

新型奥克梯隆型皂苷元荧光探针的设计、合成与活性评价

杨刚强* 杨延婷 杨青 李阳
姜永涛 傅风华 王洪波*

(^a 烟台大学 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心 分子药理和药物评价教育部重点实验室
烟台 264005)

摘要 24R-奥克梯隆型皂苷元(Pyxinol), 化学名称(20S,24R)-环氧达玛-3 β ,12 β ,25-三醇, 是 20(S)-原人参二醇的主要代谢产物, 具有抗心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)的活性. 为了构建有活性的 Pyxinol 荧光探针, 设计应用不同物理特性的连接臂连接 Pyxinol 与荧光基团异硫氰酸荧光素(FITC, 常用荧光基团), 以降低荧光大基团对 Pyxinol 的空间位阻干扰. 合成的荧光探针用 H9C2 心肌细胞进行了体外抗 MIRI 活性评价. 结果显示, 具有亲水柔性乙氧基链的荧光探针保留了 Pyxinol 的抗 MIRI 活性. 该活性小分子荧光探针的首次合成, 为 Pyxinol 等人参皂苷的生物活性机制研究提供了重要的分子工具.

关键词 人参皂苷; 荧光探针; 化学合成; 心肌缺血再灌注损伤

Novel Fluorescent Pyxinol-Based Probes: Design, Synthesis and Biological Evaluation

Yang, Gangqiang* Yang, Yanting Yang, Qing Li, Yang
Jiang, Yongtao Fu, Fenghua Wang, Hongbo*

(Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005)

Abstract Pyxinol ((20S,24R)-epoxydammarane-3 β ,12 β ,25-diol), the 24R-ocotillol type sapogenin, shows the well protective activity against myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) and is the main metabolite of 20(S)-protopanaxadiol. To build up the pyxinol fluorescent probes retaining the original biological activity, the linkers with different physical properties were designed to connect the fluorescein isothiocyanate (FITC, the common fluorescent dyes) to pyxinol to reduce the steric interference of bulky fluorescent group and pyxinol. The synthesized fluorescent probes were evaluated the *in vitro* anti-MIRI activity using H9C2 cardiac myocytes. The results showed that the molecular fluorescent probe with hydrophilic flexible polyethylene glycol (PEG) linker retained the anti-MIRI activity of pyxinol. The first synthesis of active molecular fluorescent probe will provide the key molecular tool for studying biological activity mechanism of pyxinol and other ginsenosides.

Keywords ginsenoside; fluorescent probe; chemical synthesis; myocardial ischemia-reperfusion injury

人参皂苷及其苷元是人参的重要活性成分, 具有多种药理活性, 在调节机体免疫、诱导肿瘤细胞凋亡、对其他药物的增效减毒等方面均有较好的作用^[1]. 近年来, C-20 位不含糖基的人参皂苷及其苷元(如原人参二醇(PPD)的体内、外代谢研究表明: 20,24-环氧的奥克梯隆型代谢产物可能是其在人和动物体内发挥作用的真正

有效成分^[2].

24R-奥克梯隆型皂苷元(Pyxinol, **1**), 是 20(S)-原人参二醇在人和大鼠体内的主要代谢产物之一和可能的真正有效成分^[3], 化学名称为(20S,24R)-环氧达玛-3 β ,12 β ,25-三醇, 属于四环三萜类奥克梯隆(Ocotillol)型人参皂苷元(图 1). 体内、外药理学活性研究表明,

* Corresponding authors. E-mail: oceanygq@hotmail.com; hongbowangyt@gmail.com

Received May 27, 2017; revised July 10, 2017; published online July 18, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21502164), the Research Fund for Excellent Young and Middle-Age Scientists of Shandong Province (No. BS2015YY039), and the Startup Project of Doctor Scientific Research in Yantai University (No. YX14B17).

国家自然科学基金(No. 21502164)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(No. BS2015YY039)、烟台大学博士科研基金(No. YX14B17)资助项目.

Pyxinol 具有抗大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)的活性, 且 C-24 位差向异构对其抗大鼠 MIRI 活性存在显著的影响^[4]. 另一方面, 20(S)-原人参二醇在体内可能因代谢成 Pyxinol 而显示出抗大鼠 MIRI 活性而体外以原型形式存在而未显示出活性^[4], 这些研究表明了其作用靶点能特异识别 Pyxinol 的立体结构. 因此, 其作用靶点和分子机制值得深入研究.

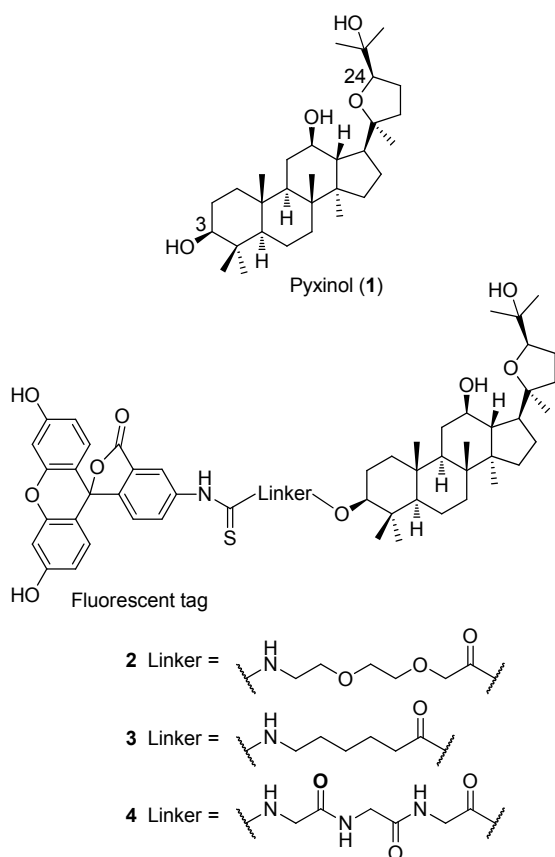


图1 24R-奥克梯隆型皂苷元(1)及其荧光探针的结构式
Figure 1 Chemical structure of pyxinol and its fluorescent probes

以荧光基团与活性配体连接获得的荧光探针研究受体在活细胞内的定位与动态分布, 是研究药物作用靶点和分子机制的重要手段^[5]. 然而, 在配体上引入的荧光基团经常会对配体形成空间位阻干扰^[6], 使合成的荧光探针无法靶向其配体的作用靶点, 常常表现在荧光探针无法保留配体的生物活性. 这种现象经常发生在基于小分子配体的荧光探针上, 尤其是仅具有中等强度生物活性($\mu\text{mol/L}$ 级)的天然小分子所合成的荧光探针^[7]. 人参皂苷的活性起效浓度多为 $\mu\text{mol/L}$ 级, 基于人参皂苷的荧光探针成功设计、合成, 鲜有报道.

异硫氰酸荧光素(FITC)因具有较好的生物相容性、稳定易保存, 且能呈现明亮的黄绿色荧光等优点, 是目

前应用最广的荧光素. 本文通过在 FITC 和 Pyxinol 间引入不同物理性质的连接臂(Linker), 降低 FITC 对 Pyxinol 的空间位阻干扰, 设计合成基于 Pyxinol 的荧光探针, 并对其进行了保护大鼠 H9C2 心肌细胞抗 MIRI 活性的测定.

1 结果与讨论

1.1 Pyxinol 荧光探针的设计

文献显示 Pyxinol 的 C-3 位羟基上引入葡萄糖基对其抗大鼠 MIRI 活性无影响^[8]. 因此, 我们设计了在 C-3 位羟基上引入 FITC, 二者间用亲水柔性乙氧基链、疏水柔性烷基链和亲水刚性甘氨酸链三类 Linker 连接(图 1), 其长度选用常规 6~8 个原子链^[6b].

1.2 Pyxinol 荧光探针的合成

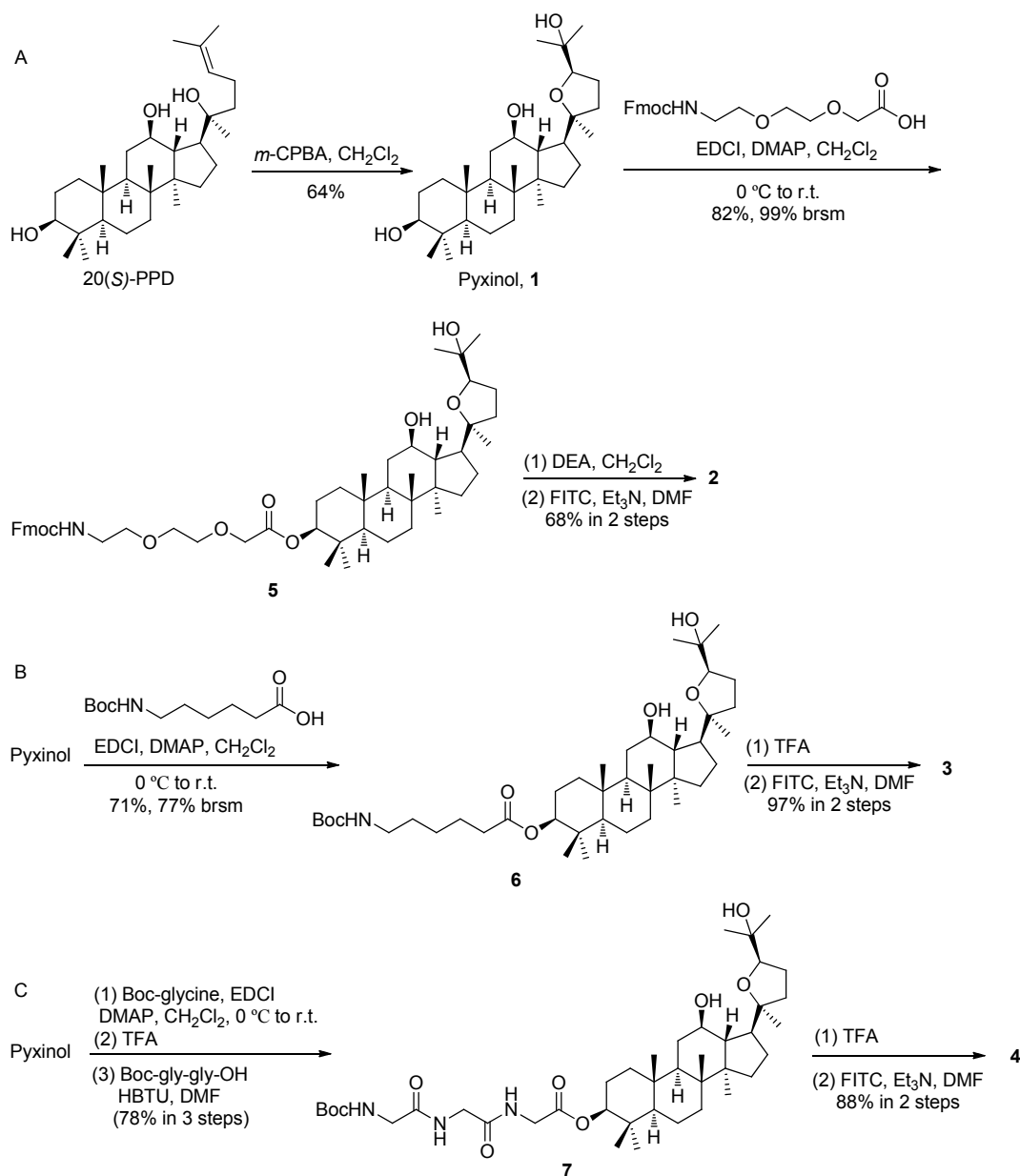
Pyxinol 的 C-3 位和 C-12 位仲羟基均为活泼基团, 虽然 C-12 位仲羟基与附近呋喃环上的氧原子存在分子内氢键而拥有更强的亲核能力^[9], 且邻位空间位阻较大, 然而因分子内氢键的存在, C-12 位仲羟基受呋喃环的空间位阻影响较大. 在合适的反应条件下, C-3 位仲羟基可以有更好的反应选择性^[10]. 因此, 目标荧光探针的合成路线选择免保护策略, 先合成 Pyxinol, 再在 C-12 位仲羟基免保护下直接在 C-3 位酯化引入 Linker, 最后引入 FITC 的策略.

首先, 以商品易得的 20(S)-原人参二醇为起始原料, 根据文献^[10]改良条件氧化环化制备 Pyxinol (Scheme 1, 线路 A). 荧光探针分子 2 和 3 可简单、高效地通过在冰浴缓慢升至室温条件下, 直接在 Pyxinol C-3 位酯化分别引入乙氧基链和烷基链后, 氨基脱保护, 再直接与 FITC 缩合获得(Scheme 1, 线路 A、B). 荧光探针分子 4 通过 Pyxinol C-3 位酯化先引入一个甘氨酸后, 再通过酰胺化引入 Boc-甘氨酸酐, 最后氨基脱保护, 并与 FITC 缩合获得, 5 步反应, 总产率为 69% (Scheme 1, 线路 C).

合成所得中间产物及最终产物经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和高分辨质谱确证. 其中, 三种荧光探针合成过程中, 酯化前后苷元 C-3 位上氢的化学位移均向低场移动, 由 δ_{H} 3.2 移至 4.4~4.6, 而 C-12 位上氢的化学位移均无变化, 可以判断所合成的中间产物 5~7 及最终荧光探针分子 2~4 的酯键均连接在 C-3 位上.

1.3 生物活性测试

由图 2 可知, 与 IRI 对照组比较, 在 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 荧光探针 2 和 3 均有类似 Pyxinol 保护 H9C2 心肌细胞抗 IRI 的活性, 荧光探针 2 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 仍表现出保护 H9C2 心肌细胞抗 IRI 的活性. 而荧光探针 4 在上述 2



图式 1 荧光探针 2、3 和 4 的合成

Scheme 1 Synthesis of fluorescent probes 2, 3 and 4

个浓度下, 均未显示出保护 H9C2 心肌细胞抗 IRI 活性。这些结果说明了荧光探针 **2** 中的亲水柔性乙氧基链能较好地避免大基团 FITC 对 Pyxinol 的空间位阻干扰。

2 结论

根据设计的合成线路, 简单高效地合成了 3 个含不同物理性质 Linker 的 Pyxinol 小分子荧光探针, 保护 H9C2 心肌细胞抗 IRI 活性研究表明, 含亲水柔性乙氧基链的荧光探针 **2** 保留了 Pyxinol 的生物活性。本文首次获得了一个保留 Pyxinol 抗 MIRI 活性的小分子荧光探针, 为 Pyxinol 的生物活性作用机制研究和进一步的靶点探索提供了重要的物质基础, 也为同类探针分子的

设计提供了重要参考, 其后续研究正在开展中。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

NMR 用 Bruker VANCE-400 核磁共振仪测定, 以 TMS 作为内标; 高分辨质谱(HRMS)在 Thermo Scientific Q Exactive 质谱仪上测定; 旋光采用 SGW-3 自动旋光仪测定; 薄层色谱(TLC)采用 HSGF254(烟台化学工业研究所); 柱层析使用硅胶为 200~300 目(烟台化学工业研究所); 酶标仪为 Molecular Devices 的 SpectraMax M3 型; H9C2 细胞培养使用 GIBCO 的 DMEM 高糖培养

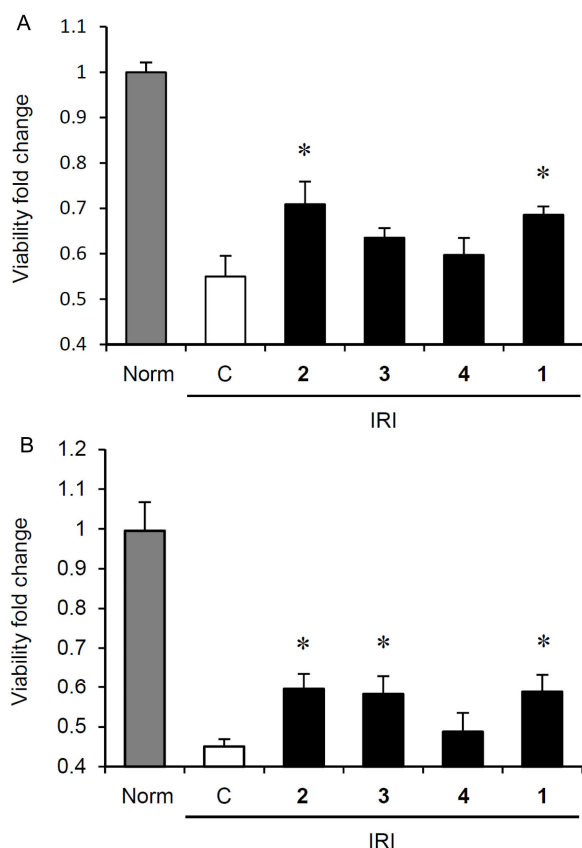


图2 荧光探针2, 3和4对H9C2心肌细胞模拟缺血再灌注损伤(IRI)的保护活性

Figure 2 Protective activity of fluorescent probes 2, 3 and 4 on simulated ischemia-reperfusion injury (IRI) of H9C2 cardiac myocytes

Effect of (A) 1 $\mu\text{mol/L}$ or (B) 5 $\mu\text{mol/L}$ fluorescent probes on cell viability in a MTT test. Error bars represent the SE ($n=3$ to 5), statistical significances were determined using the Student t-test. * $p<0.05$ compared with IRI control group (C).

基和胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS). 所用试剂和溶剂为市售化学纯或分析纯; 要求无水的溶剂均用分子筛干燥处理.

3.2 化合物的合成

3.2.1 3β -O-[2-[2-(苄甲氧羰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙酰-(20S,24R)-环氧化玛-12 β ,25-二醇(5)的合成

Pyxinol (40 mg, 0.084 mmol)、2-[2-(苄甲氧羰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙酸(39 mg, 0.101 mmol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 48 mg, 0.25 mmol)溶于无水 CH_2Cl_2 (1.0 mL)中, 在冰浴里, 氩气保护下加入4-二甲氨基吡啶(DMAP, 2 mg, 0.016 mmol), 缓慢升至室温搅拌2 d. 用水猝灭反应, 用 CHCl_3 萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩, 经柱层析得到无色粘液5 (58 mg, 0.069 mmol, 82%, 99% brsm), 回收原料 Pyxinol (7 mg, 0.015 mmol, 17%). 化合物5: $[\alpha]_D^{20} +13.9$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.76

(d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 5.49 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J=10.9$, 5.3 Hz, 1H), 4.37 (dd, $J=7.1$, 2.1 Hz, 2H), 4.22 (t, $J=7.1$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J=16.7$ Hz, 1H), 4.10 (d, $J=16.7$ Hz, 1H), 3.84 (dd, $J=8.7$, 6.6 Hz, 1H), 3.74~3.66 (m, 4H), 3.59 (t, $J=4.9$ Hz, 2H), 3.48 (td, $J=10.5$, 4.4 Hz, 1H), 3.42 (q, $J=5.0$ Hz, 2H), 2.18 (td, $J=10.9$, 3.5 Hz, 1H), 2.08~1.85 (m, 5H), 1.67~1.63 (m, 4H), 1.58~1.37 (m, 5H), 1.33~1.25 (m, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.12~0.92 (m, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.85 (s, 6H), 0.83 (s, 6H), 0.88~0.77 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 156.5, 143.9 (2C), 141.2 (2C), 127.6 (2C), 127.0 (2C), 125.1 (2C), 119.9 (2C), 86.4, 85.4, 81.5, 70.9, 70.8, 70.2, 70.1, 70.0, 68.6, 66.6, 55.9, 51.9, 50.3, 49.3, 47.9, 47.2, 40.8, 39.7, 38.5, 37.9, 37.0, 34.7, 32.5, 31.3, 31.1, 28.5, 27.9, 27.8, 27.5, 26.1, 24.9, 23.7, 18.1, 18.0, 16.4, 16.3, 15.3. HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{73}\text{N}_1\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 866.5183, found 866.5163.

3.2.2 3β -O-[2-[2-(N-荧光素-5-异硫氰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙酰-(20S,24R)-环氧化玛-12 β ,25-二醇(2)的合成

化合物5 (35 mg, 0.041 mmol)溶于 CH_2Cl_2 (0.5 mL), 加入二乙胺(DEA, 0.5 mL), 室温搅拌8 h后浓缩. 然后浓缩物溶于无水 N,N -二甲基甲酰胺(DMF, 0.6 mL), 在氩气保护下依次加入三乙胺(TEA, 12 μL), FITC (36 mg, 0.092 mmol). 室温搅拌1 d, 浓缩, 经柱层析得到黄色固体2 (28 mg, 0.028 mmol, 68% in 2 steps). m.p. 196~200 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +21.2$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.88 (s, 2H), 7.44 (s, 1H), 6.67 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.54 (dd, $J=8.7$, 2.2 Hz, 2H), 4.50 (dd, $J=11.0$, 5.2 Hz, 1H), 4.10~4.05 (m, 2H), 3.88 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 3.75~3.67 (m, 2H), 3.65~3.55 (m, 6H), 3.50 (td, $J=12.4$, 10.4, 4.1 Hz, 1H), 2.22~2.16 (m, 1H), 2.04~1.76 (m, 5H), 1.72~1.45 (m, 9H), 1.41~1.15 (m, 4H), 1.26 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.10~0.85 (m, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 182.3, 172.3 (2C), 171.2, 161.4, 154.2 (2C), 147.8, 133.2, 130.2 (2C), 126.4, 124.4, 123.0, 116.9 (2C), 113.6, 113.6, 111.6 (2C), 103.6 (2C), 87.8, 86.0, 83.1, 72.3, 72.0, 72.0, 71.2, 69.9, 69.4, 57.2, 55.9, 53.2, 51.6, 50.0, 45.4, 41.0, 39.7, 39.0, 38.2, 35.7, 33.7, 32.9, 32.1, 29.6, 28.5, 27.1, 26.8, 26.6, 26.1, 24.7, 19.2, 18.8, 17.0 (2C), 15.9. HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+$

HJ⁺ 1011.5035, found 1011.5033.

3.2.3 3β-O-(*N*-叔丁氧羰酰基-6-氨基己酰)-(20*S*,24*R*)-环氧达玛-12β,25-二醇(**6**)的合成

Pyxinol (44 mg, 0.092 mmol)、*N*-Boc-6-氨基己酸(66 mg, 0.28 mmol)和 EDCI (90 mg, 0.047 mmol)溶于无水 CH₂Cl₂ (1.0 mL)中, 在冰浴里, 氩气保护下加入 DMAP (2 mg, 0.016 mmol), 缓慢升至室温搅拌 2 d. 用水猝灭反应, 用 CHCl₃ 萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 浓缩, 经柱层析得到无色粘液 **6** (45 mg, 0.065 mmol, 71%, 77% brsm), 回收原料 Pyxinol (4 mg, 0.0084 mmol, 9%). 化合物 **6**: [α]_D²⁵ +20.8 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.47 (dd, *J*=10.3, 6.0 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J*=8.8, 6.7 Hz, 1H), 3.51 (td, *J*=10.5, 4.6 Hz, 1H), 3.11 (q, *J*=6.3 Hz, 2H), 2.30 (t, *J*=7.4 Hz, 2H), 2.19 (td, *J*=10.4, 3.0 Hz, 1H), 2.09~1.83 (m, 6H), 1.72~1.46 (m, 13H), 1.44 (s, 9H), 1.38~1.25 (m, 4H), 1.28 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 1.18~0.81 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.3, 155.9, 86.4, 85.3, 80.5, 79.0, 70.9, 70.0, 56.0, 51.9, 50.3, 49.3, 47.9, 40.3, 39.7, 38.5, 37.8, 37.0, 34.7, 34.6, 33.9, 32.5, 31.3, 31.1, 28.5, 28.4(3C), 27.9, 27.8, 27.6, 26.3, 26.1, 24.9, 24.7, 23.7, 18.1(2C), 16.4, 16.3, 15.3; HRMS (ESI, positive) calcd for C₄₁H₇₁N₁O₇Na [M+Na]⁺ 712.5128, found 712.5106.

3.2.4 3β-O-[*N*-(荧光素-5-异硫氰基)-6-氨基己酰]-(20*S*,24*R*)-环氧达玛-12β,25-二醇(**3**)的合成

化合物 **6** (32 mg, 0.046 mmol)溶于三氟乙酸(TFA, 0.3 mL), 室温搅拌 1 h 后浓缩. 然后浓缩物溶于无水 DMF (0.5 mL), 在氩气保护下依次加入 TEA (50 μL), FITC (22 mg, 0.056 mmol). 室温搅拌 1 h 浓缩, 经柱层析得到黄色固体 **3** (42 mg, 0.043 mmol, 93% in 2 steps). m.p. 184~190 °C; [α]_D²⁵ +17.9 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.88 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.80 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 6.68 (d, *J*=2.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 6.55 (dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 2H), 4.41 (dd, *J*=10.7, 5.2 Hz, 1H), 3.88 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 3.51~3.44 (m, 3H), 2.28 (t, *J*=7.1 Hz, 2H), 2.220~2.14 (m, 1H), 2.04~1.33 (m, 24H), 1.25 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.14~0.93 (m, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.80 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 182.3, 175.2 (2C), 171.2, 161.3, 154.1 (2C), 147.8, 133.2, 130.2 (2C), 126.4, 124.6, 122.9, 116.9 (2C), 113.6, 113.5, 111.6 (2C), 103.6 (2C), 87.8, 86.0, 82.2, 72.3, 72.0, 57.3, 55.9, 53.2, 51.7, 50.1, 45.3, 41.0, 39.8, 39.0, 38.2, 35.8, 35.4, 33.7, 32.9, 32.2, 29.6, 29.3,

28.6, 27.4, 27.2, 26.9, 26.6, 26.1, 25.8, 24.7, 19.3, 18.7, 17.1, 17.0, 16.0. HRMS (ESI, positive) calcd for C₅₇H₇₅N₂O₁₀S [M+H]⁺ 979.5137, found 979.5130.

3.2.5 3β-O-(*N*-叔丁氧羰酰基甘胺酰甘胺酰甘胺酰)-(20*S*,24*R*)-环氧达玛-12β,25-二醇(**7**)的合成

Pyxinol (42 mg, 0.088 mmol)、*N*-Boc-甘氨酸(26 mg, 0.148 mmol)和 EDCI (51 mg, 0.266 mmol)溶于无水 CH₂Cl₂ (1.0 mL)中, 在冰浴里, 氩气保护下加入 DMAP (3 mg, 0.024 mmol), 缓慢升至室温搅拌 1 d. 用水猝灭反应, 用 CHCl₃ 萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 浓缩, 经柱层析得到无色 *N*-Boc-甘胺酰中间体(56 mg, 0.088 mmol, 100%).

N-Boc-甘胺酰中间体(52 mg, 0.082 mmol)溶于 TFA (0.3 mL), 室温搅拌 0.5 h 后浓缩. 经柱层析得到白色甘胺酰中间体(43 mg, 0.081 mmol, 98%). 白色甘胺酰中间体(24 mg, 0.045 mmol)和 *N*-Boc-甘胺酰甘氨酸(15 mg, 0.065 mmol)溶于无水 DMF (0.8 mL), 在氩气保护下加入 HBTU (29 mg, 0.076 mmol), 室温搅拌 4 h. 用饱和 NaHCO₃ 水溶液猝灭反应, 用 EtOAc 萃取, 合并的有机相经无水硫酸钠干燥, 浓缩, 经柱层析得到白色固体 **7** (27 mg, 0.036 mmol, 80%). m.p. 210~220 °C; [α]_D¹⁵ +12.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.43 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J*=8.4, 8.0 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J*=18.0, 5.4 Hz, 1H), 4.02 (d, *J*=5.4 Hz, 2H), 4.05 (dd, *J*=18.1, 5.4 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J*=9.2, 6.1 Hz, 1H), 3.84 (d, *J*=6.1 Hz, 2H), 3.51 (td, *J*=10.4, 4.5 Hz, 1H), 2.19 (td, *J*=10.9, 3.5 Hz, 1H), 2.08~0.81 (m, 21H), 1.44 (s, 9H), 1.27 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.84 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.2, 169.5, 169.0, 156.3, 86.5, 85.3, 82.4, 80.5, 70.9, 70.1, 56.0, 52.0, 50.3, 49.3, 47.9, 44.3, 42.8, 41.4, 39.7, 38.5, 37.9, 37.0, 34.7, 32.6, 31.3, 31.1, 28.5, 28.3(3C), 27.9, 27.9, 27.6, 26.1, 25.0, 23.6, 18.1(2C), 18.1, 16.3, 15.3; HRMS (ESI, positive) calcd for C₄₁H₆₉N₃O₉Na [M+Na]⁺ 770.4932, found 770.4914.

3.2.6 3β-O-(*N*-荧光素-5-异硫氰基-甘胺酰甘胺酰甘胺酰)-(20*S*,24*R*)-环氧达玛-12β,25-二醇(**4**)的合成

化合物 **7** (22 mg, 0.029 mmol)溶于 TFA (0.3 mL), 室温搅拌 1 h 后浓缩. 浓缩物溶于无水 DMF (0.6 mL), 在氩气保护下依次加入 TEA (80 μL), FITC (22 mg, 0.056 mmol). 室温搅拌 1 h 后浓缩, 经柱层析得到黄色固体 **4** (27 mg, 0.026 mmol, 88% in 2 steps). m.p. 200~210 °C; [α]_D¹⁷ +8.1 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.95 (dd, *J*=8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.90 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.67 (d, *J*=2.3 Hz, 2H), 6.65 (d, *J*=

8.9 Hz, 2H), 6.53 (dd, $J=8.7, 2.2$ Hz, 2H), 4.47 (dd, $J=11.2, 4.9$ Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.90~3.87 (m, 1H), 3.49 (td, $J=10.5, 4.6$ Hz, 1H), 2.23~2.12 (m, 1H), 2.03~0.087 (m, 21H), 1.26 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 183.5, 172.2, 172.1, 171.2, 170.9 (2C), 160.4, 154.3 (2C), 147.4, 133.2, 130.3 (2C), 129.9, 126.5, 125.0, 116.9 (2C), 113.9, 113.5, 111.7 (2C), 103.6 (2C), 87.8, 85.9, 83.3, 72.3, 71.9, 57.2, 55.9, 53.2, 51.6, 50.0, 43.3, 42.0, 41.0, 39.7, 39.0, 38.2, 35.7, 33.7, 33.1, 32.9, 32.1, 29.6, 28.5, 27.1, 26.8, 26.6, 26.0, 24.6, 19.2, 18.7, 17.0 (2C), 15.9. HRMS (ESI, positive) calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{73}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1037.4940, found 1037.4927.

3.3 生物活性测试

体外保护 H9C2 心肌细胞抗 IRI 活性测试使用噻唑蓝(MTT)法进行. 细胞被接种到 96 孔培养板中(每孔 $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个细胞). 在接种 24 h 后吸去旧的完培养基[10% FBS 的改良杜氏伊格尔培养基(DMEM)高糖培养基], 向细胞中加入缺氧支持液(含 2 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的无糖无血清 DMEM 培养基, 现配现用), 然后在培养箱中培养 1 h 后置换缺氧支持液为完全培养基或含药物的完全培养基, 将细胞置于培养箱中, 建立 H9C2 心肌细胞缺血/再灌注模型. 复氧 24 h 后用 MTT 检测心肌细胞活力, 不做任何处理的细胞作为正常组(Norm), 只置换缺氧支持液为完全培养基的细胞为 control 组.

辅助材料(Supporting Information) 中间体及最终产物的氢谱和碳谱图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] (a) Si, J. G.; Tian, C. E. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* **2016**, 27, 1190 (in Chinese).
(司建功, 田长恩, 时珍国医国药, **2016**, 27, 1190.)
(b) Yang, Z. Q.; Zhao, T. T.; Liu, H. L.; Zhang, L. D. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 19383.
(c) Li, B. H.; Zhao, J. O.; Wang, C. Z.; Searle, J.; He, T. C.; Yuan, C. S.; Du, W. *Cancer Lett.* **2011**, 301, 185.
- [2] Yang, J. *Ph.D. Dissertation*, Jilin University, Changchun, **2016** (in Chinese).
(杨洁, 博士论文, 吉林大学, 长春, **2016**.)
- [3] (a) Li, L.; Chen, X. Y.; Li, D.; Zhong, D. F. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 472.
(b) Wang, W. Y.; Wang, L.; Wu, X. M.; Xu, L. X.; Meng, Q. G.; Liu, W. H. *Chirality* **2015**, 27, 170.
- [4] (a) Bi, Y.; Tian, J. W.; Wang, L.; Zhao, F. L.; Zhang, J. F.; Wang, N.; Sun, H. J.; Meng, Q. G. *J. Med. Plant Res.* **2011**, 5, 2424.
(b) Wang, T.; Meng, Q. G.; Zhang, J. F.; Bi, Y.; Jiang, N. C. *Fitoterapia* **2010**, 81, 783.
- [5] Sakurai, K.; Hiraizumi, M.; Isogai, N.; Komatsu, R.; Shibata, T.; Ohta, Y. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 517.
- [6] (a) Kawatani, M.; Osada, H. *MedChemComm* **2014**, 5, 277.
(b) Ziegler, S.; Pries, V.; Hedberg, C.; Waldmann, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 2744.
- [7] Robles, O.; Romo, D. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 318.
- [8] (a) Jin, X.; Shen, W. Z.; Jin, L. F.; Jia, J. Y.; Li, X. F.; Wang, X. L.; Di, X.; Zhang, H. J.; Li, P. Y. *J. Jilin Univ. (Med. Ed.)* **2013**, 39, 1164 (in Chinese).
(金鑫, 沈卫章, 金立方, 贾姣源, 李小丰, 王秀丽, 邸鑫, 张红娟, 李平亚, 吉林大学学报(医学版), **2013**, 39, 1164.)
(b) Bi, Y.; Wang, T.; Meng, Q. G.; Zhang, J. F.; Wang, L.; Li, Q.; Zhao, F. L.; Sun, H. J. *Rec. Nat. Prod.* **2012**, 6, 242.
(c) Bi, Y.; Tian, J. W.; Li, C. M.; Zhang, J. F.; Wang, N.; Jiang, N. C.; Sun, H. J.; Meng, Q. G. *J. Med. Plant Res.* **2011**, 5, 6731.
(d) Zhao, C. F. *Ph.D. Dissertation*, Jilin University, Changchun, **2008** (in Chinese).
(赵春芳, 博士论文, 吉林大学, 长春, **2008**.)
(e) Liu, J. P.; Zhao, C. F.; Li, P. Y.; Li, X. J. *Jilin Univ. (Med. Ed.)* **2006**, 32, 64 (in Chinese).
(刘金平, 赵春芳, 李平亚, 李锐, 吉林大学学报(医学版), **2006**, 32, 64.)
- [9] Meng, Q. G.; Tan, W. J.; Hou, G. G.; Zhang, X. Y.; Hu, X. Y.; Yang, F.; Bai, G. J.; Zhu, W. W.; Cai, Y.; Bi, Y. *J. Mol. Struct.* **2013**, 1054~1055, 1.
- [10] Yang, G. Q.; Li, Y.; Yang, Q.; Yue, X.; Yao, L.; Jiang, Y. T. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 1530 (in Chinese).
(杨刚强, 李阳, 杨青, 岳馨, 姚雷, 姜永涛, 有机化学, **2017**, 37, 1530.)

(Cheng, F.)