

氢-氮远程相关实验在天然产物结构研究中的应用

任晋玮¹, 王瑛, 刘钢, 罗元明^{2*}

摘要: 核磁共振是有机分子结构鉴定不可或缺的分析手段。对于结构完全未知的天然产物, 通过综合分析一维 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱图所提供的化学位移、耦合常数、积分值等信息, 结合 COSY、HSQC、HMBC 和 NOESY 等二维谱图从而确定其平面结构和相对立体化学。但是, 对于分子中含有多个氮原子的结构, 由于杂原子的影响, 往往会给结构鉴定带来困难, 而氢-氮远程相关实验的应用, 可以提供很多有用的结构信息, 从而辅助类似化合物的结构鉴定。

关键词: 核磁共振, 结构鉴定, 谱图解析, ^1H - ^{15}N 的远程相关、Gliocladiosin A

^1H - ^{15}N HMBC Spectra Used in Natural Products

Structure Identified

Abstract: Nuclear magnetic resonance (NMR) is an indispensable analytical method for the identification of organic structures. For unknown natural products, their plane structures and relative stereochemistry are determined by comprehensive analysis of chemical shift, coupling constant, integral value and other information provided by one-dimensional nuclear magnetic ^1H spectrum and ^{13}C spectrum, combined with two-dimensional spectra such as ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC and NOESY. However, for the structure containing multiple nitrogen atoms, it is often difficult to identify the structure due to the influence of heteroatoms, and the application of ^1H - ^{15}N HMBC experiments can provide a lot of useful structural information to assist the identification of such structures.

核磁共振是一种用来研究物质的分子结构及物理特性的波谱学方法, 是一种强大的定性、定量分析手段, 在化学结构确定、构型^[1]和构象分析^[2]、化学反应机理研究^[3]、分子的相互作用^[4]、代谢组学^[5]等方面有着非常广泛的应用。核磁共振是有机机构鉴定不可或缺的分析

¹作者简介: 任晋玮, 男, 高级工程师, 主要从事微生物次级代谢产物研究和核磁共振分析测试。E-mail: renjw@im.ac.cn.

²通讯作者: 罗元明, 正高级工程师。研究方向: 质谱在生物大分子结构中的应用研究。E-mail: luoym@im.ac.cn.

基金项目: 中国科学院“关键技术人才”项目

手段。对于结构完全未知的天然产物，通过综合分析一维 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱图所提供的化学位移、耦合常数，积峰值等信息，结合 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC 和 NOESY 等二维谱图数据，从而确定其平面结构和相对立体化学^[6-7]。

但是，对于分子中含有多个氮原子的结构，由于杂原子的影响，往往会给结构鉴定带来困难。自然界的氮元素绝大多数为 ^{14}N ，其自旋量子数为零，因此不能产生核磁共振信号； ^{15}N 虽然能产生核磁共振，但是 ^{15}N 的天然丰度只有 0.37%，而且其磁旋比（不同元素的物理常数，实验测得）很小，导致 ^{15}N NMR 谱灵敏度非常低，从而导致直接测定 ^{15}N 谱非常的困难。 ^1H - ^{15}N 的远程相关实验由于最终采集的是氢的信号，使得实验的灵敏度得到了一定程度的提高，并且 ^1H - ^{15}N 远程相关实验不仅可以提供 ^1H 与 ^{15}N 的 2 - 3 键相关信号，而且可以根据 ^{15}N 的化学位移来推断其化学环境和氧化态，从而为此类结构的鉴定提供重要的信息^[8]。

本文将以 Gliocladiosin A 结构解析过程为例，来说明 ^1H - ^{15}N 的远程相关实验在复杂天然产物结构研究中的应用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂：

Bruker AVANCE III HD 500 MHz 超导核磁共振波谱仪，配 Prodigy BBO 探头；DMSO- d_6 （D，99.9%），美国 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)。

1.2 核磁条件：

Gliocladiosin A 样品在 Bruker AVANCE III HD 500 MHz 超导核磁共振波谱仪上检测，选用的氘代试剂为 DMSO- d_6 (δ_{H} : 2.50 ppm, δ_{C} : 40.0 ppm)，具体的 实验参数如下表所列：

表 1 Gliocladiosin A 核磁检测的主要参数

核磁实验项目							
	^1H	^{13}C -APT	COSY	HSQC	HMBC	^1H - ^{15}N HMBC	ROESY
共振频率 /MHz	500.05	125.75	500.05	500.05/ 125.75	500.05/ 125.75	500.05/ 50.68	500.05
脉冲序列	zg30	zgpg30	cosygpqf	hsqcedetgpsisp	hmbcgpndqf	hmbcgpndqf	Roesygpqh.2
谱宽/ppm	20.00	236.00	9.00	9.00/180.00	13.00/236.00	13.00/439.80	13.00

采集次数/N	16	256	3	4	24	256	24
采样点数	64k	64k	2k	1024	2048	2048	2048
弛豫时间							
/D1	1.0	2.0	2.0	1.5	1.38	2.0	2.0
空扫次数							
/DS	2	4	8	16	16	16	16
脉宽/ μ s	12.79	9.04	12.79	12.79/9.08	12.79/9.08	12.79/14.80	12.79
增益值/RG	32	203	203	203	203	203	203

1.3 样品的制备:

Gliocladiosin A 由王瑛博士分离自 *Clonostachys rogersoniana*, 将菌株发酵物依次经过硅胶、反相 C18 键合硅胶和 sephardex LH20 色谱柱层析分离, 再用半制备高效液相纯化得到单体化合物。取 Gliocladiosin A 样品约 15mg 溶解于 0.5 ml DMSO-*d*₆, 待测。

2 结果与讨论:

2.1 Gliocladiosin A 的 ¹H, ¹³C 数据分析

分析 Gliocladiosin A 的 ¹H 和 APT-¹³C NMR 数据, 提示结构中由四个活泼氢(δ_H 4.34, 4.96, 9.75 and 10.83), 3 个甲基, 3 个亚甲基, 4 个次甲基 (其中两个与氧原子相连), 有 10 个芳香/不饱和碳 (其中 7 个连有质子), 4 个羰基碳(δ_C 162.9, 168.4, 169.2 and 171.8)。

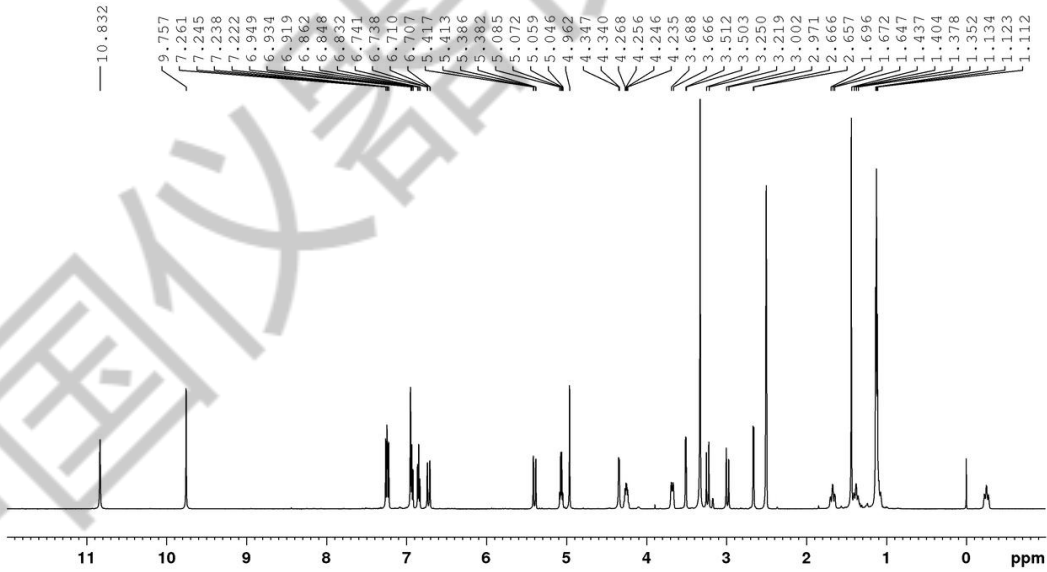


图1 Gliocladiosin A 的 ¹H NMR 谱图

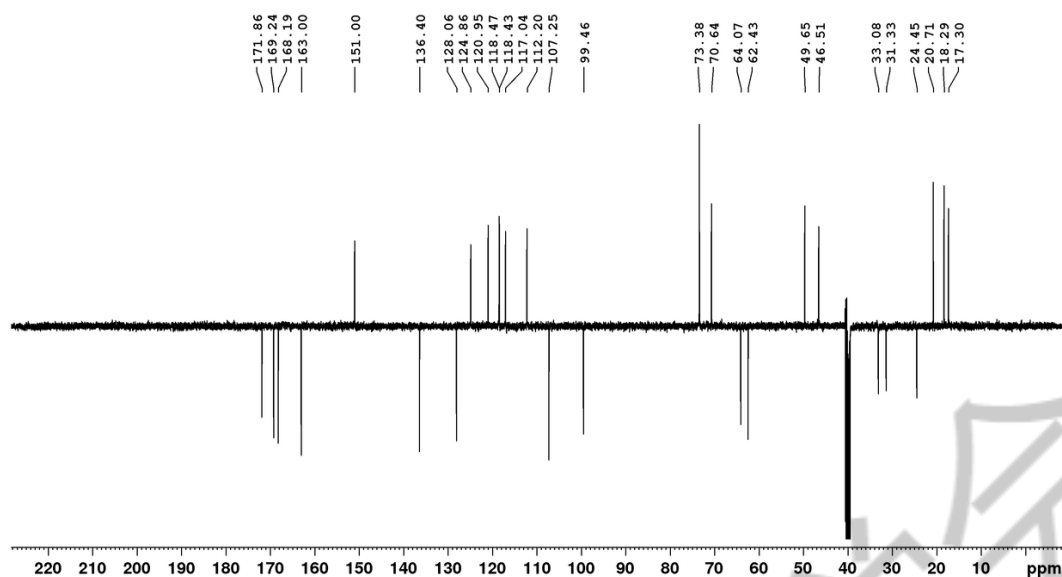


图2 Gliocladiosin A 的¹³C-APT NMR 谱图

2.2 Gliocladiosin A 的二维核磁数据解析

该化合物氢碳之间的连接关系通过分析 HSQC 数据进行了归属。分析 ¹H-¹H COSY 数据, 可以推断得到 C-22-C-7-C-12, C-15-C-23, C-4-C-17 和 C-5'-C-8'四个自旋系统。根据 H-4 与 C-5, C-16 和 C-17 之间的 HMBC 相关, H-7 与 C-5 之间的 HMBC 相关, H-15 与 C-13, C-16 和 C-17 之间的 HMBC 相关, 以及 H₃-23 与 C-16 和 C-17 之间的 HMBC 相关, 从而确立了 14 元内酯环的结构片段。H-4 与 C-5, C-16 和 C-17 之间的 HMBC 相关, H₃-22 与 C-7 和 C-8 之间的 HMBC 相关, 以及 H₃-23 与 C-16 和 C-17 之间的 HMBC 相关, 提示有两个羟基分别与 C-15 和 C-7 相连, 从活泼氢 (δ_H 4.34) 到 C-9, C-10 和 C-11 之间的 HMBC 相关提示该羟基与 C-10 相连。分析 H-1'、H-2'、以及 H-5' ~ H-8' 的 HMBC 相关, 可以推断出结构中存在一个 1*H*-indol-3-yl 的片段, H-10' 与 C-2, C-3 和 C-4 之间的 HMBC 相关表明 C-10' 与 C-3 相连。活泼氢(δ_H 4.96) 与 C-2, C-3, C-4, C-15, C-16 和 C-17 确定了吡咯烷桥环片段; 基于 H-4 与 C-2, C-3, C-17, C-18, 以及 H₃-24 与 C-17, C-18 和 C-19 之间的 HMBC 相关, 结合 H₃-24 和 H-17 与 N-1 之间的 ¹H-¹⁵N HMBC, 再考虑 C-2 (δ_C 169.2), C-19 (δ_C 178.1), C-16 (δ_C 99.5) and C-19 (δ_C 64.1) 的化学位移, C-2 与 N-1 相连, 且 C-19 与 C-16 通过一个氧原子相连, 形成一个 hexahydrofuro[3,4-*b*]pyridine-2,7-dione 的结构片段以满足该化合物不饱和度的要求, 且根据 N₁-OH 与 C-18 之间的 ¹H-¹³C HMBC 相关, 以及该羟基与 N-1 之间的 ¹H-¹⁵N HMBC, 提示该羟基连接与 N-1 上, 至此该化合物的平面结构完全确定。

H-11 和 H-12 之间的耦合常数为 15.5Hz, 由此推断 C-11/C-12 之间的烯双键为反式构型; H-17 与 H₃-23, H₃-24 与 H_a-10' 之间的 NOE 相关, 提示它们处于环的同一侧, H-4 与 H-21 之间的 NOE 相关提示它们处于环的另一侧。C-7 和 C-10 的相对立体构型由于距离左侧的多元环系统较远, 所以无法通过 NOE 数据分析来确定。

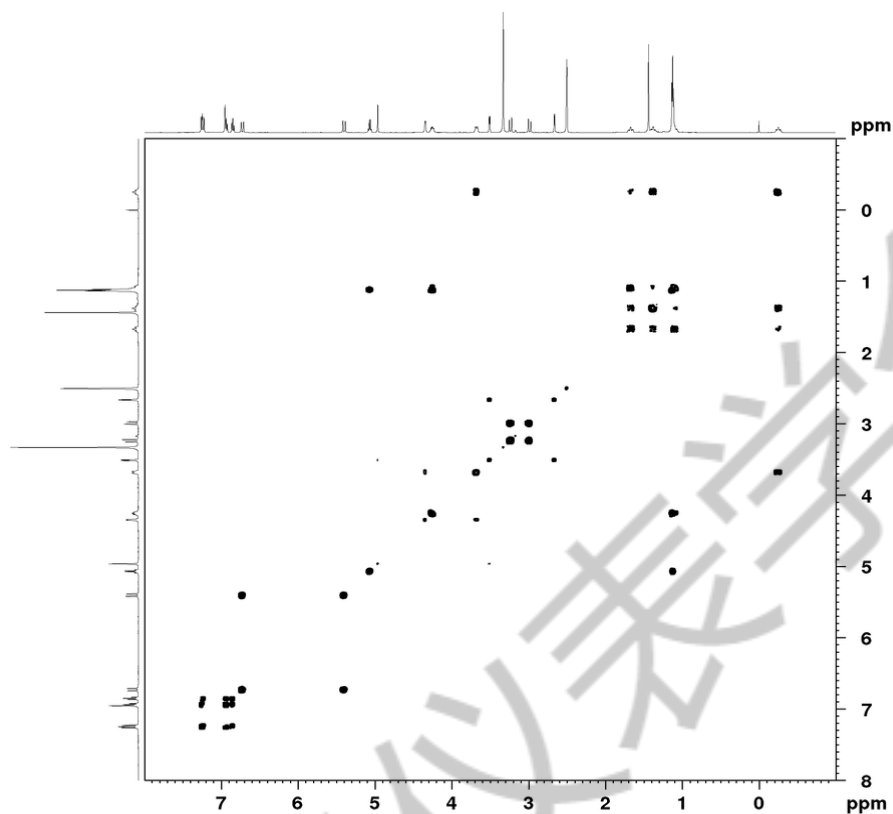


图 3 Gliocladiosin A 的 COSY 谱图

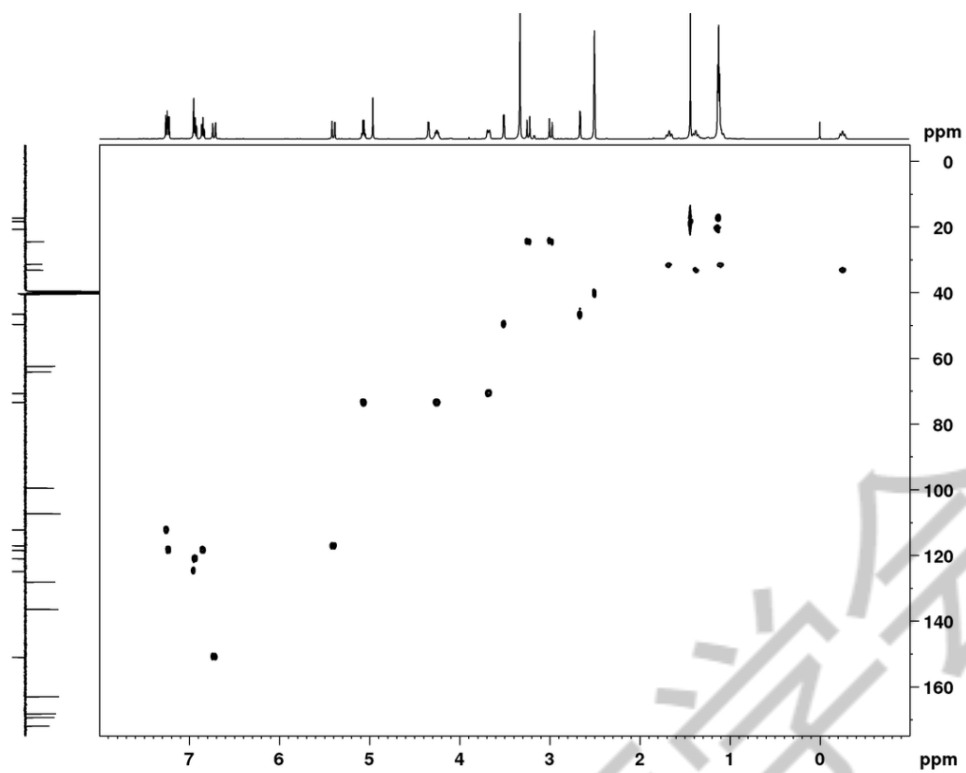


图4 Gliocladosin A 的 HSQC 谱图

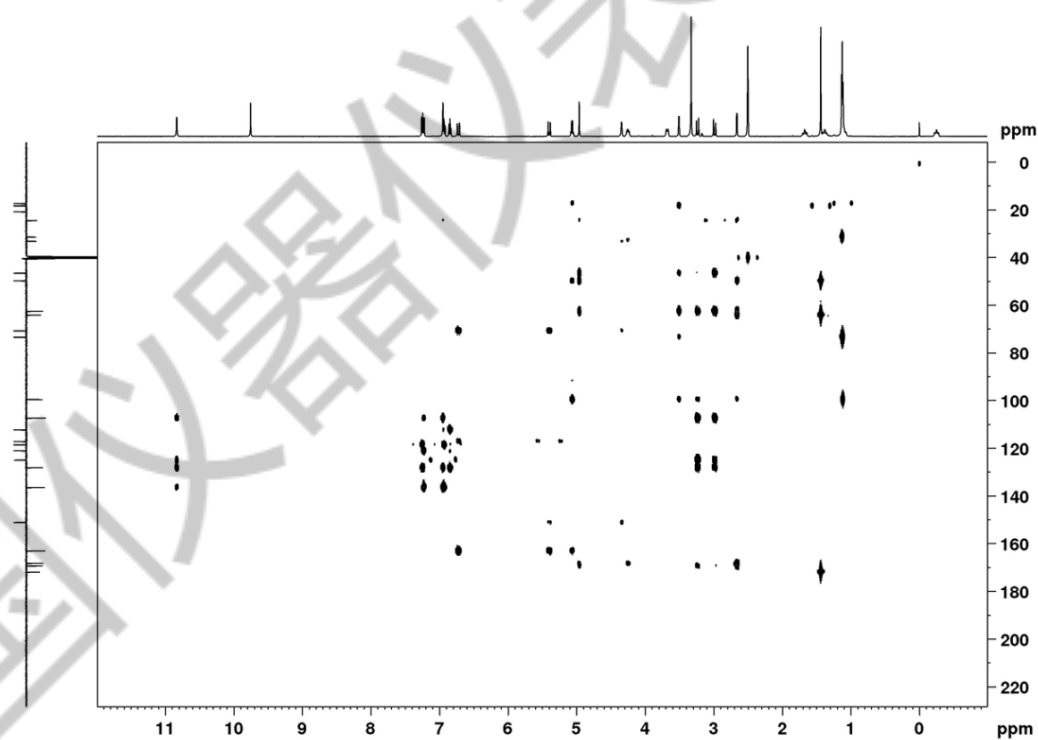


图5 Gliocladosin A 的 HMBC 谱图

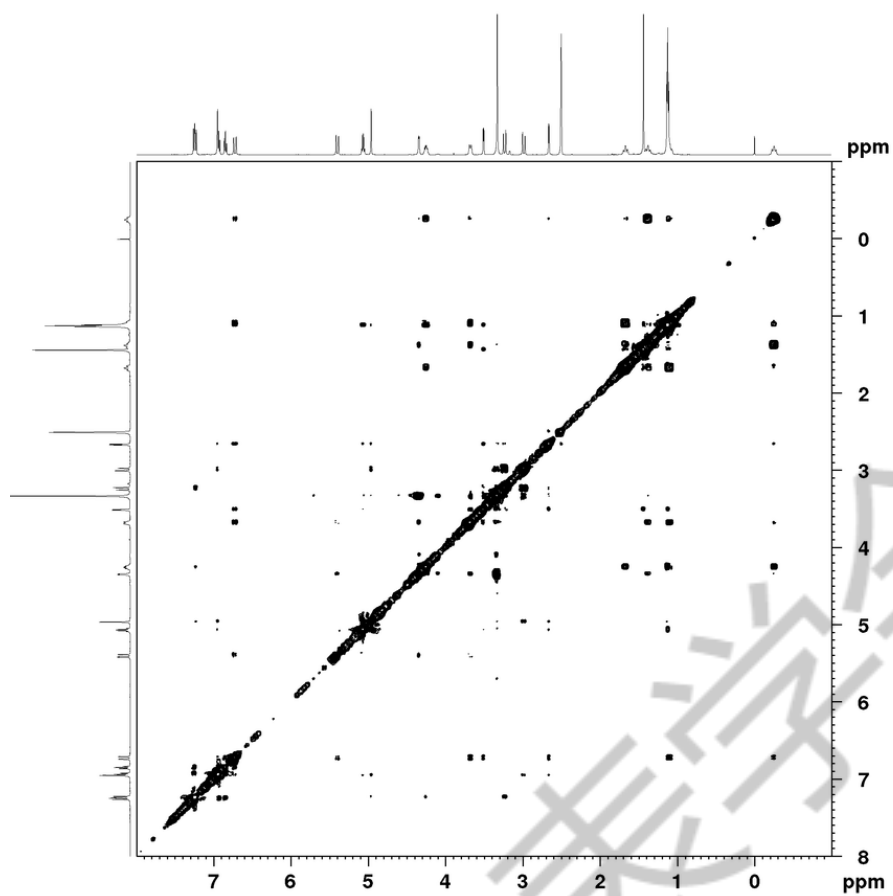


图 6 Gliocladiosin A 的 ROESY 谱图

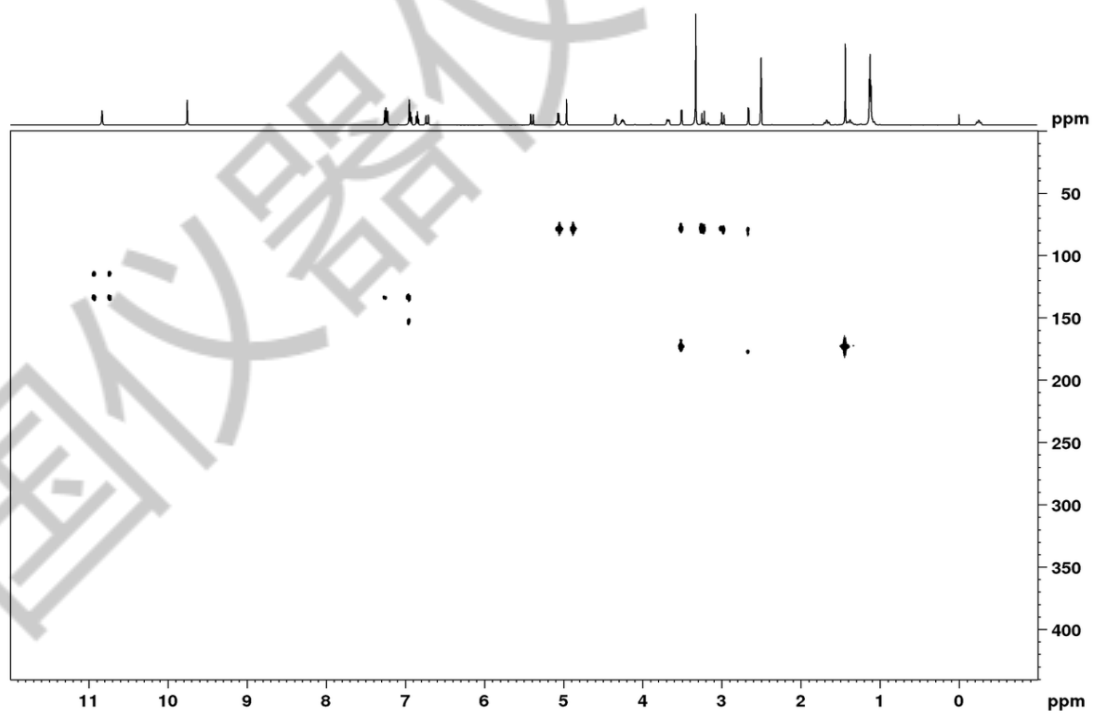


图 7 Gliocladiosin A 的 ^1H - ^{15}N HMBC 谱图

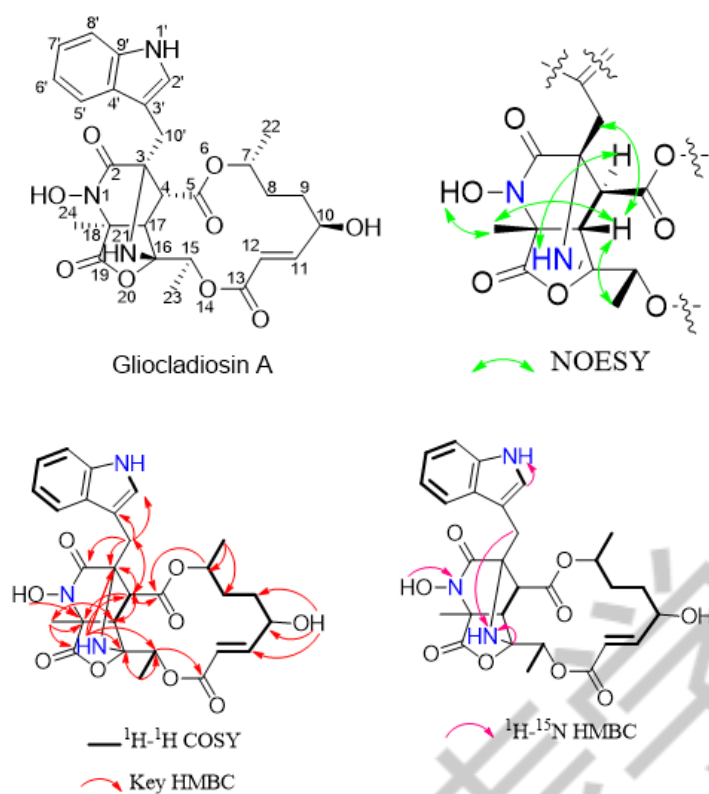


图 7 Gliocladiosin A 主要相关信息的示意图

表 2 Gliocladiosin A 的数据归属

位置	δ_{C}^a , mult.	δ_{H}^b (J in Hz)	HMBC ^b
1	N (172.8)		
1-OH		9.75 (s)	18
2	169.2, qC		
3	62.4, qC		
4	46.5 CH	2.67, d (4.5)	2, 3, 5, 16, 17, 18, 10'
5	168.4, qC		
7	73.4, CH	4.26, m	5, 8, 9, 22
8	31.3, CH ₂	1.69, m	7, 9, 10, 22
9	33.1, CH ₂	1.40, m	7, 8, 10, 11
10	70.6, CH	3.68, d (16.5)	8, 9, 11, 12
10-OH		4.35, d (3.5)	9, 10, 11
11	150.9, CH	6.74, dd, (1.5, 15.5)	9, 10, 12, 13
12	117.0, CH	5.41, dd, (2.0, 15.5)	10, 11, 13
13	162.9, qC		
15	73.4, CH	5.08, q (5.0)	13, 16, 17, 23
16	99.5, qC		
17	49.6, CH	3.51, d (4.5)	3, 4, 5, 15, 16, 21, 24

18	64.1, qC		
19	171.8, qC		
21	N (78.5)	4.96, s	3, 4, 15, 16, 17, 10'
22	18.3, CH ₃	1.13, d (5.0)	7, 8
23	17.3, CH ₃	1.12 d (5.0)	15, 16
24	18.4, CH ₃	1.43, s	17, 18, 19
25	---	---	
1'	N (133.7)	10.83, d (1.5)	2', 3', 4', 9'
2'	124.8, CH	6.95, s	3', 4', 9', 10'
3'	107.2, qC		
4'	128.0, qC		
5'	112.2, CH	7.23, d (8.0)	3', 7', 9'
6'	118.7, CH	6.86, t (8.0)	4', 8'
7'	120.9, CH,	6.94, t (8.0)	5', 9'
8'	118.4, CH	7.26, d (8.0)	4', 6'
9'	136.4, qC		
10'	24.4, CH ₂	3.25, d (15.5)	2, 3, 4, 2', 3', 4'

^aRecorded at 500 MHz. ^bRecorded at 125 MHz.

3 结论

本文以 Gliocladiosin A 为例, 通过对该化合物氢、碳数据分析, 结合 COSY, HSQC、HMBC、NOESY 以及 ¹H-¹⁵N HMBC 相关分析, 从而确定了该化合物的平面结构和部分的相对立体化学, 为复杂含氮化合物的结构解析提供了新的思路和方法指导。

参考文献:

- [1]Reena B, Dennis PC. Synthesis and Spectroscopic Analysis of a Stereoisomer Library of the Phytophthora Mating Hormone α1 and Derived Bis-Mosher Esters. [J] *Journal of the American Chemical Society*. 2011, 133, 50, 20435-20443
- [2]Kazuo Furihata a, Haruo Seto. J-Resolved HMBC, a new NMR technique for measuring heteronuclear long-range coupling constants. *Tetrahedron Letters*. 1999, 40 (34): 6271-6275
- [3]Evan WZ, Liu T, Erlendur J, Jeongjae L, Israel T, Rajesh BJ, Wang Q, Holly S, Javier CG, Song Q, Grey CP. In situ NMR metrology reveals reaction mechanisms in redox flow batteries. [J] *Nature*, 2020, **579**, 224–228.

- [4]Serena M., Jesus A., Matthew W. Imaging Saturation Transfer Difference (STD) NMR: Affinity and Specificity of Protein–Ligand Interactions from a Single NMR Sample. [J] *Journal of the American Chemical Society* 2023, 145, 30, 16391-16397.
- [5]Ana M. S., Ana I. T., Ana C. A, Ignacio F. The Cardiovascular Risk of Healthy Individuals Studied by NMR Metabonomics of Plasma Samples. [J] *Journal of Proteome Research*. 2011, 10, 11, 4983-4992.
- [6]Ren JW, Zhang F, Liu XY, Li Li, Liu G, Liu XZ, Che YS. Neonectrolide A, a New Oxaphenalenone Spiroketal from the Fungus *Neonectria* sp. [J] *Organic Letters*, 2012, 14(24), 6226-6229.
- [7]Qi QY, Ren JW, Sun LW, He LW, Bao L, Yue W, Sun QM, Yao YJ, Yin WB, Liu HW. Stucturally Diverse Sesquiterpenes Produced by a Chinese Tibet Fungus *Stereum hirsutum* and Their Cytotoxic and Immunosuppressant Activities.[J] *Organic Letters*. 2015, 17: 3098-3101.
- [8]Mei Q, Wang YN, Zhao M, Liu XY, Peng SQ, Wang FP, ^1H - ^{15}N HMBC spectra of C18-diterpenoid alkaloids, [J] *Chinese Chemical Letters*, 2015, 26 (06) : 804-806.