

二维核磁共振谱测定植物新环肽— 太子参环肽 A 和 B 中氨基酸序列^①

谭宁华^a 王德祖^{b*} 张宏杰^b
陈昌祥^b 周俊^b 赵守训^a

(a 中国药科大学植物化学室, 南京 210009; b 中国科学院昆明植物所
植物化学开放实验室, 昆明 650204)

摘 要

在植物新环肽 [太子参环肽 A(HA) 和 B(HB)] 的结构研究中, 应用 COLOC 谱较成功地解决了其氨基酸序列。结果表明当 J 值选择在 6 Hz-15 Hz 时, COLOC 谱能满意地给出氮上含有活泼氢的氨基酸序列。

关键词 二维核磁共振, COLOC, 氨基酸序列测定, 太子参环肽。

引 言

在植物界中发现由常见氨基酸依肽键相连并环合而成的植物环肽很少^[1,2]。最近我们在常用中药太子参的化学研究中, 首次从石竹科植物中发现了两个新的植物环肽——太子参环肽 A(HA) 和 B(HB)^[3]。近年来, 应用各种二维核磁共振技术研究环肽化合物结构方面的工作时有报道。在太子参环肽 A(HA) 和 B(HB) 的结构研究中, 我们先结合 ¹H-¹H、¹H-¹³C COSY 及 RELAY 等 2D 技术对其碳谱和氢谱信号进行了归属, 找出每一个氨基酸残基片段内的质子自旋体系(见图 1), 确定了 HA 和 HB 分别是由 7 个和 8 个氨基酸组成; 然后应用 COLOC 谱, 观察氨基酸羰基碳与其相连的氨基酸氨基质子的远程偶合, 推定了这两个肽的氨基酸序列(见结果与讨论), 这一结果与 FAB-MS 和样品酶解开环后的序列分析结果完全相同。说明二维核磁共振技术在植物环肽结构研究中潜力很大, 尤其在解决氨基酸连接序列问题上提供了一种有效方法。

收稿日期: 1992-06-09 收修改稿日期: 1992-08-31

① 中国科学院昆明植物所植物化学开放实验室资助项目。 * 通讯联系人。

实 验

本实验的全部核磁共振图谱均用 Bruker-Spectrospin AM-400 核磁共振仪测定, 溶剂 C_5D_5N 和 CD_3OD , 内标 TMS, 温度 $20^\circ C-25^\circ C$; 观察频率: 氢谱 400.13 MHz, 碳谱 100.62 MHz; 各种二维谱技术都使用 Bruker 仪器所带程序; 2D 谱中的 90° 脉冲宽度: 同核相关谱 $8.2 \mu s$, 异核相关谱中 1H 核 $10.3 \mu s$, ^{13}C 核 $4.8 \mu s$, COSY 谱使用 45° 混合脉冲; COLOC 谱中延迟时间 Δ_1 分别以 0.083 s, 0.0625 s, 0.0500 s 和 0.0333 s 取值(即 $^nJ_{(XH)}$ = 6 Hz, 8 Hz, 10 Hz 和 15 Hz) 进行测定, $\Delta_2 = 1/2\Delta_1$, 取功率谱划图; 谱宽: 1H 同核相关谱 2034.520 Hz 对称矩阵, 数据点 512×1024 , 异核相关谱 F_1 谱宽 2032.52 Hz, F_2 谱宽 16666.67 Hz, 数据点 256×1024 ; 样品浓度 40 mg/0.5 ml.

结 果 与 讨 论

一、氨基酸残基质子自旋体系的确定

太子参环肽 A(HA) 和 B(HB) 的氢谱和碳谱信号明显地可以分成三个区域来识别, 氨基酸残基边链上氢和碳信号多集中于高场区 [0.50 ppm - 3.00 ppm (PMR)、0 ppm - 40 ppm (CMR)], 氨基酸残基 α 位及连有极性基团如羟基、苯环等位置氢和碳信号多集中于中场区 [3.00 ppm - 6.00 ppm (PMR)、40 ppm - 70 ppm (CMR)], 低场区 [7.00 ppm - 11.00 ppm (PMR)、120 ppm - 175 ppm (CMR)] 则为肽键酰胺基团和芳环的氢和碳信号区. 碳谱低场区信号提示 HA 和 HB 分别含有 7 个和 8 个氨基酸残基, 其 δ 值分别为: HA-173.64 ppm, 173.57 ppm, 173.36 ppm, 173.11 ppm, 172.75 ppm, 171.89 ppm, 171.51 ppm; HB-174.08 ppm, 173.93 ppm, 171.59 ppm, 171.25 ppm, 171.13 ppm, 170.83 ppm, 170.51 ppm, 169.98 ppm. 氢谱低场区信号显示 HA 和 HB 分别具有 6 个和 5 个氮上有活泼氢的肽键, 其 δ 值分别为: HA-10.28 ppm, 10.10 ppm, 9.24 ppm, 9.10 ppm, 7.69 ppm, 7.56 ppm; HB-9.85 ppm, 9.77 ppm, 8.43 ppm, 7.98 ppm, 6.67 ppm. 应用 $^1H-^{13}C$ 、 $^1H-^1H$ COSY 及 RELAY 可以在中场区找出 HA 的 7 个氨基酸残基的 α 氢 [5.38 ppm, 5.26 ppm, 5.00 ppm, 5.00 ppm, 4.70 ppm (和 3.60 ppm), 4.70 ppm, 4.40 ppm] 和 α 碳 (64.14 ppm, 61.73 ppm, 60.49 ppm, 59.41 ppm, 58.37 ppm, 57.52 ppm, 43.36 ppm); HB 的 8 个氨基酸残基的 α 氢 [5.14 ppm, 4.78 ppm (和 3.99 ppm), 4.65 ppm, 4.65 ppm, 4.51 ppm, 4.39 ppm (和 3.99 ppm), 4.39 ppm, 3.51 ppm] 和 α 碳 (61.55 ppm, 61.55 ppm, 59.36 ppm, 59.22 ppm, 58.01 ppm, 50.39 ppm, 45.96 ppm, 43.10 ppm), 以及 HA 和 HB 分子中各个氨基酸残基片段内的质子自旋体系 [见图 1], 说明 HA 由 1 个苏氨酸(Thr)、1 个脯氨酸(Pro)、1 个甘氨酸(Gly)、1 个缬氨酸(Val)、2 个异亮氨酸(Ile) 和 1 个苯丙氨酸(Phe) 组成; HB 由 2 个甘氨酸、1 个异亮氨酸、1 个亮氨酸(leu)、1 个苯丙氨酸和 3 个脯氨酸组成. 其氢谱

和碳谱数据见表.

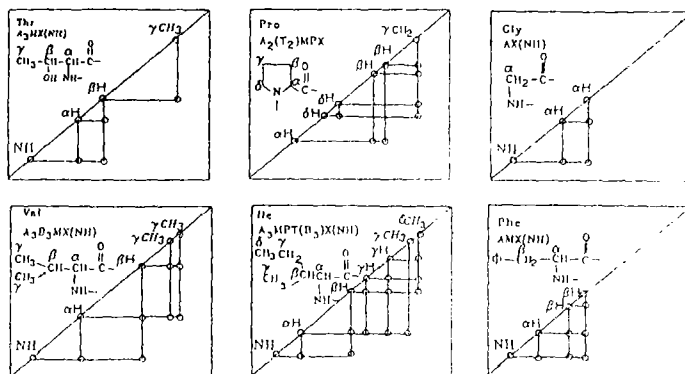


图 1 太子参环肽A 分子中 6 种氨基酸残基质子自旋体系的示意图

Fig. 1 Diagram for the spin systems of protons in the amino acid residues of heterophyllin A assigned by COSY and RELAY

表 1 太子参环肽A 和 B 的氢谱和碳谱化学位移值

Tab. 1 ¹H- and ¹³C NMR chemical shifts of heterophyllin A and B

	Heterophyllin A		Heterophyllin B	
	δ_H^*	δ_C^*	δ_H^*	δ_C^*
1	10.28		9.85	
2	3.60, 4.70	43.36	3.99, 4.39	45.96
3		171.51		171.13
4	9.10		9.77	
5	5.26	61.73	3.99, 4.78	43.10
6	2.21	41.52		169.98
7	1.29	16.26	7.98	
8	1.54, 2.21	25.89	5.14	50.39
9	1.06	10.91	1.71, 2.34	39.50
10		173.36	1.90	26.15
11	9.24		1.00 (1.04)	21.67 (23.71)
12	5.83	57.52	1.04 (1.00)	23.71 (21.67)
13	5.00	69.05		171.25
14	1.54	20.56		
15		171.89	4.65 ^{a)}	59.36 ^{d)}
16			1.90, 2.16 ^{b)}	27.26 ^{e)}
17	4.70	64.14	1.71, 1.90 ^{d)}	25.80 ^{d)}

续表 1
Continuation of the Tab. 1

	Heterophyllin A		Heterophyllin B	
	δ_{H}^*	$\delta_{\text{C}}^{\dagger}$	δ_{H}^*	δ_{C}^*
18	1.84-1.93,2.54	31.03	3.51,3.82 ^{a)}	48.00 ^{b)}
19	1.84-1.93	27.06		171.59 ^{b)}
20	3.68,3.79	49.74		
21		173.11	3.51 ^{a)}	59.22 ^{d)}
22	7.56		1.71,2.01 ^{b)}	28.60 ^{b)}
23	5.00	60.49	1.38,1.56 ^{d)}	25.38 ^{d)}
24	2.44	32.22	3.28,3.51 ^{d)}	47.69 ^{b)}
25	0.85 (0.95)	19.25 (19.95)		170.83 ^{b)}
26	0.95 (0.85)	19.95 (19.25)		
27		172.75	4.39	61.55
28	7.69		2.01,2.80	31.44
29	5.00	58.37	1.56,1.71	22.53
30	2.35	37.95	3.51,3.64	46.93
31	1.19	15.74		170.51
32	1.25,1.66	25.43	8.43	
33	0.85	10.58	4.51	61.55
34		173.64	2.34	35.48
35	10.10		1.41	16.85
36	4.40	59.41	1.23,1.56	26.54
37	3.08,3.40	39.73	0.80	9.97
38		137.16		173.93
39			6.67	
40		128.10	4.65	58.01
41	7.13-7.30	129.57	3.73,4.14	34.26
42		130.22		140.20
43				
44		173.57		126.50
45			7.22-7.30	130.59
46				128.57
47				
48				174.08

*) δ /ppm in $\text{C}_2\text{D}_2\text{N}$ from internal TMS at 400 MHz for δ_{H} and 100 MHz for δ_{C} .

§) δ /ppm in CD_3OD from internal TMS at 100 MHz

a-i) Assignments may be reversed in each vertical column

二、氨基酸序列的确定

在确定太子参环肽 A(HA) 和 B(HB) 的氨基酸组成及其分子中各个氨基酸残基的

羰基和氨基信号以后, 我们再应用 COLOC 谱, 观察氨基酸羰基及其相连氨基酸氨基质子的远程偶合, 较成功地解决了氮上含活泼氢的氨基酸的序列. 我们先后取延迟时间 Δ_1 为 0.1250 s、0.0830 s、0.0625 s、0.0500 s、0.0333 s、0.0250 s (即 ${}^1J_{(\text{NH})}$ 分别为 4 Hz、6 Hz、8 Hz、10 Hz、15 Hz、20 Hz) 等值测定了 COLOC 谱, 结果表明 ${}^1J_{(\text{NH})}$ 为 6 Hz、8 Hz、10 Hz、15 Hz 时的 COLOC 谱能给出所需的信息, 所以 Δ_1 取值范围在 ${}^1J_{(\text{NH})}$ 为 6 Hz–15 Hz 时较宜. 图 2(a) (${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$), 表明 HA 具有 $-\text{Pro}-\text{Val}-\text{Ile}-\text{Phe}-$ 和 $-\text{Gly}-\text{Ile}$ 肽段; 图 2(b) (${}^1J_{(\text{NH})} = 15 \text{ Hz}$), 表明 HA 具有 $-\text{Val}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Gly}-$ 和 $-\text{Ile}-\text{Thr}-$ 肽段, 因此可以推定 HA 具有 $-\text{Pro}-\text{Val}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Ile}-\text{Thr}-$ 序列. 图 2(c) 为 HB 的 COLOC 谱 (${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$), 结果表明它具有 $-\text{Pro}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ile}-$ 序列. 这结果与 FAB-MS 和酶解开环后序列分析结果完全相同, 太子参环肽 A 和 B 的结构见图 3.

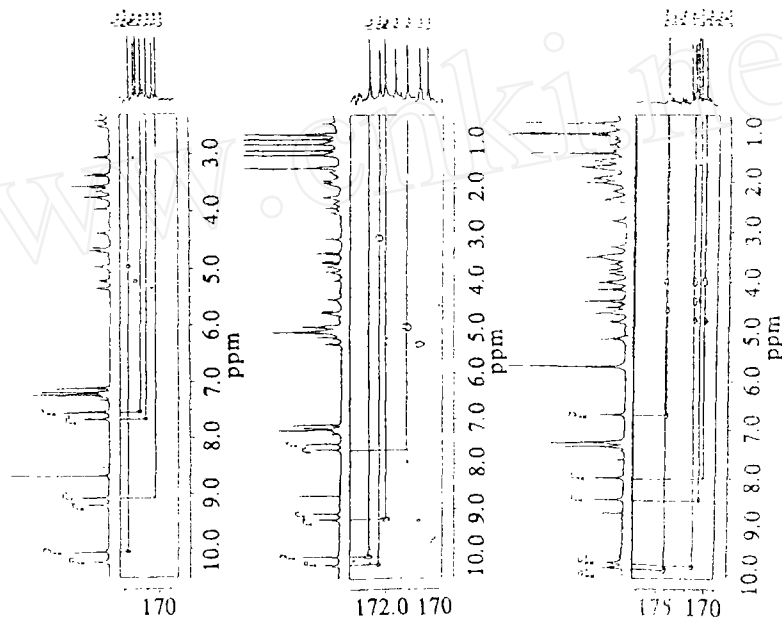


图 2 HA 和 HB 的 COLOC 谱低场区. (a) HA 的 COLOC 谱, ${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$. (b) HA 的 COLOC 谱, ${}^1J_{(\text{NH})} = 15 \text{ Hz}$. (c) HB 的 COLOC 谱, ${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$.

Fig. 2 Low field region of COLOC spectrum of HA and HB (a) COLOC spectrum of HA, ${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$. (b) COLOC spectrum of HA, ${}^1J_{(\text{NH})} = 15 \text{ Hz}$. (c) COLOC spectrum of HB, ${}^1J_{(\text{NH})} = 6 \text{ Hz}$.

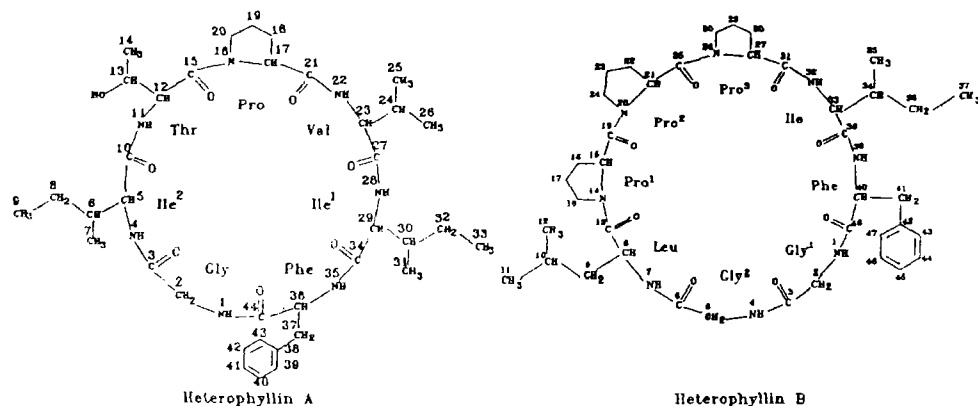


图3 太子参环肽A和B的结构

Fig. 3 Structures of heterophyllin A and B

参 考 文 献

- 1 Bashwira S, et al. Tetrahedron, 1989,45(18): 5845
- 2 Kinoshita K, et al. Chem Pharm Bull, 1991,39(3): 712
- 3 Tan N H, et al. Chinese Chemical Letters, in press

DETERMINATION OF AMINO ACID SEQUENCES OF TWO NEW CYCLOPEPTIDES BY 2D NMR

Tan Ninghua^a, Wang Dezu^b, Zhang Hongjie^b

Chen Changxiang^b, Zhou Jun^b and Zhao Shouxun^a

(^a Department of Phytochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009;

^b Laboratory of Phytochemistry, Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming, 650204)

Abstract

By combination of several NMR techniques (including ¹H-¹H, ¹H-¹³C COSY, RELAY, and COLOC), the spin systems and sequences of amino acid residues of heterophyllin A and B, two new cyclopeptides which were isolated from *Pseudostellaria heterophylla*, have been successfully elucidated. The results indicated the sequences of amino acids with NH can be satisfactorily determined by COLOC when the ³J_(NH) were 6Hz to 15Hz.

Key words 2D NMR; COLOC; Determination of sequences of amino acids; Cyclopeptides; Heterophyllin A; Heterophyllin B.