

X 射线晶体衍射是解析出青蒿素 三维结构的唯一方法

华庆新

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0004

2015 年 10 月屠呦呦因青蒿素的发现和抗疟新药的创制荣获诺贝尔生理或医学奖。这是对当年研究团队的最高学术褒奖，既是对屠呦呦这位主要学者的肯定，也是对曾经参与研发的几十个单位、几百名研究人员的鼓励。中国科学院生物物理研究所(下简称生物物理所)是解析青蒿素分子结构(图 1)

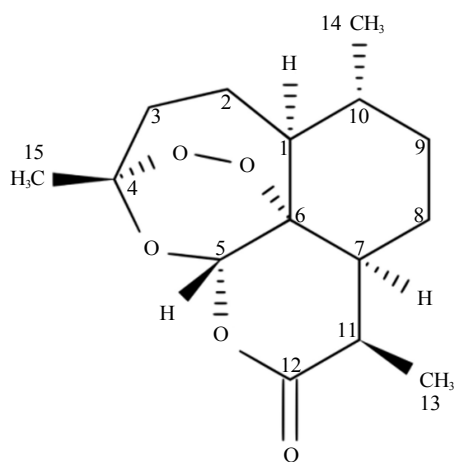


图 1 青蒿素晶体结构图示，由生物物理所青蒿素研究组测定

的单位，我虽曾在生物物理所工作(1963~1989)，但没有参与青蒿素的研究，只是耳闻，完全是局外人。屠呦呦获诺贝尔奖后，复看中国科学院上海有机化学研究所(下简称有机所)、生物物理所当年青蒿素结构测定的科研论文，继后又看到有关书刊网络对当年青蒿素立体结构测定的报道和回顾。《青蒿素分子和立体结构测定的历史回顾》一文^[1]已经对青蒿素三维结构测定的全过程作了详细历史回顾，本文只从专业角度阐释何以说“X 射线晶体衍射是解析出青蒿素三维结构的唯一方法”，而当年核磁共振等波谱技术则无法测定青蒿素立体三维结构。

1 解析三维立体结构对新药认定至关重要

测定精确的有机分子的立体结构，即测定其组成原子的三维结构，是任何新药认定的基础，这是国际公认的惯例。专一的有机分子或生物分子的三维结构，对应于此分子特定化学(或生物学)的功能效用。完整测定的分子结构，是创新药物的基本属性，也是西方学术界认可新药的门槛，由此可推向

作者简介：华庆新，1963 年毕业于中国科学技术大学生物物理系。Associate Professor, Dept. of Biochemistry, Case Western Reserve University, Cleveland (1999-2011), 2011 retired. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Chicago (1994-1999). Dept. of Biophysical Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard School of Medicine, Boston (1989-1994). Institute of Biophysics and Molecular Biology, ETH-Honggerberg, Zurich (1987). The National Institute for Medical Research, MRC, London (1985). The Institute of Biophysics, Chinese Academic of Science, Beijing (1963-1989). 从 20 世纪 80 年代起，长期致力于以核磁共振(NMR)、圆二色仪(CD)等方法研究胰岛素的溶液三维结构，以图深入了解胰岛素的构像折叠、结合及稳定性，为设计新型胰岛素提供基础理论依据。主要学术论文 50 篇发表于国际知名刊物，如 Nature, Nature: Structural Biology, Proceeding of National Academia of Science, USA, J. Biol. Chem., J. Mol. Biol. 等。其解析出的十几个胰岛素及其类似物三维结构都已存入美国蛋白质数据库。出版《蛋白质分子的溶液三维结构测定：多维核磁共振方法》(1995), Invited Review Article: “Insight Into Folding, Binding and Stability of Insulin by NMR” (PIBB, 2004), “Insulin: a Small Protein with Long Journey” (Protein & Cell, 2010).

收稿日期：2016-12-31，接受日期：2017-01-09

世界,为全人类造福.因此,测定青蒿素的立体结构是青蒿素药物研发的一个重要环节.解析青蒿素结构并不是研究的最终目的,但却是必需跨越的桥梁.知道正确立体结构,才能正确解释其抗癌功能,而青蒿素神奇的抗癌作用的关键就在于其分子中的过氧桥.知道其立体结构,为定向设计高效低毒的抗癌药物提供支持.

也正由于立体结构重要,而其他方法无法解析,当年523办公室才给全国唯一有X射线四圆衍射仪的生物物理所下达测定青蒿素三维立体结构的任务,而该所因解析出胰岛素晶体结构也已有合适的攻坚仪器及队伍人才.

1970年代国内学术文章的发表还很不规范;一些学术词汇的应用也不尽统一;整个青蒿素研究又涉及这么多单位,牵扯到生物学、医学、药学、化学、物理学等诸多学科;相互交流不很畅通;论文发表常以集体署名;论文中引述他人实验结果和结论时不标明出处单位;加之引用时想当然地按自己理解而改动原义,造成后期报刊网络媒体等非专业人士的以讹传讹.由此,一则会引起各单位相互间不满,二来在学术上传递了不尽正确的信息,广为流传.

最早的青蒿素相关学术论文见参考文献[2-5],其中即使同一词如“化学结构”,不少人泛指为化学结构式.有机所论文^[4]中所说“结构”,实际是青蒿素的物理化学性质加上部分结构信息或结构片段.而生物物理所文章^[5]则特指三维立体结构,每个原子有精确坐标,有键长键角,精确到以Å度量.如果1970年代可以比较含混地谈“结构”,到21世纪就应该明确专指为三维立体结构了.有关结构、构型、构象的界定,请见文献[1]引述的注释.

青蒿素分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ (相对分子质量282)是中国医学科学院药物研究所用质谱确定,有机所证实,这为进一步分析铺平了道路.但这 $C_{15}H_{22}O_5$ 是环链分子,还是树干样枝链分子,或是有一个、几个小环或杂环交联分子?仅由波谱学所得的分子片段的结构信息,人们仍然不得而知.实际上,如文献[1]所说,只有X射线晶体衍射能给出正确答案.

2 一维核磁共振(NMR)无法解析出青蒿素分子三维立体结构

现在不少文献、新闻媒介广泛报道说青蒿素的结构是以核磁共振等波谱学方法解析出的,或者说

先由核磁方法得到,再由X射线晶体衍射精化.为此我想从NMR专业角度说上几句.笔者使用NMR30年,对NMR有一定了解.所谓核磁共振,是核磁矩不为零的原子核(如 1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O),在外加静磁场中发生能级分裂,当满足共振条件时共振吸收另一特定射频电磁场能量的物理现象,在1946年发现.而近代核磁共振方法的发展,可以粗略分为3个阶段:1970年代的初创阶段,如有机所当时使用的100或250MHz仪器,就属于最初的核磁波谱仪,只用一维核磁共振,完全是NMR的初级阶段.核磁技术发展的第二个台阶,应归功于1980年代瑞士苏黎世高等工学院(ETH)的理查德·恩斯特(Richard Ernst)^[6].他在核磁共振中用强而短的脉冲波代替功率弱的连续波,并以傅里叶变换,将时间域函数变为频率域观测到清晰的核磁波谱,加上他以量子力学从理论上严格推导出二维、多维核磁共振,使他在1991年获诺贝尔化学奖.第三个台阶也归功于同是苏黎世高等工学院的维特里希(K.Wüthrich)^[7],他用二维核磁共振并以距离几何(distance geometry)算法软件,解析生物大分子溶液结构,而此后的异核(1H , ^{13}C , ^{15}N)三维核磁共振及相应软件在生物医药领域发挥巨大作用. Wüthrich于2002年获诺贝尔化学奖.本人1987年在Wüthrich实验室作访问学者. NMR技术的发展历程可见1995年出版的《蛋白质分子的溶液三维结构测定——多维核磁共振方法》一书^[8].即便现在要得到分子的三维结构,也起码需两大步:先以几个二维或三维NMR图谱作谱线归属,认定一维图谱中的每条谱线关连到哪个 1H 或 ^{13}C 原子上;然后按每个NOE的强度大体确定各原子间距,再以距离几何算法软件计算出粗结构,随后多次重复才得到精化的三维结构.

有机所当时的仪器技术用的还是第一代NMR仪器技术,并以照射某一谱线来判知谱线属性、偶合关系.但现在这类一维谱线照射方法早已淘汰,而代之以二维谱^[8].从他们的文章中的确可知道0~1ppm之间谱线代表可能有甲基,但这是几个甲基,并不确切知道,是哪个位置的甲基,与其他碳氢氧原子如何关联,一维 1H -NMR图谱没有给出更多信息.仅从谱线的化学位移,并不能确定是 $-CH_3$ 、是 $-CH_2$,还是 $-CH$.至多是可能性推测,更无法定量,加之一维谱线重叠,难以识别作谱线归属,不能得到确切的结构证据.青蒿素分子式中有22个氢原子,但图谱仅报道11个氢原子的

谱线猜测^[3-4]。另外 11 个氢原子为何在图谱中消失? 是否重叠隐含在那 11 条谱线之中? 若如此, 则作出的谱线推测会有误。论文对此没有作任何解释。

又如 ¹³C-NMR 图谱显示 15 个 ¹³C 谱峰^[2-4], 表明有伯碳、仲碳、叔碳、季碳原子^[3-4], 可是这些碳原子又是如何对应于青蒿素分子 15 个碳原子的哪一个? 文章只有一些很粗略的猜测。即使不作 NMR 测定, 也可以推测可能含伯碳、仲碳、叔碳、季碳 4 类碳原子, 断不能就此说: 已经解出了分子结构。

再者, 青蒿素的关键过氧化桥, 是搭在哪两个碳原子上? 这牵涉到如何与疟原虫的靶点部位结合之处, 也就是关系青蒿素的药物活性的关键, 是药效之所在。从上述 3 篇学术论文, 完全看不到一点讨论或佐证, 没有任何实验数据可以支持这个结构的“活性部位”(或说“靶点结合部位”)。而青蒿素之所以抗疟就在于这个关键部位。论文[4]顶多有些猜测, 但这不是科学根据! 文献中曾提到“3.44~5.68 ppm 之间没有质子峰”, 于是就推测这过氧基团是接于两个叔碳原子, 这样的推测也并无唯一性。NMR 谱峰的化学位移有三种效应, 最突出的就是环流位移效应^[8]。现在已知的青蒿素分子结构是否存在某些屏蔽效应, 从而使谱线向高场或低场位移, 屏蔽出 3.44~5.68 ppm 区间? 仅从一维核磁图谱, 无人能排除屏蔽效应的可能性。文献[3-4]还提到: 照射 1.7 ppm 处的谱线, 5.8 ppm 的谱线就增强 11%, 说这就是所谓核 Overhauser 效应(NOE)。并由此推断这 2 个 H₃、H₁₀ 都在 β 面上, 这种分析也只是猜测。NOE 效应是间距在 5 Å 之内的两个质子之间(不论是同一分子内, 或是分子之间的质子), 会产生谱线增强的现象, 但它无法区分是共价键相连而靠近的质子, 还是空间较近而没有共价键连接的质子。在二维核磁共振中, 用 NOESY 谱一次可得所有有 NOE 相关的质子, 再比较 TOCSY 谱, 可以排除共价键连接的质子, 才能辨认出空间间距较近的两个质子。还有, 为什么说他们都在 β 面上, 为什么不可能在 α 面上? 亦无解释。

当时相关研究人员确实付出了极大努力, 在不同条件下测试, 并在氧化、还原、酸碱处理、甲基化、乙酰化等等条件下重复测试。但仅从一维 NMR 图谱拿不到分子立体结构, 这些都不是研究人员的水平问题, 而是技术方法本身的限制。仅用

一维 NMR 数据能解析出有机分子三维立体结构, 世界上没人能做到。

3 旋光色散、红外光谱也不能得到精确的分子结构信息

旋光色散是圆二色仪的前身, 不过现在国际上早就弃用旋光色散。我从 1980 年代初就开始使用圆二色仪, 也历时 30 年。圆二色性是利用物质对左旋及右旋圆偏振光的差异, 测量不同波长下的差值与波长 λ 之间的关系曲线, 即圆二色光谱曲线。但谱线的解释却很困难, 并有极大争议。对蛋白质的圆二色光谱只能作定性推测, 顶多对 α 螺旋作半定量估算, 而绝不能作定量计算。其结果也是对整个分子而言, 知道有不对称碳原子, 无法作结构推断。旋光色散更是只能粗略得知左右旋色散之差, 很难解释。文献[3-4]里很少引用旋光色散, 说上几句也很笼统, 有数据, 无解释, 没有给出明确结构信息。

红外光谱对化学基团的鉴定很有价值, 但也仅此而已。它主要用于鉴定官能团。如羰基, 不论是在酮、酸、酯或酰胺等类化合物中, 其伸缩振动总是在 1 700 cm⁻¹ 左右出现一个强吸收峰。青蒿素红外光谱也确实在 1 700 cm⁻¹ 左右有一个强吸收峰, 可以断定分子中有羰基。不过这是酮、酸、酯中哪个羰基? 却不明白, 更不要说这羰基在分子的哪个部位!

再者, 有机化学经常会讲桥式或船式, 左旋或右旋, 氢键朝上还是朝下, 都涉及立体专一结构, 牵涉到手性或镜像对称, 都不是一维 NMR、红外、旋光色散、质谱所能决定的。

但参考文献[4]的摘要明确写道: “它的结构是由红外光谱、核磁共振谱、质谱和化学反应以及 X 射线衍射等方法确定的。”在谈及核磁共振结果时却只用了“提示”、“推定”等不确定的词汇。文中又写道: “通过化合物(1)和(2)的红外光谱、核磁共振和质谱以及一些化学反应, 可以推定 I、II、III、IV 及 V 是青蒿素的部分结构。”而所推定的“部分结构”, 也只是小到如 4 个甲基或者 2 个 CH—CH₃ 之类的结构碎片。我想重申一句: 我无意贬低在当时仪器技术条件下, 许多科研工作者的不懈努力, 积累了大量结构信息。但如果说这些波谱学方法在 1970 年代就“解析出”青蒿素结构, 并且直至 21 世纪还如此宣传、扩散, 在学术上是不严谨的, 会产生误导效应。使得无专业知识的人

士以为核磁共振等方法在当时就已经测得青蒿素立体结构。

目前在媒体广为流传的，是一位记者在 2008 年采访有机所某教授的报道中写道^[9]：“青蒿素的结构是根据光谱数据解读出来的，也是由光谱数据证明的。”2011 年此文又转载到科学网，现在仍被广泛采信，影响颇大。文中有许多明显的学术性错误，但因未出现在学术刊物，本文从略，不复多言。

总之，青蒿素的立体专一结构是李鹏飞、梁丽等人以直接法、氧原子反常散射测定的^[1]。X 射线晶体衍射是测定出青蒿素三维结构的唯一方法。青蒿素研究由此上了一个新台阶，令西方科学家对中国科学家在中药有效成分的出色研究刮目相看，也为屠呦呦的青蒿素研究获得诺贝尔奖奠定了坚实基础。这一结构完全正确，沿用至今，没有修改，为中外学术界公认。当年有机所等单位以一维核磁共振等波谱手段取得不少青蒿素的化学结构信息，推测出一些结构片段，但不足以解析出其完整立体构型。正如文献[1]指出的，国内波谱学权威梁晓天教授当年在内部会议中已经肯定了生物物理所的立体结构，也明确否定了由波谱学数据推测出的结构。从回顾青蒿素研究的过往历史，更使我们深深体会到：各学科、专业间的交流协作、取长补短，是当年青蒿素研发成功的最重要因素。

附记 说到梁晓天教授，想起一次中国医学科学院药物研究所梁先生的学术报告。一般人作学术报告都是讲自己如何成功，他却别开生面专讲自己研究中曾经的五六次错误，逐一说明如何发现错误，自我纠错，设计并改进实验，得到正确结果。报告最后他还语重心长地告诫说：一些搞波谱的人可以是：“要什么有什么，不要什么没什么！”他进一步解释说，波谱都有噪声信号，如果没有客观标准，随意抬高阈值，真峰可被认为是噪声伪峰；而人为降低阈值，伪峰可以被认为是真峰！研究人员

切勿随心所欲地改变这阈值门槛！他的报告自我纠错，求真求实，谦虚谨慎，谆谆教诲，令人难忘！

参 考 文 献

- [1] 梁 丽. 青蒿素分子和立体结构测定的历史回顾. 生物化学与生物物理进展, 2017, **44**(1): 6-16
Liang L. Prog Biochem Biophys, 2017, **44**(1): 6-16
- [2] 青蒿素结构研究协作组. 一种新型倍半萜内酯——青蒿素. 科学通报, 1977, **22**(3): 142(Chemical Abstracts 87, 98788g, 1977)
The Collaborating Group for Research on the Structure of Qing Hao Su. A new sesquiterpene lactone-Qinghaosu. Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin), 1977, **22**(3): 142(Chemical Abstracts 87, 98788g, 1977)
- [3] 青蒿研究协作组. 抗疟新药青蒿素的研究. 药学通报, 1979, **14**(2): 49-53
The Collaborating Group for Research on the Structure of Qing Hao Su. Chinese Pharmaceutical Journal, 1979, **14**(2): 49-53
- [4] 刘静明, 倪慕云, 樊菊芬, 等. 青蒿素(Arteannuin)的结构和反应. 化学学报, 1979, **37**(2): 129-143
Liu J M, Ni M Y, Fan J F, et al. Acta Chimica Sinica, 1979, **37**(2): 129-143
- [5] 中国科学院生物物理研究所青蒿素协作组. 青蒿素的晶体结构及其绝对构型. 中国科学, 1979(11): 1114-1128
Qinghaosu Research Group of Institute of Biophysics. Scientia Sinica, 1980, **23**(3):380-396(Chemical Abstracts 93, 71991e, 1980)
- [6] Ernst R R. Nobel Lecture: Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/ernst-lecture.html. 1991
- [7] Wüthrich K. Nobel Lecture: NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/wuthrich-lecture.html. 2002-12-08
- [8] 华庆新. 蛋白质分子的溶液三维结构测定——多维核磁共振方法. 长沙: 湖南师范大学出版社, 1995
Hua Q X. Three Dimensional Structural Determination of Protein Molecule in Solution: The Multidimensional Nuclear Magnetic Resonance Methods. Changsha: Hunan Normal University Press, 1995
- [9] 王丹红. 周维善院士讲述青蒿素结构测定经过. 科学时报, 2008-12-02(A2)
Wang D H. Science Times, 2008-12-02(A2)