新型异甜菊醇衍生物的合成、表征及生物活性研究

郭永泰^a 侯熙彦^b 郑昌吉^c 赵春晖^d 金宇婷^a
高雪琴^a 王倩^a 孙蕾^a 赵龙铉^{*,a,d} 朴花^{*,e}

(^a 辽宁师范大学化学化工学院 辽宁大连 116029)

(^b 大连民族大学生命科学学院 辽宁大连 116600)

(^c 延边大学药学院 吉林延吉 133002)

(^d 辽宁师范大学 生物技术与分子药物研发辽宁省重点实验室 辽宁大连 116029)

(^e 大连医科大学基础医学院 辽宁大连 116044)

摘要 以异甜菊醇为先导化合物, 通过连接片段分别在 C-16 和 C-19 位引入吗啉和哌嗪结构, 并对 D 环进行结构改造, 设计合成了 15 种未见文献报道的异甜菊醇衍生物, 并观察其对人皮肤鳞癌细胞(Colo-16)和人肺腺癌细胞(A549)抑制作用。生物活性结果显示, 有 4 种化合物对人皮肤鳞癌细胞(Colo-16)的抑制活性明显优于阳性对照物 5-氟尿嘧啶。同时观察其对大肠杆菌(*E. coli* 1924)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 4220)、变形链球菌(*S. mutans* 3289)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*MRSA* 3167)和耐喹诺酮金黄色葡萄球菌(*QRSA* 3505)的抑制作用, 结果显示, 有 6 种化合物对 *S. mutans* 3289 的最小抑菌浓度(MIC)为 8 μg/mL, 与阳性对照物氯霉素相当; 16β-*O*-[5-氧亚基-5-(4-甲基-1-哌嗪基)-戊酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-12b**)对 *MRSA* 3167 的最小抑菌浓度(MIC)为 8 μg/mL, 与阳性对照物氯霉素相当。

关键词 异甜菊醇; 细胞毒性; 抑菌活性

Synthesis, Characteristics and Bioactivities of Novel Isosteviol Derivatives

Guo, Yongtai^a Hou, Xiyan^b Zheng, Changji^c Zhao, Chunhui^d Jin, Yuting^a
Gao, Xueqin^a Wang, Qian^a Sun, Lei^a Zhao, Longxuan^{*,a,b} Piao, Hua^{*,e}

(^a School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

(^b College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

(^c College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

(^d Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

(^e Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044)

Abstract Fifteen novel isosteviol derivatives were designed and synthesized by introducing morpholine and piperazine moieties into C-16 and C-19 position through connecting fragments, and the D-ring structure was modified. The inhibitory effects on Colo-16 and A549 were observed, the results showed that the inhibitory activities of 4 compounds on Colo-16 were significantly better than the positive control of 5-fluorouracil. The inhibitory effects on *E. coli* 1924, *S. aureus* 4220, *S. mutans* 3289, *MRSA* 3167 and *QRSA* 3505 were also observed, the results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of 6 compounds on *S. mutans* 3289 was 8 μg/mL, which was comparable to the positive control chloramphenicol. The MIC of 16β-*O*-(5-oxo-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-valeryl)-19-beyeran acid ethyl ester (**IS-12b**) on *MRSA* 3167 was 8 μg/mL, which was comparable to the positive control chloramphenicol.

Keywords isosteviol; cytotoxic activity; antibacterial activity

* Corresponding authors. E-mail: lxzhao@lnnu.edu.cn; piaohua88@163.com

Received May 13, 2019; revised June 26, 2019; published online August 1, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21101067).

国家自然科学基金(No. 21101067)资助项目.

异甜菊醇(Isosteviol, **IS**)又称异斯特维醇(图 1), 其骨架由甜菊苷酸水解而成. 异甜菊醇是一种具有贝叶烷骨架的四环二萜类化合物, 具有广泛的生物活性如抗肿瘤^[1-4]、抑菌^[5]、降血压^[6]、降血糖^[7]及抗氧化等^[8-10].

图 1 异甜菊醇的结构
Figure 1 Structure of isosteviol

通过对甜菊苷的代谢产物甜菊醇和水解产物异甜菊醇的研究发现, 异甜菊醇比母体甜菊苷和同分异构体甜菊醇具有更广泛的生物活性. 此外, 由于其独特而稀有的四环二萜类结构特点使其成为药物合成中有用的

活性框架^[11]. 异甜菊醇分子中结构修饰较多的部分是 D 环中的酮基, 其次是 C-19 位的羧基, 成为良好的结构修饰位点^[12].

含氮片段的导入不仅能增加化合物的极性, 同时还可通过氢键与多种受体部位结合. 吗啉、哌嗪和 *N*-甲基哌嗪是常见的含氮六元杂环. 许多抗肿瘤药物和抗菌药物, 如达沙替尼、波舒替尼、泊那替尼、吉非替尼、洛美沙星和环丙沙星等, 他们的结构中都含有哌嗪或吗啉片段. 本课题组前期的研究结果表明^[13-15], 在五环三萜类化合物中引入哌嗪或吗啉片段能抑制人肺癌细胞(A549)等癌细胞在体外细胞系中的生长. 因此, 我们将哌嗪、甲基哌嗪和吗啉片段导入到异甜菊醇结构中, 同时对其 D 环进行结构改造, 以期得到活性较好且生物利用度较高的新型四环二萜类衍生物. 具体合成路线如 Schemes 1~4.

Reagents and conditions: (i) H_2SO_4 ($w=10\%$), $95\text{ }^\circ\text{C}$; (ii) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , r.t.; HOCH_2COOH , TEA, THF, r.t.; (iii) morpholine or *N*-methyl piperazine, DMAP, EDCI, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$; (iv) *N*-Boc piperazine, DMAP, EDCI, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$; (v) TFA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$

图式 1 异甜菊醇衍生物 IS-1~IS-4 的合成
Scheme 1 Synthesis of isosteviol derivatives IS-1~IS-4

Reagents and conditions: (i) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$, DMSO, KOH, r.t.; (ii) NaBH_4 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, r.t.; (iii) succinic anhydride, DMAP, CH_2Cl_2 ; (iv) morpholine or *N*-methyl piperazine, DMAP, EDCI, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$; (v) *N*-Boc piperazine, DMAP, EDCI, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$; (vi) TFA, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}\sim\text{r.t.}$

图式 2 异甜菊醇衍生物 IS-7~IS-10 的合成
Scheme 2 Synthesis of isosteviol derivatives IS-7~IS-10

Reagents and conditions: (i) glutaric anhydride, DMAP, CH₂Cl₂; (ii) morpholine or *N*-methyl piperazine, DMAP, EDCI, CH₂Cl₂, 0 °C ~ r.t.; (iii) *N*-Boc piperazine, DMAP, EDCI, CH₂Cl₂, 0 °C ~ r.t.; (iv) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C ~ r.t.

图式 3 异甜菊醇衍生物 IS-11~IS-14 的合成

Scheme 3 Synthesis of isosteviol derivatives IS-11~IS-14

Reagents and conditions: (i) TsCl, pyridine, r.t.; (ii) 2,4,6-collidine, reflux; (iii) LiI, 2,4,6-collidine, reflux.

图式 4 异甜菊醇衍生物 IS-16~IS-17 的合成

Scheme 4 Synthesis of isosteviol derivatives IS-16~IS-17

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

以异甜菊醇为先导化合物, 在其 C-16 位和 C-19 位通过乙醇酸、丁二酸和戊二酸连接片段导入吗啉和哌嗪, 并对其 D 环进行结构改造, 共设计合成了 15 种未见文献报道的异甜菊醇衍生物, 所有的新化合物结构均经

IR, ¹H NMR 和 ¹³C NMR 得到了确证. 同时对所有新化合物进行了 HRMS 测试, 测得的数值与理论值相符.

1.2 抗肿瘤细胞增殖实验

对合成的 17 种异甜菊醇衍生物进行了细胞毒活性测试(表 1). 根据表 1 可看出: 在抑制 Colo-16 细胞测试中, 化合物 **IS-1**, **IS-2a**, **IS-2b**, **IS-3**, **IS-4**, **IS-8a**, **IS-12a**, **IS-12b** 和 **IS-14** 的活性优于先导化合物异甜菊醇, 其中化合物 **IS-2a**, **IS-4** 和 **IS-8a** 的活性略优于阳性对照物 5-氟尿嘧啶, **IS-1** 的活性明显优于阳性对照物 5-氟尿嘧啶; 在抑制 A549 细胞测试中, 化合物 **IS-9**, **IS-11**, **IS-12a**, **IS-16** 和 **IS-17** 对 A549 表现出一定的抑制活性. 对具有抗肿瘤细胞增殖活性的化合物进行构效关系分析, 初步得到以下结论: (1)在 C-19 位导入极性乙醇酸片段能明显改善对 Colo-16 细胞的抑制; (2)通过在 C-19 位导入乙醇酸连接片段, 与含氮六元杂环吗啉、哌嗪结构偶联的衍生物和通过 C-19 位加入丁二酸连接片段与吗啉偶联的衍生物均改善了对 Colo-16 细胞的抑制; (3)通过 C-19 位导入乙醇酸连接片段并与 *N*-甲基哌嗪、*N*-Boc 哌嗪结构偶联的衍生物和通过 C-16 位导入戊二酸连接片段并与含氮六元杂环吗啉、*N*-甲基哌嗪结构偶联的衍生物均能改善对 A549 细胞的抑制活性; (4) D 环的 C-15 和 C-16 位之间变成双键时能改善对 A549 的抑制活性.

表 1 异甜菊醇衍生物抑制 Colo-16 和 A549 细胞的 IC₅₀ 值^a
Table 1 IC₅₀ of isosteviol derivatives on Colo-16 and A549

Compd.	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	
	Colo-16	A549
IS-1	53.03 ± 0.0343	192.77 ± 0.0338
IS-2a	103.37 ± 0.1329	218.62 ± 0.0143
IS-2b	195.97 ± 0.1057	213.62 ± 0.0335
IS-3	190.35 ± 0.1019	200.87 ± 0.0650
IS-4	110.62 ± 0.1398	191.20 ± 0.0230
IS-7	—	224.45 ± 0.0154
IS-8a	107.67 ± 0.2093	212.34 ± 0.0185
IS-8b	—	242.06 ± 0.0307
IS-9	—	155.57 ± 0.0273
IS-10	—	184.00 ± 0.0264
IS-11	209.74 ± 0.0842	167.95 ± 0.0415
IS-12a	192.25 ± 0.0681	145.04 ± 0.0528
IS-12b	168.55 ± 0.1258	183.61 ± 0.0201
IS-13	—	183.74 ± 0.0294
IS-14	162.18 ± 0.1515	281.52 ± 0.0755
IS-16	—	165.73 ± 0.0374
IS-17	—	155.11 ± 0.0800
甜菊苷(SS)	188.41 ± 0.127	269.09 ± 0.0659
异甜菊醇(IS)	207.91 ± 0.1478	177.07 ± 0.0199
齐墩果酸(OA)	—	170.88 ± 0.0303
阿霉素(Adriamycin)	30.82 ± 0.3025	47.63 ± 0.0811
5-氟尿嘧啶(5-FU)	117.41 ± 0.2246	58.65 ± 0.1042

^a “—” indicates that the data is unknown. The data is calculated according to the improved karbers method.

1.3 抑菌活性实验

对所合成的异甜菊醇衍生物进行了大肠杆菌(*E. coli* 1924)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 4220)、变形链球菌(*S. mutans* 3289)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA 3167)和耐喹诺酮金黄色葡萄球菌(QRSA 3505) 5 种菌株的抑菌活性测试. 在对 *E. coli* 1924 的抑菌活性测试中, 化合物 **IS-4**, **IS-7**, **IS-8b** 和 **IS-11** 均显示出一定的抑菌活性; 在对 *S. aureus* 4220 的抑菌活性测试中, 化合物 **IS-4**, **IS-7**, **IS-8b**, **IS-11** 和 **IS-12b** 显示出一定的抑菌活性; 在对 *S. mutans* 3289 的活性测试中, 衍生物 **IS-9**, **IS-10**, **IS-12a**, **IS-12b**, **IS-14** 和 **IS-17** 与阳性对照物氯霉素活性相当, 对 *S. mutans* 3289 的 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$; 在对 MRSA 3167 的活性测试中, 衍生物 **IS-7**, **IS-10**, **IS-11**, **IS-12b** 和 **IS-17** 显示出一定活性, 其中 **IS-12b** 最小抑菌浓度(MIC)为 8 $\mu\text{g/mL}$, 与阳性对照物氯霉素相当; 在对 QRSA 3505 的活性测试中, 衍生物 **IS-10**, **IS-11**, **IS-12b**, **IS-14** 和 **IS-17** 显示出的活性弱于阳性对照物氯霉素. 对具有抑菌活性的化合物进行构效关系分析, 初步得到以下结论: (1)该类化合物对 *S. mutans* 3289 和 MRSA 3167 显示出较好的选择抑制性; (2)通过丁二酸片段与 *N*-Boc 哌嗪哌嗪结构偶联, 或通过戊二酸片段与吗啉、*N*-甲基哌嗪或哌嗪结构偶联, 以及 D 环 C-15、C-16 位变成双键能明显改善先导化合物对 *S. mutans* 3289 的抑制活性;

表 2 抗菌实验数据^a

Table 2 Anti-bacterial experimental results

Compd.	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	<i>E. coli</i> 1924	<i>S. aureus</i> 4220	<i>S. mutans</i> 3289	MRSA 3167	QRSA 3505
IS-1	—	—	—	—	—
IS-2a	>128	>128	64	—	—
IS-2b	>128	>128	128	—	—
IS-3	>128	>128	16	—	—
IS-4	128	64	128	128	>128
IS-7	64	64	16	64	128
IS-8a	—	—	—	—	—
IS-8b	16	16	>128	128	>128
IS-9	>128	>128	8	—	—
IS-10	>128	>128	8	16	16
IS-11	32	32	32	64	64
IS-12a	>128	>128	8	—	—
IS-12b	>128	32	8	8	32
IS-13	—	—	—	—	—
IS-14	>128	>128	8	>128	16
IS-16	—	—	—	—	—
IS-17	>128	>128	8	32	16
Stevioside (SS)	—	—	—	—	—
Isosteviol (IS)	—	—	—	—	—
Chloramphenicol	4	4	8	8	8

^a “—” Indicates that the compound has no inhibitory effect on the tested bacteria..

(3)通过丁二酸片段与哌嗪结构偶联, 或通过戊二酸片段与 *N*-甲基哌嗪结构偶联, 以及 D 环 C-15、C-16 位变成双键能改善先导化合物对 MRSA 3167 的抑制活性; (4)通过丁二酸片段与哌嗪结构偶联, 或通过戊二酸片段与 *N*-甲基哌嗪、哌嗪结构偶联, 以及 D 环 C-15、C-16 位变成双键能改善先导化合物对 QRSA 3505 的抑制活性.

2 结论

以异甜菊醇为先导化合物, 通过连接片段分别在 C-16 和 C-19 位引入吗啉和哌嗪结构, 并对 D 环进行结构改造, 设计合成了 15 种未见文献报道的异甜菊醇衍生物, 并观察其对皮肤鳞癌细胞(Colo-16)和人肺腺癌细胞(A549)抑制作用. 通过活性对比发现, 导入乙醇酸连接片段能明显改善对 Colo-16 细胞的抑制; 通过在 C-19 位导入乙醇酸连接片段与含氮六元杂环吗啉、哌嗪结构偶联的衍生物和通过 C-19 位加入丁二酸连接片段与吗啉偶联的衍生物均改善了对 Colo-16 细胞的抑制; 通过 C-19 位导入乙醇酸连接片段并与 *N*-甲基哌嗪、*N*-Boc 哌嗪结构偶联的衍生物和通过 C-16 位导入戊二酸连接片段与含氮六元杂环吗啉、*N*-甲基哌嗪结构偶联的衍生物均能改善对 A549 细胞的抑制活性; D 环的 C-15 和 C-16 位之间变成双键时能改善对 A549 的抑制活性. 通过丁二酸片段与 *N*-Boc 哌嗪哌嗪结构偶联, 或通过戊二酸片段与吗啉、*N*-甲基哌嗪或哌嗪结构偶联, 以及 D 环 C-15、C-16 位变成双键能明显改善先导化合物对 *S. mutans* 3289 的抑制活性; 通过丁二酸片段与哌嗪结构偶联, 或通过戊二酸片段与 *N*-甲基哌嗪结构偶联, 以及 D 环 C-15、C-16 位变成双键能改善先导化合物的结构修饰改造提供了方向.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-5 型纤维熔点测定仪(温控型)(北京泰克仪器有限公司); WGH-30 型双光束红外分光光度计(上海勇规分析仪器有限公司), KBr 压片; VARIAN MERCURY PLUS 400 型核磁共振仪(美国 Varian 技术有限公司), AVANCE-500 MHz 核磁共振仪(瑞士 BRUKER 公司), CDCl_3 为溶剂; GC-Tof MS 型高分辨率质谱. 所用药品和试剂均为分析纯或化学纯.

3.2 实验方法

16-氧亚基-贝叶-19-酸(**IS**)的合成参考文献[16], 得

到白色固体产物. 16-氧亚基-贝叶-19-酸乙酯的具体合成方法见参考文献[17], 得到了白色的固体产物 **IS-5**. m.p. 126~127 °C. 16 β -羟基-贝叶-19-酸乙酯的具体合成方法见参考文献[17], 得到了白色的固体产物 **IS-6**. m.p. 152~153 °C; 16 β -O-[4-氧亚基-4-甲苯磺酰基]-贝叶-19-酸乙酯的合成参考文献[18], 得到无色液体产物 **IS-15**.

3.2.1 2-(16-氧亚基-贝叶-19-氧亚基-19-氧)乙酸(**IS-1**)的合成

在圆底烧瓶中加入二氯甲烷(15 mL), 将 **IS** (1.0g, 14.00 mmol)溶于其中, 在搅拌下加入草酰氯(1.1 mL, 12.56 mmol), 常温下搅拌 24 h, 薄层层析(TLC)检测反应, 结束后, 减压蒸馏除去溶剂, 再加入乙醇酸(477.6 mg, 6.28 mmol)和三乙胺(4.4 mL, 31.40 mmol), 在搅拌下加入四氢呋喃, 室温下反应 7 h, 反应完成后, 减压蒸馏除去溶剂, 用乙酸乙酯和水萃取, 并用 1 mol/L HCl 洗涤至微酸性, 用饱和氯化钠洗涤, 过滤, 柱层析得 490.2 mg 白色固体产物 **IS-1**, 产率 42%. m.p. 188.5~188.9 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -59.1 (*c* 0.04, CH₂Cl₂); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 6.92 (s, 1H, COOH), 4.67 (d, *J*=16.3 Hz, 1H, OCHCO), 4.58 (d, *J*=16.3 Hz, 1H, OCHCO), 2.64 (dd, *J*=18.7, 3.0 Hz, 1H, H_a-15), 2.24 (d, *J*=13.4 Hz, 1H, H _{β} -15), 1.90 (d, *J*=13.6 Hz, 1H), 1.80 (d, *J*=19.9 Hz, 2H), 1.76~1.65 (m, 4H), 1.60 (d, *J*=11.8 Hz, 1H), 1.55 (d, *J*=11.9 Hz, 1H), 1.51~1.34 (m, 4H), 1.26 (s, 3H), 1.24~1.15 (m, 3H), 1.09~1.03 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.94~0.88 (m, 1H), 0.73 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 223.3, 176.9, 173.0, 60.2, 57.3, 54.9, 54.5, 49.0, 48.7, 44.2, 41.7, 40.0, 39.7, 38.3, 38.1, 37.5, 29.1, 21.8, 20.5, 20.1, 19.1, 13.7; IR (KBr) ν : 3447, 2941, 2845, 1740, 1462, 1148 cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₂H₃₂O₅ 376.2250, found 376.2248.

3.2.2 (16-氧亚基-贝叶-19)-酸-[2-(4-吗啉基)-2-氧亚基]乙酯(**IS-2a**)的合成

在圆底烧瓶中加入二氯甲烷(5 mL), 依次将 **IS-1** (100.0 mg, 0.26 mmol)、吗啉(0.03 mL, 0.31 mmol)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP) (38.1 mg, 0.31 mmol)溶于其中, 搅拌下将反应液冷却到 0 °C. 再将二亚胺盐酸盐(EDCI) (249.2 mg, 1.30 mmol)溶于二氯甲烷中, 逐滴将其加入反应液中, 于 0 °C下搅拌 5 min, 然后室温下搅拌 3 h. 薄层层析检测反应结束后, 减压蒸馏除去溶剂, 用二氯甲烷和水萃取, 并用饱和氯化钠溶液洗涤至中性, 用无水硫酸镁对有机相进行干燥, 过滤, 柱层析得 104.2 mg 白色固体 **IS-2a**, 产率 88%. m.p. 55.1~55.7 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -53.5 (*c* 0.40, CH₂Cl₂); ¹H NMR

(CDCl₃, 500 MHz) δ : 4.80 (d, *J*=14.3 Hz, 1H, OCHCO), 4.63 (d, *J*=14.3 Hz, 1H, OCHCO), 3.71~3.42 (m, 8H, morpholine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.65 (dd, *J*=18.7, 3.4 Hz, 1H, H_a-15), 2.28 (d, *J*=13.5 Hz, 1H, H _{β} -15), 1.94 (d, *J*=13.9 Hz, 1H), 1.87~1.78 (m, 3H), 1.73 (d, *J*=14.5 Hz, 1H), 1.68 (d, *J*=13.9 Hz, 1H), 1.63~1.52 (m, 4H), 1.50~1.41 (m, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.23~1.17 (m, 3H), 1.11~1.05 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.96~0.90 (m, 1H), 0.75 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 222.8, 177.1, 165.2, 60.9, 57.3, 55.0, 54.9, 54.7, 54.5, 48.9, 48.7, 46.2, 44.6, 44.3, 41.9, 41.7, 40.0, 39.7, 38.3, 38.2, 37.5, 29.3, 21.9, 20.5, 20.1, 19.2, 13.8; IR (KBr) ν : 2951, 2851, 1736, 1676, 1458, 1229 cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₆H₃₉NO₅ 445.2828, found 445.2817.

3.2.3 (16-氧亚基-贝叶-19)-酸-[2-(4-甲基-1-哌嗪基)-2-氧亚基]乙酯(**IS-2b**)的合成

在圆底烧瓶中加入二氯甲烷(5 mL), 依次将 **IS-1** (80.0 mg, 0.21 mmol)、*N*-甲基哌嗪(0.05 mL, 0.42 mmol)和 DMAP (51.3 mg, 0.42 mmol)溶于其中, 搅拌下将反应液冷却到 0 °C. 再将 EDCI (201.3 mg, 1.05 mmol)溶于二氯甲烷中, 逐滴将其加入反应液中, 于 0 °C下搅拌 5 min, 然后室温下搅拌 3 h. 薄层层析检测反应结束后, 减压蒸馏除去溶剂, 用二氯甲烷和水进行萃取, 用饱和氯化钠溶液洗涤至中性, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 柱层析得到无色液体产物 **IS-2b**, 产率 92.0%. $[\alpha]_D^{21}$ -36.08 (*c* 0.19, CH₂Cl₂); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 4.79 (d, *J*=14.2 Hz, 1H, OCHCO), 4.61 (d, *J*=14.2 Hz, 1H, OCHCO), 3.62 (s, 2H, piperazine H-2 $\times$ 2), 3.41 (s, 2H, piperazine H-6 $\times$ 2), 2.63 (dd, *J*=18.7, 3.4 Hz, 1H, H_a-15), 2.40 (d, *J*=5.3 Hz, 4H, piperazine H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2), 2.30 (s, 3H, NCH₃), 2.27 (d, *J*=13.7 Hz, 1H, H _{β} -15), 1.93 (d, *J*=13.3 Hz, 1H), 1.86~1.77 (m, 3H), 1.69 (q, *J*=14.1 Hz, 3H), 1.60 (d, *J*=11.7 Hz, 1H), 1.54 (d, *J*=11.7 Hz, 1H), 1.51~1.39 (m, 4H), 1.30 (s, 3H), 1.21~1.15 (m, 3H), 1.09~1.03 (m, 1H), 0.97 (s, 3H), 0.95~0.88 (m, 1H), 0.74 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : 222.8, 177.1, 165.2, 60.9, 57.3, 55.0, 54.9, 54.7, 54.5, 48.9, 48.7, 46.2, 44.6, 44.3, 41.9, 41.7, 40.0, 39.7, 38.3, 38.2, 37.5, 29.3, 21.9, 20.5, 20.1, 19.2, 13.8; IR (KBr) ν : 2949, 2869, 1736, 1680, 1456, 1240, 1173 cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₇H₄₂N₂O₄ 458.3145, found 458.3149.

3.2.4 (16-氧亚基-贝叶-19)-酸-[2-(4-叔丁氧羰基-1-哌嗪基)-2-氧亚基]乙酯(**IS-3**)的合成

在圆底烧瓶中加入二氯甲烷(5 mL), 依次将 **IS-1** (90.0 mg, 0.24 mmol)、*N*-Boc 哌嗪(88.7 mg, 0.48 mmol)

和 DMAP (58.2 mg, 0.48 mmol) 溶于其中, 将反应液冷却到 0 °C. 再将 EDCI (277.9 mg, 1.19 mmol) 溶于无水二氯甲烷中, 逐滴将其加入反应液中, 于 0 °C 下搅拌 5 min, 然后室温下搅拌 3 h. 薄层层析检测反应结束后, 减压蒸馏除去溶剂, 用二氯甲烷和水萃取, 并用饱和氯化钠溶液洗涤至中性, 无水硫酸镁对有机相进行干燥, 过滤, 柱层析得 92.1 mg 无色液体产物 **IS-3**, 产率 71%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -39.9 (c 0.20, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.81 (d, $J=14.3$ Hz, 1H, OCHCO), 4.63 (d, $J=14.25$ Hz, 1H, OCHCO), 3.58~3.38 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.64 (d, $J=17.7$ Hz, 1H, H_α -15), 2.27 (d, $J=13.3$ Hz, 1H, H_β -15), 1.93 (d, $J=13.8$ Hz, 1H), 1.80 (q, $J=18.5$ Hz, 3H), 1.73~1.54 (m, 6H), 1.47 (s, 9H), 1.38 (q, $J=13.5$ Hz, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.18 (t, $J=10.9$ Hz, 3H), 1.10~1.04 (m, 1H), 0.98 (s, 3H), 0.95~0.89 (m, 1H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.5, 173.4, 172.6, 172.1, 81.7, 59.9, 57.1, 57.0, 55.7, 54.8, 52.1, 43.7, 42.4, 41.5, 40.7, 39.9, 38.1, 38.1, 35.5, 34.6, 33.6, 31.2, 28.9, 24.9, 21.7, 21.1, 20.2, 19.0, 18.9, 17.8, 14.1, 13.3; IR (KBr) ν : 3445, 2930, 2851, 1734, 1672, 1456, 1236, 1166 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_6$ 544.3512, found 544.3511.

3.2.5 (16-氧亚基-贝叶-19)-酸-[2-(1-哌嗪基)-2-氧亚基]乙酯(**IS-4**)的合成

将 **IS-3** (100.0 mg, 0.18 mmol) 溶于二氯甲烷中, 冷却到 0 °C 后加入三氟乙酸 (0.4 mL, 5.40 mmol), 再将温度升到室温搅拌 2 h, 反应结束后用 0.1 mol·L⁻¹ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 中和至微碱性 (pH=9, 冰水浴), 用二氯甲烷和水萃取, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤, 经柱层析得 61.5 mg 无色液体产物 **IS-4**, 产率 75%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -39.5 (c 0.04, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.81 (d, $J=17.8$ Hz, 1H, OCHCO), 4.63 (d, $J=17.8$ Hz, 1H, OCHCO), 3.62~2.91 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2 & H-6 $\times$ 2), 2.65 (dd, $J=23.3, 4.6$ Hz, 1H, H_α -15), 2.29 (d, $J=16.8$ Hz, 1H, H_β -15), 1.95 (d, $J=17.5$ Hz, 1H), 1.85~1.78 (m, 3H), 1.75~1.66 (m, 4H), 1.57 (q, $J=11.7$ Hz, 1H), 1.43 (q, $J=10.2$ Hz, 2H), 1.32 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.12~1.04 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (q, $J=11.7$ Hz, 1H), 0.76 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 176.9, 165.3, 154.5, 80.5, 60.7, 57.1, 54.7, 54.3, 48.7, 48.5, 44.1, 41.5, 41.0, 39.8, 39.5, 38.1, 38.0, 37.3, 29.0, 28.4 (2C), 21.6, 20.3, 19.9, 19.0, 13.6; IR (KBr) ν : 3451, 2928, 2851, 1734, 1670, 1458, 1153 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ 444.2988, found 444.2985.

3.2.6 4-氧亚基-4-(16 β -O-19-氧亚基-19-乙氧基-贝叶)丁酸(**IS-7**)的合成

在圆底烧瓶中加入二氯甲烷 (5 mL), 依次将 **IS-6** (100.0 mg, 0.29 mmol)、丁二酸酐 (57.4 mg, 0.57 mmol) 和 DMAP (42.1 mg, 0.35 mmol) 溶于其中, 加热回流 8 h, 薄层层析检测反应结束后, 用二氯甲烷和水萃取, 有机相用无水硫酸镁干燥, 过滤, 经柱层析得 80.1 mg 无色液体 **IS-7**, 产率 63%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -57.7 (c 0.18, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.76~4.73 (m, 1H, CHOCO), 4.15~4.00 (m, 2H, OCH_2CH_3), 2.69~2.62 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.15 (d, $J=13.2$ Hz, 1H, H_α -15), 1.88~1.69 (m, 6H), 1.60~1.46 (m, 4H), 1.44~1.32 (m, 3H), 1.25 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 1.15 (s, 3H), 1.07~0.94 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (q, $J=9.6$ Hz, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 178.2, 177.8, 172.4, 138.1, 82.4, 60.2, 57.3, 55.9, 55.0, 43.9, 42.6, 41.8, 41.7, 40.7, 40.1, 38.3, 34.8, 29.4, 29.3, 25.1, 21.9, 20.4, 19.1, 14.4, 13.4; IR (KBr) ν : 3437, 2947, 2846, 1719, 1452, 1379, 1229, 1177 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{NO}_6$ 448.2825, found 448.2855.

3.2.7 16 β -O-(4-氧亚基-4-吗啉基-丁酰基)-19-贝叶酸乙酯(**IS-8a**)的合成

按照合成 **IS-2a** 的方法由化合物 **IS-7** (98.0 mg, 0.22 mmol)、吗啉 (0.02 mL, 0.26 mmol)、DMAP (32.0 mg, 0.26 mmol) 和 EDCI (209.00 mg, 1.09 mmol) 反应, 得 87.0 mg 白色固体产物 **IS-8a**, 产率 75%. m.p. 99.1~99.7 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -45.3 (c 0.38, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.75~4.71 (m, 1H, CHOCO), 4.14~3.99 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.69~3.45 (m, 8H, morpholine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.71~2.59 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{-CH}_2\text{CO}$), 2.15 (d, $J=16.8$ Hz, 1H, H_α -15), 1.83~1.76 (m, 5H), 1.70 (d, $J=16.1$ Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.58~1.49 (m, 4H), 1.41~1.31 (m, 3H), 1.20 (t, $J=9.2$ Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.00 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (q, $J=11.6$ Hz, 1H), 0.71 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.8, 173.3, 170.1, 82.1, 67.1, 66.8, 60.1, 57.3, 56.0, 55.0, 45.9, 43.9, 42.5, 42.3, 41.8, 41.7, 40.7, 40.2, 38.3, 34.9, 29.7, 29.1, 28.1, 25.1, 21.9, 20.4, 19.1, 15.5, 14.4, 13.5; IR (KBr) ν : 2948, 2851, 1720, 1641, 1439, 1267, 1236, 1176, 1117 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_6$ 517.3403, found 517.3414.

3.2.8 16 β -O-[4-氧亚基-4-(4-甲基-1-哌嗪基)-丁酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-8b**)的合成

按照合成 **IS-2b** 的方法由化合物 **IS-7** (200.0 mg, 0.45 mmol)、*N*-甲基哌嗪 (0.06 mL, 0.54 mmol)、DMAP

(65.5 mg, 0.54 mmol)和EDCI (427.5 mg, 2.23 mmol)反应, 得 175 mg 白色固体产物 **IS-8b**, 产率 74%. m.p. 88.2~88.9 °C; $[\alpha]_D^{25} -44.3$ (c 0.40, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.74~4.70 (m, 1H, CHOCO), 4.12~4.01 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.61 (t, $J=6.1$ Hz, 2H, COCH_2), 3.49 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.69~2.34 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.30 (s, 3H, NCH_3), 2.14 (d, $J=15.8$ Hz, H_α -15), 1.84~1.75 (m, 6H), 1.59~1.48 (m, 4H), 1.40~1.33 (m, 2H), 1.31 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 1.24 (t, $J=8.9$ Hz, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.05~0.99 (m, 3H), 0.98~0.92 (m, 1H), 0.84 (s, 3H), 0.87~0.82 (m, 1H), 0.71 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.8, 173.4, 169.8, 138.1, 82.0, 60.1, 57.3, 56.0, 55.2, 55.0, 54.9, 46.3, 45.3, 43.9, 42.5, 41.8, 40.7, 40.2, 38.3 (2C), 34.9, 29.8, 29.1, 28.3, 25.1, 21.9, 20.4, 19.1, 14.4, 13.5; IR (KBr) ν : 2937, 2842, 1726, 1645, 1448, 1294, 1117 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_5$ 530.3721, found 530.3731.

3.2.9 16 β -O-[4-氧亚基-4-(4-叔丁氧羰基-1-哌嗪基)-丁酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-9**)的合成

按照合成 **IS-3** 的方法由化合物 **IS-7** (360.3 mg, 0.80 mmol)、*N*-Boc 哌嗪(179.4 mg, 0.96 mmol)、DMAP (117.7 mg, 0.96 mmol)和EDCI (769.2 mg, 4.01 mmol)反应, 得 350.1 mg 无色液体产物 **IS-9**, 产率 71%. $[\alpha]_D^{20} -36.8$ (c 0.42, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.75~4.72 (m, 1H, CHOCO), 4.14~4.01 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.58~3.40 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.69~2.61 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.15 (d, $J=13.2$ Hz, 1H, H_α -15), 1.88~1.77 (m, 5H), 1.69 (t, $J=13.1$ Hz, 2H), 1.60~1.50 (m, 4H), 1.47 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.41~1.32 (m, 3H), 1.25 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.06~0.94 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 0.88~0.83 (m, 1H), 0.72 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 176.5, 172.0, 168.9, 153.6, 80.9, 79.3, 64.8, 58.9, 56.1, 54.8, 53.8, 44.1, 42.7, 41.3, 40.6 (2C), 39.5, 39.0, 37.1 (2C), 33.7, 28.5, 27.9, 27.4 (3C), 27.1, 23.9, 20.7, 19.2, 17.9 (2C), 14.3, 13.1, 12.3; IR (KBr) ν : 2935, 2849, 1701, 1654, 1417, 1236, 1170 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_7$ 616.4088, found 616.4079.

3.2.10 16 β -O-[4-氧亚基-4-(1-哌嗪基)-丁酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-10**)的合成

按照合成 **IS-4** 的方法由化合物 **IS-9** (100.0 mg, 0.16 mmol)和三氟乙酸(0.2 mL, 2.40 mmol)反应, 得 54.3 mg 无色液体产物 **IS-10**, 产率 65%. $[\alpha]_D^{20} -38.2$ (c 0.20, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.75~4.71 (m, 1H, CHOCO), 4.13~4.02 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.72~2.93

(m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.68~2.62 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.48 (d, $J=13.1$ Hz, H_α -15), 2.15 (d, $J=13.6$ Hz, 1H, H_β -15), 1.83~1.69 (m, 6H), 1.63~1.47 (m, 5H), 1.41~1.32 (m, 3H), 1.24 (s, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.06~0.97 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 0.87 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 0.72 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 189.2, 177.5, 173.0, 169.7, 81.8, 81.7, 59.8, 57.0, 55.6, 54.7, 45.0, 44.7, 43.6, 42.2, 41.4, 40.9, 40.4, 39.8, 38.0, 34.5, 29.6, 29.4, 28.8, 27.8, 24.8, 21.6, 20.1, 18.8, 14.0, 13.1; IR (KBr) ν : 2937, 2849, 1726, 1651, 1448, 1375, 1231, 1175 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_5$ 516.3563, found 516.3560.

3.2.11 5-氧亚基-5-(16 β -O-19-氧亚基-19-乙氧基-贝叶)戊酸(**IS-11**)的合成

按照合成 **IS-7** 的方法由化合物 **IS-6** (86.8 mg, 0.25 mmol)、戊二酸酐(213.2 mg, 1.75 mmol)和DMAP(36.6 mg, 0.30 mmol)反应, 得 80.4 mg 无色液体产物 **IS-11**, 产率 70%. $[\alpha]_D^{21} -49.5$ (c 0.38, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.75~4.71 (m, 1H, CHOCO), 4.14~4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.49~3.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.44~2.37 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.15 (d, $J=13.1$ Hz, H_α -15), 2.00~1.93 (m, 2H), 1.85~1.69 (m, 6H), 1.60~1.50 (m, 4H), 1.42~1.36 (m, 2H), 1.32 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 1.23 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.08~0.94 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (q, $J=9.7$ Hz, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 177.5, 176.6, 172.1, 80.8, 64.8, 59.0, 56.1, 54.7, 53.8, 42.7, 41.4, 40.5, 39.7, 39.0, 37.1, 33.6, 32.5, 32.0, 27.9, 23.9, 20.7, 19.2, 19.0, 17.9, 14.2, 13.1, 12.2; IR (KBr) ν : 3429, 2949, 2849, 1720, 1454, 1379, 1234, 1178 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6$ 462.2981, found 462.3000.

3.2.12 16 β -O-(5-氧亚基-5-吗啉基-丁酰基)-19-贝叶酸乙酯(**IS-12a**)的合成

按照合成 **IS-2a** 的方法由化合物 **IS-11** (100.0 mg, 0.22 mmol)、吗啉(0.02 mL, 0.26 mmol)、DMAP (31.6 mg, 0.26 mmol)和EDCI (207.0 mg, 1.08 mmol)反应, 得 87.0 mg 无色液体产物 **IS-12a**, 产率 76%. $[\alpha]_D^{20} -12.1$ (c 0.24, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.75~4.71 (m, 1H, CHOCO), 4.12~4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.75~3.61 (m, 8H, morpholine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 3.49~3.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.44~2.37 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.15 (d, $J=13.4$ Hz, 1H, H_α -15), 1.98~1.93 (m, 2H), 1.88~1.78 (m, 4H), 1.60~1.56 (m, 2H), 1.54~1.48 (m, 2H), 1.32 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 1.27~1.22 (m, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.08~1.01 (m, 3H), 0.96 (q, $J=9.4$

Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (q, $J=9.2$ Hz, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 177.7, 173.7, 171.1, 81.9, 67.1, 66.9, 60.1, 57.3, 55.9, 55.0, 46.1, 43.9, 42.6, 42.1, 41.7, 40.9, 40.2, 38.3, 38.3, 34.8, 33.9, 32.3, 29.1, 25.1, 21.9, 20.7, 20.4, 19.1, 18.6, 14.3, 13.5; IR (KBr) ν : 2949, 2849, 1724, 1653, 1452, 1377, 1234, 1177, 1117 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{NO}_6$ 531.3560, found 531.3566.

3.2.13 16 β -O-[5-氧亚基-5-(4-甲基-1-哌嗪基)-戊酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-12b**)的合成

按照合成 **IS-2b** 的方法由化合物 **IS-11** (200.0 mg, 0.43 mmol)、*N*-甲基哌嗪(0.06 mL, 0.52 mmol)、DMAP (63.3 mg, 0.52 mmol)和 EDCI (414.1 mg, 2.16 mmol)反应, 得 169.2 mg 无色液体产物 **IS-12b**, 产率 72%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -34.2 (c 0.44, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 4.73 (d, $J=6.2$ Hz, 1H, CHOCO), 4.12~4.02 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.75~3.48 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.44~2.37 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.31 (s, 3H, NCH_3), 2.15 (d, $J=13.4$ Hz, H_α -15), 2.00~1.92 (m, 2H), 1.84~1.69 (m, 6H), 1.55 (q, $J=15.0$ Hz, 4H), 1.34 (d, $J=14.3$ Hz, 2H), 1.27~1.23 (m, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.07~0.97 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 0.84 (t, $J=16.6$ Hz, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.7, 173.7, 170.8, 81.8, 60.1, 57.3, 55.9, 55.4, 55.0, 54.9, 46.2, 45.6, 43.9, 42.6, 41.8, 41.7, 40.9, 40.2, 38.3, 38.2, 34.8, 34.0, 33.3, 32.5, 29.1, 25.1, 21.9, 20.8, 20.4, 19.1, 14.3, 13.5; IR (KBr) ν : 2941, 2845, 2793, 1726, 1651, 1454, 1375, 1292, 1229, 1150 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_5$ 544.3876, found 544.3879.

3.2.14 16 β -O-[5-氧亚基-5-(4-叔丁氧羰基-1-哌嗪基)-戊酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-13**)的合成

按照合成 **IS-3** 的方法由化合物 **IS-11** (100.0 mg, 0.22 mmol)、*N*-Boc 哌嗪(48.3 mg, 0.26 mmol)、DMAP (31.7 mg, 0.26 mmol)和 EDCI (207.2 mg, 1.08 mmol)反应, 得 98.0 mg 无色液体产物 **IS-13**, 产率 72%. $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -31.9 (c 0.48, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.75~4.72 (m, 1H, CHOCO), 4.14~4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.75~3.68 (m, 2H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.58~3.40 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.44~2.37 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.15 (d, $J=13.5$ Hz, H_α -15), 2.00~1.93 (m, 2H), 1.84~1.75 (m, 4H), 1.59 (q, $J=13.0$ Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.34 (q, $J=2.8$ Hz, 2H), 1.26~1.23 (m, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.08~1.01 (m, 3H), 0.96 (q, $J=9.4$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.87~0.83 (m, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 177.7, 173.7,

171.1, 154.8, 81.9, 80.5, 60.1, 58.7, 57.3, 55.9, 55.0, 53.6, 45.5, 43.9, 42.6, 41.7, 41.6, 40.9, 40.2, 38.3, 38.3, 34.8, 33.9, 32.6, 29.1, 28.6 (3C), 25.2, 21.9, 20.7, 20.4, 19.1, 18.7, 14.3, 13.5; IR (KBr) ν : 2939, 2851, 1726, 1653, 1458, 1420, 1238, 1173 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7$ 630.4244, found 630.4243.

3.2.15 16 β -O-[5-氧亚基-5-(1-哌嗪基)-戊酰基]-19-贝叶酸乙酯(**IS-14**)的合成

按照合成 **IS-4** 的方法由化合物 **IS-13** (50.0 mg, 0.07 mmol)和三氟乙酸(0.2 mL, 2.10 mmol)反应得 69.0 mg 淡黄色液体 **IS-14**, 产率 82%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -30.0 (c 0.04, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.75~4.71 (m, 1H, CHOCO), 4.14~4.00 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.69~2.92 (m, 8H, piperazine H-2 $\times$ 2, H-3 $\times$ 2, H-5 $\times$ 2, H-6 $\times$ 2), 2.47~2.38 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.15 (d, $J=13.6$ Hz, H_α -15), 1.85~1.72 (m, 2H), 1.64~1.50 (m, 4H), 1.42~1.32 (m, 3H), 1.27~1.23 (m, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.08~0.99 (m, 3H), 0.96 (q, $J=9.3$ Hz, 1H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (q, $J=9.5$ Hz, 1H), 0.70 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 177.1, 173.1, 170.3, 81.2, 59.5, 56.6, 55.2, 54.3, 45.3, 44.9, 43.3, 41.9, 41.2, 41.1 (2C), 40.3, 39.5, 37.6, 37.6, 34.2, 33.3, 31.8, 29.3, 28.5, 24.5, 21.3, 20.1, 19.8, 18.5, 13.7, 12.9; IR (KBr) ν : 2947, 2849, 1724, 1651, 1452, 1377, 1178 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_5$ 530.3720, found 530.3713.

3.2.16 贝叶-15-烯-19-酸乙酯(**IS-16**)的合成

参考文献[19], 在圆底烧瓶中加入 2,4,6-三甲基吡啶(5 mL), 将 **IS-15** (690.0mg, 1.37 mol)溶于其中, 回流反应 4 h, 经薄层层析检测反应结束后, 减压蒸馏除去溶剂, 用乙酸乙酯和水萃取, 并用 1mol/L HCl 洗涤至微酸性, 用饱和氯化钠洗涤, 过滤, 柱层析得到无色液体 **IS-16**, 产率 95%. $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -5.0 (c 0.04, CH_2Cl_2); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.71, 5.45 (d, $J=5.5$ Hz, each 1H, H-15, H-16), 4.10 (q, $J=14.12$ Hz, OCH_2CH_3), 2.16 (d, $J=13.1$ Hz, 1H), 1.79 (t, $J=14.4$ Hz, 3H), 1.69~1.64 (m, 3H), 1.57~1.51 (m, 1H), 1.46~1.37 (m, 3H), 1.29~1.25 (m, 6H), 1.21 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.08 (dd, $J=2.2, 11.4$ Hz, 1H), 1.02 (s, 1H), 1.00 (s, 3H), 0.88 (q, 1H), 0.59 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 177.7, 136.7, 135.0, 61.2, 60.1, 57.3, 52.4, 49.3, 44.0, 43.8, 39.8, 38.4, 38.0, 37.9, 33.3, 29.3, 25.1, 21.8, 20.6, 19.5, 14.3, 14.1; IR (KBr) ν : 3035, 2945, 2847, 1724, 1452, 1232 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_2$ 330.2559, found 330.2551.

3.2.17 贝叶-15-烯-19-酸(IS-17)的合成

参考文献[19], 在圆底烧瓶中加入 2,4,6-三甲基吡啶(7 mL), 将 IS-16 (375.1 mg, 1.13 mol)和碘化锂(455.7 mg, 3.40 mmol)溶于其中, 回流反应 12 h, 经薄层层析检测反应结束后, 用乙酸乙酯和水萃取, 并用 1 mol/L HCl 洗涤至微酸性, 用饱和氯化钠洗涤, 过滤, 柱层析得到白色固体产物, 产率 90%. m.p. 177.4~177.9 °C. $[\alpha]_D^{20}$ -6.4 (c 0.39, CH₂Cl₂); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.74, 5.46 (d, J =5.6 Hz, each 1H, H-15, H-16), 2.15 (d, J =13.2 Hz, 1H), 1.82~1.74 (m, 4H), 1.70~1.58 (m, 3H), 1.55~1.33 (m, 5H), 1.29 (d, J =4.5 Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 1.13~1.02 (m, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.89 (d, J =9.3 Hz, 1H), 0.67 (s, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 184.8, 136.7, 135.0, 61.2, 57.3, 52.5, 49.3, 44.0, 43.8, 39.7, 38.2, 38.1, 37.8, 33.3, 29.3, 25.1, 21.8, 20.7, 19.4, 14.0; IR (KBr) ν : 3030, 2999, 2941, 2850, 1690, 1448, 1256 cm⁻¹; HRMS calcd for C₂₀H₃₀O₂ 302.2246, found 302.2248.

3.3 体外抗肿瘤细胞增殖实验

3.3.1 实验材料

细胞系: 人皮肤鳞癌细胞(Colo-16)和人肺腺癌细胞(A549).

材料: 胎牛血清(Hyclone)、RPMI1640 培养基(Gibco)、青霉素、链霉素双抗、胰酶-EDTA 溶液、磷酸缓冲液(PBS)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、细胞培养瓶及 96 孔细胞培养板、倒置显微镜(CKX41, Olympus)、二氧化碳细胞培养箱(Thermo)、超净工作台、离心机(Centrifuge 5804 R, eppendorf)、酶标仪(xMark, BIO-RAD)及待测的药品.

3.3.2 实验方法

配置待测的药品: 将本实验待测样品和阳性对照药品阿霉素、齐墩果酸和氟尿嘧啶溶解于安全剂量的 DMSO 50 μ L 中, 后用质量分数为 10% RPMI1640 完全培养液将待测药品分别配成 320, 160, 80, 40 和 20 μ mol·L⁻¹ 5 个剂量, 相应的终浓度分别 160, 80, 40, 20 和 10 μ mol·L⁻¹.

抗肿瘤细胞增殖实验: 将 Colo-16 和 A549 细胞分别在含质量分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中扩增细胞, 待细胞铺满瓶底约 80% 时更换新鲜培养液, 于第二天用质量分数为 0.25% 胰酶-EDTA 溶液消化贴壁细胞并收集、洗涤细胞, 将 Colo-16 和 A549 细胞的细胞浓度均调整为 2×10^4 个/mL. 将二种细胞各自分别接种于 96 孔细胞培养板中, 100 μ L/孔, 置细胞板于体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h, 之后分别取 5 个剂量的待测药品 100 μ L/孔加到细胞板中, 每个浓度设三个复孔. 振荡器振荡细胞板 30 s, 随后置细胞培养箱中

孵育 48 h. 在终止实验前 4 h, 加 MTT 20 μ L/孔, 继续孵育, 实验终止时, 将细胞板在 4 °C, 2000 r/min 离心 10 min, 甩板后加入 DMSO 150 μ L/孔, 测定 570 nm 下的 OD 值. 获得数据后, 采用 SPSS17.0 软件计算 IC₅₀.

3.4 抑菌实验

参考文献[20], 将 *E. coli*(大肠杆菌)1924、*S. aureus*(金黄色葡萄球菌)4220、*S. mutans*(变形链球菌)3289、MRSA(耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)3167 和 QRSA(耐喹诺酮金黄色葡萄球菌)3505 五种菌种稀释 1000 倍后, 各自在十个 96 孔微量滴定板上接种, 保持恒温 37 °C, 培养 24 h, 加入质量分数为 0.05% 的所测样品溶液. 继续培养 24 h 后, 使用酶联免疫吸收测定仪对菌种的生长情况进行检测, 以对其最小抑菌浓度(MIC)进行测试. 采用相同的方法用氯霉素(Chloramphenicol)做对照试验.

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Lin, J.; Guo, Y.; Gao, Y.; Wang, S.; Wang, X.; Xie, Z.; Niu, H.; Chang, W.; Liu, L.; Yuan, H.; Lou, H. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3944.
- [2] Liu, C. J.; Yu, S. L.; Liu, Y. P.; Dai, X. J.; Wu, Y.; Li, R. J.; Tao, J. *C. Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 26.
- [3] Wang, M.; Li, H.; Xu, F.; Gao, X.; Li, J.; Xu, S.; Zhang, D.; Wu, X.; Xu, J.; Hua, H.; Li, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 885.
- [4] Luan, T.; Cao, L. H.; Deng, H.; Shen, Q. K.; Tian, Y. S.; Quan, Z. S. *Molecules* **2019**, *24*, 121.
- [5] Wu, Y.; Liu, C. J.; Liu, X.; Dai, G. F.; Du, J. Y.; Tao, J. C. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 2052.
- [6] Hsieh, M. H.; Chan, P.; Sue, Y. M.; Liu, J. C.; Liang, T. H.; Huang, T. Y.; Tomlinson, B.; Chow, M.; Kao, P. F.; Chen, Y. J. *Clin. Ther.* **2003**, *25*, 2797.
- [7] Ma, J.; Ma, Z.; Wang, J.; Milne, R. W.; Xu, D.; Davey, A. K.; Evans, A. M. *Diabetes, Obes. Metab.* **2007**, *9*, 597.
- [8] Samadder A.; Das, J.; Das, S.; Khuda, A. R. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *34*, 743.
- [9] Jin H.; Gerber J. P.; Wang J.; Ji, M.; Davey, A. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 986.
- [10] Wong, K. L.; Lin, J. W.; Liu, J. C.; Yang, H. Y.; Kao, P. F.; Chen, C. H.; Loh, S. H.; Chiu, W. T.; Cheng, T. H.; Lin, J. G.; Hong, H. J. *Pharmacology* **2006**, *76*, 163.
- [11] Hutt, O. E.; Doan, T. L.; Georg, G. I. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1602.
- [12] Zhu, S. L.; Wu, Y.; Liu, C. J.; Wei, C. Y.; Tao, J. C.; Liu, H. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 70.
- [13] Tian, T.; Liu, X.; Lee, E. S.; Sun, J.; Feng, Z.; Zhao, L.; Zhao, C. *Arch. Pharmacol. Res.* **2017**, *40*, 458.
- [14] Chen, Y. H.; Hou, X. Y.; Zhi, D. F.; Li, C.; Tian, T.; Sun, J. Y.; Zhao, L. X.; Zhao, C. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 795 (in Chinese). (陈艳华, 侯熙彦, 支德福, 李常, 田甜, 孙竞阳, 赵龙铨, 赵春晖, 有机化学, **2016**, *36*, 795.)
- [15] Liu, X. Y.; Gao, X. H. Q.; Jin, X. J.; Zhao, C. H.; Feng, Z. H.; Sui, Y.; Zhao, L. X.; Yan, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 3227 (in Chinese). (刘新宇, 高雪琴, 金学军, 赵春晖, 冯中华, 隋悦, 赵龙铨, 阎欣, 有机化学, **2018**, *38*, 3227.)

- [16] Lohelster, C.; Weckbecker, M.; Waldvogel, S. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013, 5539.
- [17] Zhang, T.; Lu, L. H.; Liu, H.; Wang, J. W.; Wang, R. X.; Zhang, Y. X.; Tao, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5827.
- [18] Liu, C. J.; Liu, Y. P.; Yu, S. L.; Dai, X. J.; Zhang, T.; Tao, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 5455.
- [19] Murillo, J. A.; Gil, J. F.; Upegui, Y. A.; Restrepo, A. M.; Robledo, S. M.; Quiñones, W.; Echeverri, F.; Martin, A. S.; Olivo, H. F.; Escobar, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 153.
- [20] Xing, X. L.; Liu, T. T.; Song, M. X.; Li, Y. R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Li, H. S.; Zheng, C. J.; Piao, H. R. *Chin. J. Med.* **2013**, 23, 1 (in Chinese).
- (邢肖兰, 刘婷婷, 宋明霞, 李亚茹, 张雨, 李燕, 李花淑, 郑昌吉, 朴虎日, 中国药物化学杂志, **2013**, 23, 1.)

(Zhao, C.)