

# CBS

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE



**HPTLC is indispensable  
Not only for screening of natural products**

**CAMAG 102**

## 海绵中具有生物活性的天然产物的筛选



作者 Anne Klopel 和 Andrea Kolm



Dr. Franz Brümmer教授

德国斯图加特大学生物研究所Franz Brummer教授的研究小组从事于海绵中有生物活性的天然产物的研究。特别是化学生态学以及具有潜在药理活性的新成分的分离鉴别。而某些海绵品种的培育(原位、非原位、体外)及依存环境的变化所致代谢物组分的变化也是一个主要的研究方向。

在与德国霍恩海姆大学食品化学系Gerda Morlock博士的合作下,采用高效薄层色谱(HPTLC)、生物活性分析及质谱分析技术对培养过程中相关的化学成分结构及生物活性的变化进行了研究。这是这3种技术首次联合应用于具有生物活性的天然产物领域,也特别适合用于新药的开发研究。

### 介绍

海洋无脊椎动物是一类筛选具有药用价值的活性化合物最有效的来源,每年有大约有800个新成分被发现,其中有45%来自海绵。因为无法移动的滤食动物缺乏形体上的自我保护机制,所以海绵用这些化合物来对抗觅食压力、同类竞争及生物污垢,这些活性成分表现出抗菌、抗炎、细胞毒及抗病毒的毒性。尽管这些次级代谢产物非常多样化,但目前只有少数进入了临床市场,如从*Cryptotethya crypta*中得到

的ARA A® (9-β-D-arabino-furanosyladenine),它对单纯疱疹病毒表现出抗病毒作用。

在这些产品进入药品市场或临床测试之前,需要经过大量的各种实验分析。首先,采用标准生物测定对粗提物进行普通生物活性检测,如以艾希氏大肠杆菌及枯草芽孢杆菌进行片琼脂扩散法检测或以费氏弧菌进行冷光细菌检测。然而,为弄清楚单一成分和生物活性之间的关系,进行生物导向的分离是必须的。而为了达到分离和纯化的目的,各种色谱分离系统(如固相萃取、凝胶渗透色谱、半制备高效液相色谱)是必不可少的。接下来需要对单一的化合物或组分作进一步的生物活性筛选,并采用HPLC-MS或NMR进行结构解析。

在大量的寻找和鉴定新的具有生物活性化合物的工作中,和HPLC相比,HPTLC提供了一种简捷、更健全(较小的基质效应)且经济的分析方法,对30份海绵提取物平行进行色谱分离是可行的。HPTLC和基于以费氏弧菌进行冷光细菌检测的生物测定方法相结合,以及采用高分辨率质谱进行结构解析,从而为海绵中代谢物及生物活性筛选的研究提供了一套非常有效的系统。对于感兴趣的成分,可以直接从薄层

板上提取并转移到MS系统而无需时间及花费高昂的分离纯化过程,片刻后即可通过高分辨率MS得到各个质谱信号及分子式。由于对HPTLC薄层板上的成分条带的提取很完全,这种方法具有和HPLC-MS相当检测灵敏度。

### 供试品溶液的制备

海绵样品取样及培养(原位及非原位)后,每个样本取1-5 cm<sup>3</sup>以液氮冷冻冻干,粉碎,各取100 mg置于无菌反应试管内,加高纯度甲醇振荡提取20小时,离心,取上清液2 mL,即得。

### 标准品溶液的制备

阿瓦醇及阿瓦酚(由德国美因兹大学Dr. Werner Muller教授从*Dysidea avara*中分离得到)加高纯度甲醇适量,分别制成0.1 mg/mL的溶液,即得。

### 薄层板

硅胶G 60 F<sub>254</sub> HPTLC预制薄层板(Merck), 20 x 10 cm, 甲醇预洗展开后置薄层板加热器上100°C加热15 min。

### 点样

CAMAG ATS4 自动点样,带宽4 mm,轨道间距6 mm,点样距底边8 mm,边距10 mm。点样体积:样品提取溶液20 μl;标准溶液0.2-2 μl

### 色谱展开

采用CAMAG AMD 2自动展开系统,以甲醇、二氯甲烷及正己烷15步梯度展开,展开过程在氮气条件下进行,最终展距53 mm,在2.5小时内完成。

### 生物活性检测

采用CAMAG Digistore 2成像系统,将HPTLC薄层板分别在254 nm、366 nm及白光(反射)下记录图像。

为进行生物活性筛选,采用CAMAG薄层板浸渍装置将薄层板浸入发光细菌(费氏弧菌)悬浮溶液(BioLuminex 试剂盒, Boulder公司, USA),浸入速度3.5 cm/s,停留时间1s。具有生物生物活性成分会导致薄层板上细菌发光的抑制或增强,以CAMAG Bioluminizer生物自发光检测器记录谱图,可将图谱导入VideoScan软件进行数字量化。

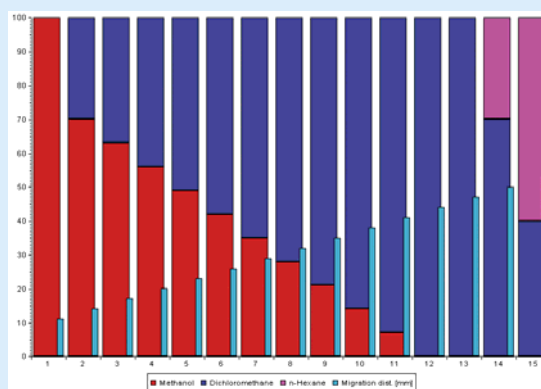


### CAMAG AMD 2 展开系统

(全自动多步梯度色谱展开系统)

瑞士卡玛多步梯度色谱展开(AMD)程序可在硅胶固定相上进行可重现的梯度洗脱。用来分离复杂或存在基质干扰的样品,并可获得比其它任何薄层色谱展开技术都要优异的色谱分辨率。

其工作原理是将薄层色谱在同一方向多次重复展开,且每一步溶剂迁移距离依次增加、极性(洗脱强度)依次降低,形成了分步的梯度洗脱。在两步展开之间,剩余溶剂被从展开槽中排空,薄层在真空下干燥。聚集效应结合梯度洗脱可产生非常窄的成分条带,峰宽一般为1mm,也就是说80mm的展开距离理论上可使40种成分达到基线分离。



## HPTLC-ESI-MS的联用

将薄层板上感兴趣的成分区域标记出来，通过在线提取装置(Chromextraktor, ChromAn)将其转移进入ESI-MSD(Agilent, 电压 4KV, 去溶剂温度 300 °C, 干燥气流 10 L/min, 雾化气压力30 psig), 提取溶剂为甲醇-甲酸铵缓冲液(10 mmol/L, pH 4) 95:5, 流速0.1 mL/min。通过在m/z 200至900范围的正离子全扫描获得质谱并通过高分辨质谱(LTQ Orbitrap XL hybrid FT-MS, 赛默-飞世尔)进行确认。

## 结果及讨论

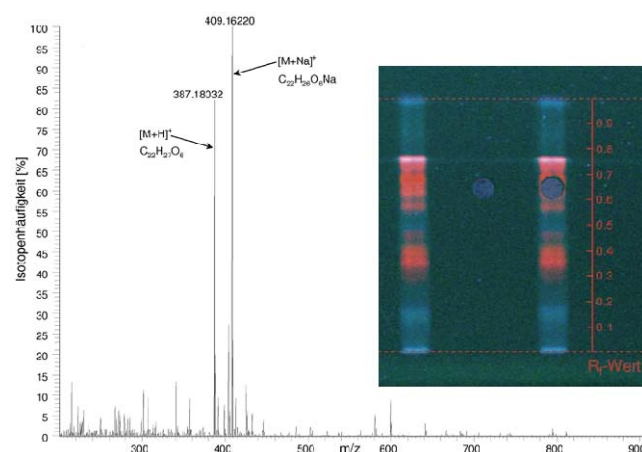
通过体外海绵细胞培养, 即primmorphs(细胞三维聚集繁殖) 来大规模生产海绵及相应的生物活性化合物是可行的。

试验所感兴趣的次级代谢产物可通过细胞培养继续在体外合成, 这一点通过HPTLC-生物活性筛选方法得到了证实。然而某些海绵(如 *Axinella polypoides*) 在代谢物的组成方面有所差异, 虽然对总提取物的整体毒性不造成影响。通常情况下, 对于同一成分来说, 体外培养的海绵的提取物会产生比原位培养的相应提取物更强的冷光抑制作用(如 *Axinella polypoides*, *Suberites domuncula*, *Petrosia ficiformis*), 这可能是由于在逆境条件下代谢物合成增多的关系所致。

也有部分海绵物种积累了更多的在原位培养条件下所没有的潜在生物活性化合物(如 *Suberites domuncula*), 如 *Dysidea avara*在体外培养时产生一种生物细菌发光增强的成分。还有一个对 *Vibrio fischer*显示毒性的成分在分析中丢失了, 或是由于合成的量太少所致。此外对共生蓝藻可能参与产物合成的影响进行了考察, 在对 *Petrosia ficiformis*提取物的分析结果显示其使得代谢产物的指纹图谱有所改变, 但

总的活性没有改变。

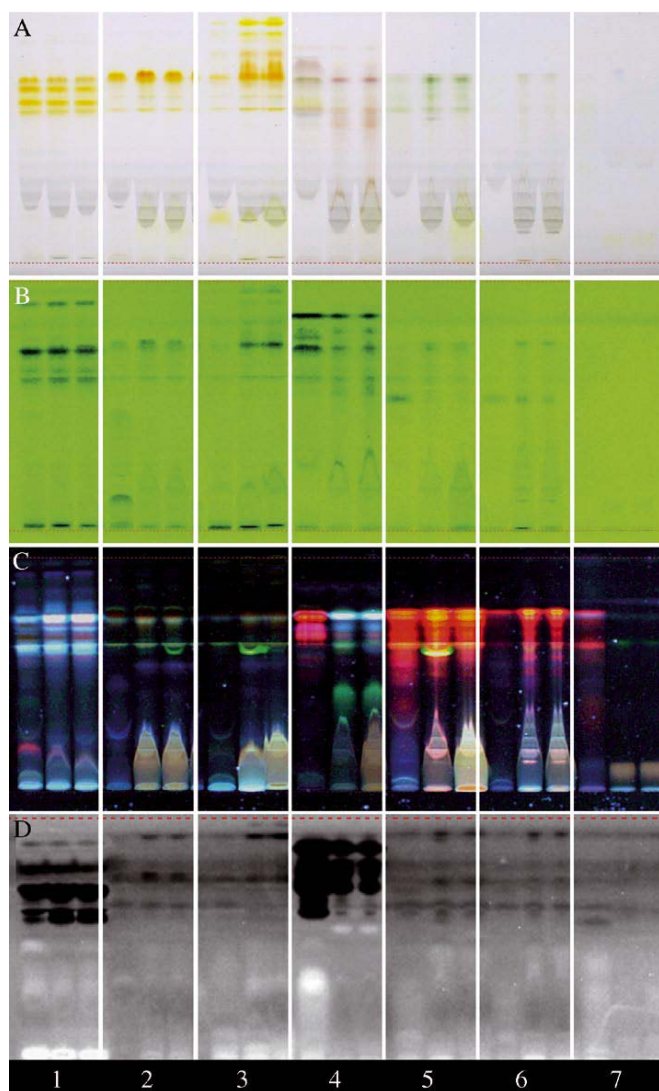
HPTLC、Biolumines生物活性检测和质谱分析技术的联合运用, 使得可以平行的对30种不同的海绵提取物进行快速有效的分离、生物活性成分的鉴定及结构确定。这些技术的联合应用使得首次分离检测到一种淡水海绵产生的生物活性成分, 该成分通过体外培养不能被合成。通过和高分辨质谱的联用, 其精确的单同位素分子离子及钠离子的质荷比(m/z) 经测定分别为387.18032[M+H]<sup>+</sup>和409.1622[M+Na]<sup>+</sup>, 从而确定其结构式为C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub>。



左: 淡水海绵 *Ephydatia fluviatilis* 中一种生物活性成分的

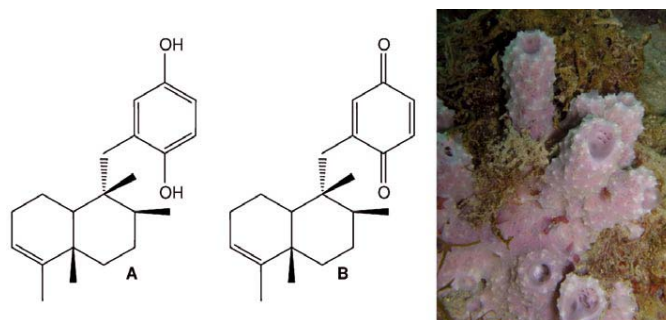
HPTLC-ESI-MS谱图(正离子模式), 单同位素分子离子 m/z 为 387.18032, 偏差 0.7pp

右: HPTLC图谱(366 nm): 活性成分( $R_f=0.65$ ) 通过在线提取接口装置(直径4 mm) 被提取(左边轨道: 提取前; 中间: 空白对照; 右边轨道: 提取后)

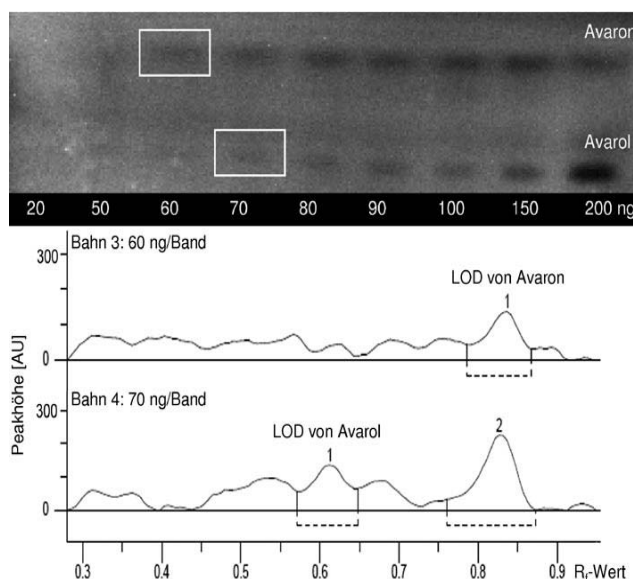


HPTLC图谱: A 白光, B 254nm, C 366nm, D 生物发光检测  
 1-7 左边轨道: 原位培养海绵提取物; 1-7 中间轨道: 体外培养海绵提取物 (细胞培养基按照Le Pennec et al. (2003)); 1-7 右边轨道 (细胞培养基按照Zucht (2005))。  
*Acanthella acuta* (1), *Axinella polypoides* (2), *Suberites domuncula* (3), *Dysidea avara* (4), *Petrosia ficiformis* 蓝藻共生 (5), *Petrosia ficiformis* 无蓝藻共生 (6), *Ephydatia fluviatilis* (7) Harsha(1983)细胞培养基  
 黑色区域: 生物自发光抑制; 白色区域: 生物自发光增强; 白色方框: *Ephydatia fluviatilis*中的未知活性成分

已知的生物活性天然产物是具有抗病毒和细胞毒作用的阿瓦醇和阿瓦醌, 其生物活性检测限分别为70 ng (阿瓦醇) 和60 ng (阿瓦醌), 完全能够满足海绵中成分筛选的需要。



从*Dysidea avara* (右图) 中分离得到的阿瓦醇 (A) 和阿瓦醌 (B)。目前, 阿瓦醇用于治疗牛皮癣等的软膏剂。



HPTLC生物自发光检测后的肉眼(上)及VideoScan软件数字模拟(下)的检测限(白色框): 阿瓦醇 70 ng; 阿瓦醌 60 ng

这种基于生物活性的分析方法使得某些在目前普遍采用的HPLC-DAD检测器中无紫外吸收的活性代谢物也能够得到检测。优势更在于省去了HPLC-MS相关的分离纯化阶段, 且薄层分离后由于溶剂的蒸发, 不会造成酶或像生物发光细菌这样的有机物的钝化而影响检测。

[1] A. Klöppel, W. Grasse, F. Brümmer, G. Morlock, J. Planar Chromatogr. 21 (2008) 431-436

作者通讯方式:

<sup>1</sup> Prof. Dr. Franz Brümmer, Institute of Biology, Department of Zoology, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 56, 70569 Stuttgart, Germany, franz.brueemmer@bio.uni-stuttgart.de

<sup>2</sup> PD Dr. Gerda Morlock, Institute of Food Chemistry, University of Hohenheim, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart, gmorlock@uni-hohenheim.de