

NUS 一种快速可靠的 NMR 实验技术

闫丽, 熊嫣, 彭绍春

(北京理工大学分析测试中心, 北京 102488)

摘要: 2D NMR 实验在有机化合物、药物分子、蛋白质等结构解析中具有重要作用, 由于 2D NMR 共振信号分别在两个独立的频率轴上展开, 因此需要较长的数据采集时间, 多数 2D NMR 基本在夜间或隔天进行测试, 对于一些不稳定易分解的化合物, 可能会导致信号缺失, 造成解析困难, 本文以利福霉素-S 为研究对象, 通过 NUS (Non-uniform sampling) 技术采集其 COSY、HSQC 和 HMBC 谱图, 结果表明使用 NUS 实验技术, 不仅缩短了 50% 的实验时间, 信噪比提高了 4 倍, 同时也相应的提高了谱图的分辨率, 为今后快速鉴定化合物结构提供了参考。

关键词: 核磁共振; NUS; 2D NMR;

NUS a fast and reliable NMR experimental technology

Yan Li, Xiong Yan, Peng Shaochun

(Analysis & Testing Center, Beijing Institute of Technology, Beijing 102488, China)

Abstract: 2D NMR experiments play an important role in the structural analysis of organic compounds, drug molecules, proteins, etc. Since the 2D NMR resonance signals are developed on two independent frequency axes, a longer data acquisition time is required. Most 2D NMR is basically at night or test on the next day. For some unstable and easy-to-decompose compounds, it may cause signal loss and difficulty in analysis. This article takes rifamycin-S as the research object. Collect its COSY, HSQC and HMBC spectra through NUS (Non-uniform sampling) technology, the results show that the use of NUS experimental technology not only shortens the experiment time by 50%, increases the signal-to-noise ratio by 4 times, but also improves the resolution of the spectra correspondingly, which is useful for the rapid identification of compound structures in the future.

Keywords: NMR; NUS; 2D NMR

1 引言

NMR 已广泛应用于化学化工、生物医学、代谢组学、动力学等研究领域, 并成为鉴定

化合物结构以及研究动力学研究强有力的分析手段。当需要阐明一个已知或未知的分子结构时，2D NMR 将起到至关重要的作用。相比于 1D NMR，2D NMR 共振信号分别在两个独立的频率轴上展开，因此需要较长的数据采集时间，对于不稳定易分解化合物，伴随着数据采集时间的增加而发生结构变化，将不利于结构解析。

要获得高分辨率的 2D NMR 需要以等间距的时间间隔对时域进行采样，需要较长的数据采集时间^[1]，大多数 2D NMR 基本在夜间或隔天进行测试，从而减慢了结构解析的进程。如遇到样品浓度、原子核天然丰度偏低等情况，则需要增加采样时间，才能获得分辨率和信噪比较高的谱图，如何不增加实验时间也可获得分辨率和信噪比较高的 2D NMR，节省谱仪的时间，仍是广大学者日益关注的问题。

随着现代谱仪硬件技术的高速发展，采用高场强的 NMR 谱仪，可提高样品中核自旋极化度，从而获得更强的 NMR 信号以缩短数据采集的时间^[2]。高灵敏度超低温探头的广泛应用，采用低温氦气冷却探头的接收线圈与前置放大器（冷却至 25K 和 77K 左右），极大程度的降低了检测线圈中的电子噪音，使灵敏度提高了 3-4 倍^[2-3]。多个接收器并行采集的新型机柜（NEO），在硬件基础上解决了 2D NMR 实验数据采集的基本问题。

为了进一步提高 2D NMR 实验效率，在实验技术方法开发上，创立了快速采集 2D NMR 的 NUS（Non-uniform sampling）实验技术，通过在间接维上随机选取采样点数，可快速的完成 2D NMR 的测试，与传统线性采集方式相比节省了 50%的实验时间^[4-9]，已广泛应用于 2D NMR 实验中。本文以利福霉素-S 为例，探讨了基于 NUS 实验技术在 2D NMR 上的实验结果，就数据采集时间、信噪比、分辨率以及数据重建进行讨论，为化合物的快速检测和结构解析提供一种解决思路的参考。

2 实验原理

2D NMR 是通过多个脉冲重复 1D NMR，从而创建一个间接的时间序列维度，2D NMR 中的 1D 测量被称为“增量”，一系列的 1D 测量数据形成了一个二维矩阵，矩阵的“行”为直接检的 1D NMR，“列”组成了间接维度，而 2D NMR 在间接维数中所获得分辨率所需的实验时间由 t_1 增量所决定^[6]，每个实验均是等间隔的时间序列。二维矩阵的“行”进行傅里叶变换生成一个干涉图，干涉图的“列”进行傅里叶变换，经过两次傅里叶变换，生成 2D NMR^[4-6]。

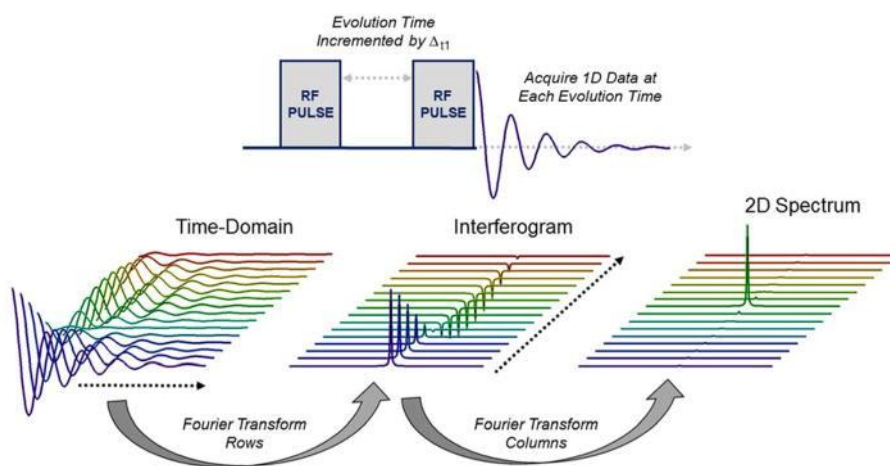


图1 2D NMR 原理示意图

NUS (Non-uniform sampling) 是一种基于稀疏式非均匀采样技术, NUS 最早的方法是从指数概率密度函数 (PDF) 中随机采样, 以模拟 NMR 信号衰减^[1,9]。在间接维度中, 通过跳过 2D 中一些 1D 的测量子集, 随机获取间接维上一小部分的时间增量, 从而减少数据采集的总时间^[5-6,9-10]。因此传统傅里叶变换不再对 NUS 数据产生光谱, 需要采用特殊的方法对原始数据进行重建, 主要方法包括: 压缩感知 (CS)、最大熵、迭代软阈值 (IST)、迭代重加权最小二乘法 (IRLS)^[11-12]。

传统信号采集需满足 Nyquist 采样定理, 即采样频率不能低于信号频谱中最高频率的两倍, 才可对信号进行压缩处理。而压缩感知 (CS) 是指在某一变换区域内若信号是稀疏的, 对原始信号进行随机欠采样后, 可将采样与压缩编码合并进行, 通过非线性算法重建出原始信号^[2,11-12]。

3 实验部分

3.1 仪器与采集参数

¹H-NMR、¹³C-NMR、线性采集 2D NMR、NUS 采集 2D NMR 数据均记录在配备有 BBO H & F 宽频氦冷超低温反式探头的 Bruker Ascend 700 MHz 核磁共振波谱上, 共振频率为 700.15 MHz。恢复时间 (d_1) 为 1.5 s, 累加次数为 16, NUS 数据矩阵大小为 2 k × 512 个数据点 (间接维 (t_1) 512), 采样点稀疏度 ($N_{US}AMOUNT(\%)$) 为 50%, $N_{US}POINTS$ (COSY、HSQC、HMBC) 分别为: 256、256、128。

使用 Top Spin 3.5 pl 7 版本中提供的压缩感知 (CS) 迭代软阈值 (IST) 算法重建 NUS 采样数据。

3.2 样品制备

实验过程中所用的溶剂均为分析纯试剂，未经纯化直接使用。利福霉素-S 生产厂家为 TCI 化学试剂公司。配置 50 mM 利福霉素-S 样品溶解于 0.6 mL 的 DMSO-*d*₆ 于 5 mm 核磁管中。

4 实验结果与讨论

4.1 2D NMR 数据采集时间

表 1 通过比较线性采集和 NUS 采集的数据时间，可以发现 NUS 采集 COSY、HSQC 和 HMBC 的数据时间相比于线性采集，分别节省了 49.7%、50%和 50.2%的数据采集时间。线性采集 COSY、HSQC 和 HMBC 谱图总共用时 11 h 10min，而使用 NUS 进行数据采集则用时 5 h 35min，总体节约了 50%的数据采集时间。

表 1 线性采集和 NUS 采集 2D NMR 时间

TD=521				
D ₁ =1.5 s	实验	线性采集	NUS	节省 (%)
NS=16				
	¹ H- ¹ H COSY	3 h 41min	1 h 51min	49.7
	¹³ C- ¹ H HSQC	3 h 34min	1 h 47min	50
	¹³ C- ¹ H HMBC	3 h 55min	1 h 57min	50.2
总时长		11 h 10min	5 h 35min	50

由实验原理可知，2D NMR 是通过多个脉冲重复 1D NMR，每个 1D 增量都是等间隔的，数据采集时间取决于测量的增量数，因此增加了 2D NMR 数据采集的时间，而 NUS 跳过了 2D 中一些 1D 的测量子集，使得采集的 1D 测量值减少，通过只获得间接维一小部分时间增量，从而缩短实验时间^[4-6]。对于代谢组学以及不稳定易分解的化合物，可在有效时间内快速完成 2D NMR 的测试，避免因结构变化而造成信号缺失的问题。

如图 2 所示在相同的实验参数条件下（恢复时间（*d*₁）为 1.5 s，累加次数为 16，数据矩阵大小为 512 个数据点（间接维度 *t*₁ 点数）），采样稀疏度（N_{US}AMOUNT(%)）为 50%，使用 NUS 进行数据采集的总时间减少，但是相关信号峰并未丢失，COSY（ δ_{H} 0.57, 3H, d, *J* = 6.3 Hz、 δ_{H} 0.79, 3H, d, *J* = 7.0 Hz、 δ_{H} 0.84, 3H, d, *J* = 7.0 Hz）、HSQC（ δ_{H} 2.90（1H, brd）， δ_{C} 75.9、 δ_{H} 3.26（1H, dd）， δ_{C} 77.9）、HMBC（ δ_{H} 2.06（1H, m） δ_{C} 39.8、 δ_{H} 1.44（1H, m）， δ_{C} 36.8、 δ_{H} 1.44（1H, m）， δ_{C} 39.2）。

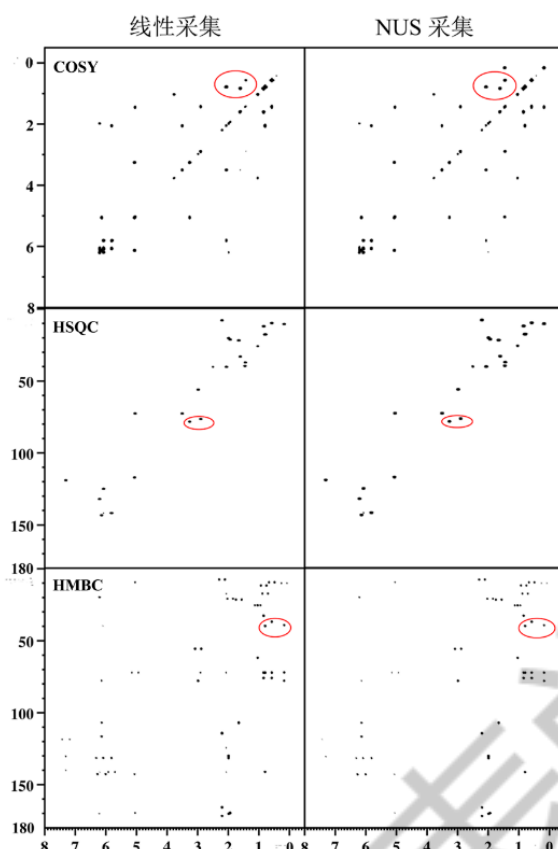


图2 传统线性采集 COSY、HSQC、HMBC 谱图和 NUS 技术采集 COSY、HSQC、HMBC 谱图

在 NUS 中, 采样点的稀疏度($N_{US}AMOUNT(\%)$)决定实验时间, 本实验采样稀疏度(%) 设置为 50%, 即用原有 $TD(F1=512)$ 的采样点对应实验时间的二分之一进行采样, 而剩下 50% 的数据点用特定的算法进行重建, 因此只采集间接维上一小部分的采样点, 便可达到缩短实验时间的目的。

4.2 2D NMR 谱图的信噪比和分辨率

表 2 通过比较线性收集和 NUS 技术的信噪比, 采用 NUS 技术收集 COSY、HSQC 和 HMBC 谱图的信噪比分别提高了 1.87、2.7、1.87 倍

表 2 线性采集和 NUS 技术谱图信噪比对比

实验	线性采集	NUS 采集	提高
	信噪比		倍数
1H - 1H COSY	6418.79	11974.35	1.87
^{13}C - 1H HSQC	1061.05	2866.18	2.7
^{13}C - 1H HMBC	4504.05	8400.92	1.87

将线性和 NUS 技术采集 COSY 谱图 0-6 ppm 处进行放大对比（如图 3 所示），经过 t_1 噪音处理，结果表明使用 NUS 技术，在节省 50%实验时间的情况下，谱图噪音较小，信噪比较高于线性采集。

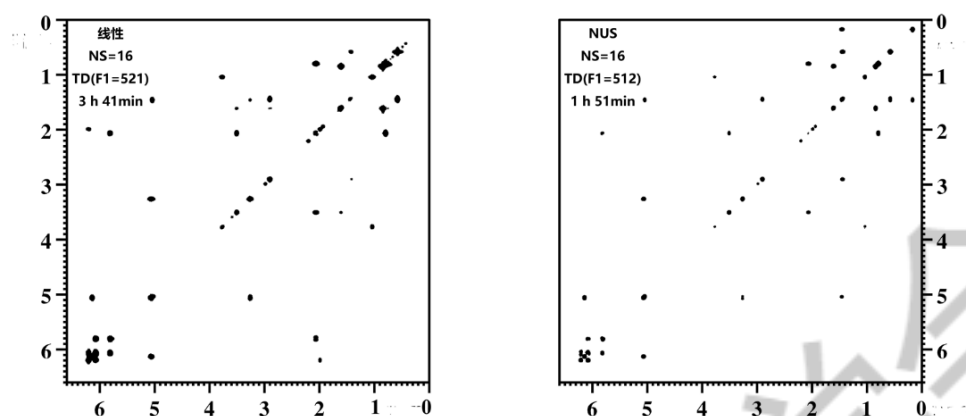


图 3 线性 2D NMR 与 NUS 技术采集 COSY 实验信噪比示意图

由于传统线性采集的信号经过傅里叶变换会产生类似于噪音的伪影，而 NUS 采用随机采集采样点，剩余采样点由特定的算法进行数据重建，可以剔除频率中的伪影，提高谱图的信噪比。

如图 4 可知，将 COSY 5.5-6.5 ppm 处 (δ_H 5.81, 1H, dd, $J = 15.2, 7.7$ Hz、 δ_H 6.07, 1H, dd, $J = 15.2, 10.9$ Hz、 δ_H 6.20, 1H, dd, $J = 10.9$ Hz) 相关信息峰进行放大，使用 NUS 技术采集的数据点噪音较小，且峰宽较窄偏规则椭圆状，等高线密集无重叠现象，并且具有较高的分辨率。而使用线性 2D NMR 数据点噪音较大，虽然等高线密集但峰值重叠，分辨率较低。由于 NUS 采用特定算法对原始数据进行重构，因此可以准确的恢复峰位、峰型以及强度^[7,11-12]。

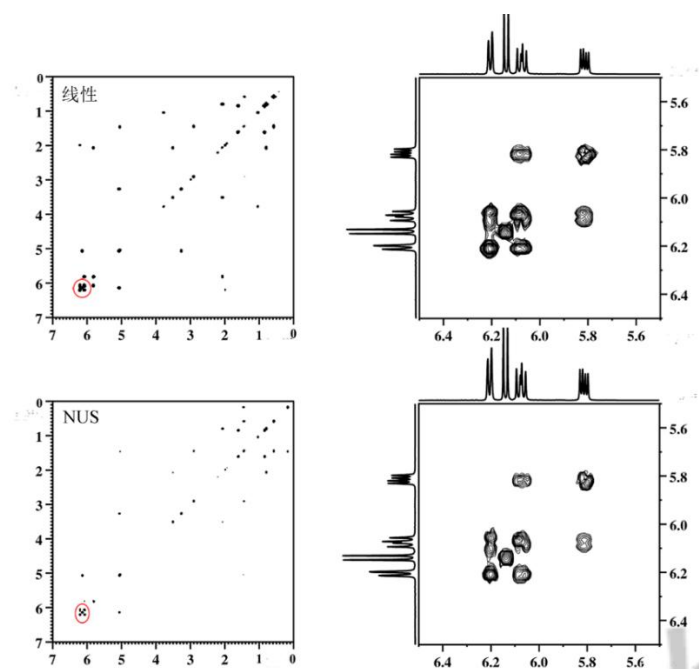


图4 利福霉素-S COSY 谱图 5.5–6.5 ppm 放大图

4.3 NUS 数据重建

由实验原理可知，若信号在变换区域是稀疏的，即可将采样与压缩编码合并进行，重建 NUS 原始数据，而信号的稀疏性是实现 CS 的基础，如表 3、图 5 所示，稀疏度 ($N_{US}AMOUNT(\%)$) 分别选取 12.5%、20%、35%、50%， $N_{US}POINTS$ 分别为 64、102、179、256 采集 COSY 谱图，采用压缩感知 (CS) 迭代软阈值 (IST) 算法对 NUS 数据进行重建，可明显观察到，即使稀疏度为 12.5%，数据采集时间为 28 min 5sec 的 NUS 数据，重建后的数据，与 100% 离散傅里叶变换下的谱图相似，并无相关信息峰的丢失 ($\delta_H 0.57$, 3H, d, $J = 6.3$ Hz、 $\delta_H 0.79$, 3H, d, $J = 7.0$ Hz、 $\delta_H 0.84$, 3H, d, $J = 7.0$ Hz)，且重构的交叉峰强度与线性基本一致。

表3 采用不同稀疏度 ($N_{US}AMOUNT(\%)$) 收集 COSY

实验/参数	$N_{US}AMOUNT$ (%)	$N_{US}POINTS$	时间
COSY	12.5	64	28 min 5sec
TD=521	20	102	44 min 3sec
NS=16	35	179	1 h 17min
D1=1.5 s	50	256	1 h 51min

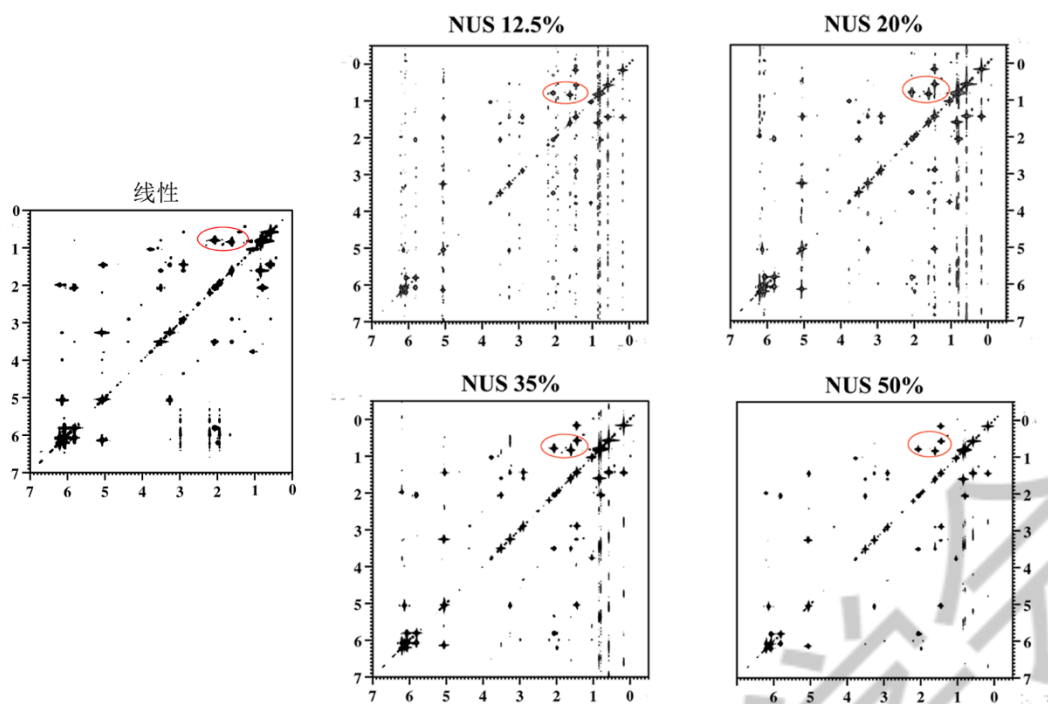


图5 线性和选取不同稀疏度采集的 COSY 谱图

传统的离散傅里叶变换是一种线性算法，因此会在频谱中有很好的强度。而迭代软阈值（IST）算法则是非线性算法，是指在每次迭代的过程中，将信号与全局阈值进行比较，将高于阈值的信号峰储存在重建的谱图之中，在对重建的谱图进行逆变换得到与之对应的时域数据，减去该时域数据，剩下的部分与小波变换结合后，运到下一次迭代中去^[2, 13-15]，因此可以得到与离散傅里叶相似的谱图。由于迭代软阈值(IST)信号丢失最小，重建性最好，因此在 NUS 中经常采用迭代软阈值（IST）对数据进行重建。

5 结束语

如今 NUS 技术已广泛应用于生物大分子、代谢组学多维 NMR 实验，同样也适用于 2D 有机小分子。本文通过采用 NUS 技术，完成了对利福霉素-S 的 2D NMR 实验采集，随机获取间接维上一小部分的时间增量，不仅缩短了 50%的数据采集时间，同时相应的提高了谱图的信噪比和分辨率，NUS 可像线性采集方式一样采集 2D NMR，并具有同线性 2D NMR 相同的信噪比和分辨率。对于不稳定易分解的化合物大分子化合物可在有效时间内快速完成相关谱图测试，是一种快速、可靠的 NMR 实验技术，为有机催化、分析化学、材料、代谢组学等领域提供高效检测方法，推动学科发展。

参考文献:

- [1] Mehdi Mobli. Reducing seed dependent variability of non-uniformly sampled multidimensional NMR data[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2005, 256, 60–69
- [2] 聂莉莎, 蒋滨, 张许等. 基于压缩感知/重采样的 NMR 噪声抑制新方法[J]. *波普学杂志*, 2016, 33 (2) 224-256
- [3] Helena Kovacs, Detlef Moskau, Manfred Spraul. Cryogenically cooled probes—a leap in NMR technology[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2005, 20(2,3), 134–135
- [4] Trixi von Schlippenbach, Peter J. Oefner, Wolfram Gronwald. Systematic Evaluation of Non-Uniform Sampling Parameters in the Targeted Analysis of Urine Metabolites by ^1H , ^1H 2D NMR Spectroscopy[J]. *Scientific Reports.* 2018, 8, 1-7
- [5] Adrien Le Guennec, Jean-Nicolas Dumez, Patrick Giraudeau, Stefano Caldarella. Resolution-enhanced 2D NMR of complex mixtures by non-uniform sampling[J]. *Magn. Reson. Chem.* 2015, 53, 913–920
- [6] Frank Delaglio, Gregory S. Walker, Kathleen A. Farley. Non-Uniform Sampling for All: More NMR Spectral Quality, Less Measurement Time[J]. *Am Pharm Rev*, 2017, 20(4), 1-11
- [7] Dariusz Gołowicz, Paweł Kasprzak, Vladislav Orekhov, Krzysztof Kazimierczuk. Fast time resolved NMR with non-uniform sampling[J]. *D. Gołowicz et al*, 2020 (116) 40–55
- [8] Martin Billeter. Non-uniform sampling in biomolecular NMR[J]. *J Biomol NMR* (2017) 68:65–66
- [9] Tomas Miljenović, Xin ying Jia, Peter Lavrencic, Bostjan Kobe, Mehdi Mobli. A non-uniform sampling approach enables studies of dilute and unstable proteins[J]. *J Biomol NMR* (2017) 68:119–127
- [10] Troels E. Linnet, Kaare Teilum. Non-uniform sampling of NMR relaxation data[J]. *J Biomol NMR* (2016) 64:165–173
- [11] Krzysztof Kazimierczuk, Vladislav Yu. Orekhov. Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 5556–5559
- [12] Dariusz Gołowicz, Paweł Kasprzak, Vladislav Orekhov, Krzysztof Kazimierczuk. Fast time-resolved NMR with non-uniform sampling[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 6548–6551
- [13] Mehdi Mobli, Jeffrey C. Hoch. Nonuniform sampling and non-Fourier signal processing

methods in multidimensional NMR[J]. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.83 (2014) 21–41

[14]D. Flemming Hansen. Using Deep Neural Networks to Reconstruct Non-uniformly Sampled NMR Spectra[J].J Biomol NMR (2019) 73:577–585

[15]韩明月，郑慧，胡炳文等.迭代软阈值法压缩感知重建谱峰较宽的二维固体谱[J].波谱学杂志，2015，32（4）552-561

中国仪器仪表杂志