波 谱 学 杂 志

第7卷 第3期
1990年 9月

Chinese Journal of Magnetic Resonance

Vol. 7 No.3
Sep. 1990

棉子糖乙酰化物的2D－NMR研究

李兴从 王德祖 杨崇仁**

（中国科学院昆明植物研究所植物化学研究室）

摘 要

应用氢－氢和碳－氢相关谱（^{1}H－^{1}H COSY and ^{13}C－^{1}H COSY），同核和异核J－分解谱（JRES and HETJRES），异核中继相干传递二维谱（RELAY）和异核远程化学位移相关谱（COLOC）研究了棉子糖乙酰化物的化学结构，并对COLOC及RELAY实验的参数取值进行了讨论。结果表明，二维核磁共振技术特别是COLOC对于确定配糖体糖基的连接顺序和连接位置是十分有效的方法。

关键词：二维核磁共振；棉子糖乙酰化物。

引 言

在植物天然配糖体成分的化学研究中，连接在配基上的糖基部分的结构测定是十分重要而又繁琐的步骤。这包括确定糖链上糖的种类、数目、构型、连接顺序和连接位置等。经典的方法是制备配糖体的甲基化衍生物而后以甲醇水解判别糖的种类、连接顺序和连接位置等。然而这仍需要其他的化学和物理手段相配合。且对于糖链较复杂的化合物，更难于鉴别。近十年来，二维核磁共振技术飞速发展，新方法和新手段不断涌现，为复杂天然化合物的结构测定开拓了广阔的前景。本文以棉子糖乙酰化物（1）为模型化合物进行数种二维核磁共振实验，从而讨论这些技术在配糖体结构解析中的应用。

实 验

所有NMR实验均在Bruker－Spectrospin AG AM－400超导核磁共振仪上进行。以$CDCl_3$为溶剂，TMS作内标。^{1}H NMR和^{13}C NMR的工作频率分别为400.13

收稿日期：1989年6月3日。收修改稿日期：1989年9月30日。 **通信联系人

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

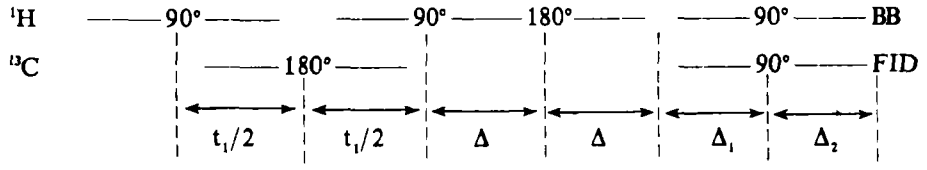
MHz和 100.62 MHz. $^1H-^1H$ COSY, $^{13}C-^1H$ COSY以及2D J-分解谱按常法测定.

一、棉子糖乙酰化物(1)的制备

棉子糖(上海化学试剂采购供应站,警后天山化工厂分装)500 mg溶于醋酐-吡啶(1:1)14 ml中,90°C条件下反应1.5 h,按常法处理得1.

二、异核中继相干传递二维谱(RELAY)实验

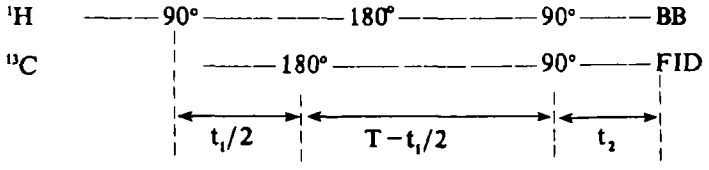
脉冲系列:



样品浓度200 mg/0.5 ml. F_1维谱为^1H谱,谱宽3000 Hz. F_2维谱为^{13}C谱,谱宽18000 Hz. 4096×512数据矩阵. $t_1=6$ μs, $Δ=14$ ms, $Δ_1=3.56$ ms, $Δ_2=1.78$ ms. 扫描次数64,取数时间20 h.

三、异核远程化学位移相关谱(COLOC)实验

脉冲系列:



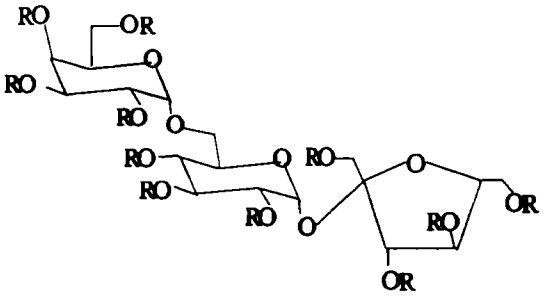
样品浓度200 mg/0.5 ml. F_1维谱为^1H谱,谱宽3000 Hz. F_2维谱为^{13}C谱,谱宽18000 Hz. 2048×512数据矩阵. $t_1=6$ μs, $T=165.6$ ms, $t_2=82.8$ ms. 扫描次数32,取数时间11 h.

结果和讨论

一、应用氢-氢和碳-氢相关谱($^1H-^1H$ COSY and $^{13}C-^1H$ COSY)对棉子糖乙酰化物(1)的化学位移的指定

棉子糖(Raffinose)(2)是存在于多种植物里的一种寡糖,其化学结构为α-D-半乳吡喃糖基(1-6)-α-D-葡萄吡喃糖基(1-2)-β-D-果呋喃糖. 1981年,Morris等应用二维碳-氢相关技术对它的碳谱和氢谱进行了指定[1]. 但乙酰化后,由于各碳及质子的酰化位移效应不同,应对乙酰化物的氢谱和碳谱信号进行重新指定.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1　R: Ac
2　R: H

首先，解析图谱的着手点是处于低场的端基碳和端基质子的共振信号。果糖基的端基碳是季碳，在氢谱中无共振信号。另两个端基碳的共振信号（δ: 95.36, 89.72）分别与两个端基质子的共振信号（δ: 5.126, 5.663）相关。参照 Morris 的工作，假定 89.72（C）/5.663（H）这一对是 α－D－葡萄吡喃糖基的端基碳和端基质子的共振信号，则另一对应属于 α－D－半乳吡喃糖基的共振信号。

应用 ^{1}H－^{1}H COSY 谱解析各糖基的自旋偶合系统。由于葡萄糖基的质子是一个 AHMRVX（Z）七自旋系统[2]，从其端基质子出发，根据相邻质子的偶合关系，依次可以找到 2 位，3 位，4 位，5 位和 6 位的质子。同理，半乳糖基上的各质子也被一一指定。在此基础上，返回到 ^{13}C－^{1}H COSY 谱，根据直接相连的碳和质子的偶合相关，可以对葡萄糖基和半乳糖基上各质子相对应的碳进行一一指定。其中葡萄糖基 6 位碳的化学位移向低场移至 65.62 ppm，表明这一位置上应连有一个糖基。显然，先前对葡萄糖基端基碳和质子的共振信号的假定是成立的。

果糖基的自旋偶合系统是这样建立的：参照棉子糖（2）的碳谱数据，首先推定 1 中果糖基的 3 位碳的共振信号为 76.04 ppm。应用 ^{13}C－^{1}H COSY 谱找出其 3 位质子的共振信号，它与半乳糖基 4 位质子的共振信号几乎完全重叠。根据 ^{1}H－^{1}H COSY 谱，依次可以确定 4 位，5 位和 6 位质子的共振信号。回到 ^{13}C－^{1}H COSY 谱上，它们的碳信号即可一一指定。最后剩下的一个碳共振信号 61.35 ppm 则只可能是果糖基 1 位碳的贡献。

二、应用二维 J－分解谱（2D J－resolved spectrum）确定 1 的偶合常数

碳水化合物的氢谱在一些频率范围内的共振信号比较密集，难于一一指定。测定 1 的同核 J－分解谱（JRES），有些重叠信号得到了很好的解析。通过辨析峰形和计算偶合常数，可以帮助结构分析。如 4.130－4.218 ppm 的复峰解析为 Ga_6－H 的四重峰和 F_1′－H 的二重峰；5.070－5.131 ppm 的复峰应是 Ga_1－H 的二重峰和 Ga_2－H 的四重峰的贡献；5.303－5.363 ppm 的复峰为 Ga_3－H 的四重峰和 F_4－H 的三重峰；而 5.450－5.508 ppm 的复峰为 G_3－H 的三重峰和 F_3－H 与 Ga_4－H 相互重叠的二重峰。在 4.250－4.544 ppm 的复峰为 F_1, F_6, Ga_5, F_5, F_6′和 G_6 六个质子的共振信号，各偶合裂分之间相互交叠，在我们的实验条件下，除较低场 F_1－H 的二重峰信号

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

外，其余信号及偶合裂分仍难于判别。仅能根据 $^1H-^1H$ COSY 和 $^{13}C-^1H$ COSY 谱得到各质子的大致顺序。

通过异核 J－分解谱（HETJRES），还确定了 1 中所有碳的 C－H 偶合常数。其中端基的 J（CH）为 173－175 Hz，亚甲基的 J（CH）为 146－156 Hz，而次甲基的 J（CH）为 129－134 Hz。

三、应用异核中继相干传递二维谱（Heteronuclear Relayed Coherence transfer spectroscopy, RELAY）确立 1 的各糖基片段的自旋偶合系统。

二维异核 RELAY 实验[3,4]通过 $^1H-^1H$ 相干中继传递到 ^{13}C 核上，从而得到 C－C 相关的信息。即在 RELAY 谱上，除了直接相连的 C－H 相关峰，还显示出与邻碳氢的中继相干传递相关峰（R），据此即可找出与之相连的 C 的信号。与此类推，即能得到分子骨架的信息。但若含有季碳和杂原子（如氧），相干传递就不能进行。我们应用该技术，对 1 的各糖基片段的分子骨架（果糖基从 3 位开始）作了分析，进一步验证了 COSY 谱的指定。例如，在葡萄糖基片段中，G_1-C 除与 G_1-H 相关外，还与 G_2-H 相关，通过 G_2-H 即可找到 G_2-C；而 G_2-C 又与 G_3-H 有 R 峰，通过 G_3-H 就可找到 G_3-C；余类推。显然，该技术是确定分子骨架片段的一种好方法，比 2D INADEQUTE[4,5,6] 灵敏度高，样品用量少，测定时间短。

RELAY 实验的关键是选择一个合适的混合时间 Δ，以使质子磁化矢量在转移给 ^{13}C 核之前有效地转移到下一个 ^1H 核。Δ、Δ_1 和 Δ_2 的取值依据为：$2\Delta+\Delta_1=1/[4J(HH)_{ave.}]$ 或 $\Delta=1/[4J(HH)_{max.}]$，$\Delta_1=1/[2\,^1J(CH)]=2\Delta_2$。对于化合物 1，应用以下参数 $\Delta=14$ ms（$J_{ave.}=7.9$ Hz，$J_{max.}=17.9$ Hz），$\Delta_1=3.56$ ms $=2\Delta_2$（$^1J(CH)=140$ Hz）进行实验得到了很好的 RELAY 谱（图 5），因参数的取值与 1 的实际 J 值较吻合。在图 5 中，除了半乳糖基的 4 位和 5 位的 R 峰很弱外，几乎所有的 H－H－C 的 R 峰都显示出来了。Ga_4 和 Ga_5 之间的 R 峰很弱可能是由于 Ga_4-H 和 Ga_5-H 的偶合很小（$^3J(HH)<0.5$ Hz），使磁矢量的中继转移受阻所致。故又取参数 $\Delta=29.6$ ms（$J_{ave.}=4.0$ Hz，$J_{max.}=8.4$ Hz），$\Delta_1=3.3$ ms $=2\Delta_2$（$^1J(CH)=150$ Hz）及 $\Delta=48.3$ ms（$J_{ave.}=2.5$ Hz，$J_{max.}=5.2$ Hz）（Δ_1 和 Δ_2 同上）进行 RELAY 实验。结果表明，随着 Δ 值的增大，所得图谱除后者显示一个较强的 G_5-C 和 G_4-H 的 R 峰外，仍不出现 Ga_5 和 Ga_5 之间的 R 峰，其余信息均较图 5 少得多。显然，对于 1 及其类似的配糖体和寡糖类化合物，第一组参数是一个较理想的 RELAY 实验条件。

四、应用异核远程化学位移相关谱（Heteronuclear Shift Correlation Spectroscopy Via Long Range Couplings, COLOC）确定 1 的糖基连接顺序和连接位置

$^1H-^1H$ COSY，$^{13}C-^1H$ COSY 以及 RELAY 能够确定各糖基的自旋偶合系统，

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

但仍不能给出糖基间相互的连接顺序和连接位置的"直接相关信息". COLOC 实验能够给出某一碳与隔碳或杂原子（如氧）键的碳上的氢的偶合相关信息[7], 因而可以用来确定配糖体中糖基之间被配糖键相隔的碳核与质子的相关关系. 在 1 的 COLOC 谱中, 所有与配糖键有关的相关峰都显示出来了. 例如, 果糖基的端基碳（F_2－C）除与 F_1－C 上的两个偕氢、F_4－H 及 F_5－H 相关外, 还与葡萄糖基的 1 位氢（G_1－H）相关, 因此可确定葡萄糖基的 1 位连在果糖基的 2 位上. 半乳糖基的 1 位碳除与 Ga_1－H 和 Ga_5－H 相关外, 还与葡萄糖基的 6 位氢（Ga_6－H）相关; 而葡萄糖基的 6 位碳又与半乳糖基的 1 位氢（Ga_1－H）相关, 因而可以确定半乳糖基的 1 位连在葡萄糖基的 6 位上. 至此, 三个糖基的连接顺序和连接位置就得以指定了. 另外, 还能得到许多重要的信息. 如葡萄糖基的 G_1－C 与 G_1－H 和 G_5－H 相关, 果糖基的 F_5－C 与 F_5－H, F_6－H, F_6－H′和 F_3－H 相关, F_3－C 与 F_1－H, F_1－H′, F_4－H 和 F_3－H 相关, 等等. 应用这些信息, 可以更清楚地确定 4.250－4.410 ppm 复峰中各质子的顺序. 这与 COSY 谱指定的结果是一致的.

在 COLOC 实验中, 必须选择一个合适的延迟时间 T. T 的取值参照所需观察的远程 C－H 核的偶合常数: 即 $T=1/[2\ ^nJ(CH)]=2t_2$. 我们选取以下四组参数进行 COLOC 实验: (1) T＝165.6 ms＝$2t_2$ (J(CH)＝3.1 Hz)（图 6）, (2) T＝200 ms＝$2t_2$ (J(CH)＝2.5 Hz), (3) T＝125 ms＝$2t_1$ (J(CH)＝4.0 Hz), (4) T＝100 ms＝$2t_2$ (J(CH)＝5.0 Hz), 结果表明, 第 (1) 组参数所得的图谱信息最多, 第 (3) 组稍次, 第 (2) 组最差, 但四次实验均能观察到与配糖键相关联的 C－H 偶合交叉峰. 可以认为, 应用 COLOC 实验确定配糖体和寡糖的糖基的连接顺序及位置, 延迟时间 T 以 J(CH)＝3.0－4.0 Hz 取值最佳, 这与一般配糖键的三键偶合常数 ^3J(HCOC) 约为 3.0－5.5 Hz[9] 是一致的.

五、二维核磁共振技术在配糖体结构解析中的应用

二维核磁共振技术对于配糖体的结构解析显示了很大的潜力. 在通常情况下, 应用 $^1H-^1H$ COSY 和 $^{13}C-^1H$ COSY 谱对糖基部分各单糖片段的自旋偶合系统进行指定, 然后与标准糖的甲基甙的碳谱数据比较, 分析"异常"的碳的化学位移值, 应用"配糖位移效应 (The glycosylation shift effect)", 即可推定糖基的连接顺序和连接位置. 在某些情况下, 应用二维 RELAY 谱确立各糖基的自旋偶合系统要比 COSY 谱优越得多[8]. 但这两类方法都不能给出糖基之间相连的"直接相关信息", 且应用于具复杂糖链结构的化合物往往受到一定的限制. 对于糖基的连接位置的确定, 已报道了不少方法, 如选择性 INEPT[9], 2D NOESY[2, 10], 2D－DEPT[11], 同核远程化学位移相关谱[12], 异核 NOE[13] 等. 实验结果表明, 对于配糖体中糖基的连接顺序和连接位置的确定, COLOC 谱不失为一种有用而又简便的方法.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 1和2的NMR谱数据

Tab. 1 NMR spectral data for 1 and 2 (δ: ppm, J: Hz)

	^{1}H NMR				^{13}C NMR			
	1 ($CDCl_3$)			2 (D_2O)	1 ($CDCl_3$)			2 (D_2O)
	δ		J (HH)	δ	δ		J (CH)	δ
F-1	4.398	d	12.4	3.66	61.35	t	129	62.23
	4.202	d	12.4					
2					104.47	d		104.60
3	5.459	d	4.5	4.22	76.04	d	156	77.16
4	5.352	t	4.5	4.06	75.55	d	156	74.81
5	4.318			3.89	79.57	d	154	82.15
6	4.380			3.77	63.08	t	129	63.27
	4.274							
G-1	5.663	d	3.7	5.43	89.72	d	175	92.90
2	4.765	dd	10.4, 3.6	3.56	70.13	d	150	71.77
3	5.482	dd	10.2, 9.9	3.77	69.08	d	152	73.48
4	5.010	t	10.2, 9.7	3.53	68.46	d	152	70.25
5	4.274			4.04	68.92	d	152	72.21
6	3.732	dd	11.0, 6.2	4.01	65.62	t	134	66.72
	3.530	dd	11.0, 1.7	3.69				
Ga-1	5.126	d	3.6	4.99	95.36	d	173	99.29
2	5.091	dd	10.6, 3.7	3.83	67.79	d	156	69.30
3	5.321	dd	10.6, 3.4	3.91	67.05	d	150	70.25
4	5.465			4.00	67.89	d	156	70.03
5	4.367			3.96	65.96	d	146	71.83
6	4.159	dd	11.3, 6.0	3.75	61.52	t	129	61.94
	4.041	dd	11.2, 7.0					

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

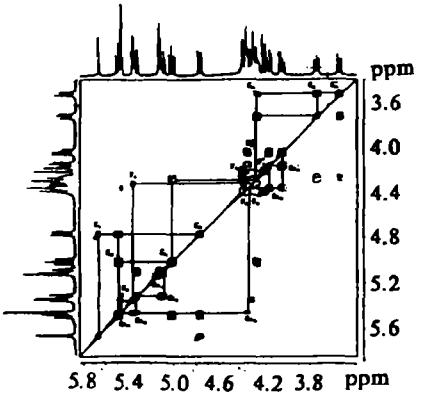


图 1　1 的二维氢 - 氢相关谱等高图.

Fig. 1　Contour plot of $^1H-^1H$ COSY of 1.

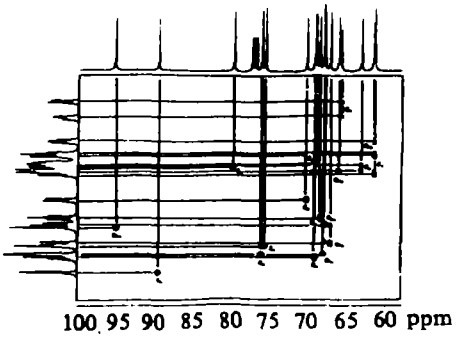


图2　1 的二维碳 - 氢相关谱等高图.

Fig. 2　Contour plot of $^{13}C-^1H$ COSY of 1.

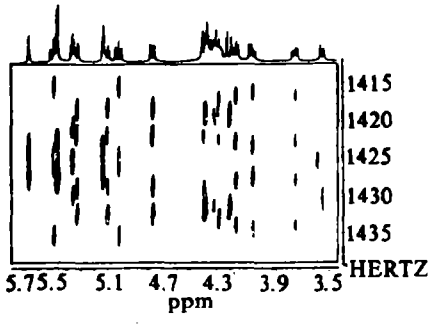


图 3　1 的二维同核 J- 分解谱等高图.

Fig. 3　Contour plot of homonuclear 2D J-resolved spectrum of 1.

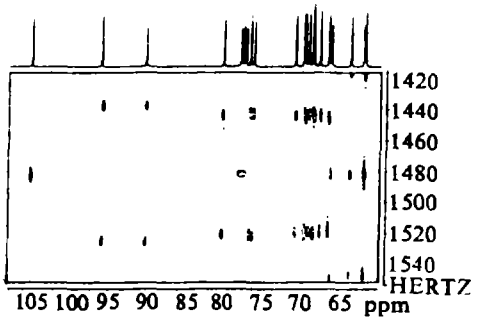


图4　1 的二维异核 J- 分解谱等高图.

Fig. 4　Contour plot of heteronuclear 2D J-resolved spectrum of 1.

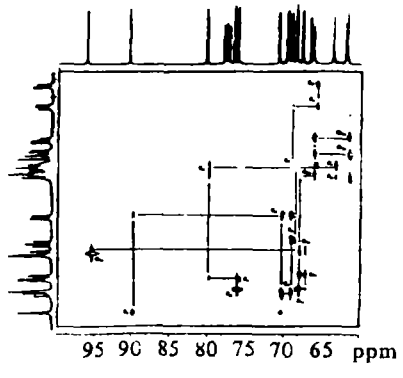


图 5　1 的二维异核 RELAY 谱等高图.

Fig. 5　Contour plot of heteronuclear 2D RELAY spectrum of 1.

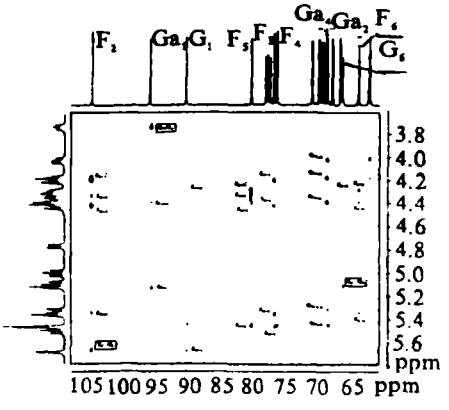


图 6　1 的二维 COLOC 谱等高图. 标有小矩形框的是糖基之间的偶合相关峰: 如 F_2-G_1 表示 F_2 碳与 G_1 氢之间的偶合相关; 糖内之间的偶合: 如 F_{2-1} 表示 F_2 碳和 F_1 氢之间的偶合相关.

Fig. 6　Contour plot of 2D *COLOC* spectrum of 1. Interglycosidic couplings are denoted by a small frame: e.g. F_2-G_1 means that the carbon F_2 is coupled with the proton G_1. Intra-unit coulpings: F_{2-1}, for example, represents a coupling between the carbon F_2 and the proton F_1.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献

[1] Gareth A. Morris and Laurence D. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4703 (1981)
[2] James H. Prestegard, Theodore A. W. Koerner, Jr., Peter C. Demou and Robert K. Yu., *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4993 (1982)
[3] Bolton, P. H., *J. Magn. Reson.* **48**, 336 (1982)
[4] Ad Bax, *J. Magn. Reson.*, **55**, 149 (1983)
[5] Ad Bax, Freeman, R. and Frenkiel, T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2102 (1981)
[6] Mareci, T. H. and Freeman, R., *J. Magn. Reson.*, **48**, 158 (1982)
[7] Kessler, H., Griensinger, C., Zarbock, J. and Loosli, H. R., *J. Magn. Reson.*, **57**, 331 (1984)
[8] Bigler, P., Ammann, W. and Richarz, R., *Org. Magn. Reson.*, **22** (2), 109 (1984)
[9] Ad Bax, Eagan, W. and Kovac, P., *J. Carbohydr. Chem.*, **3** (4), 593 (1984)
[10] Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J. M., Warren C. D. and Jeanloz, R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984)
[11] Batta, Gy. and Liptak, A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 369 (1985)
[12] Batta, Gy. and Liptak, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 248 (1984)
[13] Kover, K. E. and Batta, Gy. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 647 (1986)

2D-NMR STUDIES ON RAFFINOSE ACETATE

Li Xingcong Wang Dezu and Yang Chongren

(*Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

ABSTRACT

2D-NMR experiments of $^{1}H-^{1}H$ COSY, $^{13}C-^{1}H$ COSY, JRES, HETJRES, RELAY and COLOC were applied to the studying of raffinose acetate (1), a model compound used in this research work. The results show that these techniques are useful for structure elucidation of natural glycosides. It is noted that COLOC is a powerful tool for the determination of sequence and interglycosidic linkages of sugar moieties.

Key words: 2D-NMR; Raffinose acetate.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net