4-硝基苯基 *N,N'*-二乙酰基-4-硫基- β -壳二糖苷的合成与酶底物活性研究

郭兵博 沈生强 金淑惠* 路慧哲 张建军*

(中国农业大学理学院 北京 100193)

摘要 基于硫代糖苷类化合物对糖苷酶的水解抗性, 设计并合成了以对硝基苯酚为紫外吸收基团的二糖底物分子 4-硝基苯基 *N,N'*-二乙酰基-4-硫基- β -壳二糖苷(pNP-TCB), 并分别研究了两个糖苷水解酶第 18 家族(GH18)几丁质酶和第 20 家族(GH20) β -*N*-乙酰己糖胺酶对 pNP-TCB 的降解响应. 结果显示底物 pNP-TCB 几乎不被 β -*N*-乙酰己糖胺酶降解, 却能够被几丁质酶降解并释放出对硝基苯酚, 该分子可在 405 nm 处通过酶标仪检出. 表明底物 pNP-TCB 具有良好的特异性, 从而实现细胞水平 GH18 几丁质酶的性质研究且不受己糖胺酶的干扰, 为 GH18 几丁质酶和 GH20 β -*N*-乙酰己糖胺酶的筛选分离提供良好的检测手段.

关键词 对硝基苯酚; 二糖底物; 壳二糖苷; 几丁质酶; 紫外吸收

Synthesis and Enzyme Substrate Activity of *p*-Nitrophenyl *N,N'*-Diacetyl-4-thio- β -chitobioside

Guo, Bingbo Shen, Shengqiang Jin, Shuhui* Lu, Huizhe Zhang, Jianjun*

(School of Science, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract Based on the resistance of glycosidase to the hydrolysis of glycosidase, the probe molecule *p*-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl-4-thio- β -chitobioside (pNP-TCB) was designed and synthesized. The effects of pNP-TCB on the degradation of glycoside hydrolase family 18 (GH18) chitinase and 20 (GH20) β -*N*-acetylhexosaminidase were studied. The results showed that when pNP-TCB was combined with β -*N*-acetylhexosaminidase, the disaccharide substrate was hardly degraded. But when it reacted with chitinase, the pNP-TCB was degraded by enzyme to release *p*-nitrophenol group, and the corresponding ultraviolet absorption value can be detected by enzyme-labeled instrument at 405 nm. It indicates that the substrate molecule exhibits good specificity, which can be used to study the properties of GH18 chitinase at the cellular level without interference of β -*N*-acetylhexosaminidase. The pNP-TCB can also provide a good detection method for screening and isolation between the GH18 chitinase and the GH20 β -*N*-acetyl hexose.

Keywords *p*-nitrophenol; disaccharide substrate; chitobioside; chitinase; UV absorption

几丁质(chitin)又称为甲壳质或甲壳素, 是以 *N*-乙酰氨基葡萄糖为基本单元并通过 β -(1,4)氧苷键连接而成的一种线性聚合物^[1,2]. 几丁质是昆虫外表皮及真菌细胞壁的重要组成成分, 高等动植物体内基本不含几丁质, 因此, 作用于几丁质降解过程中的相关酶被认为是绿色的农药靶标^[3,4]. 几丁质降解对昆虫的生长发育至关重要, 降解过程由两个家族糖苷水解酶第 18 家族(GH18)几丁质酶(EC 3.2.1.14)和第 20 家族(GH20) β -*N*-乙

酰己糖胺酶(EC 3.2.1.52)催化^[5,6]. GH18 几丁质酶可催化几丁质降解成较短的几丁质寡糖, 几丁质寡糖进一步被 GH20 β -*N*-乙酰己糖胺酶从非还原端逐步降解, 生成 *N*-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)^[5~7]. 目前针对几丁质酶和 β -*N*-乙酰己糖胺酶抑制剂的相关研究已取得较多进展, 文献报道的抑制剂主要有 Thiazolines、Phlegmacin B₁ 和 Bisdionin C^[8~10]. 本课题组在针对昆虫来源的 β -*N*-乙酰己糖胺酶 *O*fHex1 抑制剂的设计和合成方面也开展了大

* Corresponding authors. E-mail: zhangjianjun@cau.edu.cn; shuhuij@cau.edu.cn

Received June 10, 2019; revised July 31, 2019; published online August 7, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21772230) and the Chinese Universities Scientific Fund (No. 2019TC135).

国家自然科学基金(No. 21772230)及中国高校科研基金(No. 2019TC135)资助项目.

量的研究工作^[11-13].

研究几丁质酶活性测定的方法对于几丁质的开发、循环利用、新型几丁质酶抑制剂的研究等具有积极的推动作用. 几丁质酶是糖基水解酶的一种, 其活性检测方法主要包括比色法^[14]、黏度测定法^[15]、放射化学法^[16]和 HPLC 法^[17]等. 其中比色法最为常用, 其原理之一是利用 4-硝基苯基- β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷(pNP-GlcNAc)、4-硝基苯基- β -D-N,N'-二乙酰壳二糖苷(pNP-(GlcNAc)₂)或 4-甲基伞形基- β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷(Mu-GlcNAc)等作为相关酶的底物分子, 通过糖基水解释放出硝基苯酚或甲基伞形酮来检测酶的活性^[18,19]. 我们课题组^[20]在前期研究中, 设计报道了一种新型的糖基化酰亚胺基荧光探针, 具有较好的水溶性和荧光特性, 在氨基糖苷酶的活性检测中发现其比 Mu-GlcNAc 更有效. 现有文献报道的 GH18 几丁质酶底物分子主要为 4-硝基苯基- β -D-N,N'-二乙酰壳二糖苷(pNP-(GlcNAc)₂), 该底物可被几丁质酶降解为双糖(GlcNAc)₂ 及对硝基苯酚(pNP), 通过在波长 405 nm 处检测 pNP 紫外吸收强度来检测其酶活^[21]. pNP-(GlcNAc)₂ 底物能够同时被 GH18 几丁质酶和 GH20 β -N-乙酰己糖胺酶降解, 并释放出 pNP 分子^[21-23]. 因此, pNP-(GlcNAc)₂ 底物不适用于生物体内几丁质酶活性的常规测定. 所以, 设计能被 GH18 几丁质酶水解的专一性底物具有重要的研究意义.

根据酶催化的专一性, 硫代糖苷键难以被糖苷水解酶断裂^[24,25], 鉴于此, 设计了一种新型含硫糖苷底物 4-硝基苯基 N,N'-二乙酰基-4-硫基- β -D-壳二糖苷(pNP-TCB), 设计思路如图式 1 所示, 以期该底物只被 GH18 几丁质酶专一性降解, 而不能被 GH20 β -N-乙酰己糖胺酶降解, 从而实现细胞水平 GH18 几丁质酶的性质研究不受己糖胺酶的干扰, 并为 GH18 几丁质酶和 GH20 β -N-乙酰己糖胺酶的筛选分离提供良好的检测手段.

图式 1 4-硝基苯基 N,N'-二乙酰基-4-硫基- β -壳二糖苷(pNP-TCB)的设计思路

Scheme 1 Design of *p*-nitrophenyl N,N'-diacetyl-4-thio- β -chitobioside (pNP-TCB)

1 结果与讨论

1.1 pNP-TCB 底物分子的路线设计与合成讨论

寡糖的合成往往需要在特定位点进行偶联反应, 由于每个单糖结构含有多个羟基, 因此对单糖其它位点的羟基进行选择性保护与脱保护是寡糖合成过程中的一个研究重点^[26]. 在本课题组之前的研究基础^[27-29]上, 分别对两个单糖结构进行选择性保护, 偶联反应后再脱除保护基, 最终得到 pNP-TCB 目标化合物, 首先合成了双糖偶联供体 2-乙酰氨基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-1-硫代- β -D-吡喃葡萄糖苷(2'), 合成路线如 Scheme 2 所示. 首先以 N-乙酰氨基葡萄糖为原料在乙酰氯的作用下发生全乙酰化和氯化反应得到全乙酰化氯代糖, 然后将全乙酰化氯代糖在丙酮存在下与硫脲反应生成硫脲盐酸盐, 抽滤得中间体 2a, 再在温和碱偏重亚硫酸钠作用下水解生成化合物 2', 化合物 2' 中 SH 的偶合常数为 $J=9.4$ Hz (d, δ 2.58), 与文献值^[30] $J=9.6$ Hz (δ 2.58)一致.

图式 2 化合物 2' 的合成路线
Scheme 2 Synthetic route of compound 2'

目标化合物 2~6 的合成路线如 Scheme 3 所示. 以 N-乙酰氨基葡萄糖为原料, 经过全乙酰化、氯化 and 1 位对硝基苯基取代得化合物 2. 在化合物 2 的后处理过程中, 若浓缩反应体系中的溶剂后直接用二氯甲烷萃取, 则易乳化, 虽然可选择硅藻土破乳, 但会造成收率损失; 而保留少许丙酮后再经二氯甲烷萃取, 可减少体系乳化现象. 化合物 2 在甲醇-甲胺溶液中脱除乙酰基, 反应过程中逐渐析出白色固体, 将反应体系进行减压抽滤可得化合物 3. 由于需要对受体单糖的 4 位羟基进行偶联, 因此需要把 3,6 位羟基先保护起来, 为此, 优先选择在对甲苯磺酸的催化下对 4,6 位羟基进行异丙叉基保护^[31], 以 92% 收率得到化合物 4. 随后对化合物 4 的 3 位羟基进行苯甲酰化反应得到化合物 5. 为了对化合物 5 的 6 位羟基进行保护, 需先用冰醋酸和水解除去 4,6 位的异丙叉基得到化合物 6, 随后进行 6 位羟基的选择性苯甲酰化.

化合物 7~11 的合成路线如 Scheme 4 所示. 化合物 6 在无水吡啶和无水二氯甲烷条件下与两种反应试剂

Reagent and conditions: (i) AcCl; (ii) K₂CO₃, acetone, 4-nitrophenol, reflux; (iii) CH₃OH, CH₃NH₂; (iv) DMF, 2,2-dimethoxypropane, 4-TsOH; (v) pyridine, benzoyl chloride, 0 °C; (vi) AcOH, H₂O, reflux

图式 3 化合物 6 的合成路线

Scheme 3 Synthetic route of compound 6

(苯甲酰氯和苯甲酰氰)进行 6 位羟基的选择性苯甲酰化反应, 得到化合物 7。对比反应结果发现, 用苯甲酰氰酰化的收率比用苯甲酰氯酰化的收率有所提高。对比化合物 3, 6 和 7 可知, 化合物 3 中 H-3 的化学位移(δ)为 3.74, 其 3 位羟基苯甲酰化后得化合物 6, 化合物 6 中 H-3 的化学位移向低场移动到 δ 5.22, 证明苯甲酰化发生在 3-OH 上。当化合物 6 的 3,6 位羟基发生选择性苯甲酰化后, 所得化合物 7 中 H-6 的化学位移相较于化合物 6 的 H-6 则明显向低场移动, 证明选择性苯甲酰化发生在 6-OH 上。具体的特征峰化学位移的变化如表 1 所示。

Reagent and conditions: (vii) CH₂Cl₂, pyridine, benzoyl cyanide; (viii) CH₂Cl₂, pyridine, Tf₂O, -10 °C; (ix) DMF, NaNO₂; (x) CH₂Cl₂, pyridine, Tf₂O; (xi) sodium hydride, DMF or cysteamine, dithioerythritol (DTE), DMF; (xii) CH₃OH, CH₃NH₂

图式 4 化合物 11 的合成路线

Scheme 4 Synthetic route of compound 11

表 1 酰化反应区域选择性特征峰化学位移

Table 1 Feature chemical shift of regioselective acylation reactions

δ	3	6	7
δ_{H-3}	3.74	5.22	5.33
$\delta_{H-6a, H-6b}$	3.37~3.15 (2H)	3.67~3.48 (2H)	4.64~4.44 (2H)

化合物 7 在无水吡啶和无水二氯甲烷条件下与三氟甲磺酸酐反应, 生成 4 位三氟甲磺酰氧基取代的中间体, 在亚硝酸钠的作用下进一步实现构型翻转得到化合物 8; 化合物 8 再经过 4 位三氟甲磺酸酐酯化得到偶联双糖受体化合物 9。化合物 9 性质不稳定, 合成后直接用于二糖偶联反应。在无水无氧条件下, 偶联反应采取两种方案进行: 双糖供体 2' 与双糖受体 9 在氢化钠作为碱的条件下能够以 16% 的收率得到偶联产物 β -(1 $\rightarrow$ S $\rightarrow$ 4) 连接的二糖化合物 10; 双糖供体 2' 与双糖受体 9 在二硫赤藓醇(DTE)及巯基乙胺的条件下进行偶联反应, 则目标化合物 10 的收率为 26%。化合物 10 经过甲胺的甲醇溶液脱除保护基得到化合物 11。化合物 11 结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证。其中, 氢谱中 H-1 和 H-1' 的偶合常数分别为 $J=8.5$ Hz (δ 5.23)、 $J=10.3$ Hz (δ 4.59), 结合碳谱中, C-1, C-1' 的 δ 值分别为 98.16 和 82.75, 证明化合物 11 结构为 β -(1 $\rightarrow$ S $\rightarrow$ 4) 连接的 β 构型。

1.2 pNP-TCB 作为 GH18 几丁质酶底物的性质研究

为了直观地评价 GH18 几丁质酶对 pNP-TCB 底物的降解作用, 采用不同用量粘质沙雷氏菌几丁质酶(EC 3.2.1.14)对 pNP-TCB 底物降解实验, 结果如图 1。凡是经粘质沙雷氏菌几丁质酶孵育 30 min 后的底物, 在 405 nm 波长下经酶标仪检测均有相应的 pNP 紫外吸收值, 并且该吸收值的大小随着几丁质酶用量的增加而逐渐增大, 且两者之间具有良好的线性关系($R^2=0.9928$), 由此说明, 粘质沙雷氏菌几丁质酶能够对 pNP-TCB 底物进行降解, 释放出 pNP 紫外吸收基团。

图 1 不同浓度粘质沙雷氏菌几丁质酶(EC 3.2.1.14)对 pNP-TCB 底物的降解作用

Figure 1 Degradation of pNP-TCB substrate by different concentrations of chitinase from *Serratia marcescens*

1.3 pNP-TCB 底物的专一性研究

为了研究 pNP-TCB 底物的专一性, 首先设置了粘质沙雷氏菌几丁质酶(EC3.2.1.14)(GH18 几丁质酶)对同一浓度 pNP-TCB、pNP-(GlcNAc)₂ 和 pNP-GlcNAc 3 种底物的降解活性实验, 空白对照为相同底物浓度的柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 6.0), 每个实验重复 3 次. 结果如图 2 所示. 粘质沙雷氏菌几丁质酶与 pNP-TCB 和 pNP-(GlcNAc)₂ 两种底物孵育后在波长 405 nm 下经酶标仪检测均有明显的 pNP 紫外吸收, 而与 pNP-GlcNAc 底物孵育后几乎没有吸收. 由此说明, 粘质沙雷氏菌几丁质酶能够对 pNP-TCB 和 pNP-(GlcNAc)₂ 两种底物进行降解释放 pNP, 而对 pNP-GlcNAc 底物则几乎不降解.

图 2 粘质沙雷氏菌几丁质酶(EC 3.2.1.14)对不同底物的降解作用

Figure 2 Degradation of different substrates by chitinase from *Serratia marcescens*

为了进一步验证 pNP-TCB 底物的专一性, 采用亚洲玉米螟 *O/H*Hex1 酶(EC3.2.1.52) (GH20 β -N-乙酰己糖胺酶)对同一浓度 pNP-TCB、pNP-(GlcNAc)₂ 和 pNP-GlcNAc 三种底物进行降解, 每个实验重复 3 次. 结果如图 3 所示. 亚洲玉米螟 *O/H*Hex1 酶(EC 3.2.1.52)与 pNP-GlcNAc、pNP-(GlcNAc)₂ 两种底物孵育后在波长 405 nm 下经酶标仪检测均有明显的紫外吸收, 而与 pNP-TCB 底物作用后几乎没有吸收. 由此说明, 亚洲玉米螟 *O/H*Hex1 酶(EC 3.2.1.52)能够较好地降解 pNP-(GlcNAc)₂ 和 pNP-GlcNAc 两种底物, 但对 pNP-TCB 底物几乎不降解.

2 结论

以 *N*-乙酰氨基葡萄糖为原料, 经过全乙酰化、氯化、取代、异亚丙基化、苯甲酰化、酯化、二糖偶联和脱保护等步骤, 合成了一种新型的 GH18 几丁质酶专一性底物 4-硝基苯基-*N,N'*-二乙酰基-4-硫基- β -壳二糖苷(pNP-TCB). 通过 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证了化合物的结构, 采用比色法研究了 GH18 几丁质酶和 GH20 β -N-乙酰己糖胺酶对新型底物 pNP-TCB 的降解

图 3 亚洲玉米螟 *O/H*Hex1 酶(EC 3.2.1.52)对不同底物的降解作用

Figure 3 Degradation of different substrates by the *O/H*Hex1 from *Ostrinia furnacalis*

活性. 结果表明, 该底物可以专一性地被 GH18 几丁质酶水解, 而几乎不能被 GH20 β -N-乙酰己糖胺酶水解. 因此可利用 GH18 几丁质酶对该底物的专一性, 实现在细胞水平上对 GH18 几丁质酶性质的研究而不受己糖胺酶的干扰, 能为新型的 GH18 几丁质酶抑制剂的活性研究提供专一的检测底物.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

高分辨质谱采用 Bruker Daltonics Bio-TOF-Q III 型质谱仪(ESIMS)测定; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 使用瑞典 Bruker Avance 300 型核磁共振仪测定, 四甲基硅烷(TMS)为内标; FlexStation 3 酶标仪, Molecular Devices 公司; RE-52AA 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水式真空泵, 巩义市予华有限责任公司; ZF7-C 三用紫外分析仪, 上海康华仪器制造有限责任公司; CP214 型分析天平, 奥豪斯仪器(常州)有限责任公司; ZNCL-T 智能恒温磁力搅拌棒, 郑州杜甫仪器有限公司; Bruker Avnce 核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克旋转蒸发器. 薄层层析硅胶板, 青岛海洋化工厂; 柱层析硅胶, 青岛海洋化工厂. GH18 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)几丁质酶(5U)、柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 6.0)、无菌蒸馏水购自于南京都莱生物科技有限公司, 所用的 GH20 的亚洲玉米螟 β -N-乙酰己糖胺酶 *O/H*Hex1 (5 mU/mL)、pNP-(GlcNAc)₂ 底物是由中国农业科学院植物保护研究所杨青教授课题组提供; 其它所有试剂均为国产市售分析纯.

3.2 化合物的合成

3.2.1 2-乙酰氨基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-1-硫代- β -D-吡喃葡萄糖苷(2')的合成

参考文献[32]方法制备. 取 30.5 g (138 mmol)化合物 1 溶于 100 mL 的乙酰氯, 室温反应 18 h, 经薄层色谱(TLC) [*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)=1:1]检测反应完全

后, 用二氯甲烷萃取. 有机相经分别经饱和碳酸钠溶液和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩溶剂得暗紫色固体 42.5 g. 然后用 250 mL 丙酮溶解暗紫色固体, 加入 16.5 g (217 mmol) 硫脲, 57 °C 回流 6 h, 经 TLC (展开剂为乙酸乙酯) 检测反应完全, 减压抽滤得中间体 **2a** (35 g).

将 35 g (86.4 mmol) 中间体 **2a** 溶于 300 mL 二氯甲烷和 200 mL 水中, 加入 34.2 g (172.8 mmol) 偏重亚硫酸钠, 50 °C 回流 5 h. 经 TLC [V (二氯甲烷): V (甲醇) = 10:1] 检测反应完全, 用二氯甲烷萃取, 有机相经饱和食盐水洗涤后干燥, 浓缩溶剂后用乙酸乙酯重结晶得 28.6 g 白色固体 **2'**, 产率为 57%. m.p. 164~166 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -25.3 (c 0.5, DMSO) [文献值:^[32] m.p. 165~167 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -24.8 (c 1.0, 氯仿)]; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.65 (d, J =9.2 Hz, 1H, NHAc), 5.18~5.02 (m, 2H, H-3, H-4), 4.58 (t, J =9.8 Hz, 1H, H-1), 4.25 (dd, J =12.4, 4.9 Hz, 1H, H-6a), 4.15 (t, J =10.1 Hz, 2H, H-2, H-6b), 3.70 (dd, J =6.0, 3.7 Hz, 1H, H-5), 2.58 (d, J =9.4 Hz, 1H, SH), 2.10 (s, 3H, CH₃CO), 2.04 (d, J =4.2 Hz, 6H, CH₃CO), 1.99 (s, 3H, CH₃CO); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.15, 169.70, 169.43, 169.35 (C=O), 78.82, 74.93, 73.48, 68.59, 62.14, 55.67, 22.77, 20.64, 20.49, 20.43 (CH₃CO). HRMS calcd for C₁₄H₂₂NO₈S [M+H]⁺ 364.1051, found 364.1061.

3.2.2 2-乙酰氨基-3,4,6-三-*O*-乙酰基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**2**)的合成

参考文献[33]方法制备. 取 40.0 g (181 mmol) 化合物 **1** 溶于 100 mL 的乙酰氯, 室温反应 18 h. 经 TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 1:1] 检测反应完全, 用二氯甲烷萃取. 有机相分别经饱和碳酸钠溶液和饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥, 浓缩得暗紫色固体产物 57 g. 用 150 mL 丙酮溶解固体产物, 加入 27.7 g 对硝基苯酚(199 mmol)和 27.4 g (199 mmol) 无水 K₂CO₃, 69 °C 回流 4 h. 经 TLC [V (二氯甲烷): V (甲醇) = 20:1] 检测反应完全, 浓缩丙酮. 用二氯甲烷萃取、干燥、浓缩, 得白色固体 **2** (39.8 g), 产率 47%. m.p. 238~239 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -45.4 (c 0.5, DMSO) [文献值:^[33] m.p. 235~237 °C, $[\alpha]_{546}$ -49 (c 1.0, 氯仿)]; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.26~8.20 (m, 2H, ArH), 8.12 (d, J =9.0 Hz, 1H, NH), 7.29~7.18 (m, 2H, ArH), 5.56 (d, J =8.4 Hz, 1H, H-1), 5.29~5.18 (m, 1H, H-3), 4.95 (t, J =9.7 Hz, 1H, H-4), 4.37~3.94 (m, 4H, H-2, H-5, H-6a, H-6b), 2.01 (s, 6H, CH₃CO), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.78 (s, 3H, CH₃CO); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 170.08, 169.96, 169.81, 169.72 (C=O), 161.72, 142.34, 125.84, 116.71 (ArC), 98.05, 70.79, 70.19,

66.71, 61.48, 49.30, 22.80, 20.51, 20.44 (CH₃CO).

3.2.3 2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**3**)的合成

将化合物 **2** (39.8 g, 85.0 mmol) 溶于 150 mL 甲醇中, 加 50 mL 甲胺溶液, 常温反应 12 h. 经 TLC [V (二氯甲烷): V (甲醇) = 6:1] 检测反应完全, 抽滤得白色固体 **3** (26.8 g), 产率为 92%. m.p. 205~206 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -22.8 (c 0.5, DMSO) [文献值:^[34] m.p. 200~201 °C, $[\alpha]_D^{21}$ -16.18 (c 0.87, V (水): V (丙酮) = 1:1)]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.26~8.14 (m, 2H, ArH), 7.86 (d, J =9.0 Hz, 1H, NH), 7.23~7.09 (m, 2H, ArH), 5.24~5.12 (m, 3H, H-1, 2×OH), 4.66 (s, 1H, OH), 3.74 (dd, J =18.6, 8.7 Hz, 2H, H-2, H-3), 3.55~3.15 (m, 4H, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 1.82 (s, 3H, CH₃CO); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.68 (C=O), 162.38, 141.96, 125.84, 116.71 (ArC), 98.61, 77.51, 73.99, 70.23, 60.70, 55.42, 23.14 (CH₃CO). HRMS calcd for C₁₄H₁₉N₂O₈ [M+H]⁺ 343.1136, found 343.1129.

3.2.4 2-乙酰氨基-2-脱氧-4,6-*O*-异丙叉基- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**4**)的合成

将 15.8 g (46.2 mmol) 化合物 **3** 溶于 100 mL 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中, 加入 0.6 g (3.15 mmol) *p*-TsOH 和 7.4 mL (78.4 mmol) 2-甲氧基丙烯, 氮气保护反应 14 h, TLC (展开剂为乙酸乙酯) 检测反应完全, 加 5 mL 三乙胺(TEA)终止反应. 用乙酸乙酯萃取后经饱和碳酸氢钠溶液和水洗涤, 无水硫酸钠干燥后浓缩溶剂得白色固体 **4** (16.2 g), 产率 92%. m.p. 111~112 °C, $[\alpha]_D^{25}$ +29.5 (c 0.5, DMSO), ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.20~8.16 (m, 2H, ArH), 7.92 (d, J =8.9 Hz, 1H, NH), 7.23~7.12 (m, 2H, ArH), 6.63 (d, J =7.8 Hz, 1H, NH), 5.32 (d, J =8.2 Hz, 1H, H-1), 5.29 (s, 1H, OH), 3.87~3.77 (m, 2H, H-2, H-3), 3.70 (t, J =9.9 Hz, 1H, H-4), 3.62~3.45 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1.80 (s, 3H, CH₃CO), 1.45 (s, 3H, CMe-2a), 1.33 (s, 3H, CMe-2b); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.69 (C=O), 162.04, 142.14, 125.87, 116.74 (ArC), 99.15 (C, CMe₂), 98.64, 73.71, 70.73, 67.27, 61.40, 56.14, 29.14 (CH₃, CH₃COO), 23.09 (CH₃, CH₃COO), 19.19 (CH₃, CH₃CO). HRMS calcd for C₁₇H₂₃N₂O₈ [M+H]⁺ 383.1449, found 383.1438.

3.2.5 2-乙酰氨基-2-脱氧-4,6-*O*-异丙叉基-3-*O*-苯甲酰基- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**5**)的合成

将 12.1 g (31.7 mmol) 化合物 **4** 溶于 40 mL 无水吡啶中, 0 °C 氮气保护下, 逐滴滴加 5.6 mL (48.6 mmol) BzCl, 反应 2 h. TLC [V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3:1]

检测反应完全. 加 2 mL 甲醇, 反应体系变澄清, 经质量分数为 5% 的冰-稀盐酸洗涤后用二氯甲烷萃取, 干燥浓缩得白色固体 **5** (11.8 g), 产率为 77%. m.p. 191~192 °C $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 26.3$ (*c* 0.5, DMSO); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.19~8.11 (m, 2H, ArH), 8.03~7.97 (m, 2H, ArH), 7.64~7.56 (m, 1H, ArH), 7.45 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArH), 7.11~7.05 (m, 2H, ArH), 6.36 (d, *J*=9.3 Hz, 1H, NH), 5.65~5.52 (m, 1H, H-3), 5.39 (d, *J*=8.3 Hz, 1H, H-1), 4.55 (dd, *J*=18.8, 9.3 Hz, 1H, H-2), 4.12~3.99 (m, 2H, H-4, H-6a), 3.89 (t, *J*=10.4 Hz, 1H, H-6b), 3.78~3.70 (m, 1H, H-5), 1.86 (s, 3H, CH_3CO), 1.51 (s, 3H, CMe-2a), 1.38 (s, 3H, CMe-2b); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.63, 165.47 (C=O), 161.74, 142.37, 133.51, 129.53, 128.80, 125.88, 116.87 (ArC), 99.57 (C, CMe₂), 98.06, 72.85, 71.30, 67.15, 61.33, 53.76, 28.94 (CH_3 , CH_3COO), 22.69 (CH_3 , CH_3COO), 19.14 (CH_3CO). HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 487.1711, found 487.1698.

3.2.6 2-乙酰氨基-3-*O*-苯甲酰基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**6**)的合成

将 8.5 g (17.5 mmol) 化合物 **5** 溶于 75 mL 冰醋酸和 50 mL 蒸馏水中, 60 °C 回流 3 h. TLC(展开剂为乙酸乙酯)检测反应完全. 用甲苯与反应体系共蒸除去乙酸和水, 再用乙酸乙酯溶解后浓缩, 得 9.5 g 棕黄色固体 **6** 的粗产物, 粗产物经柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=2:3] 分离纯化后得棕色固体 **6** (6.5 g), 产率 83%. m.p. 154~155 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 32.4$ (*c* 0.5, DMSO)[文献值:^[31] $[\alpha]_{\text{D}}^{22} + 29.3$ (*c* 0.5, 丙酮)]. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.25~8.15 (m, 2H, ArH), 8.04 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, OH), 7.97~7.89 (m, 2H, ArH), 7.64 (td, *J*=7.8, 4.0 Hz, 1H, ArH), 7.51 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, ArH), 7.26~7.17 (m, 2H, ArH), 5.54 (d, *J*=5.5 Hz, 1H, NH), 5.44 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, H-1), 5.22 (dd, *J*=10.3, 8.5 Hz, 1H, H-3), 4.73 (t, *J*=5.6 Hz, 1H, H-2), 4.23~4.03 (m, 1H, H-4), 3.75~3.69 (m, 1H, H-5), 3.67~3.48 (m, 3H, H-6a, H-6b, OH), 1.62 (s, 3H, CH_3CO); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.42, 165.66 (C=O), 162.07, 142.18, 133.28, 130.12, 129.47, 128.69, 125.90, 116.84 (ArC), 97.78, 77.22, 76.53, 67.70, 60.24, 53.34, 22.76 (CH_3CO). HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 447.1398, found 447.1397.

3.2.7 2-乙酰氨基-3,6-二-*O*-苯甲酰基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(**7**)的合成

将 7.0 g (15.7 mmol) 化合物 **6** 溶于 50 mL 无水二氯甲烷和 20 mL 无水吡啶中, -10 °C 氮气保护下, 缓慢滴加 20 mL 二氯甲烷和 2.2 mL (19.2 mmol) 苯甲酰氯混合溶液, -10 °C 反应 6 h. TLC [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)]=1:1] 检测反应完全, 加 5 mL 甲醇终止反应. 反应体系经质量分数为 5% 的冰盐酸洗涤后, 用二氯甲烷萃取, 有机相经饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后浓缩溶剂得 **7** 的粗产物, 将粗产物用乙酸乙酯重结晶得白色固体 **7** (6.7 g), 产率 78%. m.p. 235~237 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 23.8$ (*c* 0.5, DMSO); [文献值:^[31,35] m.p. 242~245 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} + 13.7$ (*c* 0.5, 丙酮)]; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.16 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, OH), 8.13~8.05 (m, 2H, ArH), 8.04~7.94 (m, 4H, ArH), 7.75~7.62 (m, 2H, ArH), 7.58~7.51 (m, 4H, ArH), 7.24 (d, *J*=9.3 Hz, 2H, ArH), 5.90 (d, *J*=6.1 Hz, 1H, NH), 5.56 (d, *J*=8.5 Hz, 1H, H-1), 5.38~5.23 (m, 1H, H-3), 4.64 (d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-6a), 4.44 (dd, *J*=12.0, 6.8 Hz, 1H, H-6b), 4.19 (dt, *J*=14.4, 7.9 Hz, 2H, H-2, H-4), 3.82~3.74 (m, 1H, H-5), 1.67 (s, 3H, CH_3CO); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.58, 165.67, 165.57 (C=O), 161.69, 142.14, 133.54, 133.33, 130.03, 129.70, 129.53, 129.40, 128.79, 128.69, 125.65, 116.83 (ArC), 97.39, 76.20, 74.03, 68.39, 63.75, 53.29, 22.76 (CH_3CO). HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 551.1660, found 551.1647.

将 6.4 g (11.6 mmol) 化合物 **7** 溶于 25 mL 无水二氯甲烷和 10 mL 无水吡啶混合溶剂中, -15 °C 氮气保护下, 缓慢滴加 20 mL 二氯甲烷和 5 mL 三氟甲磺酸酐冷的混合溶液, -15 °C 反应 1.5 h. TLC [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=1:1] 检测反应完全后, 反应体系经质量分数为 5% 的冰盐酸洗涤后, 用二氯甲烷萃取, 有机相经饱和碳酸氢钠和饱和食盐水洗涤后, 干燥浓缩得棕色泡沫状固体 **7.3** g, 直接进行下一步反应.

3.2.8 2-乙酰氨基-3,6-二-*O*-苯甲酰基-2-脱氧- β -D-半乳糖对硝基酚苷(**8**)的合成

将 7.3 g (10.7 mmol) 棕色泡沫状固体溶于 40 mL 干燥 DMF 中, 加 7.4 g (107 mmol) 亚硝酸钠, 0~25 °C 反应 16 h. TLC [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=1:1] 检测反应完全后, 用二氯甲烷萃取, 有机相用水洗涤, 干燥浓缩得棕色固体化合物 **8** 的粗产物, 将化合物 **8** 的粗产物用无水乙醇重结晶得白色粉状固体 **8** (4.8 g), 将粗产物 **8** 重结晶后的滤液经柱层析 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯): *V*(二氯甲烷)=2:2:1] 分离得 0.5 g 化合物 **8**, 合并化合物 **8** 共 5.3 g, 两步反应的总收率为 82%. m.p. 232~234 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 42.8$ (*c* 0.5, DMSO)[文献值:^[31] $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 39.4$ (*c* 0.5, 丙酮)]; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.10~7.90 (m, 7H, ArH, OH), 7.77~7.45 (m, 6H, ArH), 7.24~7.17 (m, 2H, ArH), 5.62 (d, *J*=5.8 Hz, 1H, NH), 5.47 (d, *J*=8.5 Hz, 1H, H-1), 5.07 (dd, *J*=11.1, 3.0 Hz,

1H, H-3), 4.68~4.32 (m, 4H, H-2, H-5, H-6a, H-6b), 4.22 (dd, $J=6.2, 3.2$ Hz, 1H, H-4), 1.72 (s, 3H, CH₃CO); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.77, 165.67, 165.57 (C=O), 161.80, 142.01, 133.55, 133.34, 129.70, 129.53, 129.41, 128.79, 128.69, 125.66, 116.76 (ArC), 97.83, 74.51, 72.87, 65.07, 63.85, 48.89, 22.92 (CH₃CO). HRMS calcd for C₂₈H₂₇N₂O₁₀ [M+H]⁺ 551.1660, found 551.1648.

3.2.9 2-乙酰氨基-3,6-二-O-苯甲酰基-2-脱氧-4-O-三氟甲磺酰基- β -D-吡喃半乳糖对硝基酚苷(9)的合成

将 0.55 g (1.0 mmol) 化合物 **8** 溶于 6 mL 无水二氯甲烷和 2 mL 无水吡啶混合溶剂中, -15 °C 氮气保护下, 逐滴滴加 5 mL 二氯甲烷和 0.25 mL 三氟甲磺酸酐的混合液, -15 °C 反应 1.5 h. TLC [*V*(石油醚):*V*(乙酸乙酯)]=1:1 检测反应完全后, 反应体系经质量分数 5% 的冰盐酸洗涤后, 用二氯甲烷萃取, 有机相经饱和碳酸氢钠溶液和饱和食盐水洗涤, 干燥浓缩得棕色泡沫状固体 0.62 g, 直接用于下一步反应.

3.2.10 2-乙酰氨基-S-(2-乙酰氨基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基)-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-二-O-苯甲酰基-2-脱氧-4-硫代- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(10)的合成

参考文献[30, 36]方法制备. 将 0.363 g (1.0 mmol) 的化合物 **2'** 溶于 10 mL 无水 DMF 中, 0 °C 下, 加入 40 mg NaH(矿物油中 60% 的含量) 反应 10 min, 加入 0.62 g (0.91 mmol) 化合物 **9** 和 1.0 g 分子筛, 氮气保护下, 反应 14 h. TLC [*V*(氯仿):*V*(乙醇)]=10:1 检测反应完全后, 将反应体系倒入含有饱和碳酸氢钠的冰水中, 生成浅黄色固体, 过滤, 将滤饼溶解在二氯甲烷和冰水的混合溶液中, 萃取得有机相, 有机相经无水硫酸钠干燥、浓缩后得浅黄色固体, 随后采用柱层析 [*V*(氯仿):*V*(乙醇)]=30:1 方法分离得白色固体 **10** (210 mg), 产率为 26%. m.p. 209~211 °C, [α]_D²⁵ +5.2 (*c* 0.5, DMSO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.15~7.00 (m, 14H, ArH), 6.07 (t, $J=10.6$ Hz, 1H, H-3), 5.90 (s, 1H, NHAc), 5.74 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, H-1), 5.59 (s, 1H, NHAc), 5.16~4.90 (m, 4H, H-1', H-3', H-4', H-6a), 4.70 (dd, $J=12.4, 6.6$ Hz, H-6b), 4.44~3.68 (m, 6H, H-2, H-2', H-5, H-5', H-6'a, H-6'b), 3.11 (s, 1H, H-4), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.93 (d, $J=7.7$ Hz, 2H), 1.51 (s, 2H), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.92 (s, 3H, NAc), 1.51 (s, 3H, NAc); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.56, 170.56, 170.08, 169.64, 168.93, 166.50, 165.60 (C=O), 160.95, 142.53, 133.79, 133.15, 129.64, 129.40, 129.27, 128.44, 128.36, 128.20, 125.28, 116.43 (ArC), 96.82 (CH,

C-1), 82.14 (CH, C-1'), 75.77, 74.20, 73.58, 68.72, 67.89 (CH, C-3, C-3', C-4', C-5, C-5'), 63.67, 62.08 (CH₂, C-6, C-6'), 56.83, 52.22 (2 $\times$ CH, C-2, C-2'), 46.39 (CH, C-4), 23.03, 22.34, 20.34, 20.26, 20.24 (CH₃CO). HRMS calcd for C₄₂H₄₆N₃O₁₇S [M+H]⁺ 896.2548, found 896.2556.

3.2.11 2-乙酰氨基-S-(2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-脱氧-4-硫代- β -D-吡喃葡萄糖对硝基酚苷(11)的合成

将 0.201 g (0.22 mmol) 的化合物 **10** 溶于 10 mL 浓甲胺溶液中, 室温反应 24 h. TLC [*V*(氯仿):*V*(乙醇)]=6:1 检测反应进行完全后, 减压抽滤得白色固体 **11** (0.102 g), 产率 81%. m.p. 215~217 °C, [α]_D²⁵ +2.6 (*c* 0.5, DMSO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.31~8.18 (m, 2H, ArH), 7.93 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, NHAc), 7.83 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, NHAc), 7.24~7.13 (m, 2H, ArH), 5.23 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-1), 5.10 (d, $J=21.0$ Hz, 3H, OH), 4.72 (d, $J=40.7$ Hz, 2H, OH), 4.59 (d, $J=10.3$ Hz, 1H, H-1'), 3.80 (dd, $J=18.1, 8.6$ Hz, H-2, H-2', H-3, H-3', H-4', 5H), 3.68~3.10 (m, 6H, H-5, H-5', H-6a, H-6b, H-6'a, H-6'b), 2.85 (dd, $J=14.7, 7.4$ Hz, 1H, H-4), 1.86 (s, 6H, 2 NAc); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.52, 169.49 (C=O), 162.32, 141.95, 125.88, 116.65 (ArC), 98.16 (CH, C-1), 82.75 (CH, C-1'), 80.95 (CH, C-5'), 77.29 (CH, C-5), 75.60 (CH, C-3'), 70.76 (CH, C-3), 70.76 (CH, C-4'), 61.85, 61.24 (CH₂, C-6, C-6'), 56.42, 55.23 (2 $\times$ CH, C-2, C-2'), 47.52 (CH, C-4), 23.16 (Ac). HRMS calcd for C₂₂H₃₁N₃O₁₂S [M+H]⁺ 562.1701, found 562.1709.

3.3 pNP-TCB 作为酶底物的性质研究

将 pNP-TCB, pNP-GlcNAc 和 pNP-(GlcNAc)₂ 溶于水配成 5 mmol/L 的底物贮备液; 将粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 和亚洲玉米螟 β -N-乙酰己糖胺酶 *O*fHex1 (EC 3.2.1.52) 配成浓度为 5 mU/mL 的酶缓冲体系 (pH 6.0). 将底物和 pH 6.0 的柠檬酸-磷酸缓冲溶液和酶依次分别添加至 96 孔酶标板中, 在 37 °C 条件下进行孵育一段时间, 用 5 mmol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 通过检测 405 nm 下的紫外吸收值来表征酶对底物的降解活性. 为了避免化合物本身可能产生的紫外吸收, 进行对照实验. 此部分实验参考文献 [37, 38] 方法进行.

首先分别移取 20, 40, 60, 80 μ L 的粘质沙雷氏菌几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 溶液加入到酶标板中, 依次加入 75, 55, 35, 15 μ L 的柠檬酸-磷酸缓冲溶液 (pH 6.0), 然后分别加入 5 μ L 浓度为 5 mmol/L 的 pNP-TCB 溶液, 对照组由 5 μ L 底物和 95 μ L 缓冲液 (pH 6.0) 组成, 在 37 °C 下孵育 30 min 后加 100 μ L 的 Na₂CO₃ (0.5 mol/L) 溶液终止反

应, 用酶标仪在 405 nm 波长下进行紫外吸收值的测定. 每个活性测定实验重复三次.

3.4 pNP-TCB 底物的专一性研究

3.4.1 粘质沙雷氏菌几丁质酶(EC 3.2.1.14)对不同底物的降解活性

首先在酶标板中加入 45 μL 的柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 6.0), 然后依次分别加入 5 μL 的 pNP-TCB、pNP-(GlcNAc)₂ 和 pNP-GlcNAc, 最后分别加入 50 μL 的粘质沙雷氏菌几丁质酶溶液. 对照组为相同底物浓度的柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 6.0). 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h 后, 加 100 μL 的 Na_2CO_3 (0.5 mol/L) 溶液终止反应, 用酶标仪在 405 nm 波长下测定相应的紫外吸收值. 每个活性测定实验重复三次.

3.4.2 亚洲玉米螟 *OfHex1* 酶(EC 3.2.1.52)对不同底物的降解活性

本实验所用的实验方法与 3.4.1 节中的实验方法一致.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **2** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 谱图, 化合物 **2'**, **3~11** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 和 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Lai, K. P. *Pharm. Today* **2009**, 19, 14 (in Chinese). (赖坤平, 今日药学, **2009**, 19, 14.)
- [2] Zhu, K. Y.; Merzendorfer, H.; Zhang, W. *Annu. Rev. Entomol.* **2016**, 61, 177.
- [3] Zechmeister, L.; Toth, G. Z. *Physiol. Chem.* **1934**, 223, 53.
- [4] Liu, T. *Ph.D. Dissertation*, Dalian University of Technology, Dalian, **2009** (in Chinese). (刘田, 博士论文, 大连理工大学, 大连, **2009**.)
- [5] Dahiya, N.; Tewari, R.; Hoondal, G. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71485, 773.
- [6] Alton, M. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1987**, 59, 59.
- [7] Liu, T.; Chen, L.; Ma, Q.; Shen, X.; Yang, Q. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, 20, 754.
- [8] Macdonald, J. M.; Tarling, C. A.; Taylor, E. J.; Dennis, R. J.; Myers, D. S.; Knapp, S.; Davies, G. J.; Withers, S. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 2599.
- [9] Chen, L.; Liu, T.; Duan, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 3851.
- [10] Schüttelkopf, A. W.; Andersen, O. A.; Rao, F. V. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 428.
- [11] Dong, L. L.; Shen, S. Q.; Chen, W.; Lu, H. Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 2135.
- [12] Shen, S. Q.; Chen, W.; Dong, L. L. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, 33, 445.
- [13] Shen, S. Q.; Dong, L. L.; Chen, W. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67, 6387.
- [14] Boller, T.; Mauch, F. *Methods Enzymol.* **1988**, 161, 430.
- [15] Ohtakara, A. *Methods Enzymol.* **1988**, 161, 426.
- [16] Cabib, E. *Methods Enzymol.* **1988**, 161, 424.
- [17] Koga, D.; Yoshioka, T. *Agric. Biol. Chem.* **1998**, 62, 1643.
- [18] Zhou, J. S.; Chen, L. L.; Kang, L. Q.; Liu, Z. H.; Yuan, S. J. *Agric. Food Chem.* **2018**, 66, 12773.
- [19] Duivenvoorden, B. A.; Ghauharali, K.; Scheij, S. *Carbohydr. Res.* **2014**, 399, 26.
- [20] Dong, L. L.; Shen, S. Q.; Lu, H. Z.; Jin, S. H.; Zhang, J. J. *ACS Sens.* **2019**, 45, 1222.
- [21] Krolicka, M.; Hinz, S. W. A.; Koetsier, M. J. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66, 1658.
- [22] Van, Munster, J. M.; Dobruchowska, J. M.; Veloo, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 2209.
- [23] Wang, S.; Moyne, A. L.; Thottappilly, G.; Wu, S. J.; Locy, R. D.; Singh, N. K. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 28, 492.
- [24] Rich, J. R.; Dr, A. S.; Dr, M. M. P. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 623.
- [25] Driguez, H. *ChemBioChem* **2001**, 2, 311.
- [26] Xu, Y. R.; Zhang, J. J.; Dong, Y. H.; Tan, W. M. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 2929 (in Chinese). (许一仁, 张建军, 董燕红, 谭伟明, 有机化学, **2017**, 37, 2929.)
- [27] Jiang, R.; Zong, G.; Liang, X.; Jin, S.; Zhang, J.; Wang, D. *Molecules* **2014**, 19, 6683.
- [28] Jiang, R.; Liang, X. M.; Sun, J.; Zhang, J. J.; Wang, D. Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, 34, 926 (in Chinese). (姜锐, 梁晓梅, 孙晋, 张建军, 王道全, 有机化学, **2014**, 34, 926.)
- [29] Wang, J. Y.; Jiang, R.; Liang, X. M.; Wang, D. Q.; Zhang, J. J. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 375 (in Chinese). (王家尧, 姜锐, 梁晓梅, 王道全, 张建军, 有机化学, **2017**, 37, 375.)
- [30] Wang, L. X.; Lee, Y. C. *J. Chem. Soc.* **1996**, 27, 581.
- [31] Chen, H. M.; Withers, S. G. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 2212.
- [32] Davis, B. G. *EP 1644390* **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, 142, 94064].
- [33] Chupakhina, T. A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, 30, 301.
- [34] Loft, K. J. *ChemBioChem* **2009**, 10, 565.
- [35] Nikolaev, A. V.; Ivanova, I. A.; Shibaev, V. N. *Bioorg. Khim.* **1990**, 16, 1693.
- [36] Fettke, A.; Peikow, D.; Peter, M. G. *Tetrahedron* **2009**, 65, 4356.
- [37] Nawani, N. N.; Kapadnis, B. P. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, 90, 803.
- [38] Nguyen, H. A.; Nguyen, T. H. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 3475.

(Lu, Y.)