

# 高通量天然产物化学和毛细管核磁共振探头技术的应用 \*

胡金锋<sup>1,2,\*</sup> Gary R. Eldridge<sup>2</sup> 余亦华<sup>3</sup> Mark O 'Neil-Johnson<sup>2</sup>

(1. 华东师范大学脑功能基因组学教育部重点实验室 上海 200062; 2. 美国红杉科学公司, 圣路易斯市 密苏里州 63114; 3. 华东师范大学上海市功能磁共振成像重点实验室 上海 200062)

**摘 要** 介绍了近几年为高通量药物筛选构建大型天然产物样品库的高通量天然产物化学,即多通道平行高效液相制备和平行液质联用分析技术;详细介绍了核磁共振新技术即体积小和质量灵敏度高的毛细管核磁共振探头技术,该探头技术的成功应用使得天然产物样品库中活性化合物的结构鉴定所需样品量降低到前所未有的微克级水平;展望了源于中药的天然产物作为小分子探针开展脑功能方面的化学基因组学研究。

**关键词** 高通量天然产物化学 天然产物样品库 毛细管核磁共振探头 结构鉴定微型化 化学基因组学

中图分类号: O629; O657. 61 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2008)04-0429-12

## High-Throughput Natural Product Chemistry Methods and the Application of the Capillary NMR Probe

Hu Jinfeng<sup>1,2,\*</sup> Gary R. Eldridge<sup>2</sup> Yu Yihua<sup>3</sup> Mark O 'Neil-Johnson<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Brain Functional Genomics of the Ministry of Education, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. Sequoia Sciences, Inc., Saint Louis, Missouri 63114, USA; 3. Shanghai Key Laboratory of Functional Magnetic Resonance Imaging, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** High-throughput natural product chemistry methods, mainly consisting of two parallel multi-channel systems of preparative HPLC and LC-ELSD-MS, have been applied to the generation and analysis of large natural product libraries. The enhancement on mass sensitivity by the low volume capillary NMR probe (CapNMR<sup>TM</sup>) technology makes the NMR data acquisition, structure elucidation and de-replication on microgram amounts of natural products a reality. This state-of-the-art probe has ushered in a new era in the miniaturization of structure elucidation of natural products using mass-limited material. The perspectives for natural products as small molecular probes in brain functional genomics are briefly provided.

**Key words** high-throughput natural product chemistry methods; natural product libraries; CapNMR<sup>TM</sup> probe; miniaturization of the structure elucidation process; chemical genomics

收稿: 2007 年 9 月, 收修改稿: 2007 年 10 月

\* 国家自然科学基金项目 (No. 90713040, 30640068)、教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET) 项目、上海市科委项目 (06DZ19002, 06J14033, 07DZ22006) 资助

\* \* 通讯联系人 e-mail: jhf@brain.ecnu.edu.cn; jhu@sequoiasciences.com

## 1 引言

一般来说,天然活性物质结构新颖、疗效高和毒副作用小,所以它们一直是新药设计的主要分子模型之一。到目前为止,人类用于治疗疾病的药物中直接来源于天然化合物的占 30%—40%<sup>[1]</sup>。纵观 1981—2002 的 20 余年间,总共大约有 1 000 个化学药品得到美国 FDA 的批准,其中仅就抗肿瘤(antitumor)和抗感染(antiinfective)的药物而言,其直接或间接来源于天然产物的就超过 60%<sup>[2-6]</sup>。即便如此,时至今日已被开发成为药物的天然化合物仅占公开发表的天然产物的 1%,甚至更少<sup>[1]</sup>;而且收录在天然产物数据库(dictionary of natural products, DNP)中至少有 40% 的各种结构类型的化合物是合成化合物库(synthetic compound libraries, SCL)所不具备的<sup>[7]</sup>。新药的研发不仅有赖于药物筛选模型的建立与优化,更取决于被筛化合物的多样性。目前已建立起来的药靶大多缺乏足够的先导化合物来探索结构与生物活性之间的关系(structure-activity relationship, SAR)。天然产物样品库(natural products libraries, NPL)是解决这一问题的有效途径之一。因为该样品库既能提供结构复杂多样的有机小分子,又适合目前的高通量药物筛选技术<sup>[8,9]</sup>。随着分离技术和鉴定方法的现代化,天然产物的研究取得了很大进展。从传统中药(traditional Chinese medicine, TCM)中寻找对人类疾病药物靶点的有效成分,解析

其结构;对结构进行化学修饰和制备衍生物;通过药效关系(SAR)的研究发现先导化合物,从而找到相应的药物,是当前我国新药研究的主要途径之一。

## 2 高通量天然产物化学方法的概述和大型天然产物样品库的制备与分析

随着现代科学技术的迅猛发展,药物化学工作者对大型天然产物样品库的制备与分析,尤其是对快速分离和鉴定库中微量活性有机小分子化合物的要求越来越高。平行制备和平行分析等高通量(high-throughput)技术首先被应用在大型合成化合物库(SCL)的制备与分析上<sup>[10-19]</sup>。目前,该高通量方法已成功地应用在大型天然产物样品库的建立与分析上<sup>[8,9]</sup>:具体是采用加速溶剂提取(accelerated solvent extractor, ASE),快速自动硅胶柱层析(flash master automated chromatography, FAC),高通量平行多通道高效液相制备(high-throughput parallel multiple channel preparative HPLC, HT-*pm*HPLC)和高通量平行多通道液质联用分析(high-throughput parallel multiple channel LC-ELSD-MS, HT-*pm*LCMS)等技术和方法来制备和分析天然产物样品库(图 1—4)。原材料的提取物(包括水相和有机相)可通过快速自动柱层析得到 4 至 5 个极性不同的硅胶柱层析组分(flash fractions),然后每个组分经过 HT-*pm*HPLC 在相应的溶剂梯度下各自制备成 40 个 HPLC 组分(HPLC fractions)(见图 1)。

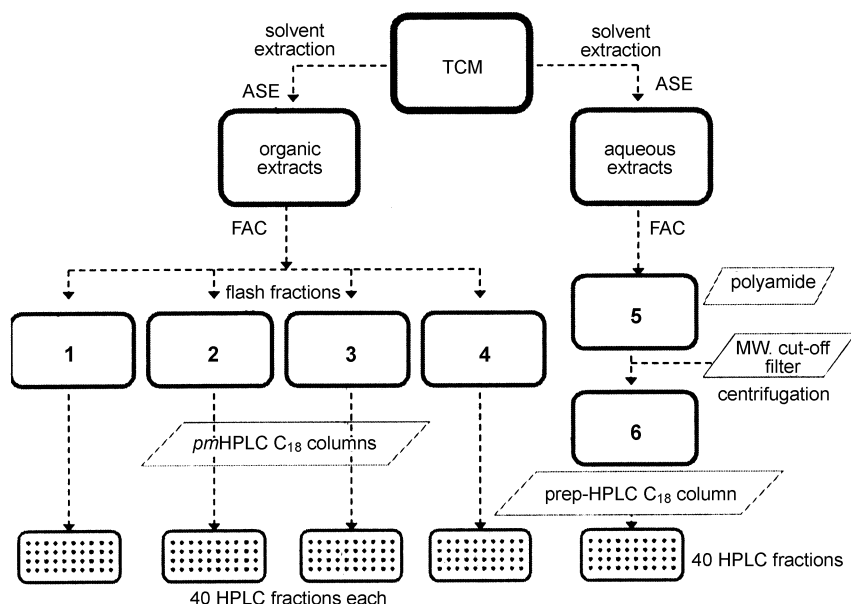


图 1 运用高通量天然产物化学的多通道平行高效液相制备技术建立适合高通量药物筛选的中药天然产物样品库(96 孔板)

Fig. 1 TCM compound libraries generated by HT-*pm*HPLC for high-throughput screening

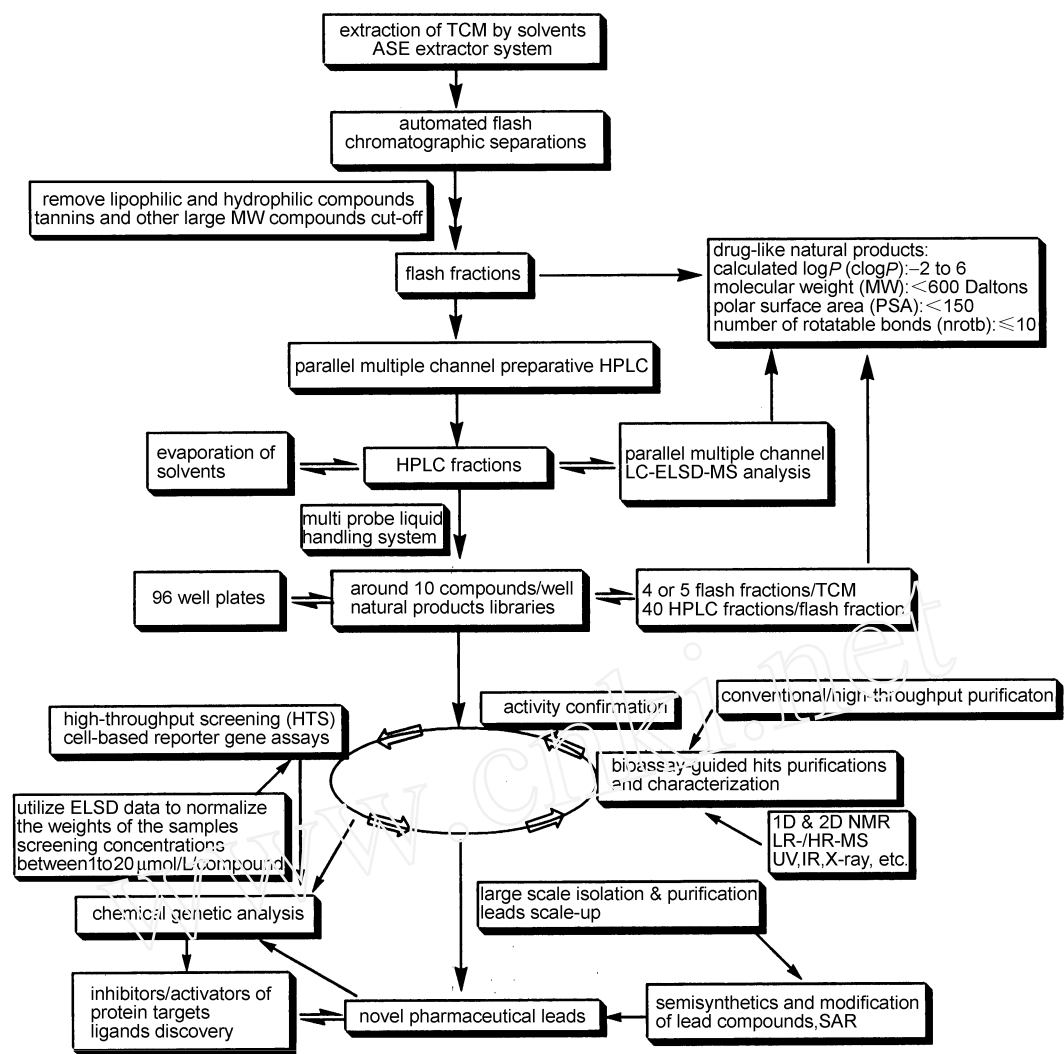


图 2 中药 (TCM) 天然产物样品库中先导化合物的发现流程图  
Fig. 2 Schematic flow of lead discovery from TCM compound libraries

每个 HPLC 组分被自动移液器 (multiprobe liquid handling system) 转移到 96 孔板制成天然产物样品库 (图 1, 2)。进而用 HF *pm*LCMS 来快速检测板中每孔的样品 (图 2—4)，从而可以快速得知库中每个样品 (即 HPLC 组分) 所含化合物的个数及各化合物的分子量与保留时间等信息。96 孔板中每一孔仅含若干个化合物，每个化合物的浓度比其在相应的提取物中的浓度高出几十到上百倍，因此库中样品有利于生物活性筛选。这样得到的天然化合物库除去了潜在的杂质 (potential interferences) 并利用离心过滤 (Centricon™ high molecular weight filter) 剔除了大分子化合物。有了 LC-ELSD-MS 的分析数据，活性成分的复制 (de-replication) 及计算机信息管理更加方便。同时有了分子量的信息，有利于从天然化合物库中开发新药，这是因为市场上绝大多数的药

物分子量在 300 到 600 道尔顿 (Da) 的范围内<sup>[5]</sup>。

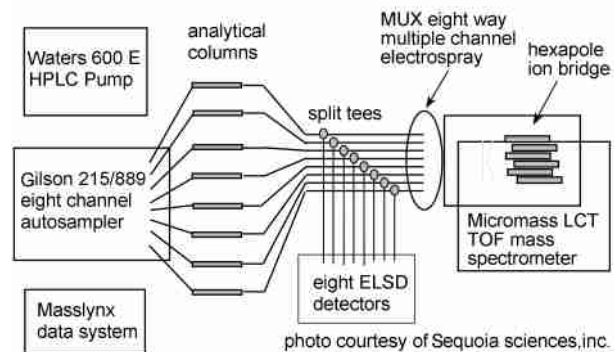


图 3 平行八通道分析型液质联用 (LC-ELSD-MS) 分析天然产物样品库 (平面示意图)<sup>[9]</sup>  
Fig. 3 Natural product libraries analyzed by HF *pm*LCMS system (plane illustration)<sup>[9]</sup>

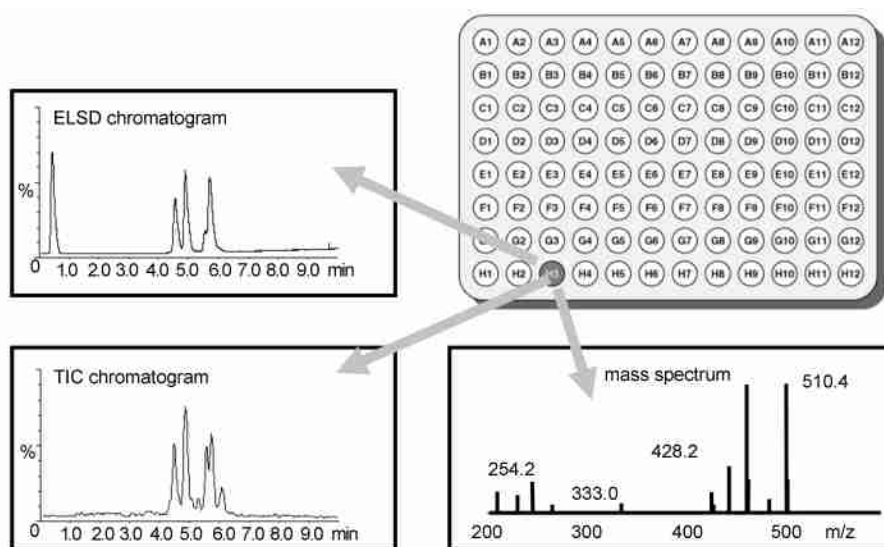


图 4 液质联用(LC-ELSD-MS)分析天然产物样品库(96孔板)中每个样品

Fig. 4 96-well plates analyzed by LC-ELSD-MS

### 3 毛细管核磁共振探头技术和天然化合物结构鉴定微型化

由于天然产物的含量低,化合物的结构又具有多样性和复杂性,对活性天然产物尤其是微量成分的分离纯化和结构鉴定具有极大的挑战性。众所周知,生物活性筛选时,药靶所需化合物的量在微克级,而常规天然产物的分离、结构鉴定如核磁共振波谱所需化合物的量在毫克级。往往一个样品的生物活性被确定后,研究人员需要重复该天然产物的提取与纯化工作,以期得到足够量的单体用于化合物的结构鉴定。这样需要大量的人力、物力和财力的投入。我们在世界上率先利用体积小(仅几个微升)、灵敏度高的毛细管核磁探头(CapNMR<sup>TM</sup> probe)

技术(图5,6),使得活性天然产物分离和结构鉴定所需的样品微量化,降到一个前所未有的微量水平(5—200 μg)<sup>[20-22]</sup>:大约5 μg的样品可以得到<sup>1</sup>H-NMR(5 min内),<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY(60 min内)和NOESY(约100 min内)等谱图;大约30 μg的样品可以得到二维HSQC或HMQC谱图(2—3 h内);70至100 μg的样品可以得到一张比较完全的HMBC谱图(12—16 h内);如若想得到<sup>13</sup>C-NMR谱图,则大约需要200 μg的样品<sup>[20]</sup>。库中活性样品(HPLC组分)一般可通过半制备型(semi-preparative)或分析型的HPLC来进行快速分离纯化得到单体化合物(微克级)<sup>[20-22]</sup>。

对微量化合物的结构能进行鉴定的一个关键因素是增强核磁共振的质量灵敏度。近十年来一些新型核磁共振探头技术被研发和应用起来,这些探头主要包括有Cold Probe<sup>[23-32]</sup>,CryoProbe<sup>TM[33-41]</sup>,Nano Probe<sup>[42-48]</sup>,CryoFlowProbe<sup>TM[49]</sup>和MicroCryoProbe<sup>TM</sup>(<http://www.bruker-biospin.com/nmr/products/crp.html>)<sup>[20]</sup>等。在前文中<sup>[20]</sup>,我们不仅对这些探头做过简要的介绍,而且还对与HPLC-NMR联用的一些流动探头(flow probes)<sup>[49-53]</sup>如CryoFlowProbe<sup>TM</sup>和IFC Cold Probe等在微量化合物NMR波谱的采集和在线结构鉴定(on-line chromatography/structure elucidation)等方面做过简要分析。这些探头确实能提高核磁共振的质量灵敏度,但购置费和维护费用相当高<sup>[20]</sup>。毛细管核磁探头(CapNMR<sup>TM</sup> probe)是美国MRM/Protasis公司(MRM公司成立于1994年,2000年与Protasis公司合并)基于磁共振微传感器技术(magnetic resonance microsensors,MRM)开发出来的

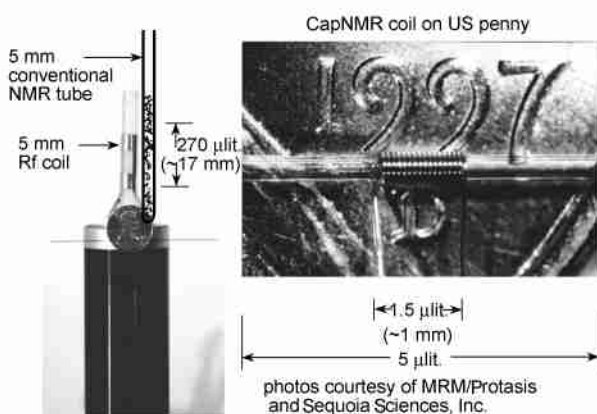


图 5 毛细管核磁共振探头和 5 mm 常规核磁管的对比视图

Fig. 5 CapNMR<sup>TM</sup> probe and 5 mm conventional NMR tube

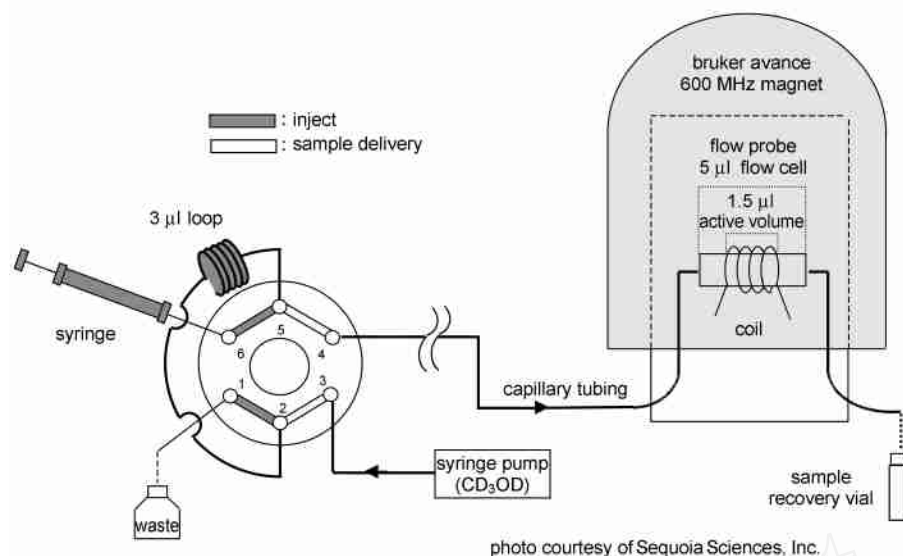


图 6 体积小(5  $\mu\text{l}$ )的线圈其中 NMR 有效容积仅为 1.5  $\mu\text{l}$  的毛细管核磁共振探头手动流动进样平面示意图(600 MHz NMR)<sup>[8,20]</sup>

Fig. 6 Schematic diagram of a 600 MHz NMR spectrometer equipped with 5  $\mu\text{l}$  CapNMR<sup>TM</sup> probe (1.5  $\mu\text{l}$  active volume) and the manual syringe loading sample<sup>[8,20]</sup>

新产品并已商业化<sup>[54-56]</sup>,近几年发展与应用非常迅速。该探头价格比较合理,目前在美国的销售价大约为 5.5—6.0 万美元(包括自动进样系统)。众多厂家的 300 至 800 MHz 的核磁共振仪如:Bruker、Varian 和 JBOl 等现在均可支持这种微型的毛细管核磁探头技术。此外该探头亦可与液相色谱技术联用(CapLC<sup>TM</sup>, CapLC-NMR)分析化合物的结构<sup>[57-59]</sup>。

CapNMR<sup>TM</sup> 探头是毛细管大小的射频线圈(Rf coil)呈螺旋线管状缠绕在熔融石英管(相当于普通探头中的核磁管)上而成的(图 5)。该探头带有  $z$  方向的脉冲梯度场线圈,其螺旋线管线圈是一个对  $^1\text{H}$  优化的,对  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  和  $^2\text{H}$ (用于锁场)3 种共振频率可调谐的线圈。该探头质量灵敏度的增益源于该射频线圈和容积缩小的流动池(流动池整体容积为 5  $\mu\text{l}$ ,而有效容积即 NMR 的响应容积仅为 1.5  $\mu\text{l}$ ) (见图 6)。该探头的技术含量高,采用了诸如毛细管流体和质量敏感增强等先进技术。毛细管流体技术能使探头有很好的溶剂兼容性(excellent solvent compatibility)和很小的 NMR 峰宽(minimal peak broadening);还能很好地保持已校准的信号传输基线(calibrated transmission lines);并且在非流动模式(stop-flow)下测试,能保持有限的样品稀释度(limited sample dilution)。所有这些流控技术(fluidics)的成功应用加上体积仅几个微升的线圈,能使体积在微升级或质量在纳摩尔级的 NMR 分析具有很高的质量

灵敏度。利用该探头可测得微量化合物的二维核磁共振波谱(2D-NMR),进而可大大加速样品量有限的天然产物的结构鉴定过程<sup>[60]</sup>。一般情况下,起始原料只需几百克,而不是几公斤或十几公斤,这样充分利用了有限的资源,节约了宝贵的原材料。例如我们曾经仅用 99 g(干燥后的称重)北美植物大红钓钟柳(*Penstemon centranthifolius*)的地上部位作为起始原料<sup>[20]</sup>,经有机溶剂提取后得到 12 g 有机相提取物。该提取物利用快速自动硅胶柱层析,平行高效液相制备和液质联用等技术来制备和分析钓钟柳天然产物库(*Penstemon* library)。该 96 孔板可复制成相同的两份,一份用于生物活性筛选,另一份供稍后相对应的孔板中活性化合物的分离纯化。库中有几个相邻样品(即 HPLC 分离物)经生物活性筛选后发现具有抗菌活性(anti-bacteria)。合并这几个活性样品(即 HPLC 分离物),再经高效液相半制备分离纯化得到 6 个化合物(图 7)。对每个纯品经进一步的化学和生物活性的分析得知:化合物 6 为主要成分,但无抗菌活性;微量化合物 5 才是活性物质。表 1 中列出了每一微量单萜环烯醚萜(1—6)的分离量及应用毛细管核磁探头确定结构时获得各 NMR 谱图所用的测试时间(acquisition time)。其中每一化合物的含量是在分离过程中通过蒸发光散射检测仪(ELSD)的线性方程来计算得到的: $\log(\text{ELSD 峰积分面积})$  vs.  $\log(\text{纯品的含量, } \mu\text{g}/\mu\text{l})$  (图 8)<sup>[20]</sup>。化

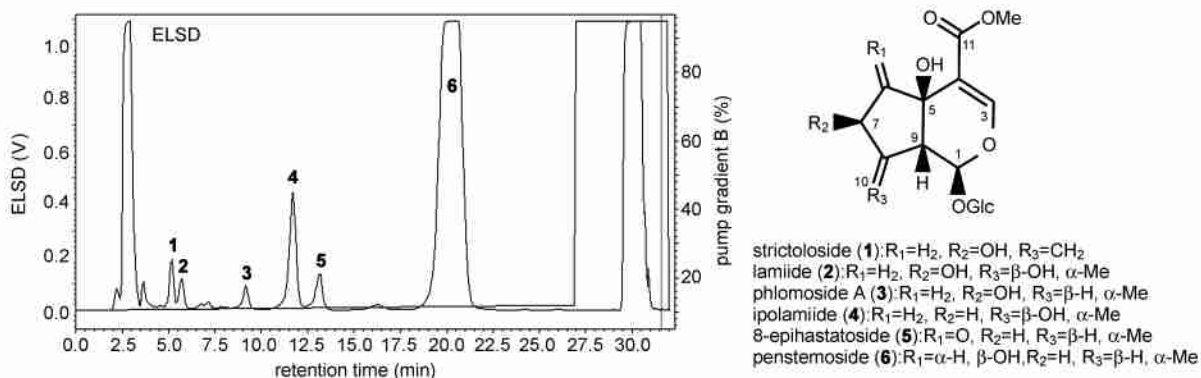


图 7 高效液相半制备分离纯化单萜环烯醚苷 (iridoid glycosides 1—6) [20]

Fig. 7 The structures of iridoid glycosides (1—6) and their corresponding ELSD peaks in the semi-preparative HPLC purification chromatogram [20]

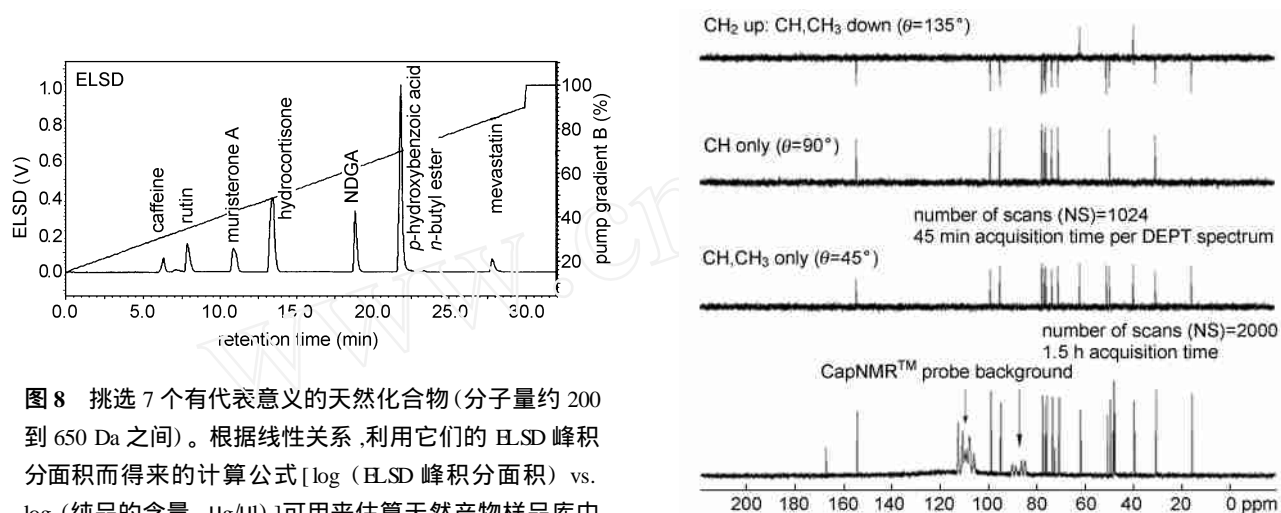


图 8 挑选 7 个有代表意义的天然化合物 (分子量约 200 到 650 Da 之间)。根据线性关系, 利用它们的 ELSD 峰积分面积而得来的计算公式  $[\log(\text{ELSD 峰积分面积}) \text{ vs. } \log(\text{纯品的含量, } \mu\text{g}/\mu\text{l})]$  可用来估算天然产物样品库中被分离化合物的质量 (标准偏差大约为  $\pm 20\%$ )

Fig. 8 Seven standard natural products ( $M_w$  between ca 200 and 650 Da) were selected for ELSD evaluation and generation of the quantification equation:  $\log \mu\text{g} = (\log \text{peak area} - A)/B$

合物 6 的质量约为 300  $\mu\text{g}$ , 我们采用毛细管核磁探头在较短的时间内测得它的  $^{13}\text{C}$  谱 (图 9)。NMR 谱图测试完毕后, 一般来说, 被测样品的回收率都能达到 95% 以上 (表 1 和图 10)。

图 9 质量  $\mu\text{g}$  级的 penstemoside (6) 运用毛细管核磁探头测得的  $^{13}\text{C}$  和 DEPT 谱。300  $\mu\text{g}$  化合物 6 溶解在 6.5  $\mu\text{l}$  氘代甲醇 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 中; 探头流动池 (5  $\mu\text{l}$ ) 里的质量为 230  $\mu\text{g}$ , 有效容积 (即 NMR 的响应容积 1.5  $\mu\text{l}$ ) 里的质量仅为 70  $\mu\text{g}$

Fig. 9 Carbon and DEPT data acquisition by CapNMR<sup>TM</sup> probe: 300  $\mu\text{g}$  penstemoside (6) diluted with 6.5  $\mu\text{l}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 230  $\mu\text{g}$  (5  $\mu\text{l}$ ) injected; 70  $\mu\text{g}$  in the active volume (1.5  $\mu\text{l}$ )

表 1 天然化合物 (1—6) 的分离量、NMR 波谱测试时间和各样品的回收率

Table 1 Natural products (1—6): amount, NMR data acquisition time and the recovery ratio

compound	amount <sup>a</sup>	$^1\text{H}$	COSY	HSQC	HMBC	$^{13}\text{C}$	DEPT	recovery (%) <sup>e</sup>
1	35 $\mu\text{g}$	5 min	54 min	2 h 40 min	15 h	NA <sup>c</sup>	NA	> 95
2	25 $\mu\text{g}$	5 min	54 min	2 h 40 min	15 h	NA	NA	> 95
3	32 $\mu\text{g}$	5 min	54 min	2 h 40 min	15 h	NA	NA	> 95
4	90 $\mu\text{g}$	5 min	54 min	5 h <sup>b</sup>	8 h	NA	NA	> 98
5	46 $\mu\text{g}$	5 min	54 min	1 h 20 min	15 h	NA	NA	> 95
6	300 $\mu\text{g}$	5 min	30 min	30 min	2 h	1.5 h	45 min <sup>d</sup>	> 99

a each sample diluted with 6.5  $\mu\text{l}$   $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 5  $\mu\text{l}$  injected into the capillary NMR probe; b HSQC data could be acquired in 80 min, however, the experiment was set up for 5 h; c not acquired; d 45 min per spectrum of DEPT (135°, 90° and 45°); e Final sample recovery was measured by NMR peak area

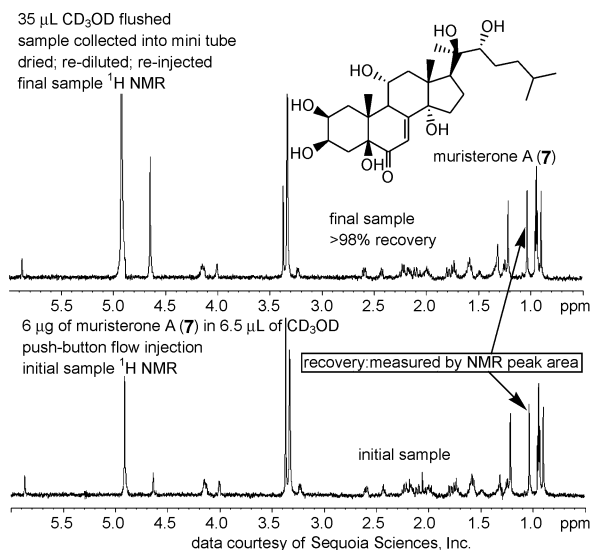


图 10 以化合物 muristerone A (7) 为例说明用毛细管核磁探头 (CapNMR<sup>TM</sup> probe) NMR 波谱测试完毕后样品从探头中的回收率

Fig. 10 Using muristerone A (7) as an example to demonstrate the ratio of the sample recovery from the probe after NMR experiments

对于质量大于 70 µg 但还不足以直接测得碳谱的化合物,如上述从大红钓钟柳植物得到的单萜环烯醚萜 ipolamiide (4, 90 µg), 由于可以测得 HSQC 和比较完全的 HMBC 谱, 因而其 <sup>13</sup>C 信号 (包括季碳) 的归属完全可结合 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC 和 HMBC 等二维 NMR 谱中的相关交叉峰尤其是 HMBC 谱中的 <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> 和 <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> 交叉峰 (cross peaks) 来推导出来 (表 1 和图 11) [20]。

毛细管核磁探头 (CapNMR<sup>TM</sup> Probe) 的安装和维护均很简单, 操作平台坚实稳定、使用便利。测试样品时可采用手动 (manual syringe loading) [18, 20-22]、辅助手动 (assisted manual syringe loading HTSL-1100) 或自动流动进样 [automated/unattended flow injection (Bruker BEST or Varian VAST)] [61, 62]。该探头分析样品经济实用: 测试中免除了核磁管的使用, 氘代试剂用量亦很少 (low solvent consumption), 约为常规 5 mm 核磁管试剂耗量的 1/10, 即大约用 6.5 µl 氘代试剂溶解每个样品, NMR 测试完后另外再需约 30—40 µl 氘代试剂用来冲洗线圈中的熔融石英管若干次

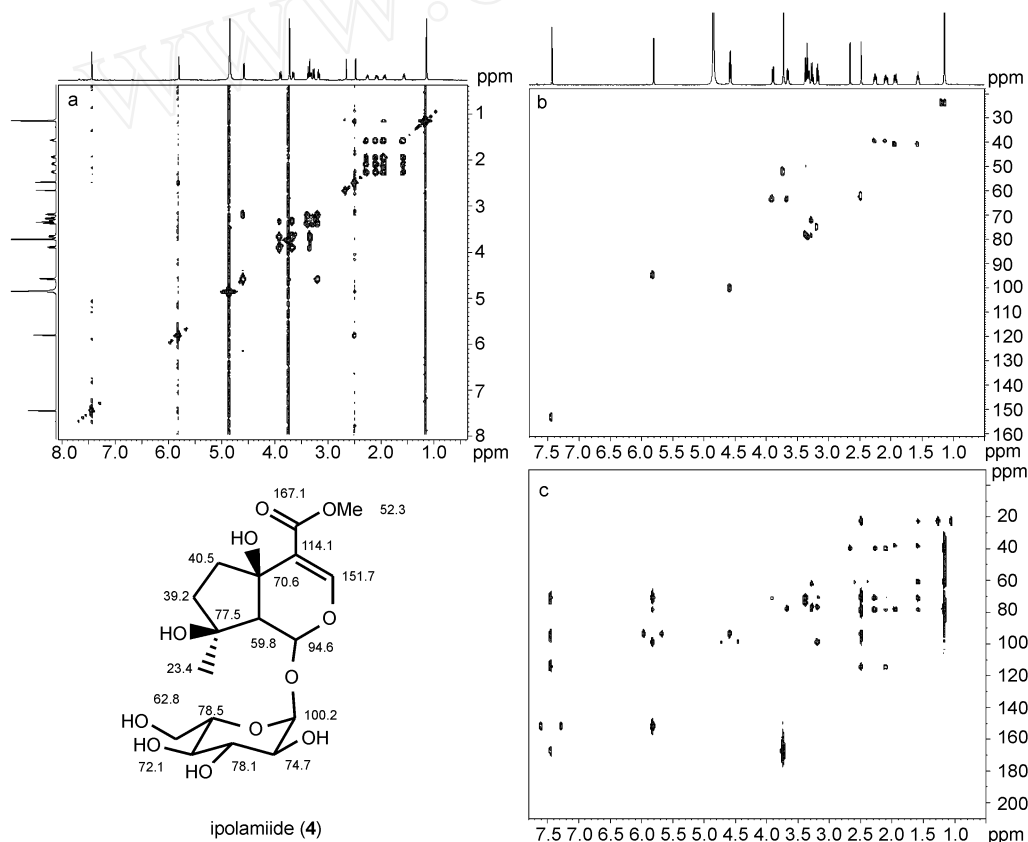


图 11 化合物 4 的 <sup>13</sup>C 信号归属: 90 µg 溶解在 6.5 µl CD<sub>3</sub>OD 中; 探头流动池 (5 µl) 里的质量为 70 µg, 有效容积 (即 NMR 的响应容积 1.5 µl) 里的质量仅为 20 µg

Fig. 11 The assignment of <sup>13</sup>C signals for the mass-limited material ipolamiide (4): 90 µg diluted with 6.5 µl CD<sub>3</sub>OD, 70 µg (5 µl) injected into the probe with only 20 µg of sample in the active volume (1.5 µl). a) COSY, NS = 8, 54 min (data acquisition time). Data processed with unshifted sine bell function without symmetrization; b) HSQC, NS = 128, 54 min; c) HMBC, NS = 200, 8 h

(如图 12 所示)以备用。

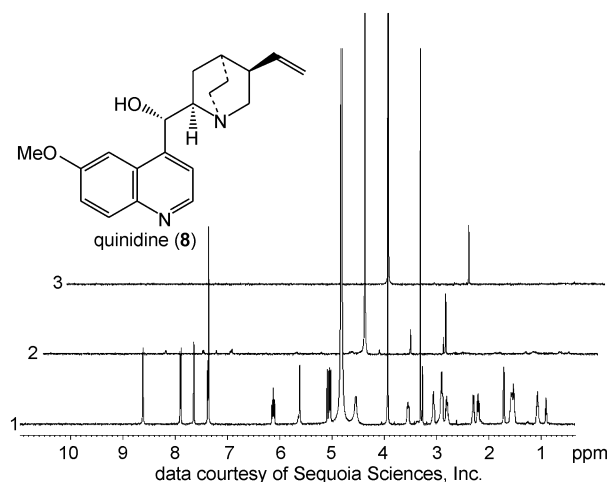


图 12 以化合物 quinidine (8) 为例说明毛细管核磁探头 (CapNMR™ probe) 的冲洗

Fig. 12 Using quinidine (8) as an example to demonstrate the purge of the coil after NMR experiments. 1) 50 µg quinidine infused; 2) 10 µl solvent flushed; 3) 25 µl solvent flushed

该探头的线圈适用于各种氘代试剂。根据被测化合物的溶解性能,我们曾使用过苯、氯仿、丙酮、乙腈、甲醇、水、二甲亚砜和吡啶等氘代试剂或两种氘代试剂的混合溶剂。NMR 匀场容易,所用的氘代溶剂量很少,因此谱图受溶剂残留峰的影响很小,即使氘代试剂里添有缓冲溶剂(不同的 pH 值)甚至是在高浓度的盐溶液(salt tolerance)中仍然能保持着良好的信噪比(S/N)(图 13)。

$$S/N = \frac{S_{coil} B_0^2 m_{sample}}{V_{noise} \sqrt{R_{coil}}}$$

coil sensitivity

magnetic field

sample mass in coil

noise

CapNMR™ involves:

- 1) high strength magnets ( $7T < B_0 < 21^+ T$ )
- 2) RF microcoils with high mass sensitivity

reminder: acquisition time  $(S/N)^2$

图 13 毛细管核磁探头信噪比(S/N)的制约因素<sup>[54,63]</sup>

Fig. 13 The impact factors effecting the ratio of the signal and noise (S/N) of the CapNMR™ Probe<sup>[54,63]</sup>

由图 13 所示公式来看,提高毛细管核磁共振探头的信噪比主要可来自高强度磁场(high field strength magnet)和微型射频线圈(Rf microcoil)等两个方面。诚然,单方面提高核磁共振仪的场强是可以提高 NMR 的灵敏度和信噪比,但成本太高,例如将 600 MHz 的 NMR 更新为 800 MHz,信噪比是提高了

1.5 倍但每台仪器的成本却飙升近 4 倍,达 350 万美元(见表 2)。若以蔗糖(sucrose, 9)的异端质子为例(图 14),仅仅将 600 MHz 核磁共振仪上的常规核磁管更换为毛细管核磁共振探头,信噪比(S/N)就能提高 10 倍以上(表 3 和图 14)。

表 2 NMR 场强(600 MHz)、信噪比和相应的价格

Table 2 NMR spectrometers' frequencies, the corresponding S/N and prices

NMR spectrometer ( <sup>1</sup> H frequency)	S/N (0.1 % EB)	price (USD, million)
600 MHz	1 200 1	0.9
700 MHz	1 500 1	2.0
800 MHz	1 850 1	3.5
900 MHz	2 700 1	5.0

表 3 毛细管核磁共振探头与常规核磁管相对信噪比和采样时间的对比(参照蔗糖的异端质子的<sup>1</sup>H 信号)

Table 3 The comparison of the relative S/N and the data acquisition time between the CapNMR™ probe and the 5 mm conventional probe (referring to the <sup>1</sup>H signal of the anomeric atom in sucrose)

single scan, figure of merit <sup>a</sup>	5 mm conventional probe <sup>b</sup>	capNMR™ probe <sup>c</sup>
spectral resolution	< 1 Hz	< 1 Hz
relative S/N, fixed mass <sup>d</sup>	1	10
relative data acquisition time, fixed mass	100	1

a at 600 MHz, sucrose (9) anomeric proton; b line broadening 1.0 Hz; c line broadening 0.7 Hz; d 1 scan: S/N = 3 for 1.5 nmol (513 ng) of sucrose; 256 scans (10 min): S/N > 10 for 1 nmol (340 ng) of sucrose; rule of thumb: 1 nmol injected gives S/N > 10/1 in 10 min

总之,毛细管核磁共振探头有着常规的 5mm 探头不可比拟的质量灵敏度(表 3 和图 15)。相对于常规探头,该探头即使对微量的具有较大分子量的化合物,例如人参皂苷 Rc,其 NMR 波谱的测试仍具有强大的优势(表 4 和图 16)。不仅如此,毛细管核磁共振探头还可应用在微量蛋白质大分子的 NMR 测试上<sup>[64]</sup>。

我们曾对当今具有领先技术水平的两个探头即 CapNMR™ 和 MicroCryoProbe™ 作过对比<sup>[20,21]</sup>。在实验过程中,两探头对微量化合物的二维 NMR 谱(30 µg: HSQC/HMQC 和 70 µg: HMBC)的测试能力是相当的。正如大多数高新技术本身有着各自的优缺点一样, MicroCryoProbe™ 探头比较适合单位体积里溶解性能不太好的样品即需要较多的氘代试剂(至少 100 µl)来溶解的样品,而且测试碳谱时需要的样品



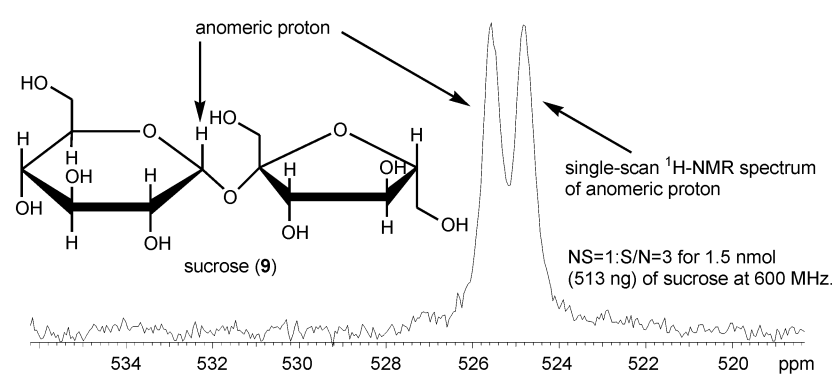


图 14 观察 sucrose (9, 微量) 的异端质子信号来说明毛细管核磁探头的高信噪比 (S/N) [54]

Fig. 14 The <sup>1</sup>H signal of the anomeric proton of sucrose (9, trace amount) is used to calculate S/N for the CapNMR™ probe [54]

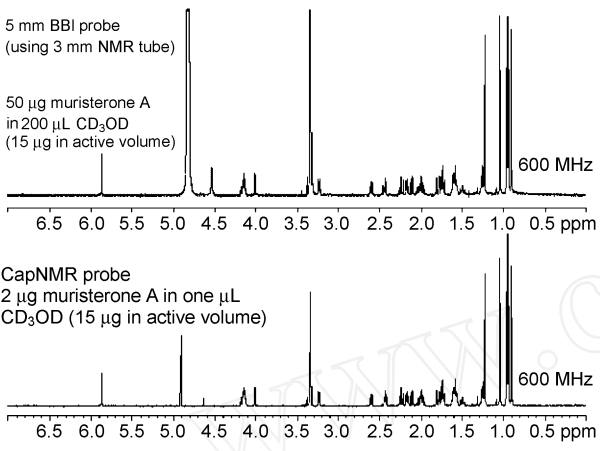


图 15 以化合物 muristerone A(7) 为例对比毛细管核磁探头和常规核磁探头的质量灵敏度

Fig. 15 Using muristerone A (7) to demonstrate the preeminent enhancement on mass sensitivity by using the CapNMR™ probe (over the conventional 5 mm BBI probe)

量较大;CapNMR™ 探头因为在 NMR 测试过程中氘代溶剂的残留峰影响很小,因而拥有较高的样圈比 (sample-to-coil ratio) 即注满因子 (filling factor) [65], 所以测试 NMR 谱尤其是 <sup>1</sup>H 和 COSY 谱时所需的样品量相对于 MicroCryoProbe™ 探头来说更少 (5 到 10 µg) [20,21] (图 17)。

表 4 对比毛细管核磁探头和常规核磁管对人参皂苷 Rc 的 NMR 测试

Table 4 The comparison of the NMR data acquisition for ginsenoside-Rc between the CapNMR™ probe and the 5 mm conventional probe

ginsenoside-Rc (10) ( <i>M<sub>w</sub></i> > 1 000)	amount (µg)	acquisition time	
		flow inject CapNMR™ probe	5 mm conventional probe
<sup>1</sup> H	3	5 min	impossible
TOCSY	3	1 h	impossible
HSQC	50	3 h	24 h ok
HMBC	50	12 h	impossible

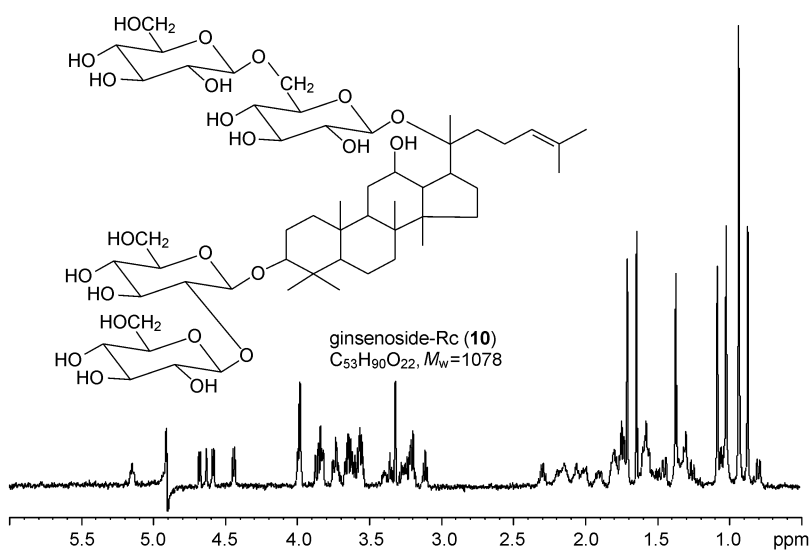


图 16 毛细管核磁探头测微量且分子量较大的化合物 ginsenoside-Rc (10) 的 <sup>1</sup>H NMR 波谱

Fig. 16 <sup>1</sup>H NMR data acquired for ginsenoside-Rc (10, trace amount) with a large molecular weight (over 1 000 Da). Sample in the coil: 1 µg/µl (CD<sub>3</sub>OD); The CapNMR™ probe was operated at a temperature of 298 K; Pulse widths were 5.5 µs at a power of 24 dB for the <sup>1</sup>H spectrum (NS = 64, 5 min acquisition time)

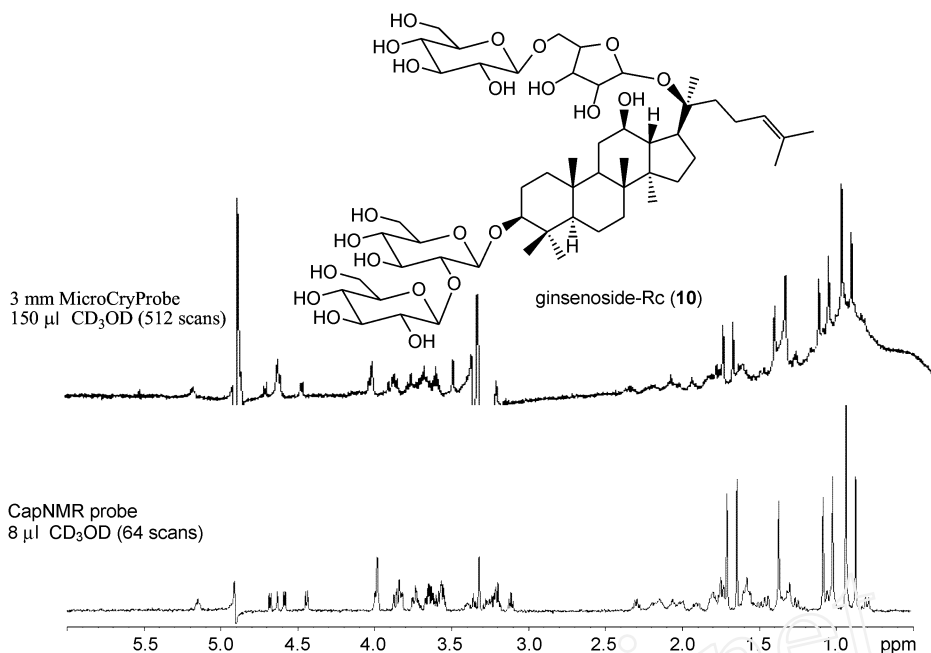


图 17 对比 CapNMR<sup>TM</sup>和 3 mm MicroCryoProbe<sup>TM</sup>两探头测得 ginsenoside-Rc (10, 1.5 µg/µl) 的<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Fig. 17 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) of ginsenoside-Rc (10, 1.5 µg/µl): CapNMR<sup>TM</sup> probe vs. 3 mm MicroCryoProbe<sup>TM</sup> probe

#### 4 毛细管核磁共振探头技术在微量新天然化合物结构鉴定过程中的应用

近几年来我们使用世界上首个 5 µl 氢间接碳梯度 (proton indirect carbon gradient) 的毛细管核磁共振探头在天然产物尤其是微量新成分的结构鉴定上开展了大量工作 (表 5)<sup>[21, 22, 66-72]</sup>。表 5 中新化合物的分子量大多在 250 至 1 000 Da 之间。由于是采用高

通量而非常规的分离技术,新化合物的样品量均在 µg 级 (一般在几个 µg 到几百个 µg 之间)。显然一些理化数据譬如熔点 (m. p.)、比旋光 ([α]<sub>D</sub>)、红外 (IR) 和紫外 (UV) 等因样品量少的原因而无法检测<sup>[21, 22, 66-72]</sup>。但由于使用了毛细管核磁探头,这些微量新化合物的<sup>1</sup>H 和<sup>13</sup>C 化学位移的归属以及相对构型均能确定下来。根据近几年我们与一些制药和生物技术公司以及学术单位的合作经验,大约

表 5 首个 5 µl 氢间接碳梯度的毛细管核磁共振探头的应用: µg 级新天然产物结构鉴定

Table 5 The application of the first 5 µl proton indirect carbon gradient CapNMR<sup>TM</sup> probe to the structure elucidation of novel natural products with mass-limited materials

compound name	class	M <sub>w</sub>	amount	ref.
acuminatanol	flavanoid	638	160 µg	66
arboreslin	flavanoid	368	140 µg	67
cleistrioside-5	alkylated sugar	750	400 µg	70
2,6-diacetyl-3,4-diisobutyl-1-O-octylglucopyranoside	alkylated sugar	516	200 µg	21
2,6-diacetyl-3,4-dimethylbutyl-1-O-octylglucopyranoside	alkylated sugar	544	70 µg	21
2,3-dihydroxy-5-methoxystilbene	stilbene	242	200 µg	68
2,3-dihydroxy-3,5-dimethoxystilbene	stilbene	272	35 µg	68
2,3-dihydroxy-5,5-dimethoxystilbene	stilbene	272	360 µg	68
hispidolide A	sesquiterpene	336	250 µg	69
hispidolide B	sesquiterpene	350	35 µg	69
(E)-2-hydroxy-2-(4-hydroxybenzyl)-5,5-dimethoxystilbene	stilbene	378	50 µg	68
ocholignan A	lignan	374	70 µg	72
ocholignan B	lignan	374	15 µg	72
3-O-cis- <i>p</i> -coumaroyl-20-hydroxy-12-ursen-28-oic acid	triterpene	618	8 µg	71
phragmidimer A	stilbene	482	350 µg	68
suaveolindole	indole-sesquiterpene	353	300 µg	22

100  $\mu\text{g}$  的化合物就足以完成生物活性的初步确定和化学结构的初步鉴定;从而足以作为下一步的研发工作提供必要的信息,诸如化合物的生物活性、骨架类型、结构新颖性、合成可行性和该类化合物在临床应用方面的索引等等<sup>[21,66]</sup>。

## 5 天然产物应用于化学基因组学研究

快速结构鉴定的微型化技术为从中药天然产物样品库中快速地找到先导化合物提供了极大的方便。通过利用高通量天然产物化学和毛细管核磁探头(CapNMR<sup>TM</sup> probe)技术,可以使生物活性筛选和结构鉴定同时在  $\mu\text{g}$  级上进行。我们首先建立了大型中药资源库(其中包括近 200 种具有健脑益智功效的中药)<sup>[73-76]</sup>,然后利用高通量天然产物化学技术成功地高通量药物筛选构建了大型天然产物样品库。通过基因芯片等功能基因组学技术,我们对不同的人类大脑疾病模式动物进行基因表达和蛋白组学研究,发现若干与脑衰老疾病有关的基因靶点<sup>[77-80]</sup>。在此基础上建立了基于细胞筛选模型的高通量药物筛选平台,对中药天然化合物库进行生物活性筛选。这种针对基因靶点的细胞筛选灵敏度高、检测方便,能有效地追踪活性成分,给活性物质的分离带来了极大的便利。放大中药提取物中含有对基因靶点有作用的活性成分提取分离和纯化的规模,得到足够量的纯品活性化合物。对活性化合物进行化学结构修饰,探讨构效关系(SAR)。利用天然活性化合物作为小分子探针针对脑衰老相关基因进行化学基因组学(chemical genomics)等方面的深入研究,进一步发现与确证脑衰老基因靶标的功能,探讨脑衰老的机理;同时为找到抗脑衰老疾病的药物先导化合物提供新的线索和科学依据。这也是后基因组时代创新药物研发的最新途径之一。

### 参 考 文 献

- [1] Petersen F. Drug Discovery from Natural Sources, 85 Years of Natural Products Research at Novartis. 1—13
- [2] Newman D J, Cragg G M. J. Nat. Prod., 2007, 70 (3): 461—477
- [3] Newman D J, Cragg G M, Snader K M. J. Nat. Prod., 2003, 66 (7): 1022—1037
- [4] Newman D J, Cragg G M, Kingston D G. The Practice of Medicinal Chemistry (ed. Wermuth C G). London: Academic Press, 2003. 91
- [5] Roggo S, Ertl P. Drug Discovery from Natural Sources, 85 Years of Natural Products Research at Novartis. 70—71
- [6] Shu Y Z. J. Nat. Prod., 1998, 61 (8): 1053—1071
- [7] Henkel T, Brunne R M, Müller H, Reichel F. Angew. Chem. Int. Ed., 1999, 38 (5): 643—647
- [8] Eldridge G R, Vervoort H C, Lee C M, Cremin P A, Williams C T, Hart S M, Gering M G, O Neil-Johnson M, Zeng L. Anal. Chem., 2002, 74 (16): 3963—3971
- [9] Cremin P A, Zeng L. Anal. Chem., 2002, 74 (21): 5492—5500
- [10] Fang L L, Pan J M, Yan B. Biotechnol. Bioeng., 2000, 71 (2): 162—171
- [11] Fang L L, Wan M, Pennacchio M, Pan J M. J. Comb. Chem., 2000, 2 (3): 254—257
- [12] Weller H N. Mol. Diversity, 1999, 4 (1): 47—52
- [13] Wang T, Zeng L, Cohen J, Kassel D B. Comb. Chem. High T. Scr., 1999, 2 (6): 327—334
- [14] De Biasi V, Haskins N, Organ A, Bateman R, Giles K, Jarvis S. Rapid Commun. Mass Spec., 1999, 13 (12): 1165—1168
- [15] Zeng L, Burton L, Yung K, Shushan B, Kassel D B. J. Chromatogr. A, 1998, 794 (1/2): 3—13
- [16] Taylor E W, Qian M G, Dollinger G D. Anal. Chem., 1998, 70 (16): 3339—3347
- [17] Zeng L, Kassel D B. Anal. Chem., 1998, 70 (20): 4380—4388
- [18] Schultz L, Carr C D, Cameron L M, Bukowski J. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8 (17): 2409—2414
- [19] Weller H N, Young M G, Michalczyk S J, Reitnauer G H, Cooley R S, Rahn P C, Loyd D J, Fiore D, Fischman S J. Mol. Diversity, 1997, 3 (1): 61—70
- [20] Hu J F, Garo E, Yoo H D, Cremin P A, Zeng L, Gering M G, O Neil-Johnson M, Eldridge G R. Phytochem. Anal., 2005, 16 (2): 127—133
- [21] Hu J F, Yoo H D, Williams C T, Garo E, Cremin P A, Zeng L, Vervoot H C, Lee C M, Hart S M, Gering M G, O Neil-Johnson M, Eldridge G R. Planta Med., 2005, 71 (2): 176—180
- [22] Yoo H D, Cremin P A, Zeng L, Garo E, Williams C T, Lee C M, Gering M G, O Neil-Johnson M, Eldridge G R, Hu J F. J. Nat. Prod., 2005, 68 (1): 122—124
- [23] McNally D J, Aubry A J, Hui J P M, Khieu N H, Whitfield D, Ewing C P, Guerry P, Brisson J R, Logan S M, Soo E C. J. Bio. Chem., 2007, 282 (19): 14463—14475
- [24] Szantay C, Beni Z, Balogh G, Gati T. TrAC-Trends Anal. Chem., 2006, 25 (8): 806—820
- [25] Kay W, Petersen B O, Duus J O, Perry M B, Vinogradov E. FEBS J., 2006, 273 (13): 3002—3013
- [26] De Swiet T M. J. Magn. Reson., 2005, 174 (2): 331—334
- [27] Lane A N, Arumugam S. J. Magn. Reson., 2005, 173 (2): 339—343
- [28] Bradley S A, Paschal J, Kulanthaivel P. Magn. Reson. Chem., 2005, 43 (1): 31—35
- [29] Sigvardson K W, Adams S P, Barnes T B, Blom K F, Fortunak J M, Haas M J, Reilly K L, Repta A J, Nemeth G A. J. Pharm. Biomed. Anal., 2002, 27 (1/2): 327—334
- [30] Russell D J, Hadden C E, Martin G E, Gibson A A, Zens A P, Carolan J L. J. Nat. Prod., 2000, 63 (8): 1047—1049

- [31] Bringmann G, Wohlfarth M, Rischer H, Grune M, Schlauer J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39 (8): 1464—1466
- [32] Shockcor J P, Wurm R M, Silver I S, Crouch R C, Martin G E. *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35 (28): 4919—4922
- [33] Coxon B. *Carbohydr. Res.*, 2007, 342 (8): 1044—1054
- [34] Findeisen M, Brand T, Berger S. *Magn. Reson. Chem.*, 2007, 45 (2): 175—178
- [35] Charlton A J, Donarski J A, Jones S A, May B D, Thompson K C. *J. Environ. Monitor.*, 2006, 8 (11): 1106—1110
- [36] Anklin C, Alemany L B. *Magn. Reson. Chem.*, 2006, 44 (3): 230—240
- [37] Pham T N, Kover K E, Jin L, Uhrin D. *J. Magn. Reson.*, 2005, 176 (2): 199—206
- [38] Coxon B. *Carbohydr. Res.*, 2005, 340 (10): 1714—1721
- [39] Losonczi J, Green I. *Am. Lab.*, 2004, 36 (1): 26—26
- [40] Griffin J L, Keun H, Richter C, Moskau D, Rae C, Nicholson J K. *Neurochem. Int.*, 2003, 42 (1): 93—99
- [41] Martin G E, Hadden C E, Russell D J, Kaluzny B D, Guido J E, Duholke W K, Stiemsma B A, Thamann T J, Crouch R C, Blinov K, Elyashberg M, Martirosian E R, Molodtsov S G, Williams A J, Schiff P L. *J. Heterocyclic Chem.*, 2002, 39 (6): 1241—1250
- [42] Rantanen H, Virkki L, Tuomainen P, Kabel M, Schols H, Tenkanen M. *Carbohydr. Polym.*, 2007, 68 (2): 350—359
- [43] Quemener B, Ordaz-Ortiz J J, Saulnier L. *Carbohydr. Res.*, 2006, 341 (11): 1834—1847
- [44] Yamaji N, Dai L, Sugase K, Andriantsiferana M, Nakajima T, Iwashita T. *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271 (19): 3855—3864
- [45] Li J Y, Harper J K, Grant D M, Tombe B O, Bashyal B, Hess W M, Strobel G A. *Phytochemistry*, 2001, 56 (5): 463—468
- [46] Chaurat D C, Durst T, Arnason J T, Sanchez-Vindas P, Roman L S, Poveda L, Keifer P A. *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37 (44): 7875—7878
- [47] Keifer P A, Baltusis L, Rice D M, Tymiak A A, Shoolery J N. *J. Magn. Reson.*, 1996, 119 (1): 65—75
- [48] Manzi A, Salimath P V, Spiro R C, Keifer P A, Freeze H H. *J. Bio. Chem.*, 1995, 270 (16): 9154—9163
- [49] Spraul M, Freund A S, Nast R E, Withers R S, Maas W E, Corcoran O. *Anal. Chem.*, 2003, 75 (6): 1536—1541
- [50] Lewis R J, Bernstein M A, Duncan S J, Sleigh C J. *Magn. Reson. Chem.*, 2005, 43 (9): 783—789
- [51] Corcoran O, Spraul M. *Drug Discovery Today*, 2003, 8 (14): 624—631
- [52] Corcoran O, Spraul M, Hofmann M, Ismail I M, Lindon J C, Nicholson J K. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 16 (3): 481—489
- [53] Sidelmann U G, Braumann U, Hofmann M, Spraul M, Lindon J C, Nicholson J K, Hansen S H. *Anal. Chem.*, 1997, 69 (4): 607—612
- [54] Olson D L, Norcross J A, O'Neil-Johnson M, Molitor P F, Detlefsen D J, Wilson A G, Peck T L. *Anal. Chem.*, 2004, 76 (10): 2966—2974
- [55] Olson D L, Lacey M E, Sweedler J V. *Anal. Chem.*, 1998, 70 (3): 645—650
- [56] Olson D L, Peck T L, Webb A G, Magin R L, Sweedler J V. *Science*, 1995, 270 (5244): 1967—1970
- [57] Lambert M, Wolfender J L, Staerk D, Christensen B, Hostettmann K, Jaroszewski J W. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (2): 727—735
- [58] Wolfender J L, Queiroz E F, Hostettmann K. *Magn. Reson. Chem.*, 2005, 43 (9): 697—709
- [59] Jaroszewski J W. *Planta Med.*, 2005, 71 (9): 795—802
- [60] Schroeder F C, Gronquist M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45 (43): 7122—7131
- [61] Kautz R A, Getzinger W K, Karger B L. *J. Comb. Chem.*, 2005, 7 (1): 14—20
- [62] Jansma A, Chuan T, Albrecht R W, Olson D L, Peck T L, Geierstanger B H. *Anal. Chem.*, 2005, 77 (19): 6509—6515
- [63] Hout D I, Richards R E. *J. Magn. Reson.*, 1976, 24: 71—85
- [64] Peti W, Norcross J, Eldridge G R, O'Neil-Johnson M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126 (18): 5873—5878
- [65] Krishnan V V. *J. Magn. Reson.*, 2006, 179 (2): 294—298
- [66] Hu J F, Caro E, Hough G W, Gering M G, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48 (33): 5747—5749
- [67] Hu J F, Caro E, Hough G W, Gering M G, Yoo H D, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *J. Chem. Res.*, 2007, (5): 296—297
- [68] Caro E, Hu J F, Gering M G, Hough G W, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *J. Nat. Prod.*, 2007, 70 (6): 968—973
- [69] Hu J F, Patel R, Li B, Caro E, Hough G W, Gering M G, Yoo H D, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *J. Nat. Prod.*, 2007, 70 (4): 604—607
- [70] Hu J F, Caro E, Hough G W, Gering M G, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69 (4): 585—590
- [71] Hu J F, Caro E, Gering M G, Pasmore M, Yoo H D, Esser T, Sestrich J, Cremin P A, Hough G W, Perrone P, Lee Y S L, Le N T, O'Neil-Johnson M, Costerton J W, Eldridge G R. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69 (1): 118—120
- [72] Hu J F, Caro E, Yoo H D, Cremin P A, Gering M G, O'Neil-Johnson M, Eldridge G R. *Phytochemistry*, 2005, 66 (9): 1077—1082
- [73] Jiang N, Ou Yang K Q, Cai S X, Hu Y H, Xu Z L. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005, 26 (10): 1181—1186
- [74] Fang L Y, Zhang M C, Li C X, Dong S Z, Hu Y H. *Neurosci. Lett.*, 2006, 404 (1/2): 148—153
- [75] Zheng X X, Hu Y H, Liu J H, Ou Yang K Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15 (20): 4531—4535
- [76] Li X C, Hu Y H. *Brain Res. Bull.*, 2005, 66 (2): 99—105
- [77] Wu P, Hu Y H. *Curr. Genomics*, 2006, 7 (5): 293—300
- [78] Dong S Z, Li C X, Wu P, Tsien J Z, Hu Y H. *Eur. J. Neurosci.*, 2007, 26 (1): 101—112
- [79] Niu W Z, Jiang N, Hu Y H. *Anal. Biochem.*, 2007, 362 (1): 126—135
- [80] Li X C, Yang Q X, Hu Y H. *Neurosci. Lett.*, 2006, 392 (1/2): 145—149