

REFERENCES

- [1] LIANG X, BAI M, YAN X, et al. External curative effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* decoction on skin wounds [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(5): 486-490.
- [2] LI Z G, NI G C, SUN X W, et al. Determination of the residual organic solvents in salvianolic acid A by GC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(1): 59-61.
- [3] BI L, CHEN W P, CHEN J P, et al. Effects of salvianolic acid A on inhibition of human lung cancer cells by regulating PTEN-PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2012, 28(6): 541-543.
- [4] BI L, CHEN W P, JIANG Z Q, et al. Effect of salvianolic acid A on mitochondrial transmembrane potential of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2012, 27(4): 1171-1173.
- [5] WANG X, TIAN Y, YAN X Y, et al. Inhibitory effect of salvianolic acid A on migration of LTPC cells via ERK signaling [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2011, 33(12): 2059-2061.
- [6] YOU H, DING W, DANG H, et al. c-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 879-889.
- [7] ZHANG Y M, ZHANG X Y, LIU L L, et al. Detection of expressions of HGF mRNA and c-Met mRNA in cervical carcinoma with QRT-PCR method [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*(西安交通大学学报 医学版), 2011, 32(2): 234-237.
- [8] BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W, GHERARDI E, et al. Met, metastasis, motility and more [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 915-925.
- [9] ZHANG S H, SU J, ZHEN Y S. Salvianolic acid A inhibits nucleoside transport and potentiates the antitumor activity of chemotherapeutic drugs [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 2004, 39(7): 496-499.
- [10] PAN Y F, ZHANG J B, DING J, et al. Pharmacological research progress of salvianolic acid A [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2008, 15(4): 294-295.

收稿日期: 2013-08-28

乌灵菌粉化学成分研究

陆静娴¹, 罗镭¹, 陈勇¹, 陈建², 祝明^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.浙江佐力药业股份有限公司, 浙江湖州 313299)

摘要: 目的 对乌灵菌粉的化学成分进行研究。方法 采用硅胶柱层析、制备液相等多种分离手段, 对乌灵菌粉中石油醚、乙酸乙酯部分进行提取、分离、纯化, 通过核磁数据进行结构鉴定。结果 分离并鉴定 4 个化合物, 分别为: 5-hydroxymellein(1)、5-carboxymellein(2)、金雀异黄素(3)和 5-methylmellein(4)。结论 化合物 2, 3, 4 为首次从乌灵菌粉提取分离得到; 化合物 1, 2, 4 为乌灵菌粉的特征性成分。

关键词: 乌灵菌粉; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)05-0541-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.006

Chemical Constituents of Wuling Fermentative Powder

LU Jingxian¹, LUO Lei¹, CHEN Yong¹, CHEN Jian², ZHU Ming^{1*} (1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2. Zhejiang Jolly Pharmaceutical Co. Ltd., Huzhou 313299, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents of Wuling fermentative powder. **METHODS** Four components were extracted, separated and purified from the parts of petroleum and acetic ether by the means of silica gel column chromatography and preparative HPLC methods, and identified by NMR data. **RESULTS** The four compounds were elucidated as: 5-hydroxymellein(1), 5-carboxymellein(2), genistein(3) and 5-methylmellein(4). **CONCLUSION** The later three components are obtained for the first time from Wuling Fermentative powder. 1, 2 and 4 are the characteristic components in Wuling Fermentative powder.

KEY WORDS: Wuling fermentative powder; chemical constituents

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2012ZX09304005)

作者简介: 陆静娴, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)864594225
任中药师 Tel: (0571)86734991 E-mail: zhumingd@hotmail.com

E-mail: lujingxian1984@gmail.com

*通信作者: 祝明, 女, 主

乌灵菌是一种生长在土栖白蚁废弃蚁巢上的珍稀药用真菌,黑柄炭角菌 *Xylaria nigripes*(Kl.) Sacc.的菌核,属真菌门(Eumycota),子囊菌亚门(Ascomycotina),炭角菌属(*Xylaria*);主要产于四川、云南、广东、浙江、江西、江苏等地,罕见于黄河以北。以乌灵菌经深层发酵后所得的菌丝体干燥后制成的乌灵菌粉,具除湿镇惊、利小便、补心肾的功效,用于治疗失眠、心悸、吐血、产后及术后失血等,能明显改善各种记忆障碍,具益智健脑功效^[1]。有关乌灵菌粉化学成分的研究主要以氨基酸类成分及核苷类成分研究为主,而这几类成分为药用真菌类产品的共有成分^[2-3]。为了进一步明确乌灵菌粉化学组成,找寻其特征成分,更好地区分其他药用真菌产品,稳定生产工艺,本实验对乌灵菌粉化学成分进行研究,从其石油醚、乙酸乙酯部分分离得到4个化合物,分别为5-hydroxymellein(**1**)、5-carboxymellein(**2**)、金雀异黄素(**3**)和5-methylmellein(**4**),其中化合物**1**、**2**、**4**为乌灵菌粉的特征性成分;化合物**2**、**3**、**4**为首次从乌灵菌粉提取分离得到,结构式见图1。

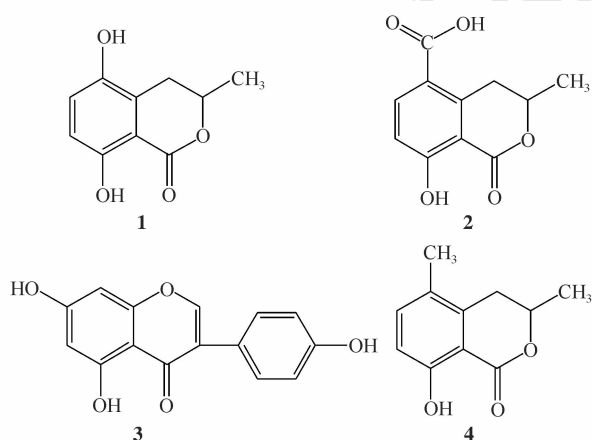


图1 4种化合物的结构

Fig 1 Structures of four compounds

1 仪器和材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 6538 四极杆飞行时间质谱仪(美国Agilent公司); Hamilton 250 μL 注射器(美国Hamilton公司); 核磁共振仪(Bruker ARX500); SSI制备液相(天津市兰博试验仪器设备有限公司); RE-52B 旋转蒸发器(上海博通化学科技有限公司); SHB-III A 循环式真空泵(上海伯龙电子设备有限公司)。

柱层析用硅胶(100~200目, 200~300目, 均为

青岛海洋化工厂分厂生产); 薄层色谱硅胶预制GF₂₅₄板(青岛海洋化工厂); 显色剂: 10%硫酸乙醇; 石油醚(沸程: 30~60℃和60~90℃, 中国石化集团杭州炼油厂, 分析纯); 乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 三氯甲烷(杭州双林化工试剂厂, 分析纯); 甲醇(杭州陆都化学试剂厂, 分析纯); 无水乙醇(杭州双林化工试剂厂, 分析纯); 乌灵菌粉(浙江佐力药业股份有限公司提供, 批号: 20080106)。

1.2 四级杆飞行时间质谱仪试验条件

电喷雾离子源, 正离子检测模式; 毛细管电压: 4.0 kV; 毛细管温度: 300℃; 干燥气: 68.95 kPa; 雾化气: 8 L·min⁻¹; 碰撞气: 氮气; 进样方式: 注射泵直接进样, 流速: 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2 提取和分离

取乌灵菌粉适量, 加70%乙醇回流提取3次, 合并提取液, 减压回收至无醇味, 分别用石油醚、乙酸乙酯萃取, 回收溶剂, 得石油醚、乙酸乙酯部分。将石油醚部分置常压硅胶柱层析中进行分析, 以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 共收集52个馏分, 经薄层色谱检识后, 合并其中25~30号组分, 用无水乙醇重结晶得到化合物**4**。

将乙酸乙酯部分置常压硅胶柱层析中进行分析, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 共收集80个馏分, 经薄层色谱检识, 合并为2段, 将第1段混合物再经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱得化合物**3**和A组分。将第2段混合物经硅胶柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 共收集20个馏分, 合并11~15号组分, 无水乙醇重结晶得到化合物**3**。A组分再经半制备液相分离, 以50%甲醇为洗脱剂, 得化合物**1**和化合物**2**。

3 结构鉴定

化合物**1**: 白色针晶, mp: 228~231℃。[α]_D²⁰ = -81.5° (MeOH)

分子量: C₁₀H₁₀O₄; ESI-MS m/z 195.065 0 [M+H]⁺(理论值 195.065 2, 偏差-1.0×10⁻⁶)。

通过分析化合物**1**的¹H-NMR(MeOD, 500 MHz)和¹³C-NMR(MeOD, 125 MHz), 观察到1个甲基信号[δ_{H} 1.49(3H, d, $J=6.0$ Hz); δ_{C} 21.37], 一个亚甲基信号[δ_{H} 2.61(1H, dd, $J=17.0, 11.5$ Hz)和3.15(1H, dd, $J=17.0, 3.5$ Hz); δ_{C} 29.73]和一个连氧的CH信号[δ_{H} 4.65(1H, m); δ_{C} 78.00]。另外, 在¹H-NMR上观察2个芳香质子信号[δ_{H} 6.69(1H,

d, $J=9.0$ Hz)和 7.01(1H, d, $J=8.5$ Hz)], 通过分析耦合常数, 推测这 2 个芳香质子为苯环上的邻位耦合。在 ^{13}C -NMR 谱上观察 10 个碳信号, 其中有 6 个芳香碳信号(其中 2 个连氧), 1 个甲基信号, 1 个亚甲基信号, 1 个连氧碳信号和 1 个羰基信号。

综上所述, 结合 2D-NMR 和文献资料, 对化合物 **2** 的氢谱和碳谱数据进行了准确的归属, 数据见表 1, 所以将化合物 **1** 鉴定为 5-hydroxymellein^[4]。

表 1 化合物 **1** 氢谱碳谱数据

Tab 1 NMR data of compound 1

	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
1		172.05	5		147.23
2			6	7.01(1H, d)	125.41
3	4.65(1H, m)	78.00	7	6.69(1H, d)	116.80
4	2.61(1H, dd)	29.73	8		156.70
	3.15(1H, dd)		8a		109.49
4a		126.16	9	1.49(3H, d)	21.37

化合物 **2**: 白色针晶, mp: 250~252 °C。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -195^{\circ}$ (MeOH)

分子量: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$; ESI-MS m/z 223.060 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 223.060 1, 偏差 1.3×10^{-6})。

^1H -NMR(MeOD, 500 MHz): δ 1.51(3H, d, $J=6.0$ Hz, 3-Me); 3.02(1H, dd, $J=12.0, 18.0$ Hz, 4-H); 3.90(1H, dd, $J=3.0, 18.0$ Hz, 4-H); 4.85(1H, m, 3-H); 6.92(1H, d, $J=9.0$ Hz, 7-H); 8.15(1H, d, $J=8.5$ Hz, 6-H)

^{13}C -NMR(MeOD, 125 MHz): δ 21.23 (C-3Me); 34.08(C-4); 77.34(C-3); 110.40(C-8a); 117.03(C-7); 121.10(C-4a); 140.19(C-6); 145.38(C-5); 166.71 (C-5COOH); 169.23(C-8); 171.82(C-1)。以上光谱数据, 与文献的数据一致, 故化合物 **2** 鉴定为 5-Carboxylmellein^[5]。

化合物 **3**: 黄色针晶, mp: 297~298 °C。

分子量: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$; ESI-MS m/z 271.059 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 271.060 1, 偏差 -1.8×10^{-6})。

^1H -NMR(CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.03 (1H, s, 2-H); 7.36(2H, d, $J=8.5$ Hz, 2'-H, 6'-H); 6.83(2H, d, $J=8.5$ Hz, 3'-H, 5'-H); 6.32(1H, d, $J=2.0$ Hz, 8-H); 6.21(1H, d, $J=1.5$ Hz, 6-H)。

^{13}C -NMR(CDCl_3 , 125 MHz): δ 182.56 (C-4);

166.25(C-7); 164.17(C-4'); 160.03(C-5); 159.13 (C-9); 155.08(C-2); 131.69(C-2', 6'); 125.06(C-1); 123.63(C-3); 116.57(C-3', 5'); 106.60(C-10); 100.42(C-6); 95.08(C-8)。以上光谱数据, 与文献的数据一致, 故化合物 **3** 鉴定为金雀异黄素^[6]。

化合物 **4**: 白色针晶, mp: 124~125 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -114^{\circ}(\text{CHCl}_3)$

分子量: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$; ESI-MS m/z 193.085 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (理论值 193.085 9, 偏差 -1.6×10^{-6})。

^1H -NMR(CDCl_3 , 500 MHz): δ 11.00(1H, s, 8-OH); 7.29(1H, d, $J=8.5$ Hz, 7-H); 6.82(1H, d, $J=9.0$ Hz, 7-H); 4.72(1H, m, 3-H); 2.96(1H, dd, $J=16.6, 3.4$ Hz, 4-H); 2.75(1H, dd, $J=16.6, 3.4$ Hz, 4-H); 2.20(3H, s, 5-Me); 1.58(3H, d, 3-Me)。

^{13}C -NMR(CDCl_3 , 125 MHz): δ 170.31 (C-1); 75.39(C-3); 31.92(C-4); 124.88(C-5); 137.91(C-6); 115.70(C-7); 160.53(C-8); 108.10(C-9); 137.91 (C-10); 18.05(3-Me); 20.91(5-Me)。以上光谱数据, 与文献的数据一致, 故化合物 **4** 鉴定为 5-methylmellein^[7]。

REFERENCES

- [1] LIAO Y J, YU J. Wuling capsule [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2000, 9(11): 797.
- [2] TANG J, CHENG M, LU J. Profiling and determination of nucleosides in several medicinal fungi by HPLC method [C]. Chinese Pharmaceutical Association 2008 Annual Meeting of the Eighth China Academic Pharmacist Week Technology(2008 年中国药学会学术年会暨第八届药师周论文集), 2008.
- [3] ZHONG R H, XU S F. Determination of adenosine content in Wuling powder by HPLC [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2003, 28(7): 679-680.
- [4] KELLY T, CHANDRAKUMAR N, WALTERS N, et al. Practical procedure for the isolation of emodin and chrysophanol [J]. J Org Chem, 1983, 48(20): 5733-5734.
- [5] ANDERSON J R, EDWARDS R L, WHALLEY A J S. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family xylariaceae [J]. J Chem Soc Perkin Trans. 1, 1983: 2185-2192. DOI: 10.1039/P19830002185.
- [6] LIU S Y, WANG Y, HE R R. Chemical constituents of *Ganoderma lucidum* (Leys. ex Fr.) Karst [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2008, 25(3): 183-188.
- [7] CHEN P, WU J, DAI H F. Chemical constituents from endophytic fungus S26 of *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2008, 18(4): 279-283.

收稿日期: 2013-03-28