

生物活性天然产物 分离策略手册

K. 霍斯泰特曼 M.P. 古普塔 著
A. 马斯顿 E.F. 奎罗兹
赵维民 王罗医 译
吴 剑 刘群芳



生物活性天然产物 分离策略手册

K. 霍斯泰特曼 M. P. 古普塔 著
A. 马斯顿 E. F. 奎罗兹

科学出版社

北 京

图字: 01-2010-1294

内 容 简 介

本书引用大量参考文献和应用实例,介绍了包括天然产物提取、生物活性测试、薄层色谱法筛选、天然产物分离和高效液相色谱与质谱、核磁共振谱联用等多种技术,提供了许多与实际工作相关的信息。

本书可供从事天然产物化学、天然药物化学和中草药活性成分研究的研究人员及医药院校相关专业的教师、研究生参考,对有机化学、仪器分析领域研究与开发的人员也有较大参考价值。

Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products/ edited by Kurt Hostettmann, Mahabir P. Gupta, Andrew Marston, Emerson Ferreira Queiroz
Copyright © 2008 by SECAB and CYTED. All Rights Reserved.

Authorized translation from English language edition published by SECAB and CYTED.

图书在版编目(CIP)数据

生物活性天然产物分离策略手册/(瑞士)霍斯特特曼(Hostettmann, K.)等著;赵维民等译. —北京:科学出版社,2010

ISBN 978-7-03-029040-3

I. 生… II. ①霍… ②赵… III. 生物活性-天然有机化合物-手册
IV. O629-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010) 第 184205 号

责任编辑: 黄 海 / 责任校对: 陈玉凤
责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 陈 敬
封面摄影: Kurt Hostettmann

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

盛 宣 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 10 月第 一 版 开本: B5(720 × 1000)

2010 年 10 月第一次印刷 印张: 15 3/4

印数: 1—3 000 字数: 318 000

定价: 49.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

序

《生物活性天然产物分离策略手册》一书的出版是安德烈斯贝洛协议(SECAB)执行秘书处和科学与技术促进发展伊比利亚美洲计划(CYTED)精细药物化学子项目 X 在一项专门合作协议基础上共同努力取得的一项新的成果。该合作协议旨在联合科学、技术和行政力量,来推进与伊比利亚美洲国家天然资源的知识、管理和可持续利用相关的项目与活动的战略研究和开发。

作为自然遗产的一部分,植物是数以百万计具有结构多样性的生物活性物质的来源,就像是一个尚待发现的宝贵药物分子的巨大宝藏。一个植物提取物可能含有数千种不同的次生代谢产物,这些化合物对于生物医学研究中不可或缺的新药或植物治疗制剂的开发十分重要。

分子结构是任何来源物质的主要特征,一个化合物的物理、化学、生物学、药理学和其他性质都是其所具有的分子结构作用的结果,可将其视为化合物的身份证。研究和分析生物活性天然产物,并将其分子结构完全确定,对天然产物的组成、潜在的工业和医学应用等方面的基础科学研究十分重要。

本书涵盖了天然产物提取、生物活性测试、色谱方法、天然产物分离和最新分析方法等领域的研究策略,是专门为伊比利亚美洲国家从事活性天然产物的鉴定、提取、分离和识别工作的研究人员和教师而编写。

安德烈斯贝洛协议(SECAB)执行秘书处,其职责包括在教育、文化、科学和技术领域开展跨部门的工作来促进伊比利亚美洲国家的全面发

展，很高兴推荐这本新书，并要特别感谢 K.霍斯泰特曼博士，M.P.古普塔博士，A.马斯顿博士和 E.F.奎罗兹博士为此付出的努力。

F.H.蒙塔尔沃
执行秘书
安德烈斯贝洛协议组织
(CAB)

前 言

编写这本手册的想法源于 CYTED(科学与技术促进发展伊比利亚美洲计划)在南美洲国家为组织多次天然产物讲习班所做的筹备工作，目的是将各次讲习班的演讲内容汇编成册。这本手册涉及多方面的内容，包括天然产物提取，生物活性测试，薄层色谱法筛选，天然产物的分离和现代分析技术，提供了许多与实际工作相关的信息，并附有方法和操作方案的参考文献。

这本手册针对所有对药用植物和天然产物感兴趣的人士——尤其适合年轻研究人员和博士研究生阅读。它对学术界以外从事质量控制和产品开发的读者也会有所帮助。

K. 霍斯泰特曼

M. P. 古普塔

A. 马斯顿

E. F. 奎罗兹

日内瓦大学和巴拿马大学

日内瓦和巴拿马城

目 录

序

前言

第1章 导言	1
1.1 药用植物的重要性	1
1.2 来源于植物代谢产物的新药	2
1.3 标准化植物提取物	7
参考文献	12
第2章 从植物到活性成分	14
2.1 从高等植物中发现新药的方法	14
2.2 选择植物的标准	15
2.3 植物标本的鉴定	17
2.4 提取	19
2.4.1 提取之前对植物材料的处理	19
2.4.2 植物材料的提取	19
2.5 人工产物的形成	22
2.6 超临界流体提取(SFE)	25
2.7 提取物的处理	26
2.7.1 过滤	26
2.7.2 凝胶过滤	27
2.7.3 沉淀	27
2.7.4 叶绿素的脱除	27
2.7.5 蜡质的脱除	27
2.7.6 单宁类物质的脱除	28

2.8 生物活性测试	29
2.8.1 在薄层色谱板上利用黄瓜黑星病菌检测抗真菌活性	32
2.8.2 在薄层色谱板上利用白色念珠菌和琼脂覆盖法检测抗真菌活性	32
2.8.3 TLC 法检测自由基清除活性	33
2.8.4 TLC 法检测抗氧化活性	34
2.8.5 TLC 法检测乙酰胆碱酯酶抑制活性	34
2.8.6 灭蚊活性测试	36
2.9 薄层色谱化学筛选	37
2.9.1 通用试剂	37
2.9.2 生物碱	38
2.9.3 强心苷类化合物	39
2.9.4 蒽醌类化合物	39
2.9.5 黄酮类化合物	40
2.10 制备分离技术	41
2.10.1 常压柱色谱	42
2.10.2 减压液相色谱(VLC)	43
2.10.3 薄层色谱	45
2.10.4 快速色谱	50
2.10.5 低压液相色谱(LPLC)	54
2.10.6 中压液相色谱(MPLC)	58
2.10.7 高压液相色谱(HPLC)	68
2.10.8 离心分配色谱(CPC)	74
参考文献	85
第3章 联用技术(液相色谱/紫外、液相色谱/质谱和液相色谱/核磁共振)	91
3.1 简介	91

3.2 LC/UV 联用	92
3.3 LC/MS 联用	94
3.4 LC/NMR 联用	94
3.4.1 连续流动探头的设计	97
3.4.2 溶剂信号的压制	98
3.4.3 灵敏度	100
3.4.4 运行模式	101
3.5 代谢产物分析: LC-多重联用策略	103
3.6 代谢产物分析中的问题	104
3.7 LC/UV/MS 和 LC/NMR 在植物化学分析中的应用	106
3.7.1 植物粗提物中二氢黄酮和异黄酮的去重分析	107
3.7.2 用 LC/UV/MS 和连续流动 LC/ ^1H -NMR 对植物 <i>Erythrina vogelii</i> 中抗真菌活性成分的去重分析	107
3.7.3 利用停流 LC/ ^1H -NMR 和 2D 相关实验鉴定植物 <i>Monotes</i> <i>englerii</i> 中黄烷酮的结构	112
3.8 结合 LC/NMR、LC/MS 分析和混合物样品 NMR 测试研究 不稳定化合物	116
3.8.1 在线鉴定植物 <i>Jamesbrittenia fodina</i> 中的不稳定肉桂 酸酯衍生物	116
3.8.2 差向异构化反应的研究	119
3.9 在线绝对构型的确定	122
参考文献	124

第 1 章 导 言

高等植物是数以百万计天然产物的来源，所含化合物的结构类型千变万化。这些化合物往往具有特定功能，其中许多具有可被人类利用的生物活性。它们可为新药开发提供先导化合物，或作为生物医学研究的重要工具。虽然大部分天然产物是生命过程的基本物质，但也存在毒素、激素和其他功能分子。制药公司常试图利用天然产物进行新药研发。这也正是人们对天然产物的兴趣所在。随着高通量筛选技术的应用，目前已能对大量化合物进行多种生物活性的测试。自然界存在的新化合物数量和骨架类型无法估量，对尽可能多的天然产物进行活性评价对于发现新药具有重要意义。

1.1 药用植物的重要性

在过去很长时间内，植物几乎是人类的唯一药物来源。19 世纪初，随着药物化学的发展，植物成为药物的最早原料来源。尽管合成药物化学和微生物发酵如今已取得巨大发展，但源于植物的治疗药物仍占有重要地位。根据 Newman 等在 2003 年发表的一篇综述中的统计数据，多达 52% 的新药开发与天然产物有关。作者在药物的来源分类中加入了天然产物仿制物(natural product mimics, NM)一类，即指那些基于天然产物知识而设计的化合物，或在活性测试中用于竞争性取代天然底物的合成化合物(图 1.1)。

来源于植物的经典药物包括：茜草科植物金鸡纳树皮中的抗疟药奎宁、罂粟科植物罂粟中的镇痛药吗啡和著名的镇咳药可待因、颠茄和其他茄科植物中的阿托品、玄参科植物洋地黄中的强心苷地高辛。

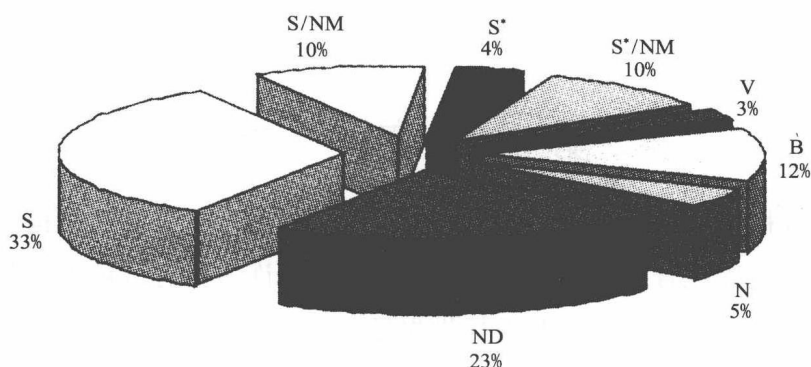


图 1.1 1981 年至 2002 年间的新化学实体(Newman 等, 2003)

“B”=生物来源；肽或从生物体、细胞株分离或利用生物技术生产的蛋白质；“N”=天然产物；“ND”=天然产物衍生物；“S”=全合成药物，通常由随机筛选或对已有药物进行修饰发现；“S*”=全合成药物，但采用了天然产物的药效基团；“V”=疫苗；“NM”=天然产物仿制物

在地球上约 40 万种植物中，只有一小部分经过植物化学成分研究，而经过生物或药理筛选的部分则更少。此外，植物提取物可能包含数千种不同的次生代谢产物，对某一植物进行化学研究只是揭示其部分组成成分。因此，植物界蕴藏的大量从药理学角度看具有价值的分子仍有待人们去发现(Potterat 和 Hostettmann, 1995; Hamburger 等, 1991)。

1.2 来源于植物代谢产物的新药

过去的几十年间，人们在抗癌药物研究领域对天然化合物进行了大量的研究工作。在 1983 年至 1994 年间美国批准的抗癌药物中，超过 60%为天然来源(Cragg 等, 1997)。其中，有些是植物次生代谢产物或植物成分的衍生物(Cordell 等, 1993)。双吲哚生物碱长春碱和长春新碱来源于马达加斯加夹竹桃科植物长春花(*Catharanthus roseus*)，它们已在 20 世纪 60 年代被开发成有效的抗癌药物，并且至今依然在白血病治疗中发挥着重要作用(图 1.2)。此外，半合成衍生物长春瑞宾(3,5-去甲脱水长春碱, Navelbine®)最近被开发成专门用于治疗乳腺癌的药物。二萜类

化合物紫杉醇(图 1.3), 即人们熟知的 Taxol[®]是在 NCI(美国国家癌症研究所)项目资助下被发现的。该化合物于 20 世纪 60 年代后期从红豆杉科植物太平洋红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中被首次分离得到, 人们后来从红豆杉属其他植物, 如欧洲红豆杉(*T. baccata*)中也发现该化合物的存在。

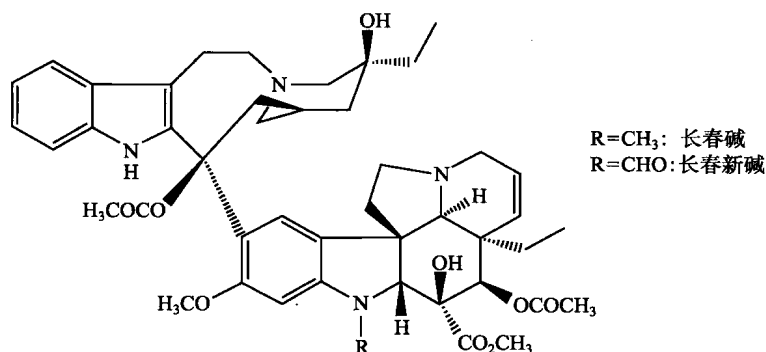


图 1.2 长春碱和长春新碱

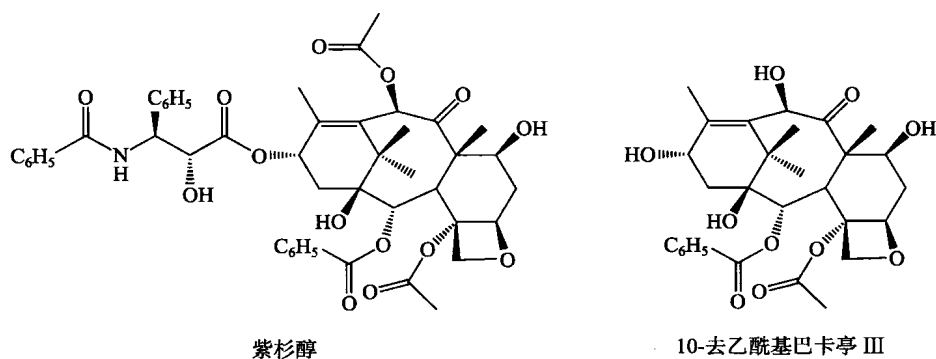


图 1.3 紫杉醇和生源前体 10-去乙酰基巴卡亭 III

然而, 原料供应问题影响了紫杉醇的开发, Taxol[®]直至 1992 年才获得 FDA(食品和药物管理局)的批准。Taxol[®]最初被用于治疗对化疗耐受的卵巢癌, 现在也被用于其他妇科癌症的治疗。紫杉醇几乎仅存在于红豆杉的树皮, 且含量很低。此外, 实现工业规模的全合成也不切实际。利用更容易获得的、来源于欧洲红豆杉针叶的结构类似物 10-去乙酰基巴

卡亭Ⅲ进行半合成,使原料来源问题得到了解决(图 1.3)。这一策略也使制备其他结构类似物成为可能,其中多西他赛(Taxotere[®])最近也已上市。

基于植物来源喜树碱的几个衍生物最近被用作癌症治疗的药物(图 1.4)。单萜类生物碱喜树碱是 20 世纪 60 年代后期从中国观赏性树木喜树(珙桐科)中分离得到的。然而,尽管其具有很强的抗癌活性,但由于毒性及溶解性差的缘故使喜树碱的临床效果并不显著。此后,研究人员投入了相当大的精力,以寻找活性更好、毒性更小的结构类似物。拓扑替康(Hycamtin[®])于 1996 年 5 月被 FDA 批准用于治疗对其他化疗药物耐受的晚期卵巢癌(图 1.4)。1996 年 6 月,依立替康盐酸盐注射剂也被批准用于转移性结肠或直肠癌的治疗。目前,还有很多基于植物成分的癌症治疗药物正在研究之中。来源于三尖杉科植物三尖杉(*Cephalotxus harringtonia*)的高三尖杉酯碱是尤为突出的例子,该化合物对多种白血病均表现活性作用。不仅新分子可作为潜在的先导化合物,已知化合物也具有开发前景。桦木酸是桦树(桦木科,桦木属)中的一种常见成分,最近被证实具有很强的抗癌活性,已被列为治疗黑色素瘤的候选

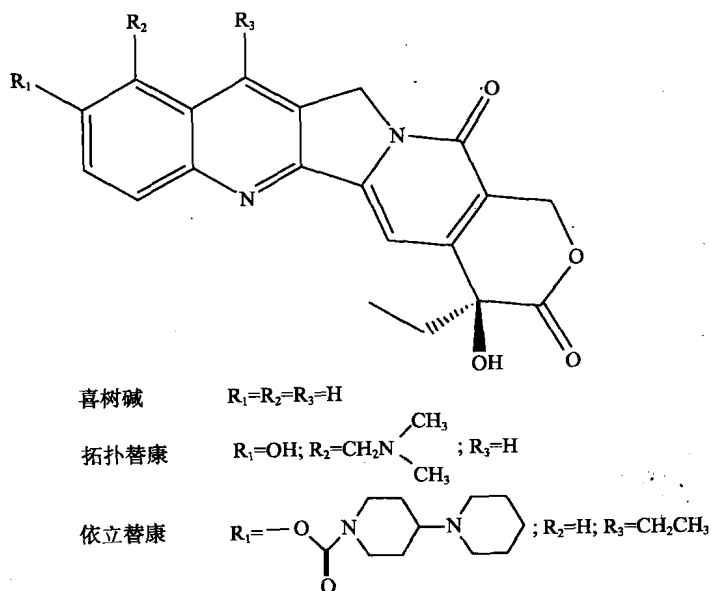


图 1.4 喜树碱及其衍生物

化合物。

在过去十年中,青蒿素的发现和开发(Woerdenbag 等, 1994)表明植物资源在抗疟新药的研发中也发挥了很大作用。青蒿素是一种含有分子内过氧基团的倍半萜内酯, 由中国科学家于 1972 年从菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua*)中分离得到, 这种植物在中国作为退热药及用于治疗疟疾已有两千多年的历史。青蒿素代表着一类全新的抗疟活性化合物结构类型, 对抗药性疟原虫株具有显著活性。由于青蒿素的高脂溶性, 它在作为药物使用时存在一些问题。为此, 研究人员合成了包括醚和羧酸酯在内的一系列衍生物。其中, 蒿甲醚、蒿乙醚和青蒿琥酯钠正在越来越多的国家被授权作为药物使用(图 1.5)。

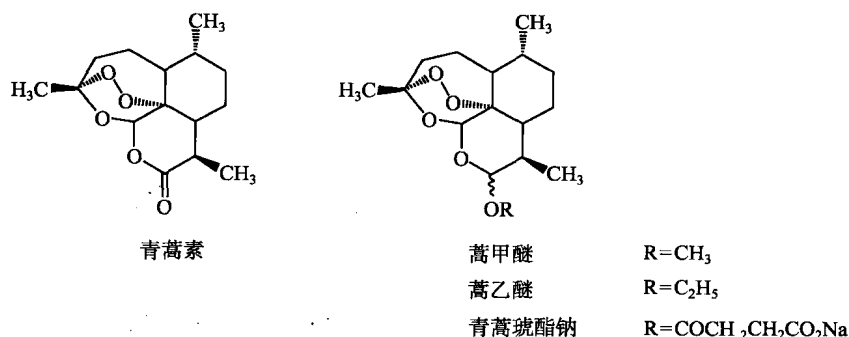


图 1.5 青蒿素及其衍生物

还有一些植物代谢产物处于治疗艾滋病新药研究的前沿。这些工作主要是在美国国家癌症研究所进行, 该研究所每年都测试数以千计的植物提取物。二聚萘基异喹啉生物碱米歇尔胺 B(michellamine B)是最具希望的先导化合物之一, 它来源于非洲西部钩枝藤科藤本植物 *Ancistrocladus korupensis*。这个化合物表现出广泛的抗 HIV-1 和 HIV-2 毒株活性, 包括 HIV-1 耐药毒株(图 1.6)。然而, 毒理学研究表明其治疗指数非常小, 并且显示了潜在的神经毒性, 因而 NCI 决定停止对其旨在进一步临床开发的研究。更多的植物代谢产物已成为有前景的新药候选物: 非洲热带雨林植物红厚壳树(山竹子科)的香豆素衍生物绵毛胡桐内酯 A

(calanolide A)能抑制艾滋病毒逆转录酶活性；巴豆醇酯类化合物蔓生素(prostratin)是从大戟科植物 *Homolanthus nutans* 中获得，该植物在萨摩亚群岛的传统医学中被用来治疗黄热病；内屈考诺酮(conocurvone)源于澳大利亚山龙眼科灌木 *Conospermum incurvum*，它可阻止细胞病变效应和 HIV 复制，但其作用机制尚不清楚。

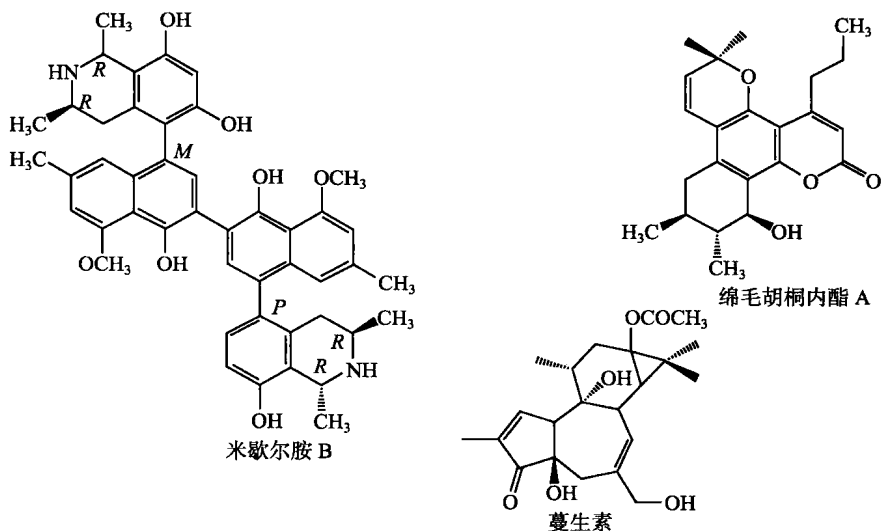


图 1.6 具有抗病毒活性的次生代谢产物

在保加利亚和土耳其，人们习惯于局部应用雪花莲属植物来治疗疼痛性神经症状(如面部神经痛)(Shu, 1998)。加兰他敏(galanthamine)(图 1.7)是于 20 世纪 50 年代被首次从石蒜科植物雪花莲中分离得到的(Shu, 1998)，现在是用于阿尔茨海默症仅有的几个治疗药物之一，其作用机制涉及维持大脑中的乙酰胆碱水平。加兰他敏在石蒜科其他属植物，如水仙属和石蒜属中也存在；它可从植物夏雪片莲(*Leucojum aestivum*)中分离得到或通过合成获得(Bruneton, 1998)。加兰他敏具有双重作用机制，作为乙酰胆碱酯酶抑制剂，它能阻止乙酰胆碱的降解，从而增加递质的浓度；作为烟碱型乙酰胆碱受体的变构强化配体，它可增强受体产生的离子流(Shu, 1998)。最近的一项研究发现它可通过诱导抗细胞凋

亡蛋白的表达来发挥神经保护作用(Villaroya 等, 2004)。研究人员采用几组随机、双盲、平行试验对加兰他敏和安慰剂加以比较, 以检测该化合物的效能、耐受性和安全性。结果表明, 加兰他敏可保持认知功能, 阻止新产生的非认知行为症状开始至少 1 年, 并且使日常生活能力丧失延后 6 个月。加兰他敏具有胆碱能药物典型的副作用, 最常见表现为恶心、呕吐和腹泻(Kurz, 2002)。尽早服用药物似乎是最佳选择, 并且每 8 个星期应对药物剂量进行调整(Zarotsky 等, 2003)。

研究人员对加兰他敏的一些类似物也进行了研究。例如, 通过生化、行为和药代动力学分析对 6-氧-乙酰基-6-氧-去甲基加兰他敏(P11012)和 6-氧-去甲基-6-氧-[(1-金刚烷基)-羰基]加兰他敏(P11149)与母体化合物进行比较。

结果显示, P11149 和 P11012 均为前药, 可产生高浓度的 6-氧-去甲基加兰他敏, 该化合物比加兰他敏的体外活性高 10 至 20 倍(IC_{50} 分别为 $0.11 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.92 \mu\text{mol/L}$)。这三个生物碱显示中枢胆碱能活性, 可降低体温及减轻

东莨菪碱所诱导的损伤。在相同的曲线下面积时, P11149 比 P11012 具有更慢、更低、更持久的浓度水平。P11012 和加兰他敏迅速达到最大浓度, 但加兰他敏具有最大的曲线下面积。P11149 被认为是一个更好的治疗选择, 因为它比 P11012 具有更长的作用时间, 比加兰他敏对乙酰胆碱酯酶有更好的亲和力和更好的选择性, 且比其他两者具有更高的口服治疗指数(Bores 等, 1996)。

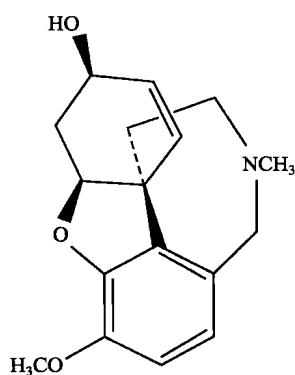


图 1.7 加兰他敏
(galanthamine)

1.3 标准化植物提取物

植物可作为纯化的、结构确定的活性成分来源, 但其治疗潜力不仅

仅只限于此。如果植物只显示较弱或低专一性的药理活性，或者如果活性成分尚不清楚，则适合使用提取物。此外，治疗效果可能来自几个活性成分的协同作用。为确保稳定的质量和疗效，建立提取物中活性成分的含量标准非常重要。当活性成分不明确时，则须选择提取物中最具代表性的化学成分。表 1.1 列出的是美国最畅销的植物膳食补充剂的名单 (FDM, 2005)。

表 1.1 2004 年在食品、药品以及大众市场零售渠道中最畅销的植物膳食补充剂*

排名/植物	销售额/\$
1. 大蒜(<i>Allium sativum</i> L., 百合科)	27 013 420
2. 紫锥花(<i>Echinacea</i> spp., 紫锥花属)	23 782 640
3. 锯叶棕榈 [<i>Serenoa repens</i> (Bartr.) Small, 棕榈科]	20 334 030
4. 银杏(<i>Ginkgo biloba</i> L., 银杏科)	19 334 010
5. 大豆(豆科)	17 419 530
6. 蔓越橘(<i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait., 杜鹃花科)	13 445 670
7. 人参和西洋参(<i>Panax ginseng</i> C. Meyer 和 <i>Panax quinquefolius</i> L., 五加科)	12 165 220
8. 黑升麻 [<i>Cimicifuga racemosa</i> , (L.) Nutt., 毛茛科]	11 984 960
9. 贯叶连翘(<i>Hypericum perforatum</i> L., 藤黄科)	9 087 829
10. 水飞蓟 [<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn., 菊科]	7 775 529
11. 夜来香(<i>Oenothera biennis</i> L., 柳叶菜科)	6 088 103
12. 缬草(<i>Valeriana officinalis</i> L., 败酱科)	3 449 297
13. 绿茶 [<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze var. <i>sinensis</i> , 山茶科]	2 794 783
14. 欧洲越橘(<i>Vaccinium myrtillus</i> L., 杜鹃花科)	2 341 301
15. 葡萄(<i>Vitis vinifera</i> L., 葡萄科)	2 330 281
16. 淫羊藿(<i>Epimedium</i> L., 小檗科)	2 203 555
17. 育亨宾(<i>Pausinystalia yohimbe</i> K. Schum., 茜草科)	1 835 313
18. 马栗(<i>Aesculus hippocastanum</i> L., 七叶树科)	1 564 550
19. 刺五加 [<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.), 五加科]	992 286
20. 生姜(<i>Zingiber officinalis</i> Rocs., 姜科)	814 789
多种植物混合物 [‡]	52 049 290
其他植物	11 841 120
总额	257 514 900

* 数据来源于伊利诺伊州芝加哥 Information Resources 公司。所有数据是基于截止于 2005 年 1 月 2 日的 52 周内食品、药品以及大众市场零售渠道的销售情况；

‡ 指含有一种以上草本植物的组合配方。