



FOURIER 80

利用Fourier 80台式波谱仪的 ^1H 和 ^{13}C 核磁共振波谱技术，对马钱子碱进行分析

Alec Beaton
2023年12月

立于信，源于新

马钱子碱是一种天然存在的生物碱，多见于南亚原生树木中的马钱子种子，并致使该种子产生毒性^[1]。如图1所示，马钱子碱的化学结构包含一些有趣的官能团——包括苯环、多个脂族环结构，以及氮和氧等杂原子。这一系列特征通过一份富含结构信息的NMR谱图而获得表征。Fourier 80 MHz台式NMR波谱仪能够轻松完成针对马钱子碱等物质的研究，下文的应用说明将通过一维和二维NMR实验予以介绍。

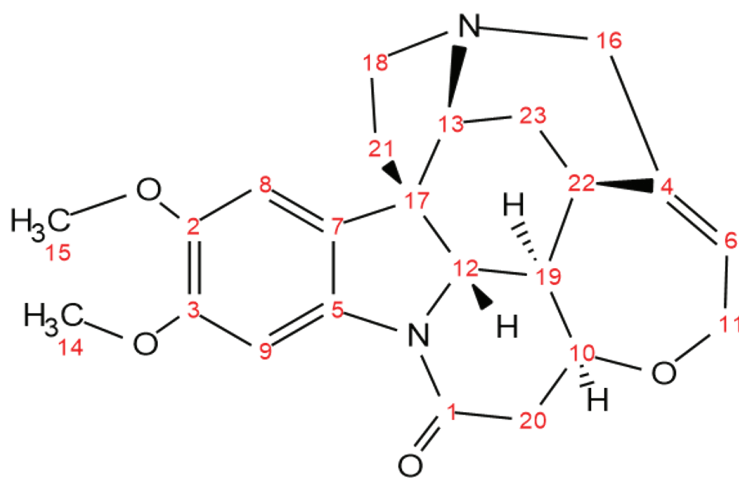


图1 马钱子碱 ($\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$) 的化学结构。

图2显示了在Fourier 80台式波谱仪上，仅通过一次扫描，在15秒内即获得的100 mM马钱子碱样品（溶解于 CDCl_3 ）的 ^1H NMR谱图。该谱图的积分对应于预期的26个质子，其中一些质子处于明显不同的化学环境，例如，与双键中的碳8、碳9和碳6连接的三个质子。

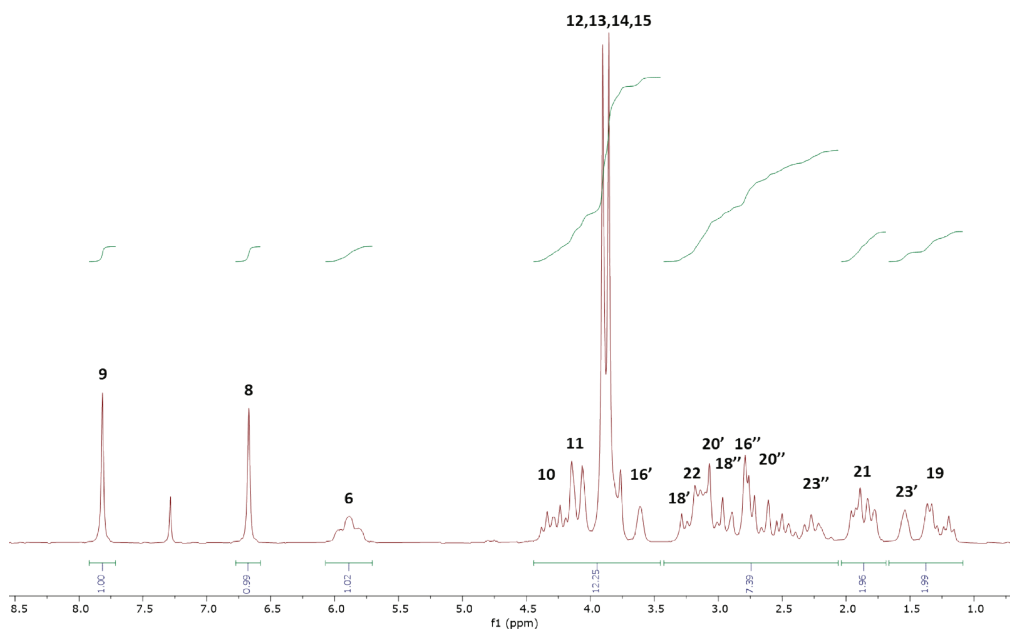


图2 仅通过一次扫描即获得的100 mM马钱子碱 (溶解于 CDCl_3) 的 ^1H NMR谱图, 整个实验用时仅15秒。

COSY实验可用于研究原子核如何通过化学键, 与附近的其他核相关联。图3显示了一项对250 mM马钱子碱 (溶解于 CDCl_3) 进行的 ^1H COSY实验案例。该实验采用梯度场, 经过一次扫描 (增量为 t_1), 用时共计13分钟。图2所示波峰反映了与碳8和碳9 (蓝色)、碳12-14和碳9 (绿色)、碳12-15和碳8 (橙色)、碳11和碳6 (紫色)、碳19和碳10 (粉色), 以及碳19和碳12-14 (浅橙色) 相连的质子之间的相关性。

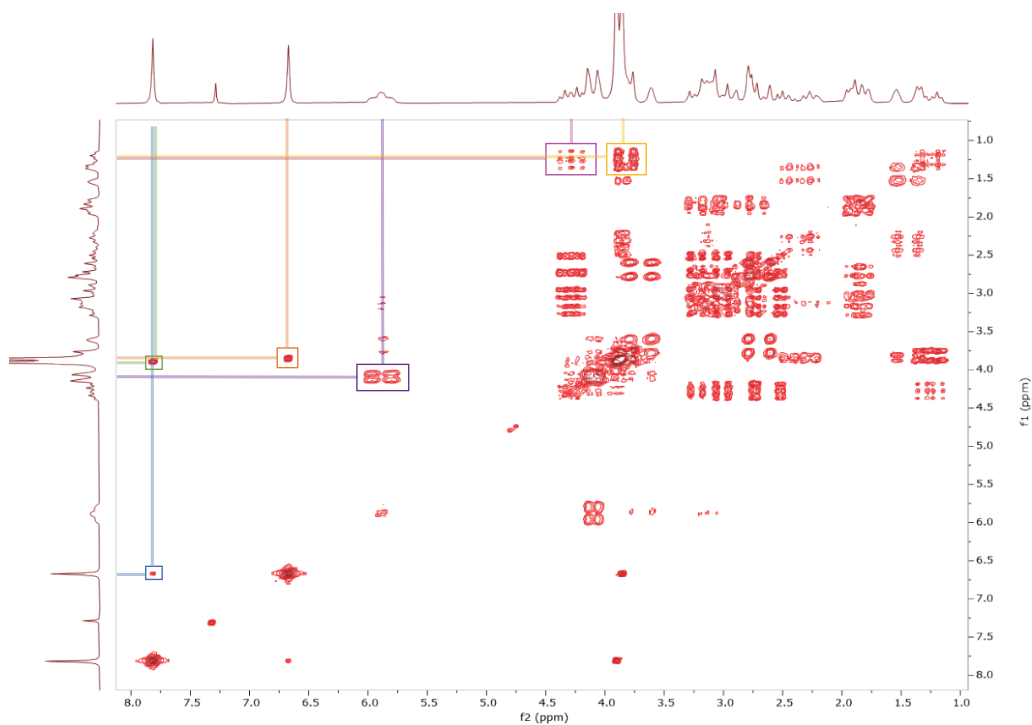


图3 在13分钟内获得的250 mM马钱子碱在 CDCl_3 中的 ^1H COSY谱图, 经过一次扫描 (增量为 t_1)。

通过1 M马钱子碱 (溶解于 CDCl_3) 的 ^{13}C 谱图, 研究人员得以逐一识别其分子中的23个碳位点, 如图4所示。为生成该谱图, 实验采用了功率门控 ^1H 去耦和45度翻转角, 进行了256次扫描 (每次扫描3秒), 实验用时共计13分钟。

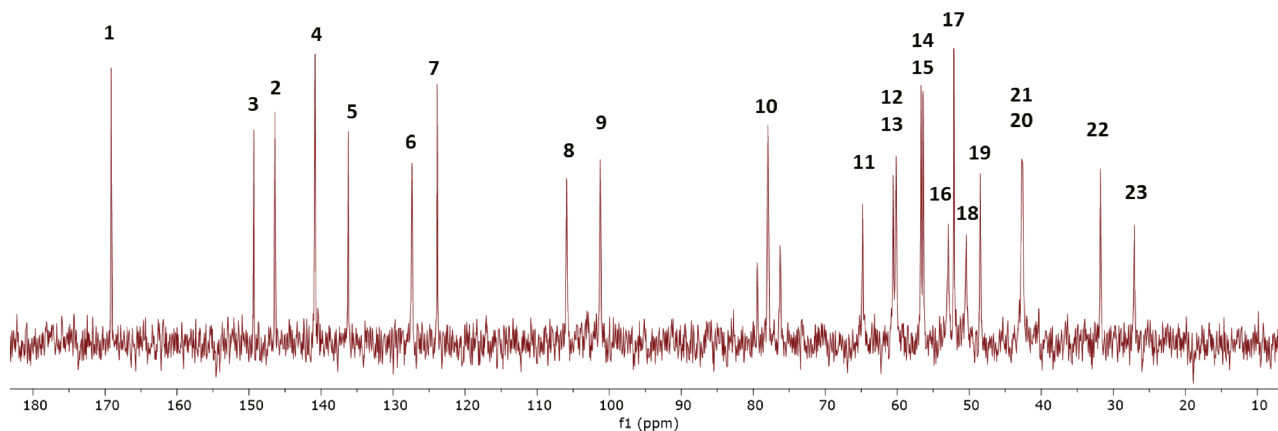


图4 在13分钟内获得的1 M马钱子碱 (溶解于 CDCl_3) 的 ^{13}C NMR谱图, 采用功率门控 ^1H 去耦和45度翻转角, 经过256次扫描。

最后, 可使用 ^{13}C 通道进行二维实验, 如图5所示的谱编辑的HSQC和HMBC谱图。在谱编辑的HSQC谱图中, CH_3 和 CH 基团中的质子 (图5左侧蓝色交叉峰) 与 CH_2 基团所连质子呈相反相位 (图5右侧红色交叉峰)。未直接连接质子的碳不会显示出任何相关性。该实验经过4次扫描 (TD F1 = 128), 共计用时11分钟。

HSQC谱图显示了与分子中的碳直接相连的质子之间的相关性, 与此相反, HMBC谱图则用于识别与分子中其他碳长程耦合的质子 (图5右侧)。例如, 根据HMBC谱图, 碳9所连质子与四种不同的碳核 (均为芳香环中的季碳, 如图1所示) ——碳7 (蓝色)、5 (绿色)、2 (粉色) 和3 (紫色) 存在长程耦合。该实验经过8次扫描 (TD F1 = 256), 用时共计37分钟。

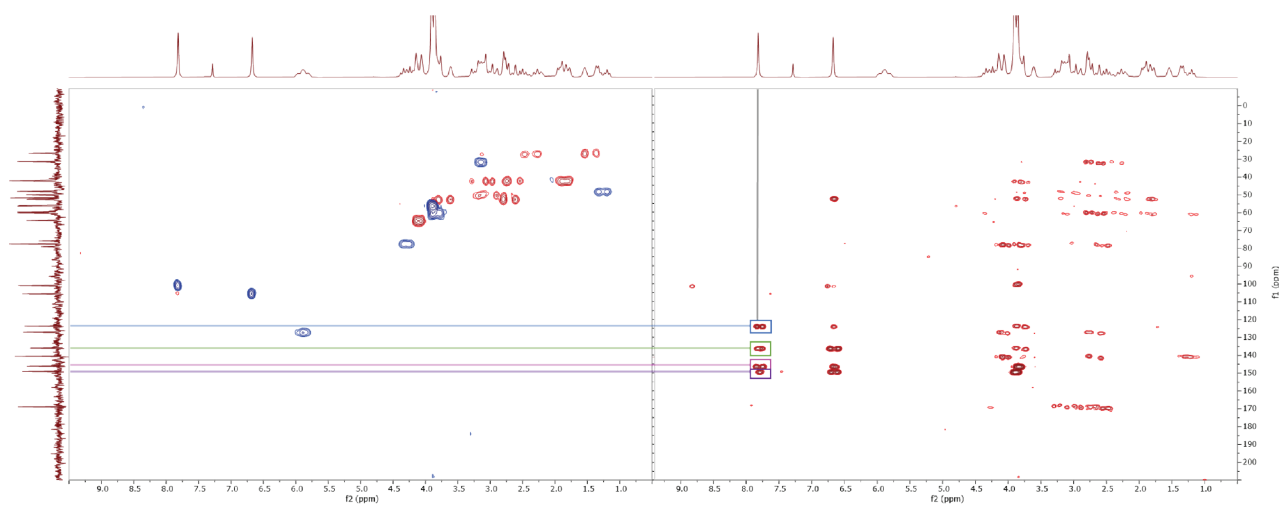


图5 A 300 mM马钱子碱 (溶解于 CDCl_3) 的谱编辑HSQC谱图 (左侧, 11分钟内获得) 和HMBC谱图 (右侧, 37分钟内获得)。

从图4所示的 ^{13}C 谱图可见，一些峰呈现重叠，例如，碳14与碳15（甲氧基）（56 ppm附近），或者脂族环结构中的碳21与碳20（42 ppm附近）。在试图确定某个未知化合物的完整化学结构时，这种重叠现象可能不利于分析。为提高 ^{13}C 维度的分辨率，可使用更多的t1增量。此设置会延长间接维度的采集时间，进而延长整个实验用时。例如，图5中的128 t1增量对应的间接维度采集时间为20 ms。通过将t1增量提高至512 t1，间接采集时间延长至70 ms，实验用时从11分钟延长至45分钟。

要通过较长的间接采集时间获得额外分辨率信息，同时保持较短的实验用时，可通过实施非均匀采样（NUS）来实现。Fourier 80能够轻松地获取NUS数据，如图6B所示。通过实施25%的稀疏采样，在间接维度检测到64个超复数点，同时设置512 t1增量，从而在11分钟内（间接采集时间为70 ms），即获得谱编辑的HSQC谱图，从而实现 ^{13}C 维度上更高的分辨率（相比于非NUS数据），同时实验用时并未延长。

尽管通过非均匀采样可提高 ^{13}C 维度的分辨率，但HSQC谱图中的一些交叉峰仍然存在相连或无法分离的情形。在这种情况下，使用宽带选择性的HSQC谱图可能更有利，如图6C和6D所示。图6C显示了一段在TD (F1) = 128下获得的，从67 ppm到47 ppm谱宽范围的HSQC谱图（图6A中 ^{13}C 投影中显示的黄色区域）。通过该实验，Fourier 80生成了与分子中的两个甲氧基碳（即图1中的碳14和碳15）对应的两个明显的交叉峰（57 ppm附近）（图6A、6B和6C中的红色框），并且，位于脂肪环中氮核附近的碳12和碳13（图1）对应交叉峰（图6A、6B和6C中的橙色框）的分辨率得到提高。最后，在平均32次扫描和TD (F1) = 64参数下生成的信号中，可获得一段较窄谱宽范围（47 ppm至37 ppm，图6A中 ^{13}C 投影中的绿色区域）的宽带选择性HSQC谱图，以便区分碳21和碳20对应的交叉峰（图6A、6B和6D中的蓝色框）。

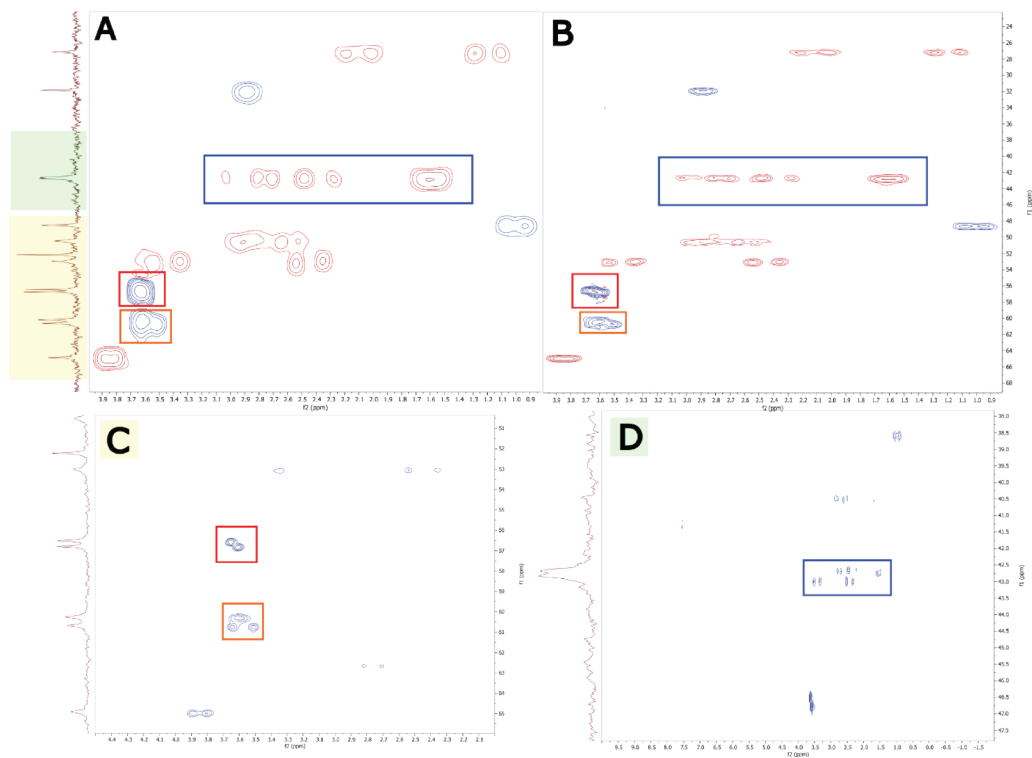


图6 (A) 在11分钟内，以128个t1增量和4次扫描设置获得的谱编辑HSQC谱图。(B) 在11分钟内，通过非均匀采样，以512 t1增量和4次扫描设置获得的谱编辑HSQC谱图。(C) 在18分钟内，以128个t1增量和4次扫描设置获得的，从67 ppm至47 ppm宽带选择性HSQC谱图。(D) 在一小时18分钟内，以64个t1增量和64次扫描设置获得的，从47 ppm到37 ppm的选定波段HSQC谱图。

此外,我们还可获取ROESY谱图(如图7所示),作为COSY谱图(如图3所示)的补充。与COSY交叉峰不同的是,ROESY交叉峰并非通过化学键的J耦合而产生;相反,ROESY交叉峰依赖于偶极耦合,最终对应于在空间中彼此接近的质子。ROESY交叉峰还会以不同的相位出现(相对于对角线峰),如图7所示的蓝色等值线(相对于对角线上的红色等值线)。

至于这些信息的效用,我们再次以图1中的两个甲氧基(碳15和碳14)为例来说明。在ROESY谱图中,我们可通过确定这些甲氧基与(碳8和碳9上的)哪个苯环质子产生交叉峰(如图7所示),来区分这些甲氧基。要将这些甲氧基峰相分离,可开展两个一维选择性ROESY实验,这两个实验分别选择苯环上的一个不同质子。使用TopSpin中直观的工作流界面,可以轻松地完成实验设置。

所得谱图是一张穿过二维ROESY谱图对角线上选定波峰位置的水平切片,如图7所示。例如,7.55 ppm处的碳9高频苯质子,与碳14上的甲氧基质子产生交叉峰(图7中,以橙色表示),而6.40 ppm处的碳8低频苯质子,与碳15上的甲氧基质子产生交叉峰(图7中,以绿色表示),每张选择性一维谱图中,均可观察到单独的甲氧基质子共振。

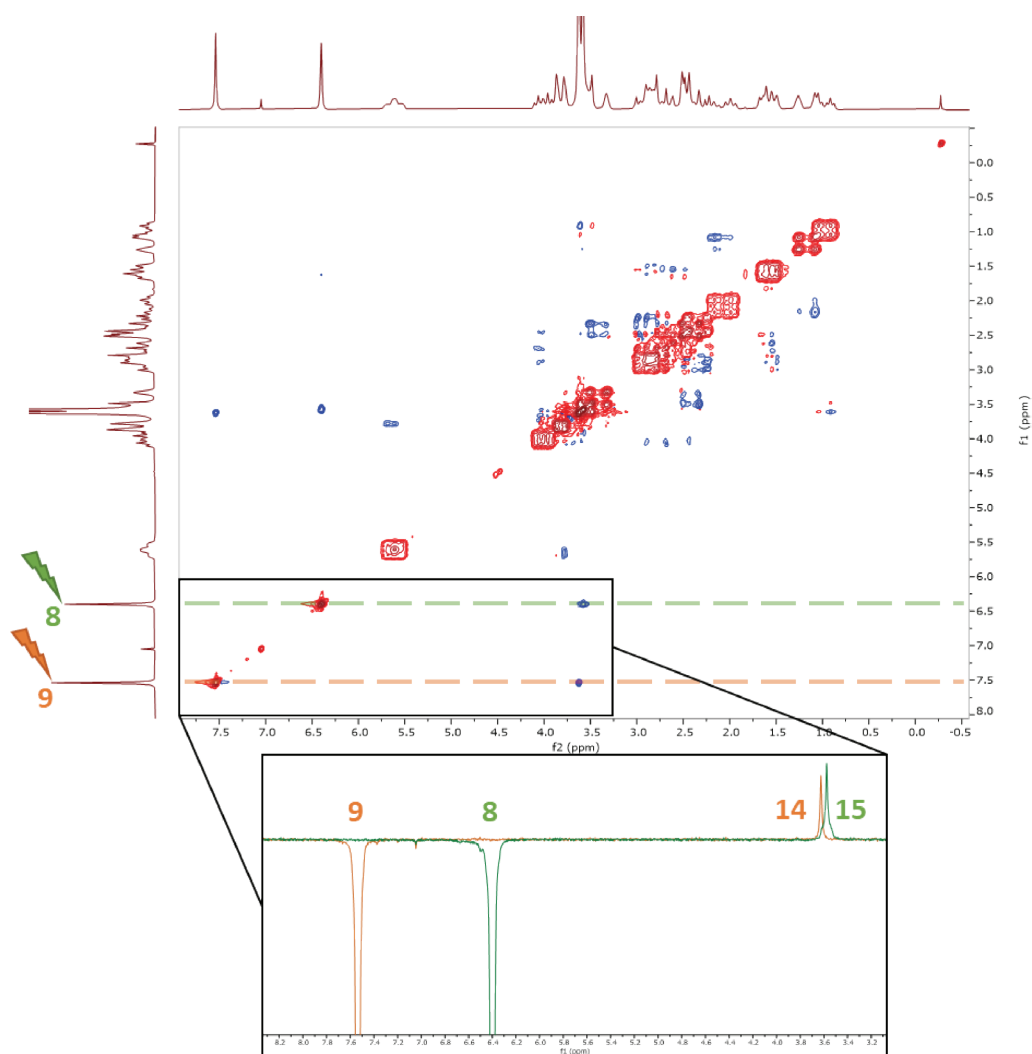


图7 300 mM马钱子碱在80 MHz下的ROESY谱图,经过8次扫描(增量为256个t1增量),实验用时共计1小时。插图显示了两个选择性一维ROESY实验的叠加,选择的是7.55 ppm(橙色)和6.40 ppm(绿色)处的波峰,经过8次扫描,实验用时共计2分29秒。

除了选择性ROESY实验以外,还可采用选择性COSY和TOCSY实验。与图7所示的一维选择性ROESY数据类似,这些选择性实验可生成完整二维COSY或TOCSY谱图对角线上选择性激发峰位置的水平切片。由图8所示的谱图可见,碳6上的质子被选择性地照射(5.7 ppm,以褐红色轨迹中的红色闪电符号表示)。

如图3中的二维COSY谱图所示，该质子与附近碳原子上的三个不同质子形成J耦合。根据COSY实验期间，J耦合发生演变的时长，一些波峰可能显得比其他波峰更剧烈。例如，当这一时长对于11 Hz的J耦合（图8，绿色轨迹）为最优时，所得一维选择性COSY谱图4.1 ppm处的碳11质子最为剧烈。如图1所示，这些质子位于相邻的碳原子上，从而产生三键J耦合。距离超过三个键的质子所产生的耦合通常较弱。因此，当上述时长对于3.5 Hz的J耦合（图8，青色轨迹）为最优时，在一维选择性COSY谱图中，3.6 ppm附近的碳16和3.1 ppm处的碳22上的质子更容易被观察到。在这两种情况下，一维选择性COSY谱图中的相关峰均呈现反相线形。如果许多相关峰强度各异，则分析难度增大。一种可行的解决方案是运行一维选择性TOCSY实验，其中相关峰呈现同相线形，如图8的紫色轨迹所示。在此情况下，混合时间将决定J耦合质子易于观察的程度。当混合时间为120 ms时，单独COSY实验中观察到的所有相关峰此时也均可观察到，此外，还可观察到一些与碳23（2.27 ppm和1.54 ppm）、碳19（1.35 ppm）、碳12和碳13（3.87 ppm）上的质子的相关性较低的其他长程耦合质子，并且还可更清晰地观察到2.8 ppm和2.6 ppm附近的16”质子共振。

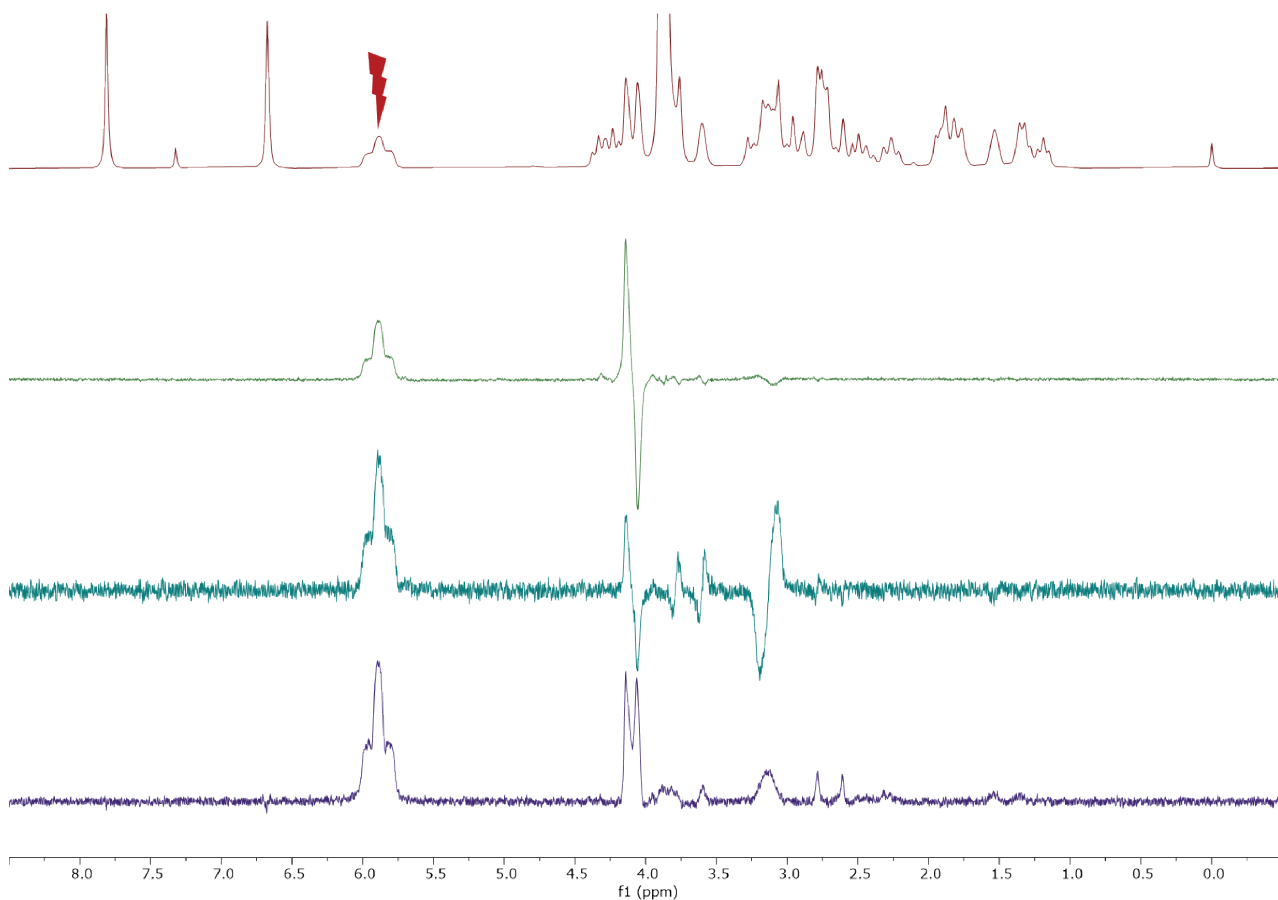


图8 一维¹H谱图（褐红色轨迹）显示了在后续实验中被用于进行选择性激发（5.7 ppm）的波峰。下面两个一维选择性COSY谱图中的混合时长对于J耦合常数的两个不同值——11 Hz（绿色轨迹）和3.5 Hz（青色轨迹）分别为最优，经过8次扫描，实验用时共计2.5分钟。最后的一维选择性TOCSY谱图（紫色轨迹）中的混合时间为120 ms，经过32次扫描，实验用时共计7.5分钟。

这组实验证实了Fourier 80在台式NMR分析方面拥有的巨大潜力：从用于进行结构分析的常规一维¹H或¹³C谱图，到用于解决更具体、更复杂结构问题的选择性杂核和同核实验，它都表现优异。该系统不仅通过¹H和¹³C通道带来了灵活性，而且还可通过采用梯度场、形状脉冲和非均匀采样，实现快速、高效、可靠的数据采集。

参考文献:

1. Lu, L.; Huang, R.; Wu, Y.; Jin, J.-M.; Chen, H.-Z.; Zhang, L.-J.; Luan, X. Brucine: A Review of Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Frontiers in Pharmacology* 2020, 11.



布鲁克磁共振微信公众号

● 布鲁克 (北京) 科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbio.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询:
400-898-5858
布鲁克售后技术支持:
400-898-1088

布鲁克 (北京) 科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号
中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路
2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路
618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886