

攀茎钩藤茎枝的化学成分研究

王子明¹, 杨 龄², 房银东³, 陈 佳⁴, 王 赞¹, 李荣生¹, 王 扣^{1*}, 王 飞^{3*}

1. 昆明医科大学 药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500

2. 铜仁职业技术学院, 贵州 铜仁 554300

3. 云南西力生物技术股份有限公司, 云南 昆明 650201

4. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 研究攀茎钩藤 *Uncaria scandens* 茎枝的化学成分。方法 利用硅胶、Sephadex LH-20、RP₁₈ 和 HPLC 等对其化学成分进行分离和纯化, 根据波谱数据和理化性质对化合物的结构进行鉴定。利用高效液相色谱法测定了其中钩藤碱和异钩藤碱的含量。结果 从攀茎钩藤茎枝的 95%乙醇提取物中分离得到 17 个化合物, 分别鉴定为 5 α -carboxystrictosidine (1)、3 β -异二氢卡丹宾碱 (2)、异长春花苷内酰胺 (3)、3 α -二氢卡丹宾碱 (4)、帽柱叶碱 (5)、恩卡林碱 F (6)、3 β -异二氢卡丹宾碱 4-氧化物 (7)、异二氢卡丹宾碱 (8)、nauclefine (9)、卡丹宾碱 (10)、calyxamine B (11)、绿原酸甲酯 (12)、3,4,5-三甲氧基苯酚 (13)、托可醌 (14)、喹诺瓦酸 (15)、咖啡酸甲酯 (16)、金丝桃苷 (17)。攀茎钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的质量分数分别为 0.72 和 0.38 $\mu\text{g/g}$ 。结论 化合物 7~9、11~14 为首次从该属植物中分离得到; 化合物 1~6、16、17 为首次从该植物中分离得到。攀茎钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量较低, 其在部分地区作为钩藤使用的合理性有待进一步验证。

关键词: 攀茎钩藤; 吲哚生物碱; 3 β -异二氢卡丹宾碱; 异长春花苷内酰胺; 绿原酸甲酯; 托可醌

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)12-2802-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.009

Chemical constituents from stems of *Uncaria scandens*

WANG Zi-ming¹, YANG Ling², FANG Yin-dong³, CHEN Jia⁴, WANG Yun¹, LI Rong-sheng¹, WANG Kou¹, WANG Fei³

1. School of Pharmacy and Yunnan Key Laboratory of Natural Medicine Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

2. Tongren Polytechnic College, Tongren 554300, China

3. Yunnan Xili Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650201, China

4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents from the stems of *Uncaria scandens*. **Methods** The compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20, RP₁₈, and HPLC. The structures were identified by spectroscopic methods and physicochemical properties. The contents of rhynchophylline and isorhynchophylline were detected by HPLC method. **Results** Seventeen compounds were isolated and identified from 95% ethanol extract of the stems of *U. scandens* and characterized as 5 α -carboxystrictosidine (1), 3 β -isodihydrocadambine (2), strictosamide (3), 3 α -dihydrocadambine (4), mitraphylline (5), uncarine F (6), 3 β -isodihydrocadambine 4-oxide (7), isodihydrocadambine (8), nauclefine (9), cadambine (10), calyxamine B (11), methyl chlorogenate (12), 3,4,5-trimethoxyphenol (13), α -tocopherylquinone (14), quinovic acid (15), methyl caffeate (16), and hyperoside (17). The contents of rhynchophylline and isorhynchophylline from *U. scandens* were 0.72 and 0.38 $\mu\text{g/g}$. **Conclusion** Compounds 7—9 and 11—14 are isolated from *Uncaria* genus for the first time. Compounds 1—6 and 16, 17 are isolated from *U.*

收稿日期: 2019-02-20

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项 (2014FB014); 昆明医科大学“百名中青年学术和技术骨干”培养计划 (60117190410); 云南省重点实验室培养计划资助项目 (2017DG006)

作者简介: 王子明 (1993—), 男, 在读硕士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 2214183850@qq.com

*通信作者 王 扣 (1983—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。E-mail: koko_yaya@163.com

王 飞 (1980—), 男, 博士, 从事天然产物实体库的组建与管理。E-mail: f.wang@mail.biobiopharma.com

scandens for the first time. The contents of rhynchophylline and isorhynchophylline is low and the reasonable use of them as *U. scandens* in some areas needs to be further verified.

Key words: *Uncaria scandens* (Smith) Hutchins; indole alkaloids; 3 β -isodihydrocadambine; strictosamide; methyl chlorogenate; α -tocopherylquinone

攀茎钩藤 *Uncaria scandens* (Smith) Hutchins, 为茜草科 (Rubiaceae) 钩藤属 *Uncaria* Schreber nom. cons. 植物, 产于广东、广西、云南、四川及西藏等地, 在民间有广泛的应用基础, 其带钩茎枝水煎液可用来防治感冒, 其在广西也作中药钩藤使用^[1]。然而《中国药典》2015 年版规定中药钩藤的基原植物为钩藤 *U. rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil.、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsute* Havil. 或无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb.^[2]。前人已从攀茎钩藤中分离到生物碱、萜类、甾类、香豆素、有机酸等类型化合物 30 多个, 其中吲哚生物碱类成分 4 个^[3-8]。为了进一步明确攀茎钩藤在化学成分上与中药钩藤有何异同, 本实验对云南澜沧产攀茎钩藤茎枝的化学成分进行研究, 从 95% 乙醇提取物中分离得到 17 个化合物, 包括 10 个吲哚生物碱和 7 个其他类化合物, 分别鉴定为 5 α -carboxystrictosidine (**1**)、3 β -异二氢卡丹宾碱 (3 β -isodihydrocadambine, **2**)、异长春花苷内酰胺 (strictosamide, **3**)、3 α -二氢卡丹宾碱 (3 α -dihydrocadambine, **4**)、帽柱叶碱 (mitraphylline, **5**)、恩卡林碱 F (uncarine F, **6**)、3 β -异二氢卡丹宾碱 4-氧化物 (3 β -isodihydrocadambine 4-oxide, **7**)、异二氢卡丹宾碱 (isodihydrocadambine, **8**)、nauclefine (**9**)、卡丹宾碱 (cadambine, **10**)、calyxamine B (**11**)、绿原酸甲酯 (methyl chlorogenate, **12**)、3,4,5-三甲氧基苯酚 (3,4,5-trimethoxyphenol, **13**)、托可醌 (α -tocopherylquinone, **14**)、喹诺瓦酸 (quinovic acid, **15**)、咖啡酸甲酯 (methyl caffeate, **16**)、金丝桃苷 (hyperoside, **17**)。其中, 化合物 **7**~**9**、**11**~**14** 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 **1**~**6**、**16**、**17** 为首次从该植物中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE III 500、600 MHz 核磁共振仪 (Bruker 公司) (TMS 为内标); Agilent 1200 分析型和制备型 HPLC (Agilent 公司); Shimadzu Inertsil ODS 制备色谱柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 10 μ m) (Shimadzu 公司); Agilent G6230 型质谱仪 (Agilent

公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (德国 Merck 公司); BUCHI pump Manager C-615 型中压色谱仪 (瑞士 Buchi 公司); WFH-203 (2F-1) 紫外分析仪 (上海精科实业有限公司); RP₁₈ 色谱填料 (德国 Merck 公司); 薄层硅胶板 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 所有试剂均为分析纯或色谱纯。对照品钩藤碱 (批号 bbp00607) 和异钩藤碱 (批号 bbp00607) 均为云南西力生物公司产品, 质量分数均大于 98%。

攀茎钩藤茎枝采于云南省普洱市澜沧县, 原植物经中国医学科学院西双版纳州傣药南药重点实验室李海涛副研究员鉴定为茜草科钩藤属植物攀茎钩藤 *Uncaria scandens* Hutchins.。标本 (U-2017-001) 存放于昆明医科大学药学院。

2 提取与分离

20 kg 攀茎钩藤茎枝, 粉碎后用 95% 乙醇冷浸提取 3 次, 每次 7 d, 减压浓缩得总浸膏 0.97 kg。用硅胶 (80~100 目) 拌样, 经硅胶柱色谱, 用石油醚-丙酮 (10:1 $\rightarrow$ 0:1) 系统洗脱, TLC 跟踪, 合并相同流分得到 6 个部分 (Fr. 1~6)。Fr. 1 经硅胶柱, 用石油醚-丙酮 (10:1) 洗脱, 制备型 TLC (石油醚-丙酮 10:1) 纯化得到化合物 **14** (59 mg)。Fr. 2 经硅胶柱色谱, 以氯仿-丙酮-氨水 (60:10:1 $\rightarrow$ 60:20:1) 梯度洗脱得到 4 个组分 (Fr. 2-1~2-4)。Fr. 2-1 经 Sephadex LH-20 凝胶 (甲醇) 和制备型 HPLC (甲醇-水 35:65) 纯化得到化合物 **13** (45 mg)。Fr. 3 经硅胶柱色谱, 用氯仿-甲醇 (30:1 $\rightarrow$ 15:1) 洗脱得到化合物 **15** (115 mg)。Fr. 4 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (15:1 $\rightarrow$ 4:1) 洗脱, 再用制备型 HPLC (甲醇-水 25:75) 纯化得到化合物 **12** (423 mg) 和 **17** (100 mg)。Fr. 5 通过硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (60:1 $\rightarrow$ 0:1) 洗脱得到 5 个组分 (Fr. 5-1~5-5)。Fr. 5-1 用制备型 HPLC (甲醇-水 58:42) 纯化得到化合物 **5** (5 mg) 和 **6** (5 mg)。Fr. 5-2 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮-氨水 (60:30:1) 洗脱, 制备型 TLC (氯仿-甲醇 20:1) 纯化得到化合物 **9** (8 mg)。Fr. 5-3 经 Sephadex LH-20 凝胶 (氯仿-甲醇 1:1) 和制备型 HPLC (甲醇-水 50:50)

纯化后,经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(15:1→4:1)洗脱得到化合物**7**(19 mg)、**8**(6 mg)、**11**(6 mg)和**16**(3.4 mg)。Fr. 5-4通过制备型HPLC(甲醇-水 60:40)纯化后,经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(8:1)洗脱得到化合物**2**(220 mg)和**10**(57 mg)。Fr. 5-5经制备型HPLC(甲醇-水 60:40)纯化后,再通过硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(10:1→8:1)洗脱得到化合物**4**(91 mg)和**3**(267 mg)。Fr. 6经制备型HPLC(甲醇-水 43:57)纯化后,通过硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(5:1→4:1)梯度洗脱得到化合物**1**(20 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:淡黄色粉末,ESI-MS m/z : 575 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.61 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-3), 3.67 (1H, dd, J = 11.8, 7.1 Hz, H-5), 2.76 (2H, m, H-6 α , 20), 3.08 (1H, m, H-6), 7.45 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-9), 7.03 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-10), 7.12 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-11), 7.29 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-12), 2.22 (1H, m, H-14 α), 2.43 (1H, m, H-14 β), 3.05 (1H, m, H-15), 7.82 (1H, s, H-17), 5.25 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-18 α), 5.64 (1H, d, J = 17.4 Hz, H-18 β), 5.91 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-19), 5.81 (1H, m, H-21), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 4.82 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 3.22~3.43 (4H, m, H-2'~5'), 3.93 (1H, dd, J = 11.8, 2.1 Hz, H-6' α), 4.01 (1H, m, H-6' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 130.0 (C-2), 49.5 (C-3), 53.0 (C-5), 24.0 (C-6), 108.3 (C-7), 127.5 (C-8), 119.2 (C-9), 120.6 (C-10), 123.4 (C-11), 112.2 (C-12), 138.5 (C-13), 34.6 (C-14), 32.7 (C-15), 108.6 (C-16), 157.2 (C-17), 119.8 (C-18), 135.2 (C-19), 45.3 (C-20), 97.4 (C-21), 171.8 (C-22), 177.5 (C-23), 52.9 (-OCH₃), 100.4 (C-1'), 74.6 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.8 (C-4'), 78.9 (C-5'), 63.1 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[9-10],故鉴定化合物**1**为5 α -carboxystrictosidine。

化合物**2**:黄色粉末,ESI-MS m/z : 547 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.54 (1H, brs, H-3), 3.12 (1H, m, H-5 α), 3.63 (1H, m, H-5 β), 2.60 (1H, m, H-6 α), 3.13 (1H, m, H-6 β), 7.40 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-9), 6.98 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-10), 7.06 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-11), 7.35 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-12), 1.90 (1H, m, H-14 α), 2.48 (1H, m, H-14 β), 2.50 (1H, m, H-15), 7.52 (1H, s, H-17), 3.94 (1H, dd, J = 12.0, 7.2 Hz, H-18 α), 4.02 (1H, dd, J = 12.1, 7.5 Hz, H-18 β),

3.12 (1H, m, H-19), 2.10 (1H, m, H-20), 6.06 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-21), 3.74 (3H, s, -OCH₃), 4.83 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 3.22~3.41 (4H, m, H-2'~5'), 3.65 (1H, dd, J = 12.4, 7.2 Hz, H-6' α), 3.90 (1H, dd, J = 12.3, 2.4 Hz, H-6' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 132.9 (C-2), 48.9 (C-3), 49.2 (C-5), 17.9 (C-6), 108.8 (C-7), 128.5 (C-8), 118.6 (C-9), 119.8 (C-10), 122.1 (C-11), 112.2 (C-12), 137.7 (C-13), 31.2 (C-14), 29.1 (C-15), 111.8 (C-16), 154.2 (C-17), 62.7 (C-18), 57.30 (C-19), 38.8 (C-20), 96.3 (C-21), 168.7 (C-22), 51.9 (-OCH₃), 99.8 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.8 (C-3'), 71.9 (C-4'), 77.6 (C-5'), 63.2 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[11-12],故鉴定化合物**2**为3 β -异二氢卡丹宾碱。

化合物**3**:黄色粉末,ESI-MS m/z : 499 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.07 (1H, m, H-3), 3.10 (1H, td, J = 12.0, 4.2 Hz, H-5 α), 4.86 (1H, dd, J = 12.8, 5.5 Hz, H-5 β), 2.64~2.69 (2H, m, H-6 α , 20), 2.90~2.97 (2H, m, H-6 β , 2'), 7.37 (1H, m, H-9), 6.99 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-10), 7.05 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-11), 7.31 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-12), 2.03 (1H, td, J = 13.9, 6.0 Hz, H-14 α), 2.46 (1H, ddd, J = 14.1, 4.7, 2.1 Hz, H-14 β), 2.78 (1H, m, H-15), 7.38 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-17), 5.31 (1H, dd, J = 17.2, 2.0 Hz, H-18 α), 5.36 (1H, dd, J = 10.2, 2.0 Hz, H-18 β), 5.65 (1H, dt, J = 17.2, 10.0 Hz, H-19), 5.40 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-21), 4.57 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1'), 3.15~3.31 (3H, m, H-3'~5'), 3.62 (1H, dd, J = 11.9, 5.9 Hz, H-6' α), 3.85 (1H, dd, J = 11.9, 2.2 Hz, H-6' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 134.8 (C-2), 55.1 (C-3), 44.8 (C-5), 22.1 (C-6), 110.3 (C-7), 128.7 (C-8), 118.7 (C-9), 120.1 (C-10), 122.5 (C-11), 112.2 (C-12), 137.8 (C-13), 27.3 (C-14), 24.9 (C-15), 109.2 (C-16), 149.2 (C-17), 120.5 (C-18), 134.4 (C-19), 44.8 (C-20), 98.0 (C-21), 167.1 (C-22), 100.5 (C-1'), 74.3 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[13],故鉴定化合物**3**为异长春花苷内酰胺。

化合物**4**:黄色粉末,ESI-MS m/z : 547 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 3.84 (1H, m, H-3), 2.80 (2H, m, H-6), 7.39 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-9), 6.98 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-10), 7.05 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-11), 7.30 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 2.38 (1H, d, J =

14.6 Hz, H-14 α), 1.79 (1H, dt, J = 14.6, 10.4 Hz, H-14 β), 3.08 (1H, m, H-15), 7.57 (1H, s, H-17), 3.29 (1H, m, H-18 α), 2.93 (1H, m, H-18 β), 4.35 (1H, dd, J = 7.5, 5.3 Hz, H-19), 2.09 (1H, dt, J = 9.0, 5.9 Hz, H-20), 5.61 (1H, d, J = 9.1 Hz, H-21), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 4.82 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 3.31~3.42 (4H, m, H-2'~5'), 3.86 (1H, m, H-6' α), 3.68 (1H, m, H-6' β); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 136.0 (C-2), 64.1 (C-3), 56.1 (C-5), 23.4 (C-6), 108.7 (C-7), 128.2 (C-8), 118.6 (C-9), 119.7 (C-10), 122.0 (C-11), 112.0 (C-12), 138.2 (C-13), 37.5 (C-14), 34.1 (C-15), 111.3 (C-16), 153.6 (C-17), 59.4 (C-18), 66.6 (C-19), 44.6 (C-20), 97.5 (C-21), 169.4 (C-22), 52.0 (-OCH₃), 100.8 (C-1'), 74.6 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.0 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.3 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[14], 故鉴定化合物 **4** 为 3 α -二氢卡丹宾碱。

化合物 **5**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 369 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.80 (1H, brs, 1-NH), 2.47 (1H, m, H-3), 2.50 (1H, m, H-5 α), 3.37 (1H, m, H-5 β), 2.04 (1H, m, H-6 α), 2.49 (1H, m, H-6 β), 7.18 (2H, m, H-9, 11), 7.04 (1H, t, J = 7.8 Hz, H-10), 6.85 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-12), 2.38 (1H, m, H-14 α), 1.24 (1H, m, H-14 β), 2.10 (1H, m, H-15), 7.43 (1H, s, H-17), 1.10 (3H, d, J = 6.5 Hz, H₃-18), 4.37 (1H, m, H-19), 2.10 (1H, m, H-20), 1.84 (1H, t, J = 10.4 Hz, H-21 α), 3.21 (1H, dd, J = 10.7, 2.5 Hz, H-21 β), 3.58 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 181.0 (C-2), 74.6 (C-3), 54.3 (C-5), 35.2 (C-6), 55.6 (C-7), 133.4 (C-8), 123.1 (C-9), 122.7 (C-10), 128.1 (C-11), 109.6 (C-12), 140.7 (C-13), 28.4 (C-14), 30.4 (C-15), 106.9 (C-16), 154.1 (C-17), 14.9 (C-18), 73.9 (C-19), 40.5 (C-20), 54.4 (C-21), 167.2 (C-22), 50.79 (-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[15], 故鉴定化合物 **5** 为帽柱叶碱。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 369 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 2.34 (1H, m, H-3), 3.26 (1H, m, H-5 α), 2.45 (1H, m, H-5 β), 2.36 (1H, m, H-6 α), 2.03 (1H, m, H-6 β), 7.36 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-9), 7.01 (1H, td, J = 7.6, 1.1 Hz, H-10), 6.18 (1H, td, J = 7.7, 1.3 Hz, H-11), 6.89 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-12), 1.02 (1H, m, H-14 α), 2.18 (1H, m, H-14 β), 2.70 (1H, brm, H-15), 7.41 (1H, s, H-17), 1.22 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH₃-18), 4.17 (1H, qd, J = 6.6, 1.5 Hz,

H-19), 1.93 (1H, m, H-20), 2.98 (1H, m, H-21 α), 2.16 (1H, m, H-21 β), 3.62 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 180.8 (C-2), 67.5 (C-3), 54.0 (C-5), 34.8 (C-6), 55.2 (C-7), 133.2 (C-8), 125.1 (C-9), 122.2 (C-10), 127.6 (C-11), 109.3 (C-12), 140.1 (C-13), 26.9 (C-14), 25.0 (C-15), 105.0 (C-16), 153.9 (C-17), 18.6 (C-18), 74.7 (C-19), 36.9 (C-20), 53.4 (C-21), 167.3 (C-22), 50.94 (-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为恩卡林碱 F。

化合物 **7**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 585 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.87 (1H, brs, H-3), 4.15 (1H, m, H-5 α), 4.37 (1H, m, H-5 β), 3.07 (1H, m, H-6 α), 3.42 (1H, m, H-6 β), 7.47 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-9), 7.05 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-10), 7.16 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-11), 7.43 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-12), 1.58 (1H, m, H-14 α), 2.65 (1H, m, H-14 β), 2.66 (1H, m, H-15), 7.55 (1H, s, H-17), 4.18 (1H, dd, J = 13.4, 3.5 Hz, H-18 α), 4.47 (1H, m, H-18 β), 4.37 (1H, m, H-19), 2.17 (1H, m, H-20), 6.43 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-21), 3.74 (3H, s, -OCH₃), 4.77 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.22~3.40 (4H, m, H-2'~5'), 3.69 (1H, m, H-6' α), 3.84 (1H, m, H-6' β); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 129.5 (C-2), 74.6 (C-3), 68.20 (C-5), 21.3 (C-6), 108.2 (C-7), 127.6 (C-8), 119.1 (C-9), 120.6 (C-10), 123.4 (C-11), 112.7 (C-12), 138.9 (C-13), 27.7 (C-14), 29.4 (C-15), 110.0 (C-16), 154.6 (C-17), 60.9 (C-18), 69.5 (C-19), 39.3 (C-20), 97.5 (C-21), 168.5 (C-22), 52.0 (-OCH₃), 100.1 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.6 (C-3'), 70.9 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.0 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[16], 故鉴定化合物 **7** 为 3 β -异二氢卡丹宾碱 4-氧化物。

化合物 **8**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 547 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 11.67 (1H, s, -OH), 3.20~3.29 (2H, m, H-3, 6 β), 2.55~2.93 (2H, m, H-5 α , 6 α), 3.93~3.97 (2H, m, H-5 β , 3'), 7.63 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-9), 7.23 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-10), 7.28 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-11), 7.59 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-12), 1.56 (1H, q, J = 12.6 Hz, H-14 α), 2.79 (1H, dt, J = 13.2, 3.8 Hz, H-14 β), 2.97 (1H, m, H-15), 7.66 (1H, s, H-17), 4.26 (1H, dd, J = 11.4, 5.2 Hz, H-18 α), 4.45 (1H, dd, J = 11.3, 2.9 Hz, H-18 β), 3.81 (1H, d, J = 11.6 Hz, H-19), 2.32 (1H, m, H-20), 6.43 (1H, d, J = 9.1 Hz, H-21), 3.55 (3H, s, -OCH₃), 5.40 (1H, d,

$J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.09 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, H-2'), 4.22~4.29 (2H, m, H-4', 5'), 3.35 (1H, dd, $J = 12.3$, 3.9 Hz, H-6' α), 4.69 (1H, dd, $J = 12.1$, 7.5 Hz, H-6' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, pyridine- d_5) δ : 136.6 (C-2), 68.4 (C-3), 47.5 (C-5), 23.1 (C-6), 108.6 (C-7), 128.1 (C-8), 118.5 (C-9), 119.2 (C-10), 121.3 (C-11), 111.5 (C-12), 137.6 (C-13), 34.9 (C-14), 33.4 (C-15), 110.8 (C-16), 153.6 (C-17), 63.1 (C-18), 61.1 (C-19), 40.2 (C-20), 98.1 (C-21), 167.0 (C-22), 51.0 (-OCH₃), 101.5 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.9 (C-4'), 78.4 (C-5'), 64.2 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为异二氢卡丹宾碱。

化合物 **9**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 288 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 4.51 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5), 3.18 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-6), 7.61 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9), 7.10 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 7.26 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-11), 7.43 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12), 6.94 (1H, s, H-14), 9.36 (1H, s, H-17), 7.54 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-20), 8.57 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-21); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 127.9 (C-2), 137.5 (C-3), 42.2 (C-5), 20.6 (C-6), 115.5 (C-7), 125.9 (C-8), 121.0 (C-9), 121.2 (C-10), 125.1 (C-11), 112.8 (C-12), 139.4 (C-13), 98.4 (C-14), 144.2 (C-15), 120.6 (C-16), 150.9 (C-17), 120.6 (C-20), 151.5 (C-21), 161.9 (C-22)。以上数据与文献对照一致^[18], 故鉴定化合物 **9** 为 nauclefine。

化合物 **10**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 545 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 2.82 (1H, m, H-5 α), 3.14 (1H, m, H-5 β), 2.80 (2H, m, H-6), 7.45 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-9), 6.99 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10), 7.10 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 7.32 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-12), 2.05 (1H, m, H-14 α), 2.08 (1H, m, H-14 β), 2.80 (1H, m, H-15), 7.55 (1H, s, H-17), 3.00 (1H, dd, $J = 10.9$, 7.3 Hz, H-18 α), 3.49 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-18 β), 4.92 (1H, m, H-19), 1.73 (1H, m, H-20), 5.82 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-21), 3.64 (3H, s, -OCH₃), 4.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.31~3.40 (4H, m, H-2'~5'), 3.61 (1H, dd, $J = 12.1$, 6.3 Hz, H-6' α), 3.86 (1H, dd, $J = 12.1$, 2.3 Hz, H-6' β); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 133.1 (C-2), 92.8 (C-3), 53.8 (C-5), 22.7 (C-6), 111.8 (C-7), 126.7 (C-8), 120.0 (C-9), 119.8 (C-10), 123.2 (C-11), 112.6 (C-12), 138.4 (C-13), 42.7 (C-14), 26.6 (C-15), 111.0

(C-16), 154.3 (C-17), 59.3 (C-18), 74.4 (C-19), 40.9 (C-20), 97.4 (C-21), 168.8 (C-22), 51.8 (-OCH₃), 101.6 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.9 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.7 (C-6')。以上数据与文献对照一致^[13], 故鉴定化合物 **10** 为卡丹宾碱。

化合物 **11**: 黄色油状液体, ESI-MS m/z : 196 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 3.0 (2H, s, H-3), 2.41 (2H, s, H-5), 1.42 (6H, s, 7, 8-CH₃), 1.45 (6H, s, 9, 10-CH₃), 6.45 (1H, s, H-11), 2.23 (3H, s, 13-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 58.9 (C-2), 37.9 (C-3), 148.7 (C-4), 46.2 (C-5), 58.3 (C-6), 27.3 (C-7~10), 127.0 (C-11), 198.4 (C-12), 32.0 (C-13)。以上数据与文献对照一致^[19], 故鉴定化合物 **11** 为 calyxamine B。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 369 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 2.00~2.22 (4H, m, H-2, 6), 5.26 (1H, td, $J = 7.5$, 4.6 Hz, H-3), 3.72 (1H, dd, $J = 7.5$, 3.2 Hz, H-4), 4.12 (1H, m, H-5), 6.20 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H- α), 7.51 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H- β), 7.03 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.3$, 2.0 Hz, H-6'), 3.68 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 75.8 (C-1), 37.8 (C-2), 72.1 (C-3), 70.3 (C-5), 38.0 (C-6), 175.4 (C-7), 127.6 (C-1'), 115.1 (C-2'), 146.9 (C-3'), 149.7 (C-4'), 116.5 (C-5'), 123.0 (C-6'), 147.2 (C-7'), 115.0 (C-8'), 168.2 (C-9'), 53.0 (-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[20], 鉴定化合物 **12** 为绿原酸甲酯。

化合物 **13**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 185 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.08 (2H, s, H-2, H-6), 3.80 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.78 (3H, s, 4-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[21], 鉴定化合物 **13** 为 3,4,5-三甲氧基苯酚。

化合物 **14**: 黄色油状液体, ESI-MS m/z : 469 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.99 (6H, s, 7, 8-CH₃), 2.02 (3H, s, 9-CH₃), 2.53 (2H, m, H-1'), 1.22 (3H, s, 16'-CH₃), 0.85 (9H, d, $J = 6.6$ Hz, 17', 18', 19'-CH₃), 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 20'-CH₃); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 187.1 (C-1), 140.4 (C-2), 140.1 (C-3), 187.6 (C-4), 140.5 (C-5), 144.4 (C-6), 12.5 (C-7), 12.3 (C-8), 11.8 (C-9), 21.3 (C-1'), 40.2 (C-2'), 72.6 (C-3'), 42.2 (C-4'), 21.2 (C-5'), 37.5 (C-6'), 32.7 (C-7'), 37.4 (C-8', 10'), 24.4 (C-9'), 32.8 (C-11'), 37.2 (C-12'), 24.7 (C-13'), 39.3 (C-14'), 27.9 (C-15'), 26.5

(C-16'), 19.6 (C-17'), 19.7 (C-18'), 22.6 (C-19'), 22.5 (C-20')。以上数据与文献对照一致^[22], 鉴定化合物 **14** 为托可酩。

化合物 **15**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 509 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, pyridine- d_5) δ : 3.30 (1H, dd, $J = 11.4, 4.7$ Hz, H-3), 6.02 (1H, m, H-12), 2.80 (1H, m, H-18), 1.13 (3H, s, 23-CH₃), 1.21 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, 24-CH₃), 0.78 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 25-CH₃), 1.05 (3H, s, 26-CH₃), 0.91 (3H, s, 29-CH₃), 0.97 (3H, s, 30-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine- d_5) δ : 39.2 (C-1), 26.2 (C-2), 77.9 (C-3), 39.0 (C-4), 55.8 (C-5), 18.8 (C-6), 37.3 (C-7), 40.0 (C-8), 47.2 (C-9), 37.0 (C-10), 23.3 (C-11), 129.0 (C-12), 134.0 (C-13), 56.7 (C-14), 28.1 (C-15), 25.4 (C-16), 48.6 (C-17), 55.0 (C-18), 38.7 (C-19), 37.6 (C-20), 30.5 (C-21), 36.8 (C-22), 28.5 (C-23), 16.5 (C-24), 16.5 (C-25), 18.1 (C-26), 177.9 (C-27), 180.0 (C-28), 18.8 (C-29), 21.2 (C-30)。以上数据与文献对照一致^[23], 故鉴定化合物 **15** 为喹诺瓦酸。

化合物 **16**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 195 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.13 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.99 (1H, dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, H-6), 7.53 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.25 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 3.71 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 127.4 (C-1), 115.1 (C-2), 146.2 (C-3), 148.6 (C-4), 115.2 (C-5), 122.4 (C-6), 145.8 (C-7), 116.0 (C-8), 167.7 (C-9), 51.4 (-OCH₃)。以上数据与文献对照一致^[24], 故鉴定化合物 **16** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **17**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 487 $[M+Na]^+$ 。¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.60 (1H, s, 5-OH), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 7.51 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.65 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 5.36 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 3.29~3.64 (5H, m, H-2''~6''); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.4 (C-2), 133.4 (C-3), 177.5 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 163.4 (C-7), 93.7 (C-8), 156.4 (C-9), 103.9 (C-10), 120.8 (C-1'), 114.7 (C-2'), 145.1 (C-3'), 148.5 (C-4'), 115.6 (C-5'), 121.7 (C-6'), 101.8 (C-1''), 71.3 (C-2''), 73.2 (C-3''), 67.7 (C-4''), 76.0 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献对照一致^[25], 故鉴定化合物 **17** 为金丝桃苷。

4 含量测定

文献研究表明, 钩藤碱和异钩藤碱为钩藤降压的主要成分, 其中又以异钩藤碱的降压作用最强^[26]。在对攀茎钩藤进行系统的化学成分分离过程中没有得到钩藤碱和异钩藤碱, 为了进一步明确该植物中是否含有这2种生物碱, 利用高效液相色谱法测定了其中钩藤碱和异钩藤碱的含量。

采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱, 乙腈-水 (含 0.04% 三乙胺, 冰乙酸调 pH 为 8) 57:43 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10.00 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 在 245 nm 波长下检测分析。采用文献方法^[27]制备钩藤碱和异钩藤碱混合对照品溶液, 进样并测定峰面积, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到钩藤碱和异钩藤碱的回归方程分别为 $Y=2\ 280.2 X-18.879$ ($r>0.999\ 9$) 和 $Y=1\ 968 X-19.524$ ($r>0.999\ 9$), 表明 2 种生物碱在 0.05~1.60 μ g 均与峰面积呈良好的线性关系。该分析方法的精密度、稳定性、重复性和加样回收率考察结果均符合要求。

取攀茎钩藤带钩茎枝 100 g, 加 8 倍量 95% 乙醇, 超声提取 3 次, 每次 80 min, 抽滤, 滤液合并, 浓缩干燥后用 pH 2 的盐酸 100 mL 转移至分液漏斗中, 用等量的醋酸乙酯萃取 4 次, 水层用氨水调 pH 9~10, 再用等量氯仿萃取 3 次, 回收氯仿层即得总生物碱提取物。称取提取物 6 mg, 精密称定, 置于 1 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。按照上述色谱条件进样分析, 得到攀茎钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的质量分数分别为 0.72、0.38 μ g/g。有文献表明钩藤药材中的钩藤碱和异钩藤碱质量分数可分别高达 920 和 770 μ g/g^[28], 说明攀茎钩藤中这两种生物碱的含量很低。

5 讨论

吲哚生物碱为钩藤属植物中最重要的特征性成分, 具有降血压、抗心律失常、抗血小板聚集以及抗血栓形成等作用, 主要结构类型包括吲哚生物碱和氧化吲哚生物碱。目前对中药钩藤的降血压活性研究已较为透彻, 钩藤碱和异钩藤碱等是其主要活性成分, 降压强度依次为异钩藤碱>钩藤碱>钩藤总碱>非生物碱成分^[29]。然而, 在攀茎钩藤中以钩藤碱和异钩藤碱为代表的氧化吲哚生物碱类含量较低, 含量分别为 0.72 和 0.38 μ g/g。相反, 从系统化学成分分离的结果可以看出, 5 α -carboxystrictosidine、

3 β -异二氢卡丹宾碱、异长春花苷内酰胺、3 α -二氢卡丹宾碱,以及卡丹宾碱等吲哚生物碱的含量较高,这提示攀茎钩藤这一近缘种在云南和广西部分地区作为中药钩藤使用的合理性有待进一步验证。

参考文献

- [1] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 史晓龙. 藏药攀茎钩藤化学成分及生物活性研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2015.
- [4] 马大勇, 汪 冶, 晏 晨, 等. 攀茎钩藤化学成分的研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(7): 507-509.
- [5] 张俊杰, 杨敏超, 彭 伟, 等. 攀茎钩藤化学成分的研究 [J]. 海南师范大学学报, 2016, 29(2): 189-191.
- [6] 张俊杰. 云南钩藤和攀茎钩藤两种药用植物化学成分的研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2016.
- [7] 邹 澄, 张荣平, 孙晓豫, 等. 攀枝钩藤中的化学成分 [J]. 中国民族民间医药, 1998(1): 41-42.
- [8] Yang A M, Shi X L, Zheng Z S, *et al.* Chemical constituents of *Uncaria scandens* [J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54(4): 793-794.
- [9] Ferrari F, Messana I, Botta B. Constituents of *Guettarda platypoda* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(6): 1150-1151.
- [10] 韦 宏. 团花树皮的吲哚生物碱成分 [J]. 广西科学院学报, 1999, 15(2): 52-55.
- [11] Takayama H, Tsutsumi S I, Kitajima M, *et al.* Gluco-indole alkaloids from *Nauclea cadamba* in Thailand and transformation of 3 α -dihydrocadambine into the indolopyridine alkaloid, 16-carbomethoxynaufoline [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(2): 232-233.
- [12] Raja P B, Qureshi A K, Rahim A A, *et al.* *Neolamarckia cadamba* alkaloids as eco-friendly corrosion inhibitors for mild steel in 1 M HCl media [J]. *Corros Sci*, 2013, 69(2): 292-301.
- [13] 杨 龄, 肖春贵, 金亚菊, 等. 倒挂金钩茎枝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 2365-2371.
- [14] 辛文波, 俞桂新, 王峥涛. 钩藤生物碱类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 204-207.
- [15] Seki H, Takayama H, Aimi N, *et al.* A nuclear magnetic resonance study on the eleven stereoisomers of heteroyohimbine-type oxindole alkaloids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(12): 2077-2086.
- [16] Zhou H, He H P, Kong N C, *et al.* Indole alkaloids from the leaves of *Anthocephalus chinensis* [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 91(11): 2148-2152.
- [17] Endo K, Oshima Y, Kikuchi H, *et al.* Hypotensive principles of *Uncaria hooks* [J]. *Planta Med*, 1983, 49(11): 188-190.
- [18] Abreu P, Pereira A. A new indole alkaloid from *Sarcocephalus latifolius* [J]. *Heterocycles*, 1998, 29(48): 885-891.
- [19] Rodriguez A D, Cobar O M, Padilla O L, *et al.* Calyxamines A and B, novel piperidine alkaloids from the caribbean sea sponge *Calyx podatypa* [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(12): 1331-1333.
- [20] 孔娜娜, 方圣涛, 刘 莺. 罗布麻叶中非黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3114-3118.
- [21] 李 薇, 梅文莉, 王 昊, 等. 白木香树干的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2826-2831.
- [22] 刘晖晖, 于永明, 张 涛, 等. 半边铁角蕨化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(2): 100-104.
- [23] 孙敬勇. 胆木和山香圆化学成分及其生物活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2008.
- [24] 关永霞, 杨小生, 佟丽华, 等. 苗药地瓜藤化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 342-344.
- [25] 王 强, 徐芳辉. 衡山金丝桃地上部分乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(10): 1611-1613.
- [26] Zhang F, Sun A S, Yu L M, *et al.* Effects of isorhynchophylline on angiotensin II-induced proliferation in rat vascular smooth muscle cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(12): 1673-1678.
- [27] 邓 岳, 刘阿娜, 王小明, 等. UPLC 法同时测定钩藤提取物中 4 种生物碱类成分的含量 [J]. 中药材, 2016, 39(4): 819-821.
- [28] 杨秀娟, 洪燕龙, 吴 飞, 等. HPLC 测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的方法学探讨 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 720-723.
- [29] Heitzman M E, Neto C C, Winiarz E, *et al.* Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(1): 5-29.