

## 植物细胞壁物质在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的 溶液态 2D HSQC NMR 分析

王婉婉<sup>1</sup>, 蔡继宝<sup>2</sup>, 徐振宇<sup>2</sup>, 牛凡超<sup>1</sup>, 苏加坤<sup>2</sup>, 张翼<sup>2</sup>, 杨俊<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026; 2. 江西中烟工业有限责任公司技术中心, 江西南昌 330096)

**摘要:** 细胞壁物质凝胶是细胞壁物质直接在核磁共振管中与氘代溶剂生成的产物, 无须分离成分就可以获得细胞壁良好分辨的 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 相关核磁共振谱(2D HSQC NMR)。为此选用氘代二甲基亚砜(DMSO-d<sub>6</sub>)、氘代二甲基亚砜/氘代吡啶(DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub>)和氘代二甲基亚砜/氘代六甲基磷酰三胺(DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>)这 3 种溶剂溶解白杨(被子植物)细胞壁, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下得到的图谱信号最丰富, 且很容易获得羟基苯基相关信号, 所以 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 提高了图谱的分辨率和强度。将 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 应用于松树(裸子植物)的二维核磁结构表征中, 图谱显示了高分辨率的多糖相关性和木质素结构。该法适用于植物的细胞壁物质检测, 因此这种 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的 2D HSQC NMR 研究是一种更快速, 绿色的植物细胞壁结构的评估方法。

**关键词:** 凝胶态; 细胞壁物质; 2D HSQC NMR; DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

**中图分类号:** O656.4 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2020.08.006

**引用格式:** 王婉婉, 蔡继宝, 徐振宇, 等. 植物细胞壁物质在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的溶液态 2D HSQC NMR 分析[J]. 中国科学技术大学学报, 2020, 50(8): 1077-1083.

WANG Wanwan, CAI Jibao, XU Zhenyu, et al. 2D HSQC NMR analysis of plant cell wall material in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> [J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2020, 50(8): 1077-1083.

## 2D HSQC NMR analysis of plant cell wall material in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

WANG Wanwan<sup>1</sup>, CAI Jibao<sup>2</sup>, XU Zhenyu<sup>2</sup>, NIU Fanchao<sup>1</sup>, SU Jiakun<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, YANG Jun<sup>1\*</sup>

(1. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Technology Center, China Tobacco Jiangxi Industry Co., Ltd., Nanchang 330096, China)

**Abstract:** The cell wall material gel is the product of the cell wall material directly formed with deuterated solvent in the nuclear magnetic resonance tube. The well-resolved/dispersed 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H related nuclear magnetic resonance spectra (2D HSQC NMR) can be obtained without the separation of components. Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d<sub>6</sub>), deuterated dimethyl sulfoxide/deuterated pyridine (DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub>) and deuterated dimethyl sulfoxide/deuterated hexamethylphosphoryltri-amine (DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>) were selected to dissolve the cell wall of poplar (angiosperm). The spectrum signals under DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> were the most abundant, and the correlation of p-hydroxyphenyl signals could be easily obtained. Therefore, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> improves the resolution and intensity of the spectrum. DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> was used to characterize the two-dimensional NMR structure of pine (gymnosperms), and the spectrum showed high-resolution polysaccharide correlation and lignin structure. Studies have shown that this method is suitable for the detection of cell wall substances in plants. Therefore, the 2D HSQC NMR study under DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> is a faster and greener method to evaluate the structure of plant cell wall.

**Key words:** Gel state; cell wall substance; 2D HSQC NMR; DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

收稿日期: 2020-06-06; 修回日期: 2020-06-28

基金项目: 江西中烟工业有限责任公司科技项目(2020-016)资助。

作者简介: 王婉婉, 女, 1994年生, 硕士。研究方向: 分析化学。E-mail: sa170191@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 杨俊, 博士/副教授。E-mail: yjun8202@ustc.edu.cn

## 0 引言

植物细胞壁又被称为木质纤维物质,主要由纤维素、半纤维素、木质素组成,是一种重要的可再生能源<sup>[1-2]</sup>.纤维素是一种以 $\alpha$ -1,4 苷键连接的葡萄糖聚合物,纤维素链组合在一起形成微纤维束,夹在微纤维束之间的物质是半纤维素和果胶质<sup>[3]</sup>.半纤维素主要由戊糖和己糖组成<sup>[4]</sup>.木质素是由苯丙烷衍生物单体(如香豆醇、松柏醇和芥子醇等)构成的一种结构复杂的立体物质.该物质是一种无定型并具有生物多态性的生物大分子,填充在纤维素和半纤维素的空隙<sup>[5]</sup>;三者之间的紧密结合共同形成了细胞壁的致密结构<sup>[6]</sup>.为了充分发挥木质纤维素生物资源作为生产燃料、化学品和材料的可再生资源的潜力,必须进一步了解生物物质内部的化学和分子结构,这些工作需要深入快速地分析技术并且同时保证植物细胞壁特征的完整<sup>[7]</sup>.植物细胞壁核磁共振(NMR)分析有助于对木质纤维素生物物质进行快速深入地结构表征.

溶液状态 NMR 对整个植物细胞壁进行表征依赖于可以充分溶解或溶胀生物物质的方法,植物细胞壁的溶解可根据两种基本溶剂类别进行分类:衍生化和非衍生化. Ralph 等<sup>[10]</sup>首次利用衍生化法对植物细胞壁物质进行溶液态核磁共振分析.在这项研究中,生物物质经球磨处理后,使用二甲基亚砜(DMSO)与四丁基氟化铵(TBAF)或 N-甲基咪唑(NMI)的二元溶剂体系溶解.这些方法都是通过生成衍生物来促进细胞壁的溶解,可能会改变或掩盖细胞壁的固有结构和连接键,比如 DMSO/TBAF 中乙酸酐的加入使得半纤维素氧化.

非衍生化溶剂中细胞壁显著膨胀为细胞壁聚合物提供了足够的分子流动性,偶极耦合显著降低,核弛豫时间增加,并能产生类似于完全溶解聚合物体系的高分辨率液体核磁共振光谱. Ralph 等<sup>[11]</sup>使用 DMSO- $d_6$  溶胀植物细胞壁,虽然 DMSO- $d_6$  确实能够在一定程度上阻断纤维素的氢键,但由于纤维素的高度结晶,在 DMSO- $d_6$  中有效膨胀生物物质较难,并且会产生高黏性悬浮液,从而影响了二维核磁图谱的质量,即图谱中信号的丰富性和强度. Kim 等<sup>[12]</sup>报道了使用 DMSO- $d_6$ /pyridine- $d_5$  溶剂能够明显改善 NMR 光谱的分辨率,提高二维核磁图谱的信噪比. HMPA 的 P-O 键高度极化,氧原子带强负电荷, HMPA 增加木质纤维素在 DMSO- $d_6$  中的溶解度<sup>[13]</sup>. 本文采用 DMSO- $d_6$ 、DMSO- $d_6$ /pyridine- $d_5$ 、DMSO- $d_6$ /HMPA- $d_{18}$  三种不同溶剂溶解杨树细胞壁物质,利用溶液态 2D HSQC 技术对杨树细胞壁的微观结构进行了对比分析,探究了不同溶剂对杨树细胞壁结构的影响,旨在为高效绿色的样品结构表征提供指导.

## 1 实验

### 1.1 材料与试剂

实验样品为 10 年生杨树、松树,采自江苏省徐

州市.在 60℃ 烘干 16 h 后进行粉碎、过筛,选取粒径在 10~40 目之间的样品用于实验.样品用苯-乙醇(体积比 2:1)在索氏抽提器中抽提 6 h,风干然后在 60℃ 条件下烘干,得到去脂样品,球磨 6h,保存备用.实验中所用的氢氧化钠、乙醇、甲苯以及盐酸购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯试剂,亚氯酸钠(80%),氘代二甲基亚砜(DMSO- $d_6$ , D, 99.9%),氘代吡啶(pyridine- $d_5$ , D, 99.5%)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,氘代六甲基磷酰三胺(HMPA- $d_{18}$ , D, 99.6%)购于广州谱恩科学仪器有限公司, Cellic © CTec2 (100 FPU/mL) 购于 Sigma 公司. DECO-PBM-V-0.4L 型球磨机(长沙市德科仪器设备有限公司), XW-80A 型漩涡振荡器(上海晖创化学仪器有限公司).

### 1.2 木质素分离

称取球磨 6 h 的杨树样品 10 g 置于 500 mL 锥形瓶中,加入 pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液和 5 mL 的纤维素混合酶,将锥形瓶放入漩涡振荡器中在 50℃ 下反应 48 h,通过离心除去上清液,并在相同条件下用新鲜酶混合物再次水解固体残余物.得到固体残余物水洗、离心、烘干.固体在室温下用 96% 二噁烷进一步纯化 48 h,固液比为 1:10 (g/mL),过滤混合物并用相同的溶剂洗涤直至滤液澄清.收集滤液在旋转蒸发仪下浓缩,将浓缩滤液滴入 3 倍体积的 95% 乙醇中,析出木质素沉淀,冷冻干燥后保存,以备分析.

### 1.3 纤维素和半纤维素的制备

称取球磨杨树样品 10 g 和亚氯酸钠 10 g 置于 500 mL 烧瓶中,加入乙酸缓冲溶液(pH 4.2,用 10% 醋酸调节),将酸性溶液和样品充分混合,将烧瓶置于恒温水浴搅拌锅在 75℃ 下反应 2 h<sup>[15]</sup>,离心洗涤,过滤,将残余物在烘箱 50℃ 下干燥 16 h.取烘干后的样品溶于 150 mL 2.5 mol/L 的 HCl 溶液中,在 90℃ 下反应 2 h,然后样品离心、洗涤、烘干,得到纤维素样品.取上述部分烘干样品先溶于浓度为 17.5% 的氢氧化钠,反应 2 h,离心、去离子水洗涤、烘干,然后样品溶于浓度为 8.75% 的氢氧化钠,再保持反应 2 h,过滤碱性浆液并用浓度为 1% 的乙酸洗涤,然后用无水乙酸调节溶液 pH 至 6.0 左右.将样品溶液滴入 3 倍体积浓度为 95% 的乙醇中,并用玻璃棒不断搅拌,沉淀析出过滤,用浓度为 70% 的乙醇洗涤颗粒并风干,得到半纤维素样品,储存以备分析.

### 1.4 核磁共振分析

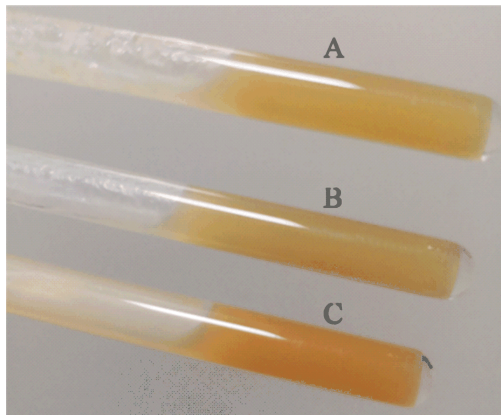
对实验得到的杨树和松树的细胞壁样品、分离杨树的木质素、纤维素、半纤维素进行核磁共振分析,取各样品 70 mg 分别溶于 DMSO- $d_6$ 、DMSO- $d_6$ /pyridine- $d_5$ 、DMSO- $d_6$ /HMPA- $d_{18}$  (0.5 mL) 中.漩涡 1 h 后超声 1~2 h,样品溶胀并溶解在氘代溶剂中.使用 Bruker Avance III 400 MHz 光谱仪(Bruker, 德国)在 25℃ 下获得各样品的 NMR 光谱. DMSO 溶剂峰值( $\delta_H/\delta_C = 2.49/39.5$  ppm)用于化学位移校准.二维 $^1H$ - $^{13}C$  异核单量子相干(HSQC)光谱标准脉冲序列具有以下参数:光谱宽

度 F2(<sup>1</sup>H) 为 11 ppm, 采样点为 2048 个, F1(<sup>13</sup>C) 谱宽为 190 ppm, 数据点为 256; 64 次扫描(NS) 和 1 s 扫描延迟(D1). HSQC 光谱中信号的体积积分在 Bruker Top Spin 2.1 软件进行.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同溶剂对二维核磁结果的影响

为了比较不同的溶剂系统对样品 2D HSQC NMR 谱图的影响, 将杨树细胞壁样品球磨处理后, 分别溶解在 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 和 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中. 杨树样品在 3 种溶剂体系中溶胀情况如图 1 所示. 由图 1 可知 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 溶剂系统能够显著膨胀生物样品, 与 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 形成的溶液相比, 溶液更均一. DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 所在的核磁管壁透明干净, 说明样品的流动性更好, 所以 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 溶剂对样品的溶解性最好.



(A) DMSO-d<sub>6</sub>, (B) DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub>, (C) DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

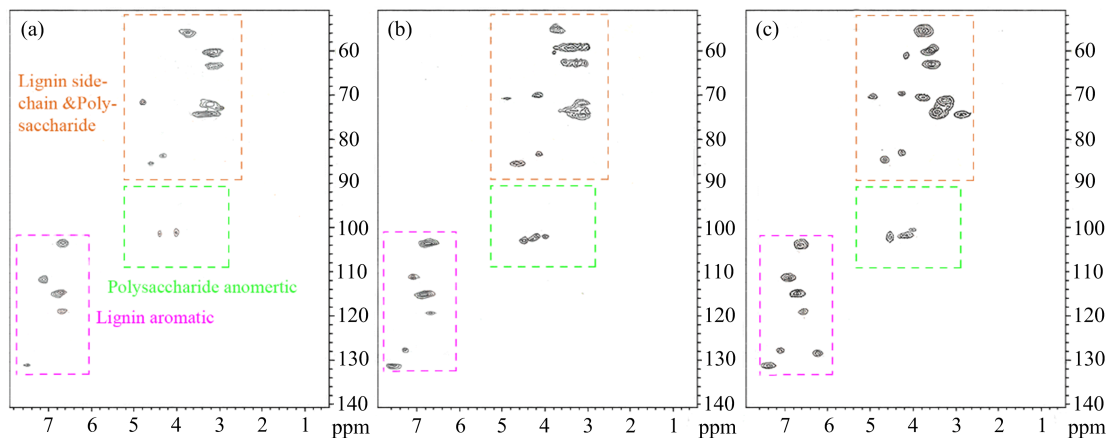
图 1 杨树细胞壁物质在不同溶剂下的溶解状态

Fig. 1 Dissolution state of poplar cell wall substances in different solvents

杨树在 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 和 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 的 2D HSQC NMR 图谱如图 2 所示. 由图 2 可知, 植物细胞壁物质在 2D

HSQC NMR 上的图谱可分为 3 个区域: 木质素芳香区 ( $\delta_H$  6.0-8.0 ppm,  $\delta_C$  100-150 ppm)、脂肪区 (木质素边链区和多糖区,  $\delta_H$  2.5-6.0 ppm,  $\delta_C$  50-90 ppm) 和多糖异头碳区 ( $\delta_H$  3.5-6.0 ppm,  $\delta_C$  90-110 ppm). 图 2 中杨树的 2D HSQC 图谱的芳香区中有紫丁香基(S)、愈创木基(G)、对羟基苯基(H)信号的出现, 脂肪区出现 4 种类型木质素连接键包括  $\beta$ -芳基醚( $\beta$ -O-4), 苯基香豆素( $\beta$ -5), 树脂醇( $\beta$ - $\beta$ ) 和肉桂醇端基, 多糖异头碳区信号有葡聚糖 [(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp] 和木聚糖 [(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xylp]. 这些成分的信号都是参照已发表的化学位移进行分配<sup>[12]</sup>, 杨树的信号分配如表 1 所示. 由表 1 可知, 与 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 归属的信号相比, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中信号最丰富. DMSO-d<sub>6</sub> 中的 2D HSQC NMR 图谱能够给出植物细胞壁物质的主要成分信息. 例如, 甲氧基,  $\beta$ -芳基醚( $\beta$ -O-4) 连接键和木质素亚单元 S、G 以及对羟基苯甲酸酯(PB).

杨树在二维核磁图谱不同区域的信号如图 3 所示. 由图 3 可知, 溶解在 DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 的植物样品的木质素边链区和芳香区的 S、G、H 的信号明显增强, 木质素的基本单元对羟基苯基(H)的信号在接近噪声水平的基础上可以检测到. 在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的二维核磁光谱中 H 的信号增强, 特别是来自脂肪(木质素侧链和多糖非异头碳区的峰)区(图 3A) 和多糖异头区的相关性信号变得更加明显. 比如, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的 HSQC 光谱显示在 102.8/4.36 ppm 处的(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp 连接的葡聚糖信号明显比 DMSO-d<sub>6</sub> 和 DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 下的葡聚糖信号更强. 此外, 在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中观察到杨树的 H、S 和木质素边链区的化学位移与 DMSO-d<sub>6</sub> 用作溶剂时观察到的化学位移没有区别(表 1). 在杨树细胞壁样品中, LA-S 信号强度高于 LA-H/G 信号, 这意味着杨树中更多的  $\beta$ -O-4 单元是通过单体醇与丁香基单元交叉偶联生成, 而不是通过单体醇与愈创木酚单元生成. 与 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 这两种体系相比, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的二维核



(A) DMSO-d<sub>6</sub>, (B) DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub>, (C) DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

图 2 杨树细胞壁物质在不同溶剂下的 2D HSQC NMR 谱图

Fig. 2 2D HSQC NMR spectra of poplar cell wall substances in different solvents



磁图谱给出的信号丰富而且最强. HMPA- $d_{18}$  的加入不仅使样品处理更容易, 而且由于细胞壁的膨胀增强, 核磁共振谱的强度和分辨率也大大提高, 所

以本研究通过实验, 优选 DMSO- $d_6$ /HMPA- $d_{18}$  作为溶解植物细胞壁物质的溶剂.

表 1 杨树细胞壁物质在不同溶剂中的 2D HSQC 谱图信号归属

成分	杨树		
	DMSO- $d_6$ [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]	DMSO- $d_6$ + pyridine- $d_5$ [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]	DMSO- $d_6$ + HMPA- $d_{18}$ [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]
LC $_{\beta}$	ND	ND	53.7/3.03
LB $_{\beta}$	53.7/3.48	53.5/3.48	53.8/3.49
Methoxyl	55.7/3.74	55.8/3.75	55.4/3.72
LA $_{\gamma}$	60.5/3.58	60.3/3.57	60.4/3.59
LB $_{\gamma}$	63.0/3.85	63.1/3.88	63.1/3.88
LC $_{\gamma}$	ND	71.3/4.16	71.2/4.14
LA $_{\alpha}$	83.1/4.29	83.3/4.28	83.0/4.25
LA-H/G( $\beta$ )	83.7/4.34	83.6/4.30	83.8/4.31
LC $_{\alpha}$	84.9/4.65	84.8/4.68	84.9/4.64
LA-S( $\beta$ )	86.3/4.09	86.1/4.07	86.0/4.09
LB $_{\alpha}$	86.3/5.44	87.5/5.42	87.1/5.48
S $_{2/6}$	103.9/6.71	103.7/6.70	103.9/6.69
S' $_{2/6}$	ND	106.5/7.18	106.3/7.19
G $_2$	111.1/6.97	110.8/6.97	111.5/6.96
G $_5$	115.2/6.77	115.1/6.78	114.9/6.79
G $_6$	118.7/6.94	118.9/6.97	119.1/6.94
H $_{2/6}$	127.9/7.19	127.7/7.18	127.6/7.18
PB	131.5/7.68	131.7/7.70	131.6/7.65
(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glep	102.6/4.24	103.3/4.23	102.5/4.39
(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xylp	101.23/4.25	102.3/4.25	101.22/4.22

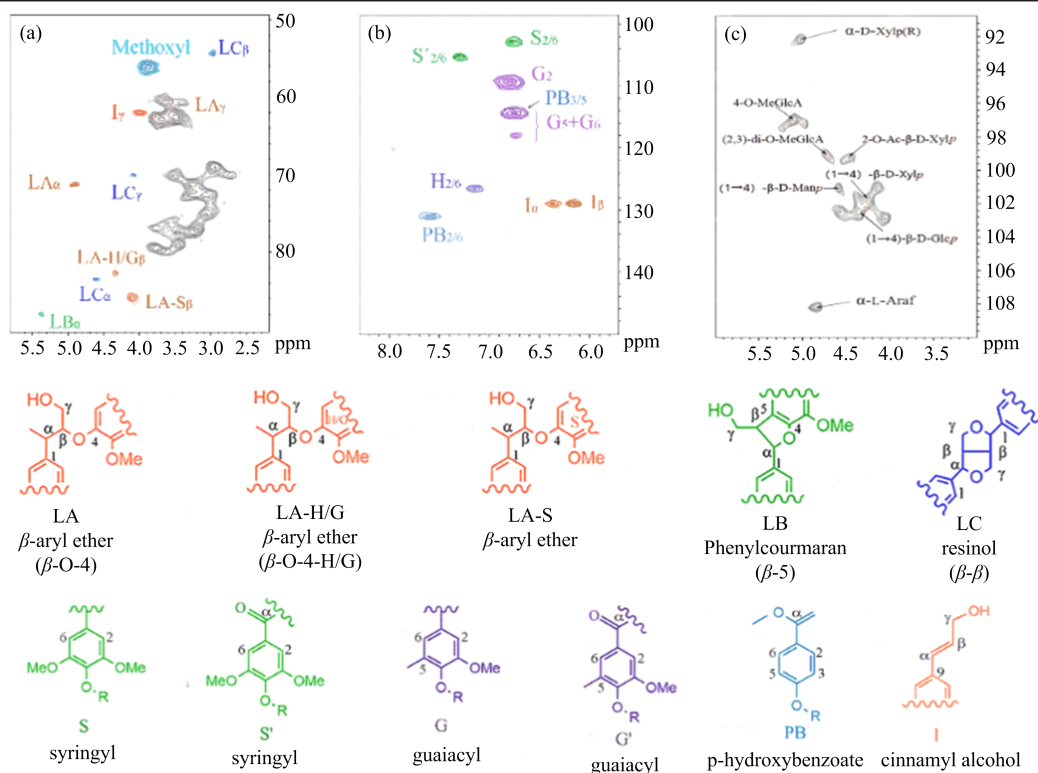


图 3 DMSO- $d_6$ /HMPA- $d_{18}$  下的杨树细胞壁物质中木质素脂肪区(A), 芳香区(B)和异头碳区(C)的 2D HSQC NMR 谱图  
Fig. 3 2D HSQC NMR spectra of aliphatic region (A), aromatic region (B) and anomeric region (C) of poplar cell wall material in DMSO- $d_6$ /HMPA- $d_{18}$

2.2 杨树细胞壁物质和分离物质的 2D HSQC NMR 谱图对比

在优化溶剂 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 的条件下, 二维核磁共振技术对细胞壁物质的直接表征, 使得细胞壁样品的制备过程更简单, 这使其成为一种有吸引力的表征方法. 为了探究与植物分离物质相比, 植物细胞壁二维核磁分析足以表征其物质的特性, 分别提取杨树的木质素、纤维素、半纤维素, 在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 溶剂下进行核磁实验, 结果如图 4 和图 5 所示. 由杨树不分离样品的 2DHSQCNMR(图 3)与样品分离后的图谱(图 4)对比可知, 在杨树分离木质素的脂肪区( $\delta_H$  2.5~6.0ppm,  $\delta_C$  50~90ppm)中的 LA-S<sub>β</sub>、LC<sub>α</sub>、LC<sub>γ</sub> 等信号和来自杨树不分离样品中, 这些信号的化学位移几乎相同. 特别是微量的 LC<sub>β</sub>( $\delta_H$  3.03 ppm,  $\delta_C$  53.7 ppm)在图 3A 中出现. 杨树细胞壁中木质素多糖连接键 LA<sub>α</sub> 和苯基香豆素 LB<sub>α</sub>, 与分离木质素中的

LA<sub>α</sub>、LB<sub>α</sub> 相比信号较弱, 但是这些相关峰仍然在杨树的细胞壁物质图谱中展现了较强的信号.  $\delta_H$  6.0~8.0 ppm,  $\delta_C$  100~150 ppm 处的木质素芳香区中的 S、G、H 信号强度在两图中几乎相同. 在杨树多糖的非异头碳区中( $\delta_H$  2.5~6.0 ppm,  $\delta_C$  50~90 ppm), 分离纤维素的内部纤维素单元(CI<sub>2</sub>, CI<sub>3</sub>, CI<sub>5</sub> 和 CI<sub>6</sub>)、纤维素非还原末端(CNR<sub>3</sub> 和 CNR<sub>5</sub>) 都在图谱中显示出了良好的信号, 分离半纤维素的木聚糖内部单元(XI<sub>2</sub>, XI<sub>3</sub>, XI<sub>4</sub> 和 XI<sub>5</sub>) 和木聚糖还原/非还原端(XR<sub>α4</sub>, XR<sub>β4</sub> 和 XNR<sub>2</sub>) 都能够在植物细胞壁图谱发现(图 5), 多糖信号化学位移分配如表 2 所示. 由此可见, 优化条件下的 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC 核磁共振可以在不分离细胞壁物质的情况下, 依然能够获得和分离物质结构特性一致的植物细胞壁物质信息, 因此在本文设计的优化条件下的 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC 核磁共振可以在不分离细胞壁物质的情况下应用于植物细胞壁物质的结构表征.

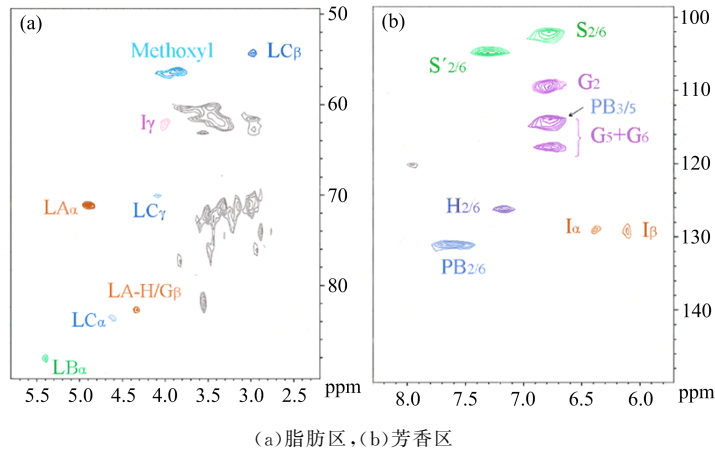


图 4 杨树细胞壁物质和分离木质素的脂肪区在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的 2D HSQC NMR 谱图

Fig. 4 2D HSQC NMR spectra of aliphatic regions of cell wall material and isolated lignin from poplar in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

表 2 杨树细胞壁物质和分离物质在 2D NMR 图谱中的物质分配

Tab. 2 Assignments of cross peaks for cellulose and hemicellulose in the 2D HSQC NMR spectra from poplar in solution system and isolated system

成分	杨树	
	细胞壁物质 [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]	分离物质 [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]
CI <sub>2</sub>	72.92/3.15	72.84/3.13
CI <sub>3</sub> + CR <sub>β3</sub>	74.78/3.37	74.76/3.31
CI <sub>4</sub>	80.85/3.35	80.84/3.32
CI <sub>5</sub> + CNR <sub>3</sub> + CNR <sub>5</sub>	76.12/3.29	76.14/3.33
CI <sub>6</sub>	60.94/3.52	60.99/3.49
(1→4)-β-D-GlcP	102.50/4.39	102.48/4.38
XI <sub>2</sub> + XNR <sub>2</sub>	72.54/3.02	72.43/3.05
XI <sub>3</sub>	75.27/3.13	75.35/3.15
XI <sub>4</sub> + XR <sub>α4</sub> + XR <sub>β4</sub>	75.94/3.38	75.95/3.35
XI <sub>5</sub>	63.70/3.62, 63.62/3.02	63.63/3.60, 63.68/3.08
(1→4)-β-D-XylP	101.22/4.22	101.26/4.25

2.3 标准物质松柏醇的二维核磁实验

为了证明 HMPA-d<sub>18</sub> 的引入不会引起植物细胞壁物质化学环境的改变, 本文选用细胞壁物质的标准物做对比实验. 木质素作为细胞壁物质的重要组分, 与纤维素、半纤维素相比, 易溶于氘代试剂.

本文选用了木质素的 4 种醇单体(对香豆醇、松柏醇、5-羟基松柏醇、芥子醇)之一的松柏醇作为标准物质进行二维核磁实验. 取松柏醇 70 mg, 球磨后溶于 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 进行 2D HSQC NMR 分析, 结果如图 6 所示. 对二维核磁图谱中的信号进行

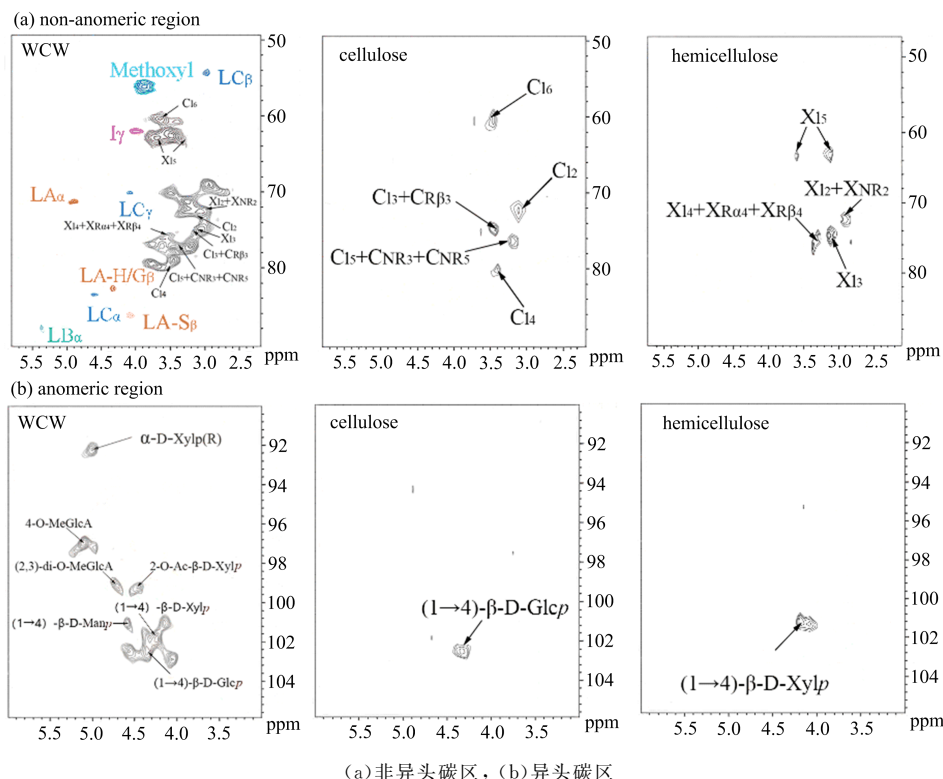


图 5 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的杨树细胞壁物质和分离的纤维素、半纤维素的 2D HSQC NMR 谱图  
 Fig. 5 2D HSQC NMR spectra anomeric regions of cell wall material and isolated cellulose and hemicellulose from poplar in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

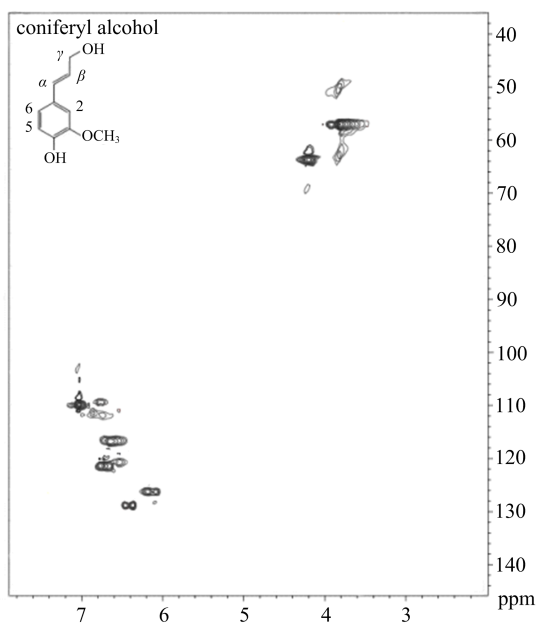


图 6 松柏醇在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的核磁图谱  
 Fig. 6 2DHSQC NMR spectra of coniferyl alcohol in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

分配,由图 6 和表 3 可知的 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的松柏醇的化学环境与 DMSO-d<sub>6</sub> 中的松柏醇的化学位移<sup>[13]</sup>几乎相同,说明 HMPA-d<sub>18</sub> 的引入不会引起细胞壁物质化学环境的改变,所以 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 溶剂下的 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC NMR 分析具有稳定性。

表 3 松柏醇在 DMSO-d<sub>6</sub> 和 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 中的核磁共振分配

Tab. 3 NMR assignments of coniferyl alcohol in DMSO-d<sub>6</sub> and DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

成分	松柏醇	
	DMSO-d <sub>6</sub> + HMPA-d <sub>18</sub> [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]	DMSO-d <sub>6</sub> [ $\delta_C/\delta_H$ ppm]
OMe	55.1/3.76	55.3/3.78
$\gamma$	61.5/4.08	61.5/4.09
2	109.6/6.98	109.5/7.00
5	115.1/6.73	115.3/6.72
6	119.0/6.77	119.3/6.79
$\beta$	127.2/6.16	127.4/6.17
$\alpha$	128.6/6.40	128.9/6.41

### 3 优化条件下松树细胞壁物质的溶液态二维核磁分析

将 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的溶液态二维核磁应用于松树的结构表征,样品在 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 的 2D HSQC NMR 图谱如图 7 所示。由图 7 可知,松树的 2D HSQC 图谱的芳香区中有愈创木基(G)、对羟基苯基(H)信号的出现。脂肪区出现木质素连接键包括  $\alpha$ -芳基( $\beta$ -O-4),苯基香豆素( $\beta$ -5),树脂醇( $\beta$ - $\beta$ )和肉桂醇端基,肉桂醇端基可以通过  $\gamma$ -C/H 相关信号在图谱中检测到。与杨树不同的是,松树在芳香区没有紫丁香基的信号。松树中含有大量的 G 和少量的 H,没有 S 的信号,G<sub>2</sub> 的信号除了在 111.4/6.97 处有信号,它的氧化  $\alpha$ -酮结构

G'<sub>2</sub>111.0/7.52 也有较强信号. G<sub>5</sub> 在 115.2/6.78 出现, G<sub>6</sub> 的信号一般是在 118.7/6.94 出现, 但 β-5 中 6 号位也在 115.1/6.49 处有信号, 这会与 G<sub>5</sub> 的信号相互重叠, 因此很难明确区分 G<sub>5</sub> 和 G<sub>6</sub> 的信号, 这也与相关研究一致<sup>[20]</sup>. 综上可知, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的溶液态 2D NMR 成功地表征松树的木质素基本单元、木质素多糖连接键等结构, 并且信号完整. DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 不仅适用于被子植物细胞壁物质的分析, 也适用于裸子植物细胞壁物质核磁分析. DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 对细胞壁的有效溶解增加了二维图谱的质量, DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的二维核磁图谱给出的信号丰富而且最强.

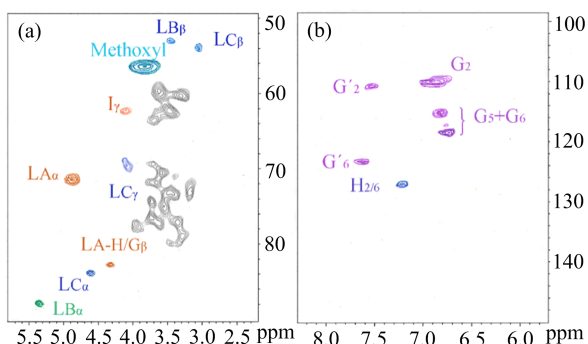


图 7 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 下的松树细胞壁物质中木质素脂肪区(A), 芳香区(B)的 2D HSQC NMR 谱图

Fig. 7 2D HSQC NMR spectra of aliphatic region (A), aromatic region (B) of pine cell wall material in DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub>

## 4 结论

本文提出了一种溶剂优化条件下的植物细胞壁的溶液态 2D HSQC NMR 分析方法. 通过比较不同溶剂下的植物 2D HSQC NMR 谱图, 得到 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 比 DMSO-d<sub>6</sub>、DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> 下的谱图更丰富、强度更大, 所以优选 DMSO-d<sub>6</sub>/HMPA-d<sub>18</sub> 作为溶解植物木质纤维素的溶剂. 通过植物分离细胞壁物质和细胞壁物质的谱图比较, 确定 2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC 分析能够表征植物细胞壁物质完整的结构特征, 因此优化后的二维 HSQC NMR 方法是一种创新的、绿色的分析方法, 能够广泛应用于植物细胞壁物质的结构分析研究.

### 参考文献 (References)

[1] BANERJEE A, DICK G R, YOSHINO T, et al. Carbon dioxide utilization via carbonate-promoted C-H carboxylation[J]. *Nature*, 2016, 531(7593): 215.

[2] KERR R A. Peak oil production may already be here[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1510.

[3] DELAUX J, ORTIZMELLET C, CANAFF C, et al. Impact of nonthermal atmospheric plasma on the structure of cellulose: Access to soluble branched glucans[J]. *Chemistry - A European Journal*, 2016, 22(46): 16522-16530.

[4] DING J, YOO C G, PU Y, et al. Cellulolytic enzyme-aided extraction of hemicellulose from switchgrass and its characteristics[J]. *Green Chemistry*, 2019, 21(14): 3902-3910.

[5] ROBINSON A R, MANSFIELD S D. Rapid analysis of poplar lignin monomer composition by a streamlined thioacidolysis procedure and near-infrared reflectance-based prediction modeling[J]. *The Plant Journal*, 2009, 58(4): 706-714.

[6] DUVAL A, LAWOKO M. A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2014, 85(SI): 78-96.

[7] FOSTON M, SAMUEL R, HE J, et al. A review of whole cell wall NMR by the direct-dissolution of biomass [J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(3): 608-621.

[8] YUAN T Q, SUN S N, XU F, et al. Structural characterization of lignin from triploid of populus tomentosa Carr [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(12): 6605-6615.

[9] ZOIA L, TAMBURINI D, ORLANDI M, et al. Chemical characterisation of the whole plant cell wall of archaeological wood: An integrated approach [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(17): 4233-4245.

[10] LU F, RALPH J. Non-degradative dissolution and acetylation of ball-milled plant cell walls: High-resolution solution-state NMR[J]. *The Plant Journal*, 2003, 35(4): 535-544.

[11] CAPANEMA E A, BALAKSHIN M Y, KADLA J F. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(25): 9639-9649.

[12] KIM H, RALPH J. Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub> [J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(3): 576-591.

[13] YOO C G, PU Y, LI M, et al. Elucidating structural characteristics of biomass using solution-state 2D NMR with a mixture of deuterated dimethylsulfoxide and hexamethylphosphoramide [J]. *ChemSusChem*, 2016, 9(10): 1090-1095.

[14] CHEN T Y, WANG B, WU Y Y, et al. Structural variations of lignin macromolecule from different growth years of triploid of populus tomentosa Carr [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 747-757.

[15] SUN R C, FANG J M, TOMKINSON J, et al. Fractional isolation, physico-chemical characterization and homogeneous esterification of hemicelluloses from fast-growing poplar wood [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 44(1): 29-39.

[16] YAHIAOUI N, MARQUE C, MYTON K E, et al. Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants [J]. *Planta*, 1997, 204(1): 8-15.

[17] HALPIN C, KNIGHT M E, GRIMAPETTENATI J, et al. Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco stems [J]. *Plant Physiology*, 1992, 98(1): 12-16.

[18] VAILHE M A B, BESLE J M, MAILLOT M P, et al. Effect of down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76(4): 505-514.

[19] AKPINAR O, ERDOGAN K, BAKIR U, et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides [J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2010, 43(1): 119-125.

[20] BALAKSHIN M, CAPANEMA E, GRACZ H, et al. Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy [J]. *Planta*, 2011, 233(6): 1097-1110.