

· 论著 ·

13-酰胺基取代苦参碱衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

付 奔, 田云桃, 丁 力, 吴秋业, 郭忠武, 赵庆杰 (第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 合成 13-酰胺基取代苦参碱衍生物及研究该类化合物的体外抗肿瘤活性。方法 以槐果碱为原料, 通过迈克尔加成(Michael addition), 叠氮还原酰化反应, 制得系列 13-位酰胺取代的衍生物, 所有化合物结构均经¹H NMR 等谱确证; 选取人肝癌细胞(BEL-7404)和小鼠黑色素瘤细胞(K111)对所合成的目标化合物进行体外抗肿瘤药理活性筛选。结果 设计合成了 9 个新化合物, 大多数化合物对两株肿瘤细胞都具有较强的抑制活性。结论 化合物 4b 和 4e 对人肝癌细胞(BEL-7404)有较强的抑制活性。

[关键词] 苦参碱; 衍生物; 合成; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R914.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)01-0012-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.004

Synthesis and antitumor activity of 13-acylmatine derivatives

FU Ben, TIAN Yuntao, DING Li, WU Qiuye, GUO Zhongwu, ZHAO Qingjie (Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize a series of 13-acylmatine derivatives and evaluate their *in vitro* antitumor activity. **Methods** Using sophocarpine as the starting material, a series of new compounds were synthesized through Michael addition, Staudinger reduction and acylation. The structure of target compounds were confirmed by ¹H NMR and MS techniques. Their antitumor activity against human hepatoma cells (BEL-7404) and mice melanoma cells (K111) were evaluated *in vitro* by MTT assay. **Results** We synthesized 9 compounds and all the compounds exhibited inhibitory activities against BEL-7404 and K111. **Conclusion** Compound 4b and compound 4e exhibit good *in vitro* antitumor activity to human hepatoma cells (BEL-7404).

[Key words] matrine; derivatives; synthesis; antitumor activity

恶性肿瘤是目前严重威胁人类健康的常见病和多发病, 各类肿瘤疾病导致的死亡在临床上仅次于心脑血管疾病。因此, 抗肿瘤药物研究是新药研究的重要方向之一。从天然产物中寻找有效抗肿瘤先导化合物, 是抗肿瘤药物研究的优先方向^[1]。大量研究发现, 生物碱具有显著的抗肿瘤功效, 如紫杉醇类、苦参碱类、喜树碱类、长春碱类早已广泛应用于临床, 且疗效显著。苦参碱类生物碱就是以苦参碱为代表, 母核相同, 化学结构相似的一类生物碱^[2,3]。该类生物碱还有氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐胺碱、槐定碱等^[4]。近几年的研究发现, 苦参碱类生物碱还具有良好的抗病毒活性, 例如槐定醇衍生物对柯萨奇病毒(Coxsackie B virus)具有抑制作用^[5-7], 氧化苦参碱对由乙肝病毒(BEL-

7404)引起的人肝癌细胞的生长具有抑制作用^[8,9]。这为科研人员提供了一个新方向。而苦参碱类生物碱分离提取技术的进步及全合成技术的发展为苦参碱的深入研究提供了重要原料保证^[10]。课题组前期工作发现 13-甲氨基-18-硫代苦参碱(M-19)的活性较好, 且毒性与苦参碱相当^[11]。因为苦参碱具有很好的水溶性, 所以结合课题组前期所做的工作, 本课题设想在苦参碱分子中先构建酰胺键, 在此基础上进一步引入系列疏水基团, 从而调节其脂水分配系数, 改善其生物活性。合成路线如图 1 所示。

1 仪器和材料

R-3 旋转蒸发仪(瑞士步奇 BUCHI); 核磁共振氢谱; Bruker Spectmspin AC-P600 型仪器测定, 以 CDCl₃ 为溶剂, TMS 为内标; JA1003 型精密电子天平(上海良平仪器有限公司); DLSB-H 低温冷却液循环泵(上海豫康科教仪器设备有限公司); 85-1 型磁力恒温搅拌器(上海志成电器有限公司); SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); 低温反

[基金项目] 国家自然科学基金(21502225, 81102490)

[作者简介] 付 奔, 硕士研究生

[通讯作者] 郭忠武, 博士, 第二军医大学特聘教授. E-mail: wu-gysmmu@hotmail.com

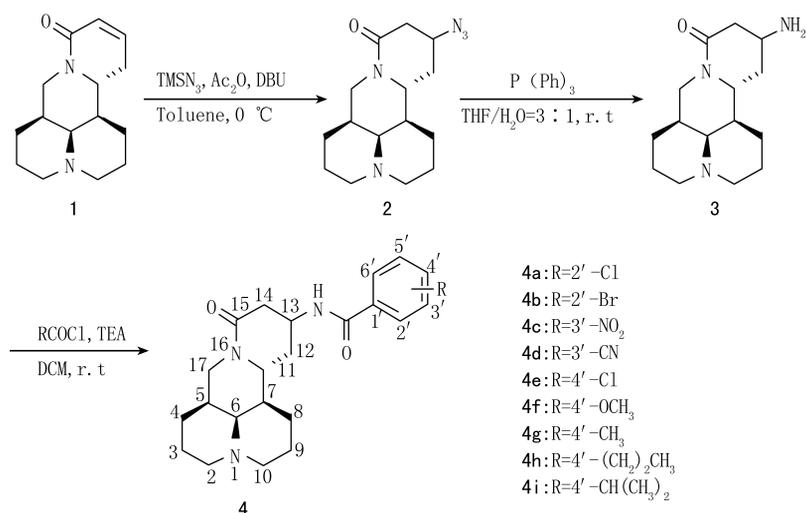


图1 目标化合物的合成路线

应器(巩义市英峪予华仪器厂);薄层色谱硅胶板和柱层析硅胶(烟台江友公司)。药理实验采用MTT法测定样品对肿瘤细胞株的细胞毒作用,以苦参碱和氧化苦参碱为对照。合成目标化合物所用的试剂均为市售分析纯。

2 目标化合物的合成

2.1 中间体13-叠氮基苦参碱2的制备 取槐果碱2.46 g(10 mmol)置于100 ml圆底烧瓶中,抽真空,氮气保护下加入无水甲苯25 ml,冰浴搅拌下依次滴加无水乙酸5.66 ml(100 mmol),叠氮三甲基硅烷(TMSN₃)13.2 ml(100 mmol),20 min后滴加1,8-二氮杂二环[5,4,0]十一碳-7-烯(DBU)180 μl(1 mmol),由薄层板监测反应进程,约48 h反应完全,加入甲苯20 ml,搅拌均匀,碳酸钾水溶液洗涤两遍,饱和氯化钠溶液洗涤一遍,无水硫酸钠干燥。浓缩后粗品进行硅胶柱层析纯化[流动相为二氯甲烷-甲醇(60:1)],得黄色油状物即中间体2 2.8 g,收率为79.2%^[11]。

2.2 13-氨基苦参碱3的制备 取中间体2 1 g(3.46 mmol)和三苯基磷1 g(3.82 mmol)置于50 ml圆底烧瓶中,加入四氢呋喃-水(10:1)22 ml溶解,搅拌条件下加热回流,薄层板监测反应进程,约6 h后反应完全。反应液浓缩,加入盐酸20 ml(0.5 mol/L)后加热回流30 min,待冷却后加入蒸馏水20 ml,再用乙酸乙酯(30 ml×3)萃取,水层用饱和氢氧化钠溶液调节pH至8~9,再用二氯甲烷(100 ml×2)萃取,收集有机层,浓缩,硅胶柱层析纯化[流动相为二氯甲烷-甲醇(30:1)],得黄色油状物即中间体3 0.77 g,收率为84.5%^[11]。

2.3 13-对甲基苯甲酰胺苦参碱4g的制备 取重蒸过的二氯亚砷5 ml和对甲基苯甲酸258 mg(1.90 mmol)置于25 ml圆底烧瓶中,搅拌条件下加热回流,3 h后反应完全,减压蒸馏备用。取中间体3 100 mg(0.38 mmol)置于25 ml圆底烧瓶中,加入无水二氯甲烷10 ml和干燥过的三乙胺0.5 ml,常温搅拌下滴加制备好的对甲基苯酰氯,滴加完后继续反应,薄层板监测反应进程,反应完毕后向反应液中加入二氯甲烷15 ml,再用碳酸氢钠饱和溶液(25 ml×2)洗涤,饱和食盐水溶液(25 ml×2)洗涤,收集有机相,无水硫酸钠干燥。将有机相浓缩,硅胶柱层析纯化[流动相为二氯甲烷-甲醇(30:1)],得黄色粉末即目标化合物4g 0.78 g,收率为84.5%^[11]。

目标化合物4a~4f,4h~4i按同法制备。9个目标化合物经光谱确证其结构、收率、MS和¹H NMR数据见表1。

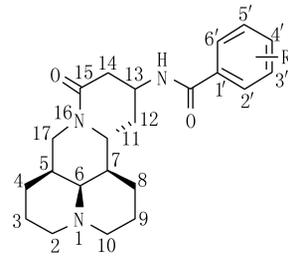
3 药理实验

3.1 受试药物 上述合成的目标化合物9个(4a~4i),苦参碱,氧化苦参碱,共计11个。

3.2 细胞株 人肝癌细胞株(BEL-7404),小鼠黑色素瘤细胞株(K111),购自上海复祥生物科技有限公司。

3.3 活性实验测试 MTT法检测样品对细胞的毒性,其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓩(formazan)并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砷(DMSO)能溶解细胞中的甲瓩,用酶联免疫检测仪测定其在540 nm处的光吸收值

表1 目标化合物 4a~4i 的结构、收率、MS 和 ¹H NMR 数据



化合物	收率 (%)	MS (M+H) ⁺ ESI	¹ H NMR(DMSO, TMS)δ
4a	82	402.87	7.84(d, J=6.8 Hz, 1H, Ar-3'-H), 7.79(m, 1H, Ar-4'-H), 7.68(m, 1H, Ar-5'-H), 7.62(d, J=8.2 Hz, 1H, Ar-6'-H), 8.14(s, 1H, -NH-CO-), 3.78(m, 1H, Matrine-13-H), 2.56-2.29(m, 2H, Matrine-14-H), 3.49-3.18(m, 2H, Matrine-17-H), 2.20-1.84(m, 2H, Matrine-12-H), 3.39(m, 1H, Matrine-11-H), 2.78(m, 1H, Matrine-6-H), 1.69(m, 1H, Matrine-5-H), 1.74(m, 1H, Matrine-7-H), 1.56-1.33(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.64-1.47(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.53-2.39(m, 4H, Matrine-2, 10-H)
4b	84	447.45	7.87(d, J=6.5 Hz, 1H, Ar-3'-H), 7.64(m, 1H, Ar-4'-H), 7.71(m, 1H, Ar-5'-H), 7.95(d, J=8.4 Hz, 1H, Ar-6'-H), 8.22(s, 1H, -NH-CO-), 3.85(m, 1H, 13-H), 2.67-2.31(m, 2H, Matrine-14-H), 1.89-1.57(m, 2H, Matrine-12-H), 3.41(m, 1H, Matrine-11-H), 3.47-3.19(m, 2H, Matrine-17-H), 1.75(m, 1H, Matrine-5-H), 1.78(m, 1H, Matrine-7-H), 1.56-1.29(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.54-1.37(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.59-2.48(m, 4H, Matrine-2, 10-H), 2.62(m, 1H, Matrine-6-H)
4c	78	413.74	8.67(s, 1H, Ar-2'-H), 8.46(d, J=5.3 Hz, 1H, Ar-4'-H), 8.17(m, 1H, Ar-5'-H), 8.52(d, J=8.0 Hz, 1H, Ar-6'-H), 8.06(s, 1H, -NH-CO-), 3.71(m, 1H, Matrine-13-H), 2.59-2.33(m, 2H, Matrine-14-H), 3.46(m, 1H, Matrine-11-H), 1.95-1.57(m, 2H, Matrine-12-H), 3.41-3.16(m, 2H, Matrine-17-H), 2.56(m, 1H, Matrine-7-H), 1.68-1.29(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.56-1.45(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.62-2.33(m, 4H, Matrine-2, 10-H)
4d	80	393.69	8.53(s, 1H, Ar-2'-H), 8.27(d, J=5.4 Hz, 1H, Ar-4'-H), 7.84(m, 1H, Ar-5'-H), 8.36(d, J=7.8 Hz, 1H, Ar-6'-H), 8.21(s, 1H, -NH-CO-), 3.87(m, 1H, Matrine-13-H), 2.54-2.26(m, 2H, Matrine-14-H), 3.52(m, 1H, Matrine-11-H), 1.97-1.68(m, 2H, Matrine-12-H), 3.55-3.92(m, 2H, Matrine-17-H), 2.49(m, 1H, Matrine-6-H), 1.62(m, 1H, Matrine-5-H), 1.71(m, 1H, Matrine-7-H), 1.77-1.34(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.57-1.33(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.54-2.37(m, 4H, Matrine-2, 10-H)
4e	86	403.14	8.12(d, J=11.2 Hz, 2H, Ar-2', 6'-H), 7.59(d, J=5.6 Hz, 2H, Ar-3', 5'-H), 8.17(s, 1H, -NH-CO-), 3.77(m, 1H, Matrine-13-H), 2.49-2.34(m, 2H, Matrine-14-H), 1.98-1.54(m, 2H, Matrine-12-H), 3.44(m, 1H, Matrine-11-H), 3.45-3.14(m, 2H, Matrine-17-H), 2.67(m, 1H, Matrine-6-H), 1.73(m, 1H, Matrine-5-H), 1.76(m, 1H, Matrine-7-H), 1.63-1.27(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.56-1.40(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.68-2.43(m, 4H, Matrine-2, 10-H)
4f	81	398.52	7.84(d, J=11.4 Hz, 2H, Ar-2', 6'-H), 7.28(d, J=5.2 Hz, 2H, Ar-3', 5'-H), 3.91(s, 3H, -OCH ₃), 7.94(s, 1H, -NH-CO-), 3.91(m, 1H, Matrine-13-H), 2.52-2.34(m, 2H, Matrine-14-H), 1.92-1.63(m, 2H, Matrine-12-H), 3.36(m, 1H, Matrine-11-H), 3.51-3.29(m, 2H, Matrine-17-H), 1.77(m, 1H, Matrine-5-H), 1.74(m, 1H, Matrine-7-H), 1.58-1.33(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.61-1.42(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.57-2.39(m, 4H, Matrine-2, 10-H), 2.54(m, 1H, Matrine-6-H)
4g	76	381.63	7.97(d, J=10.9 Hz, 2H, Ar-2', 6'-H), 7.38(d, J=5.5 Hz, 2H, Ar-3', 5'-H), 2.41(s, 3H, -CH ₃), 2.87(s, 1H, -NH-CO-), 3.77(m, 1H, Matrine-13-H), 2.66-2.37(m, 2H, Matrine-14-H), 2.01-1.76(m, 2H, Matrine-12-H), 3.41(m, 1H, Matrine-11-H), 3.39-3.16(m, 2H, Matrine-17-H), 1.82(m, 1H, Matrine-5-H), 1.78(m, 1H, Matrine-7-H), 1.66-1.47(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.57-1.40(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.63-2.41(m, 4H, Matrine-2, 10-H), 2.69(m, 1H, Matrine-6-H)
4h	81	410.56	7.91(d, J=11.5 Hz, 2H, Ar-2', 6'-H), 6.86(d, J=5.2 Hz, 2H, Ar-3', 5'-H), 2.69(m, 2H, Ph-CH ₂ -H), 1.62(m, 2H, Bu-CH ₂ -H), 0.96(t, 3H, CH ₃ -H), 8.08(s, 1H, -NH-CO-), 3.74(m, 1H, Matrine-13-H), 2.46-2.33(m, 2H, Matrine-14-H), 1.87-1.64(m, 2H, Matrine-12-H), 3.44(m, 1H, Matrine-11-H), 3.59-3.27(m, 2H, Matrine-17-H), 2.64(m, 1H, Matrine-6-H), 1.84(m, 1H, Matrine-5-H), 1.97(m, 1H, Matrine-7-H), 1.57-1.29(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.61-1.37(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.59-2.43(m, 4H, Matrine-2, 10-H)
4i	85	410.73	7.87(d, J=11.3 Hz, 2H, Ar-2', 6'-H), 7.43(d, J=5.2 Hz, 2H, Ar-3', 5'-H), 2.76(m, 1H, Ph-CH-H), 1.29(d, J=6.3 Hz, 6H, CH ₃ -H), 8.21(s, 1H, -NH-CO-), 3.77(m, 1H, Matrine-13-H), 2.63-2.27(m, 2H, Matrine-14-H), 1.94-1.65(m, 2H, Matrine-12-H), 3.52(m, 1H, Matrine-11-H), 2.47-3.20(m, 2H, Matrine-17-H), 2.62(m, 1H, Matrine-6-H), 1.71(m, 1H, Matrine-5-H), 1.76(m, 1H, Matrine-7-H), 1.61-1.32(m, 4H, Matrine-4, 8-H), 1.55-1.46(m, 4H, Matrine-3, 9-H), 2.53-2.45(m, 4H, Matrine-2, 10-H)

(OD值), 可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。

3.4 试剂 细胞培养基: DMEM, 牛胎血清,

0.25% 胰蛋白酶溶液 (trypsin), DMSO, MTT; 磷酸缓冲液 (PBS); MTT 溶液: 用 PBS 配成 5 mg/ml 溶液; 细胞溶解液: 含 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 5%

异丁醇, 0.02 mol/L 盐酸。

3.5 实验耗材 96孔细胞培养板, 50 ml 细胞培养瓶。

3.6 实验步骤 将样品分别溶解于 DMSO 中, 得到浓度为 1 mg/ml 的溶液, 再用 PBS 作 1:10 梯度稀释, 得到浓度为 100、10、1、0.1、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品溶液, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 10 μl , 每个浓度做两个平行测试, 空白对照使用 DMSO 做相应梯度稀释后加入板中; 取处于对数生长期的细胞, 经胰酶消化并洗涤后悬浮于含 10% 小牛血清

的细胞培养基中, 经台盼蓝染色法计数活细胞数目, 调整细胞悬液密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 将细胞悬液加入到上述的 96 孔细胞培养板中, 每孔 90 μl , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 ml, 继续在培养箱中放置 3~4 h 之后每孔加入细胞溶解液 100 μl , 在培养箱中放置过夜。测定 570 nm 的 OD 值, 根据 OD 值计算样品处理后对细胞的抑制率 [细胞抑制率 = (空白对照组 OD 值 - 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值) $\times 100\%$]。实验结果见表 2。

表 2 不同浓度目标化合物对两种肿瘤细胞的抑制率 (%)

化合物	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					化合物	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	100	10	1	0.1	0.01		100	10	1	0.1	0.01
BEL-7404						K111					
4a	48.9	15.7	8.4	2.9	1.5	4a	31.4	17.5	9.2	5.2	1.1
4b	73.2	25.3	18.6	10.5	8.4	4b	29.6	12.7	8.5	5.6	2.1
4c	43.5	27.5	24.4	16.3	8.2	4c	36.1	20.6	14.3	6.8	5.7
4d	52.1	43.1	33.2	21.7	13.1	4d	34.6	19.2	15.7	7.4	6.5
4e	58.7	36.8	29.4	25.7	18.1	4e	23.8	12.9	8.4	6.3	5.1
4f	23.9	10.9	9.8	5.4	3.2	4f	22.9	9.1	6.2	5.7	4.4
4g	25.3	10.8	6.7	6.0	3.6	4g	12.8	7.8	7.3	4.6	3.2
4h	29.4	21.7	17.1	8.1	5.3	4h	25.7	23.3	16.9	11.5	9.3
4i	34.0	22.6	15.4	10.3	7.8	4i	18.6	6.4	4.5	4.1	3.2
苦参碱	12.8	6.7	6.4	5.8	2.7	苦参碱	27.3	13.4	10.4	3.2	2.5
氧化苦参碱	11.6	9.4	3.4	2.5	2.1	氧化苦参碱	13.1	10.5	7.5	5.2	1.6

4 结果和讨论

初步的体外抗肿瘤活性实验结果表明, 9 个目标化合物对上述两种肿瘤细胞均有一定的抑制作用。9 个目标化合物的活性均优于苦参碱和氧化苦参碱。同样浓度下目标化合物对 BEL-7404 的抑制活性优于对 K111 的抑制活性。在所合成的衍生物中, 在苯的邻位或间位引入氯原子或溴原子等弱吸电子基团, 化合物的抗肿瘤活性明显增强, 而引入硝基或氰基等强吸电子基团, 化合物的抗肿瘤活性并没有明显提高。苯环的对位取代使化合物活性提高不明显, 有的甚至降低了化合物的活性, 这可能是苯环的对位取代不利于化合物在空间结构上与靶点更好地匹配。由于化合物数量有限, 该类化合物抗肿瘤活性与侧链取代基之间的构效关系还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 王佩, 李玉珍, 齐有利. 植物类抗肿瘤药成为市场主导——抗肿瘤药物的应用及用药趋势分析[J]. 首都医药, 2003, 10

(5):33-34.

[2] 江纪武. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986:700.

[3] Liu XJ, Gao MA, Li WH, et al. Alkaloids from sophora flavescens aition[J]. Fitoterapia, 2010, 81(6):524-527.

[4] 洪阁, 刘培勋. 槐属植物生物碱化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(5):783-785.

[5] Pan QM, Li YH, Hua J, et al. Antiviral matrine-type alkaloids from the rhizomes of sophoratonkinensis [J]. J Nat Prod, 2015, 78(70):1683-1688.

[6] Tang S, Kong LY, Li YH, et al. Novel N-benzenesulfonyl sophocarpinol derivatives as coxsackie B virus inhibitors [J]. ACS Med Chem Lett., 2015, 6(2):183-186.

[7] Bi CW, Zhang CX, Li YH, et al. Synthesis and biological evaluation of sophoridinol derivatives as a novel family of potential anticancer agents [J]. ACS Med Chem Lett, 2014, 5(11):1225-1229.

[8] Gao LM, Han YX, Wang YP, et al. Design and synthesis of oxymatrine analogues overcoming drug resistance in hepatitis b virus through targeting host heat stress cognate 70 [J]. J Med Chem, 2011, 54(3):869-876.

[9] Zhang YB, Zhan LQ, Li GQ, et al. Dimericmatrine-type alkaloids from the root of sophora flavescens and their anti-hepatitis b virus activities [J]. J Org Chem, 2016, 81(15):6273-

6280 .
 [10] Samuel VW, Nicholas PC, Richard B. Total synthesis of the tetracyclic lupinalkaloid (+)-allomatrine [J]. *Org Lett*, 2013, 15(17):4596-4599 .
 [11] Hu HG, Wang SZ, Zhang CM, *et al.* Synthesis and *in vitro* inhibitory activity of matrine derivatives towards pro-inflammatory cytokines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(24): 7537-7539 .
 [收稿日期] 2016-07-27 [修回日期] 2016-11-25
 [本文编辑] 顾文华

(上接第4页)

[4] Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, *et al.* Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(1):60-67 .
 [5] Vougiotiannopoulou K, Skaltsounis AL. From Tyrian purple to kinase modulators: naturally halogenated indirubins and synthetic analogues [J]. *Planta Med*, 2012, 78(14):1515-1528 .
 [6] Wang L, Zhou GB, Liu P, *et al.* Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12):4826-4831 .
 [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:199 .
 [8] 李园园, 方建国, 王文清, 等. 大青叶历史考证及现代研究进展[J]. *中草药*, 2005, 36(11):1750-1753 .
 [9] 刘泽玉, 苏拓僮, 杨明, 等. 青黛炮制过程中靛蓝定向生成的工艺设计与优化[J]. *中草药*, 2011, 42(1):56-60 .
 [10] 李广华, 赵文法, 王蕴, 等. 药用青黛的质量考察[J]. *中国药事*, 2009, 23(5):472-473 .
 [11] 黄以钟, 潘大仁, 王占成, 等. 不同生长时期对马蓝药效成分的影响[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(16):75-78 .
 [12] 黄璐琦, 戴住波, 吕冬梅, 等. 探讨道地药材研究的模式生物及模型[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(9):1063-1066 .
 [13] 胡世林. 中国道地药材原色图说[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998: 86-87 .
 [14] 普吴, 孙星衍, 孙冯翼. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 25 .
 [15] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 1085-1086 .
 [16] 胡嘉琪, 崔鸿宾, 张玉龙. 国产爵床科芦莉花族植物的花粉形态[J]. *植物分类学报*, 2005, 43(2):123-150 .
 [17] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 128-150 .
 [18] 福建植物志编写组. 福建植物志[M]. 福州: 科学出版社, 1989: 132-133 .
 [19] 李洪光. 药用植物马蓝和积的遗传多样性分析研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010 .
 [20] 杨成祥, 刘小芬, 范世明. 药用植物马蓝的资源调查研究[J]. *中国现代中药*, 2012, 14(3):33-35 .
 [21] 朱仁磊. 福建马蓝资源化学及其水分生理学研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011 .
 [22] 张丹雁, 林秀旋, 陈晓庆, 等. 南板蓝(马蓝)驯育栽培技术研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2010, 24(2):18-19 .
 [23] 张旭, 何明辉, 魏成熙. 贵州省道地药材南板蓝根引种栽培研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(33):18730-18731 .
 [24] 杜沛欣. 马蓝 GAP 规范化种植研究进展[J]. *海峡药学*, 2011, 23(8):57-59 .
 [25] 张英娇, 魏道智, 宁书菊, 等. 氮磷钾对马蓝营养生长与叶片有效成分含量的影响[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(10): 1299-1301 .
 [26] 魏世勇, 张旭, 魏成熙. 南板蓝的营养特性及栽培技术[J]. *山地农业生物学报*, 2003, 22(6):493-498 .
 [27] 陈瑞芳, 刘颖嘉, 程习梅, 等. 马蓝光合特性研究[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2014, 43(3):225-229 .
 [28] 宁书菊, 张英娇, 林建勇, 等. 光强对福建马蓝光合特性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(7):901-908 .
 [29] 覃军, 陈奕龙, 张丹雁, 等. 不同光照条件对南大青叶(马蓝叶)中靛玉红含量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(1):59-60 .
 [30] 魏道智, 林文雄, 陈慧, 等. 福建马蓝的种苗繁殖与栽培[C]. 第六届全国药用植物和植物药学术研讨会论文集. 长春, 2006, 127-129 .
 [31] 崔红艳, 方子森, 牛俊义, 胡麻栽培技术的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(18):8-13 .
 [32] 龙菊生, 聂垚. 林下套种马蓝(山蓝)技术[J]. *现代园艺*, 2013, (3):28 .
 [33] 蔡益航, 吴建宇. 枇杷园套种青黛高产栽培技术[J]. *现代农业科技*, 2013, (19):103-105 .
 [34] 张丽梅, 陈菁瑛, 陈熹. 马蓝未成熟种子的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(3):521 .
 [35] 孙云玲, 姚洪源, 田华林, 等. 马蓝组培快繁技术研究[J]. *现代农业科技*, 2010, (9):102-103 .
 [36] 朱永宏, 李学敏, 韩宝玲. RAPD 技术在中药材鉴定中的应用进展[J]. *中草药*, 2007, 38(9):1443-1444 .
 [37] 黄玉吉, 陈菁瑛. 马蓝种质资源的 RAPD 分析[J]. *中药材*, 2010, 33(2):183-186 .
 [38] 于英君, 肖井仁, 姜颖, 等. 菘蓝和马蓝基因组 DNA RAPD 指纹图谱的建立[J]. *中医医药学报*, 2013, 41(6):26-27 .
 [39] 向小亮, 宁书菊, 黄延龄, 等. 外源水杨酸对马蓝叶片中蛋白水平表达的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(3):689-693 .
 [40] 龚小贵. 不同浓度茉莉酸甲酯对马蓝生理与蛋白质的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2011 .
 [41] Marcinek H, Weyler W, Deus-Neumann B, *et al.* Indoxyl-UDPG-glucosyltransferase from *Baphicacanthus cusia* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(2):201-207 .
 [收稿日期] 2016-01-04 [修回日期] 2016-06-20
 [本文编辑] 顾文华