糖苷酶底物 6-氯-4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸苷的合成

田加蒙 宁倩倩 丁海新* 柏江 肖强*

(江西科技师范大学有机功能分子研究所 江西省有机功能分子重点实验室 南昌 330013)

摘要 为了开发用于粘多糖贮积症 I 型疾病检测的 α -L-艾杜糖醛酸荧光酶底物, 以廉价易得的葡萄糖酸内酯为起始原料合成 1,2,3,4-四-O-乙酰基- β -D-葡萄糖醛酸甲酯, 经过自由基溴代及自由基还原合成 1,2,3,4-四-O-乙酰基- α -L-艾杜糖醛酸甲酯, 以 Mitsunobu 反应为关键步骤合成糖苷键, 最后脱除保护基团得到 6-氯-4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸苷. 用单晶衍射确证了关键中间体的结构, 初步的酶学测试证明该底物可用于 α -L-艾杜糖醛酸酶活性的快速检测.

关键词 α -L-艾杜糖醛酸酶; 荧光酶底物; Mitsunobu 反应; 糖苷化; 自由基反应

Synthesis of Enzyme Substrate 6-Chloro-4-methylumbelliferyl- α -L-idopyranosiduronic Acid

Tian, Jiameng Ning, Qianqian Ding, Haixin* Bai, Jiang Xiao, Qiang*

(Jiangxi Key Laboratory of Organic Chemistry, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013)

Abstract In order to develop fluorogenic enzyme substrate for quick diagnosis of mucopolysaccharidosis type I, 6-chloro-4-methylumbelliferyl- α -L-idopyranosiduronic acid was synthesized from commercially available D-glucurono-6,3-lactone. Firstly, 1,2,3,4-tetra-O-acetyl- β -D-glucuronate methyl ester was brominated and subsequently reduced with radical reaction to give 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-L-idopyranuronate methyl ester. Then 6-chloro-4-methylumbelliferyl- α -L-idopyranosiduronic acid was synthesized using Mitsunobu reaction as the key step. The related structures of key intermediates were confirmed with X-ray crystallography. The preliminary biological test proved that the synthesized enzyme substrate could be used for quick detection of α -L-iduronidase.

Keywords α -L-iduronidase; fluorogenic enzyme substrate; Mitsunobu reaction; glycosylation; radical reaction

粘多糖贮积症 I 型(Mucopolysaccharidoses type I, MPS I)是一种常见染色体隐性遗传疾病, 又称 Hurler 综合征, 其发病原因是由于病人先天性缺陷或者缺失表达 α -L-艾杜糖醛酸酶(EC 3.2.1.76)的基因, 从而导致不能有效降解体内的糖胺聚糖(GAGS)硫酸肝素和硫酸皮肤素^[1]. 严重的 MPSI 疾病主要表现为儿童身材矮小、耳聋、骨骼畸形和严重的智力障碍等症状, 多数病人会在 20 岁前死亡. 因此胎儿的 α -L-艾杜糖醛酸酶活性测定是具有遗传史家庭产前诊断的必检项目, 同时也是诊断 MPS I 疾病的重要手段之一^[2].

荧光糖苷酶底物是测定糖苷酶活性的重要方法, 具有操作简单、灵敏度高、特异性强和价格便宜的优点, 在

临床疾病检测中得到了广泛的应用^[3]. 早在 1972 年, Weissmann 等^[4]就合成了苯基-O- α -L-艾杜糖醛酸苷, 并成功用于 α -L-艾杜糖醛酸酶的活性测定. 该糖苷酶底物在 α -L-艾杜糖醛酸酶水解下释放出苯酚, 进一步与福林酚试剂(Folin Phenol Reagent)反应后进行光谱测定, 实验操作繁琐, 灵敏度较低. 之后 Stirling 等^[5]报道了 4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸苷 **1**, 该底物在 α -L-艾杜糖醛酸酶水解下释放出荧光团 4-甲基伞形酮(MU), 然后通过荧光光谱测定 α -L-艾杜糖醛酸酶的活性. 目前该底物在临床上已经被广泛用于检测 α -L-艾杜糖醛酸酶活性^[6], 但是该底物的价格十分昂贵, 测定时间也较长, 因此有必要进一步开发新型的糖苷酶底物. 在本文中, 我们设

* Corresponding authors. E-mail: dinghaixin_2010@163.com; xiaoqiang@tsinghua.org.cn

Received August 5, 2019; revised September 4, 2019; published online September 25, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21676131, 21462019), the Bureau of Science & Technology of Jiangxi Province (No. 20143ACB20012) and the Doctor Startup Fund of Jiangxi Science & Technology Normal University (No. 2018BSQD022).

国家自然科学基金(Nos. 21462019, 21676131)、江西省科技厅重点(No. 20143ACB20012)和江西科技师范大学博士启动基金(No. 2018BSQD022)资助项目.

计并合成了一种新的糖苷酶底物 6-氯-4-甲基伞形酮- α -L-艾杜醛酸苷 **2**, 由于 6-位氯原子的吸电子作用, 预期该糖苷酶底物具有更快的酶水解速度和更高的荧光效率^[7].

图1 荧光酶底物 α -L-艾杜醛酸苷 **1** 和 **2** 的化学结构

Figure 1 Chemical structure of α -L-idopyranosiduronic acid **1** and **2** as fluorogenic enzyme substrate

目前 α -L-艾杜糖醛酸糖苷酶底物的合成主要面临两个方面的挑战, 首先 α -L-艾杜糖醛酸无法从自然界直接获得, 其制备主要是以 D -葡萄糖为起始原料, 需要经过复杂的化学转换合成得到, 非常耗时, 导致合成成本很高^[8]. 在生物体内艾杜糖醛酸片段的合成是在 C-5 异构酶的作用下由葡萄糖醛酸直接在 C-5 位异构化得到的, 因此酶催化也是获取 α -L-艾杜糖醛酸的一条重要途径, 文献报道相关工作主要是围绕抗血栓药物磺达肝葵钠 (Fondaparinux sodium) 的合成进行^[9]. 另外一种相对比较简洁的化学合成方法是通过 1,2,3,4-四- O -乙酰基- D -葡醛酸甲酯的 5 位选择性溴代, 然后进一步自由基还原得到 1,2,3,4-四- O -乙酰基- D -葡醛酸甲酯和 1,2,3,4-四- O -乙酰基- α -L-艾杜糖醛酸甲酯的混合物, 分离较为困难且产率较低, 但仍然是最便捷的方法之一^[10], 本文采用该方法.

其次, α -糖苷键的构建是合成 α -L-艾杜糖醛酸糖苷底物的关键步骤, 同时也是最为困难的步骤. 最早报道是通过氯化锌催化熔融法合成得到芳基- O -L-艾杜糖苷的 α 和 β 混合物, 分离困难, 同时产率低于 25%. 然后在氧化铂催化下, 用氧气选择性氧化 5 位伯羟基得到目标产物 α -L-艾杜糖醛酸糖苷底物, 产率低于 20%. 该路线已不具备实际应用价值^[11]. 2013 年洪上程等首次报道了以 Mitsunobu 糖苷化反应构建 α -L-艾杜糖醛酸糖苷键合成糖苷酶底物 **2** (73%, $\alpha/\beta=1.7/1$), 反应条件温和. 虽然该方法选择廉价的双丙叉葡萄糖为原料, 但是需要经过 8 步反应构建糖基给体, 反应步骤长, 且涉及复杂的氧化、还原等步骤^[12].

综合上述文献报道, 本文选择以商业上可以大量获取的葡醛酸内酯 **3** 为起始原料, 合成糖给体 2,3,4-三- O -乙酰基- α -L-艾杜糖醛酸甲酯 **8**, 以 Mitsunobu 反应构建糖苷键为关键步骤, 合成新设计的糖苷酶底物 **2**.

1 结果与讨论

首先以廉价易得的葡醛酸内酯 **3** 为起始原料 (Scheme 1), 以无水甲醇为溶剂, 在催化量氢氧化钠 (NaOH) 的作用下, 化合物 **3** 的环内酯打开形成甲酯, 减压蒸除溶剂之后, 产物不经分离直接用醋酸酐进行乙酰化, 重结晶后即可得到全乙酰化 β -D-葡醛酸甲酯 **4**, 两步总收率 45%, 该化合物可以顺利在 100 克级别上制备^[13]. 然后以新蒸的四氯化碳为溶剂, 在高压汞灯的光照下用 N -溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 对葡醛酸甲酯 **4** 的 5 位进行选择性溴代^[14], 柱层析后重结晶, 以 72% 产率得到 5-溴代葡醛酸甲酯 **5**. 该反应在光照加热回流时温度不宜太高, 保持反应体系温和回流即可, 否则会导致底物发生碳化, 从而影响反应的产率. 在相关文献报道中, 溴代的立体构型是通过核磁共振确定, 在重结晶的过程中, 首次得到了化合物 **5** 的单晶衍射结构 (图 2, CCDC 1944776), 从而完整确证了 5 位碳原子的立体化学. 从化合物 **5** 的单晶衍射结构可以看出, 溴原子与 1 位的乙酰基处于反式构象, 同时 C—Br 键的键长为 0.1966 nm, 预示其具有较高的反应活性.

图式 1 2,3,4-三- O -乙酰基- α -L-艾杜糖醛酸甲酯 (**8**) 的合成

Scheme 1 Preparation of 2,3,4-tri- O -acetyl- α -L-idopyranuronate methyl ester (**8**)

接着尝试自由基还原去除 5 位溴原子, 根据文献报道的条件^[15], 以偶氮二异丁腈 (AIBN) 为引发剂, 用三丁基锡氢 (Bu_3SnH) 作还原剂, 反应结果较为复杂, 分离纯化困难. 经过条件优化, 发现在稀 AIBN 溶液 (0.07 mmol/mL) 可以得到较好的还原结果, 同时发现反应结束后, 得到的粗产物中未反应的原料 **4** 可以通过乙醇重结晶除去, 再进一步柱层析得到全乙酰化 α -L-艾杜糖醛酸甲酯 **6**, 产率 32%. 对于该还原反应步骤, 文献报道

的产率相差较大, 从 22%~53%不等, 通过多次重复, 基本维持在 30%上下. 然后化合物 **6** 在 33% 溴化氢的醋酸溶液中发生溴代, 高产率地得到溴代糖 **7**, 该化合物不稳定. 洪上程等^[12]用三氟甲磺酸银水解溴代糖 **7** 得到糖给体 **8**, 我们优化后发现在丙酮和水混合溶剂中, 以碳酸银作为缚酸剂催化水解, 高产率地得到糖给体 **8**, 两步合并产率为 89% ($\alpha : \beta = 1 : 0.6$).

图 2 5(R)-溴-1,2,3,4-四-O-乙酰基- β -D-葡萄糖醛酸甲酯(**5**)的晶体衍射结构

Figure 2 X-ray crystal structure of 5(R)-bromo-1,2,3,4-tetra-O-acetyl- β -D-glucuronate methyl ester (**5**)

在顺利得到糖给体 **8** 后, 我们接着尝试采用 Mitsunobu 糖苷化反应^[16]构建 L -艾杜糖醛酸糖苷键, 其中 6-氯-7-羟基-4-甲基伞形酮 **9** 通过改良的 Pechmann 缩合反应得到^[17]. 在新蒸的无水四氢呋喃(THF)中, 糖给体 **8** 和伞形酮 **9** 在三苯基膦(PPh_3)和偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)作用下, 以 72% 产率偶联得到化合物糖苷 **10** (α/β , 3/2), 实验结果表明 DIAD 的效果优于偶氮二甲酸二乙酯(DEAD). 化合物 **10** 的 α 和 β 异构体采用多种溶

剂体系(乙酸乙酯/石油醚、乙酸乙酯/正己烷、丙酮/石油醚等), 始终无法通过常规的硅胶柱层析分离. 最后, 先选择在催化量甲醇钠作用下脱除化合物 **10** 上的乙酰基, 之后用高效液相色谱(HPLC)顺利分离得到 β 异构体 **11** 和 α 异构体 **12**, 然后进一步在氢氧化钠溶液中水解甲酯, 酸化后成功得到目标产物 α -L-艾杜糖醛酸糖苷底物 **2** 及其 β 异构体 **13** (Scheme 2). 值得注意的是, 糖苷酶底物 **2** 和 β 异构体 **13** 的核磁共振谱图非常相似. 同时所有相关文献中, 糖苷酶底物 **1** 的核磁共振碳谱始终未见报道, 给我们的结构确证带来了很大的困难. 幸运的是, 将 α -L-艾杜糖醛酸糖苷 **12** 重新乙酰化回到化合物 **10a**, 得到了单晶衍射结构(图 3, CCDC 1944777), 从而完整地对相关核磁共振数据进行了指认, 作为相关 L -艾杜糖醛酸糖苷结构核磁共振数据归属的参考.

图 3 2,3,4-三-O-乙酰基- α -L-艾杜糖醛酸甲酯(**10a**)的晶体衍射结构

Figure 3 X-ray crystal structure of methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-idopyranosiduronic ester (**10a**)

最后用商业化的 α -L-艾杜糖醛酸酶分别测定了 α -L-艾杜糖醛酸糖苷底物 **2** 及其异构体 **13** 的酶水解反应(图 4). 结果表明 α -L-艾杜糖醛酸糖苷底物 **2** 能够顺利被分

图式 2 6-氯-4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸苷 **2** 的合成

Scheme 2 Synthesis of 6-chloro-4-methylumbelliferyl- α -L-idopyranosiduronic acid **2**

解,产生显著的荧光增强,而其 β 异构体 **13** 不会发生酶水解反应,从而进一步确证了 *L*-艾杜糖醛酸苷结构指认的正确性,并初步证明新设计合成的糖底物 **2** 的潜在应用性.进一步的临床样品测定,以及与商业化糖苷酶底物 **1** 的完整性能比较试验正在进一步进行中.

图4 α -*L*-艾杜糖醛酸酶对艾杜糖醛酸苷 **2** 和 **13** 的水解反应
Figure 4 α -*L*-iduronidase hydrolysis of *L*-idopyranosiduronic acid **2** and **13**

2 结论

总之,本文以廉价易得的葡醛酸内酯 **3** 为起始原料,通过对 1,2,3,4-*O*- β -*D*-葡醛酸甲酯 **4** 进行自由基溴代和自由基还原得到 α -*L*-艾杜糖醛酸酯 **6**,然后以 Mitsunobu 糖苷化反应为关键步骤合成得到 6-氯-4-甲基伞形酮- α -*L*-艾杜糖醛酸苷.关键中间体 **5** 和 **10a** 得到了单晶衍射结构确证,初步的酶学测试证明该底物可用于 α -*L*-艾杜糖醛酸酶活性的快速检测.虽然合成的总产率较低,但仍然是一条开发合成 α -*L*-艾杜糖醛酸糖苷酶底物的简洁方法,可以用于类似结构 α -*L*-艾杜糖醛酸糖苷酶底物的合成.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AV400 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司); AB SCIEX Triple TOF 4600 型高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Autopol IV-T A21200-T 型全自动数字式旋光仪(美国 Rudolph 公司); M-560 熔点测定仪(BUCHI 公司); Waters 2545 高效液相色谱仪; Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪.分析纯甲苯(PhMe)加入氢化钙回流 3 h,使用前蒸出;分析纯四氢呋喃(THF)加入四氢铝锂回流 3 h,使用前蒸出.超干甲醇(MeOH)购自灵威科技有限公司;所用常规试剂均购自北京伊诺凯科技有限公司;所用 α -*L*-艾杜糖醛酸酶购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司.

3.2 实验方法

3.2.1 1,2,3,4-*O*-乙酰基- β -*D*-葡萄糖醛酸甲酯(**4**)的合成

氩气保护下,将 NaOH (200 mg, 0.5 mmol)加入到 500 mL 甲醇中,剧烈搅拌 20 min 使其完全溶解.用冰浴冷却至 0 °C,在 30 min 内分批加入 *D*-葡醛内酯 **3** (50 g, 0.28 mol).化合物 **3** 完全溶解后,减压旋蒸除去溶剂,得到浅黄色泡沫状固体,真空干燥 2 h 以除去残留的甲醇.向装有浓缩物的烧瓶中加入乙酸酐(540 g, 500 mL)和无水乙酸钠(95 g, 0.116 mol),于氩气保护下将混合物加热至 90 °C 反应 1.5 h.冷却后将浅棕色反应液倒入冰水中,分批加入碳酸氢钠调节至中性,反应液用二氯甲烷萃取(600 mL $\times$ 2),有机相再依次使用去离子水(300 mL $\times$ 3)、饱和碳酸氢钠溶液(300 mL $\times$ 3)、饱和食盐水(300 mL $\times$ 2)洗涤,无水硫酸镁干燥.滤液减压浓缩,浓缩物用无水乙醇重结晶得到白色针状晶体 **4** (48 g, 45%). m.p. 170~172 °C(文献值^[13]: 175~177 °C); $[\alpha]_D^{25} + 13.2$ (*c* 0.072, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.02 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 5.51 (t, *J*=9.5 Hz, 1H), 5.12~4.90 (m, 2H), 4.68 (d, *J*=9.8 Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.9, 169.8, 169.5, 169.2, 167.4, 91.1, 71.8, 71.3, 70.3, 69.3, 53.1, 20.9, 20.8, 20.7 (C $\times$ 2); HRMS calcd for C₁₅H₂₁O₁₁ [M+H]⁺ 377.1078, found 377.1083.

3.2.2 (5*R*)-1,2,3,4-*O*-乙酰基-5-*C*-溴- β -*D*-葡萄糖醛酸甲酯(**5**)的合成

化合物 **4** (1.00 g, 2.66 mmol)溶于 20 mL 四氯化碳中,加入 NBS (0.57 g, 3.19 mmol)后,在高压汞灯(275 W)光照条件下加热回流 4 h.经薄层色谱(TLC)监测原料反应完全后,减压旋干四氯化碳,加入二氯甲烷(40 mL)溶解,依次使用去离子水(50 mL $\times$ 3)、饱和碳酸氢钠溶液(50 mL $\times$ 3)、饱和食盐水(50 mL $\times$ 2)洗涤,无水硫酸镁干燥.滤液减压浓缩,浓缩物采用无水乙醇重结晶得到白色固体 **5** (0.93 g, 72%). m.p. 160~161 °C(文献值^[14a] 159~161 °C); $[\alpha]_D^{25} - 85.2$ (*c* 0.061, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.12~6.10 (m, 1H), 5.59~5.57 (m, 1H), 5.38~5.36 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.03 (d, *J*=2.3 Hz, 6H), 1.98 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.9, 169.3, 169.0, 168.9, 164.4, 90.8, 90.5, 70.5, 69.4, 68.5, 54.5, 20.8 (C $\times$ 2), 20.7, 20.6; HRMS calcd for C₁₅H₂₀BrO₁₁ [M+H]⁺ 455.0184, found 454.0182.

3.2.3 1,2,3,4-四-*O*-乙酰基- α -*L*-艾杜糖醛酸甲酯(**6**)的合成

化合物 **5** (2.00 g, 3.53 mmol) 溶解于无水甲苯(50 mL)中, 缓慢加入 AIBN (0.26 g 溶于 80 mL 甲苯中, 浓度为 2%) 和 Bu_3SnH (1.58 mL, 3.53 mmol), 氩气保护下于 110 °C 回流 1.5 h. 经 TLC 监测反应完全后, 冷却至室温, 直接减压浓缩, 粗产物用乙醇结晶除去大部分化合物 **4**, 残余物通过硅胶柱层析分离纯化得到白色固体 **6** (533 mg, 32%). m.p. 123~124 °C (文献值^[10b] 125~126 °C); $[\alpha]_D^{25} -67.9$ (*c* 0.056, CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.05 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 5.08 (t, $J=3.3$ Hz, 1H), 4.98~4.96 (m, 2H), 4.81~4.80 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.7, 169.5, 169.3, 169.0, 167.8, 90.3, 68.3, 67.0, 66.0, 65.6, 52.8, 21.1, 21.0 ($\text{C}\times 2$), 20.8; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 377.1078, found 377.1083.

3.2.4 2,3,4-三-*O*-乙酰基-*L*-艾杜糖醛酸甲酯(**8**)的合成

化合物 **6** (500 mg, 1.1 mmol) 加入在冰水中冷却 20 min 的 33% 的溴化氢的醋酸溶液(5 mL)中, 冰浴条件下搅拌 0.5 h 后, 自然升至室温继续搅拌 3 h. TLC 监测反应完全后, 用二氯甲烷(30 mL)溶解, 倒入冰水中搅拌 20 min. 有机相依次使用冰水(20 mL $\times$ 3)、饱和碳酸氢钠溶液(20 mL $\times$ 3)、饱和食盐水(20 mL $\times$ 2)洗涤, 无水硫酸镁干燥, 滤液减压浓缩得到粗产物 **7**. 室温下取化合物 **7** (100 mg, 0.252 mmol) 溶于 75% 的丙酮水溶液(4 mL)中, 加入碳酸银(83 mg, 0.30 mmol)搅拌 2 h. 通过 TLC 监测反应完全, 反应混合物通过硅藻土过滤, 将滤液减压浓缩得到粗产物, 经硅胶柱层析分离纯化得到油状产物 **8** (75 mg, $\alpha:\beta=1:0.6$; 89%). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.15 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 5.17 (dd, $J=5.3, 3.7$ Hz, 1H), 5.09~4.97 (m, 2H), 4.91 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 4.69~4.67 (q, $J=7.1$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.04~2.01 (m, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.8, 169.6, 169.0 ($\text{C}\times 2$), 92.3, 69.1, 68.0, 67.5, 67.1, 52.6, 21.0 ($\text{C}\times 2$), 20.8; HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 335.0973, found 335.0976.

3.2.5 4-甲基-6-氯香豆素-7-基-2,3,4-三-*O*-乙酰基-*L*-艾杜糖醛酸甲酯(**10**)的合成

化合物 **8** (500 mg, 1.50 mmol)、4-甲基-6-氯-7-羟基香豆素(**9**) (466 mg, 2.21 mmol)、三苯基膦(PPh_3 , 580 mg, 2.21 mmol) 依次加入无水四氢呋喃(10 mL)中. 室温下搅拌 1 h 后, 冰浴条件下加入 DIAD (446 mg, 2.21 mmol) 搅拌 0.5 h, 自然升至室温后搅拌过夜. 经 TLC 监测反应

完全, 减压旋干四氢呋喃, 浓缩物溶于二氯甲烷(20 mL)中, 依次使用饱和碳酸氢钠溶液(20 mL $\times$ 3)、稀氢氧化钠溶液(20 mL $\times$ 3)、饱和食盐水洗涤(20 mL $\times$ 2), 无水硫酸镁干燥. 滤液减压旋干得粗产物, 通过硅胶柱层析分离得到白色固体 **10** (564 mg, $\alpha:\beta=3:2$; 72%).

3.2.6 4-甲基-6-氯香豆素-7-基-*L*-艾杜糖醛酸甲酯(**11**和**12**)的合成

化合物 **10** (100 mg, 0.190 mmol) 悬浮于超干甲醇中, 加入 0.35 mL 甲醇钠溶液(500 mg 钠溶于 20 mL 超干甲醇中), 先冰浴 0.5 h 后恢复室温搅拌 4 h. 经 TLC 监测反应完全, 加入冰醋酸(34 mg, 0.57 mmol)超声混合均匀, 减压浓缩得到粗产物. 将其通过硅胶柱层析分离纯化得到白色固体 **11** 和 **12** 的混合物(70 mg, 92%). 混合物再经高效液相色谱仪分离制备, 分别得到化合物 **11** (β 构型, 25 mg) 和化合物 **12** (α 构型, 47 mg).

β 构型 **11**: m.p. 137~139 °C; $[\alpha]_D^{25} +127.1$ (*c* 0.048, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.87 (s, 1H, H-5), 7.45 (s, 1H, H-8), 6.33 (s, 1H, H-3), 5.74 (d, $J=3.4$ Hz, 1H, OH-2'), 5.54 (s, 1H, H-1'), 5.27 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, OH-3'), 5.17 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, OH-4'), 4.99 (s, 1H, H-5'), 3.94 (d, $J=3.7$ Hz, 1H, H-3'), 3.80 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.75 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, H-2'), 3.66 (s, 3H, H-7'), 2.42 (s, 3H, 4- CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 169.4 (C-6'), 160.1 (C-2), 154.9 (C-7), 153.3 (C-6), 153.0 (C-9), 126.4 (C-5), 118.6 (C-4), 115.3 (C-10), 113.2 (C-3), 104.5 (C-8), 97.3 (C-1'), 74.7 (C-5'), 70.0 (C-4'), 69.9 (C-3'), 69.3 (C-2'), 52.0 (C-7'), 18.5 (4- CH_3); HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClO}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401.0634, found 401.0639.

α 构型 **12**: m.p. 112~114 °C; $[\alpha]_D^{25} -130.9$ (*c* 0.055, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.84 (s, 1H, H-5), 7.39 (s, 1H, H-8), 6.32 (d, $J=1.7$ Hz, 1H, H-3), 5.76 (d, $J=3.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.58 (d, $J=5.4$ Hz, 1H, OH-2'), 5.39~5.37 (m, 2H, OH-3', OH-4'), 4.70 (d, $J=3.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.87~3.83 (m, 1H, H-4'), 3.69~3.63 (m, 5H, H-2', H-3', H-7'), 2.40 (s, 3H, 4- CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 170.3 (C-6'), 160.1 (C-2), 154.9 (C-7), 153.3 (C-9), 153.1 (C-6), 126.6 (C-5), 119.2 (C-4), 115.4 (C-10), 113.3 (C-3), 104.8 (C-8), 100.4 (C-1'), 72.3 (C-5'), 71.9 (C-2'), 70.9 (C-3'), 70.5 (C-4'), 52.3 (C-7'), 18.6 (4- CH_3); HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClO}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401.0634, found 401.0639.

3.2.7 4-甲基-6-氯香豆素-7-基- β -*L*-艾杜糖醛酸(**13**)的合成

化合物 **11** (20 mg, 49.90 μmol) 溶于混合溶剂(1.1 mL, $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, $V:V=10:1$) 中, 于 -10 °C 加入 60 μL

氢氧化钠溶液(24 mg NaOH 溶于 600 μ L H₂O), 反应液冰浴下继续搅拌 2 h. 经 TLC 监测反应完全后, 加入阳离子树脂调至 pH 为 6~7, 低温旋蒸除去 THF, 冷冻干燥得到白色固体 **13** (17 mg, 92%). m.p. 195~197 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 120.0$ (*c* 0.025, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.83 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.31 (d, *J*=3.7 Hz, 1H), 4.73 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.86~3.89 (m, 1H), 3.57~3.62 (m, 3H), 2.41 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 168.5, 160.2, 155.9, 153.2 (C $\times$ 2), 126.2, 118.8, 114.9, 112.9, 104.7, 98.6, 75.7, 70.5, 70.3, 70.1, 18.6; HRMS calcd for C₁₆H₁₆ClO₉ [M+H]⁺ 387.0477, found 387.0484.

3.2.8 4-甲基-6-氯香豆素-7-基- α -L-艾杜糖醛酸(**2**)的合成

取化合物 **12** 按照制备化合物 **13** 的方法, 合成得到白色固体 **2** (18 mg, 93%). m.p. 185~187 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 38.9$ (*c* 0.018, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.53 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.57 (d, *J*=6.2 Hz, 1H), 5.22 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 4.04 (d, *J*=5.7 Hz, 1H), 3.25 (m, 3H), 2.40 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 172.4, 160.3, 155.9, 153.6, 153.0, 125.9, 117.9, 114.6, 112.8, 105.4, 98.0, 75.1, 73.3, 73.0, 71.4, 18.5; HRMS calcd for C₁₆H₁₆ClO₉ [M+H]⁺ 387.0477, found 387.0482.

辅助材料(Supporting Information) 目标化合物 6-氯-4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸(**2**), 中间体化合物 **4**~**6**、**8**、**10**~**13** 的核磁共振图谱以及化合物 **5**, **10a** 的单晶衍射数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] (a) Muenzer, J. J. *Pediatr.* **2004**, *144*, S27.
(b) Bach, G.; Friedman, R.; Weissmann, B.; Neufeld, E. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 2048.
- [2] (a) Galimberti, C.; Madeo, A.; Di Rocco, M.; Fiumara, A. *Italian J. Pediatr.* **2018**, *44*.
(b) Matern, D.; Gavrilou, D.; Oglesbee, D.; Raymond, K.; Rinaldo, P.; Tortorelli, S. *Semin. Perinatol.* **2015**, *39*, 206.
- [3] (a) Burke, H. M.; Gunnlaugsson, T.; Scanlan, E. M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10576.
(b) Wysocki, L. M.; Lavis, L. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 752.
- [4] (a) Weissmann, B.; Santiago, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 1430.
(b) Liem, K. O.; Hooghwinkel, G. J. *Clin. Chim. Acta* **1975**, *60*, 259.
- [5] (a) Stirling, J. L.; Robinson, D.; Fensom, A. H.; Benson, P. F.; Baker, J. E.; Button, L. R. *Lancet* **1979**, *2*, 37.
(b) Hopwood, J. J.; Muller, V.; Smithson, A.; Baggett, N. *Clin. Chim. Acta* **1979**, *92*, 257.
(c) Butterworth, J.; Broadhead, D. M. *J. Inherited Metab. Dis.* **1980**, *2*, 71.
- [6] (a) Mandelli, J.; Wajner, A.; Pires, R. F.; Giugliani, R.; Coelho, J. C. *Arch. Med. Res.* **2002**, *33*, 20.
(b) Sista, R. S.; Wang, T.; Wu, N.; Graham, C.; Eckhardt, A.; Winger, T.; Srinivasan, V.; Bali, D.; Millington, D. S.; Pamula, V. K. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *424*, 12.
- [7] (a) Perry, J. D.; James, A. L.; Morris, K. A.; Oliver, M.; Chilvers, K. F.; Reed, R. H.; Gould, F. K. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 977.
(b) Briciu-Burghina, C.; Heery, B.; Regan, F. *Analyst* **2015**, *140*, 5953.
(c) Nasser, S. A.; Betschart, L.; Opaleva, D.; Rahfeld, P.; Withers, S. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 11359.
- [8] (a) Mohamed, S.; Ferro, V. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 72, Eds.: Baker, D. C.; Horton, D., **2015**, Vol. 72, p. 21.
(b) Tabour, C.; Machetto, F.; Mallet, J. M.; Duchaussoy, P.; Petitou, M.; Sinay, P. *Carbohydr. Res.* **1996**, *281*, 253.
(c) Pellissier, H. *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34*, 441.
- [9] (a) Debarnot, C.; Monneau, Y. R.; Roig-Zamboni, V.; Delauzun, V.; Le Narvor, C.; Richard, E.; Henault, J.; Goulet, A.; Fadel, F.; Vives, R. R.; Priem, B.; Bonnaffé, D.; Lortat-Jacob, H.; Bourne, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 6760.
(b) Liu, J.; Linhardt, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1676.
(c) Yin, X.; Yan, J.; Ji, S.; Wang, F.; Cao, H. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1388 (in Chinese).
(尹晓娟, 闫俊, 姬胜利, 王凤山, 曹鸿志, 有机化学, **2012**, *32*, 1388.)
- [10] (a) Ferrier, R. J.; Tyler, P. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2762.
(b) Mohamed, S.; Krenke, E. H.; Ferro, V. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2950.
- [11] (a) Friedman, R. B.; Weissmann, B. *Carbohydr. Res.* **1972**, *24*, 123.
(b) Baggett, N.; Samra, A. K.; Smithson, A. *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 63.
- [12] Lu, F.-C.; Lico, L. S.; Hung, S.-C. *ARKIVOC* **2013**, 13.
- [13] Ni Cheallaigh, A.; Potter, G. T.; Gardiner, J. M.; Miller, G. J. *Org. Synth.* **2016**, *93*, 200.
- [14] (a) Ferrier, R. J.; Furneaux, R. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 1996.
(b) Chiba, T.; Sinay, P. *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 379.
- [15] (a) Yu, H. N.; Furukawa, J.; Ikeda, T.; Wong, C.-H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 723.
(b) Cheng, W.-C.; Lin, C.-K.; Li, H.-Y.; Chang, Y.-C.; Lu, S.-J.; Chen, Y.-S.; Chang, S.-Y. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2647.
- [16] (a) Gin, D. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 645.
(b) Dondoni, A.; Marra, A.; Scherrmann, M. C.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1774.
- [17] Suresh, G.; Nadh, R. V.; Srinivasu, N.; Kaushal, K. *Synth. Commun.* **2016**, *46*, 1972.

(Li, L.; Fan, Y.)