

文章编号: 1000-4556(2009)01-0120-06

新药替尼泊昔的碳氢 NMR 信号全归属

李 文*, 沙 沂, 朱 丹

(沈阳药科大学 分析测试中心, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要: 替尼泊昔是从北美鬼臼或西藏鬼臼提取到的鬼臼树脂, 经化学成分分离得到鬼臼毒素通过半合成方法获得的衍生物, 是一种周期特异性细胞毒药物. 作为一种抗肿瘤药物, 替尼泊昔已逐渐成为治疗颅内恶性肿瘤的主要化疗药物. 本文应用 1D NMR 和 2D NMR 实验技术 (COSY, NOESY, TOCOSY, gHSQC, gHMBC) 研究了其结构, 并对其¹H NMR、¹³C NMR 谱信号进行了全归属.

关键词: 核磁共振(NMR); 归属; 2D NMR 技术; 替尼泊昔; 抗肿瘤药

中图分类号: O482.53 **文献标识码:** A

引言

替尼泊昔(Teniposide)化学名为 4-O-去甲基-1-O(4, 6, 0, 2, 噻吩甲叉-BO-D-吡喃葡萄糖甙)表鬼臼毒, 是从北美鬼臼或西藏鬼臼提取到的鬼臼树脂, 经化学成分分离得到鬼臼毒素通过半合成方法获得的衍生物, 是一种周期特异性细胞毒药物. 作为一种抗肿瘤药物, 替尼泊昔已逐渐成为治疗颅内恶性肿瘤的主要化疗药物^[1,2]. 该药目前在国内正处于新药研发申报阶段, 具有良好的开发前景, 但至今尚无有关 NMR 数据的报道. 本文利用¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、COSY、NOESY、TOCOSY、gHSQC、gHMBC 等核磁共振技术对该药的结构和构型进行了深入研究^[3-5], 对其¹H NMR 和¹³C NMR 谱信号进行了全归属, 同时确证了该半合成药物的结构是正确的. 这对替尼泊昔及其同类物的结构确证和质量控制具有重要的参考价值.

收稿日期: 2008-09-26; 收修改稿日期: 2008-10-14

作者简介: 李文(1960-), 女(汉族), 辽宁金州人, 教授级高工, 主要从事仪器分析及药物结构确证的研究, 电话:

024-23986332, E-mail: liwenhc@163.com. * 通讯联系人.

1 实验部分

实验所用替尼泊昔精制品由海南晨菲药业有限公司提供. 1D NMR、2D NMR 实验均采用 Bruker AVANCE 600 型核磁共振波谱仪测定, 溶剂为氘代二甲基亚砜 (DMSO- d_6), 内标为四甲基硅烷(TMS), 5 mm 样品管, BBO 探头. ^1H 和 ^{13}C NMR 谱的工作频率分别为 600.13 MHz 和 150.92 MHz. DEPT、COSY、NOESY、TOCOSY、gHSQC、gHMBC 实验分别采用相应的标准脉冲程序. COSY、NOESY、TOCOSY 实验谱宽 F_1 域(^1H)均为 7 183.91 Hz, F_2 域(^1H)均为 7 183.91 Hz, 脉冲间隔 D_1 均为 1.5 s, 采样次数 NS 分别为 4、8、8; NOESY 实验混合时间 τ_m 为 800 ms, TOCOSY 实验混合时间 τ_m 为 60 ms. gHSQC、gHMBC 实验谱宽 F_1 域(^1H)6 009.62 Hz, F_2 域(^{13}C)30 303.03 Hz; 梯度场强度 gHSQC(42.4 、 11.6) $\times 10^{-4}$ T/cm, gHMBC(26.5 、 15.9 、 21.2) $\times 10^{-4}$ T/cm; gHSQC 实验脉冲间隔 D_1 为 1.5 s, 选取碳氢偶合常数为 145, 采样次数 NS 为 8; gHMBC 实验脉冲间隔 D_1 为 1.5 s, 选取碳氢远程偶合常数为 8 以获取碳氢远程相关峰, 采样次数 NS 为 48.

2 结果与讨论

在替尼泊昔的 ^{13}C NMR 谱中出现 27 个碳信号, 分别对应结构中的 32 个碳原子, 其中 δ_c 56.0、 δ_c 108.4、 δ_c 110.0、 δ_c 126.4、 δ_c 147.2 均为 2 个碳信号的重叠峰(如下所述). 根据 DEPT-135 谱可确定有 1 个伯碳信号, 3 个仲碳信号, 14 个叔碳信号, 9 个季碳信号, 替尼泊昔的化学结构式及原子标记如图 3.

在 ^1H NMR 谱中, 高场区 δ_H 3.62(6H, s)可归属为 $2'$ -OCH₃ 和 $6'$ -OCH₃ 质子, 伯碳信号 δ_c 56.0 在 gHSQC 谱(如图 1)中与 $2'$ -OCH₃、 $6'$ -OCH₃ 质子峰相关, 应归属为 $2'$ -OCH₃、 $6'$ -OCH₃ 碳的重叠信号. 低场区 δ_H 8.26(1H, s)经重水交换实验后消失, 证明为活泼质子峰, 应归属为 $1'$ -OH 质子. 季碳信号 δ_c 134.7、 δ_c 147.2 在 gHMBC(如图 2)谱中分别与 $1'$ -OH 质子、 $2'$ -OCH₃' 和 $6'$ -OCH₃ 质子峰远程相关, 应分别归属为 C-1' 和 C-2'、C-6' 的重叠信号. δ_H 6.19(2H, s)在 gHMBC 谱中与 C-2'、C-6' 远程相关, 应归属为 H-3'、H-5' 的重叠峰, 其在 gHSQC 谱中的相关叔碳信号 δ_c 108.4 可归属为 C-3'、C-5'. 在 gHMBC 谱中, 季碳信号 δ_c 43.0 和 δ_c 130.3 均与 H-3'、H-5' 的重叠峰远程相关, 应分别归属为 C-10 和 C-4'.

因 δ_H 4.50(1H, d, $J=5.4$ Hz)在 gHSQC 谱中与 C-10 相关, 可归属为 H-10, 在 TOCOSY 谱中, H-10 与 δ_H 3.31(1H, dd, $J=14.1$, 5.4 Hz)、 δ_H 2.94(1H, m)、 δ_H 4.27(2H, overlapped)、 δ_H 4.95(1H, d, $J=3.1$ Hz)全相关, 其中在 COSY 谱中 δ_H 3.31(1H, dd, $J=14.1$, 5.4 Hz)与 H-10 相关, 应归属为 H-10a; δ_H 2.94(1H, m)与 H-10a 位质子峰相关, 应归属为 H-3a; δ_H 4.28(2H, m)、 δ_H 4.95(1H, d, $J=3.1$ Hz)同时与 H-3a 相关, 结合偶合裂分情况和积分值判断应分别归属为 H-3 和 H-4; 在 gHSQC 谱中, 碳信号 δ_c 40.5、 δ_c 37.2、 δ_c 67.7、 δ_c 71.8 分别与 H-10a、H-3a、H-3、H-4 相关, 应分别归属为 C-10a、C-3a、C-3、C-4. 在 gHMBC 谱中, δ_H 6.54(1H, s)与 C-10 远程相关, 可归属为 H-9, 在 gHSQC 谱中, δ_c 110.0 与 H-9 相关, 可归属为 C-5 和 C-9 的重叠信号, 因 δ_H 7.03(1H, overlapped)也与 C-5、C-9 的重叠信号相关, 应归属为 H-5. 季碳信

号 δ_c 128.8、 δ_c 132.9 在 gHMBC 谱中同时与 H-4、H-10 远程相关, 且后一个碳信号还与 H-10a 远程相关, 应归属为 C-9a, 则前一个碳信号应归属为 C-4a. δ_H 6.03(1H, brs)、 δ_H 6.04(1H, brs) 在 gHSQC 谱中均与仲碳信号 δ_c 101.4 相关, 前二者应归属为 H-7, 后者应归属为 C-7. 季碳信号 δ_c 146.2、 δ_c 147.8 在 gHMBC 谱中同时与 H-5、H-7、H-9 远程相关, 应分别归属为 C-5a、C-8a. 季碳信号 δ_c 174.8 按碳化学位移规律判断^[6,7], 应归属为 C-1.

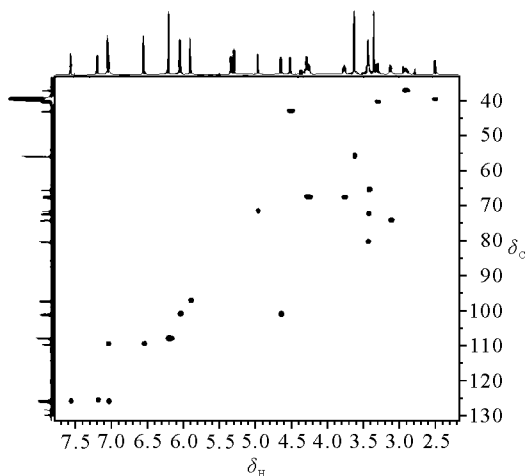


图 1 替尼泊昔 gHSQC 谱

Fig. 1 gHSQC spectrum of Teniposide

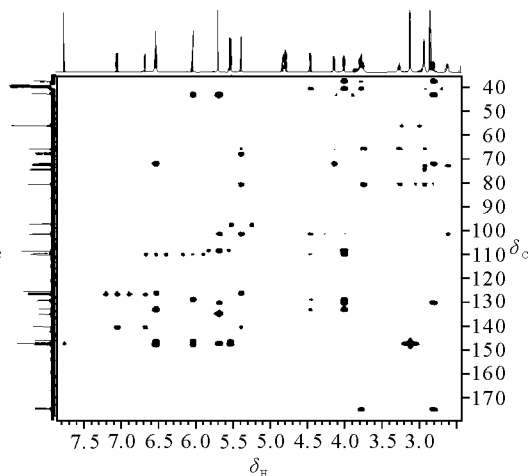


图 2 替尼泊昔 gHMBC 谱

Fig. 2 gHMBC spectrum of Teniposide

在 gHMBC 谱中, 仲碳信号 δ_c 101.5 与 H-4 远程相关, 应归属为 C-1'', δ_H 4.64 (1H, d, $J=7.6$ Hz) 在 gHSQC 谱中与 C-1'' 位碳信号相关, 应归属为 H-1''. 在 TOCSY 谱中 H-1'' 与 δ_H 3.11(1H, m)、 δ_H 3.43(3H, overlapped)、 δ_H 3.76(1H, m)、 δ_H 4.27 (1H, overlapped) 全相关, 在 COSY 谱中, δ_H 3.11(1H, m) 与 H-1'' 相关, 应归属为 H-2'', δ_c 74.5 在 gHSQC 谱中与 H-2'' 相关, 应归属为 C-2''. δ_H 5.28(1H, d, $J=5.2$ Hz)、 δ_H 5.32(1H, d, $J=3.0$ Hz) 经重水交换实验后消失, 其中前组峰在 COSY 谱中与 H-2'' 相关, 应归属为 2''-OH 质子, 则后组峰归属为 3''-OH 质子. 在 gHMBC 谱中, δ_c 72.7 同时与 H-2'' 及 2''-OH、3''-OH 质子峰远程相关, 应归属为 C-3'' 碳, δ_c 80.6 只与 3''-OH 质子远程相关, 应归属为 C-4''. 仲碳信号 δ_c 67.9 在 gHSQC 谱中同时与 δ_H 3.75(1H, m)、 δ_H 4.24(1H, m) 相关, 应归属为 C-8''; 两个质子信号应归属为 H-8'' 两个偕偶的亚甲基质子, 其中位于高场的质子峰应归属为 H-8''a, 位于低场的质子峰归属为 H-8''e. 因次甲基碳信号 δ_c 65.7 在 gHMBC 谱中只与 H-8'' 有远程相关峰, 应归属为 C-9''; 在 gHSQC 谱中, δ_H 3.43(3H, overlapped) 与 C-3''、C-4''、C-9'' 相关, 应归属为 H-3''、H-4''、H-9'' 的重叠信号. δ_H 5.89(1H, s) 在 gHMBC 谱中同时与 C-4''、C-8'' 远程相关, 应归属为 H-6'', 因 δ_c 97.5 在 gHSQC 谱中与 H-6'' 相关, 应归属为 C-6''.

在 gHMBC 谱中, δ_H 7.18(1H, d, $J=3.2$ Hz) 与 C-6'' 远程相关, 应归属为 H-3'''. 在 COSY 谱中, δ_H 7.03(1H, overlapped) 与 H-3''' 相关, 应归属为 H-4'''; δ_H 7.54(1H, d, $J=5.0$ Hz) 与 H-4''' 相关, 应归属为 H-5'''. 在 gHSQC 谱中, δ_c 126.0 与 H-3''' 相关,

应归属为 C-3^{'''}, δ_c 126.4 同时与 H-4^{'''}、H-5^{'''}相关, 应归属为 C-4^{'''}位、C-5^{'''}的重叠信号。余下的季碳信号 δ_c 140.4, 应归属为 C-2^{'''}[6,7]。

至此通过 1D NMR 和 2D NMR 的测试及谱图解析对替尼泊昔的¹H NMR、¹³C NMR 信号进行了完全归属, 由此确证该精制品的结构与图 3 相符。有关 NMR 详细数据归属见表 1。

表 1 替尼泊昔的 NMR 数据(溶剂: 氘代二甲基亚砜)

Table 1 NMR data of Teniposide (Solvent: DMSO-*d*₆)

Position	δ_c	Related proton		
		δ_H	gHMBC	COSY
1	174.8	/	H-3, H-10a	/
3	67.7	4.28, (m)	/	H-3a
3a	37.2	2.94, (m)	H-10, H-10a	H-3, H-4, H-10a
4	71.8	4.95, (d, $J=3.1$ Hz)	H-5, H-10a, H-1 [']	H-3a
4a	128.8	/	H-4, H-9, H-10	/
5	110.0	7.03, (s)	H-4	/
5a	146.2	/	H-5, H-7, H-9	/
7	101.4	6.03, 6.04, (brs)	/	/
8a	147.8	/	H-5, H-7, H-9	/
9	110.0	6.54, (s)	H-10	/
9a	132.9	/	H-4, H-5, H-10, H-10a	/
10	43.0	4.50, (d, $J=5.4$ Hz)	H-9, H-10a, H-3', H-5'	H-10a
10a	40.5	3.31, (dd, $J=14.1, 5.4$ Hz)	H-4, H-10	H-3a, H-10
1 [']	134.7	/	1'-OH, H-3', H-5'	/
2 [']	147.2	/	1'-OH, 2'-OCH ₃ , H-3'	/
2'-OCH ₃	56.0	3.62, (s)	/	/
3 [']	108.4	6.19, (s)	H-10	/
4 [']	130.3	/	H-10, H-10a, H-3', H-5'	/
5 [']	108.4	6.19, (s)	H-10	/
6 [']	147.2	/	1'-OH, H-5', 6'-OCH ₃	/
6'-OCH ₃	56.0	3.62, (s)	/	/
1 ^{''}	101.5	4.64, (d, $J=7.6$ Hz)	H-4, 2''-OH	H-2 ^{''}
2 ^{''}	74.5	3.11, (m)	2''-OH	H-1 ^{''} , 2''-OH, H-3 ^{''}
3 ^{''}	72.7	3.43, (overlapped)	H-2 ^{''} , 2''-OH, 3''-OH	H-2 ^{''} , 3''-OH
4 ^{''}	80.6	3.43, (overlapped)	H-3 ^{''} , 3''-OH, H-6 ^{''} , H-8 ^{''} , H-9 ^{''}	/
6 ^{''}	97.5	5.89, (s)	H-3 ^{'''}	/
8 ^{''}	67.9	3.75, 4.24, (m)	H-6 ^{''}	H-9 ^{''}
9 ^{''}	65.7	3.43, (overlapped)	H-8 ^{''}	H-8 ^{''}
2 ^{'''}	140.4	/	H-3 ^{'''} , H-5 ^{'''}	/
3 ^{'''}	126.0	7.18, (d, $J=3.2$ Hz)	H-6 ^{''} , H-4 ^{'''} , H-5 ^{'''}	H-4 ^{'''}
4 ^{'''}	126.4	7.03, (overlapped)	H-3 ^{'''}	H-3 ^{'''} , H-5 ^{'''}
5 ^{'''}	126.4	7.54, (d, $J=5.0$ Hz)	H-3 ^{'''}	H-4 ^{'''}

该化合物结构中存在多个手性中心(3a位、4位、10位、10a位、1''位、6''位、8''位), 它们的相对构型可通过 NOESY 谱得到确认. 因在 NOESY 谱中, δ_{H} 4.95(H-4)与 δ_{H} 2.94(H-3a)及 δ_{H} 4.64(H-1'')均有相关峰, 可推断 H-4 与 H-3a 及 H-1''处于同侧; δ_{H} 4.50(H-10)与 δ_{H} 3.31(H-10a)有相关峰, 而与 δ_{H} 4.95(H-4)无相关峰, 可推断 H-10 与 H-10a 处于同侧, 而与 H-4 处于异侧. 同理 δ_{H} 5.89(H-6'')与 δ_{H} 3.75(H-8''a)有相关峰, 而与 δ_{H} 4.24(H-8''e)无相关峰, 可推断 H-6''与 H-8''a 处于同侧; 而与 H-8''e 处于异侧. 从而确定该药的相对构型与图 3 相符.

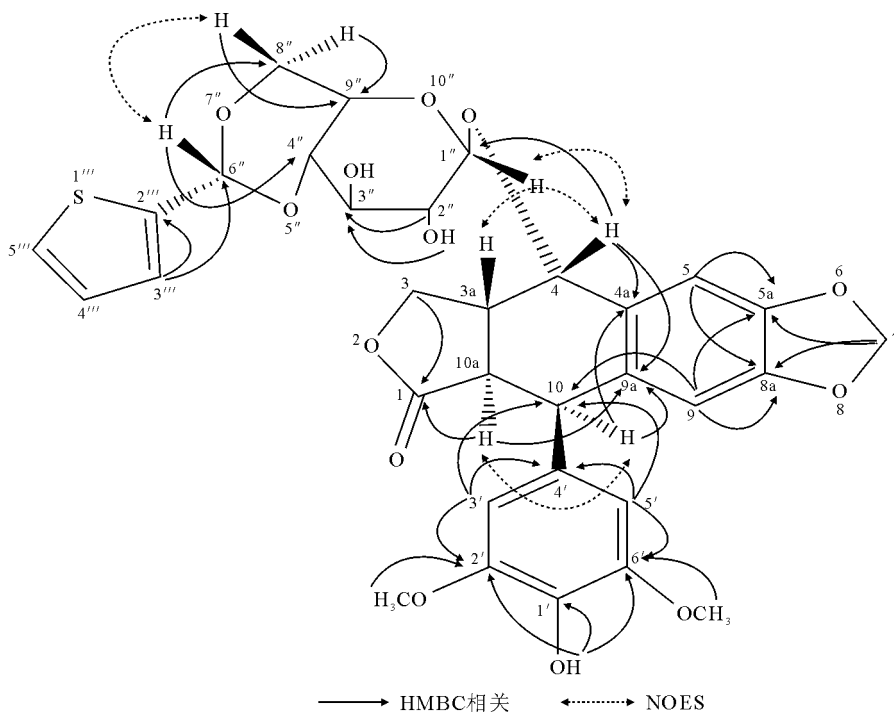


图 3 替尼泊昔化学结构式

Fig. 3 Molecular structure of Teniposide

参考文献:

- [1] Sweet D L, Henldler F J, Hanlon K, *et al.* Treatment of grade 3 and 4 astrocytomas with BCNU alone and in combination with VM-26 following surgery and radiation therapy[J]. *Cancer Treat Rep*, 1979, 61(7): 17-18.
- [2] Tian Shi-qiang(田士强), Zhang Qing-yin(张庆殷), Wu Cheng-yuan(吴承远), *et al.* The therapeutic effect of combinative use of VM26 and BCNU on glioma and research on its drug resistance (替尼泊昔和卡莫司汀对脑胶质瘤的治疗作用及耐药的研究)[J]. *Beijing Medical Journal(北京医学)*, 2002, 24(5): 336-338.
- [3] Richard J, Brennan, Jill Barber. Full assignments of the ^{13}C and ^1H NMR spectra of azithromycin in buffered D_2O and $\text{DMSO}-d_6$ [J]. *Magn Reson Chem*, 1992, 30: 327-333.
- [4] Zhang Jie(张杰), Gao Hui-yuan(高慧媛), Wu Bin(吴斌), *et al.* Structure determination of triterpene saponin from the seed of *Acanthopanax senticosus* by 2D NMR (2D NMR 对刺五加种子中的一个三萜皂苷进行结构解析)[J]. *Chinese J Magn Reson(波谱学杂志)*, 2005, 22(1): 15-19.

- [5] Li Wen(李文), Sha Yi(沙沂), Wei Jian-ling(魏建玲), *et al.* Assignment of ^{13}C and ^1H chemical shifts of potassium sodium dehydroandrographolide succinate(新药炎琥宁的碳氢 NMR 信号全归属) [J]. Chinese J Magn Reson(波谱学杂志), 2006, 23(2): 247–251.
- [6] Zhao tian-zeng(赵天增). ^1H Spectroscopy of Nuclear Magnetic Resonance (核磁共振氢谱) [M]. Beijing(北京): Beijing University Press(北京大学出版社), 1983: 18–40.
- [7] Shen Qi-feng(沈其丰). ^{13}C Spectroscopy of Nuclear Magnetic Resonance (核磁共振碳谱) [M]. Beijing(北京): Beijing University Press(北京大学出版社), 1988: 38–67.

Assignment of ^{13}C and ^1H Chemical Shifts of Teniposide

LI Wen*, SHA Yi, ZHU Dan

(Center of Instrumental Analysis, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Teniposide is a semisynthetic podophyllotoxin obtainable from the extracts of the roots and the rhizomes of May apple or mandrake plant *Podophyllum peltatum*. As an anticancer agent, Teniposide has become a major chemotherapy drug for the treatment of intracranial malignant tumor. In this study, the ^{13}C and ^1H chemical shifts of the compound were assigned using 1D NMR and 2D NMR techniques including COSY, TOCOSY, NOESY, gHSQC and gHMBC. Its structure was determined from the NMR data.

Key words: NMR, assignments, 2D NMR, teniposide, anti-tumor drug