, 原来他也是这么想的. 不谋而合! 经课题组讨论通过这个可行方案, 立下了这节课.

^① 参见 Creative Commons Attribution-ShareAlike License 的定义: 化学结构就是在一个分子中(或者在一个离子或原子基)原子之间的化学键的成键分布. 明确地说, 分子中不同原子之间, 通过不同类型的化学键而构成了特定几何形状分子就称之为化学结构. 分子的构型是个稳定的几何形状, 起源于化学键所形成的空间分布. 同样的一组原子有可能形成两种或多种具有不同构型的立体异构体. 具有不同构型的化合物, 作为药物通常有着不同的生理活性, 包括药理学效应, 毒理学和新陈代谢的作用.

3 创新前沿, 突破难关

没有计算机程序, 李鹏飞和梁丽现去学习以 ALGOL 为蓝本的编译程序语言(汉语拼音“Bianyi Chengxu Yuyan”, 缩写为 BCY^[10]), 编制了所用的计算程序. 没有计算机, 二人到北京计算中心仅有的国产 TQ-16 中型计算机^[11]借用他人半夜剩余的机时演算. 虽然目标清晰, 但干起来可不那么容易. 每个新方法, 都是从英文文献找出来的. 文字不同于听报告, 有疑难可提问. 尤其是方法, 常常文献上一笔带过, 或简略, 或模糊, 花了不少时间去摸索, 只能通过上机计算检验个人对方法的理解正确与否. 两个人要不断商讨, 互相校对思路. 直接法仅用了 7 个月就拿下. 而李鹏飞故去, 只剩下一个人时, 真是要自己和自己争论, 去辨别真伪, 错了改, 再错再改, 坚持探索. 最小二乘法和反常散射法是用了 2 年才成功的. 经过反复失败, 逐步加深了对新方法的理 解, 并不断对计算程序进行改错、验证、设计结构模型试算, 终于突破了新方法难关. 克服了科学和技术的双重挑战.

3.1 突破直接法难关, 确立初始的晶体和分子立体结构

这个课题的一个突出特点是国内首次应用国际上正在兴起的直接法, 解决了晶体学中的相角问题, 确定了青蒿素的化学结构.

他们根据 Cochran(1955 年)的三重相角关系式^[8], (公式 1), 用符号附加法^[7]推导出了初始相角:

$$\varphi_{-h} + \varphi_{h'} + \varphi_{h-h'} \sim 0 \pmod{2\pi} \quad (1)$$

其中, φ 是 X 射线 3 个衍射点指标分别为 $-h$, h' 和 $h-h'$ 相应的 3 个衍射相角.

李鹏飞的主要贡献在于引进和应用直接法, 他主编并和梁丽一起调试了一个重要的直接法公式在 TQ-16 BCY 上的计算程序. 这个由 Karle 和 Hauptman(1956 年)提出的三角函数正切公式^[9](公式 2):

$$\tan \varphi_h = \frac{\sum_{h'} \kappa_{h,h'} \sin(\varphi_{h'} + \varphi_{h-h'})}{\sum_{h'} \kappa_{h,h'} \cos(\varphi_{h'} + \varphi_{h-h'})} \quad (2)$$

经过 17 轮正切公式的运算, 衍射相角扩展后, 获得和收敛到 100 个强衍射的相角. 在他们努力下, 一套三维空间的电子云密度图由下列傅里叶(Fourier)变换^[12]得到(公式 3, 4):

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{(hkl)} \exp[-2\pi \cdot i(hx+ky+lz)] \quad (3)$$

$$F_{(hkl)} = |F_{(hkl)}| \exp i\varphi_{(hkl)} \quad (4)$$

其中, $\rho_{(x,y,z)}$ 是真实晶胞中的电子密度. $F_{(hkl)}$ 是衍射的结构因子, 通常它以复数表述如(4)式, 在(4)式中, $|F_{(hkl)}|$ 表征这个结构因子的振幅, 它的平方就是 X 射线衍射实验中只能得到的强度数值; $\varphi_{(hkl)}$ 是在 X 射线衍射实验中失去的相角, 它可以通过直接法找回来. 梁丽在 TQ-16 的计算机^[11]上建立了式(3)、(4)以及其他 X 射线晶体学数据的处理程序. 经过数月努力, 15 个碳原子和 5 个氧原子的粗略位置从最后一套电子云密度图(图 1)上读出. 这些原子的电子密度峰与北京中药所提供的分子式中的 15 个碳原子和 5 个氧原子一致. 根据原子粗略位置 (x, y, z) 计算出了原子间的距离和它们间的夹角. 由此得到的青蒿素结构具有合理的化学键长和键角. 该试用结构模型具有可信的偏差因子 0.22.

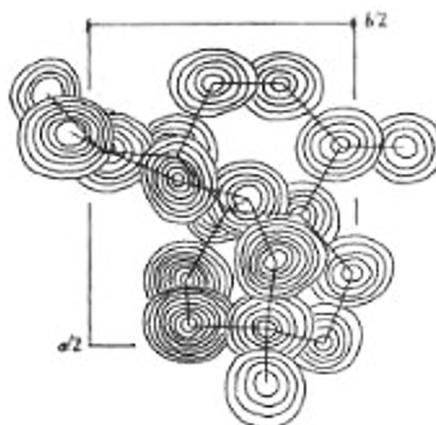


图 1 沿晶体单胞 C 方向投影的电子密度图

如图 2 所示, 15 个碳和 5 个氧原子基于图 1 中电子密度的峰高和峰的空间分布, 构成了青蒿素分子的骨架. 此时 22 个氢原子的位置是由碳原子的四面体的理论计算决定的.

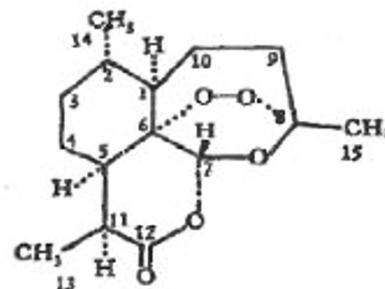


图 2 青蒿素分子的三维结构

生物物理所青蒿素课题组责成梁丽在 1975 年 11 月 30 日的全国 523 工作北京会议上, 首次揭示了青蒿素的化学结构, 也就是分子中原子联结时的键长键角, 从而展示了它的三维分子图像. 那时正是 523 群体对结构束手无策时, 大会与会者无不欣喜于这个突破. 当然也引起了上海有机所代表的关注, 这个结构与他们推测的分子骨架截然不同. 大会后, 在梁晓天教授主持的鉴定会上确认, 生物物理所用常规的 X 射线晶体衍射方法得出的以罕见的三氧噁烷为特征的青蒿素分子结构是唯一能正确地解释所有观测到的实验, 并且具有合理的化学键的分子结构. 上海有机所的实验数据可排列出十数个可能的分子结构式, 会议否定了上海有机所根据光谱和化学反应推测所得到的其中一个过氧内酯的结构, 在场各所代表(北京中药研究所, 上海有机所, 生物物理所)均无异议. 梁晓天教授还高兴地鼓励生物物理所, 发表 X 射线晶体衍射方法测定的青蒿素分子结构.

1976 年 1 月, 青蒿素结构研究协作组生物物理所组长李鹏飞和北京中药所组长屠呦呦一同前往上海, 向上海有机所通报这一结论^[13]. 与此同时, 梁丽遵照梁晓天的意见为《科学通报》起草简报. 梁丽请教了中国科学院化学研究所高分子科学研究的开拓者之一朱秀昌先生一起排定青蒿素分子中的原子序号, 查遍文献后, 从结构式上, 才发现这是一种新型倍半萜内酯, 按有机化学系统标准, 命名了这个天然化合物的所有组成的原子. 为了便于《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)收录中国的发现, 将文题定为《一种新型倍半萜内酯——青蒿素》, 并在文中以电子云密度叠合图佐证分子立体结构(实、虚线示成键的空中取向), 署名青蒿素结构协作组, 预定投稿《科学通报》^[14-15]. 该文发表于《科学通报》1977年第(3)期, 并为1977年《化学文摘》收录, 见参考文献[1]. 这是第一篇有关青蒿素结构的科学报道.

3.2 引进最小二乘法, 获得首个精细晶体结构

青蒿素结晶在不对称的空间群中, 解出的分子结构具有 7 个手型中心(图 2), 在解初始结构时, 又人为指定 $\pi/2$ 相角于衍射点(11, 2, 0)来规定了对映体中的一个, 常规的 X 射线晶体衍射方法并没有解决是左还是右手的构型问题. 图 2 的分子结构只是解决了各原子如何成键. 简言之, 图 2 是解析了结构, 但并没有明辨构型. 要把生物活性性质和从原子空间分布取向的构型联系起来, 才能从

原子水平上理解青蒿素和靶分子的作用.

为了测定青蒿素的绝对构型, 首先要得到精细结构. 以前国内单晶 X 射线衍射都是目测强度. 实验误差大, 不可能得到精细结构. 青蒿素是我国第一个由四圆衍射仪收集到精确衍射强度的小分子晶体, 提供了从晶体初始结构模型中得到各个原子在空间的准确的原子三维坐标(x, y, z)的可能性. 如何实施呢? 经数学最小二乘法优化原子参数, 用计算机精修即可. 当时国内没有现成的方法. 梁丽查阅国外文献, 去北大旁听了数学系的有关课程, 克服了诸多困难. 不幸的是, 1976 年末李鹏飞由于以身作则, 带领梁丽一年多来为赶 523 规划的进度, 连续夜里上机试算, 白天校正错误, 以致工作劳累过度, 初冬寒夜在机房病倒, 肾功能衰竭, 英年早逝. 此后, 梁丽独立继续推进最小二乘修正方法的建立. 引进了一个全矩阵最小二乘精修的方法, 并把它成功地应用在这个课题上(公式 5, 6).

$$\sum_{hkl} W_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)/k|)^2 \quad (5)$$

$$\text{其中, } W = \frac{1}{|F_o|} \text{ for } |F_o| > 16, \text{ otherwise } W = 1. \quad (6)$$

梁丽编制了(5)式全矩阵最小二乘修正方法的 TQ-16 BCY 语言的程序^[16]. 通过反复检验和试算, 并和新组员一起调试成功. 令计算的结构振幅 $|F_c(hkl)|$ 趋近于 X 射线衍射观察的结构因子振幅 $|F_o(hkl)|$, 并采用合理的加权方案^[2], 经过由粗到精的结构参数的十数次逼近, 使得偏离 R 因子从 0.22 降至 0.1070. 此后, 梁丽又编写和利用了差值电子云密度图的计算程序, 并从得到的差值电子云密度图上揭示出 22 个氢原子在空间的真实位置, 见图 3.

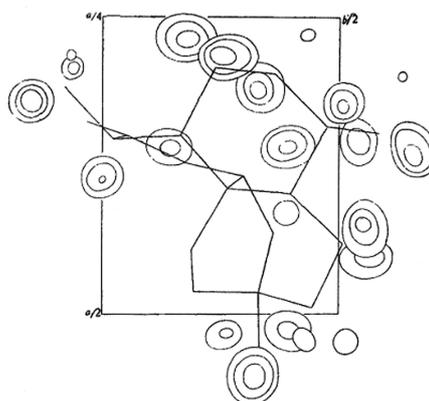


图 3 沿晶体单胞 C 方向投影的差值电子密度展现了相应分子中 22 个氢原子的电子密度峰

$$\Delta\rho(x,y,z)=\frac{1}{V}\sum_h\sum_k\sum_l F_{(hkl)}\exp[-2\pi\cdot i(hx+ky+lz)] \quad (7)$$

在上式(7)中, $F_{(hkl)} = (|F_o| - \kappa|F_c|) \exp(2\pi i\varphi_c)$ (8)

此后, 包括了新找到的这 22 个氢原子(图 3)再进行的若干次最小二乘结构精修, 直到参数移动和误差的最大比值小于 0.05, 确认精修已经收敛. 误差因子降为 7.45%. 达到当时国际精度水准. 即使

在科技发展 40 年后的今天, 该误差值仍落在衡量精细结构的误差因子范围(2%~8%)之内. 这是我国得到的第一个偏差 R 因子低于 8% 的精细结构. 它符合国际晶体学会的指导标准^[17]. 至此, 通过 X 射线晶体立体结构的分析, 完成了青蒿素化学结构的精细测定(图 4).

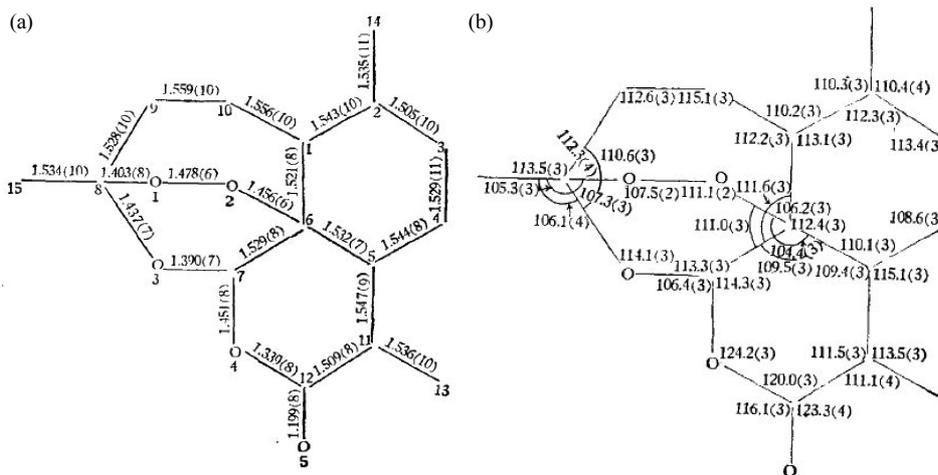


图 4 最小二乘法修正后青蒿素分子的精确键长(a)和精确键角(b)

键长单位为 Å, 键角单位为(°).

3.3 成功利用 X 射线反常散射, 确定青蒿素分子的绝对构型

因为青蒿素是旋光异构体, 绝对构型是制药业和活性天然产物全合成的成败关键, 青蒿素的绝对构型又成为 523 面临的重要课题之一. 常规的 X 射线衍射实验数据可以给出原子之间的距离和角度从而得到三维分子结构. 但是在两个不同的对映体中, 成键的键长和键角都是完全相同的. 而只有 X 射线的反常散射实验数据才有可能分辨与活性化合物的分子性质相关联的绝对构型. 为了得到青蒿素药物的活性构型, 查阅了绝对构型的开创者 Bijvoet 的有关文献, 根据 Bijvoet 在 1951 年测定酒石酸铷钠的绝对构型^[18]的理论, 梁丽利用 X 射线反常散射定出了青蒿素的绝对构型.

反常散射是与原子的吸收成正比的. 当选用入射的波长略为小于原子的吸收边的时候, 反常散射变得明显. 这将造成 X 射线衍射的相角和强度的变化.

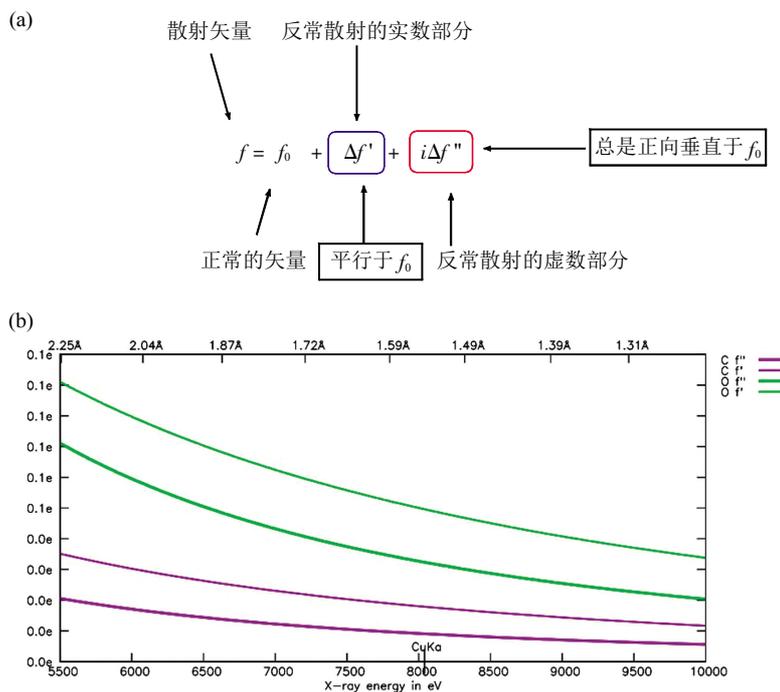
由图 5 可知, 理论近似推导的碳和氧的反常散射是很微弱的. 从国际晶体学 C 卷^[19]中的 4.2.6.8 和 4.2.4.3 表, 选择与青蒿素和酒石酸铷钠有关的反常散射因子 $\Delta f'$, $\Delta f''$ 以及采用 Cu- 和 Mo-K α

射线的质量吸收系数 μ_e 列于表 1.

表 1 列出了青蒿素含有的碳、氧原子和酒石酸铷钠(sodium rubidium (+)-tartrate)含有的钠原子的反常散射因子 $\Delta f'$ 和 $\Delta f''$, 不难看出青蒿素的反常散射效应远小于酒石酸铷钠.

对于青蒿素这样只含有轻原子(诸如碳和氧)的分子, 反常散射效应是很小的. 这种课题在当时是比较困难的, 不像今天, 有了几个成熟的常规方法可选择采用. 即使采用 Cu-K α 的 X 射线, 反常散射仍然很弱. 因此必须要非常小心精准地收集实验数据.

生物物理所利用已取得精细结构和可收到准确衍射强度的优势, 首先根据碳和氧原子的原子反常散射系数(f' 和 f''), 按照精细结构模型, 计算了 $|F_{hkl}|$ 和 $|F_{-h-k-l}|$ 的理论值, $|F_{hkl}|_{理论}$ 和 $|F_{-h-k-l}|_{理论}$. 这不同于那个时代仅有的几篇文献, 是只依靠氧原子的反常散射因子. 这样虽加重了计算这 1553 个 Bijvoet 点对的工作量, 但是会更准确. 这个计算是用自己编制的 BCY 计算程序在 TQ-16 计算机上完成的. 接下来, 设计了一个虽费时但更精确的反复累积衍射强度的数据收集方式, 最大化了这些微弱的反常散射信息, 并重新挑选了一个高品质的晶

图 5 碳和氧的反常散射系数 f' 和 f''

(a) 测定绝对构型时原子散射因子的矢量表达式. (b) 碳和氧元素的理论反常散射系数曲线. f' 和 f'' 由 Cromer 和 Liberman^[20]发展的理论近似值导出, 图片用 Brennan 和 Cowan^[21]的程序绘制.

表 1 反常散射因子 $\Delta f'$ 和 $\Delta f''$ 以及采用 Cu-和 Mo-K α 射线的质量吸收系数 μ/ρ

	Cu-K α			Mo-K α		
	$\Delta f'$	$\Delta f''$	$(\mu/\rho)/(\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	$\Delta f'$	$\Delta f''$	$(\mu/\rho)/(\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1})$
C	0.0181	0.0091	4.51	0.0033	0.0016	0.576
N	0.0311	0.0180	7.44	0.0061	0.0033	0.845
O	0.0492	0.0322	11.5	0.0106	0.0060	1.22
F	0.0727	0.0534	15.8	0.0171	0.0103	1.63
Na	0.1353	0.1239	29.7	0.0362	0.0249	3.03

体^[2], 在 X 射线四圆衍射仪管理人员协助下, 得到了富集反常散射效应后的实验强度数据 $I(hkl)_{\text{实验}}$ 和 $I(-h-k-l)_{\text{实验}}$, 经演算导出了 $|F_{hkl}|_{\text{实验}}$ 和 $|F_{-h-k-l}|_{\text{实验}}$. 这两组理论和实验值皆代入公式(9), 分别得到 $B_{\text{理论}}$ 和 $B_{\text{实验}}$.

$$B = (Q_H - 1) / \frac{1}{2}(Q_H + 1) \quad (9)$$

其中, $Q_H = |F_{hkl}| / |F_{-h-k-l}|$.

比较 $B_{\text{理论}}$ 值和 $B_{\text{实验}}$ 值的符号, 若两者符号一致, 则绝对构型就是该结构模型; 否则, 绝对构型就是该三维结构的镜像. 也就是说, 具有活性的青蒿素分子构型可以和其他光学活性分子一样, 通过

X 射线反常散射试验方法确定其绝对构型. 为了测定结果可靠, 用公式(10)校正了吸收效应.

$$BA = \left(\frac{Q_{H_1} - 1}{Q_{H_2}} \right) / \left(\frac{1}{2} \left(\frac{Q_{H_1} + 1}{Q_{H_2}} \right) \right) \quad (10)$$

其中, $Q_H = |F_{hkl}| / |F_{-h-k-l}|$; Q_{H_1} 是主要 Bijvoet 点对的 $|F_{hkl}|$ 和 $|F_{-h-k-l}|$ 的商, 而 Q_{H_2} 是相邻吸收点对的商.

从所有的 1553 个点对中挑选了具有一定强度且相邻吸收点对的 $B \geq 0.006$ 的 15 对 Bijvoet 点对. 通过(9)和(10)两式直接检测到 Bijvoet 点对的差别. B 和 BA 均指出理论值和实验值符号相反. 因此于 1977 年底, 在已测定的具有精确键长和键

角的分子结构的基础上, 进一步利用 X 射线反常散射效应分辨出键长和键角都丝毫不差的两个对映体中的一个, 为青蒿素的绝对构型^[21]。之所以称其为绝对构型是因无需参照任何化合物(参照甘油醛分子的构型 D+ 或 L+ 所定的构型即为相对构型^②)。实际上它就是由镜面相关联的 1975 年分子结构模型^[1]的镜面对映体。这个具有生物活性意义的绝对构型展示如图 6 和图 7。它是国内用 X 射线反常散射方法成功测定的第一个不含重原子的天然产物的绝对构型。

青蒿素的三维分子结构和活性分子的绝对构型是由中国科学院生物物理研究所引入 3 个新方法, 建立了相应的晶体学软件后, 才最终测定的。生物物理所一批年轻的科学工作者, 不畏困难, 即使有一个人累倒故去, 但在所、室团结一致的努力下, 终于按规划完成了 523 这样一个国家任务。中国科学院生物物理研究所青蒿素协作组责成梁丽执笔, 以署名“中国科学院生物物理所青蒿素研究组”的论文来纪念为测定青蒿素立体结构, 身负重责, 夜以继日赶进度, 奉献出他年轻生命的李鹏飞(1938~1976)。研究文章《青蒿素晶体结构和绝对构型》于 1978 年 4 月完成。该文以严谨的科技方法和确凿的科学数据用中、英文全面发表了测定的青蒿素分子结构, 精细结构的原子座标, 以及可与世界比肩的绝对构型, 发表在《中国科学》(中文版 1979 年, 英文版 1980 年)^[2]。该文被 1980 年的《化学文摘》收录^[2], 并且被编入周公度教授的《结构和物性》高等教育课程教材中^[22]。

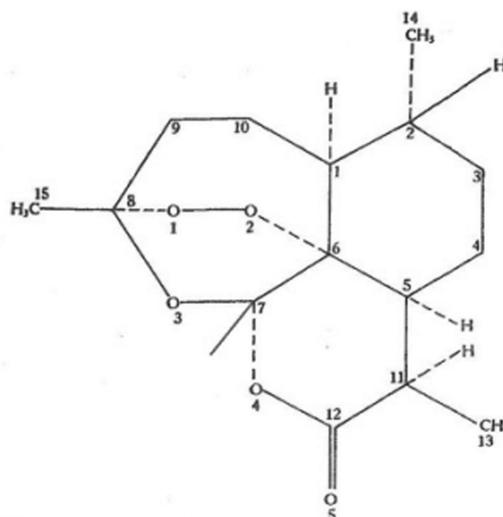


图 6 绝对构型的青蒿素分子结构式

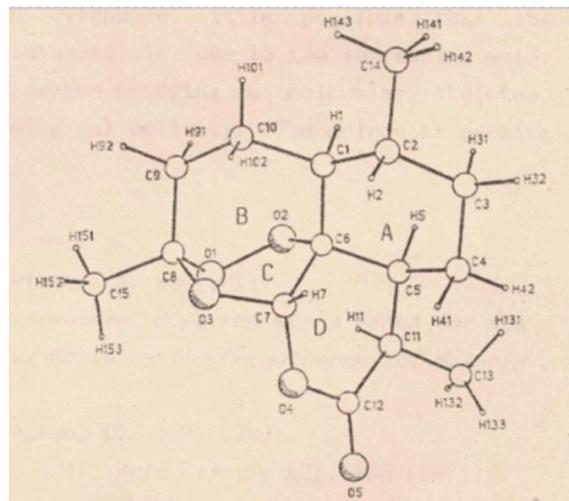


图 7 绝对构型的青蒿素分子结构模型

① 当一个立体中心包括手型中心上的取代基的精确空间排布已知时, 称之为分子的绝对构型。直到 1951 年以后, 人们才有可能得到手型分子的绝对构型。分子的绝对构型大多是用 X 射线晶体学方法先获得结构, 然后再用反常散射方法测定, 而无需参照任何化合物。在 1966 年前后, 通过 Chan-Ingold-Prelog 原子序数优先原则决定立体中心的取代基的优先次序, 若是顺时针方向, 则标记为 *R*(Rectus, 拉丁文的右), 若反时针方向则标记为 *S*(Sinister, 拉丁文的左), 以此来命名立体中心的构型, 但不是整个分子。一个分子如若只有一个立体中心可以标记为 *R* 或 *S*, 若有多个立体中心就要有多于一个的标记。例如, 青蒿素有七个立体中心可标记为(3*R*, 5*aS*, 6*R*, 8*aS*, 9*R*, 12*S*, 12*aR*), 其中 3, 5*a* 等是系统命名的原子号数。这个 *R/S* 绝对构型命名系统对于这个旋光异构体将偏振光向顺时针方向, 即右旋(+)或者反时针方向, 即左旋(-)没有固定的关系。一个 *R* 异构体可能是右旋, 也可能是左旋。同样, 这个 *R/S* 命名系统和相对构型 *D/L* 系统间也没有固定的关系。

② 相对构型是参照一个化合物的已定下的构型来辨别这个旋光异构体的构型, 如参照甘油醛。早在大约 1885 年时, 研究碳水化合物 Fischer 把甘油醛(glyceraldehyde, 最简单的糖)作为手型分子的模板。甘油醛是具有两种构型的一对对映体。他指定能将偏振光向顺时针(dextrorotatory)方向旋转的构型为 D-(+)-甘油醛, 能将偏振光向反时针方向(levorotatory)旋转的构型为 L-(-)-甘油醛。如果其他分子的手型中心能够通过一定形式的化学变换, 成为类似于甘油醛的构型, 这样所有的分子都可以参照甘油醛来指定为 D- 或 L- 构型。正由于这个原因, 这种 D- 和 L- 命名的构型被称之为相对构型。这 D 或 L 标记的构型并不关联到将偏振光向顺时针方向或向反时针方向旋转, 即 D- 和 L- 并不能指出哪个对映体是右旋, 哪个是左旋。更确切点, 它只是说这个化合物的立体构型是相对应于甘油醛对映体的 D- 或 L- 的构型。如在蛋白质中通常发现的 19 个 L- 氨基酸中有 9 个在 589 nm 波长下是右旋, 而 D- 果糖也可称之为左旋糖, 就因为它它是左旋。后来, 这甘油醛的右旋异构体实际上真是 D 异构体, 但这只是一个幸运的猜测。在这系统建立的时候, 没有办法了解哪个构型是右旋(如果这个猜测是错误的, 这标记情况现在将更混乱)。近年, 有科学论文提出常规的衍射试验很快地就能提供毫不含糊的分子中所有立体中心的相对构型^[23]。

4 解析成功, 去伪存真

4.1 立体结构问世, 国内外采用

在青蒿素结构测定过程中, 这个达到国际水准的青蒿素立体结构模型曾由生物物理所胰岛素晶体结构研究室的代表在第 11 届国际晶体学大会(1978 年 8 月, 华沙)上展示. 中国科学院生物物理研究所

所因青蒿素结构的破解荣获 1979 年国家发明二等奖^[13], 位居青蒿素结构测定的第一名, 仅次于三名分离提纯的研究单位. 该立体结构还由屠呦呦在 1981 年召开的世界卫生组织化学专业组的第四次北京国际会议上进行了报告, 中国科学院生物物理研究所代表应邀参加会议(图 8).

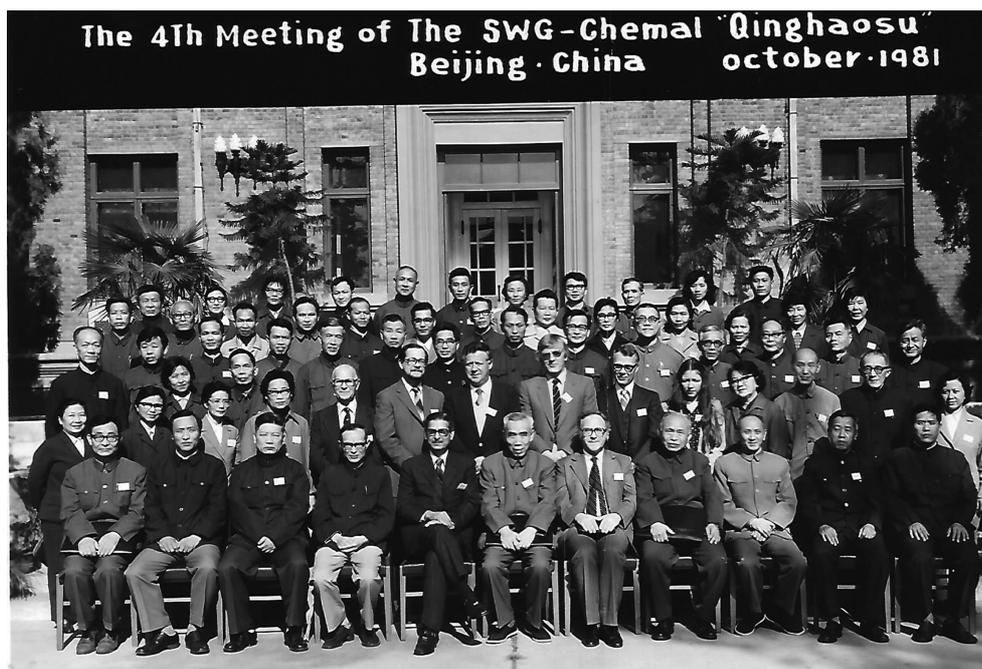


图 8 1981 年 10 月世界卫生组织化学专业组的第四次北京国际会议全体出席人员

这一从原子水平揭示的青蒿素分子立体结构和活性构型, 令国际确信新抗疟药青蒿素的可喜发现, 为因青蒿素的发现获得诺贝尔奖奠定了毋庸置疑的科学基础. 青蒿素结构测定的史实, 验证了因成功测定了青霉素、B12 和胰岛素晶体结构的而获得 1964 年诺贝尔化学奖的霍奇金的阐述: “X 射线分析作为化学结构分析方法的极大优点的是在它毫无疑问地唯一确定结构的同时, 展现了根本从未料想到的令人惊讶的结构细节”^[24].

青蒿素的立体结构被列在 2015 年 10 月 5 日诺贝尔生理或医学奖发布文献中(图 9). 在有关青蒿素结构测定方面, 国际同行均归功于 X 射线晶体衍射分析方法确凿无疑地确定了青蒿素的结构和绝对构型^[2]. 该结构提供的原子坐标为此后的青蒿素量子力学模型, 能量计算, 靶分子结合, 乃至其抗肿瘤作用探讨所采用^[25-32].

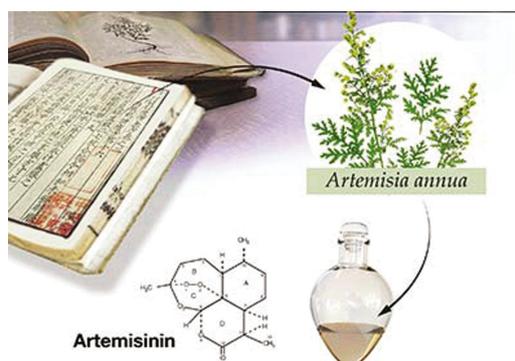


图 9 青蒿素的立体结构被列在 2015 年诺贝尔生理或医学奖发布文献中^[33]

值此青蒿素结构的首发科学报道, 《一种新型的倍半萜内酯——青蒿素》, 发表 40 周年之际, 笔者作为亲历亲为者撰写本文, 回顾和展示了青蒿素结

构和构型的全历程，望与大家共享这一在中国科学研究发展历史上的光荣与精神，同时也希望借此校正某些混淆的学术和认知问题，以正确借鉴历史的经验与精神。

4.2 实事求是，科学责任

青蒿素的发现在 2015 年获得诺贝尔生理或医学奖，引发大家关注首发报道青蒿素结构的论文《一种新型的倍半萜内酯——青蒿素》。由于集体署名，众人不知作者是谁，不知是谁发现青蒿素这个前所未见的新型分子，又由于文中掺杂了不同的测试方法和科学概念，使人们忽略该文的重点所在。为此我们试图理清这些问题，还其历史的原貌。

《一种新型的倍半萜内酯——青蒿素》首稿是由生物物理所参与青蒿素晶体结构分析的梁丽执笔在 1976 年 1 月中旬完成。署名和投稿的期刊是在课题组长李鹏飞授意下拟定的。在原稿中仅报道了根据 X 射线衍射晶体结构分析方法发现了一种新型倍半萜内酯，文中备有手绘的三维的青蒿素化学分子结构(图 2)，并附有翔实的含有分子结构骨架的电子云密度叠合图(图 1)。用以佐证文题“一种新型倍半萜内酯——青蒿素”这一中国的发现。

X 射线衍射实验必需的单晶样品和分子式是由北京中药所直接提供的。这些包括着 523 群体前阶段的付出。本着 523 协作原则，北京中药所要在生物物理所的科研成果报道时附上有关样品的取得，无可厚非。但他们没有参加青蒿素结构的 X 射线晶体分析而且自称“生物物理所那些数据我们也不懂，……”^[14]，就在原稿生物物理所的科研成果上，随意地插入不能测定晶体结构的方法，并混淆了结构和构型的科学概念(见第 7 页注释①)，改成了“根据光谱数据和 X 射线分析以及化学反应，证明其为一种新型的倍半萜内酯，具有左列的相对构型”，并未经生物物理所最后审阅同意，自行上报卫生部。但论文仍以生物物理所原定的青蒿素结构研究协作组署名，1977 年发表在生物物理所原定的《科学通报》上。

这新型倍半萜内酯吸引了国外科技界注意，《化学文摘》当年即收录。众所周知，只有 X 射线衍射方法才有可能测定像青蒿素这样前所未见的复杂立体结构，而 20 世纪 70 年代的波谱和化学反应却无能为力。尤其是报道新型化合物，科学界十分慎重。《化学文摘》的专业编辑察觉了这种偏离，恢复了原稿的科学表述，即测定的是“结构(structure)”，抛弃了不确切的“相对构型(relative

configuration)”。更敏锐地从 X 射线衍射的两张图，断定是真实地测定了 1(即青蒿素)的晶体结构，而对文中插入光谱数据以及化学反应，科学地分别摘出为“该结构为质谱，红外光谱，¹H 核磁共振谱和化学反应测定。(原文：The structure was detd. by mass spectrometry, IR spectrometry, ¹H NMR, and chem. reactions. The cryst. structure of 1 was also detd.)”^[1]。《化学文摘》虽无一遗漏地详列了文中号称“测定结构”的光谱数据所用的波谱技术和化学反应，但 40 年来，未见任何学术文章报道可以重复。而测定的晶体结构，已获得其他国家发表的科学论文证实和高度评价^[34-35]。

以此为例，该文章如若没有 X 射线衍射方法的晶体结构解析结果，仅靠 CA 摘要明确区分出的“该结构为质谱，红外光谱，¹H 核磁共振谱和化学反应测定”是不可能获得青蒿素分子的正确化学结构为国争光的，而是贻笑四方了。所以写科学文章一定要实事求是。

4.3 严谨治学，勇于创新

对于生物物理所青蒿素结构的测定，屠呦呦曾在她的书中概括为“用当时国内先进的 X- 衍射方法测定青蒿素的化学结构，并在精细地测定反常散射强度数据基础上确定其绝对构型，终于在 1975 年 11 月 30 日确定了青蒿素的化学结构”。Daniel L. Klayman^[14]曾在《科学》(Science)发表的综合评述中明确指出“青蒿素的结构，以及它的相对构型^[23]是毫不含糊地为 X 射线衍射测定。它的绝对构型也已经查明”。

5 结 语

本文详述了青蒿素结构的研究工作，可以看出，青蒿素结构测定过程是一个步步紧跟国际先进科学水平的努力。Karle 夫妇在 1964 年才完成世界上第一个用直接法解析的晶体结构，我们为了破解这谜一样的青蒿素结构，勇敢尝试了这一新方法，1975 年就成功地测定了青蒿素结构。这一成果的创新价值不仅仅在于解出了青蒿素的化学结构，更在于它开拓了我们的视野，我们可以看得更高，敢于对科研初步成果提出精益求精的设想。正是基于更为广阔的视野和更高的追求，在青蒿素化学结构确定后，我们又引进了最小二乘的精修方法，使得青蒿素结构精度进一步达到了国际先进水平。精确的结构进一步为我们开启了辨别一对对映体的大门。不畏惧过于微弱的反常散射效应，不厌

其烦地重复积累收集数据, 不怕烦琐的计算, 闯开至今还是晶体结构分析中棘手的绝对构型难关, 查明了具有抗疟活性的青蒿素的构型. 生物物理所的青蒿素研究任务引入了3个新方法, 建立了晶体学软件. 虽然费时3年, 痛心失去了一位优秀的科研骨干, 但这第一个立体结构突破后, 连续完成了测定北京中药所的青蒿甲素(该结构被用于屠呦呦诺奖代表作^[36])、青蒿乙素(通过测定结构证实了这就是没有抗疟活性的南斯拉夫化学家在同一植物中分到的 Arteannuin B)、青蒿琥酯^[37]和竹红菌乙素^[38]等一系列的晶体结构. 由此在中国开创了一条快速解析不含重原子晶体结构的常规程序, 发挥了X射线晶体结构分析在物质结构和生物结构学科上的强有力的作用.

在科学研究中不仅要有合适的课题, 更需要有实事求是、严谨治学的态度, 再加上克服困难勇于创新的精神. 相信在全国科学工作者的共同努力下中国的科学界必将迎来又一个明媚的春天.

本文写出这些世界同行早有的公断, 是为了表明中国人能作出结构, 也有科学能力明辨真伪. 写到这里, 我们不免要提及老一辈科学家们为我们树立的榜样. 尤其是梁晓天先生, 是他以广博的化学和波谱的学识, 论证了上海有机所的猜测结构式只是分子局部部分十多种组合的其中之一, 且还不能解释所有实验数据. 他当时就加以否定而不顾它是由什么人提出的猜测. 也不因是年轻人作出的青蒿素晶体和化学结构而看轻. 相反, 他以科学数据为本. 旗帜鲜明首先表态, 从此才能使青蒿素的正确结构得到公认. 希望通过此文, 使大家了解到围绕青蒿素结构测定中的事实. 这其中有艰辛和努力, 也有缺欠和教训. 我们希望借用此文向在这项研究工作中为人类的健康做出奉献的科学研究人员致敬, 并澄清一些不实的传言, 还历史以真相. 更盼我们年青的一代要肩负科学责任, 实事求是, 为国家作出更多更大的科研成果. 我们衷心希望中国的科学研究能继往开来, 在健康的科学大道上开创更为美好的未来.

致谢 青蒿素结构研究课题是在以周克鼎为代表的全国523办公室的指导下按政治任务完成的. 卫生部中医研究院中药研究所提供了X射线晶体分析所需的晶体和分子式. 北京计算中心TQ-16机组给予了计算上的方便. 该工作曾蒙前辈科学家唐有祺, 梁晓天, 朱秀昌教授的正确引导. 中国科学院

生物物理研究所提供了良好的研究环境和条件. 研究获得中国科学院生物物理研究所相关同志的支持, 诸如时任党支部书记的徐秀璋同志力主接受523办公室的军工任务, 并得到胰岛素晶体结构研究室领导们的支持和关注工作进展, 郑启泰, 张树德, 董贻诚同志在不同阶段不同方面或多或少的参与和帮助, 管理维护四圆衍射仪的伍伯牧和窦士琦同志协助收集了衍射数据. 这些我们牢牢铭记在心. 早在2013年5月前研究室主任, 前所长, 中国科学院院士, 梁栋材就指出, “青蒿素结构的测定为青蒿素新药和青蒿素类药物提供了科学基础”. 2013年10月, 前研究室代主任林政炯对我们说“回忆有助于了解晶体结构分析在整个青蒿素结构测定工作中所起的作用”. 青蒿素X射线晶体结构分析的成功依然记忆犹新地活在共同经历过那个年代的老同志们的心中. 在本文成文过程中得到王耀萍, 徐秀璋, 王大成, 王家槐, 雷克健, 林政炯, 华庆新, 李幼华, 严友为等同志的建议、支持和鼓励在此一并致谢.

参 考 文 献

- [1] 青蒿素结构研究协作组. 一种新型倍半萜内酯——青蒿素. 科学通报, 1977, 22(3): 142(Cheical Abstracts 87, 98788g, 1977)
The Collaborating Group for Research on the Structure of Qing Hao Su. A new sesquiterpene lactone-Qinghaosu. Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin), 1977, 22(3):142(Cheical Abstracts 87, 98788g, 1977)
- [2] 中国科学院生物物理研究所青蒿素协作组. 青蒿素的晶体结构及其绝对构型. 中国科学, 1979(11): 1114-1128
Qinghaosu Research Group of Institute of Biophysics. Scientia Sinica, 1980, 23(3): 380-396(Cheical Abstracts 93, 71991e, 1980)
- [3] 张剑方. 迟到的报告. 广州: 羊城晚报出版社, 2006
ZHANG J F. A Detailed Chronological Record of Project523 and The Discovery and Development of Qinghaosu (Artemisinin). Guangzhou: Yangcheng Evening News Publishing(Guangdong) Co. Ltd, 2006
- [4] Tu Y Y. Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(35): 10210-10226
- [5] Sheldrick G M. A short history of SHELX. Acta Cryst, 2008, A64: 112-122(DOI: 10.1107/S0108767307043930)
- [6] 竺迺珏. 创建测定分子结构的直接法——浅谈1985年诺贝尔化学奖. 知识就是力量, 1986(1): 5
Zhu N J. Knowledge is Power, 1986(1): 5
- [7] Karle I L, Karle J. An application of the symbolic addition method to the structure of L-arginine dihydrate. Acta Crystallographica, 1964, 17(7): 835-841
- [8] Cochran W. Relations between the phases of structure factors. Acta

- Crystallographica, 1955, **8**(8) : 473-478
- [9] Hauptman H, Karle J. Structure invariants and seminvariants for noncentrosymmetric space groups. *Acta Crystallographica*, 1956, **9**(1): 45-55
- [10] 中国科学院计算技术研究所 30 年 1956-1986. 北京: 中国科学院计算技术研究所, 1986: 113-115
ComICT-CAS at Thirty: a History from 1956 to 1986. Beijing: Institute of Computing Technology, Chinese Academy of Sciences, 1986: 113-115
- [11] 秦福祥, 张纪仁. 上海电子仪表工业志. 上海: 上海社会科学院出版社, 1999: 第四编
Qin F X, Zhang J R. Shanghai Electronic Instrument Industry. Shanghai: Shanghai Academy of Social Sciences Press, 1999
- [12] Bricogne G. Fourier transforms in crystallography: theory, algorithms and applications//Shmueli U. *International Tables for Crystallography Volume B.2nd*. New York: John Wiley & Sons, 2010: 24-113 (DOI:10.1107/97809553602060000760)
- [13] 屠呦呦. 青蒿及青蒿素类药物. 北京: 化学工业出版社, 2009
Tu Y Y. Artemisia and Artemisinin. Beijing: Chemical Industry Press, 2009
- [14] 黎润红. “523” 任务与青蒿素研发访谈录. 长沙: 湖南教育出版社, 2015: 266-286
Li R H. Interviews on 523 Project and The Discovery of Artemisinin. Changsha: Hunan Education Publishing House, 2015: 266-286
- [15] Wang M Y. Publication process involving the discovery of artemisinin (qinghaosu) before 1985. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2016, **6**(6): 461-467
- [16] 梁 丽, 董贻诚, 林政炯. 晶体结构修正的最小二乘方法. *化学通报*, 1979(3): 23-25
Liang L, Dong Y C, Lin Z J. *Chemical Bulletin*, 1979(3): 23-25
- [17] Wodak S J, Vagin A A, Richelle J, Das U, Pontius J, Berman H M. Assessing The Quality Of Macromolecular Structures//Arnold E, Himmel D M, Rossmann M G. *International Tables for Crystallography Volume F. 2nd*. New York: John Wiley & Sons, 2012: 662-676(DOI:10.1107/97809553602060000880)
- [18] Bijvoet J M, Peerdeman A F, Van Bommel A J. Determination of the absolute configuration of optically active compounds by means of X-rays. *Nature*, 1951, **168** (4268): 271-272 (DOI:10.1038/168271a0)
- [19] Prince E. *International Tables for Crystallography Volume C: Mathematical, Physical and Chemical Tables*. Springer Netherlands, 2006(DOI: 10.1107/97809553602060000103)
- [20] Cromer D T, Liberman D. Relativistic calculation of anomalous scattering factors for X rays. *Journal of Chemical Physics*, 1970, **53**(5): 1891-1898
- [21] Brennan S, Cowan P L. A suite of programs for calculating X-ray absorption, reflection and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelengths. *Rev Sci Instrum*, 1992, **63**(1): 850-853
- [22] 周公度. 结构和物性——化学原理的应用. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2009: 147-148
Zhou G D. *Structure and Properties of Matter: Application of Chemical Principle*. 3rd. Beijing: Higher Education Press, 2009: 147-148
- [23] Albright A L, White J M. Determination of absolute configuration using single crystal X-ray diffraction. *Methods Mol Biol*, 2013, **1055**(1055):149-162
- [24] Crowfoot D. *X-ray Analysis of Complicated Molecules//Nobel Lectures in Chemistry 1942-1962*. London: World Scientific Publishing and Imperial College Press, 1964: 83
- [25] Kepler J A, Philip A, Lee Y W, *et al*. Endoperoxides as potential antimalarial agents. *J Med Chem*, 1987, **30**(8): 1505-1509
- [26] Gu J D, Chen K X, Jiang H L, *et al*. A quantum chemistry study of Qinghaosu. *Chemical Physics Letters*, 1997, **277**(1-3): 234-238
- [27] Gu J D, Chen K X, Jiang H L, *et al*. A DFT study of artemisinin and 1, 2, 4-trioxane. *Journal of Molecular Structure Theochem*, 1999, **459**(1-3): 103-111
- [28] Gu J D, Chen K X, Jiang H L, *et al*. The radical transformation in artemisinin: a DFT study. *J Phys Chem A*, 1999, **103** (46): 9364-9369
- [29] Bhattacharjee A K, Karle J M. Stereoelectronic properties of anti-malarial artemisinin analogues in relation to neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 1999, **12**(5): 422-428
- [30] Wang J D, Zhang C J, Chia W N, *et al*. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 2015, **6**: 10111
- [31] Dong J X, Dan Y M, Tan Z C, *et al*. Low temperature molar heat capacities and thermal stability of crystalline artemisinin. *Thermochimica Acta*, 2007, **463**(1): 2-5
- [32] Crespo-Ortiz M P, Wei M Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, **2012**(4): 247597
- [33] Press Release: the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/press.html. 2015-10-05
- [34] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985, **228**(4703): 1049-1055
- [35] Chan K L, Yuen K H, Takayanagi H, *et al*. Polymorphism of artemisinin from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 1997, **46** (7): 1209-1214
- [36] 屠呦呦, 倪慕云, 钟裕容, 等. 中药青蒿素化学成分的研究 I. *药学报*, 1981, **16**(5): 366-370
Tu Y Y, Ni M Y, Zhong Y R, *et al*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1981, **16**(5): 366-370
- [37] Liang L, Dong Y C, Zhu N J. Stereochemistry of a derivative of artemisinin-artesunate, C₁₉H₂₈O₈. *Journal of Structural Chemistry*, 1986, **5**(2): 73-77
- [38] 梁 丽, 竺迺珏, 张曼华. 竹红菌乙素晶体和分子结构. *科学通报*, 1987, **32**(1): 56-59
Liang L, Zhu N J, Zhang M H. *Chinese Science Bulletin*, 1987, **32**(1): 56-59