

## · 综述 ·

## HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然活性成分筛选中的应用

王晓飞, 焦海胜, 李玉民\*

兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730030

**摘要:** HPLC 由于分离度和灵敏度高, 其在柱后与生物活性检测联用形成的天然活性成分筛选技术, 具有操作简单、耗费低、灵敏度和专属性高等优点, 已用于天然产物中抗氧化剂、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂、磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂、血管紧张素转移酶 (ACE) 抑制剂、细胞色素 P450 抑制剂等的筛选。综述了 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然活性成分筛选研究中的应用, 同时对其优点和不足进行了总结。

**关键词:** HPLC; 生物活性检测; 天然产物; 活性成分; 筛选

**中图分类号:** R285.51      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2013)08-1047-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.025

## Application of on-line technology with HPLC-post-column bioactivity assay in screening active constituents from natural products

WANG Xiao-fei, JIAO Hai-sheng, LI Yu-min

Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

**Key words:** HPLC; bioactivity assay; natural products; active constituent; screening

随着“回归自然”浪潮的兴起, 以及对药物毒副作用及耐药性的认识, 从天然产物中寻找安全有效的药物已引起国内外学者的高度重视。然而, 由于天然产物化学成分的多样性及作用机制的复杂性, 天然活性成分的筛选一直是药物研究的瓶颈。随着科学技术的发展, 天然活性成分的筛选方法已经由传统的化学分离、结构鉴定、活性测定模式发展到了活性导向的分离, 进而形成了以药物基本特性为基础的 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术。该技术由于实现了化学分离和生物活性检测的同步进行, 克服了传统药物筛选方法存在的操作繁琐、成本高等缺点, 已被广泛地应用于天然产物中抗氧化剂<sup>[1]</sup>、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂、磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂、血管紧张素转移酶 (ACE) 抑制剂、细胞色素 P450 抑制剂等的筛选。本文综述了 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然活性成分筛选中的应用, 同时探讨了其优点和不足。

### 1 天然抗氧化剂

利用抗氧化剂的化学特性 (还原性), 采用 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术建立的天然产物中抗氧化剂的筛选方法, 是将经分离的化合物在柱后与抗氧化活性检测试剂作用, 最终通过作用前后吸光度是否发生变化, 是否引起检测试剂结构发生变化来进行筛选。根据活性检测试剂的不同, 该方法可分为 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法、2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二盐 (ABTS) 法<sup>[1]</sup> 和磷钼络合物法。HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然产物中筛选抗氧化剂的应用见表 1。

#### 1.1 DPPH 法

Koleva 等<sup>[13]</sup>首次采用 HPLC-柱后生物活性检测 DPPH 法建立了天然产物中抗氧化剂的筛选方法。其在柱后的筛选原理见图 1。

DPPH 自由基 (DPPH·) 在溶液中显紫色, 在 517 nm 处有最大吸收。当抗氧化剂在柱后与 DPPH·

收稿日期: 2012-10-15

基金项目: 甘肃省消化系肿瘤重点实验室开放基金 (lzujbky-1022-t03)

作者简介: 王晓飞, 博士, 主要从事天然产物分离研究。Tel: (0931)8942491 E-mail: wxf\_2511@yahoo.com.cn

\*通信作者 李玉民 E-mail: liym@lzu.edu.cn

表1 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在抗氧化剂筛选的应用

Table 1 Application of on-line technology with HPLC-post-column bioactivity assay in anti-oxidant screening

样品	检测试剂	活性成分	文献
苹果	DPPH	儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、根皮苷	2
华丽紫铆	DPPH	原矢车菊素 B <sub>2</sub> 、(-)-表儿茶素、原矢车菊素 B <sub>3</sub>	3
迷迭香	DPPH	carosol、carosic acid carnosaldehyde、12-methoxycarnosic acid、epiisorosmanol	4
薄荷	DPPH	咖啡酸、圣草枸杞苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、迷迭香酸	5
桑葚	DPPH	矢车菊素 3-葡萄糖苷、矢车菊素 3-芸香糖苷、绿原酸及其同分异构体	6
山楂花	DPPH	绿原酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷, 9个未鉴定成分	7
当归	ABTS	coniferyl ferulate	8
普洱茶	ABTS	表儿茶素、芦丁、没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素、没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯、槲皮素-3-葡萄糖苷, 1个未鉴定成分	9
金露梅	ABTS	鞣花酸、儿茶素、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷、槲皮素-3-芸香糖苷、槲皮素-3-阿糖胞苷、山柰酚-3-芸香糖苷、异鼠李素-3-葡萄糖苷、异鼠李素-3-半乳糖苷	10
大根老鹤草	ABTS	没食子酸、鞣花酸、4-没食子酰基奎尼酸、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷、槲皮素-4-葡萄糖苷	11
鹿根	ABTS	绿原酸、β-蜕皮激素、六羟黄酮-7-葡萄糖苷、六羟黄酮-7-(6-乙酰基葡萄糖苷)、6-羟基山柰酚-7-葡萄糖苷、6-甲氧基山柰酚-7-葡萄糖苷、6-羟基山柰酚-7-(6-乙酰基葡萄糖苷)	12

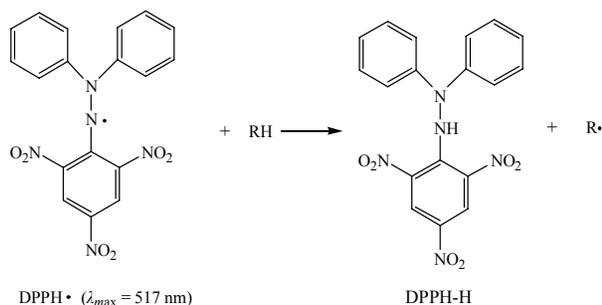


图1 DPPH法筛选原理

Fig. 1 Mechanism of DPPH screening

作用时, 一个或多个氢从抗氧化剂上转移至 DPPH• 上, 生成结构稳定的 DPPH-H, 其在 517 nm 的吸收消失。该方法中天然产物经 HPLC 分离, 流出物在柱后进入活性检测单元与 DPPH• 作用后, 利用作用前后吸光度的变化, 即作用后在色谱图中形成倒峰, 进行抗氧化剂的筛选。Koleva 等<sup>[13]</sup>指出该方法由于反应环的存在, DPPH• 浓度、反应时间、流动相的组成及 pH 严重影响该法的筛选灵敏度。研究表明, 当 DPPH• 浓度为  $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、反应时间为 30 s 时, 该法的筛选灵敏度最高; 然而当采用酸性流动相时, 该法的灵敏度显著降低。

为了提高筛选灵敏度, Dapkevicius 等<sup>[14]</sup>对此方法进行了改进, 优化了 DPPH• 溶液的组成及体积流量, 采用氢气净化 DPPH• 溶液, 增加了一个脉

冲阻尼器和采用一种专用钨灯检测器; 在 DPPH• 溶剂中加入了缓冲盐, 利用酸性较高的流动相, 检测限显著提高, 该方法的筛选灵敏度提高了 30 倍。从色谱学角度看, 酸性的流动相能够有效分离多酚类化合物。因此, 改进的方法应该适用于天然产物中多酚类化合物的筛选, 然而该方法只能用于筛选不能有效地检测抗氧化活性的抗氧化剂。

为了能够定量检测抗氧化剂的抗氧化活性, Bandoniene 和 Murkovic 等<sup>[2,15-16]</sup>在运用 DPPH 法筛选过程中, 采用了容积较小的反应环, 这样可以有效地防止倒峰的峰展宽; 通过和标准抗氧化剂的抗氧化活性比较, 能够有效地定量测定其抗氧化活性。

为了确定筛选出的抗氧化剂的化学结构, Nuengchamnong 等<sup>[3]</sup>在筛选天然抗氧化剂时联用了质谱, 该方法的缺点是采用了内径较大的反应环, 且在反应环中反应流速较小, 其质谱图中的信号峰明显展宽。Pukalskas 等<sup>[4]</sup>在筛选天然抗氧化剂时, 为了确定抗氧化剂的化学结构联用了固相萃取-核磁共振 (SPE-NMR), 该方法的缺点是灵敏度较低。

### 1.2 ABTS 法

Koleva 等<sup>[17]</sup>首次采用 HPLC-柱后生物活性检测 ABTS 法筛选天然产物中抗氧化剂, 其筛选原理见图 2。

ABTS<sup>•+</sup>在 743 nm 处有最大吸收。当抗氧化剂存在时, ABTS<sup>•+</sup>转变成结构稳定的 ABTS, 其在 743 nm

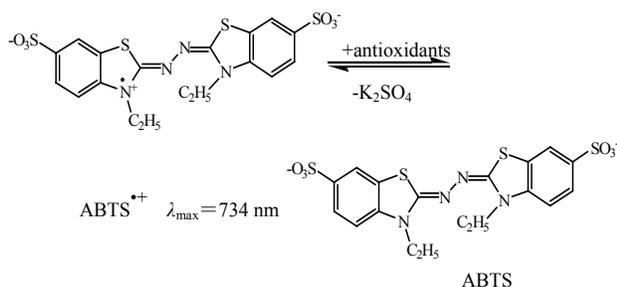


图2 ABTS法筛选原理

Fig. 2 Mechanism of ABTS screening

的吸收消失。与 DPPH 法相比, ABTS 法具有较高的筛选灵敏度; 同时由于 ABTS<sup>•+</sup> 水溶性更强, 其应用范围比 DPPH 法的应用范围更广<sup>[17]</sup>。Stewart 等<sup>[18]</sup> 在运用 ABTS<sup>•+</sup> 筛选天然抗氧化剂的研究中, 除了采用了不同的反应环和反应温度外, 还安装了一种在线 ABTS<sup>•+</sup> 脱气系统, 但这种系统的使用, 使得此方法的筛选灵敏度大大降低。为了确定抗氧化剂的结构, Li 等<sup>[8]</sup> 在运用 ABTS<sup>•+</sup> 筛选天然抗氧化剂的研究中, 联用了 UV 和 MS。

### 1.3 磷钼络合物法

磷钼络合物法是在酸性条件下利用磷钼试剂, 采用 HPLC 柱后生物活性检测在线联用技术建立的一种筛选抗氧化剂的方法<sup>[19]</sup>。这种方法最初是用来确定环境中的磷和硅<sup>[20]</sup>。为了测定样品中的磷, 样品与酸性的钼(VI)溶液混合, 产生 (PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>)<sup>3-</sup>。这种负离子在还原剂的存在下, 被还原生成蓝色的 (PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>)<sup>7-</sup><sup>[21]</sup>。根据这一特性, 可以运用比色计测定 (PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>)<sup>7-</sup> 的量来确定样品中磷的量。

Cardenosa 等<sup>[19]</sup> 首先采用 HPLC 对天然产物进行分离, 流出物在柱后反应环中与 6 价的磷钼试剂及磷试剂混合进行反应, 生成 5 价的蓝色磷钼络合物, 然后在 598 nm 对磷钼络合物进行测定, 具有抗氧化活性的化合物呈倒峰。此方法简单, 便于应用, 但由于在使用过程中需要高温条件限制了其广泛应用。

### 2 AChE 抑制剂

采用 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术从天然产物中筛选 AChE 抑制剂的方法是由 Ingkaninan 等<sup>[22]</sup> 首次建立的。其在柱后的筛选原理见图 3。

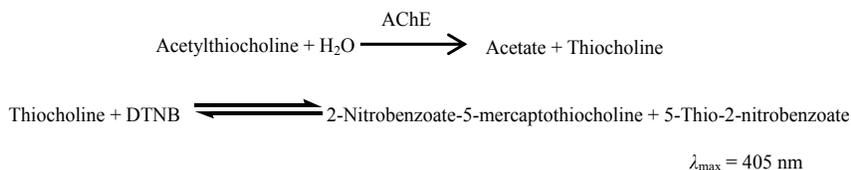


图3 AChE抑制剂筛选原理

Fig. 3 Mechanism of AChE inhibitor screening

AChE 抑制剂存在时, AChE 活性降低, 生成硫胆碱的量减少, 进而使硫胆碱与 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应生成的 5-Thio-2-nitrobenzoate 的量减少。在该方法中天然产物经 HPLC 分离后, 流出物在柱后进入活性检测单元与检测试剂作用后, 405 nm 检测吸光度, 具有 AChE 抑制活性的化合物呈倒峰。Ingkaninan 等<sup>[22]</sup> 指出 HPLC-柱后生物活性在线检测筛选 AChE 抑制剂的流动相组成、反应温度对筛选灵敏度具有显著影响, 研究表明甲醇-水系统比乙腈-水系统更适合于对天然产物中 AChE 抑制剂的筛选。由于天然产物中 AChE 抑制剂多为生物碱, 为了获得较好的分离度, 需在流动相中加入碱性试剂, 然而碱性试剂对 AChE 的活性具有抑制作用。经优化, 当流动相为甲醇-0.1 mol/L 乙酸铵水 (30:70) 时, 该方法的筛选灵敏度最高。此外, 该方法的筛选灵敏度随着温度的升高而增加, 当温度为 50 °C 时, 该方法对

加兰他敏的筛选灵敏度最高。

为了提高该方法的筛选灵敏度, Fabel 等<sup>[23]</sup> 对该方法进行了改进, 采用了空气整段间隔流动的方法泵入活性检测试剂。经改进, 有效地避免了流出物在柱后反应环中与检测试剂作用时间长而引起的峰展宽, 从而提高筛选灵敏度。由于荧光检测器比紫外-可见检测器的检测灵敏度高, Rhee 等<sup>[24]</sup> 采用了碘化 7-乙酰氧基-1-甲基-喹啉 (AMQI) 在柱后与 AChE 反应, 经分解产生荧光物质碘化 7-羟基-1-甲基喹啉 (HMQI)。当 AChE 抑制剂存在时, 其抑制了 AChE 的活性, 进而抑制了 HMQI 的生成。Rhee 等<sup>[24]</sup> 利用此法对加兰他敏的筛选灵敏度为 0.5 μmol, 筛选灵敏度显著提高。HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然产物中乙酰胆碱酯酶抑制剂筛选的应用见表 2。

### 3 PDE 抑制剂

PDE 可以和 2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)环磷酸鸟

表2 HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在AChE抑制剂筛选的应用

Table 2 Application of on-line technology with HPLC-post-column bioactivity assay in AChE inhibitor screening

样品	柱后检测器	活性成分	文献
水仙	UV	加兰他敏和一未鉴定成分	22
水仙	UV	ungiminorine	25
水仙	UV	加兰他敏	26
纳丽石蒜	FD	恩其明	27

苷(mant-cGMP)、2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)环磷酸腺苷(mant-cAMP)反应,分别生成2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)磷酸鸟苷(mant-GMP)和2'-(N-甲基邻氨基苯甲酰)磷酸腺苷(mant-AMP),与mant-cGMP和mant-cAMP相比,mant-GMP和mant-AMP的荧光强度明显降低。PDE抑制剂存在时,可抑制PDE的活性,进而使反应生成的mant-GMP和mant-AMP量减少。根据这一原理,Schenk等<sup>[28]</sup>建立了HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术筛选天然产物中PDE抑制剂的方法,并对筛选过程中影响筛选灵敏度的各因素进行了优化,并指出当PDE浓度为4 mU/mL,mant-cGMP浓度为10 μmol/L,反应温度为30 °C时,筛选灵敏度最高;当使用甲醇-水作流动相时,柱后对PDE活性影响较小。

#### 4 ACE抑制剂

荧光自淬灭剂abz-FRK(dnp)P-OH在ACE的作用下,生成荧光物质abz,ACE抑制剂会和abz-FRK(dnp)P-OH竞争性地与ACE作用,生成的荧光物质abz的量降低。根据这一原理,van Elswijk等<sup>[29]</sup>建立的HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术筛选天然产物中ACE抑制剂的方法与典型的筛选系统结构相比较,其具有2个反应环。应用该方法从水解牛奶中筛选出多种肽类化合物,具有ACE抑制作用<sup>[28]</sup>。

#### 5 细胞色素P450抑制剂

乙氧基卤试灵在细胞色素P450的作用下,可以生成荧光物质卤试灵。细胞色素P450抑制剂和乙氧基卤试灵会竞争性地与细胞色素P450反应,生成的荧光物质减少。根据这一原理,Kool等<sup>[30]</sup>建立了HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术筛选天然产物中细胞色素P450抑制剂的方法。

该方法与典型的筛选系统结构相比较,其在柱后流出物进入活性检测单元前,增加了2个HPLC泵。这2个泵可以分别泵入水和有机溶液,保证在

进入活性检测单元时溶剂系统不发生变化,减少对细胞色素P450的影响,并指出在活性检测单元中,酶浓度、乙氧基卤试灵浓度、有机溶剂浓度、反应温度对筛选灵敏度影响显著。研究表明,当酶质量浓度为19.7 μg/mL,乙氧基卤试灵浓度为150 nmol/L,有机溶剂甲醇或乙腈体积分数分别为3%~6%、1%~3%,反应温度为37 °C时,筛选灵敏度最高。Jeurissen等<sup>[31]</sup>对卡瓦和罗勒提取物进行了筛选,从中分别确定了5种和3种细胞色素P450s抑制剂,其结构尚未确定。

#### 6 结语

目前,天然产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,因此,快速、有效、方便的天然活性成分筛选技术在天然产物化学中已占有越来越重要的位置。应用HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术筛选天然产物中有效成分的方法已经发展了近10年,加之其具有操作简单、筛选速度快等优点,该方法是一种非常适合于天然活性成分高通量筛选的方法。目前,该方法以应用于对具有抗氧化、抑制AChE、抑制PDE、抑制ACE、抑制细胞色素P450等活性成分的筛选。相信随着天然药物化学与其他相关学科的相互渗透,其用途还会更加宽广。

#### 参考文献

- [1] 王璐,孙莉琼,苏航,等.联用技术在自由基清除物筛选中的应用[J].中草药,2012,43(5):1032-1036.
- [2] Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9): 2482-2487.
- [3] Nuengchamnong N, de Jong C F, Bruyneel B, et al. HPLC Coupled on-line to ESI-MS and a DPPH-based assay for the rapid identification of anti-oxidants in *Butea superba* [J]. *Phytochem Anal*, 2005, 16(6): 422-428.
- [4] Pukalskas A, van Beek T A, de Waard P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1/2): 81-88.
- [5] Koşar M, Dorman H J D, Isotalo J, et al. Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(16): 5004-5010.
- [6] Oki T, Kobayashi M, Nakamura T, et al. Changes in radical-scavenging activity and components of Mulberry fruit during maturation [J]. *J Food Sci*, 2006, 71(1): C18-C22.
- [7] Raudonis R, Jakštas V, Burdulis D, et al. Investigation of

- contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2009, 45(5): 382-394.
- [8] Li S Y, Yu Y, Li S P. Identification of antioxidants in essential oil of *Radix Angelicae Sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(9): 3358-3362.
- [9] Qian Z M, Guan J, Yang F Q, et al. Identification and quantification of free radical scavengers in Pu-erh tea by HPLC-DAD-MS coupled online with 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) diammonium salt assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(23): 11187-11191.
- [10] Miliuskas G, van Beek T A, Venskutonis P R, et al. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa* [J]. *J Sci Food Agric*, 2004, 84(15): 1997-2009.
- [11] Miliuskas G, van Beek T A, Venskutonis P R, et al. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum* [J]. *Eur Food Res Technol*, 2004, 218(3): 253-261.
- [12] Miliuskas G, van Beek T A, de Waard P, et al. Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(2): 168-172.
- [13] Koleva I I, Niederlander H A G, van Beek T A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(10): 2323-2328.
- [14] Dapkevicius A, van Beek T A, Niederlander H A G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912(1): 73-82.
- [15] Bandoniene D, Murkovic M. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 53(1/3): 45-49.
- [16] Bandoniene D, Murkovic M, Pfannhauser W, et al. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214(2): 143-147.
- [17] Koleva I I, Niederlander H A G, van Beek T A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(14): 3373-3381.
- [18] Stewart A J, Mullen W, Crozier A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49: 52-60.
- [19] Cardenosa R, Mohamed R, Pineda M, et al. On-line HPLC detection of tocopherols and other antioxidants through the formation of a phosphomolybdenum complex [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(12): 3390-3395.
- [20] Galhardo C X, Masini J C. Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry [J]. *Anal Chim Acta*, 2000, 417(2): 191-200.
- [21] Barrows J N, Jameson G B, Pope M T. Structure of a Heteropoly Blue. The four-electron reduced  $\beta$ -12-molybdophosphate anion [J]. *J Am Chem Soc*, 1985, 107(6): 1771-1773.
- [22] Ingkaninan K, de Best C M, van der Heijden R, et al. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 872(1/2): 61-73.
- [23] Fabel S, Niessner R, Weller M G, et al. Effect-directed analysis by high-performance liquid chromatography with gas-segmented enzyme inhibition [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1099(1/2): 103-110.
- [24] Rhee I K, Appels N, Luijendijk T, et al. Determining acetylcholinesterase inhibitor activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14(3): 145-149.
- [25] Ingkaninan K, Hazekamp A, de Best C M, et al. The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from Narcissus' Sir Winston Churchill' [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(6): 803-806.
- [26] de Jong C F, Derks R J E, Bruyneel B, et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1/2): 303-310.
- [27] Rhee I K, Appels N, Hofte B, et al. Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor s ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(11): 1804-1809.
- [28] Schenk T, Breeel G J, Koevoets P, et al. Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization [J]. *J Biomol Screen*, 2003, 8(4): 421-429.
- [29] van Elswijk D A, Diefenbach O, van der Berg S, et al. Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1020(1): 45-48.
- [30] Kool J, van Liempd S M, Ramautar R, et al. Development of a novel cytochrome P450 bioaffinity detection system coupled online to gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Biomol Screen*, 2005, 10(5): 427-436.
- [31] Jeurissen S M F, Claassen F W, Havlik J, et al. Development of an on-line performance chromatography detection system for human cytochrome P450 1A2 inhibitors in extracts of natural product [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1141(1): 81-89.

## 山竹的化学成分及其咕吨酮类化合物的药理作用研究进展

赵骁宇<sup>1</sup>, 徐增<sup>1</sup>, 蓝文健<sup>2,3</sup>, 李厚金<sup>1\*</sup>

1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

3. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006

**摘要:** 山竹是一种味美、营养和药用价值极高的水果。近年来, 对山竹的主要化学成分进行了系统研究, 发现其富含结构多样的多酚类化合物, 其中咕吨酮类化合物具有抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、抗疟疾、抗病毒、酶抑制、清除自由基等多种药理活性。对山竹化学成分及其药理作用的研究进展进行了系统地综述。

**关键词:** 山竹; 多酚类化合物; 咕吨酮类化合物; 抗肿瘤; 抗菌

中图分类号: R282.71; O629.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-1052-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.026

## Advances in studies on chemical constituents of *Garcinia mangostana* and bioactivities of xanthenones

ZHAO Xiao-yu<sup>1</sup>, XU Zeng<sup>1</sup>, LAN Wen-jian<sup>2,3</sup>, LI Hou-jin<sup>1</sup>

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

3. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Key words:** *Garcinia mangostana* L.; polyphenols; xanthenones; antitumor; antibacteria

山竹 *Garcinia mangostana* L. 又名山竹子、莽吉柿、凤果, 为藤黄科藤黄属的一种种间杂交的异源多倍体果实, 是典型的热带水果<sup>[1]</sup>。其原产于马来群岛, 现主要分布于泰国、越南、马来西亚、印尼、菲律宾等东南亚国家, 我国广东、福建、云南、台湾等省也有引种<sup>[2]</sup>。山竹果壳黑红色, 较厚; 果肉雪白色。山竹果肉含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素及矿物质元素, 素有“果后”之称。研究发现, 山竹中含有结构丰富的化合物, 且大部分具有良好的药理活性。本文对山竹主要化学成分及其药理作用研究进展进行综述。

### 1 化学成分

目前已从山竹中发现鉴定的化合物 83 个, 主要是多酚类化合物, 包括咕吨酮类、花色苷、酚酸类、聚合鞣质酸类等<sup>[3-4]</sup>。从山竹中发现的咕吨酮类化合物有 61 个<sup>[5-6]</sup>, 咕吨酮的母核结构见图 1; 酚酸类主

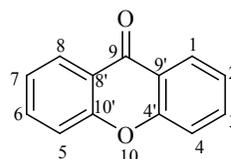


图 1 咕吨酮类化合物母核结构式

Fig. 1 Stem nucleus of xanthenone

要是对羟基苯甲酸、间羟基苯甲酸及其衍生物<sup>[7]</sup>; 花色苷类化合物主要有花青素-3-槐糖苷、花青素-3-葡萄糖苷等<sup>[8]</sup>; 聚合鞣质酸类化合物主要是阿福豆素、儿茶素以及培儿茶素等化合物的低聚物<sup>[4]</sup>。山竹中的咕吨酮类结构新颖, 具有以下规律: (1) 咕吨酮类化合物母核上的取代基主要有: 3-甲基-2-丁烯基、羟基、甲氧基。C-1 位有羟基取代基的有 58 个化合物; 只在 C-2 位有 3-甲基-2-丁烯基取代基的有 50 个化合物, 只在 C-8 位有 3-甲基-2-丁烯基取代基

收稿日期: 2012-09-11

基金项目: 广东省中医药强省科研基金 (20111164); 广东省大学生创新实验项目基金 (1055812020)

作者简介: 赵骁宇 (1991—), 主要研究领域为天然药物化学。E-mail: zhaoxiaoyu1991@163.com

\*通信作者 李厚金 Tel: (020)84113698 E-mail: ceslhj@mail.sysu.edu.cn

的有 39 个化合物，在 C-2 位和 C-8 位同时有 3-甲基-2-丁烯基取代基的有 6 个化合物；只在 C-3 位有羟基取代基的有 32 个化合物，只在 C-6 位有羟基取代基的有 25 个化合物，在 C-3, 6 位同时有羟基取代基的有 11 个化合物。化合物中 3-甲基-2-丁烯基取代基最多有 3 个，羟基取代基最多有 4 个。当分子中存在 2 个 3-甲基-2-丁烯基取代基时，倾向于在 C-2, 8 位上；若有 3 个 3-甲基-2-丁烯基取代基时，则总是在 C-2, 5, 8 位上。(2) 除了化合物 54，山竹其他咕吨酮类 C-4 位上没有取代基。(3) 若 3-甲基-2-丁烯基取代基的邻位存在羟基，易于生成五元或六元环。从山竹中分离

得到的化合物结构及名称见图 2 和表 1。

咕吨酮是重要的活性物质，其化学合成研究一直是热门<sup>[51-53]</sup>。1941 年，Holleman A F 首先利用水杨酸苯酯合成了咕吨酮的母核<sup>[54]</sup>，至今咕吨酮合成方法报道比较多，然而，由于母核上的取代位置不易于控制，合成产率较低，因此，仍难以实现经济高效的工业化制备。咕吨酮的生物合成也有研究，现在普遍认为，聚乙酸类化合物，如 2, 4, 6-三羟基苯甲酸和 3-羟基苯甲酸是其生源合成的前体<sup>[55-56]</sup>。山竹中发现含有多个羟基苯甲酸类化合物，这也进一步证实了咕吨酮生源合成途径。

