

- [3] 彭程, 胡晋红, 朱全刚, 等. 正交试验优选苦参方中苦参有效成分的提取工艺[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(2): 124-126.
- [4] 苏静州, 刘明官, 董海荣. HPLC法测定复方石韦片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中草药, 2005, 36(3): 383-384.
- [5] 吴玉兰, 丁安伟, 冯有龙. 荆芥及其相关药材挥发油的成分研究[J]. 中草药, 2000, 31(12): 894-896.
- [6] 王秀坤, 李家实, 魏璐雪. 苦参挥发油成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 552-553.
- [7] 宋小妹, 考玉萍. 洁身洗剂中苦参化学成分转化研究[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(6): 257-269.
- [8] 贾敏鸽, 孙文基. 苦参及其复方中苦参碱与氧化苦参碱的转化研究[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 90-92.
- [9] 李丽贤, 陈新, 崔健. 苦参与蛇床子配伍后苦参碱含量变化[J]. 长春中医学院学报, 2002, 18(12): 44.
- [10] 王新峰, 李磊, 韩国柱. 苦参药理作用的研究进展[J]. 医药导报, 2004, 24(6): 483-485.

灰毡毛忍冬的化学成分研究

贾晓东, 冯煦*, 赵兴增, 王鸣, 孙浩, 董云发

(江苏省中国科学院植物研究所, 南京中山植物园江苏省药用植物研究开发中心, 江苏 南京 210014)

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.

-Mazz. 为忍冬科忍冬属植物, 具有清热解毒、抗菌消炎的功效, 在中医临床及民间广泛应用于痈肿疮疖, 喉痹, 丹毒, 热毒血痢, 风热感冒, 温热发病等疾病的治疗。《中国药典》2005年版一部将其作为新收载品种, 与红腺忍冬、华南忍冬一同列入新增的山银花项下。国内外对其化学成分的研究相对较少。本文报道从灰毡毛忍冬中分离得到的8个化合物: 金圣草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(I)、苜蓿素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(II)、槲皮素(III)、芦丁(IV)、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(V)、绿原酸甲酯(VI)、绿原酸(VII)、3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1-3)-α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃阿拉伯糖基-常春藤皂苷元-28-O-β-D-吡喃葡萄糖酯苷(VIII), 其中化合物I和VIII为首次从忍冬属中分离得到, 化合物IV、VI、VII为首次从灰毡毛忍冬中得到。

1 仪器与材料

核磁共振光谱用Bruker AV-500型核磁共振光谱仪测定(TMS内标), 熔点用X4型数字显示显微熔点测定仪测定, ESI-MS在Agilent 1100 LC/MSD SL上测定, Labconco(freeze dry system/LYPH LOCK®4.5)冷冻干燥仪。柱色谱材料为硅胶H(Merck)、RP-C₁₈(YMC; 12 nm)及Sephadex LH-20(Amersham Biosciences)。灰毡毛忍冬于2003年6月采自湖南隆回县, 经江苏省中国科学院植物研究所袁昌齐研究员鉴定, 标本现存放于江苏省中国科学院植物研究所药用植物研究开发中心。

2 提取与分离

灰毡毛忍冬干燥花蕾38 kg用适量90%乙醇回流提取浓缩得浸膏, 取其中一半的浸膏依次用石油醚、醋酸乙酯萃取。萃取所得醋酸乙酯部分用硅胶柱分段、脱色, 流动相依次为氯仿-甲醇(10:1, 4:1, 1:1)、甲醇。其中氯仿-甲醇(4:1)部分经反复硅胶柱分段, 反相柱分离及凝胶柱纯化得到单体化合物I~VIII。

3 结构鉴定

化合物I: 黄色粉末(丙酮-水), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish反应阳性。ESI-MS(*m/z*): 485[M+Na]⁺, 分子式为C₂₂H₂₂O₁₁。IR(KBr)(cm⁻¹): 3300(OH), 1660(C=O), 1600, 1495(苯环双键), 1110(C-O), 1085, 840。¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 500 MHz)δ: 6.45(1H, d, *J*=2.18 Hz, H-6), 6.87(1H, d, *J*=2.14 Hz, H-8), 示A环为5, 8-二取代; 6.98(1H, s, H-3), 7.59(1H, overlap, H-2'), 6.95(1H, d, *J*=8.9 Hz, H-5'), 7.60(1H, m, H-6'), 示B环为ABX自旋系统; 5.06(1H, d, *J*=7.40 Hz, Glc-H-1), 12.95(1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 125 MHz)δ: 164.10(C-2), 103.75(C-3), 181.99(C-4), 161.04(C-5), 100.01(C-6), 162.93(C-7), 94.98(C-8), 156.87(C-9), 105.31(C-10), 120.45(C-1'), 110.33(C-2'), 150.88(C-3'), 148.01(C-4'), 115.74(C-5'), 121.32(C-6'), 99.47(G-1), 73.09(G-2), 77.21(G-3), 69.59(G-4), 76.43(G-5), 60.61(G-6), 55.95(OCH₃)。综合各光谱数据及与

收稿日期: 2008-03-28

基金项目: 江苏省社会发展科技计划项目(BS2001025)

作者简介: 贾晓东(1981-), 女, 内蒙古包头市人, 2006年毕业于江苏省中国科学院植物研究所, 获硕士学位, 从事药用植物活性成分的研究。

* 通讯作者 冯煦 Tel/Fax: (025)84347084 E-mail: fengxu@mail.cnbg.net

文献报道^[1]对比鉴定化合物为金圣草素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 I: 黄色粉末(丙酮-水), 盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。ESI-MS (m/z): 515 [$M + Na$]⁺, 分子式为 $C_{23}H_{24}O_{12}$ 。IR_{max}^{KBr} (cm^{-1}): 3 300 (OH), 1 660 (C=O), 1 600, 1 495 (苯环双键), 1 110 (C-O), 1 085, 840。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6.46 (1H, d, $J=2.12$ Hz, H-6), 6.93 (1H, d, $J=2.18$ Hz, H-8), 示 A 环为 5, 7-二取代; 6.98 (1H, s, H-3), 示 3 位无取代基; 7.36 (2H, s, H-2', 6'), 示 B 环为对称结构; 5.06 (1H, d, $J=7.40$ Hz, Glc-H-1), 12.95 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 164.06 (C-2), 103.41 (C-3), 181.98 (C-4), 161.04 (C-5), 100.15 (C-6), 162.97 (C-7), 95.27 (C-8), 156.82 (C-9), 105.34 (C-10), 120.17 (C-1'), 104.55 (C-2'), 148.19 (C-3'), 140.07 (C-4'), 148.19 (C-5'), 104.55 (C-6'), 99.47 (G-1), 73.09 (G-2), 77.32 (G-3), 69.67 (G-4), 76.43 (G-5), 60.51 (G-6), 56.35 (OCH₃ × 2)。综合各光谱数据及与文献报道^[2]对比鉴定化合物为苜蓿素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 II: 黄色粉末 (MeOH), mp > 300 °C, 盐酸-镁粉反应阳性。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6.18 (1H, d, $J=2.02$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J=2.02$ Hz, H-8), 示环为 5, 7-二取代; 6.88 (1H, d, $J=8.49$ Hz, H-5'), 7.54 (1H, dd, $J=2.19, 8.47$ Hz, H-6'), 7.67 (1H, d, $J=2.18$ Hz, H-2'), 示 B 环为 ABX 自旋系统; 9.26, 9.31, 9.54 (3H, s, 3 × OH), 10.74 (1H, s, 7-OH), 12.48 (1H, s, 5-OH)。¹H-NMR 数据与文献报道^[3]槲皮素相对照一致, 且与槲皮素对照品 R_f 值及斑点颜色一致, 故鉴定化合物为槲皮素。

化合物 N: 黄色粉末 (冻干), mp 185~186 °C, 盐酸-镁粉反应和 Molish 反应均为阳性。该化合物的理化常数和 NMR 数据与文献报道^[4]一致, 故鉴定此化合物为芦丁。

化合物 V: 黄色粉末 (丙酮-水), mp 191~192 °C。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6.19 (1H, d, $J=1.62$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J=1.62$ Hz, H-8), 示 A 环为 5, 7-二取代; 6.84 (1H, d, $J=8.97$ Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, overlap, H-6'), 7.57 (1H, d, $J=1.84$ Hz, H-2'), 示 B 环为 ABX 自旋系统; 5.45 (1H, d, $J=7.14$ Hz, Glc-H-1), 9.20, 9.66 (2H, s, 2 × OH), 10.80 (1H, s, 7-OH), 12.63 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 156.14

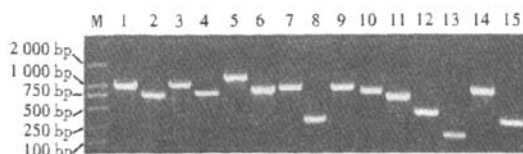
(C-2), 133.31 (C-3), 177.42 (C-4), 161.22 (C-5), 98.60 (C-6), 164.10 (C-7), 93.44 (C-8), 156.29 (C-9), 103.94 (C-10), 121.55 (C-1'), 115.16 (C-2'), 144.77 (C-3'), 148.42 (C-4'), 116.17 (C-5'), 121.14 (C-6'), 100.86 (G-1), 77.51 (G-2), 76.47 (G-3), 74.05 (G-4), 69.90 (G-5), 60.94 (G-6)。以上数据与文献报道槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷^[3]图谱数据一致, 故鉴定此化合物为槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 (quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside)。

化合物 VI: 白色簇晶 (石油醚-醋酸乙酯), mp 90~93 °C。¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 6.27 (d, $J=15.90$ Hz), 7.59 (d, $J=15.65$ Hz), 显示结构中有反式烯烃键的存在。¹³C-NMR δ : (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 73.01 (C-1), 35.11 (C-2), 70.97 (C-3), 69.32 (C-4), 66.84 (C-5), 37.20 (C-6), 173.55 (C-7), 51.72 (C-8), 165.30 (C-1'), 113.83 (C-2'), 145.05 (C-3'), 125.32 (C-4'), 114.56 (C-5'), 145.58 (C-6'), 148.44 (C-7'), 115.80 (C-8'), 121.24 (C-9')。该化合物的理化常数和 NMR 数据与文献报道的绿原酸甲酯^[5]一致, 故鉴定此化合物为绿原酸甲酯。

化合物 VII: 淡黄色针晶 (石油醚-醋酸乙酯), mp 207~209 °C。该化合物的理化常数和 NMR 数据与文献报道的绿原酸^[6]一致, 故鉴定此化合物为绿原酸。

化合物 VIII: 白色片状晶体 (冻干), mp 232~233 °C, $C_{33}H_{46}O_{22}$, Liebermann-Burchard 反应阳性, TLC 香草醛-硫酸试液加热显紫红色, 放置后变蓝。¹³C-NMR (C_2D_5N , 125 MHz) δ : 39.07 (C-1), 26.37 (C-2), 81.21 (C-3), 43.58 (C-4), 47.60 (C-5), 18.13 (C-6), 32.56 (C-7), 39.95 (C-8), 48.21 (C-9), 36.89 (C-10), 23.41 (C-11), 122.94 (C-12), 144.11 (C-13), 42.14 (C-14), 28.28 (C-15), 23.85 (C-16), 47.00 (C-17), 41.72 (C-18), 46.16 (C-19), 30.74 (C-20), 33.99 (C-21), 32.79 (C-22), 64.00 (C-23), 14.15 (C-24), 16.17 (C-25), 17.52 (C-26), 26.08 (C-27), 176.42 (C-28), 33.09 (C-29), 23.66 (C-30), 104.92 (3-A-1), 75.38 (A-2), 75.17 (A-3), 69.75 (A-4), 66.45 (A-5), 101.43 (R-1), 71.79 (R-2), 83.06 (R-3), 73.04 (R-4), 69.79 (R-5), 18.44 (R-6), 106.91 (G-1), 75.38 (G-2), 78.61 (G-3), 71.62 (G-4), 78.53 (G-5), 62.25 (G-6), 95.75 (28-

(下转第 1720 页)

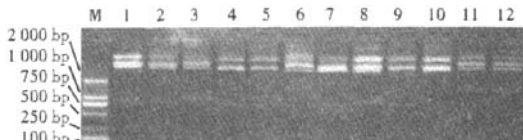


泳道1~15-随机克隆PCR产物 M-DL-2000 Marker

Lane 1~15-PCR Product of random clones M-DL-2000 Marker

图4 随机挑取15个克隆的PCR产物检测

Fig. 4 PCR Examination of random selected fifteen clones



泳道1~12-随机噬菌粒 M-DL-2000 Marker

Lane 1~12-random plasmid M-DL-2000 Marker

图5 pBluescript SK-噬菌粒双酶切检测

Fig. 5 Examination of digestion with *Xho* I, *Eco*R I of fragments contained in pBluescript SK-phasmids

离。为了进行中药何首乌次生代谢物的生物合成基因调控的基础研究,笔者构建了何首乌叶cDNA文库,在构建文库的过程中,特别注意了以下几点:

(1)mRNA的质量是文库构建成功的最重要的因素,低质量mRNA(如部分降解)建立的文库容易丢失大分子mRNA的全长拷贝,以及稀有的转录本^[4]。因此,在取材上选用新鲜的何首乌叶片为材料,这时提取出的mRNA较丰富,质量也相对较高。

(2)cDNA合成的质量除了保证在总RNA和mRNA提取过程中无RNase污染外,逆转录酶的选择也很重要。采用了Stratagene公司的基因工程逆转录酶StrataScript,它是一种新型的无RNase H活性的莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV-RT),在RNase H位点的高度保守区发生的点突变导致RNase H活性丧失而并不影响其逆转录功能,这种无核酸酶活性的突变体使其较野生型MMLV-RT能转录出较高比例的全长cDNA转录本,使cDNA合成的长度和效率明显增加,这对于一个高质量的cDNA文库是必需的。

(上接第1636页)

G-1),74.17(G-2),79.29(G-3),71.16(G-4),78.91(G-5),62.57(G-6)。以上数据与文献对比^[7]鉴定化合物为3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1-3)-α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃阿拉伯糖基-常春藤皂苷元-28-O-β-D-吡喃葡萄糖酯苷。

参考文献:

- [1] 谢韬,刘净,梁敬钰,等.滨蒿化学成分研究[J].中国中药杂志,2005,30(2):86-89.
- [2] 羊晓东,赵静峰,郭洁,等.云南兔耳草中的黄酮类成分

(3)双链cDNA分级分离也是一个不可忽略的环节。cDNA经*Xho* I酶切后形成大小不等的片段,若将这些片段都与载体连接,那些小片段会优先跟载体相连,使得文库中小片段占有较高的比例,大大降低了文库的质量^[5]。通过Sephacrose CL-2B凝胶柱去掉绝大部分小于400 bp的cDNA及酶切反应残留的DNA小片段,保证了文库中含有较大的cDNA分子,有利于文库的后续筛选工作^[6]。

(4)载体与cDNA连接效率的高低会直接关系到文库构建是否成功。文库连接与一般的片段克隆的连接不一样,一般的片段克隆连接是固定长度的载体与固定长度的目的DNA连接,而文库连接是固定长度的载体与非固定长度的目的DNA连接,目的基因cDNA长的有10 kb以上,短的只有400 bp或更短。因此,须对两者的连接比例进行摸索。在实验中,建立了几个平行反应,得出两者的连接比为1时,文库滴度最高。

cDNA文库的质量一般包括文库滴度、重组率及插入片段大小。实验表明,所构建的何首乌cDNA文库初始滴度为 1.07×10^6 pfu/mL,重组率为98.5%,插入片段在0.5~2.0 kb,文库的质量满足随后的EST测序及文库筛选要求,目前,本实验室正在进行噬菌粒的大量提取及核苷酸测序鉴定。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑部委员会.植物志[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 黄璐琳,胡尚秋,杨晓.药用植物生物工程研究进展Ⅰ.分子标记、遗传转化及功能基因研究[J].中草药,2006,37(5):647-651.
- [3] 奥斯伯FM,金斯顿RE,塞德曼JG,等.精编分子生物实验指南[M].第3版.北京:科学出版社,2005.
- [4] 毛新国,景蕊莲,孔秀英,等.几种全长cDNA文库构建方法比较[J].遗传,2006,28(7):865-873.
- [5] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, et al. The German cDNA Consortium SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. BMC Genomics, 2004,5(1):36.
- [6] 祝骥,马文丽,李凌,等.一种限制性cDNA文库的构建[J].遗传,2002,24(2):174-176.

[J]. 中草药,2004,35(3):257-259.

- [3] 陈龙,杜力军,丁怡,等.罗布麻花化学成分研究[J].中国中药杂志,2005,30(17):1340-1342.
- [4] 丁丽,王敏,赵俊,等.荔枝核化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2006,18(6):45-47.
- [5] 柴兴云,窦静,贺清辉,等.山银花中酚酸类成分研究[J].中国天然药物,2004,2(6):339-340.
- [6] 凌云,鲍燕燕,张永林,等.兴安蒲公英化学成分的研究[J].中草药,2000,31(1):10-11.
- [7] Braca A, Autore G, De S, et al. Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia* [J]. Planta Med, 2004,70(10):960-966.

灰毡毛忍冬的化学成分研究

作者:

贾晓东, 冯煦, 赵兴增, 王鸣, 孙浩, 董云发

作者单位:

江苏省中国科学院植物研究所, 南京中山植物园江苏省药用植物研究开发中心, 江苏, 南京, 210014

刊名:

中草药ISTICPKU

英文刊名:

CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS

年, 卷(期):

2008, 39(11)

被引用次数:

7次

参考文献(7条)

- 谢韬;刘净;梁敬钰 滨蒿化学成分研究[期刊论文]-中国中药杂志 2005(02)
- 羊晓东;赵静峰;郭洁 云南兔耳草中的黄酮类成分[期刊论文]-中草药 2004(03)
- 陈龙;杜力军;丁怡 罗布麻花化学成分研究[期刊论文]-中国中药杂志 2005(17)
- 丁丽;王敏;赵俊 荔枝核化学成分的研究 2006(06)
- 柴兴云;窦静;贺清辉 山银花中酚酸类成分研究[期刊论文]-中国天然药物 2004(06)
- 凌云;鲍燕燕;张永林 兴安蒲公英化学成分的研究[期刊论文]-中草药 2000(01)
- Braca A;Aotore G;De S Cytotoxic saponins from Schefflera rotundifolia[外文期刊] 2004(10)

本文读者也读过(10条)

- 王振中, 毕宇安, 尚强, 肖伟, 段金廛 金银花与山银花挥发性成分GC-MS的研究[期刊论文]-中草药2008, 39(5)
- 刘丹, 夏琳琳 山银花化学成分研究[期刊论文]-黑龙江科技信息2007(24)
- 晏永新, 钟铁, 张小娟, 李霞兰, 王少军, 王跃生, 杨世林, YAN Yong-xin, ZHONG Tie, ZHANG Xiao-juan, LI Xia-lan, WANG Shao-jun, WANG Yue-sheng, YANG Shi-lin 山银花不同产地加工品的HPLC指纹图谱研究[期刊论文]-中草药 2007, 38(11)
- 许小方, 李会军, 李萍, 冯煦, 袁昌齐, XU Xiao-Fang, LI Hui-Jun, Li Ping, FENG Xu, YUAN Chang-Qi 灰毡毛忍冬花蕾中的化学成分[期刊论文]-中国天然药物2006, 4(1)
- 湛延风, 童巧珍, 谢振宇, Zhan Yanfeng, Tong Qiaozhen, Xie Zhenyu 湖南金银花主流品种灰毡毛忍冬花蕾中咖啡酸含量的测定[期刊论文]-湖南中医学院学报2005, 25(4)
- 柴兴云, 李萍, 唐力英 山银花化学成分研究[期刊论文]-中国中药杂志2004, 29(9)
- 陈丽娜, CHEN Li-na 山银花的抗菌作用初步研究[期刊论文]-临床医学工程2009, 16(10)
- 雷志钧, 周日宝, 贺又舜, 曾嵘 灰毡毛忍冬与正品金银花体内抗菌作用的比较[期刊论文]-中医药导报2005, 11(9)
- 王柳萍, 辛宁, 张守平, 彭英奎, 欧阳明秀, Liuping, XIN Ning, ZHANG Shou-ping, PENG Ying-kui, OU YANG Ming-xiu 广西不同产地与加工方法山银花中绿原酸的含量比较[期刊论文]-时珍国医国药2008, 19(6)
- 肖冰梅, 盛孝邦, 何桂霞, XIAO Bing-mei, SHENG Xiao-bang, HE Gui-xia 不同产地灰毡毛忍冬藤主要成分的比较研究[期刊论文]-中医药学刊2005, 23(3)

引证文献(7条)

- 陈雨, 赵友谊, 吴双, 王鸣, 冯煦, 梁敬钰 灰毡毛忍冬花蕾水溶性化学成分研究[期刊论文]-中药材 2012(2)
- 滕昱伯, 陈雨, 赵友谊, 王奇志, 王鸣, 冯煦 HPLC法同时测定灰毡毛忍冬不同部位5个活性成分的含量[期刊论文]-中药材 2012(4)
- 张湘东, 宋伟峰, 钟鸣, 罗淑媛 高效液相色谱串联质谱法鉴定山银花水提取液的化学成分[期刊论文]-中国医药导报 2012(24)
- 王柯, 王艳艳, 赵东保, 刘绣华, 李明静, 许平辉 HPLC法测定金银花不同部位中木犀草素及其苷的含量[期刊论文]-

5. 郑晓珂, 赵献敏, 冯卫生, 王彦志, 郭永慧 卷柏调脂活性部位化学成分研究[期刊论文]-中草药 2009(11)
6. 刘利青, 邓张双, 杨进, 陈剑锋, 邹坤, 邵源临, 胡建忠 金银花枝叶抗猪蓝耳病毒有效活性部位中主要化学成分的含量测定[期刊论文]-医药导报 2013(9)
7. 徐文, 周光雄, 戴毅, 姚新生 木荷茎的化学成分研究[期刊论文]-中草药 2010(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200811013.aspx