

浅蓝霉素 H 的发酵优化与浅蓝苷 K 的化学合成

罗云^a 高谕康^a 燕鹏程^a 朱伟明^{*a,b,c}^(a) 中国海洋大学医药学院 海洋药物教育部重点实验室 山东青岛 266003)^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 天然产物有机合成化学重点实验室 上海 200032)^(c) 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋药物与生物制品功能实验室 山东青岛 266237)

摘要 浅蓝霉素 H (2) 及其 4-基 α -L-吡喃鼠李糖苷[即浅蓝苷 K (1)] 是从海洋来源的浅蓝异壁放线菌 WH1-2216-6 的发酵产物中分离获得的天然产物, 浅蓝苷 K (1) 具有良好的肿瘤细胞增殖抑制活性, 但其产率低, 合成未见报道。因此, 首先对浅蓝霉素 H (2) 的主产菌株浅蓝异壁放线菌 WH1-2216-6 突变株 CRM05 进行发酵优化, 采用放线菌 5 号与玉米配制的固体培养基发酵培养 CRM05 菌株, 将浅蓝霉素 H (2) 的产量提高到 272 mg/L (提高了 5 倍), 获得了足量的浅蓝霉素 H (2)。接着, 通过脱肟、鼠李糖苷化、成脎及脱乙酰保护等 6 步反应, 以 25.6% 的总收率从浅蓝霉素 H (2) 合成了浅蓝苷 K (1)。通过高分辨质谱、核磁共振和比旋光等数据确认了浅蓝苷 K (1) 的结构, 与报道的天然产物为同一化合物。浅蓝苷 K (1) 具有较强的肿瘤细胞抗增殖活性, 对肿瘤细胞株 PATU8988T、786-O、5673、DU145、A-375、FaDu 和 SF126 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.07~1.78 μ mol/L。

关键词 浅蓝霉素 H; 发酵优化; 鼠李糖苷化; 浅蓝苷 K; 抗增殖活性

Fermentation Optimization of the Caerulomycin H and the Synthesis of Cyanogriside K

Luo, Yun^a Gao, Yukang^a Yan, Pengcheng^a Zhu, Weiming^{*a,b,c}^(a) Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003)^(b) Key Laboratory of Synthetic Chemistry of Natural Substances, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)^(c) Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266237)

Abstract Caerulomycin H (2) and its 4-yl α -L-rhamnopyranoside [cyanogriside K (1)] are two microbial natural products from marine-derived *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. Cyanogriside K (1) shows good antiproliferative activity against tumor cells, whereas the yield is very low and the synthesis has not been reported. Thus, enough caerulomycin H (2) was first obtained by optimizing the fermentation condition of the mutant strain CRM05 of *A. cyanogriseus* WH1-2216-6. The yield of caerulomycin H (2) reached 272 mg/L (increased by 5 times) in the optimal solid medium consisted of corn pellets (80 g) and liquid medium 5# for actinomycetes (100 mL). Then cyanogriside K (1) was synthesized with 25.6% total yield from caerulomycin H (2) by six steps reactions including deoximation, rhamnosylation, oximation and deacetylation. The structure of cyanogriside K (1) was identified by NMR, HRESIMS and specific rotation data. It is the same compound as the reported natural product. Furthermore, cyanogriside K (1) showed good bioactivity against the proliferation of the tumor cell lines PATU8988T, 786-O, 5673, DU145, A-375, FaDu and SF126, with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values ranging from 1.07 μ mol/L to 1.78 μ mol/L.

Keywords caerulomycin H; fermentation optimization; rhamnosylation; cyanogriside K; antiproliferation

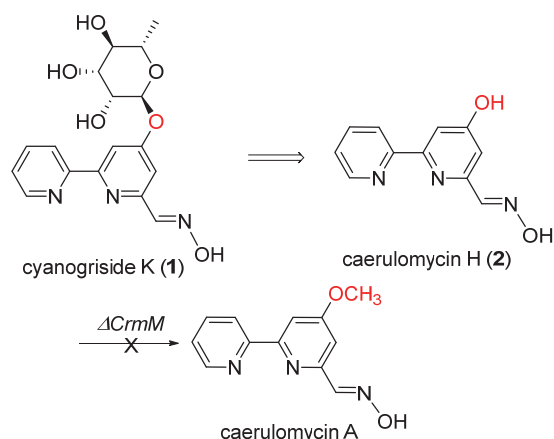
* Corresponding author. E-mail: weimingzhu@ouc.edu.cn

Received April 14, 2022; revised June 6, 2022; published online June 16, 2022.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China-Shandong Union Foundation (No. U1906213) and the Open Fund Projects from Key Laboratory of Synthetic Chemistry of Natural Substances (No. SIOC-2021-7).

国家自然科学基金委员会-山东省人民政府联合基金(No. U1906213)和天然产物有机合成化学学院重点实验室开放基金(No. SIOC-2021-7)资助项目。

浅蓝霉素是一类分子中含有 2,2'-联吡啶母核的生物碱,大多来源于微生物.浅蓝霉素 A (caerulomycin A) 为首个被发现的浅蓝霉素类化合物,由 Funk 等^[1]于 1959 年在 *Streptomyces caeruleus* PRL 1687 的发酵产物中分离得到.1977 年 McInnes 等又从该菌株的发酵产物中分离得到了浅蓝霉素 B 和 C^[2],随后又于 1978 年分离得到了联吡啶母核上连有 6-脱氧-L-阿拉伯糖的环状糖苷浅蓝霉素 D^[3],1988 年又分离得到了浅蓝霉素 E^[4].2011 年,本课题组从胶州湾海底沉积物中分离得到了一株异壁放线菌 *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6,并从此发酵产物中分离鉴定了包含浅蓝霉素 H (caerulomycin H) 在内的 6 种新的浅蓝霉素类化合物^[5];2019 年又分离鉴定了一类 4-O-糖苷,其中浅蓝霉素 H-4-基 α -L-吡喃鼠李糖苷(即浅蓝苷 K, cyanogriside K, 1)对人结肠癌细胞系 HCT-116 显示出较强的抗增殖活性^[6],具有成药潜力^[7].目前浅蓝苷 K 只能从异壁放线菌 WH1-2216-6 获取,但发酵产率低(仅 0.11 mg/L)^[6],远不能满足后续的成药性研究.基于此,本研究探索了浅蓝苷 K 的化学合成.根据反合成分析,浅蓝苷 K 可以从浅蓝霉素 H 糖基化得到,而后者是异壁放线菌 WH1-2216-6 的突变株 CRM05 的主产物(Scheme 1).我们通过优化培养基,开发了一条大量获取浅蓝霉素 H 的高效发酵与分离方法,然后研究了基于浅蓝霉素 H 母核糖基化的合适方法,获得了从浅蓝霉素 H 制备浅蓝苷 K 的合成路线.



图式 1 来自异壁放线菌 WH1-2216-6 的浅蓝苷 K (1)与浅蓝霉素 A 和 H (2)

Scheme 1 Cyanogriside K (1) and caerulomycins A and H (2) from *A. cyanogriseus* WH1-2216-6

1 结果与讨论

1.1 发酵优化

海洋异壁放线菌野生株 WH1-2216-6 的主产物是浅蓝霉素 A^[5],而浅蓝霉素 H 是浅蓝霉素 A 的生物合成前

体^[8-9],灭活其中的 O-甲基转移酶基因 *CrmM*,将导致浅蓝霉素 H 甲基化为浅蓝霉素 A 的关键酶 *CrmM* 无法表达,于是生物合成被阻断在浅蓝霉素 H (Scheme 1).由此构建的突变菌株 CRM05 (Δ *CrmM*)的主产物就是浅蓝霉素 H.然后,对突变株 CRM05 的发酵条件进行优化,以提高浅蓝霉素 H 的产量.为了测定不同发酵条件下浅蓝霉素 H 的产量,首先将浅蓝霉素 H 的标准品^[5]配制成浓度为 1.0、0.75、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 和 0.005 mg/mL 的甲醇溶液,在 $\lambda_{\max}$ 242 nm 下用高效液相色谱(HPLC)检测浅蓝霉素 H 的峰面积(表 1),通过面积归一法,建立峰面积(x)与浓度(y)的对应关系(图 1),再拟合出浅蓝霉素 H 的标准曲线^[10]: $y=0.0492x+0.0005$, $r^2=0.9999$ (图 1),表明标准曲线的线性关系良好,可用于浅蓝霉素 H 的含量测定.

表 1 浅蓝霉素 H 的浓度与峰面积的对应关系^a

Table 1 Correspondence between concentration and peak area of caerulomycin H

Concentration/(mg·mL ⁻¹)	Peak area
0.005	868
0.025	5053
0.05	10067
0.10	20158
0.20	40907
0.40	80590
0.50	101588
0.75	152430
1.00	203151

^a ACE C₁₈ analytical column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); mobile phase: MeCN/H₂O ($V:V=1:9$, 0~0.5 min) and MeCN/H₂O ($V:V=1:9\sim1:0$, 0.5~4 min) containing HCO₂H ($\phi=0.1\%$), and MeCN-H₂O ($V:V=1:9$, 4~4.5 min); flow rate 0.4 mL/min; injection volume 1 μ L.

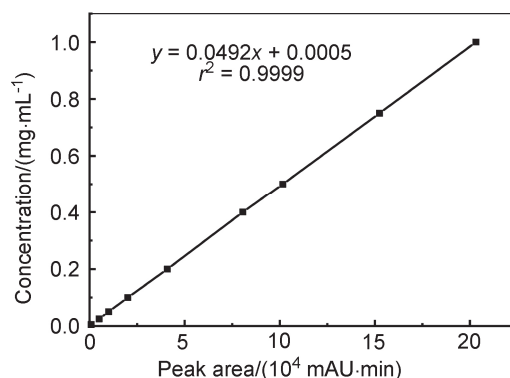


图 1 浅蓝霉素 H 的浓度与峰面积的对应关系标准曲线

Figure 1 Standard curve between concentration and peak area of caerulomycin H

在原液体培养基摇床培养(发酵 1)的基础上,先后尝试了 4 种方法发酵培养突变菌株 CRM05,即原液体培养基+玉米配制成固体培养基静置培养(发酵 2)、原液体培养基+大米配制成固体培养基静置培养(发酵 3)、

放线菌 5 号液体培养基摇床培养(发酵 4)、放线菌 5 号+玉米配制成固体培养基静置培养(发酵 5), 其中固体培养基均采用“100 mL 液体培养基+80 g 大米或玉米”配制. 然后用等量的乙酸乙酯(EtOAc)萃取或提取 3 次, 浓缩之后进行 HPLC 分析(条件同标准曲线的制作), 并利用标准曲线计算浅蓝霉素 H 的产量. 结果表明: 菌株在玉米培养基比大米培养基中长得快, 故放线菌 5 号培养基只加玉米组合成固体培养基, 且在其中培养 CRM05 菌株 23 d 后产量达到最大, 为 272 mg/kg(表 2), 是原培养基产量的 6 倍. 因此, 采用发酵 5, 规模化静置培养 CRM05 突变株 23 d, 分离纯化后得到 2.42 g 纯度 $\geq 80\%$ 的浅蓝霉素 H.

表 2 不同培养方法下浅蓝霉素 H 的产量

Table 2 Yields of caerulomycin H using different cultivation methods

培养方法	发酵时间/d	发酵量	浅蓝霉素 H 产量
发酵 1	15	300 mL	42.4 mg/L
发酵 2	170	540 g	139.3 mg/kg
发酵 3	170	540 g	72.9 mg/kg
发酵 4	15	300 mL	71.1 mg/L
发酵 5	17	180 g	166.1 mg/kg
	23	180 g	272.2 mg/kg
	32	180 g	176.6 mg/kg

1.2 4-羟基吡啶的糖苷化

为节约难得的浅蓝霉素 H, 本工作选取 4-羟基吡啶片段作为模型分子, 探索合适的糖苷化方法.

糖苷化反应的关键之一是选择合适的糖供体, 本研究尝试了几种常用的糖供体, 即 1-溴- α -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(3)[包括经典的 Koenig-Knorr 反应^[11](表 3, Entries 1~3)和相转移催化反应^[12](表 3, Entries 4, 5)]、 β -D-吡喃葡萄糖-1,2,3,4,6-五乙酸酯^[13](表 3, Entries 6, 7)、1-对甲苯磺基- β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯^[14](表 3, Entries 8, 9)和 1-三氯乙酰氨基-D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯^[15](表 3, Entry 10, Schmidt 给体法). 结果表明, Koenig-Knorr 反应的效果最佳, 以 1-溴- α -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯为供体可以 68.4% 的收率获得对应 O-苷——1-O-(吡啶-4-基)- β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(4).

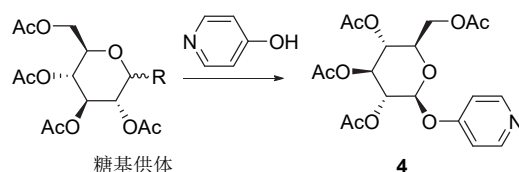
1.3 浅蓝霉素 H 的糖苷化

1.3.1 直接糖苷化

利用 1-溴- α -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(3)作糖基供体, 以上述最佳反应条件对浅蓝霉素 H (2)直接糖苷化. 结果发现浅蓝霉素 H 的 4-或 8-位的单糖苷化产物为次要产物($t_R=2.63$ min), 而 4,8-位的双糖苷化产物

表 3 4-羟基吡啶的糖苷化模型反应

Table 3 Model glucosidation for 4-hydroxypyridine



Entry	R	Reagent	Solvent ^a	Temperature and time	Ref.	Yield ^b /%
1	Br	Ag ₂ CO ₃	MeCN	80 °C, 1 + 3 h ^c	[11a~11d]	68.4
2			Toluene	105 °C, 3 h		7
3		Cs ₂ CO ₃	MeCN	25 °C, 24 h	[11e]	11
4		Bu ₄ NBr, NaOH	CHCl ₃ /H ₂ O (V: V=1:1)	40 °C	[12a]	— ^d
5		Bu ₄ NBr, K ₂ CO ₃			[12b]	—
6	OAc	FeCl ₃ ·6H ₂ O	CH ₂ Cl ₂	25 °C	[13a, 13b]	—
7		BF ₃ ·OEt ₂			[13c]	—
8		NIS, TfOH	CH ₂ Cl ₂	−78 °C	[14a~14c]	—
9		NIS, TMSOTf		−35 °C		
10		BF ₃ ·OEt ₂	CH ₂ Cl ₂	25 °C	[15a~15c]	—

^a Drying by molecular sieve; ^b actual yield; ^c 4-hydroxypyridine and Ag₂CO₃ were stirred at 80 °C for 1 h, then glycosyl donor (3 equiv.) was added and stirred for 3 h; ^d no reaction.

为主要产物($t_R=3.05$ min)、两者的比例为 37:63, 表明 7-胍基影响目标产物的合成. 因此, 尝试间接合成浅蓝苷 K.

1.3.2 间接糖苷化

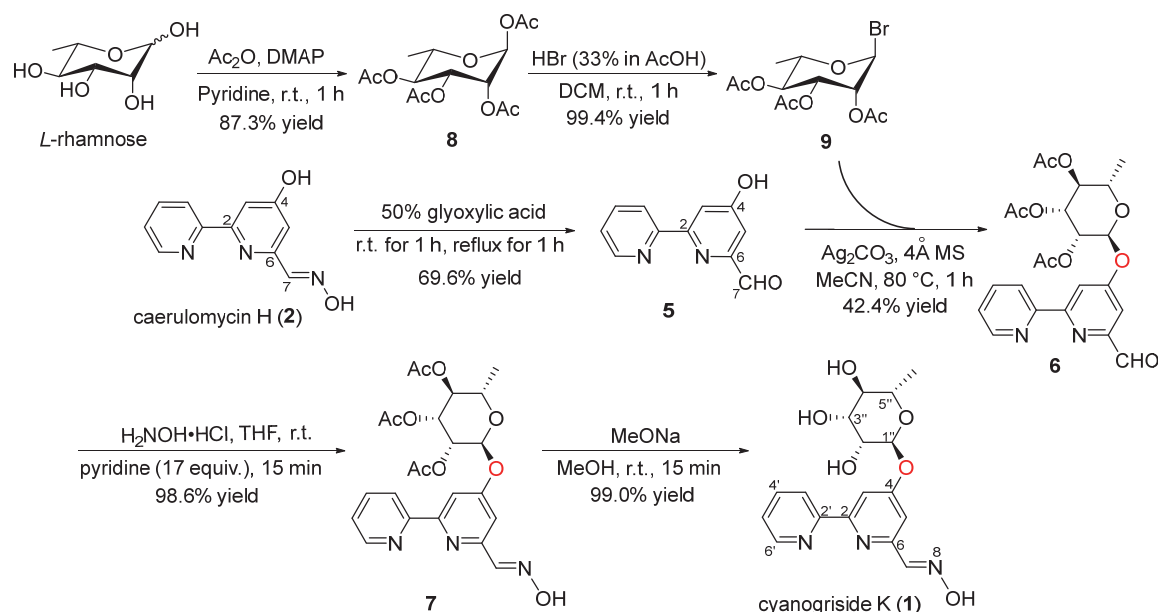
利用醛肟交换, 先将浅蓝霉素 H (2) 的胍基转变为醛基, 生成浅蓝霉素 M (5)^[9,16]; 再将浅蓝霉素 M 糖苷化生成浅蓝霉素 M-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(6), 然后将醛变成肟得到浅蓝霉素 H-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(7), 最后脱去乙酰基保护即可合成目标产物(1)(Scheme 2).

首先用乙酸酐将 L-鼠李糖全乙酰化, 合成 α -L-吡喃鼠李糖-1,2,3,4-四乙酸酯(8, 收率 87.3%), 再用 33% HBr/AcOH 选择性溴代 1-乙酰氧基, 减压浓缩至干即可得到 1-溴- α -L-吡喃鼠李糖-2,3,4-三乙酸酯(9)^[17](易变失活, 需用现制). 然后将浅蓝霉素 H (1a) 脱胍, 尝试了质量分数为 50% 的乙醛酸水溶液^[9]和 37% 甲醛水溶液与 10 mol/L 盐酸的混合溶液^[17]两种方案, 结果发现质量分数为 50% 的乙醛酸水溶液脱胍更佳, 在室温搅拌 1 h 后再回流 1 h, 即可生成 7-位为醛基的浅蓝霉素 M (5, 收率 69.6%). 5 接着与 9 反应生成浅蓝霉素 M-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(6, 收率 42.4%). 化合物 6 经手性色谱柱 Chiral INB 的 HPLC 手性分析发现只有 1 个峰, 表明仅生成 1 种端基异构体; 根据端基质子的偶合常数($^3J_{H-1'',H-2''}=1.9$ Hz)推测其为 α -L-鼠李糖苷^[6]. 接下来有两条路径可以获得终产物, 一是先脱去乙酰基保护再成肟, 二是先成肟再脱保护基. 脱保护基需要用到强亲核性的甲醇钠, 为了避免其与强亲电性的芳香醛

反应以及增大极性造成产物分离困难, 本研究采取了第二条路径. 将化合物 6 与盐酸羟胺和吡啶搅拌 15 min^[18], 即可以 98.6% 收率获得浅蓝霉素 H-4-基 α -L-(2,3,4,6-四-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(7), 经 Chiral INB 手性分析证明仅生成一种端基异构体, 其构型经端基的碳氢偶合常数($^1J_{C-1'',H-1''}=175$ Hz)确定为 α -异构体^[19]. 最后在甲醇钠的甲醇溶液中脱去化合物 7 的乙酰保护基^[20], 以 99% 收率得到目标产物浅蓝苷 K (1), 其结构同样通过了 Chiral INB 手性分析, 且与天然浅蓝苷 K 的 NMR(表 4)和 $[\alpha]_D$ (-86.7 vs -50.6) 数据一致, 证明为同一化合物. 至此, 我们以浅蓝霉素 H 和 L-鼠李糖为原料, 经过 6 步反应, 以 25.6% 总收率首次合成了浅蓝苷 K (Scheme 1).

1.4 合成浅蓝苷 K (1) 的抗增殖活性

以盐酸阿霉素(Dox)为阳性对照, 采用 Cell Counting Kit (CCK-8) 评价了目标化合物浅蓝苷 K (1) 对 20 种人肿瘤细胞系的抗增殖活性, 包括人肺癌细胞 A549、人胃癌细胞 MKN-45、人结肠癌细胞 HCT-116、人宫颈癌细胞 HeLa、人慢性髓原白血病细胞 K562、人脑瘤细胞 SF126、人卵巢畸胎瘤细胞 PA-1、人肾透明细胞腺癌细胞 768-O、人膀胱癌细胞 5637、人前列腺癌细胞 DU145、人甲状腺癌细胞 CAL-62、人胰腺癌细胞 PATU8988T、人骨肉瘤细胞 HOS、人恶性黑色素瘤细胞 A-375、人横纹肌肉瘤细胞 A-673、人咽鳞癌细胞 FaDu、人胆囊癌细胞 GBC-SD、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 HepG2 和人食管癌细胞 TE-1(表 5). 结果表明浅蓝苷 K (1) 对其中的 A549、MKN-45、HCT-116、HeLa、K562、SF126、PA-1、768-O、5637、DU145、CAL-62、PATU8988T、



图式 2 从浅蓝霉素 H 到浅蓝苷 K 的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of cyanogriside K from caerulomycin H

表4 氘代二甲基亚砶中天然与合成的浅蓝昔 K (1) 的 ^1H NMR (500 MHz) 和 ^{13}C NMR (125 MHz) 数据对比
Table 4 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data of natural and synthetic cyanogriside K (1) in DMSO- d_6

Position	Natural 1 (J in Hz) ^[6]		Synthetic 1 (J in Hz)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	157.0 (C)		157.0 (C)	
3	108.3 (CH)	8.00(d, $J=1.9$ H)	108.3 (CH)	8.00 (d, $J=2.3$)
4	163.6 (C)		163.6 (C)	
5	107.2 (CH)	7.45 (d, $J=1.9$)	107.2 (CH)	7.45 (d, $J=2.3$)
6	153.6 (C)		153.6 (C)	
7	148.7 (CH)	8.15 (s)	148.7 (CH)	8.15 (s)
2'	154.4 (C)		154.4 (C)	
3'	120.7 (CH)	8.38 (d, $J=7.9$)	120.7 (CH)	8.38 (d, $J=7.7$)
4'	137.7 (CH)	7.96 (t, $J=7.9$)	137.4 (CH)	7.96 (td, $J=7.7, 1.7$)
5'	124.6 (CH)	7.48 (dd, $J=7.9, 4.0$)	124.6 (CH)	7.48 (ddd, $J=7.7, 5.0, 1.2$)
6'	149.3 (CH)	8.69 (d, $J=4.1$)	149.3 (CH)	8.69 (dt, $J=5.1, 1.2$)
1''	98.1 (CH)	5.63 (d, $J=1.9$)	98.1 (CH)	5.63 (d, $J=1.9$)
2''	70.1 (CH)	3.88 (t, $J=4.2$)	70.1 (CH)	3.88 (dd, $J=3.2, 1.9$)
3''	70.3 (CH)	3.67 (dt, $J=5.2, 4.2$)	70.3 (CH)	3.67 (dd, $J=9.0, 3.2$)
4''	71.6 (CH)	3.17 (d, $J=5.2$)	71.6 (CH)	3.16 (s)
5''	69.8 (CH)	3.43 (dq, $J=5.2, 6.1$)	69.8 (CH)	3.43 (dd, $J=9.0, 6.1$)
6''	17.9 (CH ₃)	1.11 (d, $J=6.1$)	17.9 (CH ₃)	1.11 (d, $J=6.1$)

表5 浅蓝昔 K (1) 对肿瘤细胞的抗增殖活性 [$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$], 阳性对照: 盐酸阿霉素]

Table 5 Antiproliferation of cyanogriside K (1) against tumor cells [$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$], positive control: doxorubicin hydrochloride]

Compd.	A549	MKN-45	HCT-116	HeLa	K562	SF126	PA-1	768-O	5637	DU145	CAL-62	PATU8988T	HOS	A-375	A-673	FaDu	GBC-SD
1	7.32	3.61	3.53	2.47	9.29	1.78	5.79	1.68	1.08	1.14	2.90	1.07	2.45	1.52	2.82	1.15	2.28
Dox	1.10	1.25	0.94	0.41	0.41	0.78	0.63	0.59	0.24	0.44	0.41	0.33	0.92	0.20	0.23	0.21	5.34

HOS、A-375、A-673、FaDu 以及 GBC-SD 共 17 种癌细胞具有抗增殖活性, 半数抑制浓度(IC_{50})为 1.07~9.29 $\mu\text{mol/L}$; 尤其是对人胰腺癌细胞 PATU8988T、人膀胱癌细胞 5637、人前列腺癌细胞 DU145 和人咽鳞癌细胞 FaDu 的活性最强, IC_{50} 介于 1.07~1.15 $\mu\text{mol/L}$ 之间; 对人胆囊癌细胞 GBC-SD 的抗增殖活性甚至强于盐酸阿霉素(2.28 vs 5.34 $\mu\text{mol/L}$). 对其它 3 种肿瘤细胞 MCF-7、HepG2 和 TE-1 没有活性($\text{IC}_{50}>10$ $\mu\text{mol/L}$).

2 结论

本研究获得了异壁放线菌突变株 CRM05 代谢生成浅蓝霉素 H 的较佳发酵条件及其分离纯化方法, 即放线菌 5 号+玉米固体发酵 23 d(产量达到 272 mg/kg, 提高了 5 倍); 采用“减压硅胶柱色谱+重结晶+凝胶柱色谱”的组合分离方法, 获得了满足合成需求的浅蓝霉素 H, 纯度 $\geq 80\%$. 同时获得了一条定向合成浅蓝霉素 H-4-基 α -L-吡喃鼠李糖苷(浅蓝昔 K, cyanogriside K)的化学合成路线, 6 步反应, 总收率为 25%. 合成的浅蓝昔 K 的结构通过核磁共振和比旋光等数据加以确定, 证明其与天然浅蓝昔 K 为同一化合物. 评价了浅蓝昔 K 对 20 种人肿瘤细胞系的抗增殖活性, 发现其对胰腺癌细胞 PATU8988T、人膀胱癌细胞 5637、人前列腺癌细胞 DU145 和人咽鳞癌细胞 FaDu 有强活性($\text{IC}_{50}\approx 1$

$\mu\text{mol/L}$)对人胆囊癌细胞 GBC-SD 的抗增殖活性强于盐酸阿霉素(IC_{50} 2.28 vs 5.34 $\mu\text{mol/L}$).

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪为美国安捷伦科技有限公司 Agilent DD2 500 和 JEOL JNM-ECP 600 型; 质谱仪为美国 Waters 公司 Q-TOF Ultima Global GAA076 LC 型; 旋光仪为 JASCO P-1020 型; 红外光谱仪为美国 NICOLET 公司 NEXUS 470FT-IR 型; 旋转蒸发仪为 EYELA 公司 N-1100 型; 凝胶为 Pharmacia 公司 Sephadex™ LH-20; 液相质谱仪为 Waters ACQUITY Masslynx 工作站; 高效液相色谱分析仪为日本岛津公司 SHIMADZU LC-20AT 型[检测器: SPD-M20A DAD, 分析柱: ODS-A C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 半制备柱: ODS-A C₁₈ (10 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 手性柱: Chiral INB (250 mm $\times$ 4.6 mm)]. 发酵部分所用到的可溶性淀粉、甘油、CaCO₃、KNO₃和 NaCl 购自国药集团, 蛋白胨和酵母浸膏购自北京双旋微生物培养基制品厂, 琼脂从 Solarbio 公司购买; 合成部分用到的 4-羟基吡啶、碳酸银、碳酸铯、 β -D-葡萄糖五乙酸酯、33%氢溴酸的乙酸溶液、一水合 L-(+)-鼠李糖、吡啶、二氯甲烷、乙腈、盐酸羟胺、三氟甲磺

酸三甲基硅酯、三氟甲磺酸和 4-甲苯硫酚从安耐吉公司购买, 三氟化硼乙醚和三氯乙腈从麦克林公司购买, 四丁基溴化铵、六水合氯化铁、4-二甲氨基吡啶、冰醋酸、乙酸酐、三氯甲烷和碳酸钾从国药集团购买; 活性测试所用的磷酸盐缓冲液(PBS)、青霉素-硫酸链霉素双抗混合液、RPMI1640 培养液、DMEM 高糖培养液、MEM 培养液、MDM 培养液和 McCoy's 5A 培养液从武汉普诺赛公司购买, CCK-8 试剂盒和胰蛋白酶-EDTA 消化液分别购自 Biosharp life sciences 和 GIBCO 公司。

3.2 实验方法

3.2.1 突变株 CRM05 的培养基优化

通用流程: 配制液体或固体培养基, 灭菌后每瓶接种 3 mL 突变株 CRM05 的种子液, 于 28 °C 恒温摇床发酵或静置发酵培养, 其中固体培养基均采用“100 mL 液体培养基+80 g 大米或玉米”配制。发酵完成后用等体积的乙酸乙酯萃取液体培养产物或提取固体培养产物三次, 合并有机层, 减压浓缩至 10 mL 进行后续研究。

发酵 1(原液体培养): 可溶性淀粉 3 g、甘油 3 g、蛋白胨 3 g、CaCO₃ 0.3 g、KNO₃ 0.15 g、陈海水 150 mL、pH 7.5, 装入 500 mL 烧瓶中, 共 2 瓶, 180 r/min 的摇床发酵 15 d。EtOAc 萃取(150 mL×2×3), 浓缩至 100 mL, 取 10 μL 浓缩的乙酸乙酯溶液稀释 10 倍后进行 HPLC 分析, 蒸干剩余浓缩的乙酸乙酯溶液得粗提物 200 mg。

发酵 2(原液体培养基+玉米固体培养): 可溶性淀粉 2 g、甘油 2 g、蛋白胨 2 g、CaCO₃ 0.2 g、KNO₃ 0.1 g、陈海水 100 mL、80 g 玉米碴, pH 7.5, 装入 1 L 的烧瓶中, 共 3 瓶, 静置发酵 170 d。EtOAc 萃取(180 mL×3×3), 浓缩至 180 mL, 取 10 μL 浓缩的乙酸乙酯溶液稀释 80 倍后进行 HPLC 分析, 蒸干剩余浓缩的乙酸乙酯溶液得粗提物 545 mg。

发酵 3(原液体培养基+大米固体培养): 可溶性淀粉 2 g、甘油 2 g、蛋白胨 2 g、CaCO₃ 0.2 g、KNO₃ 0.1 g、陈海水 100 mL、80 g 大米, pH 7.5, 装入 1 L 的烧瓶中, 共 3 瓶, 静置发酵 170 d。EtOAc 萃取(180 mL×3×3), 浓缩至 180 mL, 取 10 μL 浓缩的乙酸乙酯溶液稀释 80 倍后进行 HPLC 分析, 蒸干剩余浓缩的乙酸乙酯溶液得粗提物 667 mg。

发酵 4(放线菌 5 号液体培养): 可溶性淀粉 3 g、豆粉 2.25 g、酵母浸膏 0.75 g、蛋白胨 0.3 g、CaCO₃ 0.6 g、NaCl 0.6 g、陈海水 150 mL、pH 7.5, 装入 500 mL 烧瓶中, 共 2 瓶, 180 r/min 的摇床发酵 15 d。EtOAc 取(150 mL×2×3), 浓缩至 100 mL, 取 10 μL 浓缩的乙酸乙酯溶液稀释 10 倍后进行 HPLC 分析, 蒸干剩余浓缩的乙酸乙酯溶液得粗提物 230 mg。

发酵 5(放线菌 5 号+玉米固体培养): 可溶性淀粉 3

g、豆粉 2.25 g、酵母浸膏 0.75 g、蛋白胨 0.3 g、CaCO₃ 0.6 g、NaCl 0.6 g、陈海水 100 mL、80 g 玉米碴, pH 7.5, 装入 1 L 的烧瓶中, 分别静置发酵 17、23 和 32 d, 每组 1 瓶。各自用 EtOAc 萃取(180 mL×3), 浓缩至 100 mL, 分别取 10 μL 浓缩的乙酸乙酯溶液稀释 10 倍、20 倍和 1.6 倍后进行 HPLC 分析, 蒸干剩余浓缩的乙酸乙酯溶液分别得粗提物 325、332 和 310 mg。

3.2.2 突变株 CRM05 的规模化发酵方法与浅蓝霉素 H (2) 的提取分离

按优化方法, 将 100 mL 放线菌 5 号液体培养基与 80 g 玉米装入 1 L 烧瓶中, 灭菌后接种 10 mL 突变株 CRM05 种子液, 共 163 瓶, 于 28 °C 恒温静置发酵 23 d。发酵完成后用乙酸乙酯萃取固体培养基三次, 合并有机相, 减压浓缩得粗体物 70 g。

将 70 g 粗体物通过正相减压柱分离(VLC), 石油醚/乙酸乙酯($V:V=8:1, 6:1, 4:1, 3:1, 2:1$)和二氯甲烷/甲醇($V:V=1:0, 20:1, 10:1, 8:1, 6:1, 4:1$)依次洗脱, 分别得到组分 1~4 (Fr.1~Fr.4)。其中二氯甲烷/甲醇体积比为 4:1 洗脱的馏分 Fr.4 即为纯度为 91% 的浅蓝霉素 H (1.7 g), 将二氯甲烷/甲醇体积比为 10:1~6:1 洗脱的馏分 Fr.3 (12 g) 以及体积比为 1:0~20:1 洗脱的馏分 Fr.2 (5 g) 分别溶于 60 °C 的甲醇中重结晶, 分别得到 570 和 150 mg 纯度为 80% 的浅蓝霉素 H; 重结晶后的母液经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离(甲醇洗脱), 得到纯度为 80% 的浅蓝霉素 H (80 mg), 共得到 2.42 g 纯度≥80% 的浅蓝霉素 H (2)。取纯度为 91% 的浅蓝霉素 H (18 mg) 进一步 HPLC 纯化[半制备 ODS-A C₁₈ 柱(5 μm)、17% MeCN-H₂O 洗脱、流速 4.0 mL/min]得到纯度为 99% 浅蓝霉素 H: 15.0 mg, $t_R=12.8$ min, 白色固体。m.p. 217~219 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 11.64 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 8.69~8.63 (m, 1H), 8.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.93 (td, $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.44 (ddd, $J=7.6, 4.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=2.3$ Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C : 165.1, 156.7, 154.8, 153.3, 149.2, 149.0, 137.2, 124.3, 120.6, 108.3, 106.9; ESIMS m/z 216 [M+H]⁺, 与文献值相符^[5]。

3.2.3 4-羟基吡啶的糖苷化反应

溴代葡萄糖供体 1-溴- α -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(3)的合成: 取 20 mL 二氯甲烷并将其加入到 100 mL 反应瓶中, 加入 1.95 g β -D-吡喃葡萄糖-1,2,3,4,6-五乙酸酯(5.0 mmol), 然后加入 4 Å 分子筛, N₂ 保护下冰浴搅拌 15 min 后缓慢注入 33% HBr/AcOH 溶液 10.0 mL, 缓慢恢复至室温搅拌 2 h。然后在冰浴下用饱和 NaHCO₃ 溶液中和至 pH 7, 以乙酸乙酯萃取(30 mL×3),

合并有机层,依次用饱和食盐水洗涤(10 mL×3)、无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤和减压蒸馏。经硅胶柱分离(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=4:1$)得 1-溴- α -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(**3**)^[21] 1.94 g, 收率 94.4%, 白色粉末. m.p. 89~90 °C (lit.^[27] 88~89 °C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 6.59 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.54 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 5.14 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 4.82 (dd, $J=10.0, 4.0$ Hz, 1H), 4.34~4.25 (m, 2H), 4.11 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ _C: 170.6, 169.9×2, 169.6, 86.7, 72.2, 70.7, 70.3, 67.3, 61.0, 20.8, 20.7×2, 20.6; ESIMS m/z : 433/435 [M+Na]⁺ (1:1 for ⁷⁹Br: ⁸¹Br).

表 3 Entry 1: 取 30.4 mg 4-羟基吡啶(0.32 mmol, 1.0 equiv.)并将其加入到 10 mL 反应瓶中,用 1.2 mL 乙腈溶解,加入 246.7 mg Ag₂CO₃ (0.96 mmol, 3.0 equiv.), 然后加入 4Å 分子筛, N₂ 保护 80 °C 避光搅拌 1 h, 然后加入 394.8 mg (0.96 mmol, 3.0 equiv.)溴代葡萄糖供体**3**, 继续搅拌 3 h. 反应结束后冷却至室温,用硅藻土过滤,滤液减压浓缩。经硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇, $V:V=20:1$)得 1-O-(吡啶-4-基)- β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(**4**)^[22]: 93 mg, 收率 68.4%, 浅黄色粉末. m.p. 131~133 °C (lit.^[22] 132~134 °C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 8.44 (dd, $J=4.7, 1.6$ Hz, 2H), 6.86 (dd, $J=4.7, 1.6$ Hz, 2H), 5.28 (dd, $J=14.8, 7.9$ Hz, 2H), 5.21 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.13 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J=12.4, 5.4$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J=12.4, 2.4$ Hz, 1H), 3.90 (ddd, $J=9.9, 5.5, 2.5$ Hz, 1H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ _C: 170.5, 170.2, 169.4, 169.2, 162.7, 151.3×2, 111.7×2, 97.3, 72.5, 72.4, 70.9, 68.1, 61.9, 20.7, 20.6×3; ESIMS m/z : 426 [M+H]⁺, 448 [M+Na]⁺.

表 3 Entry 2: 取 1.2 mL 甲苯并将其加入到 10 mL 反应瓶中,加入 30.4 mg 4-羟基吡啶(0.32 mmol, 1.0 equiv.)、246.7 mg Ag₂CO₃ (0.96 mmol, 3.0 equiv.)和 78.9 mg (0.19 mmol, 0.6 equiv.)溴代葡萄糖供体**3**, 然后加入 4Å 分子筛, N₂ 保护下回流 1 h. 反应结束后冷却至室温,用硅藻土过滤,滤液减压浓缩。经硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇, $V:V=20:1$)得目标产物**4** (9.5 mg, 收率 7%).

表 3 Entry 3: 取 1.2 mL 乙腈并将其加入到 10 mL 反应瓶中,再加入 10.46 mg 4-羟基吡啶(0.11 mmol, 1.0 equiv.)、39.10 mg Cs₂CO₃ (0.12 mmol, 1.1 equiv.)和 98.69 mg (0.24 mmol, 3.0 equiv.)溴代葡萄糖供体**3**, 然后加入 4Å 分子筛, N₂ 保护, 室温搅拌 24 h. 反应结束后用硅藻土过滤,滤液减压浓缩。经硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/

甲醇, $V:V=20:1$)得目标产物**4** (5 mg, 收率 11%).

表 3 Entries 4, 5: 将 5 mL 氯仿/水($V:V=1:1$)加入到 25 mL 反应瓶中,然后加入 10 mg 4-羟基吡啶(0.1 mmol, 1.0 equiv.)、27.6 mg K₂CO₃ (0.2 mmol, 2.0 equiv., Entry 4)或 8.0 mg NaOH (0.2 mmol, 2.0 equiv., Entry 5)和 64.5 mg Bu₄NBr (0.2 mmol, 2.0 equiv.), 于 40 °C 搅拌 30 min, 然后加入 82.2 mg (0.2 mmol, 2.0 equiv.)溴代葡萄糖供体**3**, 继续搅拌, 薄层色谱(TLC)和液相色谱质谱联用(LC-MS)没有检测到目标产物**4**.

表 3 Entries 6, 7: 取 2.5 mL 二氯甲烷并将加入到 10 mL 反应瓶中,加入 50 mg 4-羟基吡啶(0.52 mmol, 1.0 equiv.)、162.2 mg FeCl₃·6H₂O (0.72 mmol, 1.2 equiv., Entry 6)或 74.1 μ L BF₃·OEt₂ (0.60 mmol, 1.2 equiv., Entry 7)和 234.2 mg β -D-吡喃葡萄糖-1,2,3,4,6-五乙酸酯(0.60 mmol, 1.2 equiv.), 再加入 4Å 分子筛, N₂ 保护下室温下搅拌, TLC 和 LC-MS 没有检测到目标产物**4**.

表 3 Entries 8, 9: 取 50 mL 二氯甲烷并将其加入到 250 mL 反应瓶中,再加入 3.90 g β -D-葡萄糖-1,2,3,4,6-五乙酸酯(10.0 mmol, 1.0 equiv.)和 1.86 g 对甲苯磺酐(15.0 mmol, 1.5 equiv.), 然后加入 4Å 分子筛, N₂ 保护下于 0 °C 加入 3.70 mL BF₃·OEt₂ (30.0 mmol, 3.0 equiv.), 恢复至室温搅拌 16 h. 反应结束以后过滤并以饱和 NaHCO₃ 洗涤滤液, 收集有机相, 水相用二氯甲烷萃取(50 mL×3), 合并有机相, 减压浓缩后硅胶柱色谱分离(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=4:1$)得到 1-对甲苯磺基- β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(**10**)^[23] 3.9 g, 收率 86%, 白色粉末. m.p. 116~118 °C (lit.^[28] 117~118 °C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 7.38 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.20 (t, $J=9.4$ Hz, 1H), 5.02 (t, $J=9.8$ Hz, 1H), 4.93 (t, $J=9.5$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J=10.1$ Hz, 1H), 4.26~4.13 (m, 2H), 3.69 (ddd, $J=10.1, 4.8, 2.7$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ _C: 170.7, 170.4, 169.5, 169.4, 138.9, 134.0×2, 129.8×2, 127.7, 86.0, 75.9, 74.1, 70.0, 68.3, 62.3, 21.3, 20.9×2, 20.7×2; ESIMS m/z : 478 [M+Na]⁺.

取 1.0 mL 二氯甲烷并将其加入到 10 mL 反应瓶中,再加入 13.0 mg 4-羟基吡啶(0.136 mmol, 1.0 equiv.)和 60.0 mg 上述制备的 1-对甲苯磺基- β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(0.132 mmol, 0.97 equiv.), N₂ 保护下搅拌 30 min, 转入-78 °C (Entry 8)或-35 °C (Entry 9)低温反应仪, 10 min 后加入 30.6 mg *N*-碘丁二酰亚胺(NIS) (0.136 mmol, 1.0 equiv.)和 6.4 μ L 三氟甲磺酸(TfOH) (0.068 mmol, 0.5 equiv., Entry 8)或 7.4 μ L 三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf) (0.041 mmol, 0.3 equiv., En-

try 9). 继续搅拌, TLC 和 LC-MS 没有检测到目标产物 4.

表 3 Entry 10: 取 240.3 μL 醋酸(4.2 mmol, 1.4 equiv.)和 220.5 μL 乙二胺(3.3 mmol, 1.1 equiv.)并将其加入到 25 mL 反应瓶中, N_2 保护下滴加 1.17 g β -D-吡喃葡萄糖-1,2,3,4,6-五乙酸酯(3.0 mmol, 1.0 equiv.)与 5 mL THF 的溶液, 室温过夜搅拌. 硅胶柱色谱分离(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=4:1$)得到 β -D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯(**11**)^[24] 800 mg, 收率 76.6%, 白色黏稠固体. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 5.35 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 5.22 (dd, $J=7.2$, 3.1 Hz, 1H), 4.95~4.84 (m, 1H), 4.71 (dd, $J=10.3$, 3.4 Hz, 1H), 4.12 (d, $J=9.3$ Hz, 2H), 4.03~3.96 (m, 1H), 2.01 (s, 6H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 170.2, 169.9, 169.8, 169.4, 89.1, 70.9, 69.4, 68.6, 65.9, 62.2, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3; ESIMS m/z : 371 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

取 6.0 mL 二氯甲烷并将其加入到 25 mL 反应瓶中, 再加入 523 mg 上步制备的化合物 **11** (1.5 mmol, 1.0 equiv.)和 622 mg K_2CO_3 (4.5 mmol, 3.0 equiv.), N_2 保护下加入 752 mg Cl_3CCN (7.5 mmol, 5.0 equiv.), 室温搅拌过夜. 用饱和 NaHCO_3 和饱和 NaCl 溶液洗涤反应液, 收集有机相, 浓缩抽干即得三氯乙酰亚胺酯糖供体 1-三氯乙酰亚氨基-D-吡喃葡萄糖-2,3,4,6-四乙酸酯, 直接用于下一步反应. 将 250 mg 新鲜制备的三氯乙酰亚胺酯糖供体(0.51 mmol, 1.0 equiv.)溶于 4.0 mL 二氯甲烷中, 加入 47.6 mg 4-羟基吡啶(0.5 mmol, 1.0 equiv.), N_2 保护下于 0 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 10 min, 然后缓慢注入 6.2 μL $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (0.05 mmol, 0.1 equiv.), 继续搅拌, TLC 和 LC-MS 没有检测到目标产物 4.

3.2.4 浅蓝霉素 M (**5**)的合成

取 1 mL 质量分数为 50%的乙醛酸的水溶液于 10 mL 反应瓶中, 并加入 50 mg 浅蓝霉素 H (**2**) (0.23 mmol). N_2 保护下室温搅拌 1 h, 100 $^\circ\text{C}$ 再搅拌反应 1 h. 反应结束后用饱和 NaHCO_3 溶液中和至 pH 7, 用乙酸乙酯萃取 (15 mL $\times$ 3), 合并有机相, 减压浓缩后用硅胶柱分离(二氯甲烷/甲醇, $V:V=10:1$)得浅蓝霉素 M (**5**)^[9] 32 mg, 收率 69.6%, 淡黄色粉末. m.p. 181~182 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 11.44 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.68 (d, $J=3.5$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.96 (td, $J=7.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.49~7.45 (m, 1H), 7.28 (d, $J=2.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 193.6, 166.0, 157.6, 154.2, 154.0, 149.4, 137.4, 124.7, 120.8, 111.6, 109.2; HRESIMS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 201.0659, found 201.0658.

3.2.5 浅蓝霉素 H (**2**)的直接糖苷化

取 2.0 mL 乙腈并将其加入到 10 mL 反应瓶中, 加入 6 mg 浅蓝霉素 H (**2**) (0.03 mmol)和 24.8 mg Ag_2CO_3 (0.09 mmol), N_2 保护下加入 4Å 分子筛、升温至 80 $^\circ\text{C}$ 避光搅拌反应 1 h, 然后缓慢滴加 14.8 mg (0.036 mmol, 1.2 equiv.)溴代葡萄糖供体 **3** 的二氯甲烷溶液(0.1 mL), 继续避光搅拌, 用 LC-MS 分析反应情况.

3.2.6 浅蓝霉素 M-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(**6**)的合成

取 7 mL 无水吡啶并将其加入到 25 mL 反应瓶中, 加入 182.2 mg 一水合 L-(+)-鼠李糖(1.0 mmol, 1.0 equiv.)和 24.4 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP) (0.3 mmol, 0.3 equiv.), 再加入 4Å 分子筛, N_2 保护下冰浴搅拌 15 min 后缓慢注入 0.57 mL 乙酸酐(6.0 mmol, 6.0 equiv.), 恢复至室温搅拌 1 h. 反应结束后真空抽干反应液, 用 10 mL CH_2Cl_2 溶解, 再 1 mol/L 盐酸、饱和 NaHCO_3 各 2 mL 依次洗涤, 减压浓缩有机相. 粗产物经硅胶柱分离(石油醚/乙酸乙酯, $V:V=4:1$)洗脱得 α -L-吡喃鼠李糖-1,2,3,4-四乙酸酯(**8**)^[25] 290 mg, 收率 87.3%, 淡黄色粘稠固体. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.00 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.29 (dd, $J=10.1$, 3.5 Hz, 1H), 5.24 (dd, $J=3.6$, 2.0 Hz, 1H), 5.11 (t, $J=10.0$ Hz, 1H), 3.97~3.87 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.22 (d, $J=6.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 170.0, 169.9, 168.5, 90.8, 70.6, 68.9, 68.8 $\times$ 2, 21.0, 20.9 $\times$ 2, 20.8, 17.6; ESIMS m/z : 355 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

将该新鲜制备的全乙酰化鼠李糖 **8** (0.3 mmol, 99.6 mg)加入到回流干燥过的二氯甲烷中, 然后加入 4Å 分子筛, N_2 保护, 于 0 $^\circ\text{C}$ 下加入 33% HBr 的 AcOH 溶液 (10.0 equiv.), 缓慢恢复至室温搅拌 2 h. 反应结束后在冰浴下用饱和 NaHCO_3 溶液中和, 用 EtOAc 萃取三次, 合并有机层, 用饱和食盐水洗涤三次, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩得 1-溴- α -L-吡喃鼠李糖-2,3,4-三乙酸酯(**9**) 105 mg, 收率 99.4%, 淡黄色粘稠固体. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6.25 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 5.66 (dd, $J=10.2$, 3.4 Hz, 1H), 5.43 (dd, $J=3.4$, 1.6 Hz, 1H), 5.14 (t, $J=10.0$ Hz, 1H), 4.14~4.05 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.27 (d, $J=6.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.0, 169.9, 169.8, 83.8, 72.6, 71.2, 70.4, 68.0, 20.9 $\times$ 2, 20.7, 17.1 ($^1J_{\text{C}-1,\text{H}-1}=188.0$ Hz); ES-IMS m/z : 273 $[\text{M}-\text{Br}]^+$. 因产物其不稳定, 需立即投入糖苷化反应.

取 2.0 mL 乙腈并将其加入到 10 mL 反应瓶中, 再加入 20 mg 浅蓝霉素 M (**5**) (0.1 mmol, 1.0 equiv.)和 82.73 mg Ag_2CO_3 (0.3 mmol, 3.0 equiv.), 然后加入 4Å 分子筛,

N_2 保护下升温至 80 °C, 避光搅拌 1 h, 然后加入 105.9 mg (0.3 mmol, 3.0 equiv.) 新鲜制备的溴代鼠李糖供体 **9**, 继续避光搅拌至原料消失, 冷却至室温. 用硅藻土过滤, 滤液减压浓缩后硅胶柱色谱分离(CH_2Cl_2 -MeOH, $V:V=4:1$)得浅蓝霉素 M-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(**6**) 20 mg, 收率 42.4%, 白色粉末. $[\alpha]_D^{20} -90.7$ (c 0.1, $CHCl_3$); UV ($CHCl_3$) λ_{max} [$\log \epsilon/(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$]: 244.5 (4.12), 280.5 (3.89) nm; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 10.10 (s, 1H), 8.68 (ddd, $J=4.8, 1.8, 0.9$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.84 (td, $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.35 (ddd, $J=7.6, 4.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 5.47 (dd, $J=10.0, 3.5$ Hz, 1H), 5.44 (dd, $J=3.6, 1.8$ Hz, 1H), 5.16 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 3.88 (dq, $J=9.9, 6.2$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.17 (d, $J=6.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 193.3, 170.2, 170.1 $\times 2$, 163.7, 159.0, 154.6 $\times 2$, 149.5, 137.2, 124.7, 121.5, 112.8, 108.8, 95.1, 70.6, 69.2, 68.7, 68.1, 21.0, 20.9 $\times 2$, 17.6; IR (KBr) ν_{max} : 2925, 1752, 1583, 1372, 1221, 1034, 885, 798, 750 cm^{-1} ; HRESIMS calcd for $C_{23}H_{25}N_2O_9$ $[M+H]^+$ 473.1555, found 473.1559.

3.2.7 浅蓝霉素 H-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(**7**)的合成

取 2 mL THF 并将其加入到 10 mL 反应瓶中, 加入 7.1 mg 上面制备的化合物 **6** (0.015 mmol, 1 equiv.) 和 15.1 mg $NH_2OH \cdot HCl$ (0.218 mmol, 15 equiv.), 然后滴加 20 μL 吡啶 (0.29 mmol, 17 equiv.), 搅拌 15 min. 反应结束后用微孔滤膜滤去不溶物, 滤液减压浓缩后硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇, $V:V=40:1$)得浅蓝霉素 H-4-基 α -L-(2,3,4-三-O-乙酰基)吡喃鼠李糖苷(**7**) 7.2 mg, 收率 98.6%, 淡紫色粉末. $[\alpha]_D^{20} -79.0$ (c 0.1, $CHCl_3$); UV ($CHCl_3$) λ_{max} [$\log \epsilon/(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$]: 246.5 (4.28), 279.3 (4.02) nm; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 8.86 (s, 1H), 8.69 (ddd, $J=4.8, 1.7, 0.9$ Hz, 1H), 8.40 (dt, $J=7.9, 1.1$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.10 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.83 (td, $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.34 (ddd, $J=7.6, 4.8, 1.2$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J=10.0, 3.5$ Hz, 1H), 5.46 (dd, $J=3.5, 1.8$ Hz, 1H), 5.18 (t, $J=9.9$ Hz, 1H), 3.92 (dq, $J=9.9, 6.3$ Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.20 (d, $J=6.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C : 170.2 $\times 2$, 170.1, 163.2, 158.2, 155.3, 153.5, 150.9, 149.4, 137.2, 124.3, 121.6, 109.4, 108.2, 94.9, 70.8, 69.4, 68.8, 68.0, 21.0, 20.9 $\times 2$, 17.6, $^1J_{C-1,H-1}=174.82$ Hz; IR (KBr) ν_{max} : 3426, 2924, 2360, 1752, 1581, 1371, 1224, 1040, 976, 797, 748 cm^{-1} ;

HRESIMS calcd for $C_{23}H_{26}N_3O_9$ $[M+H]^+$ 488.1664, found 488.1663.

3.2.8 浅蓝苷 K(浅蓝霉素 H-4-基 α -L-吡喃鼠李糖苷(**1**))的合成

取 1.2 mL 甲醇于 10 mL 反应瓶中, 加入 7 mg (0.014 mmol) 上面制备的化合物 **7**, 然后滴加 1 mol/L MeONa/MeOH 溶液至 pH 9.0, 室温搅拌 15 min. 反应结束后用活化好的氢离子交换树脂中和至 pH 7.0, 微孔滤膜过滤, 滤液抽干即得目标产物浅蓝苷 K (**1**) 5 mg, 收率 99.0%, 淡紫色粉末. m.p. 226~228 °C; $[\alpha]_D^{20} -86.7$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} [$\log \epsilon/(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$]: 237.5 (4.21), 273.5 (3.87) nm; IR (KBr) ν_{max} : 3330, 2933, 2362, 1735, 1561, 1358, 1204, 1029, 995, 838, 797 cm^{-1} ; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6)和 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6)见表 4; HRESIMS calcd for $C_{17}H_{20}N_3O_6$ ($M+H^+$) 362.1347, found 362.1342.

3.2.9 肿瘤细胞增殖抑制活性评价

采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)测试化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性^[26]. 用含体积分数为 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞配成单个细胞悬液(贴壁细胞和悬浮细胞的密度分别为 5×10^4 和 9×10^4 个/mL), 按照每孔 90 μL 接种到 96 孔板中, 在体积分数为 5% 的 CO_2 、37 °C 条件下预培养 24 h. 每孔加入 10 μL 待测样品溶液[用二甲基亚砜(DMSO)溶解样品配制成 1000 $\mu mol/L$ 初始浓度, 采用十倍稀释法用 RPMI-1640 培养液稀释成 6 个浓度梯度], 每种浓度均设 3 个复孔. 将细胞置于培养箱培养 48 h, 实验分为空白组(Blank)、对照组(Control)、药物组(Drug)和阳性对照组(盐酸阿霉素 Doxorubicin). 然后, 每孔直接加入 10 μL CCK-8 溶液原液(悬浮细胞)或吸出孔内旧培养基和药物溶液, 每孔加入 100 μL 用体积分数为 10% 的胎牛血清培养液稀释 10 倍的 CCK-8 溶液(贴壁细胞), 在体积分数为 5% 的 CO_2 、37 °C 继续培养 1~4 h. 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度, 记录原始数据结果. 用 Excel 软件进行原始数据标准化处理, 通过每孔 OD 值计算初筛细胞增殖抑制率: 抑制率 (%) = $[(OD_{Control} - OD_{Drug}) / (OD_{Control} - OD_{Blank}) \times 100\%]$. 通过 GraphPad Prism 8(版本 8.0.2, GraphPad Software Inc)计算 50% 抑制率的样品浓度(IC_{50}).

辅助材料(Supporting Information) 化合物的 HRESIMS、 1H NMR、 ^{13}C NMR 和红外谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Funk, A.; Divekar, P. V. *Can. J. Microbiol.* **1959**, *5*, 317.
- [2] McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Wright, J. L. C.; Vining, L. C. *Can. J.*

- Chem.* **1977**, 55, 4159.
- [3] McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C.; Vining, L. C.; Arsenault, G. P. *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 1836.
- [4] Vinning, L. C.; McInnes, A. G.; McCulloch, A. W.; Smith, D. G.; Walter, J. A. *Can. J. Chem.* **1988**, 66, 191.
- [5] Fu, P.; Wang, S.; Kui, H.; Li, X.; Liu, P.; Wang, Y.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1751.
- [6] Mei, X.; Lan, M.; Cui, G.; Zhang, H.; Zhu, W. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6, 3566.
- [7] Zhu, W.; Mei, X.; Fu, P.; Wang, Y.; Liu, P. *CN 201711123022.7*, **2021**.
- [8] Fu, P.; Zhu, Y.; Mei, X.; Wang, Y.; Jia, H.; Zhang, C.; Zhu, W. *Org. Lett.* **2014**, 16, 4264.
- [9] Zhu, Y.; Zhang, Q.; Li, S.; Lin, Q.; Fu, P.; Zhang, G.; Zhang, H.; Shi, R.; Zhu, W.; Zhang, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 18750.
- [10] Wang, C.; Liu, P. P.; Wang, Y.; Sun, K. L.; Jia, H. J.; Zhu, W. M. *Chin. J. Mar. Drugs* **2014**, 33, 34 (in Chinese).
(王聪, 刘培培, 王义, 孙坤来, 贾海建, 朱伟明, 中国海洋药物, **2014**, 33, 34.)
- [11] (a) Koenig, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 957.
(b) Kroger, L.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 467.
(c) Stazi, F.; Palmisano, G.; Turconi, M.; Clini, S.; Santagostino, M. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1097.
(d) Fan, J.; Brown, S. M.; Tu, Z.; Kharasch, E. D. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 752.
(e) Kimmel, R.; Kafka, S.; Košmrlj, J. *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, 768.
- [12] (a) Roy, R.; Tropper, F. *Synth. Commun.* **1990**, 20, 2097.
(b) Qiao, Z.; Liu, H.; Sui, J. J.; Liao, J. X.; Tu, Y. H.; Schmidt, R. R.; Sun, J. S. *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 11480.
- [13] (a) Lerner, L. M. *Carbohydr. Res.* **1990**, 207, 138.
(b) Chatterjee, S. K.; Nuhn, P. *Chem. Commun.* **1998**, 16, 1729.
(c) Nicotra, F.; Panza, L.; Romano, A.; Russo, G. J. *Carbohydr. Chem.* **1992**, 11, 397.
- [14] (a) Schmidt, R. R. *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213.
(b) Sasaki, M.; Tachibana, K.; Nakanishi, H. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6873.
(c) Heuckendorff, M.; Poulsen, L. T.; Jensen, H. H. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 4988.
(d) Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; McDevitt, R. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 270.
- [15] (a) Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731.
(b) Schmidt, R. R. *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213.
(c) Lutteroth, K. R.; Harris, P. W. R.; Wright, T. H.; Kaur, H.; Sparrow, K.; Yang, S. H.; Cooper, G. J. S.; Brimble, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 5602.
- [16] Zhu, Y.; Xu, J.; Mei, X.; Feng, Z.; Wang, L.; Zhang, Q.; Zhang, G.; Zhu, W.; Liu, J.; Zhang, C. *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 943.
- [17] Lin, C. H.; Wen, H. C.; Chiang, C. C.; Huang, J. S.; Chen, Y. C.; Wang, S. K. *Small* **2019**, 15, 1900561.
- [18] (a) Zhang, X. P.; Liu, J.; Zhang, J. X.; Huang, J. H.; Wan, C. Z.; Li, C. H.; You, X. Z. *Polyhedron* **2013**, 60, 85.
(b) Lopez-Ogalla, J.; Saiz, G.; Palomo, F. E. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, 17, 120.
- [19] Cai, M. S.; Li, Z. J. In *Carbohydrate Chemistry*, Chemical Industry Press, Beijing, **2006**, pp. 370~373 (in Chinese).
(蔡孟深, 李中军, 糖化学, 化学工业出版社, 北京, **2006**, pp. 370~373.)
- [20] Ma, W.; Bi, J.; Zhao, C.; Zhang, Z.; Liu, T.; Zhang, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, 28, 115141.
- [21] Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16805.
- [22] Xue, S. T.; He, W. Y.; Ma, L. L.; Wang, H. Q.; Wang, B.; Zheng, G. H.; Ji, X. Y.; Zhang, T.; Li, Y. H.; Jiang, J. D.; Li, Z. R. *Molecules* **2013**, 18, 3789.
- [23] Mukhopadhyay, B.; Kartha, K. P. R.; Russell, D. A.; Field, R. A. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7758.
- [24] Ikeda, K.; Morimoto, T.; Kakiuchi, K. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 6279.
- [25] Li, J.; Wang, M.; Jiang, X. *Org. Lett.* **2021**, 23, 9053.
- [26] Ma, H.; Wang, L.; Xu, Z.; Zhang, Y.; Li, X.; Zhu, W. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, 36, 1839 (in Chinese).
(马红光, 王立平, 徐志红, 张亚鹏, 李霞, 朱伟明, 有机化学, **2016**, 36, 1839.)
- [27] Cerny, M.; Zachystalova, D.; Pacak, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1961**, 26, 2206.
- [28] Jeanes, A.; Wilham, C. A.; Hilbert, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 3667.

(Zhao, C.)