

③ 295-301

HMQC-TOCSY 技术在植物环肽和配糖体中的应用*

滕荣伟^a, 王德祖^{a**}, 李朝明^a, 丁中涛^b, 杨崇仁^a

(^a 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204) (^b 云南大学化学系, 昆明 650091)

Q946

摘 要 核磁共振 HMQC-TOCSY 二维技术可在氢谱方向和碳谱方向分别得到独立的自旋系统内氢核和碳核的全相关信息。该技术对于分子内具有多个自旋系统的植物环肽和配糖体的结构解析尤为适用。本文以环肽 annosquamosin A 和三萜皂甙 prostratoside A 为例说明该技术在这两类化合物中的应用。

关键词 HMQC-TOCSY, 植物环肽, 配糖体, Annosquamosin A, Prostratoside A

~~结构~~ NMR

1 引言

核磁共振同核 TOCSY 技术能有效地实现偶合网络内偶合氢核之间相干的任意步传递。当复杂分子具有若干独立的自旋系统而在某些区域里谱峰严重重叠时, 该方法可较好的分辨各个不同自旋系统内的氢核。

同核 TOCSY 所用的脉冲序列为: $90^\circ_\phi - t_1 - t_m - \text{检测}$ 。在液体同核系统中, 当混合期内采用强射频场或特殊设计的脉冲序列照射时, 两个标量偶合核之间建立 Hartmann Hahn 匹配条件, 自旋系统内的各个核之间, 不论有无直接偶合, 磁化矢量间进行各向同性混合并发生相干传递。混合时间的长短决定相干传递的键的数目。混合期可以是单个脉冲, 也可以是组合脉冲, 如 Mlev-16, Mlev-17, Waltz-16, Dipsi2 等^[1-3]。

TOCSY 实验中的混合脉冲序列也可用于异核接力相关实验。若用 Mlev-17 序列代替异核接力相关实验的最后一个 90°_H 脉冲, 灵敏度可以提高一倍。脉冲序列见图 1。

图 1b 方法, 采用 Mlev-17 代替最后一个 90°_H 脉冲, 运用同核 Hartmann Hahn 机理, 在偶合的氢核之间进行磁矢量传递, 改进了磁矢量的传递效率^[4]。与同核 TOCSY 技术类似, 图 1b 实验中混合时间的长短, 将决定相干传递的键的数目。若混合时间只影响直

收稿日期 1999-03-19 收修改稿日期 1999-04-19

* 中科院昆明植物所植物化学开放实验室资助项目

滕荣伟, 男, 1975 年出生, 在读博士 ** 通讯联系人

121

接相连的质子, 谱图与异核接力相关实验相同. 当选择合适的混合时间完整建立自旋系统内所有质子的相关时, 该实验不但在氢谱方向得到独立自旋系统内每个碳与该系统内所有氢的相关; 而且在碳谱方向得到自旋系统内每个氢与该系统内所有碳的相关. 因此, 称为 HMQC - TOCSY 实验.

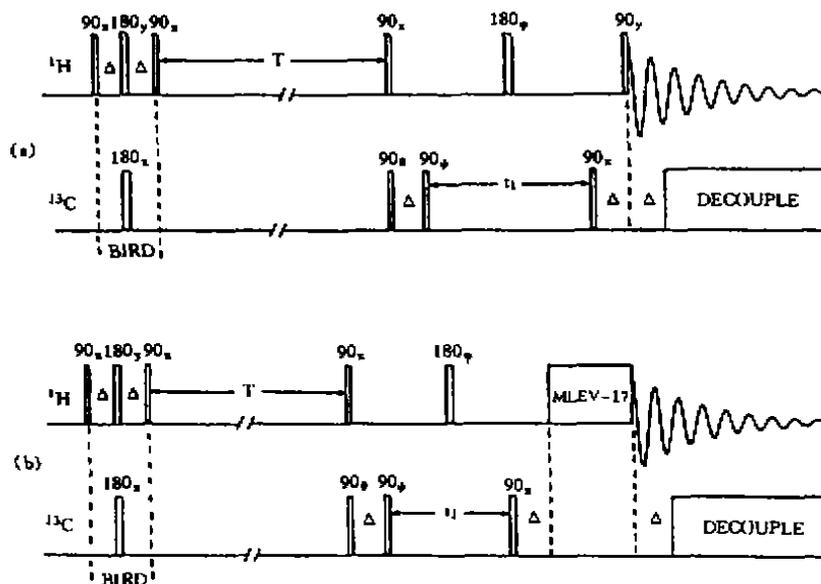


图 1 ^1H 检测的异核接力脉冲序列 (a) RELAY (b) 用 TOCSY 序列混合脉冲的 RELAY, 当混合时间较短时, 得异核接力谱 (HMQC - COSY); 当混合时间足以建立整个偶合网络的相关时, 得 HMQC - TOCSY 图谱

Fig. 1 Pulse sequence of ^1H -detected heteronuclear RELAY spectroscopy (a) RELAY (b) RELAY with TOCSY, when mixing time is short, afford heteronuclear RELAY spectroscopy (HMQC - COSY); when mixing time is long enough, afford HMQC - TOCSY

植物环肽的分子由多个氨基酸残基组成, 而植物配糖体的糖基部分往往具有多个糖单元. 由于各个自旋系统间的化学位移接近, 这类化合物的 NMR 图谱, 谱峰重叠, 难以解析, 给结构鉴定带来了很大的困难. 应用 HMQC - TOCSY 技术, 只要自旋系统内有一个氢和一个碳的 NMR 信号与其他系统不重叠, 就有可能将各个不同的自旋系统区别开, 并对谱线进行归属. 但由于 TOCSY 实验不能揭示标量偶合核之间磁矢量的传递过程, 得到的谱图不能区分直接或接力两种相关峰. 因此, 有必要测定 ^{13}C - ^1H 相关谱 (HMQC 或 ^{13}C - ^1H COSY), 对比两谱可以区分直接或接力两种相关峰; 或采用异核接力相关实验, 以取得每个自旋系统的接力信息. 应用 HMQC-TOCSY, 结合 ^1H - ^1H COSY 和 HMQC 实验, 就可以对每个自旋系统内的氢核和碳核进行全归属.

2 实验部分

2.1 样品

1 Annosquamosin A:

为番荔枝科番荔枝属植物番荔枝 (*Annona squamosia*) 的种子中分离得到的一个含有

8 个氨基酸残基的环肽, 分子式为 $C_{39}H_{61}O_{11}N_8S_1$, 氨基酸组成为 Pro、Thr、Ala、Ile、Val、Gly、Tyr 和含硫的非蛋白质氨基酸(OMet), 结构见图 2^[5]。

2 Prostratoside A:

为石竹科多莢草属植物多莢草 (*Polycarpon prostratum* (Forssk.) Aschers. et Schwein. ex Aschers.) 中分离得到的一个齐墩果烷型五环三萜皂甙, 分子式为 $C_{54}H_{86}O_{24}$ 。其甙元的结构与柴胡皂甙元相似, 糖基部分由一个阿拉伯糖(Ara)、一个木糖(Xyl)和两个葡萄糖(Glc)组成, 结构见图 3^[6]。

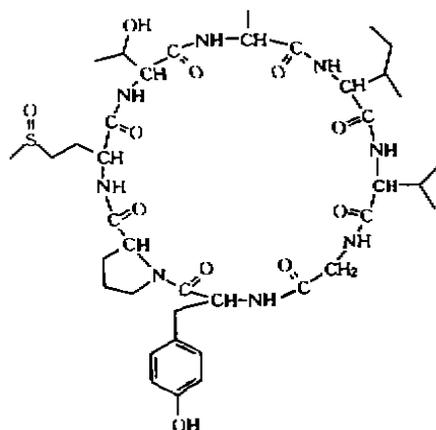


图 2 Annosquamosin A 的结构

Fig. 2 Structure of annosquamosin A

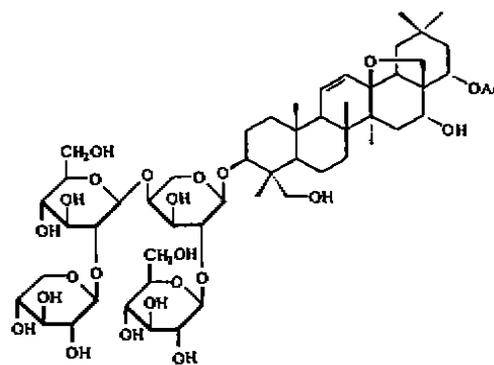


图 3 Prostratoside A 的结构

Fig. 3 Structure of prostratoside A

样品 1(约 40mg)和 2(约 35mg)溶于 0.4mL 的氘代吡啶中进行核磁共振谱测试。

2.2 仪器及测定

Bruker DRX-500 超导核磁共振仪, 500.13MHz(1H)和 125.76MHz(^{13}C), 于室温下用 $\phi 5mm$ 反相探头(BBI)进行测定。溶剂提供氘锁信号兼作内标, 采用正交检测。实验所用脉冲序列为 inv4mltp^[4], TPPI 相敏方式, 采样数据矩阵为 256×1024 , F_1 和 F_2 维均采用相移 90° 的正弦窗函数, 零填充至 512×1024 进行 FT 变换, 常规 2D 图谱相敏方式相位校正。annosquamosin A 混合时间采用 105ms, 每一个 t_1 累加 88 次; prostratoside A 混合时间采用 185ms, 每一个 t_1 累加 64 次; 分别得到它们的 HMQC-TOCSY 谱。

3 实验结果与讨论

3.1 Annosquamosin A:

文献[5]中采用 $^1H-^1H$ COSY 和 $^{13}C-^1H$ COSY 技术来确定该环肽氨基酸残基的自旋系统。如前所述, 当 NMR 谱峰重叠或位置接近时, 如 Tyr 的 $\alpha-H$ 和 Thr 的 $\alpha-H$ 几乎重叠, 而 Ile 的 $\alpha-H$ 和 $-NH$ 与 Ala 的 $\alpha-H$ 和 $-NH$ 只有很小的化学位移差; 碳谱上如 Ile 的 $\beta-C$ 和 Tyr 的 $\beta-C$ 化学位移也很接近, 因此, 很难用上述技术得到准确的指定。应用 HMQC-TOCSY 技术(谱图见图 4), 从每个氨基酸残基内任一个氢和碳的相关点出发, 在氢谱方向, 可以得到每个自旋系统内所有氢的信号; 在碳谱方向, 可以得到每个自旋系统内的所有碳的信号。即使自旋系统之间氢或碳的化学位移只有很小的差异, 用 HMQC

-TOCSY 技术可以清楚区分每一个自旋系统. 例如, 从 Ala 的 α -H 与其 α -C 相关峰出发, 沿碳谱和氢谱方向做直线, 分别得到与 δ 52.06(α -C)和 δ 18.30(β -C)以及 δ 7.72(NH)、 δ 4.80(α -H)和 δ 1.61(β -H)的相关信号; 从 Ile 的 γ -H 与 δ -C 的相关峰出发, 沿碳谱方向, 得到 δ 55.88(α -C)、 δ 36.73(β -C)、 δ 24.53(γ -CH₂)、 δ 17.48(γ -CH₃)和 δ 11.31(δ -C)的相关信号. 以此类推, 即可对各个氨基酸残基的相应谱线一一进行指定. 指定的结果用 HMQC 和 HMBC 加以验证, 从而对文献[5]中氨基酸残基的指定作出修正(表 1).

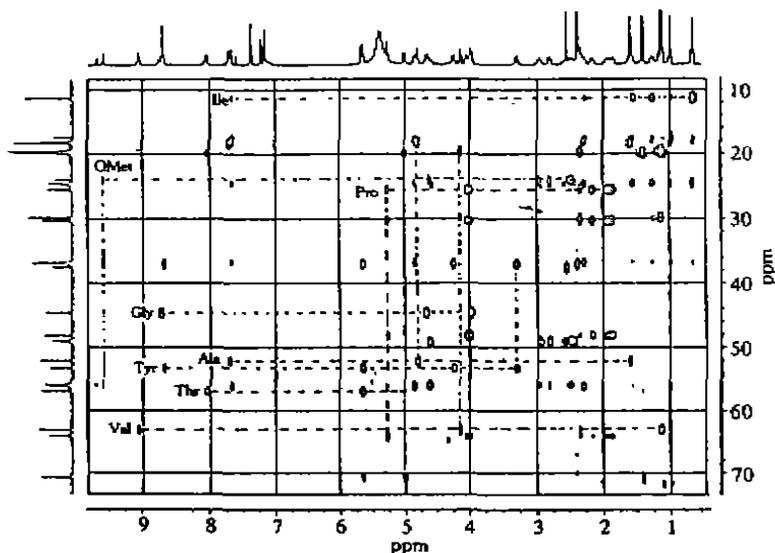


图 4 Annosquamosin A 的 HMQC-TOCSY 图谱

Fig. 4 HMQC-TOCSY spectrum of Annosquamosin A

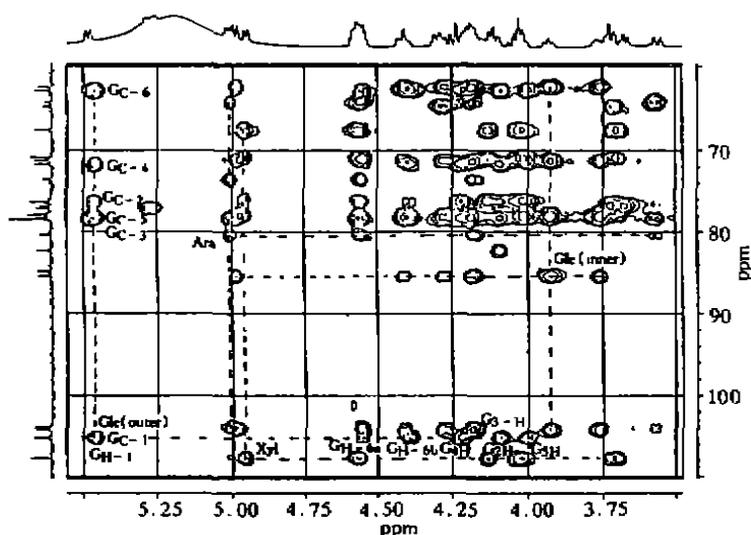


图 5 Prostratoside A 的 HMQC-TOCSY 图谱

Fig. 5 HMQC-TOCSY spectrum of Prostratoside A

表 1 Annosquamosin A ^1H 和 ^{13}C NMR 指定数据与文献值的比较
(溶剂:吡啶- d_5 , 偶合常数 J/Hz)

Tab 1 Comparison of ^1H and ^{13}C NMR data of Annosquamosin A with reference (δ in pyridine)

	$^{13}\text{C}/\text{ppm}$					$^1\text{H}/\text{ppm}$						
	CO	α	β	γ	δ	α	β	γ	δ	NH		
Pro	176.90	64.08	30.25	25.49	48.17	5.27(dd)	2.34(dd)	2.15(m)	4.14(dd)			
						J=9.72, 7.22	J=13.6, 7.22		J=7.22, 3.75			
							1.94(m)	1.86(m)	4.04(m)			
文献值	176.91	64.11	30.29	25.54	48.17	5.27(t, 8.4)	2.35(m)	1.95(m)	2.20(m)	1.88(m)	4.01(m)	
OMet	172.27	56.09	24.83	49.21	37.51(Me)	4.63(m)	2.56(m)	2.97(m)	2.54(s)(Me)	9.67(d, J=4.17)		
		[55.99]	[24.00]	[48.95]	[36.7](Me)	[4.58(m)]	[2.50(m)]	[2.80(m)]	[2.38(s)(Me)]	[9.58(d, J=4.17)]		
文献值	172.34	55.98	24.82	49.42	37.70(Me)	4.60(m)	2.56(m)	2.35(m)	2.95(m)	2.82(m)	2.56(s)	9.72(d, J=3.5)
Thr	172.42	56.89	70.94	19.85		5.64(d)	4.99(dd)	1.41(d)		8.06(d)		
						J=6.94	J=6.94, 6.71	J=6.71		J=10.38		
文献值	172.45	53.48	70.76	19.93		5.65(m)	5.03(m)	1.43(d)		8.72(d)		
								J=6.0		J=9.9		
Ala	174.30	52.06	18.03			4.80(t)	1.61(d)			7.72(d)		
						J=7.22	J=7.22			J=7.22		
文献值	174.09	56.09	18.31			4.86(t)	1.61(d)			7.73(d)		
						J=9.8	J=7.4			J=9.3		
Ile	172.27	55.88	36.73	24.53(CH ₂), 11.31		4.85(dd)	2.28(m)	1.56(m), 1.24(m)(CH ₂)	0.64(d)	7.68(d)		
				17.48(CH ₃)		J=10.56, 9.44		0.99(d, J=6.67)(CH ₃)	J=7.50	J=9.44		
文献值	172.28	52.04	36.82	24.65(CH ₂) 11.41		4.80(t)	2.35(m)	1.58(m), 1.28(m)(CH ₂), 0.64(t)	7.77(d)			
				17.53(CH ₃)		J=7.2		0.99(d, J=10.2)(CH ₃)	J=15.2	J=11.0		
Val	172.29	63.09	29.80	19.71		4.14(dd)	2.34(m)	1.14(d, J=6.05)		9.06(d)		
				19.57		J=3.89, 6.67		1.12(d, J=6.94)		J=3.89		
文献值	172.45	63.16	29.84	19.73		4.14(dd)	2.35(m)	1.15(d, J=6.7)		9.14(d)		
						J=3.5, 6.4		1.12(d, J=6.8)		J=3.4		
Gly	170.80	44.64				4.67(dd, J=6.67, 16.67)				8.72(t)		
						3.96(dd, J=6.67, 16.67)				J=6.67		
文献值	170.88	44.69				4.67(dd, J=6.5, 16.9)				8.76(t)		
						4.01(m)				J=6.2		
Tyr	173.13	53.23	36.87	129.83	116.22	5.66(dd)	4.24(dt)	7.16(d)(b)	7.37(ddd)(e)	8.68(t)		
					157.43(e)	J=12.56, 5.01	J=4.44, 15.56	J=8.89	J=2.49, 4.44, 8.89	J=5.01		
						3.30(dd, J=12.56, 15.56)						
文献值	173.0	56.97	37.15	129.44	116.30	5.65(m)	4.25(d, J=14.8)	7.18(d)	7.38(d)(e)	8.07(d)		
					157.44(e)	3.30(dd, J=12.6, 15.4)	J=8.4	J=8.4		J=8.1		

注: [] 内为 OMet 另一种构型的 NMR 数据

我们还应用 2D 同核 J 分解谱获得比较准确的化学位移和偶合常数. 从图谱上发现 OMe_t 残基存在两组 NMR 信号, 推测可能是由样品中混有仅只 OMe_t 残基构型不同的环肽所引起的.

3.2 Prostratoside A:

HMQC-TOCSY 可以获得每个糖基内氢与碳的化学位移(图谱见图 5). 例如, 末端 β-D-葡萄糖吡喃糖基, 从其端基氢与端基碳的相关峰出发, 沿碳谱和氢谱方向做直线; 从低场往高场, 碳谱方向, 找到化学位移 δ105.2、δ78.4、δ77.9、δ76.3、δ71.2 和 δ62.9 的碳与端基氢的相关信号. 与文献[7]中的¹³C 数据比较, 推定它们分别是该葡萄糖基的 C-1、C-3、C-5、C-2、C-4 和 C-6. 氢谱方向找到 δ5.46、δ4.55、δ4.38、δ4.23、δ4.21、δ4.09 和 δ4.00 的氢与端基碳的相关信号. 在此基础上, 根据 DQF-COSY, 从该糖基的端基氢和末端氢出发, 采用两头向中间推的办法, 指定每个糖基自旋系统内氢的化学位移. 从 H-1(δ5.46)指定 H-2(δ4.09), 由 H-2 指定 H-3(δ4.21); 从 H-6b(δ4.38)指定 H-5(δ4.00), 从 H-5 指定 H-4(δ4.23). 应用同样的方法分别指定了其他糖基的氢与碳的化学位移. 结果见表 2.

表 2 Prostratoside A 糖基的¹H NMR 和¹³C NMR 数据(溶剂:吡啶-d₅, δ/ppm, J/Hz)

Tab. 2 ¹H NMR and ¹³C NMR spectra data of the sugar moiety of Prostratoside A(δ in pyridine)

位置	Prostratoside A			位置	Prostratoside A		
	ref [7] ¹³ C	¹³ C	¹ H		ref [7] ¹³ C	¹³ C	¹ H
3-Ara				Xyl			
1	104.1	104.1	5.00(d, J=5.85)	1	107.7	107.7	4.96(d, J=7.08)
2	80.3	80.4	4.56(m) ^b	2	76.2	76.2	4.02(m)
3	73.5	73.4	4.17(m) ^c	3	77.9	77.7 ^a	4.13(m) ^c
4	78.1	78.2	4.17(m) ^c	4	70.7	70.8	4.13(m) ^c
5	64.3	64.3	4.56(m) ^b ; 3.57(br d, J=11.80)	5	67.5	67.6	4.57(m); 3.71(m)
Glc(inner)				Glc(outer)			
1	103.7	103.8	4.98(d, J=7.84)	1	105.1	105.2	5.46(d, J=7.84)
2	85.5	85.4	3.92(dd, J=7.93, 7.65)	2	76.2	76.3	4.09(m)
3	77.7	77.7 ^a	4.18(m) ^d	3	78.4	78.4	4.21(m)
4	71.1	71.7	4.18(m) ^d	4	71.5	71.2	4.23(m)
5	78.4	78.2	3.75(m)	5	78.3	77.9	4.00(m)
6	62.4	62.4	4.40(m); 4.27(m)	6	62.8	62.9	4.55(m); 4.38(m)

注:^a信号重叠。

以上两个例子说明, HMQC-TOCSY 技术对具有若干独立自旋系统的复杂分子的结构解析有十分重要的作用. 当选择恰当的混合时间(t_m)使多步接力达到自旋系统的末尾时, 即使自旋系统间谱峰严重重叠, 只要自旋系统内有一个氢和碳的化学位移位置与其他系统不重叠, 就可以从该氢与该碳的相关峰出发, 在氢谱方向得到该系统内所有氢的化学位移; 在碳谱方向得到该系统内所有碳的化学位移, 从而对该自旋系统作出较准确的归

属. 在天然产物化学中, 这一技术对于植物环肽和植物配糖体的结构解析, 是一个十分有力的手段.

参 考 文 献

- 1 Braunschweiler L, Ernst R R. *J Magn Reson*, 1983, 53:521 - 528
- 2 Bax A, Davis D G. *J Magn Reson*, 1985, 65:355 - 360
- 3 翟纯. *波谱学杂志*, 1992, 9(1):59 - 65
- 4 Lerner L, Bax A. *J Magn Reson*, 1986, 69:375 - 380
- 5 (a) Li Chaoming, et al. *Pytochem*, 1997, 45(3):521 - 523; (b) Li Chaoming, et al. *Phytochem*, 1998, 47(8):1668 - 1669
- 6 Ding Zhongtao, et al. *Chinese Chemical Letters*, 1999, 特发表
- 7 Shoji N, Umeyama A, et al. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(9):1750

THE APPLICATION OF HMQC-TOCSY TO THE PLANT GLYCOSIDES AND PLANT CYCLOPEPTIDES

Teng Rongwei^a, Wang Dezu^{a*}, Li Chaoming^a, Ding Zhongtao^b and Yang Chongren^a

(*Kunming Institute of Botany, The Chinese Academic of Sciences, Kunming 650204)

(^bYunnan University, Department of Chemistry, Kunming 650091)

Abstract

HMQC - TOCSY experiment is a useful 2D NMR technique for elucidating structures of organic molecules that possess independent spin systems. From HMQC - TOCSY spectrum, we can obtain information of all the proton connectivities in the F_2 dimension and information of the carbon connectivity in the F_1 dimension for a given spin system, so the chemical shifts of both proton and carbon can be simultaneously assigned. In this paper, two examples, annosquamosin A, which is a cyclopeptide, and prostratoside A, which is a triterpenoidal saponin, are given to demonstrate the application of this technique to the natural products.

Key words HMQC - TOCSY, Annosquamosin A, Prostratoside A

* Correspondence author