

现代色谱技术在天然产物研究中的应用

王媛媛¹, 吕兆林^{2*}

(1. 山西工商学院旅游与酒店管理学院, 太原 030000; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 天然产物来源广泛、种类繁多、结构复杂且多数未知。随着人们对天然产物认识的深入以及仪器分析检测技术的进步, 天然产物的开发与利用日益受到重视。近年来发展的新型色谱模式、色谱-质谱联用、谱效关联等现代色谱技术不但促进了天然产物的分离检测与纯化制备, 同时推动了天然产物活性物质的阐明, 加快了天然产物研究的步伐。基于上述现代色谱技术, 本文结合文献主要从分析检测、分离制备、活性筛选这3个层面综述其在天然产物活性物质研究方面的应用, 以期为进一步发展色谱技术在天然产物的开发与利用中提供一定的参考依据, 希望通过本文的研究可以促进色谱技术在天然产物活性成分提取与纯化领域的快速发展。

关键词: 色谱技术; 天然产物; 制备; 活性筛选

Application of modern chromatography technology in natural products research

WANG Yuan-Yuan¹, LV Zhao-Lin^{2*}

(1. School of Tourism and Hotel Management, Shanxi Technology and Business College, Taiyuan 030000, China;
2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: The natural products have a wide range of sources, various kinds, complex structures and most of them are unknown. With the deepening of people's understanding of natural products and the progress of instrumental analysis and detection technology, the development and utilization of natural products have been paid more and more attention. In recent years, the development of modern chromatographic technologies, such as new chromatographic mode, chromatography-mass spectrometry, chromatographic-effect correlation, not only promote the separation, detection, purification and preparation of natural products, but also promote the elucidation of active substances in natural products, and accelerate the pace of natural products research. Based on the above modern chromatographic technologies, this paper reviewed their application in the research of active substances in natural products from 3 aspects of detection, preparation and screening methods, so as to provide some reference for the further development of chromatographic technology in the development and utilization of natural products, and in order to promote the rapid development of chromatography technology in the field of extraction and purification of active components from natural products.

KEY WORDS: chromatographic technology; natural products; preparation; activity screening

基金项目: 水利部财政项目(2020HXKFSWXY001)

Fund: Supported by the Financial Projects of Ministry of Water Resources (2020HXKFSWXY001)

*通信作者: 吕兆林, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn

*Corresponding author: LV Zhao-Lin, Ph.D, Associate Professor, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, No.35, Qinghua East Road, Haidian District, Beijing 100083, China. E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn

0 引言

所谓天然产物,系动植物提取物或微生物、海洋生物与昆虫体内的构成物质或其代谢物质。天然产物存在很多类型,同时大部分未知,在结构、属性上皆有所区别,且在生物活性方面存在多样化表现^[1-2]。随着人们对天然产物认识的深入研究以及化学分离方法与仪器分析检测技术的进步,不断有新的活性天然产物被发现。随之可滋生若干问题,包括天然产物成分分析不全面;各成分和活性间的关联度不够;痕量成分测定难度高;成分分离-活性评估的整合还处在摸索阶段;痕量成分和极性成分制备难度高;制备研究以及代谢产物分析皆缺乏深度等。所以,为了使以上问题得到更为有效的处理,近年来研究出深度分析测定技术,使得色谱分离效能与测定速度有所提升;质谱测定与数据解析方法等也有所改进,由此能够做到对天然产物化学成分的全面解析;新型色谱制备技术(诸如微量成分富集制备等)的发展,提升制备效率与规模,攻克了代谢产物与微量成分制备难点;另外,出现了包括谱效关联技术、细胞膜色谱、亲和色谱等在内的用于成分-活性整合探究的方法。基于上述现代色谱技术,加快了天然产物研究的步伐。本文结合文献主要从分析检测、分离制备及活性筛选 3 个层面综述其在研究天然产物活性物质中的应用,以期为进一步发展色谱技术在天然产物的开发与利用中提供一定的参考依据。

1 基于现代色谱技术的天然产物成分检测及鉴定

1.1 低粒径色谱填料提升天然产物检测效率

在色谱仪器中,色谱柱扮演着“心脏”作用。通常而言,色谱柱填料的粒径愈小,柱分离的效果愈佳。超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)属于一类快速分离技术,此项技术的发展基础为传统高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)的基本理论和原理。对于 HPLC、UPLC,在色谱柱填料颗粒大小上,后者更小,在溶剂用量上,后者更少,后者分析的通量、色谱峰容量、灵敏度、测定速度皆有所提升。目前 UPLC 已广泛应用于天然产物的定性定量分析中。支红峰等^[3]利用 UPLC 能够在 9 min 内将绿茶中茶氨酸、生物碱、儿茶素类等 10 种化合物准确定量检出,比 HPLC 快速,可靠,分离效果好。任伟光等^[4]也借助 UPLC 研发出一种于 9 min 内可对大黄所含的 8 种蒽醌类成分(包括大黄酚、大黄酸与大黄素等)进行同时测定的技术,此项技术存在良好的线性相关性,在控制大黄天然产物质量方面起到借鉴作用。

1.2 新型色谱模式拓宽天然产物检测范围

近年来,有许多具有不同键合官能团的色谱填料,例如亲水作用色谱填料、立体保护键合色谱填料、尺寸排阻色谱填料、手性分子色谱填料及其聚合物基质色谱柱等^[5]。在填充材料的发展趋势下,色谱柱的选择性大大提高了,并且更多地考虑了分离天然产物的复杂成分。基于此,超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC)与亲水作用色谱(hydrophilic-interaction chromatography, HILIC)等新一代色谱技术的发展使得天然产物测定范围得到显著扩大。

HILIC 的固定相为极性化学物质,流动相则为水与溶剂。HILIC 色谱填料固定相的表面层充满了对水具有很好亲和力的强极性官能团(如羟基和酰胺),消除了正相色谱法对强极性组分的溶解性差以及反相色谱法不保留强极性组分的缺点^[6-8]。对于天然产物所含亲水性与强极性化学物质的分离测定, HILIC 适用性更佳。张铭雅等^[9]建立了一种快速灵敏稳定的亲水作用色谱法串联质谱(hydrophilic action chromatography tandem mass spectrometry, HILIC-MS/MS)方法,从蛹虫草中检测出了虫草素、虫草酸(D 甘露糖醇)、腺苷和肌苷并对其含量进行测定,整个色谱的运行时间约 8 min,且腺苷、肌苷的灵敏度可以达到 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外, HILIC 色谱还可应用于天然产物中黄酮类、核苷酸类、酚酸类等的检测分析^[10]。

SFC 的流动相为超临界流体(CO_2),固定相为诸如硅胶此类固体吸附剂,或者键合至诸如毛细管壁等载体上的高聚物^[11]。此项技术流动相速度以及分离效率皆存在较高表现,兼具液相色谱法(liquid chromatography, LC)和气相色谱法(gas chromatography, GC)两者优势,具备环保性能及广泛适用性,除了对低、中等极性化合物分离具有适用性,在分离立体选择性化合物方面也具备适用性^[12-13]。如 ZHAO 等^[14]采用 SFC 技术有效分离了经 HPLC 难以分离的 6 对螺甾皂苷 25R/S 异构体混合物,并且采用串联后 400 mm 长的 CHIRALPAK IC 手性色谱柱,甲醇为改性剂,对胡芦巴中 3 对 25R/S 异构体进行分离制备,得到了纯度大于 99%的单一螺甾皂苷。

1.3 二维色谱增强天然产物组分检测能力

天然产物化学组成复杂、种类多样,结构特征也大不相同。通过传统的一维色谱分离技术获得的色谱峰重叠比较严重,并且长期以来一直无法提供足够的分辨率^[15]。二维色谱所指为经由切换设备有效串联不同分离机制且互相独立的 2 根色谱柱进而建立的分离系统,此系统的分辨率为各一维模式分辨率平方相加值的平方根,其峰容量则为各一维模式峰容量相乘值,如此二维色谱的峰容量与分辨率大幅提升,从而可用来分离测定天然产物复杂样品体系^[16]。

全二维气相色谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography, GC×GC)和全二维液相色谱(comprehensive two-dimensional liquid chromatography, LC×LC)是目前二维色谱中相对较为成熟的应用模式,已大量推行于天然产物分离测定方面^[17-18]。诸如学者沈正超等^[19]借助全二维色谱自松针挥发油中检出了 271 种组分(一维色谱仅检出 62 种组分),分离了经一维色谱无法分离的 3 种分子式同为 C₁₅H₂₄的倍半萜,展现了全二维色谱在峰容量和对异构体分析方面的独特优势。YAO 等^[20]采用基于 Poroshell SB C₁₈ 柱和 Zorbax SB-Aq 柱结合的多中心切割二维色谱分离并准确定量了经一维色谱难以完全分离的且结构极为相似的人参皂苷类化合物。JIAO 等^[21]先借助 XAmide 固相萃取柱,完成对苦马豆的粗制样品所含黄酮类物质的富集,接着经由第一维液相,完成 15 种高黄酮类成分含量的目标部分的有效分离,再进一步经由第二维液相来分离制备其中的 3 个目标部分,获得 8 个黄酮苷,同时纯度皆在 97% 以上。

此外,二维色谱分离技术联合各类新型质谱技术应用,可使分离与鉴定天然产物复杂体系能力显著提升。WU 等^[22]利用全二维气相色谱-质谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry, GC×GC-TOF/MS)技术从黄角、杏仁、沙枣和芍药 4 种植物物种籽油中分别鉴定出 19、15、17 和 17 种脂肪酸组分,C18:1、C18:2、C16:0 和 C18:0 是其主要脂肪酸,黄角油的饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA):单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA):多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)比例最接近 1:1:1,说明其营养分布最均衡。WU 等^[23]利用 GC×GC-TOF/MS 技术从新鲜玫瑰精油中检测出 140 种化合物,比 GC/MS 多检测出 70 种化合物,其中 GC×GC-TOF/MS 检测出了 GC/MS 检测不到的酸性成分,酯类成分也由 4 种增加到 20 种。通过 2 种技术对比证明全二维色谱分离能力强、检出限低、灵敏度高。

1.4 质谱数据的深度解析促进天然产物组分的辨识

质谱(mass spectrometry, MS)的工作原理为测定离子荷质比。在被检样品经由离子源时,各组分被电离成不同质荷比(m/z)的带电离子,后经过加速电场加速,产生的离子束进入质量检测器,在检测器中利用电场和磁场相互作用,导致其以反向速率色散,双方可分别聚焦得到质谱图,进而对其质量作出有效分析^[24]。目前已有多种类型质谱被用来分析气态离子质荷比,常见的有基于离子飞行速度和飞行距离进行分离的飞行时间质谱(TOF-MS),通过电势场进行传输的四极杆质谱(Q-MS)和磁场或电场周期性运动的离子阱质谱(ion trap mass spectrometry, IT-MS)^[25]。为获取更高分辨力、准确性、灵敏度和更快的分析速度等优质性能,分析技术由单一质量分析器快速向混合质量分析

器发展,出现了不同类型质谱组合与色谱联用的现代分析技术。一般将色谱当作 MS 理想的“进样器”,后者则是前者理想的“检测器”,不但可释放色谱技术高效的分离作用,同时兼具质谱特异的鉴定作用,对辨识天然组分有所帮助。Q-TOF、IT-TOF 串联质谱技术在获取准分子离子峰的基础上,进一步得到蕴含丰富结构信息的碎片离子峰,从而对结构进行快速、准确的鉴定^[26]。如 LV 等^[27]首次应用高效液相色谱电喷雾电离源,结合混合离子阱和高分辨率飞行时间质谱(liquid chromatography electrospray ionization source in combination with hybrid ion trap and high-resolution time-of-flight mass spectrometry, LC-ESI-IT-TOF/MS)技术,以绿竹叶为模型材料,鉴定出 13 种黄酮类成分,方法线性拟合良好,显著提高了黄酮类成分鉴定的效率与灵敏度,为快速有效地确定竹叶中黄酮类化合物的结构提供了一种新的策略。韩雪等^[28]利用二极管阵列-高效液相色谱-电喷雾离子阱飞行时间串联多级质谱仪(high performance liquid chromatography-electric spray four pole flight time series multipolar mass spectrometer, HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSⁿ)并结合紫外可见光谱及多级质谱数据对蓝莓果实花青素的种类及结构进行分析,结果显示,6 类蓝莓内所鉴定的花青素类化合物合计 13 类,其中苷元分别为锦葵色素、花翠素、矢车菊素、牵牛花色素、芍药素,且 6 种蓝莓均可检测到带糖配基的锦葵色素-3-O-半乳糖、不连接糖苷的花翠素及矢车菊素。

2 基于现代色谱技术的天然产物成分分离与制备

现代色谱技术对于天然产物中各组分的检测与鉴定已经相当成熟,但是如何将这些组分分离制备出来,也是研究者们一直在探索的问题。包括制备型高效液相色谱法(preparative high performance liquid chromatography, P-HPLC)、高效逆流色谱法(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)、模拟流动床色谱法(simulated moving bed chromatography, SMBC)等在内的现代制备色谱技术,在分离、制备天然产物活性成分方面发挥着关键性作用^[29-30]。

2.1 制备型高效液相色谱促进天然产物分离纯化

P-HPLC 也叫高压液相色谱,是目前比较成熟且应用广泛的一种分离纯化技术。采用更细粒径填料制备高柱效色谱柱,通过对色谱柱加压提升色谱分离纯化效率,提高目标化合物产率,产品分离量可达克数量级以上^[30]。LIU 等^[31]采用苯基-己基柱制备高效液相色谱法,从亚麻籽油中快速分离出 12 个山梨醇,纯度均在 95.5%以上。李钰景等^[32]采用中压液相色谱反相 C₁₈柱系统和 P-HPLC 从红毛丹果皮多酚制取物分离纯化得到纯度 95.63%、产率 6.00%的老鹳草素。此外,研究中多将 P-HPLC 与其他色谱技术

如 HSCCC 联用达到目标化合物的高效分离及批量制备。张拓等^[33]建立了一种 HSCCC 结合 P-HPLC 分离纯化高纯度花色苷的方法, 先采用乙酸乙酯-正丁醇-乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液(8:35:13:60, *V:V:V:V*)为溶剂体系的 HSCCC 方法获得纯度 43.64%、得率 160.59 mg/g 的总花色苷, 再结合 P-HPLC(色谱条件为 C_{18} 制备柱、波长 280 nm、柱温 30 °C、流动相 1%醋酸水溶液-乙腈、流速 5 mL/min、进样量 1 mL)分离出 5 种花色苷组分, 纯度最高达 90.61%。

2.2 高速逆流色谱增强天然产物分离制备

HSCCC 属于新一代液-液分配色谱分离法, 其存在以下特点: 广泛的应用性、高回收率、易于操作。此项技术的工作原理主要为样品于缺乏相溶性的两相溶剂体系内高效混合与分离的行为^[34]。相较其他色谱分离法, 其最为明显的不同为, HSCCC 的固定相非固态载体, 如此能够避免因不可逆吸附导致样品损失以及受到表面化学因素影响被分析物发生变性等, 这就使得样品可以完全回收, 特别适于天然产物中微量级成分的分离制备。WU 等^[35]以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(7:3:8:2, *V:V:V:V*)为溶剂系统, 成功从山苍子中提取了对甲氧桂皮酸乙酯和肉桂酸乙酯, 两者纯度分别为 98.4%和 98.1%, 有效解决了由于常规分离技术中精力、溶剂消耗大, 样品、对照品损失多的问题。李媛媛等^[36]建立以乙腈-正丁醇-甲基叔丁基醚-水-三氟乙酸(1:40:1:50:0.01, *V:V:V:V:V*)为溶剂体系的 HSCCC 方法, 攻克了传统柱色谱上多聚体和花色苷不易分离难题, 能够自红葡萄皮内有效分离出较高纯度的飞燕草色素-3-O-葡萄糖苷、锦葵色素-3-O-葡萄糖苷和芍药色素-3-O-葡萄糖苷, 其中芍药色素-3-O-葡萄糖苷为首次分离得到。刘德明等^[37]采用 HSCCC 技术以黄柏粗提物中的生物碱在两相溶剂系统中的分配系数为依据, 筛选出最佳溶剂体系石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5:1:2:4, *V:V:V:V*), 并从 50.70 mg 黄柏粗提物中分离得到小檗碱 22.10 mg、黄柏碱 15.42 mg、巴马丁 0.80 mg 和白瓜蒌碱 0.20 mg, 纯度均可达 96%以上。

2.3 模拟流动床色谱扩大天然产物产量

SMBC 属于新一代连续分配色谱分离技术, 主要特点是操作连续化、流动相耗量少、产率高, 适合于连续性大规模生产, 且常用于天然手性成分的分离制备^[38]。其工作原理是模拟流动相和固定相的逆向流动, 在色谱柱中迁移速率大的弱吸附组分随着流动相向前移动, 而迁移速率小的强吸附组分则跟随着固定相的模拟逆流往后运动, 从而达到将两者分开的效果^[39]。实际生产中, 常将固定相填充于若干根首尾相接的色谱柱中, 定期沿流动相方向将各物料进/出口移动到下一根柱子的进/出口, 以适应多组分的分离。李长龙等^[40]建立了基于大孔吸附树脂的模拟移动床色谱法分离桑叶黄酮, 在上样流速 0.6 mL/min、洗脱流速 1.2 mL/min、转换周期 200 s 的条件下制备得到产量为

141.12 mg/(BV·h)的桑叶黄酮。WEN 等^[41]采用 SMBC 分离纯化黑莓中花青素, 纯度达 85%。并采用 HPLC 和 UPLC-QTOF-MS 对花青素提取物进行鉴定, 花青素 3-O-半乳糖苷和 3-O-阿拉伯糖苷为主要花青素, 纯化后的花青素比粗提物具有更高的清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力。

3 活性天然成分的色谱筛选

3.1 活性为导向促进活性天然成分筛选

天然产物内含复杂的化学成分, 可呈现生物活性的成分或为主要成分, 或为小部分微量成分。对于微量活性成分相关的技术难题, 包括不易识别、不易提取、不易评价等, 研究者们^[42-43]以活性为导向, 结合色谱与活性筛选等方法, 创建了导向分离制备目标成分及活性成分策略的新技术体系, 达到了天然活性物质的高效识别、快速锁定和定向获取, 从而提高了工作效率并解决了由系统分离时已知组分和其他残留物造成的干扰问题, 避免了大量重复性的分离工作。ZHOU 等^[43]利用 DPPH 和传统显色剂显色的薄层色谱-生物自显影法从菝葜中导向分离出 4 个抗氧化活性成分。WANG 等^[44]先借助超滤质谱筛选法自黄芩提取物内筛选、鉴定出 11 类 α -葡萄糖苷酶抑制剂(glucosidase inhibitor, AGI), 并以此为导向, 联合使用 HSCCC 和快速制备色谱方法分离得到 6 种 α -AGI。LIU 等^[45]建立了一种高效液相色谱-质谱-固相萃取-核磁共振(high performance liquid chromatography-mass spectrometry-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance, HPLC-MS-SPE-NMR)联用方法, 并从杜鹃花中导向地分离出 4 个微量三萜类化合物、3 个新的重排三萜类化合物 rhodoterpenoid A-C 以及 1 个新生物合成途径的化合物 rhodoterpenoid D。

3.2 亲和色谱加快活性天然成分筛选

亲和色谱(affinity chromatography, AC)此项技术的作用原理为依托固定相的结合性能实现分子的分离^[46]。此项技术的应用, 可使特异性结合潜在天然活性物质(即配体)的物质(诸如 DNA、受体、蛋白或酶)固定于色谱填料上, 制备色谱柱, 然后进行 HPLC 分析, 能与固定相产生特异结合的物质将在色谱柱上发生保留行为, 可以根据反应前后样品的 HPLC 指纹图谱的变化来确定活性成分的信息。这样天然产物就可不经过分离过程, 而是直接在相应的亲和色谱上完成筛选工作。此外, 亲和色谱还可与各种检测器[如紫外、质谱、核磁共振(magnetic resonance imaging, NMR)]联用, 实现在线筛选并鉴定天然产物活性成分。如 WANG 等^[47]将存在环氧反应基团结构的甲基丙烯酸酯基当乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)此固定目标靶酶的载体, 联合液质应用, 建立一个在线配体垂钧平台, 自延胡索提取物内筛选得到 8 个可亲和 AChE 的化合物。

DENG 等^[48]将 α -葡萄糖苷酶(glucosidase, AGH)当做靶酶, 完成了固定化 AGH 亲和材料的制备, 其联合 UPLC-MS 应用, 完成了兼具“成分分离”“活性筛选”“结构鉴定”功能的 AGHI 平台的构建, 同时经由亲和捕获, 有效筛选得到绿茶所含的 ECG、GCG 与 EGCG 这 3 个强 AGH 抑制剂, 而 EC、EGC 与 GA 这 3 个阴性分子在绿茶内的水平虽然较高, 但其亲和 AGH 酶能力较弱, 故没有被筛选出来。

3.3 谱效关联提高活性天然成分筛选整体性

随着对天然产物成分的分离鉴定的深入研究中, 发现很多成分具有抗氧化、降脂、抗癌等生物活性, 且我国中药研究多集中在对天然产物活性物质的不断挖掘中。然而天然产物具备协调整合效能、弱效应、多成分特征, 其整体活性的释放并非单一成分活性的简单相加。因此不能一味的关注于对天然产物生物活性单组分的高通量筛选, 更重要的是要对天然产物的整体活性评价进行研究。

谱效关联是指将指纹图谱和药效学数据的紧密结合, 以及运用数理统计学知识来分析天然产物的化学成分与其各成分活效的相关性, 阐释天然产物组分与生物活性之间的关系, 提高天然产物的质量评价标准^[49-50]。SHI 等^[51]基于金银花和山银花的 UPLC 指纹图谱以及微量热测量法对抗菌效果进行了评价, 经过谱效相关评估, 结果显示绿原酸和 3,4-二咖啡酰奎尼酸是金银花和山银花中的主要抗菌化合物。段小菊^[52]借助化学计量学手段, 分别构建出以 HPLC、近红外光谱这 2 类指纹图谱同抗氧化活性间为基

础的白花丹参谱效关系模型, 促进了白花丹参抗氧化活性成分的高通量筛选。毛超一^[53]通过 HPLC 指纹图谱与多成分含量分析并结合化学模式识别法, 从 13 种指标性成分中筛选出适宜作为菊花质量评价的代表性指标成分。然后采用体外细胞炎症模型及统计学方法进行成分-药效关联性分析, 进一步采用一测多评结合外标法, 运用加和控制总量的计量方法确定了 6 个质控指标成分(3-CQA、Lut-7-O-G、3,5-DCQA、4,5-DCQA、Lut-7-O- β -G、1,5-DCQA), 增强了菊花质量控制的代表性和整体性, 成功建立了一种新的菊花质量控制方法。天然产物谱效关联研究的一般路径见图 1。

4 结束语

由于天然产物很多是未知、新发现的成分, 当前的质谱数据信息和裂解规律都非常分散, 难以整合应用, 因此有必要建立天然产物的质谱标准数据库, 借助 MS 数据库检索法来定性分析天然产物的未知成分, 用谱图匹配度来衡量相似性, 从而快速地筛选、鉴定以及靶向分离天然产物。其次对天然产物活性成分的分离制备是发展趋势, 但是在繁杂的多步色谱分离和纯化过程中, 会导致活性成分失活性, 最终得不到目标单体成分, 因此有必要建立一种天然产物复杂体系中微量不稳定的活性成分的分离制备方法。故结合色谱高效分离法与药理筛选, 由此进行高选择性、高效性、高速性识别分析天然产物活性成分技术的构建具备必要性。

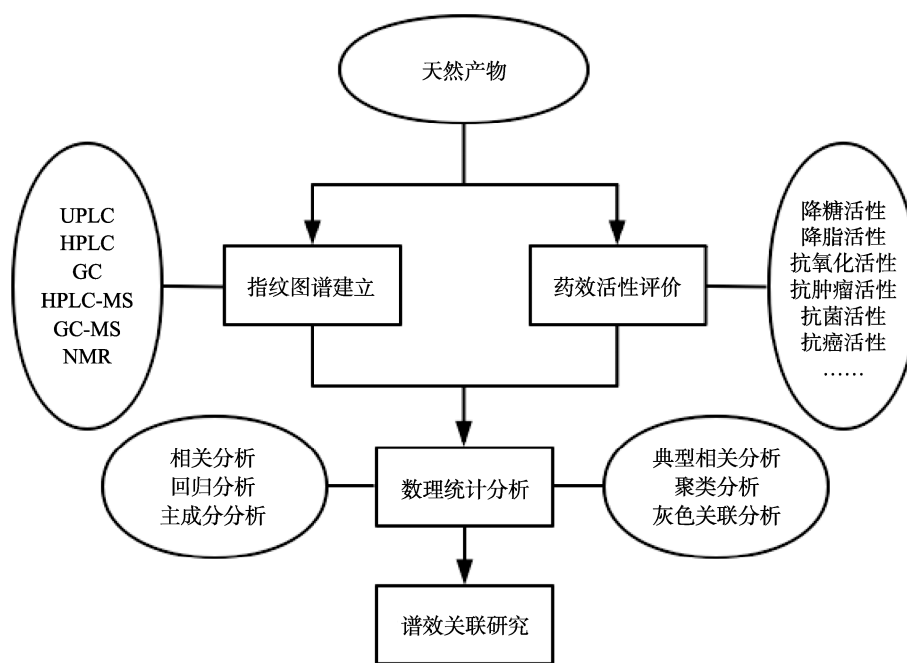


图 1 天然产物谱效关联研究的一般路径

Fig.1 General research content of natural products spectrum-effect relationship

参考文献

- [1] 章怀云, 刘俊, 毛绍名, 等. 天然产物活性成分提取分离研究进展[J]. 经济林研究, 2017, 35(3): 244-250.
ZHANG HY, LIU J, MAO SM, *et al.* Advances in researches on extraction and separation of active constituents from natural products [J]. Nonwood Forest Res, 2017, 35(3): 244-250.
- [2] MA L, ZHANG MM, ZHAO H, *et al.* Plant natural products: Promising resources for cancer chemoprevention [J]. Molecules, 2021, 26(4): 933-933.
- [3] 支红峰, 杨璐, 胡中豪, 等. 超高效液相色谱同时测定绿茶中 10 种活性物质[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 306-309.
ZHI HF, YANG L, HU ZH, *et al.* Simultaneous determination of 10 active substances in green tea using ultra high performance liquid chromatography [J]. Food Ind, 2019, 40(2): 306-309.
- [4] 任伟光, 王冬梅, 黄林芳. UPLC 法同时测定大黄中 8 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1565-1570.
REN WG, WANG DM, HUANG LF. Simultaneous determination of 8 components in Radix at Rhizoma Rhei by UPLC method [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(9): 1565-1570.
- [5] 刘洁, 肖红斌. 基于色谱技术的中药药效物质研究进展[J]. 药学报, 2019, 54(1): 73-81.
LIU J, XIAO HB. Research progress on pharmacodynamic substances of Chinese medicine based on chromatographic techniques [J]. Acta Pharm Sin, 2019, 54(1): 73-81.
- [6] BUSZEWSKI B, NOGA S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-A powerful separation technique [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402: 231-247.
- [7] 周鹏, 王征, 高希, 等. 亲水作用色谱-质谱联用法测定茶叶中 5 种游离糖[J]. 分析实验室, 2020, 39(11): 1322-1327.
ZHOU P, WANG Z, GAO X, *et al.* Determination of 5 free saccharides in teas by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(11): 1322-1327.
- [8] KARTSOVA LA, BESSONOVA EA, SOMOVA VD. Hydrophilic interaction chromatography [J]. J Anal Chem, 2019, 74(5): 415-424.
- [9] 张铭雅, 朱志铭, 姚迪, 等. HILIC-MS/MS 技术同时检测蛹虫草中虫草素、虫草酸、腺苷和肌苷含量的方法学[J]. 生物加工过程, 2019, 17(4): 430-436.
ZHANG MY, ZHU ZM, YAO D, *et al.* Simultaneous detection of cordycepin, D-mannitol, adenosine and inosine in cordyceps militaris by HILIC-MS /MS [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2019, 17(4): 430-436.
- [10] 东莎莎. 亲水色谱质谱联用技术在天然产物中的分析方法和应用研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2013.
DONG SS. The application of hydrophilic interaction chromatography and mass specyrometry in natural products [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2013.
- [11] 朱玲玲, 赵阳, 孙欣光, 等. 超临界流体色谱在天然产物分离分析中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1317-1323.
ZHU LL, ZHAO Y, SUN XG, *et al.* Application of supercritical fluid chromatography in natural products [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(8): 1317-1323.
- [12] WEST C. Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography [J]. Trends Anal Chem, 2019, 120. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115648
- [13] 滕桂平, 陈可可, 余德顺, 等. 超临界流体色谱及分析应用研究进展[J]. 现代化工, 2019, 39(6): 224-227, 229.
TENG GP, CHEN KK, YU DS, *et al.* Research progress on supercritical fluid chromatography and its application in analysis [J]. Mod Chem Ind, 2019, 39(6): 224-227, 229.
- [14] ZHAO Y, MCCAULEY J, PANG X, *et al.* Analytical and semipreparative separation of 25 (R/S)-spirostanol saponin diastereomers using supercritical fluid chromatography [J]. J Sep Sci, 2013, 36: 3270-3276.
- [15] 荆磊磊, 刘春波, 张凤梅, 等. 二维色谱分析技术及其在烟草行业中的应用[J]. 江西农业学报, 2016, 28(4): 57-60, 65.
JING LL, LIU CB, ZHANG FM, *et al.* Two-dimensional chromatography and its application in tobacco industry [J]. Acta Agric Jiangxi, 2016, 28(4): 57-60, 65.
- [16] 刘朝霞, 周亚楠, 何兰, 等. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(12): 941-946.
LIU ZX, ZHOU YN, HE L, *et al.* Application of two dimensional liquid chromatography in drug analysis [J]. Chin Pharm J, 2019, 54(12): 941-946.
- [17] 朱洁. 二维液相色谱技术在食品分析中的应用[J]. 现代食品, 2020, (13): 92-93, 112.
ZHU J. Two-dimensional liquid chromatography and its application in food industry [J]. Mod Food, 2020, (13): 92-93, 112.
- [18] GUO RZ, LIU XG, GAO W, *et al.* A strategy for screening antioxidants in ginkgo biloba extract by comprehensive two-dimensional ultra high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2015, 1422: 147-154.
- [19] 沈正超, 孙堂强, 胡雅静, 等. 全二维气相色谱/飞行时间质谱对赤松松针挥发油化学成分的分析[J]. 分析测试学报, 2018, 37(5): 532-538.
SHEN ZC, SUN TQ, HU YJ, *et al.* Analysis on chemical composition of volatile oils in red pine needles by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2018, 37(5): 532-538.
- [20] YAO CL, YANG WZ, WU WY, *et al.* Simultaneous quantitation of five panax notoginseng saponins by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography: Method development and application to the quality control of eight notoginseng containing chin patent med [J]. J Chromatogr A, 2015, 1402: 71-81.
- [21] JIAO LJ, TAO YD, WANG WD, *et al.* Preparative isolation of flavonoid glycosides from sphaerophysa salsula using hydrophilic interaction solid-phase extraction coupled with two-dimensional preparative liquid chromatography [J]. J Sep Sci, 2017, 40: 3808-3816.
- [22] WU Y, YUAN WQ, HAN X, *et al.* Integrated analysis of fatty acid, sterol and tocopherol components of seedoils obtained from four varieties of industrial and environmental protectioncrops [J]. Ind Crops Prod, 2020, 154: 112655.
- [23] WU Y, HAN X, YUAN WQ, *et al.* Salt intervention for the diversities of essential oil composition, aroma and antioxidant activities of Kushui rose (*R. setate*×*R. rugosa*) [J]. Ind Crops Prod, 2020, 150: 112417.
- [24] 胡杨. 川芎化学成分分离提取及结构鉴定研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2013.
HU Y. Study on the separation, extraction and structural identification of the chemical composition from *Ligusticum chuanxiang* Hort [D]. Changchun: Changchun Normal University, 2013.

- [25] 金力超, 范玉明, 侯晓蓉, 等. 色谱联用技术在药物分析中的应用特点和新趋势[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1520-1527.
JIN LC, FAN YM, HOU XR, *et al.* Application and tendency of chromatographic hyphenated techniques in pharmaceutical analysis [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(9): 1520-1527.
- [26] 张加余, 乔延江, 张倩, 等. 液质联用技术在天然产物结构鉴定中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 349-354.
ZHANG JY, QIAO YJ, ZHANG Q, *et al.* Progress on application of LC-MS technology in structural identification of the natural products [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(2): 349-354.
- [27] LV ZL, DONG J, ZHANG BL. Rapid identification and detection of flavonoid compounds from bamboo leaves by LC-(ESI)-IT-TOF/MS [J]. Bio Res, 2011, 7(2): 1405-1418.
- [28] 韩雪, 袁玮琼, 武艺, 等. 利用 HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSⁿ 分析不同品种蓝莓果实的花青素结构[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 210-216, 223.
HAN X, YUAN WQ, WU Y, *et al.* Analysis of anthocyanin structure of different varieties of blueberry fruits by HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSⁿ [J]. Food Ind Sci Technol, 2020, 41(8): 210-216, 223.
- [29] 夏雅俊, 闫维国. 制备色谱技术分离纯化天然产物中多酚类化合物的研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(18): 35-40.
XIA YJ, YAN WG. Progress in separation and purification of polyphenols from natural products by preparative chromatography [J]. Shandong Chem Ind, 2020, 49(18): 35-40.
- [30] 吴希, 邓勤, 徐志勇, 等. 制备型高效液相色谱在天然产物分离中的应用[J]. 化学分析计量, 2017, 26(1): 113-117, 122.
WU X, DENG Q, XU ZY, *et al.* Application of preparative high performance liquid chromatography in separation of natural product [J]. Chem Anal Meterage, 2017, 26(1): 113-117, 122.
- [31] LIU X, CAI ZZ, LEE WJ, *et al.* A practical and fast isolation of 12 cyclolinopeptides (linusorbs) from flaxseed oil via preparative HPLC with phenyl-hexyl column [J]. Food Chem, 2021, 351. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129318
- [32] 李钰景, 孙丽平, 庄永亮. 红毛丹果皮中老鹳草素的分离纯化及其热稳定性[J/OL]. 食品科学, 1-9. [2021-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20201120.1351.014.html>.
LI JY, SUN LP, ZHUANG YL. Study on the purification of geraniin from rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels and its thermal stability [J/OL]. Food Sci, 1-9. [2021-03-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20201120.1351.014.html>.
- [33] 张拓, 刘林峰, 林玲, 等. 高速逆流色谱结合半制备型液相色谱分离茶树紫芽花色苷研究[J]. 茶叶通讯, 2019, 46(2): 192-200.
ZHANG T, LIU LF, LIN L, *et al.* Study on the separation of anthocyanins in purple bud tea by high-speed counter-current chromatography coupled with semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. J Tea Commun, 2019, 46(2): 192-200.
- [34] 施敏. 近年国内高速逆流色谱分离天然产物的应用[J]. 云南化工, 2019, 46(8): 113-116.
SHI M. Application of high speed countercurrent chromatography in separation of natural products in China in recent years [J]. Yunnan Chem Technol, 2019, 46(8): 113-116.
- [35] WU JW, GE FH, WANG DM, *et al.* Combination of supercritical fluid extraction with high-speed countercurrent chromatography for extraction and isolation of ethyl p-methoxy- cinnamate and ethyl cinnamate from *Kaempferia galanga* L. [J]. Sep Sci Technol, 2016, 51(10): 1757-1764.
- [36] 李媛媛, 李灵犀, 崔艳, 等. 高速逆流色谱法分离红葡萄皮中的花色苷[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 157-161.
LI YY, LI LX, CUI Y, *et al.* Isolation of anthocyanins from red grape skins by high-speed counter-current chromatography [J]. China Brew, 2017, 36(2): 157-161.
- [37] 刘德明, 陈森芬, 王莹, 等. 高速逆流色谱法分离黄柏中 4 种生物碱的方法研究[J]. 湖南农业科学, 2018, (12): 82-87.
LIU DM, CHEN MF, WANG Y, *et al.* Separation of four alkaloids from phellodendron by high speed countercurrent chromatography [J]. Hunan Agric Sci, 2018, (12): 82-87.
- [38] 翟学萍, 齐建平, 尤慧艳. 模拟移动床色谱技术研究进展[J]. 化学教育, 2018, 39(4): 1-9.
ZHAI XP, QI JP, YOU HY. Research progress of simulated moving bed chromatography [J]. J Chem Educ, 2018, 39(4): 1-9.
- [39] WEI BF, WANG SY. Separation of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by three-zone simulated moving bed chromatography [J]. J Chromatogr A, 2020, 1625. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461326
- [40] 李长龙, 王金正, 刘曦, 等. 基于大孔径吸附树脂的模拟移动床色谱分离桑叶黄酮及其生物活性测定[J]. 蚕业科学, 2019, 45(4): 569-576.
LI CL, WANG JZ, LIU X, *et al.* Separation of flavonoids from mulberry leaf by simulated moving bed chromatography based on macroporous adsorption resin and determination of their bioactivity [J]. Acta Sericol Sin, 2019, 45(4): 569-576.
- [41] WEN HC, CUI H, TIAN HH, *et al.* Isolation of neuroprotective anthocyanins from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) against amyloid- β -induced cognitive impairment [J]. Foods, 2020, 10(1): 63.
- [42] 张宇平. 天然产物活性成分快速分离分析研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
ZHANG YP. Rapid analysis and preparative isolation of active constituents from natural products [D]. Changsha: Central South University, 2012.
- [43] ZHOU YL, MIN JG, WANG LS, *et al.* Isolation of antioxidant activity constituents from smilax China guiding by TLC-bioautography [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2012, 27: 799-802.
- [44] WANG J, LIU S, LI SN, *et al.* Ultrafiltration LC-PDA-ESI/MS combined with reverse phase-medium pressure liquid chromatography for screening and isolation potential α -glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Anal Methods, 2014, 6: 5918-5924.
- [45] LIU F, WANG YN, LI Y, *et al.* Rhodoterpenoids A-C, three new rearranged triterpenoids from rhododendron latoucheae by HPLC-MS-SPE-NMR [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7944.
- [46] 冯颖淑, 董珊珊, 徐希明, 等. 亲和色谱应用于天然活性成分筛选的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1032-1037.
FENG YS, TONG SS, XU XM, *et al.* Progress in screening active compounds from herbal medicine by affinity chromatography [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40(6): 1032-1037.
- [47] WANG LH, ZHAO YM, ZHANG YY, *et al.* Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolithbased immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2018, 1563:

- 135–143.
- [48] DENG SR, XIA LB, XIAO HB. Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS analysis [J]. Chem Commun, 2014, 50: 2582–2584.
- [49] 晏朝操, 张建锋. 基于谱效关联技术的中药研究现状[J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1735–1740.
YAN CC, ZHANG JF. Research status of traditional Chinese medicine based on spectrum effect correlation technology [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(10): 1735–1740.
- [50] 刘婧, 黄潇, 付小梅, 等. 基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 135–142.
LIU J, HUANG X, FU XM, *et al.* Spectrum-effect relationship of choleric effect of gardeniae fructus extract based on principal component analysis and gray correlation analysis [J]. Chin J Experim Traditl Med Formulae, 2020, 26(14): 135–142.
- [51] SHI Z, LIU Z, LIU C, *et al.* Spectrum-effect relationships between chemical fingerprints and antibacterial effects of *Lonicerae Japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos base on UPLC and microcalorimetry [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 12..
- [52] 段小菊. 基于化学计量学的白花丹参质量评价及谱效关系的研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.
DUAN XJ. Study on quality evaluation and fingerprint-effect relationship of *Salvia miltiorriza* var. *alba* by chemometrics [D]. Jinan: Shandong University, 2014.
- [53] 毛超一. 基于成分-药效关联的中药菊花质量标准与评价研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
MAO CY. Study on quality evaluation standard of the flower of *chrysanthemum morifolium ramat* based on the correlation of ingredients and efficacy [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Science, 2020.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



王媛媛, 硕士, 助理实验师, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。
E-mail: yuanw82@163.com



吕兆林, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物提取与加工利用。
E-mail: zhaolinlv@bjfu.edu.cn