

TLC 生物自显影技术在药物筛选中的应用

曲建博, 娄红祥*, 范培红^X
(山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘要: TLC 生物自显影是一种将薄层色谱分离和生物活性测定相结合的药物筛选方法, 具有操作简单、耗费低、灵敏度和专属性高等优点, 是一种快速测定生物活性的方法。可用于对具有抗菌/真菌, 抑制胆碱酯酶以及清除自由基和抗氧化等活性的天然产物的筛选, 可实现活性指导的提取分离。利用 TLC 生物自显影, 可测定单体活性化合物的最小抑制浓度(MID), 通过与对照品的 MID 值比较, 能够推测该化合物活性的强弱。此外, 利用 TLC 生物自显影定性及定量的特征, 还可对食物、水样及动物组织中抗生素残留量进行监测。现综述 TLC 生物自显影技术及其在天然产物筛选中的应用, 同时对其优点及不足也进行了总结。

关键词: TLC 生物自显影; 抗细菌; 抗真菌; 胆碱酯酶抑制活性; 自由基; 抗氧化作用

中图分类号: R285.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2005)01-0132-06

Application of TLC-bioautography to drug screening

QU Jian-bo, LOU Hong-xiang, FAN Pei-hong

(School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Key words: TLC-bioautography; antibacterial activity; antifungal activity; cholinesterase inhibition; free radical; antioxidation

从天然产物中得到的成分往往要进行生物活性测定。传统的活性测定方法需在整个动物或某个器官上进行, 这要求被测化合物首先被分离出来, 并且要有足够大的量, 许多从天然产物中得到的成分不能满足这一要求^[1]。目前常用的微量生物活性测定方法, 如微生物抑制法(STOP、LAST、CAST、FAST、BR-Test、Delvotest P)、酶法(Penzyme)、免疫测定法[enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)、Cite Probe]和放射性免疫测定法(Charm), 可对微量化合物进行较准确的活性测定, 但是这些方法在使用过程中有一定的局限性。例如, 微生物抑制法虽然操作简单、耗费低, 但是其专属性和灵敏度不高, 易出现假阳性结果; 酶法和放射性免疫测定法虽然灵敏度高, 但其花费相当昂贵, 一般不适用于未经分离的天然药物筛选^[2]。而 TLC 生物自显影法可弥补以上不足, 其操作简单、耗费低、灵敏度和专属性高, 是一种快速测定生物活性的方法^[2-4], 尤其适用于对具有抗菌/真菌, 抑制胆碱酯酶以及清除自由基和抗氧化等活性成分的筛选。笔者就 TLC 生物自显影技术在药物筛选中的应用作一综述。

1 TLC 生物自显影对抗菌/真菌化合物的筛选

1.1 TLC 生物自显影: TLC 生物自显影是一种将薄层色谱分离和生物活性测定相结合的药物筛选方法。利用薄层板将混合物(如植物提取物)在薄层板上展开后, 将薄层板与接种了病原微生物(人体致病菌或植物致病菌)的培养基相接触, 通过一定的培养, 非活性部位会被生长出的病原微生物所覆

盖而呈现背景色, 活性部位因抑制了病原微生物的生长而呈现抑制斑点, 这样就可从混合物中筛选出活性成分^[5]。TLC 生物自显影通常有 3 种方法: 琼脂扩散法(agar diffusion)、直接 TLC 生物自显影检测法(direct TLC bioautography detection)和琼脂覆盖法(agar overlay)。

1.1.1 琼脂扩散法: 较早被使用的一种方法, 以接种了病原微生物的培养基为载体, 将吸附了待测化合物的薄层板与培养基表面相接触, 在 0~4 的条件下培养过夜(HPTLC 板所需时间短), 利用化合物的扩散性质, 将吸附在薄层板上的化合物转移到培养基表面, 取走薄层板, 培养基在 37 左右的条件下培养过夜以进行生物自显影。一般情况下, 在培养基中加入一定量的四唑盐(如 MTT、INT 等), 会使结果更易观察^[3]。(因为 MTT、INT 等四唑盐本身颜色较浅, 且易被细菌的代谢产物转化为颜色较深的甲类化合物, 从而形成背景色)。由于硅胶与琼脂之间的吸附作用, 琼脂易黏附在硅胶上, 取走薄层板时, 易使琼脂层受到破坏, 从而影响抑菌斑点的观测, 在薄层板与琼脂层之间加一张润湿的滤纸可减小这种危险。

1.1.2 直接 TLC 生物自显影检测法: 与琼脂扩散法不同, 以薄层板为载体, 将用特定营养液配成一定浓度的病原微生物的悬浮液直接喷洒到点样并展开的薄层板上, 在潮湿避光的环境下培养一段时间即可直接或通过四唑盐溶液显色的方法观察到实验结果^[5-7]。该方法适用于可直接在薄层板上生长的真菌孢子和某些细菌, 最常用的为瓜疮痂枝孢霉菌

^X 收稿日期: 2004-04-04

作者简介: 曲建博(1980—), 男, 山东大学药学院在读硕博连续研究生, 研究方向为苔藓植物中联苯类化合物抗真菌活性及其作用机制。

Tel: (0531) 8382012 E-mail: qujianbo198@souhu.com

* 通讯作者 Tel/Fax: (0531) 8382019 E-mail: louhongxiang@sdu.edu.cn

Cladosporium cucumerinum Ell. ex Arth.。并且,使用直接 TLC 生物自显影检测法测定,化合物作用持续时间一般较长,相对与其他 2 种方法,该法更利于结果的保存。实验中,营养液可为葡萄糖-无机盐溶液^[8]或营养肉汤^[9],细菌/真菌悬浮液浓度一般为每毫升 $10^5 \sim 10^{10}$ 个孢子^[6,9],所用体积一般为 5~6 mL (20 cm × 20 cm),过多或过少均会影响抑制斑点的观测。为使细菌或者真菌均匀分布在薄层板上,可用喷瓶或滚柱装置涂布细菌或真菌悬浮液,后者可最大限度地减少空中飘浮的微生物含量。细菌或真菌的培养温度和培养时间随所用菌种的不同而不同,培养温度一般略高于室温,培养时间为 2~3 d^[6,8,10],也可在 30 ℃ 左右培养过夜^[11];有时需光照^[6,12],以使细菌/真菌进入稳定增长期为最佳。此外,由于该方法以薄层板作为生物自显影的载体,因此,薄层板以及展开剂的选择应值得注意。Hamburger 等比较了硅胶薄层板、中性 Al_2O_3 薄层板和聚酰胺薄层板生物自显影的效果,结果硅胶薄层板生物自显影效果最佳,同时认为,薄层板所用的展开剂应选用易发挥的试剂,尽管避免使用酸、碱等不易发挥的试剂,试剂的残留会对细菌或真菌的生长产生较大影响。

1.1.3 琼脂覆盖法:是前 2 种方法的杂合,将接种了细菌或真菌的熔融麦芽汁琼脂培养基均匀涂布在点样并展开后的薄层板上,待琼脂凝固后,将薄层板在 30 ℃ 左右的条件下培养过夜^[10,13],用四唑盐染色后,即可观测到实验结果。这种方法适用于广谱微生物,尤其适用于酵母菌和细菌等^[13]。值得注意的,某些化合物在培养基上很容易扩散,使用琼脂覆盖法有时不易观察到抑菌斑点。

1.2 HPTLC 及 2D-TLC 生物自显影法:HPTLC 生物自显影法与 TLC 生物自显影相比,具有以下几点优势^[3]:较普通薄层板对化合物的分离效果要好,并且对某些化合物(如 CAP、ERY)的灵敏度要比 TLC 生物自显影高;较普通薄层板的展开时间要短,且展开剂的使用量也较少,从环境保护角度看,更具优势;所需点样量及细菌培养液的量均小于 TLC 生物自显影法。

对于成分较多的天然提取物,往往要耗费大量试剂对其进行极性分离,2D-TLC 直接生物自显影方法能很好的解决这个问题。Wedge 等^[9]先用极性展开剂将 TLC 板展开,调转 90 后再用非极性展开剂第 2 次展开,这样在一块薄层板上就同时展开了极性和非极性成分。2D-TLC 生物自显影,非常适合于对含有脂溶性成分且一次展开不容易分离的提取物的生物活性测定。该方法无需使用众多的展开系统及薄层板,减少了废液处理量,进而缩短了鉴定活性化合物所需的时间。

1.3 TLC 生物自显影的应用:该法在天然药物化学中的一个主要用途是指导分离天然提取物中具有抗菌/真菌活性的化合物。根据 TLC 生物自显影的结果,可对天然提取物不同部位的生物活性进行评估,进而有目的的进行下一步的提取分离。另外,对于单体活性化合物,可利用 TLC 生物自显影测定出化合物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory dose,

MID),将该值与对照品的 MID 相比较,从而能够推测出该化合物的活性大小^[11,14]。部分利用 TLC 生物自显影筛选天然产物中抗菌/真菌活性化合物的应用情况见表 1。

TLC 生物自显影的另一个用途是对抗生素残留量的监测。Baradat 等报道了对牛奶中抗生素 Glycopeptide Actaplanin 残留量的测定过程,使用的生物活性测定方法为琼脂覆盖法。Balinova 利用 TLC 生物自显影技术,对 4 种农作物及水样中各 5 种杀(真)菌剂的残留量进行了测定,并且对实验条件进行了优化,指出绿色木霉 *Trichoderma viride* Pers. 对多种抗生素具有敏感性,为最理想的探测剂。Ramirez 等^[3]和 Choma^[5]利用 TLC 生物自显影技术对牛奶中的残留抗生素进行了定性及定量测定,指出该方法的突出优点是可免去对待测牛奶繁琐的预处理过程。

2 TLC 生物自显影对胆碱酯酶抑制剂的筛选

利用 TLC 生物自显影可对具有胆碱酯酶抑制活性的化合物进行筛选。根据 Ellman 等报道,乙酰胆碱酯酶抑制剂的生物活性测定原理如下^[4]:以硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine)为底物,DTNB[5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]为染料。将底物、染料及酶依次涂布在吸附了待测化合物的薄层板上,底物在乙酰胆碱酯酶的存在下发生水解反应,水解产生的硫代胆碱(thiocholine),其与染料 DTNB 进一步发生反应,形成黄色化合物 5-巯基-2-硝基苯甲酸盐(5-thio-2-nitrobenzoate)。在薄层板上,有活性化合物存在的部分由于活性化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制作用,以上化学反应无法进行而呈现白色,其他部分由于乙酰胆碱酯酶的作用生成 5-巯基-2-硝基苯甲酸盐而显黄色。该反应现象一般应在 15 min 以内观察完毕,因为 20~30 min 以后,结果会自动消失^[4]。Kiely 等利用 Ellman 法首次在 TLC 板上对具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的化合物进行了定性测定,他们将待测物在 TLC 板上点样后并没有展开,只是对它的抑制活性进行了评估。Rhee 等^[4]为在石蒜植物中发现除加兰他敏以外的乙酰胆碱酯酶抑制剂,将 15 种石蒜提取物在 TLC 板上展开后再进行生物活性测定,并以加兰他敏作为对照,薄层板上其他抑制斑点即显示为非加兰他敏乙酰胆碱酯酶抑制剂。利用该方法指导提取分离可大大节省活性化合物的分离时间,此外,该方法比 UV 及 Dragendorff 试剂检测法更加灵敏,并且实验所需乙酰胆碱酯酶抑制剂的最小检测量比微量盘测定法小得多。

除乙酰胆碱酯酶抑制剂外,Marston 等^[15]利用 TLC 生物自显影还对植物中具有丁酰胆碱酯酶抑制活性的化合物进行了筛选。他们用乙酸萘酯和 Fast Blue B 盐来检测酶的活性,薄层板上胆碱酯酶非抑制区域会由于乙酸萘酯和 Fast Blue B 盐分别转化为萘酚和一种重氮类化合物而呈现紫色的背景色,而活性区域仍呈现白色。

3 TLC 自显影对自由基清除剂及抗氧化剂的筛选

TLC 自显影可对天然提取物中具有自由基清除及抗氧化活性的化合物进行筛选。在展开的薄层板上喷洒 0.2% 的 DPPH 甲醇溶液,30min 后活性部位显黄色,而薄层板其余

表 1 TLC 生物自显影对具有抗菌和抗真菌活性的天然产物的筛选应用^[7,8,10-13]Table 1 Antibacterial and antifungal compounds in natural products identified by TLC bioautography^[7,8,10-13]

来源	提取溶剂	受试生物体	方法	活性成分	MID/Lg	对照品	MID/Lg
大萼金丝桃 <i>Hypericum calycinum</i>	石油醚	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	1-(4-(3-methylbut-2-enyloxy)-2,6-dihydroxy-3-methylphenyl)-3-methylbutan-1-one	0.7		
绵三七 <i>Eriosema tuberosum</i>	二氯甲烷	<i>C. cucumerinum</i> / <i>Candida albicans</i>	直接 TLC 生物自显影检测法/琼脂覆盖法	千斤拔素 D 鸡头薯酮 A* 鸡头薯酮 B* 鸡头薯酮 C* 鸡头薯酮 D*	5/1 10/1 5/5 5/1 5/1	Propiconazole/ 咪康唑	0.001/0.01
巴西金丝桃 <i>Hypericum brasiliense</i>	汽油	<i>Bacillus subtilis</i>	琼脂覆盖法	地耳草素 A 湿生金丝桃素 A isouliginosin B 巴西金丝桃酚 A*	0.5 0.2 0.16 0.32	氯苯西林 氯霉素	0.01 0.001
灌状韦氏木 <i>Westringia fruticosa</i> 、 柳枝韦氏木 <i>Westringia viminalis</i>	氯仿, 80% 乙醇水溶液	<i>C. cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	6-O-[Z]-4-methoxycinnamoyl-catalpol* 6-O-([E]-3,4-dimethoxy-cinnamoyl)-catalpol	10 25		
松生拟层孔菌 <i>Fomitopsis pinicola</i>	二氯甲烷	<i>B. subtilis</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	polyporenic acid C 3Acetyloxylanosta-8,24-dien-21-oic acid polyporenic acid A trametenolic acid 拟层孔菌酸*	1 0.01 0.2 2.5 0.1	氯霉素	0.01
雅致香茶菜 <i>Plectranthus elegans</i>	氯仿	<i>C. cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	11-hydroxy-12-oxo-7,9(11),13-abietatriene* 7A 11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene* alkylresorcinols	1 1 —	两性霉素	< 0.5
裸麦 <i>Hordeum vulgare</i>	二氯甲烷	<i>C. cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法		—		
膨大胡椒 <i>Piper dilatatum</i>	二氯甲烷	<i>C. cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	taboganic acid* methytabogonate 2,2-dimethyl-6-carboxycholesterol-4-one methyl ester 2,2-dimethyl-6-carboxycholesterol methyl ester	5 5 3 1	咪康唑	1
抱萼獐牙菜 <i>Swertia calycina</i>	二氯甲烷	<i>C. cucumerinum</i> / <i>Candida albicans</i>	直接 TLC 生物自显影检测法/琼脂覆盖法	2-methoxy-1,4-naphthoquinone*	0.1/0.4	Propiconazole	0.1/0.001
好望角姜饼树 <i>Parinari capensis</i>	二氯甲烷	<i>C. cucumerinum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	(4R,9R)-10-hydroxy-9-methyl-15-oxo-20-norkaur-16-en-18-oic acid C-lactone* (4R,9R)-10-hydroxy-13-methoxy-15-oxo-20-norkaur-16-en-18-oic acid C-lactone*	— —		
墨绿藤黄 <i>Garcinia atrovirens</i>	正丁醇	<i>C. herbarum</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	1,14-epoxy-2-methyl-2-(butoxy-carbonyl)-3-butoxy-carbonyl-2-hydroxy-3-propanolide* 2-(butoxy-carbonyl)-3-butoxy-carbonyl-2-hydroxy-3-propanolide*	0.4 0.8	环己亚胺	0.5
短穗黄芪 <i>Astragalus brachystachys</i>	丙酮	<i>B. subtilis</i>	直接 TLC 生物自显影检测法	南欧丹参醇 14R-epoxysclareol* 6Bhydroxysclareol*	20/14 ^a 20/13 ^a 20/8 ^a	五氯酚	1/15 ^a
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 168	丁醇	<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	琼脂覆盖法	bacilysin	—		

续表 1

来源	提取溶剂	受试生物体	方法	活性成分	MID/Lg	对照品	MID/Lg
微凹土密树 Bridelia retusa	二氯甲烷、 醋酸乙酯、 15% 甲醇 醋酸乙酯 溶液	C. cladosporioides	直接 TLC 生 物自显影 检测法	(E)-4-(1, 5-dimethyl-3-oxo-1-hexenyl)benzoic acid*	50		
				(E)-4-(1, 5-dimethyl-3-oxo-1-4-hexenyl)benzoic acid*	25		
				(R)-4-(1, 5-dimethyl-3-oxo-4-hexenyl)benzoic acid*	5		
				(R)-4-(1, 5-dimethyl-3-oxohexyl)benzoic acid	25		
				(-)-isonchamic acid*	10		
				(+)-sesamin 4-isopropylbenzoic acid	25 10		
美国崖椒 Fagara zanthoxyloides	二氯甲烷	C. cucumerinum/ Candida albicans, B. subtilis	直接 TLC 生 物自显影 检测法/琼 脂覆盖法	dihydrocupidiol	0.01/-, -	咪康唑/咪康唑、 氯霉素	1/0.1, 1
				凸尖花椒二醇	0.1/10, 10		
				phenylpropanol	0.1/-, -		
				(+)-sesamin N-isobutyl-(2Z, 4Z)- delta-2, 4-dienamide	0.1/-, - 0.1/10, 10		
道氏蒿 Artemisia douglassiana	水蒸气蒸 馏	Colletotrichum spp.	直接 TLC 生 物自显影 检测法	普通茼蒿酮 B	—		
漆叶花椒 Zanthoxylum rhoifolium	甲醇	S. aureus, S. epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli	琼脂覆盖法	6-acetonyldihydroneuridin	1.06 ~ 3.12	阿莫西林	0.2
				6-acetonyldihydroavicine	1.06 ~ 3.12		
Z. rhoifolium	二乙醚	S. aureus, K. pneumoniae	琼脂覆盖法	花椒素	3.12 ~ 12.5		
葡萄枪刀药 Hypoestes serpens	二氯甲烷	C. cucumerinum/ Candida albicans	直接 TLC 生 物自显影 检测法/琼 脂覆盖法	essential oil of the leaves	1.06 ~ 12.5	阿莫西林	0.2
				essential oil of the fruits	12.5 ~ 50		
				fusicosperenol A dolabeserpenoic acid A	— —		
近皮氏百部 Stemona cf. pierrei	氯仿	C. herbarum	直接 TLC 生 物自显影 检测法	百部菲 A*	10 ^b		
				百部菲 B*	10 ^b		
				百部菲 C*	10 ^b		
				百部菲 D	10 ^b		
				百部 G	10 ^b		
				百部 B	10 ^b		
				dihydropinosylvin	10 ^b		
				stilbene pinosylvin	10 ^b		

* 新化合物或首次从该植物中分离得到的天然产物 a: 新化合物点样量/抑菌斑的直径 b: 薄层板上抑菌斑的大小表明其抑菌活性 —: 未测定

* new compound or new natural product isolated from a plant a: amount of new compound charge on TLC plate/ inhibitory zone diameter b: white inhibitory zones of different size on TLC plate indicates degree of antifungal activity —: not detected

部分显紫色, 由此可区分活性化合物和非活性化合物^[13, 16, 17]。这是因为, 自由基清除剂或抗氧化剂可将紫色的 1, 1-二苯基-2-苦肟基自由基(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)转化为黄色的二苯基苦肟基(diphenylpicrylhydrazine, DPPH-H)^[16]。此外, 还可用 B-carotene 进行检测, 如 Cespedes^[18]和 Torres^[19]等将 0.05% B-carotene 氯仿溶液喷洒到待测薄层板上显色, 用 U_V254nm 光照射后, 薄层板上的背景色褪去, 活性部位仍显黄色。与此相似, Silva^[20]和 Corsino^[21]等用 0.02% B-carotene 二氯甲烷溶液进行检测, 仅在自然光的照射下即可使薄层板上的背景色褪去。该方法在天然药物化学中的部分应用情况见表 2。

4 TLC 生物自显影的定量应用

TLC 生物自显影不仅可用于定性测定, 也可用于定量测

定。活性化合物通过 TLC 生物自显影, 抑制斑点的大小通常随点样量的增加而增大。Singh 及 Adnarayana 等^[22]通过对一系列测量数据的统计数据指出, 抗生素抑制斑点的面积/直径比(S/d)与药物浓度(C)之间存在量性相关关系, 以 logC(C 为抑菌斑点上药物的浓度)为自变量, log S/log d 为因变量, 进行直线回归, 可得标准曲线。Ramirez 等^[31]利用 TLC 生物自显影得到了氯霉素(chloramphenicol)、氨苄青霉素(ampicillin)、苯甲基青霉素(benzylpenicillin)、双氯青霉素(dicloxacillin)和红霉素(erythromycin)的标准曲线: Y= a+ b lnC, Y 为抑菌斑点的直径(mm), C 为药物的质量浓度(Lg/mL), 回归系数分别为 0.998 8、0.960 8、0.987 3、0.998 4 和 0.999 9。由于 Rf 值的变化常会引起 S/d 比产生较大的变化, Ad-narayana 等^[22]提出用 PRA/PRD(PRA= 抑菌斑面积/

表 2 TLC 自显影对具有自由基清除活性的天然产物的筛选^[13, 16-21]Table 2 Natural products with free radical scavenging activity identified by TLC autography technique^[13, 16-21]

来源	提取溶剂	活性化合物	活性	对照品	对照品活性
布氏 Fagraea blumei	甲醇	布氏灰莉苷	—		
美国崖椒 Fagara zanthoxyloides	二氯甲烷	cis-fagaramide trans-fagaramide (+)-sesamin 8-acetyl dihydroch elerythrine	10 Lg ^a 10 Lg ^a 10 Lg ^a 10 Lg ^a	槲黄素	1 Lg ^a
水薄荷 Mentha aquatica	正己烷	1, 8-cineole	—		
长叶薄荷 Mentha longifolia	正己烷	menthone+ isomenthone mixture of mono-and sesquiterpene hydrocarbons	— —		
辣薄荷 Mentha piperita	正己烷	isomenthone menthone	— —		
毛花 Globularia trichosantha	甲醇	mixture of mono-and sesquiterpene hydrocarbons 毛蕊花苷 毛花球花苷 A* 草苈蓉苷 A	— — — —		
柳叶 Polyg onum salicifolium	正丁醇	trichosan thoside B* quercetin-3-O-BD-glucopyranoside quercetin-3-O-BD-galactopyranoside quercetin-3-O-(2-O-galloyl)-BD-glucopyranoside quercetin-3-O-BD-glucuronopyranoside kaempferol-3-O-BD-glucopyranoside kaempferol-3-O-BD-galactopyranoside	more more more more lower lower	槲黄素	2~9 Lg
柄花菊 Podanthus ovatifolius	甲醇、二氯甲烷	deacetylovatifolin 1, 10-epoxyovatifolin	54.5 Lmol/L 62.7 Lmol/L	槲黄素	26.4 Lmol/L ^b
米氏柄花菊 Podanthus miquoi	甲醇、二氯甲烷	柄花菊素 11, 13-dihydroovatifolin	— —		
线酒神菊 Baccharis linnearis、马吉冷酒神菊 B. magellanica、伞形酒神菊 B. umbellif or mis	二氯甲烷	10, 11-epoxy tremetone 4-hydroxy tremetone 10, 11-epoxy-4-hydroxy tremetone	62.6 Lmol/L ^b 53.2 Lmol/L ^b 30.6 Lmol/L ^b	四羟基醌 羟基茴香醚	9.37 Lmol/L ^b 26.4 Lmol/L ^b
朱鲁艾里花 Iryanthera juruensis	正己烷	7-methyl-sargachromenol 马尾藻色烯醇 epi-guaiaacin guaiaacin 疣雅木素 蜜腺樟素 B	10 Lg 10 Lg 10 Lg 10 Lg 10 Lg 10 Lg		
刺叶美登木 Maytenus aquifolium	醋酸乙酯	epigallocatechin (+)-ouratea-catechin proanthocyanidin quercetin 3-O-A-L-rhamnopyranosyl(1-6)-O-[B-D-glucopyranosyl(1-3)-O-A-L-rhamnopyranosyl-(1-2)]-O-BD-glucopyranosyl kaempferol 3-O-A-L-rhamnopyranosyl(1-6)-O-[B-D-glucopyranosyl(1-3)-O-L-rhamnopyranosyl-(1-2)]-O-B-D-glucopyranosyl	10 Lg 10 Lg 10 Lg 10 Lg 10 Lg		
危险丝兰 Yucca periculosa	甲醇	雷黎芦酚 3, 5, 3', 5'-tetrahydroxy-4-methoxy-stilbene	25.27 Lmol/L ^b 22.22 Lmol/L ^b	生育酚 咖啡酸	11.86 Lmol/L ^b 2.13 Lmol/L ^b

* 新化合物或首次从该植物中分离得到的化合物 a: 半数抑菌量 b: 50% 抑制浓度 —: 未测定

* new compound or new natural product isolated from a plant a: minimum inhibitory dose b: 50% concentration on inhibition —: not be detected

准斑面积 × 100, PRD= 抑菌斑直径/标准斑直径 × 100) 代替面积/直径, 以消除 Rf 值的影响, 在对三苯基锡类抗生素 TPTA、TPTC 和 TPTH 和 TLC 生物自显影结果进行直线回归后, 得到回归方程: lgPRA/lgPRD= b+ algC, 3 种抗生素的回归系数分别为 0.99/0.99、0.99/0.99 和 0.998/0.95。

5 TLC 生物自显影技术的优势和不足

与其他生物活性测定的方法相比, TLC 生物自显影的优点很多, 它无需特殊的仪器设备, 操作简单, 实验耗费低, 灵敏度和专属性高, 生物活性的测定速度快^[2, 3, 4]。并且, 由于薄层色谱展开技术的应用, TLC 生物测定法不仅可对化合物的

生物活性进行测定而且对化合物的代谢产物或转化物的生物活性也可同时进行测定。TLC 生物测定法的这一特点对那些本身无生物活性但代谢产物或转化物有生物活性的化合物的筛选具有重要的意义。如: Sluis^[23] 等将 iridodib 和 secoiridoib 葡萄糖苷点样于薄层板后, 先用一定浓度的 B 葡萄糖苷酶水解, 然后再进行 TLC 生物自显影, 由此发现了一些具有抗菌活性的葡萄糖苷类前药。

TLC 生物测定方法在应用过程中也存在一定的局限性。例如: TLC 生物自显影法对各种具有细胞毒性的化合物如喜树碱素、quassinoid 类和木酚素类化合物不敏感, 大部分的此

类化合物在 TLC 板无法形成抑制斑点。此外, TLC 生物自显影法并不适用所有极性的化合物^[9]。由于 TLC 生物自显影使用的微生物培养基一般用水作溶剂, 极性较大, 因此要求被测化合物的极性不能太大也不能太小。极性太大, 化合物扩散太快不易形成抑制斑点; 极性太小, 化合物不易进入介质同样不能形成抑制斑点。

6 结语

目前, 天然药物化学的研究已从单一的“化合物”模式转向“化合物+生物活性”模式^[1], 因此, 快速、有效、方便的生物活性测定技术在天然药物化学中已占有越来越重要的位置。TLC 生物自显影技术已经发展了几十年, 是一个相对比较成熟的技术, 与其他活性试验方法配合使用, 可对化合物的活性进行准确的评估, 由于它还具有操作简单、测定速度快等优点, 因此, 它是一种非常适合于在天然药物化学实验室开展的生物活性测定方法。TLC 生物自显影技术的应用空间很大, 其起初主要用于对具有抗菌/真菌化合物的筛选, 后来发展到对自由基清除剂及抗氧化剂、胆碱酯酶抑制剂的筛选, 相信随着天然药物化学与其他相关学科的相互渗透, 其用途还会更加拓宽。

References:

[1] Phillipson J D. 50 Years of medicinal plant research—every progress in methodology is a progress in science [J]. *Planta Med*, 2003, 69(6): 491-495.

[2] Choma I, Grenda D, Malinowska I, et al. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 734(1): 7-14.

[3] Ramirez A, Gutierrez R, Diaz G, et al. High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 784(2): 315-322.

[4] Rhee I K, van de Meent M, Ingkaninan K, et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 915(1-2): 217-223.

[5] Choma I M, Choma A, Staszczuk K. Determination of flumequine in milk by thin-layer chromatography-bioautography [J]. *J Liq Chrom Rel Technol*, 2002, 25(10/11): 1579-1587.

[6] Wedge D E, Galindo J C, Macias F A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(7): 747-757.

[7] Jassbi A R, Zamanizadehnajari S, Azar P A, et al. Antibac-

terial diterpenoids from *Astragalus brachystachys* [J]. *Z Naturforsch*, 2002, 57(11-12): 1016-1021.

[8] Dellar J E, Cole M D, Waterman P G. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 735-738.

[9] Wedge D E, Nagle D G. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(8): 1050-1054.

[10] Rasoamiaranjanahary L, Marston A, Guilet D, et al. Antifungal diterpenes from *Hypocistes serpens* (Acanthaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 333-337.

[11] Mackeen M M, Ali A M, Lajis N H, et al. Antifungal garcinia acid esters from the fruits of *Garcinia atroviridis* [J]. *Z Naturforsch*, 2002, 57(3/4): 291-295.

[12] Meepagala K M, Kuhajek J M, Sturtz G D, et al. Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana* [J]. *J Chem Ecol*, 2003, 29(8): 1771-1780.

[13] Chaab F, Queiroz E F, Ndjoko K, et al. Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(4): 316-320.

[14] Williams L A, Vasques E, Reid W, et al. Biological activities of an extract from *Cleome viscosa* L. (Capparaceae) [J]. *Naturwissenschaften*, 2003, 90(10): 468-472.

[15] Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1): 51-54.

[16] Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils [J]. *Planta Med*, 2003, 69(5): 413-419.

[17] Calis I, Kirmizibekmez H, Ruegger H, et al. Phenylethanoid glycosides from *Globularia trichosanthes* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(8): 1165-1168.

[18] Cespedes C L, Uchoa A, Salazar J R, et al. Plant growth inhibitory activity of p-hydroxyacetophenones and tremetones from Chilean endemic, *Baccharis* species and some analogous: a comparative study [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(8): 2283-2292.

[19] Torres P, Avila J G, Romo de Vivar A, et al. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(2): 463-473.

[20] Silva D H, Pereira F C, Zanoni M V, et al. Lipophilic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(3): 437-442.

[21] Corsino J, Silva D H, Zanoni M V, et al. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium* [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(8): 913-916.

[22] Adinarayana M, Singh U S, Dwivedi T S. A biochromatographic technique for the quantitative estimation of triphenyltin fungicides [J]. *J Chromatogr*, 1988, 435(1): 210-218.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本, 包括: 1974-1975年、1976年、1979年、1985-1994年(80元/年)、1995-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年); 1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)。欢迎订购。
电话: (022) 27474913; (022) 23006821(传真)。