三种抗坏血酸糖苷的合成及其 α -糖苷酶抑制活性马济美* 谢凌云 王龙文 陈杭炜 曾 贞
陈 浩 江 洪*

(华中农业大学理学院化学系 武汉 430070)

摘要 2-*O*- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2 β G)是从枸杞中分离得到的一种天然抗坏血酸糖苷化合物, 通过化学方法合成了 AA-2 β G 及其两种类似物, 并用商品化的阿卡波糖作为阳性对照, 研究了三种抗坏血酸糖苷对酿酒酵母 α -葡萄糖苷酶和猪胰腺 α -淀粉酶的活性影响。结果显示, 三种抗坏血酸糖苷对 α -葡萄糖苷酶有显著的抑制作用, 对 α -淀粉酶抑制作用不明显, 说明这三种抗坏血酸糖苷具有作为 α -糖苷酶抑制剂开发的潜质。

关键词 2-*O*- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸; 类似物; 合成; α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶; 抑制剂

Synthesis and α -Glycosidase Inhibitory Activity of Three Ascorbic Acid GlycosidesMa, Jimei* Xie, Lingyun Wang, Longwen Chen, Hangwei
Zeng, Zhen Chen, Hao Jiang, Hong*

(Department of Chemistry, College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract 2-*O*-(β -D-Glucopyranosyl)-L-ascorbic acid, a natural β -glycoside with ascorbic acid moiety present in *Lycium barbarum*, and its two analogues were chemically synthesized. Their inhibitory effect on yeast α -glucosidase and α -amylase were investigated with commercially available acarbose as positive control. The biological assays demonstrated the distinct inhibitory effect of these compounds on α -glucosidase activity and weak inhibitory activity against pancreatic α -amylase. The kinetic study indicated that these compounds were competitive inhibitors. These results imply that these three β -glycosides have the potential to be developed as α -glucosidase inhibitors.

Keywords 2-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-L-ascorbic acid; analogue; synthesis; α -glucosidase; α -amylase; inhibitor

糖尿病是一种代谢紊乱疾病, 已成为三大严重威胁人类健康的慢性疾病之一^[1]。根据 2014 年国际糖尿病联合会的统计, 全世界糖尿病患者超过 4.5 亿人, 其中 II 型糖尿病(非胰岛素依赖性糖尿病)占比超过 90%^[2]。在治疗 II 型糖尿病的药物中, α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖等疗效非常显著, 但是阿卡波糖也常常会引起腹胀、腹痛等副作用^[3], 因此寻求更高效安全低副作用的抗糖尿病药物一直是药物研究的重要目标^[4]。

枸杞果实是一种传统的中药, 在中国和一些亚洲国家已经当作保健品食用了两千多年。研究发现, 枸杞具有丰富的药理活性, 如抗氧化、降血压、降血糖等效果^[5]。2-*O*- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-2 β G)是一种天

然的抗坏血酸衍生物, 最早由日本学者 Toyada-ono 从宁夏枸杞中分离得到^[6], AA-2 β G 在体内只能被小肠中的 β -糖苷酶水解, 具有缓释抗坏血酸的作用, 能达到持续清除自由基和抗氧化的效果^[7], 还能抑制 Hela 细胞增殖生长^[8]。根据 AA-2 β G 分子的结构特点, 我们推测 AA-2 β G 有可能会与食物中糖类化合物在结合 α -糖苷酶时产生竞争, 起到抑制血糖急剧升高的作用。为了证实这个推测, 我们合成了 AA-2 β G 及其两种类似物 2-*O*- β -D-半乳糖基-L-抗坏血酸(AA-2 β Gal)和 3-*O*- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(AA-3 β G), 并研究了它们在体外对 α -糖苷酶的影响。

* Corresponding authors. E-mail: majimei@mail.hzau.edu.cn; jianghong@mail.hzau.edu.cn

Received December 11, 2016; revised January 20, 2017; published online February 20, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21402056) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2014QC007).

国家自然科学基金(No. 21402056)和中央高校基本科研业务费专项资金(No. 2014QC007)资助项目。

1 结果与讨论

AA-2 β G 的合成路线如 Scheme 1 所示. 由于抗坏血酸的 2 位羟基容易与羰基形成分子内氢键, 导致 2 位羟基反应活性比其他羟基低, 因此制备 AA-2 β G 时需先保护抗坏血酸的 3、5、6 位羟基^[9]. 以商品化的 5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸 **1** 为原料, 先后尝试了使用叔丁基二甲基硅基(TBS)、苄氧羰基(Cbz)和苄基(Bn)保护 3 位羟基. 以 Cbz 为保护基时, 在碳酸氢钠/THF/H₂O、碳酸钾/THF/H₂O、碳酸钾/DMSO/THF 等条件下, 3-*O*-苄氧羰基-5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸产率均较低; 控制试剂的用量, 在碳酸钾和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, TBS 能选择性地保护化合物 **1** 的 3 位羟基, 但遗憾的是在随后以溴代糖为糖基供体, 碳酸钾反应条件中不稳定, TBS 基团会发生脱除导致糖苷化反应发生在抗坏血酸的 3 位羟基(经核磁氢谱确认); 最后我们使用酸碱耐受性较高的苄基保护基, 控制保护基试剂的用量和反应时间, 以较高的产率(81%)得到化合物 **2**.

图式 1 AA-2 β G 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route to AA-2 β G

在糖苷化反应中, 我们首先尝试了 Schmidt 给体法, 即以三氯乙酰亚胺酯为糖基供体, 但此类反应在 Lewis 酸催化条件(TMSOTf 或三氟化硼乙醚)下进行, 得到的反应产物复杂, 难以纯化. 后改用溴代糖作为糖基供体, 在碱性条件下发生糖苷化, 以碳酸钾为碱、DMF 为溶剂

的常规条件下, 但反应产率依然非常低, 分析原因可能是碳酸钾在 DMF 中溶解度较低, 而糖基受体 2 位羟基本身活性偏低所致. 最后通过探索条件, 发现使用二氯甲烷和水作为溶剂, 同时在相转移催化剂四丁基溴化铵作用下, 反应效率大为提高, 以 80%的产率得到了化合物 **3**.

化合物 **3** 水解条件也必须注意, 为避免糖苷键在强酸性条件下断裂, 选择用醋酸水溶液加热条件下脱除异丙叉保护基, 然后氢化脱除苄基得到化合物 **4**, 最后用甲醇钠脱除乙酰基得到 AA-2 β G (Scheme 1). 与文献合成路线方法^[6]相比(13%), 本路线大大提高了反应总收率(53%). 以 1-溴-2,3,4,6-四乙酰基半乳糖为原料, 用相同的方法可以制备 AA-2 β Gal(总产率 51%, Scheme 2); AA-3 β G 则通过 5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸直接与 1-溴-2,3,4,6-四乙酰基葡萄糖反应后, 依次脱除保护基得到(总产率 51%, Scheme 3).

图式 2 AA-2 β Gal 的合成路线
Scheme 2 Synthetic route to AA-2 β Gal

所得化合物经过 NMR 和 HRMS 确认结构, 然后分别进行了对酿酒酵母 α -葡萄糖苷酶和 α -猪胰腺淀粉酶活性的测试. 结果显示, 三种化合物均对 α -葡萄糖苷酶有明显的抑制活性, 抑制率与浓度成正相关性, 通过计算得出 AA-2 β G、AA-2 β Gal 和 AA-3 β G 的 IC₅₀ 值分别为 0.98, 1.15, 63.67 mmol/L (表 1). 其中, AA-2 β G 和 AA-2 β Gal 的 IC₅₀ 值小于阿卡波糖阳性对照组(4.54 mmol/L), 说明 AA-2 β G 和 AA-2 β Gal 对酿酒酵母 α -葡萄糖苷酶的抑制能力高于阿卡波糖.

我们通过动力学研究了三种抗坏血酸糖苷化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型. 根据不同浓度下的三种化

图式 3 AA-3βG 的合成路线
Scheme 3 Synthetic route to AA-3βG

表 1 测试化合物对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度

Table 1 IC_{50} value of the tested compounds against α -glucosidase

化合物	$IC_{50}/(mmol \cdot L^{-1})$
阿卡波糖	4.54 ± 0.23
AA-2βG	0.98 ± 0.12
AA-2βGal	1.15 ± 0.21
AA-3βG	63.67 ± 2.60

合物水解 p NPG 的速率, 作出 Lineweaver-Burk 图如图 1 所示, 随着浓度的增加, 米氏常数 K_m 变大, 最大速率保持不变, 说明三种化合物为竞争性抑制, 通过 Dixon 方程计算得到 AA-2βG、AA-2βGal 和 AA-3βG 的抑制常数 K_i 分别为 1.98, 7.25 和 19.56 mmol/L.

AA-2βG、AA-2βGal 和 AA-3βG 对猪胰腺 α -淀粉酶的抑制活性结果如图 2 所示. 作为阳性对照的阿卡波糖, 在浓度为 0.015 mmol/L 时, 对 α -淀粉酶的抑制率为 42.7%, 而当浓度增加到 0.077 mmol/L 时, 抑制率达到了 90.6%. 而 AA-2βG、AA-2βGal 和 AA-3βG 对 α -淀粉酶的影响则较小, 在浓度为 0.015 mmol/L 时抑制率分别为 5.9%、19.4% 和 4.6%, 浓度增加到 0.77 mmol/L 时也仅为 12.9%、25.3% 和 5.9%.

阿卡波糖作为 α -糖苷酶抑制剂, 是一种有效的糖尿病治疗药物, 然而, 服用阿卡波糖常常伴有胃肠胀气和肠鸣音及腹痛、腹胀、腹泻等副作用, 这可能是由于阿卡波糖对 α -淀粉酶的强抑制作用, 导致未消化的淀粉在肠道内聚集, 被肠道菌群发酵释放出气体和低分子量物质引起的^[10]. 相比之下, AA-2βG、AA-2βGal 和 AA-3βG

图 1 AA-2βG (a)、AA-2βGal (b) 和 AA-3βG (c) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型曲线

Figure 1 Determination of the inhibitory type of AA-2βG (a), AA-2βGal (b) and AA-3βG (c) on α -glucosidase

对猪胰腺 α -淀粉酶的抑制效果远不如阿卡波糖, 如果作为 α -糖苷酶抑制剂药物开发, 这三种糖苷可能不会引起以上不良反应.

2 结论

通过化学方法合成了 AA-2βG、AA-2βGal 和 AA-3βG, 并发现三种化合物对 α -葡萄糖苷酶具备明显的抑

图2 测试物对 α -淀粉酶的抑制活性Figure 2 Inhibitory activity of the tested compounds on α -amylase

制能力, 抑制类型为竞争性抑制, 而对 α -淀粉酶影响很小, 说明这类抗坏血酸糖苷化合物可以作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂。尤其是 AA-2 β G, 本身是一种天然安全的保健品成分, 具有作为低副作用抗糖尿药物开发的潜质, 同时本研究内容也为开发传统保健品枸杞降血糖功能提供了新的线索。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪(AV400, AV600, USA, TMS 为内标); 质谱仪(Agilent 6100 ESI MS, USA); 高分辨质谱仪(Agilent 6540 ESI MS, USA; Bruker MicroTof Q II, USA); 葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20, Sigma), 淀粉酶(EC 3.2.1.1, Sigma), 其余试剂为市售化学纯或分析纯产品。

3.2 化合物的合成

3.2.1 3-O-苄基-5,6-异丙叉基-L-抗坏血酸(2)的合成

5,6-O-异丙叉基-L-抗坏血酸 **1** (1.5 g, 6.93 mmol) 溶于四氢呋喃/二甲亚砜(24 mL, $V/V=1:1$) 中, 加入碳酸钾(0.957 g, 6.93 mmol), 然后逐滴滴加苄溴(4.05 mL, 34.65 mmol), 滴加完毕, 室温(25 °C)条件下反应 0.5 h, 反应进程薄层色谱(TLC)检测跟踪。反应结束后减压蒸除溶剂四氢呋喃, 加入二氯甲烷(20 mL), 用柠檬酸水溶液洗涤数次, 至体系呈中性, 有机相用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 滤液浓缩, 硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:4] 分离得到 1.72 g 白色固体 **2**^[9a], 产率 81%。m.p. 200~201 °C (文献值^[11] 202.7~203.5 °C); 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.42~7.34 (m, 5H), 5.53 (d, $J=11.8$ Hz, 1H), 5.49 (d, $J=11.8$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 4.26 (dt, $J=6.7, 3.8$ Hz, 1H), 4.10 (dd, $J=8.5, 6.9$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J=8.5, 6.8$ Hz, 1H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H)。

3.2.2 2-O-(2,3,4,6-四乙酰基- β -D-葡萄糖基)-3-O-苄基-5,6-O-异丙叉基-L-抗坏血酸(3)的合成

将化合物 **2** (1.72 g, 5.6 mmol) 加入到二氯甲烷/水 (34 mL, $V:V=1:1$) 的混合溶液中, 室温下搅拌均匀后加入溴代五乙酰葡萄糖(2.77 g, 6.72 mmol), 随之加入碳酸钾(0.93 g, 6.72 mmol) 和四丁基溴化铵(2.16 g, 6.72 mmol), 25 °C 下搅拌反应 5 h。反应停止, 将水相与有机相分离, 有机相用柠檬酸水溶液洗涤 2 次, 用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 滤液浓缩, 残余物经硅胶柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:3] 分离得到 2.86 g 白色固体 **3**, 产率 80%。m.p. 138~140 °C; $[\alpha]_D^{20} -4.73$ (c 1.0, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.41~7.34 (m, 5H), 5.55 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 5.41 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 5.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.28 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 5.17~5.08 (m, 2H), 4.56 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 4.30~4.24 (m, 2H), 4.14 (dd, $J=12.4, 2.3$ Hz), 4.08 (dd, $J=8.5, 6.8$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J=8.5, 6.8$ Hz, 1H), 3.76 (ddd, $J=10.0, 4.4, 2.3$ Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.34 (s, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 170.4, 169.9 (2C), 169.5, 167.8, 158.5, 135.2, 128.9, 128.7, 128.2, 118.1, 110.4, 98.3, 74.9, 74.5, 73.9, 72.4, 72.1, 71.0, 68.1, 65.2, 61.4, 25.8, 25.6, 20.8, 20.6 (2C); HRMS (ESI) calcd for $C_{30}H_{36}O_{15}Na$ [$M+Na$]⁺ 659.1946, found 659.1959。

3.2.3 2-O-(2,3,4,6-四乙酰基- β -D-葡萄糖基)-L-抗坏血酸(4)的合成

将化合物 **3** (2.00 g, 3.14 mmol) 溶于 50 mL 体积分数为 80% 的 CH_3COOH 水溶液, 80 °C 下加热反应 1 h。冷却, 体系中加入 20 mL 乙酸乙酯, 用饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤分液, 中和多余的 CH_3COOH , 有机相用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 旋干, 柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 2:1] 分离得到 1.80 g 白色发泡状固体化合物, 向该化合物 (1.80 g, 2.83 mmol) 中加入其质量 0.02 倍质量分数为 10% 的 Pd/C 湿剂。将体系抽成真空状态, 加入甲醇, 通入氢气, 室温下反应 2.5 h, 抽滤, 滤液旋干, 柱层析 (乙酸乙酯) 得到 1.36 g 白色固体 **4**, 产率 85%。m.p. 163~165 °C; $[\alpha]_D^{20} -3.4$ (c 1.0, CH_3OH); 1H NMR ($DMSO-d_6$, 400 MHz) δ : 5.38~5.29 (m, 2H), 4.96~4.90 (m, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.23 (dd, $J=12.3, 4.8$ Hz, 1H), 4.05~4.00 (m, 1H), 3.95 (dd, $J=12.3, 2.1$ Hz, 1H), 3.78~3.74 (m, 1H), 3.46~3.41 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H); ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 100 MHz) δ : 170.1, 169.6, 169.4, 169.3, 168.6, 162.0, 117.1, 98.6, 74.8, 71.9, 71.0, 70.8, 68.6, 68.0, 61.8, 61.5, 20.5 (2C), 20.4, 20.3; HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{26}O_{15}Na$ [$M+Na$]⁺

529.1164, found 529.1163.

3.2.4 2-*O*- β -*D*-葡萄糖基-*L*-抗坏血酸(**5**)的合成

将化合物 **4** (0.51 g, 1 mmol) 溶于 30 mL 甲醇中, 加入 CH_3ONa (21.6 mg, 0.4 mmol), 室温下反应 3 h. 反应结束加入 5 g 的 732 阳离子交换树脂, 室温搅拌 30 min, 反应体系成弱酸性. 抽滤收集溶液, 旋干得到 0.33 g 白色发泡状固体 **5**, 产率 98%. m.p. 62~63 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 29.30$ (c 1.0, H_2O); ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 4.72 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 4.04~4.00 (m, 1H), 3.88~3.84 (m, 1H), 3.80~3.70 (m, 3H), 3.55~3.40 (m, 4H); ^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz) δ : 175.4, 173.9, 115.8, 102.9, 77.8, 76.2, 75.4, 72.8, 69.3, 69.3, 62.2, 60.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 339.0922, found 339.0917.

3.2.5 2-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基- β -*D*-半乳糖基)-3-*O*-苄基-5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸(**6**)的合成

将化合物 **2** (2.45 g, 8 mmol) 加入到二氯甲烷/水(50 mL, $V:V=1:1$) 的混合溶液中, 室温下搅拌均匀后加入溴代四乙酰半乳糖(3.95 g, 9.6 mmol), 随之加入 K_2CO_3 (1.33 g, 9.6 mmol) 和四丁基溴化铵(3.1 g, 9.6 mmol), 室温 25 °C 下搅拌反应 5 h. 反应停止, 将水相与有机相分离, 有机相用柠檬酸水溶液洗涤数次, MgSO_4 干燥, 过滤, 滤液旋干, 柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚)=1:3] 分离得到 3.87 g 白色发泡状固体 **6**, 产率 76%. m.p. 96~98 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 26.73$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.40~7.3 (m, 5H), 5.58 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 5.47~5.43 (m, 2H), 5.37~5.30 (m, 2H), 5.09 (dd, $J=9.8, 3.5$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 4.27 (td, $J=6.6, 3.3$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J=11.2, 6.6$ Hz, 1H), 4.13~4.07 (m, 2H), 4.02~3.96 (m, 2H), 2.16 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 170.3, 170.1 (2C), 169.9, 167.8, 158.4, 135.3, 128.9, 128.7, 128.3, 118.3, 110.4, 99.0, 74.9, 74.5, 73.9, 71.4, 70.5, 68.5, 66.8, 65.3, 60.8, 25.8, 25.6, 20.9, 20.6, 20.5; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 659.1946, found 659.1936.

3.2.6 2-*O*- β -*D*-半乳糖基-*L*-抗坏血酸(**7**)的合成

化合物 **6** (1.91 g, 3 mmol) 溶于 50 mL 80% CH_3COOH 水溶液, 80 °C 下加热反应 1 h. 反应停止, 反应物加入 50 mL 乙酸乙酯稀释, 依次用水、饱和 NaHCO_3 溶液洗涤, 中和多余的 CH_3COOH , 有机相用 MgSO_4 干燥, 过滤, 旋干, 柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚)=2:1] 分离得到白色发泡状固体化合物. 向该化合物(1.61 g, 2.70 mmol) 中加入 0.32 g 质量分数为 10% 的 Pd/C 湿剂. 将体系抽成真空状态, 加入甲醇, 通入氢

气, 室温下反应 2.5 h. 反应物抽滤, 滤液旋干, 柱层析(乙酸乙酯)得到 1.30 g 白色发泡状固体 2-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基- β -*D*-半乳糖基)-*L*-抗坏血酸, 产率 85%. m.p. 109~110 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 11.03$ (c 1.0, CH_3OH); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 5.28~5.21 (m, 3H), 5.11~5.07 (m, 1H), 4.80~4.79 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.24 (t, $J=6.6$ Hz, 1H), 4.04 (ddd, $J=25.4, 11.2, 6.6$ Hz, 2H), 3.79 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 3.46~3.38 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 3H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 170.0, 169.9, 169.5, 169.4, 168.6, 161.7, 117.3, 99.3, 79.2, 74.8, 70.2, 70.1, 68.7, 68.5, 67.2, 61.8, 60.8, 20.6, 20.5 (2C), 20.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 529.1164, found 529.1170.

2-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基- β -*D*-半乳糖基)-*L*-抗坏血酸(0.50 g, 1 mmol) 溶于 30 mL 甲醇中, 加入 CH_3ONa (21.6 mg, 0.4 mmol), 室温反应 3 h. 反应结束加入 5 g 的 732 阳离子交换树脂室温搅拌 30 min. 抽滤, 滤液旋干得到 0.33 g 白色发泡状固体 **7**, 产率 98%. m.p. 90~91 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 36.67$ (c 1.0, H_2O); ^1H NMR (D_2O , 600 MHz) δ : 4.64 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 4.01~3.99 (m, 1H), 3.99~3.87 (m, 1H), 3.78~3.69 (m, 4H), 3.67~3.62 (m, 3H); ^{13}C NMR (D_2O , 150 MHz) δ : 177.7, 176.5, 115.1, 103.8, 78.3, 75.5, 72.5, 70.7, 69.5, 68.6, 62.4, 61.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 361.0741, found 361.0748.

3.2.7 3-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基- β -*D*-葡萄糖基)-5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸(**8**)的合成

将 5,6-*O*-异丙叉基-*L*-抗坏血酸(2.00 g, 9.26 mmol) 溶于 60 mL DMF 溶剂中, 随后加入 K_2CO_3 (1.92 g, 14 mmol) 和四乙酰基溴代葡萄糖(5.71 g, 14 mmol), 室温下搅拌反应 10 h. 停止反应, 反应体系用乙酸乙酯稀释, 水洗分液, 水相用乙酸乙酯萃取 1 次, 合并有机相, 用柠檬酸溶液洗涤两次, 再用饱和食盐水洗涤一次, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤, 滤液旋干, 柱层析分离得到 3.31 g 白色发泡状固体 **8**, 产率 65%. m.p. 68~69 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 8.70$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.56 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.30 (t, $J=9.4$ Hz, 1H), 5.20~5.11 (m, 2H), 4.61 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J=12.5, 5.1$ Hz, 1H), 4.22~4.17 (m, 2H), 4.12 (dd, $J=8.4, 6.9$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J=8.4, 6.6$ Hz, 1H), 3.91 (ddd, $J=10.1, 5.0, 2.4$ Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.33 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 170.7, 170.1, 169.8, 169.5, 169.4, 144.8, 120.8, 110.4, 98.8, 74.8, 73.2, 72.5, 72.2, 70.7, 67.9, 65.2, 61.5, 25.7, 25.6, 20.6, 20.5 (3C); HRMS (ESI) calcd for

$C_{23}H_{30}O_{15}Na [M+Na]^+$ 569.1477, found 569.1458.

3.2.8 3-O-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸(9)的合成

3-O-β-D-四乙酰葡萄糖基-5,6-O-异丙叉基-L-抗坏血酸(1.05 g, 1.92 mmol)溶于 65 mL 80% CH_3COOH 溶液中, 80 °C 下反应 2.5 h. 反应停止, 加入 50 mL 乙酸乙酯稀释, 水洗分液, 水相用乙酸乙酯萃取 1 次, 合并有机相, 依次用水和饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤至中性, 有机相用 $MgSO_4$ 干燥, 过滤, 旋干, 柱层析分离得到 0.79 g 白色发泡状产物 3-O-β-D-四乙酰葡萄糖基-L-抗坏血酸, 产率 80%.

将 3-O-β-D-四乙酰葡萄糖基-L-抗坏血酸(0.60 g, 1.16 mmol)溶于 15 mL 甲醇中, 随后加入甲醇钠(6.28 mg, 0.46 mmol)室温下搅拌反应 3 h. 停止反应, 反应体系中加入阳离子交换树脂, 搅拌约 30 min. 过滤, 滤液旋干, 得到 0.38 g 白色发泡状固体 9, 产率 98%. m.p. 71~72 °C; $[\alpha]_D^{20} -2.67$ (c 1.0, H_2O); 1H NMR (D_2O , 600 MHz) δ : 5.13 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J=3.1$ Hz, 1H), 4.08~4.05 (m, 1H), 3.86 (dd, $J=12.5, 2.0$ Hz, 1H), 3.74~3.67 (m, 3H), 3.54~3.48 (m, 2H), 3.45~3.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (D_2O , 150 MHz) δ : 177.2, 171.1, 142.5, 133.1, 101.5, 76.3, 76.0, 75.4, 73.1, 69.2, 69.0, 62.4, 60.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{12}H_{18}O_{11}Na [M+Na]^+$ 361.0748, found 361.0741.

3.3 生物活性测试

3.3.1 α-葡萄糖苷酶活性测试

采用 96 孔板法^[12], 每孔取 50 μL 的待测溶液(AA-2βG、AA-2βGal 和阿卡波糖浓度为 0.75, 1.5, 3, 7.5, 15, 30 mmol/L; AA-3βG 浓度为 30, 44, 59, 74, 118, 148 mmol/L), 加入 50 μL 磷酸二氢钠缓冲溶液(PBS, pH 6.5)及 10 μL 的酿酒酵母源 α-葡萄糖苷酶液(0.45 U/mL), 37 °C 恒温预热 15 min, 加入 50 μL 的 pNPG 溶液(0.83 mmol/L), 在 37 °C 恒温条件下继续反应 15 min. 加入 100 μL 1 mol/L 的碳酸钠溶液终止反应. 然后用酶标仪测定 405 nm 下吸光度 D 值. 实验以 PBS 代替待测样品为空白对照组, 阿卡波糖作为阳性对照组. 阴性对照组: PBS 代替对硝基苯基 α-D-葡萄糖苷(pNPG)对照组, 在 405 nm 处无明显吸收.

样品对 α-葡萄糖苷酶抑制率的计算公式为: 抑制率(%) = $(D_{\text{空白}} - D_{\text{样品}}) / D_{\text{空白}} \times 100\%$, $D_{\text{样品}}$ 表示样品的吸光度值(排除样品自身的干扰), $D_{\text{空白}}$ 表示空白的吸光度值, 每组实验重复三组平行, 抑制率取平均值. 以浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作图得到各样品的 IC_{50} 值.

3.3.2 α-葡萄糖苷酶抑制类型测定

参考文献方法^[13], 固定酿酒酵母源 α-葡萄糖苷酶的浓度为 0.45 U/mg, 配置 AA-2βG 浓度分别为 0.75、3、

7.5 mmol/L; AA-2βGal 浓度分别为 1.5、3、7.5 mmol/L; AA-3βG 浓度分别为 74、118、148 mmol/L, 分别在这些浓度下, 改变底物 pNPG 浓度分别为 0.3、0.43、0.6、1.2 mmol/L. 反应每隔 1 min 记录吸光度值随时间推移而增长的曲线. 计算反应的初速度及其倒数与底物的 pNPG 浓度倒数进行作图, 得到 Lineweaver-Burk 曲线.

3.3.3 α-淀粉酶活性测试

参考文献方法^[14], 取 0.25 mL 猪胰腺 α-淀粉酶溶液(3.54 U/mL), 加入 0.25 mL 待测样品溶液(0.015、0.077、0.15、0.77 mmol/L), 在 37 °C 的温度下预热 10 min, 然后加入 0.5 mL 的淀粉溶液在 37 °C 水浴加热 3 min. 完毕后加入 0.5 mL DNS 显色溶液, 混合均匀, 置于 80 °C 沸水浴中反应 8 min. 反应完毕将体系冷却至室温, 加入 5 mL 蒸馏水进行稀释. 显色溶液在 540 nm 波长下进行吸光度检测. 空白对照: 用 PBS (pH=6.9)代替待测样品进行上述反应. 样品对猪胰腺 α-淀粉酶抑制率的计算公式为: 抑制率(%) = $(D_{\text{空白}} - D_{\text{样品}}) / D_{\text{空白}} \times 100\%$, $D_{\text{样品}}$ 表示样品的吸光度值(样品无背景吸收), $D_{\text{空白}}$ 表示空白的吸光度值, 每组实验测三个平行, 抑制率取平均值.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 3~9 的核磁共振氢谱和碳谱谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- (a) Zhu, J.; Liu, W.; Yu, J.; Zou, S.; Wang, J.; Yao, W.; Gao, X. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 8.
- (b) Zhou, Z.; Yan, J.; Tang, X.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Chen, X.; Su, X.; Yang, D. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 582 (in Chinese). (周祖文, 晏菊芳, 唐雪梅, 张蔚瑜, 张映霞, 陈欣, 苏小燕, 杨大成, 有机化学, **2010**, *30*, 582.)
- (a) Ruan, C.-T.; Lam, S.-H.; Lee, S.-S.; Su, M.-J. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 667.
- (a) Aoki, K.; Muraoka, T.; Ito, Y.; Togashi, Y.; Terauchi, Y. *Intern. Med.* **2010**, *49*, 1085.
- (b) Derosa, G.; Maffioli, P. *Clin. Ther.* **2012**, *34*, 1221.
- (c) Hollander, P. *Drugs* **2012**, *44*, 47.
- (a) Escandon-Rivera, S.; Gonzalez-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 968.
- (b) Huang, Y.; Fu, W.; Li, Y.; Liu, Yu.; Li, Z.; Liu, Y.; Liu, S.; Sun, J.; Li, N.; Wang, B.; Gao, X.; Zhang, D. *J. Evidence-Based Complementary Altern.* **2014**, *2014*, 9.
- (c) Kim, Y.-M.; Wang, M.-H.; Rhee, H.-I. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 715.
- (a) Alarcon-Aguilar, F. J.; Roman-Ramos, R.; Perez-Gutierrez, S.; Aguilar-Contreras, A.; Contreras-Weber, C. C.; Flores-Saenz, J. L. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 101.
- (a) Cheng, J.; Zhou, Z.-W.; Sheng, H.-P.; He, L.-J.; Fan, X.-W.; He, Z.-X.; Sun, T.; Zhang, X.; Zhao, R. J.; Gu, L.; Cao, C.; Zhou, S.-F. *Drug Des., Dev. Ther.* **2015**, *9*, 33.
- (b) Cai, H.; Liu, F.; Zuo, P.; Huang, G.; Song, Z.; Wang, T.; Lu, H.; Guo, F.; Han, C.; Sun, G. *Med. Chem.* **2015**, *11*, 383.
- (a) Toyoda-Ono, Y.; Maeda, M.; Nakao, M.; Yoshimura, M.; Sugiyama-Tomimori, N.; Fukami, H. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2092.
- (a) Takebayashi, J.; Yagi, Y.; Ishii, R.; Abe, S.; Yamada, K.; Tai, A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 1558.

- (b) Zhang, Z.; Liu, X.; Zhang, X.; Liu, J.; Hao, Y.; Yang, X.; Wang, Y. *Arch. Pharm. Res.* **2011**, *34*, 801.
- (c) Zhang, Z.; Zhang, L.; Hao, Y. *J. Practic. Med.* **2011**, *27*, 11 (in Chinese).
- (张自萍, 张立平, 郝艳芳, 实用医学杂志, **2011**, *27*, 11.)
- (d) Li, H.; Zhang, Z.; Liao, G. *Chin. J. New Drug* **2007**, *16*, 212 (in Chinese).
- (李弘武, 张自萍, 廖国玲, 中国新药杂志, **2007**, *16*, 212.)
- (e) Xie, R.; Zhang, Z.; Qiu, J. *Bull. Sci. Technol.* **2010**, *26*, 362 (in Chinese).
- (谢若男, 张正波, 裘娟萍, 科技通报, **2010**, *26*, 362.)
- [8] Zhang, Z.; Liu, X.; Wu, T.; Liu, J.; Zhang, X.; Yang, X.; Goodheart, M. J.; Engelhardt, J. F.; Wang, Y. *Cell Biol. Toxicol.* **2011**, *27*, 107.
- [9] (a) Olabisi, A. O.; Wimalasena, K. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7026.
- (b) Zheng, H. *Pharmaceutical Chemistry*, People's Medical Publishing House, Beijing, **2007**, p. 426 (in Chinese).
- (郑虎, 药物化学, 人民卫生出版社, 北京, **2007**, p. 426.)
- [10] Cho, B.-H.; Kim, J.-H.; Jeon, H.-B.; Kim, K.-W. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4341.
- [11] Kim, G.-N.; Kwon, Y.-I.; Jang, H.-D. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 712.
- [12] (a) Balan, K.; Perumal, P.; Sundar abaalaji, N.; Palvannan, T. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1081*, 62.
- (b) Sheng, Z.; Dai, H.; Pan, S.; Wang, H.; Hu, Y.; Ma, W. *Molecules* **2014**, *19*, 10563.
- [13] Brindis, F.; Rodríguez, R.; Bye, R.; Gonzalez-Andrade, M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 314.
- [14] Thongprajukaew, K.; Choodum, A.; Sa-E, B.; Hayee, U. *Food Chem.* **2014**, *163*, 87.

(Li, L.; Fa, Y.)