

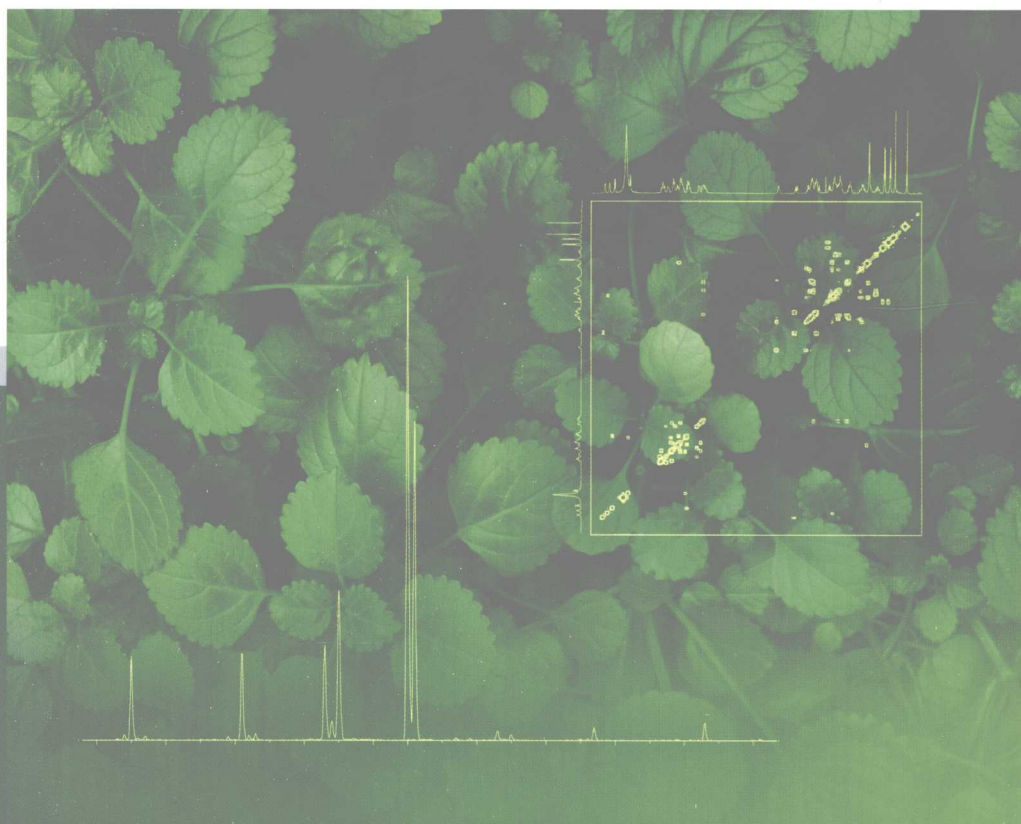


华夏英才基金学术文库

天然产物化学 丛书

天然产物 研究方法和技术

再帕尔·阿不力孜 主编



化学工业出版社

80
華英基金學術文庫

天然产物化学 丛书

天然产物 研究方法和技术



再帕尔·阿不力孜 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是《天然产物化学丛书》其中一个分册。书中围绕天然产物的研究方法,重点论述了近十年来国内外天然产物及其药物研究的现代分析、分离技术及生物技术的新思路、新方法、新技术、新进展和发展趋势。本书在介绍相关技术基本原理的基础上,主要结合编写人员近年在天然产物研究方法及其应用中所取得的新成果、以及解决实际问题的应用实例进行阐述,并引用了大量的文献供读者参考。

本分册可供从事天然产物化学、药学、中药化学以及药物分析研究等相关领域的科技人员、大专院校师生、科研管理部门人员以及制药企业的决策者等参考使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

天然产物研究方法和技术/再帕尔·阿不力孜主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 12
(天然产物化学丛书)
ISBN 978-7-122-06803-3

I. 天… II. 再… III. 天然有机化合物-研究 IV. 0629

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 181772 号

责任编辑: 李晓红 梁虹
责任校对: 陈静

装帧设计: 关飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司
装 订: 三河市万龙印装有限公司
787mm×1092mm 1/16 印张 22 $\frac{3}{4}$ 字数 591 千字 2010 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 60.00 元

版权所有 违者必究

序

过去半个多世纪，天然产物化学快速发展，取得了举世瞩目的成就，主要体现在以下方面：首先，天然产物化学结构多样性充分展现。发现并拓展了许多具有重要理论意义和应用价值的分子结构骨架体系并衍化成众多复杂天然产物结构，极大丰富了天然产物化学的内容，促进有机化学发展。多发色团吲哚生物碱和异喹啉生物碱，复杂环系萜类化合物，特异取代基的黄酮、香豆素和木脂素衍生物以及植物环肽、聚酮类等天然产物，结构奇异，变化万千，显示了大自然造就结构艺术的无穷魅力。

再者，复杂结构全合成艺术日臻完善并达到了新的高峰。数以百计的复杂结构天然化合物成功地被手性全合成，且反应收率及光学选择性不乏达到实际应用水平。逆合成原理应运而生，开创了合成设计新纪元。多项研究成果获得世界化学最高奖——诺贝尔奖。有机合成伟大艺术独特魅力得到空前完美展现。

第三，生物活性多样性紧伴化学结构多样性。过去半个多世纪，国际上研发成功的不少原创性重量级新药，多源于天然产物或其衍生物。在 1982—2002 年全球上市的小分子药物中，6% 直接来自天然产物，其余 55% 亦与天然产物紧密关联。在天然产物化学发展中，色谱、波谱等物理学方法的应用起到关键作用。以 HPLC 为代表的色谱学方法极大提高了分离纯化的效率，使一些往常难以分离的成分达到了高效纯化目的。波谱学方法包括 MS, NMR, CD, X-ray 等，开创了新的结构测定思维和手段，一个复杂天然产物结构仅需毫克级样品、耗时数日，便可完成结构研究包括立体构型测定。

我国是天然药物资源丰富的国家，药用植物有万余种，且有数千年民间用药经验，为从中发现生物活性物质、研发创新药物提供了广阔研究空间。在过去半个多世纪，我国天然药物化学研究取得了快速发展，成绩显著，研制成功了青蒿素等一系列天然创新药物。我国已形成了一支学科齐全、人员结构组成较合理、仪器设备基本达国际水平、从事天然药物化学研究的科研创新群体，正在为国家创新药物的研发而努力奋斗。

天然产物化学出版物，国内外已有不少版本，有大型系列参考书，亦有专论编著，篇幅有大有小，内容各有侧重与特点。但关于天然产物化学的系列图书，国内尚无版本面世。我国天然产物化学研究虽取得了显著成绩，但与国际先进水平相比，总体看还存在较大差距。为增强我国天然产物化学研究创新能力，提高研究水平，适应我国中草药大国的国际地位，化学工业出版社高瞻远瞩，决定推出这套《天然产物化学丛书》（以下简称《丛书》），以使广大从事天然产物化学研究的科学工作者系统了解掌握这一学科的系统知识和该领域的现状和未来发展，提高我国天然产物化学研究水平和创新能力，适应时代的需求。

《丛书》共有《天然产物研究方法和技术》、《生物碱化学》、《单萜和倍半萜化学》、

《二萜化学》、《三萜化学》、《甾体化学》、《香豆素化学》、《黄酮化学》、《木脂素化学》、《醌类化学》、《酚酸化学》、《天然糖化学》、《蛋白质类化学》13个分册，涵盖了天然产物化学的主要内容，各分册由主编组织国内本领域专家编写，他们大多为正从事教学和科研的中青年学术骨干。《丛书》涉及面广，内容丰富，工作量浩瀚。《丛书》的出版工程浩大，得到各方鼓励与帮助，尤其是化学工业出版社领导和编辑的大力支持方可完成。参与《丛书》编写的各位主编和数以百计的专家、学者，在繁重的教学科研中，耗费大量时间与精力不辞辛苦地完成编著，在此对他们表示衷心感谢。化学工业出版社的编辑同志认真审阅和修改，精心排版，做了大量工作，在此对他们的辛勤努力表示诚挚的谢意。

由于科研教学任务繁重，时间紧迫，书中难免有不当和错误之处，还望读者不吝批评指正。

于德泉，孙汉董

2007年12月

前 言

从药用植物或中草药中发现结构新颖且具有药理活性的天然产物,并进一步开发成新药,是我国的优势和国际药学领域关注的研究方向,也是推动中药现代化进程的重要内容。由于药用植物及中药的组成复杂,采用高效的分离技术和简便、快速的分析方法开展天然产物研究及新药研发是关键环节之一。近年来,除了传统的色谱分离技术、光谱及波谱分析技术不断被改进外,还涌现出了一些高效、高分辨、多功能的新型分离分析技术,尤其是色谱与波谱联用技术的快速发展,这些新技术新方法不仅提高了研究效率,在结构新颖的天然产物或先导物的快速发现等领域发挥着重要作用,还解决着重复杂天然产物体系或发现活性组分效率低的瓶颈问题。与此同时,这些年高通量筛选及高内涵筛选等高效、快速、微量的活性测试方法与手段取得了迅速发展。当前,将高通量的分离及纯化系统、高性能及不同用途的分析技术与基于生物活性评价的高通量筛选技术结合起来的研究体系,是近几年国际上药用植物研究的前沿领域,并给改革传统的天然产物研究模式提供了更有效的途径。因此,重点阐述或介绍上述新技术新方法的发展趋势及其在天然产物研究中的应用进展是撰写本书的主要目的。

本书是《天然产物化学丛书》其中之分册,以“天然产物研究方法和技术”为核心,根据近年来国内外天然产物及其药物研究的化学、分析及生物技术的发展动态,结合作者们这些年在天然产物研究中所取得的研究成果,重点论述了现代分离分析及生物技术的新思路、新方法和新应用。主要包括:核磁共振谱、高效液相色谱与核磁共振联用(LC-NMR)、质谱及其串联质谱、色谱与质谱联用(以LC-MS/MS为主)、X射线衍射分析、色谱、圆二色谱等现代波谱或光谱技术的基本原理、方法及其在天然产物化学研究中的应用进展和经验。同时,考虑到现代天然产物研究逐渐向交叉性、多学科综合研究的发展模式,本书有一章专门介绍近几年发展迅速的基于高通量筛选技术以及生物信息学技术的天然产物生物活性评价基本方法。然而,当前天然产物研究的发展呈现多元化特点,因篇幅有限,本书只能选择具有代表性或普遍性以及近几年比较活跃的研究技术或应用领域重点论述。

参加本书各章节编写的人员大多为年富力强且富有实践经验的中青年专家及本学科的学术带头人或学术骨干,他们掌握自身相关专业的国内外发展动态,对所撰写的章节内容熟悉。本书主要编入了撰写人员近几年的研究成果,解决实际问题的应用实例,突出了国内外近十年的研究进展,并引用了大量的文献供读者参考。因此,相信本书的出版有助于同行或相关领域的科技人员及青年学生更多地了解和掌握相关学科的发展动态与应用前景。

本分册可作为从事化学、药学、中药化学研究以及企业中从事药物研制工作的科研及技术人员,以及大专院校相关专业师生的重要参考书,同时科技管理部门人员以及制药企业的决策者从本书中也可获得启迪和借鉴。

参加编写的作者在百忙中为本书撰稿,付出了辛勤劳动,在此深表谢意。此外,本分册的出版得到了华夏英才基金的资助,在此表示感谢。

由于科研和教学任务繁重,写作时间仓促,书中难免存在疏漏与不妥之处,恳请读者批评、指正。

再帕尔·阿不力孜

2009年8月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 概述	1
1.2 天然产物的分析技术及方法	2
1.2.1 质谱及其联用技术的应用进展	2
1.2.2 LC-NMR 及 LC-NMR-MS 技术的应用进展	6
1.2.3 其它分析技术的概况	9
1.2.4 新型波谱学方法的进展	10
1.3 天然产物的分离技术及方法	10
1.3.1 高效分离纯化技术	11
1.3.2 高效分离纯化的研究模式	12
1.3.3 高效分离纯化研究的特点和趋势	13
参考文献	17
第 2 章 核磁共振波谱技术	20
2.1 核磁共振氢谱技术	20
2.1.1 核磁共振的基本原理	20
2.1.2 ^1H NMR 化学位移	22
2.1.3 自旋偶合与自旋分裂	24
2.1.4 偶合常数	24
2.1.5 核磁共振氢谱的解析	27
2.2 核磁共振碳谱技术	30
2.2.1 概述	30
2.2.2 常用的多脉冲实验	31
2.2.3 ^{13}C NMR 谱在天然产物结构鉴定中的应用	33
2.3 核磁共振二维谱技术	36
2.3.1 核磁共振二维谱技术的基本原理	37
2.3.2 二维分解谱	46
2.3.3 二维化学位移相关谱	50
2.3.4 二维 NOE 谱和二维化学交换谱	59
2.3.5 二维多量子跃迁谱	66
2.3.6 核磁共振二维谱技术的综合解析	75
2.4 HPLC-NMR 联用技术及其应用	77
2.4.1 引言	77
2.4.2 HPLC-NMR 仪组成及其关键技术	78
2.4.3 HPLC-NMR 谱的采集方式	82
2.4.4 HPLC-NMR 技术在天然产物研究中的应用	83
2.4.5 HPLC-NMR 技术的发展前景	88

2.5 高分辨微量魔角探头技术及其应用	90
2.5.1 概述	90
2.5.2 高分辨微量魔角探头的基本原理	92
2.5.3 高分辨微量魔角探头技术的应用	93
参考文献	97
第3章 质谱技术	99
3.1 概述	99
3.1.1 质谱技术的发展历史	100
3.1.2 质谱技术在天然产物化学研究中的应用概况	102
3.2 基本原理及离子化技术	104
3.2.1 质谱技术的基本原理及作用	104
3.2.2 质谱裂解反应	107
3.2.3 离子化技术及其应用	112
3.3 串联质谱技术	121
3.3.1 串联质谱技术 (MS/MS) 的概述	121
3.3.2 MS/MS 仪的分类及其特点	123
3.3.3 MS/MS 技术在天然产物结构分析中的应用	125
参考文献	152
第4章 色谱与质谱联用技术	156
4.1 LC-MS 技术及其应用	156
4.1.1 LC-MS 技术及其特点	156
4.1.2 LC-MS 技术在天然产物结构分析中的应用	158
4.1.3 LC-MS 技术在天然产物定量分析中的应用	183
4.1.4 小结	184
4.2 GC-MS 技术及其应用	184
4.2.1 GC-MS 技术的基本原理及其特点	185
4.2.2 GC-MS 技术在中草药成分分析中的应用	187
4.2.3 GC-MS 技术在中药材鉴定中的应用	188
4.3 CE-MS 技术及其应用	190
4.3.1 概述	190
4.3.2 CE-MS 的关键技术	190
4.3.3 CE-MS 技术在天然产物分析中的应用	193
4.3.4 存在的问题与展望	194
参考文献	195
第5章 X射线衍射分析技术	197
5.1 单晶 X 射线衍射分析技术	197
5.1.1 引言	197
5.1.2 X 射线晶体学的基本原理	197

5.1.3 单晶结构分析	203
5.1.4 单晶结构解析实例	209
5.2 粉末 X 射线衍射分析技术	215
5.2.1 基本原理	215
5.2.2 粉末 X 射线衍射技术在药物分析中的应用	216
5.2.3 中药鉴定分析	218
参考文献	221
第 6 章 色谱技术及其在天然产物研究中的应用	223
6.1 概述	223
6.1.1 色谱技术的特点及分类	223
6.1.2 色谱技术的作用与发展	223
6.2 高效液相色谱法及其应用	225
6.2.1 基本原理及分类	225
6.2.2 HPLC 仪的组成	227
6.2.3 建立高效液相色谱分析方法的一般步骤	230
6.2.4 高效液相色谱法在天然产物分析中的应用实例	232
6.3 毛细管电泳法及其在天然产物研究中的应用	257
6.3.1 概述	257
6.3.2 基本原理	259
6.3.3 毛细管电泳仪的基本组成	260
6.3.4 建立毛细管电泳分析方法的一般步骤	260
6.3.5 毛细管电泳法在中药材及天然产物分析中的应用实例	261
参考文献	265
第 7 章 圆二色谱技术及其在天然产物立体化学研究中的应用	267
7.1 旋光光谱与圆二色谱的测定原理及其 Cotton 效应	267
7.1.1 平面偏振光与旋光光谱、圆二色谱的测定原理	267
7.1.2 图谱识别及产生 Cotton 效应的因素	269
7.2 圆二色谱在结构测定中的两个重要规则	270
7.2.1 对映性规则	270
7.2.2 附近性规则	270
7.3 解析圆二色谱的常用规则	271
7.3.1 解析饱和和环酮的圆二色谱八区律和有关的 α -取代基规则	271
7.3.2 α,β -不饱和环酮的 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁规则	273
7.3.3 β,γ -不饱和环酮的 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁规则	274
7.3.4 螺旋规则	275
7.3.5 内酯的八区律和扇形规则	276
7.4 CD 激发态手征性方法	278
7.4.1 概述	278
7.4.2 生色团的结构性质及其影响	280

7.5 激发态手征性方法的应用	283
7.5.1 分子含有两个 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁生色团的 ECCD 方法	283
7.5.2 分子带有一个生色团, 需引入另一个生色团的 ECCD 方法	284
7.5.3 需要引入两个生色团的 ECCD 方法	285
7.5.4 环烯丙醇、非环烯丙醇及高烯丙醇结构研究中的 ECCD 方法	286
7.5.5 ECCD 差谱方法	289
7.5.6 非环状 α -羟基酸及相关结构研究中的 ECCD 方法	290
7.5.7 非环状多元醇结构研究中的 ECCD 方法	291
7.5.8 红移效果生色团在 ECCD 方法中的应用	294
7.5.9 具有强吸收作用的卟啉生色团在 ECCD 方法中的应用	297
7.5.10 ECCD 方法中利用非酰化方法引入的生色团	302
7.6 研究实例介绍及应用体会	305
参考文献	311
第 8 章 天然产物生物活性评价基本方法	313
8.1 基本生物活性评价的高通量筛选技术	313
8.1.1 高通量筛选技术体系的组成	313
8.1.2 靶点确定和高通量筛选模型的建立	314
8.1.3 高通量筛选检测技术	316
8.2 天然产物的药理活性评价	320
8.2.1 药理活性评价研究的信息基础	320
8.2.2 药理活性评价常用方法的基本要求	321
8.2.3 常用药理学活性评价方法的类型	323
8.2.4 天然产物生物活性研究的存在问题和前景	326
8.3 先导化合物的发现	327
8.3.1 先导化合物的发现方法	327
8.3.2 先导化合物的评价方法	329
8.3.3 先导化合物的优化	331
8.4 天然产物的构效关系研究	331
8.4.1 定量构效关系研究	332
8.4.2 基于计算的构效关系研究	335
8.4.3 虚拟筛选结果验证	337
8.4.4 天然产物构效关系的分析举例	338
8.5 生物信息学技术的应用	340
8.5.1 生物信息学技术概述	340
8.5.2 应用范围	343
8.5.3 常用方法	345
8.6 天然产物相关的创新药物开发	346
8.6.1 由天然产物研发出的新药举例	347
8.6.2 新药统计	348
8.6.3 研发途径	348
参考文献	351

第1章 绪论

再帕尔·阿不力孜, 石建功, 白进发

(中国医学科学院药物研究所)

1.1 概述

我国药用植物资源丰富,加之我国疆域有寒、温、热带之分的多种气候带类型的生物为其它国家所罕有。尤其在中草药(包括中药、民族药和民间用药)的临床使用方面具有悠久的历史和丰富的经验,因此,从中草药中发现新颖结构、具有药理活性的天然产物,进一步开发成新药是我国的优势和国际药学领域关注的研究方向,也是推动中药现代化进程的重要内容。天然产物在发现新型结构药物和先导化合物中扮演着越来越重要的角色,中草药中含有的化学成分往往种类众多、结构复杂,相当一部分成分稳定性差,系统开展中草药物质基础研究,高效、快速地发现活性天然产物是先导物发现和创新药物研制的重要及有效途径。这些年来国际研发机构及制药企业越来越重视该研究方向,拟定庞大研发计划,大量收集药用生物资源,利用最新方法及先进技术开始了广泛深入的研究,而且我国加入WTO以后,以仿制为主的西药研制遇到严重挑战。因此,我国从“十五”计划开始,尤其在“十一五”规划和国家中长期科技发展规划纲要中大大提高了对创新药物和中医现代化研究的重视,并明确提出要推进中药现代化和国际化。

另据最近出版的《中华本草》记载,我国中药资源已达12807种,其中药用植物11146种,但有4000~5000种植物处于濒危或受威胁状态,占植物总数约20%,远远高于世界平均水平的10%,并且有200种植物已经灭绝。对特有濒危药用植物资源进行保护、再生及可持续利用研究已刻不容缓。因此,最近我国将“有效保护和合理利用中药资源”列入科技发展规划重点领域中的优先主题之一。

一直以来,天然药物对于维护人类的健康发挥着重要的作用,也始终是现代药物先导化合物的主要资源。根据有关新药的综述报道^[1],从1981年至2002年,在868个化学单体药物中28%是天然药物或来自于天然产物,其它24%的药物活性基团也源于天然药物的启发。药用植物(含中草药)发挥药效作用的物质基础是具有结构复杂、化学多样性的天然产物,对于具有生物活性的天然产物有效部位进行快速分析在新药研制过程中越来越重要。天然产物化学研究的关键是先进的分离技术与手段以及准确、高效、快速的分析方法。由于药用植物及中药的组成复杂,以往的研究方法已成为复杂天然产物体系或活性组分群发现效率低的瓶颈问题。为了科学、系统地揭示中草药的物质基础,加快从天然产物中发现新的先导化合物是实现创新药物研制和中药现代化的关键环节。因此,如何发挥先进的分离及分析技术作用,改革传统的天然药物研究模式,简化中草药复杂混合物的分离分析过程,建立及完善对复杂生物体系中化学多样性天然产物的系统分离与新型分析方法;建立起适合于不同药用植物种类,或不同结构类型成分的简便、快速、微量的天然产物分析方法,以及标准化和规范化的系统分离体系是重要的研究课题。

近年来,新技术新方法的发展在对中草药的物质基础研究,结构新颖的活性天然产物或先导物的快速发现等领域起到了重要的推动作用,同时为特有濒危药用植物资源再生和可持续利用提

供了强有力的技术保障。在分离方法方面,多通道组合闪式色谱分离(combiflash chromatography)技术等高通量、自动化的分离纯化系统的开发及应用,以及色谱填料和色谱柱的改进等极大地提高了高效液相色谱(HPLC)对化合物的分离功能^[2-4],例如相继研发出超高效液相色谱(UPLC)、快速高分辨液相色谱系统(RRLC)和超快速液相色谱(UFLC)等新型液相色谱技术。这些超高压快速液相色谱技术与常规的HPLC相比,大大提高了其分析速度及分辨能力,缩短了分析周期,分析复杂样品能获得更多的信息,提高其工作效率,目前正在成为天然产物复杂体系分离与分析的重要手段。在分析技术及方法方面,多功能,高效率的高效液相色谱与波谱的联用技术,如LC-UV、LC-DAD-MS(包括新型的UPLC-MS, RRLC-MS)及LC-MS/MS、LC-NMR或LC-NMR-MS技术等,为快速分析天然产物提供了强有力的手段,实现了混合物不分离即可进行在线的结构测定和化学筛选,避免了耗时的分离纯化过程^[5-7],其工作效率得到了显著的提高。与此同时,近代药理学的飞速发展,出现了高通量筛选及高内涵筛选等高效、快速、微量的活性测试方法。因此将基于生物活性评价的高通量筛选技术、高通量的分离及纯化系统与串联质谱技术(MS/MS)及LC-MS/MS、NMR及LC-NMR、X射线衍射技术等分析技术结合起来的研究体系是近几年国际上天然药物研究的前沿领域,为改革传统的天然产物研究模式提供了更有效的途径。

1.2 天然产物的分析技术及方法

天然产物的成分复杂,包括不同类型的二级代谢物,其主要成分类型包括生物碱、黄酮类、皂苷类、蒽醌类、萜类、香豆素类、木脂素类、多糖、多肽和蛋白质等。天然产物的内在多样性不仅使它们的生物活性评价很有吸引力,而且对快速分析及筛选混合物中生物活性组分的分离及检测技术提出了很大挑战。传统的研究方法首先制备天然产物提取物,然后进行药理活性测试,利用色谱方法(包括薄层色谱、柱色谱和液相色谱等)分离、纯化获得活性提取物中的单体成分。通过核磁共振谱(NMR)、质谱(MS)、X射线晶体衍射(XRD)、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、旋光光谱(ORD)以及圆二色谱(CD)等波谱或光谱数据综合分析,完成分子结构及其立体结构的鉴定。对于有药理活性的化合物进一步寻找活性基团,研究化学结构与药理活性之间的关系,并进行结构优化获得先导化合物,寻找及发现新的药物。通过上述的方法,虽然获得了大量的天然产物有效成分,并被广泛地应用于医药、化工、食品等行业,但是这种传统方法存在许多问题和局限性。传统方法一般需要较长时间、复杂的样品制备过程,且效率低、周期长、耗资大,不适应当前快速发展的新药研发过程;而且还经常导致活性成分尤其是低含量成分的丢失或破坏等。因此,除了充分发挥不同先进分析技术的作用之外,需要改革传统的单独实施分析的检测模式,尽可能整合多种分析手段形成系统分析体系或在线分析方法,建立适合于不同结构类型成分、复杂及化学多样性天然产物的简便、快速的新型分析方法是一种重要的发展趋势。

1.2.1 质谱及其联用技术的应用进展

MS技术是天然产物结构解析的重要技术之一,可以方便地获得化合物的分子量、分子式和特征碎片结构等信息。目前,国内外日益重视质谱技术在化学、生命科学以及创新药物等领域里的应用,进一步开拓质谱技术的新用途、新分析方法的研究是很有意义的研究方向。近年来,多功能、高效率的质谱联用技术在药用植物成分分析中的应用越来越受到重视。除了已经很成熟的主要用来分析易挥发性成分的气相色谱与质谱的联用技术(GC-MS)之外,串联质谱技术(MS/MS)、高效液相色谱与质谱联用技术(LC-MS),尤其是LC-MS/MS技术已广泛应用于天然产物及药用植物混合物成分的分离与快速分析^[8-30]。此外,近年来毛细管电泳与质谱联用技术

(CE-MS) 及其应用亦获得了迅速发展。将色谱技术对复杂样品的高分离能力, 与质谱技术具有的高选择性、高灵敏度以及能够提供分子量与结构信息的特点结合起来, 可实现药用植物活性成分及其天然产物混合物的高效、灵敏在线分析鉴定和定量分析, 而且对于一些用传统的分离方法难以分离的微量成分也可实现快速分析检测。因此, 这些质谱联用技术尤其是 LC-MS/MS 技术, 已成为快速分析鉴定及定量分析天然产物成分的强有力手段。

1.2.1.1 GC-MS 技术及其应用进展

GC-MS 在天然产物非极性及挥发性成分的分析发挥了重要作用。由于 GC 有很强的分离能力, EI-MS 有标准谱库可以检索, 这对鉴定已知化合物非常有用。有关这方面的文献较多, 这里不再赘述, 在此重点介绍 GC-MS 结合化学计量学方法用于天然产物分析的最新应用进展。近年来, 将 GC-MS 与化学计量学相结合的分析方法被有效地应用于中草药复杂混合物体系的分析, 证明可以分离和鉴定更多的化学成分, 运用这种方法分析了不同中草药中上百个有效成分。例如, 生姜挥发油中含有大量且含量低的化学成分, 很难在一次色谱分离中将所有成分有效分开, 而由 GC-MS 谱获得的分析结果用相似度在质谱库检索时, 峰重叠和低含量成分的影响可能会出现错误的结构鉴定结果。为了提高分析鉴定的可靠性、准确性, Gong 等^[31]采用 GC-MS 与化学计量学相结合的分析方法, 成功地分析鉴定了干姜和鲜姜中的植物油成分。通过应用演进潜在投影图 (evolving latent projection graph, ELPG) 提高 GC-MS 获得二维数据的分辨率、校准了漂移的基线、评价相关色谱峰的纯度、鉴定化学成分的数量以及它们在峰簇中的梯度洗脱情况。然后峰簇被转化成相应化合物的纯色谱及对应质谱图, 并根据质谱库中相似度的检索和色谱保留时间分析鉴定出化学成分。利用该分析方法在干姜和鲜姜中分别检测出 140 个和 136 个成分, 并分别初步鉴定了 74 个和 75 个挥发性成分结构 (占总相对含量的 62.82% 和 47.11%)。结果表明在 GC-MS 二维数据基础上, 应用化学计量学方法在数学上能够提高 GC-MS 的分离及分辨能力, 则有助于对复杂体系中分离的相关成分进行定性和定量分析。另外, Qiu 等^[32]运用全二维气相色谱与飞行时间型质谱联用技术 (GC×GC-TOFMS) 以及全二维气相色谱与火焰离子化检测器 (GC×GC-FID) 相结合, 分析了不同产地的羌活植物中挥发油的化学成分。从产自四川 (羌活的道地药材产地) 的一个代表性样品中初步鉴定出包括烃类、酮类、酯类、醇类及其它类型共 769 个化合物, 而且定量分析结果显示该产地的羌活, 其成分组成及含量与其它产地的存在不同。利用主成分分析方法 (PCA) 对于 GC×GC-FID 谱得到的单个峰数据进行处理, 获得了不同产地的样品分类, 并寻找到导致差异的标记性化合物。

1.2.1.2 MS/MS 技术及其应用进展

MS/MS 和 LC-MS/MS 联用技术的飞速发展, 为天然产物有效部位或中草药药效物质基础的研究提供了新颖、高效的分析途径。MS/MS 及 MSⁿ 技术对分析复杂样品体系 (如天然产物提取物或中药) 中的目标化合物是非常有力的手段。这种技术与其它分离鉴定技术相比具有选择性好、灵敏度高、结构信息多和快速筛选的能力。运用 MS/MS 及 MSⁿ 技术通过分析某类已知单体化合物的裂解规律, 可以鉴定天然产物提取物中已知及未知同类成分的结构。其中, ESI-MS/MS 方法已经广泛用于分析生物碱类、黄酮及其苷类和皂苷类等多种天然产物成分。王勇等^[23]采用离子阱型的 ESI-MSⁿ 技术研究了中药乌头所含乌头碱类生物碱的裂解规律, 建立了可直接检测及鉴定乌头花乙醇提取物中乌头碱类生物碱的快速分析方法, 并且首次发现 C₃-乙酰基、C₈-苯甲酰基和 C₁₄-脂肪酸酰基的三酯型生物碱。Mohamed 等^[33]分别采用三重四极杆型和离子阱型的 ESI-MS/MS 方法开展了两种类型麦角生物碱 (麦角酸和肽类衍生物类) 的裂解特征研究, 并结合碰撞诱导裂解 (CID) 谱测试实验可用于鉴别其它潜在的麦角生物碱。同时该方法还可以鉴定裸麦面粉提取物中存在的微量麦角生碱。ESI-MSⁿ 技术对快速分析提取物中天然皂苷是一种有效的工具, 可以

避免费时的衍生化和分离步骤。刘淑莹等^[24]采用 ESI-MSⁿ 方法进行了蒺藜和人参中未衍生化的皂苷类成分分析,研究表明糖苷键断裂产生的碎片离子可以提供苷元质量数和寡糖链单糖种类的顺序和分支情况,糖基的交叉环断裂产生的子离子还可以给出一些糖基连接的信息。刘江云等^[34]运用 ESI-MSⁿ 技术研究了从远志 (*Polygala tenuifolia*) 中分离获得的三萜皂苷类的裂解规律,发现在正离子模式中子离子的形成主要通过糖苷键断裂,而负离子模式中有选择性的酰氧键断裂先于糖苷键的断裂,这两种特殊的裂解规律对这类皂苷的结构分析很有用。

另外,孕烷苷是存在于植物界和一些海洋生物中的具有毒性及药效的天然产物。Dal Piaz 等^[35]分别运用三重四极杆型和离子阱型两种 MS/MS 仪对 27 个不同孕烷苷类化合物进行了 ESI-MS/MS 及 MSⁿ 谱分析,获得了包括孕烷母核的特征、酯取代基的种类、糖基的类型(己糖、去氧己糖、二去氧己糖、O-甲基去氧己糖和 O-甲基二去氧己糖)以及糖连接顺序等结构信息。此外,通过 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 离子的裂解方式探讨,或者源内裂解产生的 $[Agl+H]^+$ 苷元离子可以获得不同的互补性结构信息。

这些年来,本实验室在天然产物分子鉴别以及中草药物质基础中组分群的质谱分析方法研究中^[28-30,36-40],将不同电离技术及其正负离子检测模式紧密结合,并进行正、负离子检测模式的离子化效果探讨,重点运用 MS/MS 技术系统地开展了不同类型天然产物的质谱行为及其与结构特征之间的相关性等研究,发现了一系列新颖的特征裂解反应、正负离子化特征和鉴别结构细微差异或特点的质谱变化规律,并成功地用于分子结构鉴别。尤其在确定皂苷类和黄酮苷类等常见天然产物的糖链连接位置及其顺序等关键及具有难度的结构分析方面取得了突破性进展。上述成果为快速鉴别药用植物(含中草药物质基础)中活性成分提供了有力的分析依据。例如,运用四级杆-线性离子阱型(QTRAP)MS/MS 仪,通过正负离子检测模式的 $(\pm)$ ESI-MSⁿ 方法,对黄酮苷类化合物的质谱行为及其裂解规律进行了系统分析研究,重点探讨了在 $(-)$ ESI-MSⁿ 谱中产生的自由基苷元离子($[Y_0-H]^\cdot$)与苷元离子(Y_0^-)的强度变化规律、产生机理等。以这两种特征诊断离子的相对强度变化为主要依据,提出了以 $(-)$ ESI-MSⁿ 方法快速鉴别单取代黄酮苷类、黄酮醇 3,7-二-O-糖苷类化合物的简便、快速的质谱分析方法,尤其在确定黄酮糖苷类化合物的糖基化位置及糖链的连接方式方面取得了新的突破^[40]。本研究方法的建立为天然产物复杂混合物中黄酮苷类成分的快速分析及其活性提取物多组分整体代谢轮廓分析提供了重要的结构信息及分析依据^[41]。详细内容参见第3章第3.3节中有关 MS/MS 技术的应用。

另外,这里需要指出的是运用不同类型或不同原理 MS/MS 仪,如三重四极杆(空间序列型)和 3D 离子阱(时间序列型)等 MS/MS 仪对同一被测物进行 MS/MS 谱分析时,其发生的裂解方式、产物离子的种类及其相对强度会出现一定的差异,其结果具有不可比性;但有时这些差异性信息对于更充分地了解同类化合物的结构特征能起到互补性作用。因此,在实际工作中需要重视这类情况,并要掌握实验技能和研究经验。

1.2.1.3 LC-MS 技术及其应用进展

天然产物往往成分复杂多样,分离提纯工作量大,而天然化合物标准品来源困难,传统的定性和定量分析方法面临较大的困难。据统计,大约 80%天然产物是非挥发性和热不稳定的成分,因此,LC-MS 及 LC-MS/MS 联用技术应用于天然产物成分研究,不需要对样品进行繁琐和复杂的前处理,这些联用技术高效快速、灵敏度高,尤其适用于含量少、不易分离得到或在分离过程中容易丢失的组分。大气压电离(API)的出现,成功地解决了液相色谱和质谱联用的接口问题,使 LC-MS 及 LC-MS/MS 逐渐发展成为成熟的技术。大气压电离包括大气压化学电离(APCI)和电喷雾电离(ESI)两种。APCI 对分析中、低极性的小分子化合物非常有效。ESI 则是一种很温和的离子化技术,多用于极性大、难挥发性、热不稳定的化合物,则 ESI 电离技术已经成为 LC-MS

联用的最常见接口。LC-DAD-MS 及 LC-MS/MS 联用技术,将液相色谱高效的在线分离能力与质谱高选择性、高灵敏度的检测能力相结合,可以同时得到化合物的保留时间、紫外吸收光谱、分子量及特征离子结构等丰富的信息,因此,它们是复杂天然产物体系成分分析的最有效研究手段。

在分析大量生物样品时,为了避免其中含有的不挥发性物质,如无机盐、蛋白质等对离子源的污染,产生了 turboionspray、Z-spray 和正交气相辅助 ESI 等离子源^[42],这些离子源的共同特点是喷雾针与进样锥孔、环状电极不在一条轴线上,而是成一定的角度,有垂直式、转弯式、斜角式以及组合式。早期的 ESI 接口最佳流速是 5 ~ 10 $\mu\text{L}/\text{min}$,现代气相辅助 ESI 接口最佳流速可提高到 50 ~ 200 $\mu\text{L}/\text{min}$,这有利于与 HPLC 的联用。此外,在样品量有限的情况下,为了进一步提高检测灵敏度,一些低流速的 ESI 源被开发使用,如 μspray 、micro-ESI 和 nanospray 等^[43],这些离子源可使用低至数 $\mu\text{L}/\text{min}$ 到数 nL/min 的流速喷雾,从而可大大提高灵敏度。

利用 LC-MS 或者 LC-MS/MS 联用技术,并结合 LC-DAD-UV 方法,通过对照组分和标准化化合物的保留时间,紫外吸收光谱以及 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 分子离子峰和特征碎片离子等综合信息,可以快速鉴定提取物中含有的已知成分。另外,LC-MS/MS 结合其它检测方法或利用某一类化合物特定的理化性质,可以对天然产物粗提物中未知成分进行直接分析;同时 LC-DAD-UV 技术是对 LC-MS 的重要补充,能提供感兴趣的天然产物属于哪一类型化合物等有用信息。

例如, Sun 等^[44]采用 LC-MS/MS 方法分析鉴定了荜茇 (*Piper longum*) 植物提取物中的酰胺类成分,其特有裂解特征提供了诊断性的结构信息。通过提取离子色谱和中性丢失扫描寻找目标化合物,不仅确定了 4 个类型的已知酰胺类化合物,而且从这种植物中鉴定出新型酰胺成分。应用本分析方法快速鉴定出共 42 个酰胺类成分,其中 22 个为该植物中首次发现且 9 个是新化合物。Lee 等^[45]通过 LC-MS/MS 谱及其数据依赖采集模式建立了可检索黄酮类化合物的 MS/MS 谱库。运用该谱库鉴定了一系列生物样品中结构非常相似的黄酮类成分。通过优化黄酮类化合物的碰撞能量,发现在离子阱型质谱仪中 45% 归一化碰撞能量下,可显示大量结构特异性的 MS/MS 谱。

另外,一些极性较大的天然产物(如氨基糖苷类抗生素类),由于不能在 C_{18} 固定相上充分保留,一般采用正相色谱法进行分离。但是存在极性化合物在非水流动相(如正己烷及氯仿)中很难溶解及色谱重现性差等问题。近年来,亲水作用色谱法(HILIC)成功应用于这类成分的分离及分析。HILIC 是一种使用极性固定相(如硅胶或衍生硅胶)以及含高浓度极性有机溶剂、低浓度水溶液为流动相的色谱技术,所用溶剂与 HPLC 相似,采用与水互溶的极性有机溶剂如乙腈或甲醇,而不用传统正相色谱中的正己烷及氯仿等溶剂,且水的含量较大(通常为 5% 或更高)。因此 HILIC 的分离机理与 HPLC 相反,但是同样与 ESI-MS 具有很好的兼容性。Strege 等^[3]建立了一种混合模式阴/阳离子交换-亲水色谱(ACE-HILIC)方法来分析肽类成分,而且该方法与 ESI-MS 和蒸发光散射监测器(ELSD)可联用,因此 ACE-HILIC-MS-ELSD 联用技术在分离及分析天然产物等生物样品的多样性成分可发挥作用。最近,随着高效液相色谱和质谱技术的发展,多种新型联用技术已开始应用于天然产物分析中。例如超高压液相色谱(UPLC)和快速高分辨液相色谱(RRLC)等被研发,并通过 UPLC-MS 及 RRLC-MS 谱分析,大大提高了其分析速度、色谱分辨及分离能力,分析复杂样品时可提高工作效率。

近几年来,本实验室在运用 MS/MS 技术等手段系统地开展质谱行为及其与结构特征之间的相关性等研究基础上,结合 LC-MS/MS 等联用技术,采用不同质谱手段相结合的“互补性”分析思路,建立了中草药复杂混合物体系组分群分析的高效、快速、微量的新颖分析方法^[29, 30, 37, 38, 40],在分子结构鉴别和活性混合物微量成分的分析方法方面取得了新进展。对于新化合物或微量成分,参照已掌握的同类已知结构的化合物的裂解规律对其未知结构进行分析推测,充分发挥了不同质谱方法在化合物成分分析中的作用。另外结合 LC-NMR, HR/MAS NMR 等手段形成了综合、

分析体系。上述研究成果实现了复杂药用植物体系中活性成分或先导物快速发现的研究快捷化和简便化,同时为中草药药效物质基础中活性组分群的高效、快速发现体系的建立提供了新的分析思路和有效的技术平台。例如,我们采用正负离子检测模式相结合的(±)ESI-MSⁿ和LC-(±)ESIMSⁿ互补性方法,建立了华山矾植物活性粗提物中葡萄糖醛酸及其衍生化三萜皂苷类成分的简便、快速的结构鉴定方法^[37,38],而且在确定三萜皂苷类的糖基连接顺序及其连接位置、独特裂解反应机理的研究中取得了新的发现和进展。首先,由(+)ESI-MSⁿ谱主要获得糖链部分的结构信息,尤其是糖基连接顺序及连接位置的关键信息;再由(-)ESI-MSⁿ谱进一步得到苷元上取代基以及葡萄糖醛酸基上羧基酯化类型的信息。因此,以(+)ESI-MSⁿ谱为主要手段,结合(-)ESI-MSⁿ谱提供的补充信息,将这两种质谱手段相结合,可以有效分析该植物提取物中的同类三萜皂苷组分。因此,在系统研究华山矾三萜皂苷在(±)ESI-MSⁿ谱中的裂解规律基础上,进一步利用(±)ESI-MSⁿ和LC-(±)ESIMSⁿ等不同方法相结合的手段,对于该植物正丁醇提取物中具有抗癌活性的两个混合物的主要组分三萜皂苷类进行了结构分析。根据所获得的大量结构信息以及相关的植物生源特征,共分析推断出28个葡萄糖醛酸及其衍生化三萜皂苷类成分的可能结构,包括5对天然同分异构体,除了2个是已分离得到的该类单体三萜皂苷之外,其它26个成分均为新化合物。

除此之外,近年来随着LC-MS技术的不断完善和发展,它已被应用于药用植物提取物中相关成分的定量分析中,并成为最有力的分析方法之一。LC-MS及LC-MS/MS技术的多反应监测(MRM)或选择离子检测(SIM)是目前最受关注的定量方法,尤其是MRM方法更具有灵敏度高、选择性强、分析快速等特点。

1.2.2 LC-NMR及LC-NMR-MS技术的应用进展

对于天然产物的结构解析,核磁共振(NMR)是最有效的分析技术之一,它能够明确地给出化合物的结构信息。关于NMR技术及其应用详见第2章和其它著作,这里重点介绍高效液相色谱-核磁共振联用技术(LC-NMR)及其应用进展概述。LC-NMR联用技术的尝试始于20世纪70年代末,直到90年代后期发展得较为成熟且得到推广使用,尤其是近年来被不断改进和完善,使其有了较大的发展。目前,LC-NMR技术作为一种新型分析手段,能够与已经成熟的LC-MS及LC-MS/MS技术实现优势互补,在天然产物混合物的结构分析中也发挥着越来越重要的作用。一般有机化合物在NMR谱上均有响应,因此,LC-NMR技术通过化学位移、偶合常数和信号的积分比例可鉴别分子结构及其同分异构体;并通过在线分析给出较完整的结构信息,用于天然产物混合物的分析^[6,46-48]。

LC-NMR技术的主要工作模式,包括连续流动模式和停止流动模式,后者又包括直接停止流动和环收集模式^[49]。停止流动模式保证了在静止条件下获得感兴趣的NMR峰信号。然而,LC-NMR技术主要存在NMR的灵敏度低,LC与NMR的溶剂兼容、溶剂峰抑制、色谱峰容量与NMR探头检测池的体积匹配等问题。虽然采用停止流动(stop-flow)等技术可提高LC-NMR的灵敏度,但存在分析时间长、与HPLC流动性特点不符、溶剂峰压制造成结构信息丢失等局限性^[50];同时对微量和痕量成分的结构鉴定具有一定难度。LC-NMR系统的作用主要依赖于探头的性能,所以改进其灵敏度的焦点主要集中在流动探头方面,目前最显著的进步是低温探头的应用^[51]。此外,高分辨魔角旋转微量探头(HR/MAS)是一种微量样品检测技术^[52],其中Nano探头技术是一种性能很好的超微量探头,其灵敏度比一般探头高2~4倍。MAS技术采用魔角旋转消除非均相溶液中磁化率不同而造成的谱线加宽,同时可使体积很小的样品保持在检测线圈内,从而得到高灵敏度和最小线宽的NMR谱。对于含量很低的样品,LC-NMR难以获得与基本结构

信息密切相关的 ^{13}C NMR 谱信号,这是限制 LC-NMR 广泛应用的主要原因之一。为了解决这个问题,新型 LC-SPE-NMR 在线技术,结合低温探头^[11]及毛细管液相色谱-核磁共振 (CELC-NMR)^[53] 联用技术,在 NMR 谱采集之前先富集样品,这样可在微克级范围内可获得 ^{13}C NMR 谱信号。另外,特制的 ^{13}C 流动检测探头也使 ^{13}C NMR 谱的获得成为可能^[54]。同时 NMR 仪磁场强度的不断提升,也增加了 NMR 的灵敏度和分辨力。总之,这些年通过提高 NMR 仪的磁场强度、设计专用的低温探头、流动探头及射频线圈、开发多种高效选择性溶剂峰抑制方法等改进获得了技术上的进步。

LC-NMR 技术早期用于天然产物的研究是鉴定样品的光照分解产物结构^[55],以及确定菊科植物 *Zaluzania grayana* 的粗提物中倍半萜内酯成分的结构开始^[56]。在过去的十多年里,LC-NMR 技术已成功地应用于天然产物混合物的分析中^[6,57],包括从植物粗提物中筛选组分^[58],分析生物碱类^[59-61]、黄酮类^[62]、倍半萜内酯类^[63,64]、维生素 E 的同系物^[65]及抗真菌药物^[66]等化合物,LC-NMR 技术在天然产物分析中逐渐显示出高效、快速、准确的优势。由于灵敏度较低,且缺乏适用的数据库,对粗提物进行化学筛选时,一般 LC-NMR 技术不作为首选分析方法。然而 LC-NMR 方法在鉴别未知组分结构,鉴定结构具有规律性的同类化合物,尤其在化合物的快速鉴定等方面,能有效地补充 LC-UV-MS 法提供结构信息的不足,这些在天然产物的前期研究中具有重要意义^[61]。

由于 HPLC 系统的常用流动相溶剂严重抑制被测样品的信号,因此其流动相的构成是 LC-NMR 谱实验需要考虑的另一重要因素。溶剂和添加物必须为联用技术中每个系统所兼容,氘代溶剂是最理想的选择,但是氘代溶剂昂贵,并且不适合作为常量溶剂使用。溶剂抑制技术的引入克服了溶剂干扰问题^[67],抑制溶剂峰的方法主要有三种:预饱和、软脉冲多辐射和 WET 技术,但是这些方法在改善检测灵敏度的同时,也抑制了一些有价值的 NMR 信号。还有一种较复杂的方法是使用两种独立的溶剂系统,如:甲醇/重水和乙腈/重水,因为两种有机溶剂抑制的范围不同,则通过合并两个体系的 NMR 谱可获得全部 ^1H NMR 谱信号,这种方法被成功用于千里光属植物提取物中复杂的生物碱分析^[68]。另以超热重水为洗脱液的方法也被用于溶剂峰的抑制^[69]。固相萃取 (SPE) 是一种重复性好、快速和选择性强的样品制备技术,与 LC-NMR 联用可以提高 NMR 的检测灵敏度。最新的 LC-SPE-NMR^[11, 70-72] 技术是将柱后固相萃取技术引入 LC-NMR 系统,液相系统使用非氘代的流动相,然后用氘代溶剂将分析物从 SPE 柱转移到 NMR 的流动探头,则降低了氘代溶剂的消耗^[73]。另外, HPLC-SPE-capNMR^[74] 和 capHPLC-capNMR^[75] 技术提高了对微量样品测定的速度和能力,并且增强了 NMR 微螺线圈的灵敏度。Exarchou 等人^[11]首次采用自动在线 LC-SPE-NMR 技术进行了希腊牛至提取物的分析。在 Clarkson 等人^[71]的研究中,通过对一个非洲药用植物 *Kanahia laniflora* 的花、叶、根和茎提取物中复杂成分的结构分析显示了 LC-SPE-NMR 联用技术的潜力。他们鉴定出 4 个黄酮醇糖苷和 3 个 5α -强心苷类成分,同时在 HSQC 谱和 HMBC 谱的基础上完全归属了 ^1H 和 ^{13}C NMR 信号。因此,LC-SPE-NMR 技术在制备性分离之前同步分析提取物成分,显著加快了天然产物复杂混合物的分析过程。

另外,在实际分析中,运用 LC-NMR 和 LC-MS、LC-DAD-UV 等手段相结合的方法可获得更有效的结果,强调不同波谱数据互补,对于充分发挥 LC-NMR 的作用、扩大其应用范围是非常必要的。例如, Zanolari 等^[76]结合连续流动模式 LC-NMR 和 LC-MSⁿ 技术,在线分析鉴定了巴西古柯类植物 *Erythroxylum vacciniifolium* 中一系列托烷类生物碱同系物,其中大部分化合物为首次发现,而且该结果可指导最终的定向分离。Cogne 等人^[77]在分析非洲玄参科植物 *Jamesbrittenia fodina* 中不稳定化合物时,首先采用 LC-UV 和 LC-ESIMS 技术揭示其存在的各种肉桂酯类衍生物,化学筛选集中于一对新颖且不稳定的异构体,再进一步通过连续流动模式和停