

茅苍术根茎中的两个新化合物

绪 扩 冯子明 杨桢楠 姜建双 张培成*

(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 北京 100050)

摘要 运用多种柱色谱技术对茅苍术根茎进行了系统的化学成分研究, 从其 80%乙醇提取物中分离得到一个新的 4,6-二炔烯类化合物和一个新的香豆素类化合物, 分别命名为(10*R*,11*R*,12*R*)-十三烷-2*E*,8*E*-二烯-4,6-二炔-1,10,11,12,13-五醇-10-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(**1**)和 isoscopoletin 6-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(**2**). 其平面结构通过 UV, IR, HR-ESIMS, 1D 和 2D NMR 等谱学技术确定. 化合物 **1** 的相对构型通过纽曼投影式分析优势构象并结合 1D NOESY 的方法确定, 而绝对构型通过比较电子圆二色谱(ECD)的方法确定. 相关结果为链状多元醇的立体构型研究提供了参考. 在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物 **1** 和 **2** 对 α -葡萄糖苷酶及蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 表现出弱的抑制活性.

关键词 茅苍术; 4,6-二炔; 多烯炔; 香豆素; 绝对构型

Two New Compounds from Rhizomes of *Atractylodes lancea*

Xu, Kuo Feng, Ziming Yang, Ya'nan Jiang, Jianshuang Zhang, Peicheng*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

Abstract In our phytochemical investigations on the 80% EtOH extract of the rhizomes of *Atractylodes lancea*, two new compounds named (10*R*,11*R*,12*R*)-tridecane-2*E*,8*E*-diene-4,6-diyne-1,10,11,12,13-pentol-10-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**) and isoscopoletin 6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (**2**) were isolated using various column chromatographic methods. Their planar structures were elucidated by means of spectroscopic and spectrometric analyses (UV, IR, 1D and 2D NMR, and HR-ESIMS). The relative configurational assignment of **1** was deduced by visualized Newman projections in association with the 1D NOESY spectra, whereas its absolute configuration was established by comparison of experimental electronic circular dichroism (ECD) spectra with known compounds. These results will benefit subsequent stereochemical studies of those open-chain polyhydric alcohols. Compounds **1** and **2** showed weak inhibitory effects on α -glucosidases and protein tyrosine phosphatases 1B (PTP1B) at a concentration of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords *Atractylodes lancea*; 4,6-diyne; polyacetylene; coumarin; absolute configuration

苍术为菊科苍术属 *Atractylodes*, 多年生草本植物, 包括 7 个植物种群, 主要分布于亚洲东部, 其中, 我国特有 5 个种群^[1]. 苍术属植物的药用历史最早记载于 2000 多年前的《神农本草经》, 以苍术和白术最为常用. 药用苍术为茅苍术 (*Atractylodes lancea*) 和关苍术 (*Atractylodes chinensis*) 的干燥根茎, 具有燥湿健脾, 除风散寒、明目之功效^[2]. 现代药理学研究表明, 苍术具有促进胃肠蠕动、利尿、肝保护、抗炎、抗病毒、降血脂、降血糖等方面的药理作用^[3,4]. 其主要含有萜类、多烯炔类、甾体类、酰基蔗糖类以及其它类化学成分^[5~10]. 本工作对茅苍术 80%乙醇提取物的水溶性化学成分进行

了研究, 从中分离得到 2 个新化合物(图 1). 借助 UV, IR, HR-ESIMS, 1D 和 2D NMR 以及 ECD 等多种谱学技术, 鉴定其结构分别为(10*R*,11*R*,12*R*)-十三烷-2*E*,8*E*-二烯-4,6-二炔-1,10,11,12,13-五醇-10-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(**1**)和 isoscopoletin 6-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(**2**). 还评价了化合物 **1** 和 **2** 对 α -葡萄糖苷酶以及蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 的体外抑制活性.

1 结果与讨论

1.1 化合物 1 的结构鉴定

化合物 **1** 为棕色无定型粉末, 易溶于水和甲醇;

* Corresponding author. E-mail: pczhang@imm.ac.cn

Received June 23, 2017; revised July 27, 2017; published online August 16, 2017.

Project supported by the Innovation Fund for Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) (No. 2016-I2M-1-010).

中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费(No. 2016-I2M-1-010)资助项目.

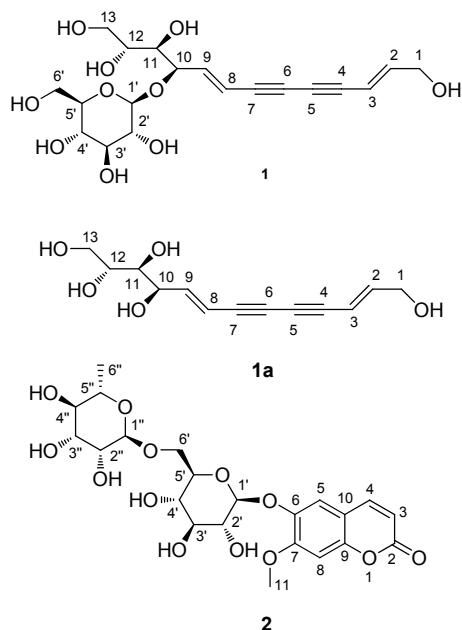


图1 化合物 1, 1a 和 2 的结构

Figure 1 Structures of compounds 1, 1a, and 2

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -136.0$ (c 0.12, MeOH); UV-Vis (MeOH) λ_{max} [$\log \varepsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]: 216 (4.46), 263 (3.95), 277 (4.19), 294 (4.35), 314 (4.27) nm; ECD (MeOH) λ_{max} [$\Delta\varepsilon/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$]: 233 (−5.43), 293 (−1.50), 312 (−1.03) nm; 其 HR-ESIMS 和 ^{13}C NMR 谱提示分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_{10} [\text{M}-\text{H}]^-$ 413.1448, found 413.1452), 不饱和度为 7. 该化合物的红外光谱提示结构中存在羟基(3352 cm^{-1})、炔键($2133, 2208\text{ cm}^{-1}$)和烯键($1369, 1417, 1628\text{ cm}^{-1}$). 极具特征的紫外图谱提示其为烯炔类衍生物, 且具有丁二炔基与烯键共轭形成的发色团($\text{CH}=\text{CHC}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}=\text{CH}$)^[11,12]. 结合 HSQC 二维谱, ^1H NMR 谱(表 1)显示 1 组 $\Delta^{2,3}$ 烯键信号 δ_{H} 5.86, 6.49, 其 3J 值(16.0 Hz)提示其为反式构型; 1 组 $\Delta^{8,9}$ 烯键信号 δ_{H} 6.20, 6.38, 其 3J 值(16.0 Hz)提示其为反式构型; 1 组糖基氢信号, 其端基的 3J 值为 7.5 Hz; 3 组含氧次甲基的氢信号 δ_{H} 3.29~3.34, 3.51~3.61, 4.52; 2 组含氧亚甲基的氢信号 δ_{H} 3.35~3.43 (1H), 3.51~3.61 (1H), 4.06 (2H). ^{13}C NMR 谱(表 1)中可推断出 4 个烯键碳信号 δ_{C} 106.2, 109.3, 147.2, 149.4; 4 个响应较低的炔碳信号 δ_{C} 80.6, 73.5, 74.0, 80.6; 3 个含氧次甲基碳信号 δ_{C} 70.8, 73.1, 77.3; 2 个含氧亚甲基碳信号 δ_{C} 60.8, 63.1 以及 1 组吡喃葡萄糖基信号 δ_{C} 101.8, 73.5, 76.7, 70.6, 76.6, 61.5, 其相对构型由端基氢的 3J 值(7.5 Hz)确定为 β 构型(葡萄糖基的绝对构型通过气相色谱法确定为 D). ^1H - ^1H COSY 谱(图 2)中发现 $\text{H}_2-1/\text{H}-2$, $\text{H}-2/\text{H}-3$ 之间以及 $\text{H}-8/\text{H}-9$,

$\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]: 233 (−5.43), 293 (−1.50), 312 (−1.03) nm; 其 HR-ESIMS 和 ^{13}C NMR 谱提示分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_{10} [\text{M}-\text{H}]^-$ 413.1448, found 413.1452), 不饱和度为 7. 该化合物的红外光谱提示结构中存在羟基(3352 cm^{-1})、炔键($2133, 2208\text{ cm}^{-1}$)和烯键($1369, 1417, 1628\text{ cm}^{-1}$). 极具特征的紫外图谱提示其为烯炔类衍生物, 且具有丁二炔基与烯键共轭形成的发色团($\text{CH}=\text{CHC}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}=\text{CH}$)^[11,12]. 结合 HSQC 二维谱, ^1H NMR 谱(表 1)显示 1 组 $\Delta^{2,3}$ 烯键信号 δ_{H} 5.86, 6.49, 其 3J 值(16.0 Hz)提示其为反式构型; 1 组 $\Delta^{8,9}$ 烯键信号 δ_{H} 6.20, 6.38, 其 3J 值(16.0 Hz)提示其为反式构型; 1 组糖基氢信号, 其端基的 3J 值为 7.5 Hz; 3 组含氧次甲基的氢信号 δ_{H} 3.29~3.34, 3.51~3.61, 4.52; 2 组含氧亚甲基的氢信号 δ_{H} 3.35~3.43 (1H), 3.51~3.61 (1H), 4.06 (2H). ^{13}C NMR 谱(表 1)中可推断出 4 个烯键碳信号 δ_{C} 106.2, 109.3, 147.2, 149.4; 4 个响应较低的炔碳信号 δ_{C} 80.6, 73.5, 74.0, 80.6; 3 个含氧次甲基碳信号 δ_{C} 70.8, 73.1, 77.3; 2 个含氧亚甲基碳信号 δ_{C} 60.8, 63.1 以及 1 组吡喃葡萄糖基信号 δ_{C} 101.8, 73.5, 76.7, 70.6, 76.6, 61.5, 其相对构型由端基氢的 3J 值(7.5 Hz)确定为 β 构型(葡萄糖基的绝对构型通过气相色谱法确定为 D). ^1H - ^1H COSY 谱(图 2)中发现 $\text{H}_2-1/\text{H}-2$, $\text{H}-2/\text{H}-3$ 之间以及 $\text{H}-8/\text{H}-9$,

表 1 化合物 1 和 2 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据(DMSO- d_6)Table 1 ^1H NMR spectroscopic data for compounds 1 and 2 in DMSO- d_6

No.	1 ^a		1a ^b		No.	2 ^a	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}		δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	4.06, brs	60.8	4.11, dd (2.0, 4.5)	62.7	2		160.5
2	6.49, dt (16.0, 4.5)	149.4	6.35, dt (16.0, 4.5)	147.7	3	6.26, d (9.5)	113.3
3	5.86, d (16.0)	106.2	5.81, brd (16.0)	108.8	4	7.86, d (9.5)	144.4
4		80.6		80.4	5	7.27, s	113.0
5		73.5		74.8	6		143.2
6		74.0		74.7	7		152.9
7		80.6		80.6	8	7.10, s	100.4
8	6.20, d (16.0)	109.3	5.88, d (16.0)	109.9	9		150.1
9	6.38, dd (16.0, 5.0)	147.2	6.40, dd (16.0, 5.0)	149.4	10		111.2
10	4.52, dd (5.0, 2.5)	77.3	4.41, dt (5.0, 2.5)	72.2	11	3.87, s	56.3
11	3.29~3.34, m	73.1	3.42, dd (8.0, 2.5)	74.6	1'	4.91, d (7.5)	100.4
12	3.51~3.61, m	70.8	3.61~3.66, m	72.9	2'	3.26~3.29, m	73.1
13a	3.51~3.61, m	63.1	3.57, dd (11.5, 5.0)	64.9	3'	3.23~3.26, m	76.8
13b	3.35~3.43, m		3.74, dd (11.5, 5.0)		4'	3.06~3.12, m	69.9
1'	4.08, d (7.5)	101.8			5'	3.48~3.51, m	75.6
2'	3.02~3.07, m	73.5			6'a	3.84, d (11.5)	66.4
3'	3.09~3.12, m	76.7			6'b	3.37~3.40, m	
4'	2.95~3.01, m	70.6			1''	4.51, d (1.0)	100.5
5'	3.13~3.17, m	76.6			2''	3.50~3.53, m	70.4
6'a	3.69, brd (11.5)	61.5			3''	3.45, dd (9.0, 3.0)	70.7
6'b	3.35~3.43, m				4''	3.13~3.19, m	72.0
					5''	3.39~3.42, m	68.4
					6''	1.08, d (6.0)	17.9

^a 在 DMSO- d_6 溶液中测得的数据; ^b 在 MeOH- d_4 甲醇溶液中测得的数据.

H-9/H-10, H-10/H-11, H-11/H-12, H-12/H-13 之间存在相关, 确定结构中存在 $C^1(H_2)OHC^2(H)=C^3(H)$ 和 $C^8(H)=C^9(H)C^{10}(H)ORC^{11}(H)OHC^{12}(H)OHC^{13}(H_2)OH$ 的片段. HMBC 谱(图 2)中发现 H-1 与 C-3 相关, H-8 与 C-6 相关, H-9 与 C-7 相关, 提示 **1** 为 4,6-二炔烯苷类, 进一步分析发现葡萄糖的端基氢 H-1' 与 C-10 存在相关. 因此, 化合物 **1** 的平面结构被确定为十三烷-2*E*,8*E*-二烯-4,6-二炔-1,10,11,12,13-五醇-10-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷.

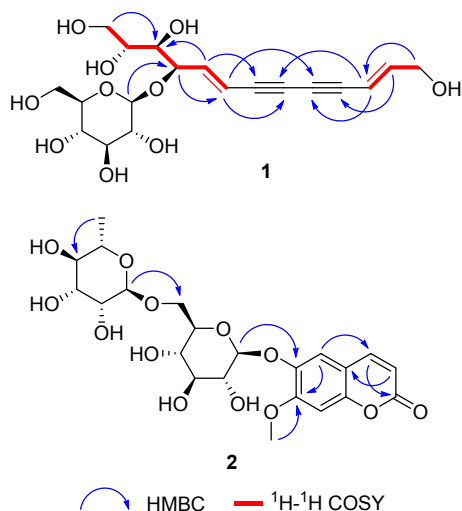


图 2 化合物 **1** 和 **2** 的 HMBC 和 1H - 1H COSY 二维谱的关键相关信号

Figure 2 Key HMBC and 1H - 1H COSY correlations of **1** and **2**

为确定该结构的立体构型, 将化合物 **1** 在温和条件下用蜗牛酶进行水解, 得到其苷元 **1a**(图 1). 通过纽曼投影式对化合物 **1a** 进行构象分析^[13], 分别以 C^{10} - C^{11} 和 C^{11} - C^{12} 为轴进行投影, 可得到 12 种构象(图 3). 化合物 **1a** 的 1H NMR 谱中显示 $^3J_{10,11}$, $^3J_{11,12}$ 值分别为 2.5, 8.0 Hz (测试溶剂: MeOH- d_4), 说明 H-10/H-11 和 H-11/H-12 分别为邻位交叉式(红色标记)和对位交叉式(紫色标记)构象. 化合物 **1a** 的 1D NOESY 显示 H-11 与 H-9 相关, H-12 与 H-10 相关, 而未发现 H-13 和 H-10 的相关信号, 提示化合物 **1a** 中 C^{10} - C^{11} 与 C^{11} - C^{12} 的相对构型分别为苏式和赤式(图 3). 在甲醇溶液中测得化合物 **1** 的 ECD 谱图(图 4), 通过比较 **1** 和已知化合物[(10*R*,11*R*)-, (10*R*,11*S*)-, (10*S*,11*R*)-十三烷-2*E*,8*E*,12-三烯-4,6-二炔-1,10,11-三醇-10-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷]的 ECD 谱图, 得知化合物在 200~400 nm 范围内的 Cotton 效应仅体现 C-10 的手性, 进一步说明 C-10 的构型为 *R*^[14]. 综上所述, 化合物 **1** 的结构最终被确定为(10*R*,11*R*,12*R*)-十三烷-2*E*,8*E*-二烯-4,6-二炔-1,10,11,12,13-五醇-10-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷.

1.2 化合物 **2** 的结构鉴定

化合物 **2** 为白色无定型粉末, 易溶于甲醇、水;

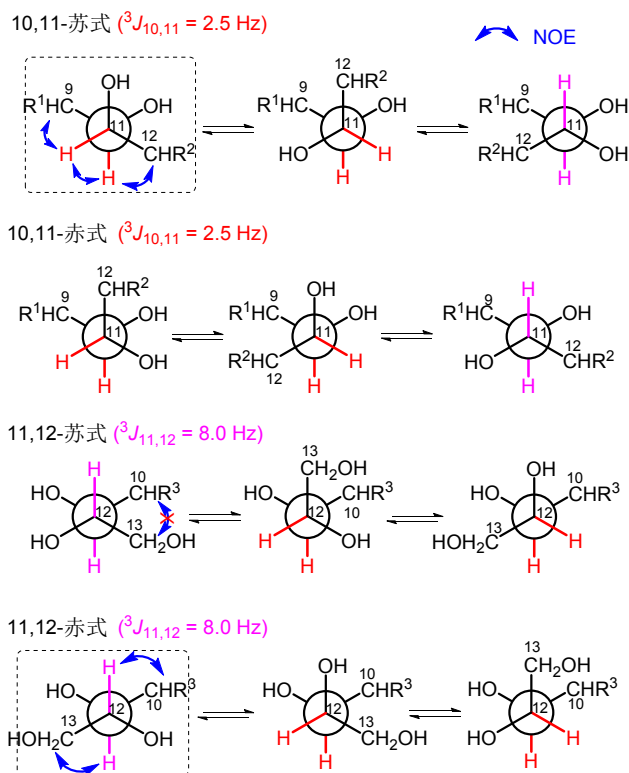


图 3 化合物 **1a** 的纽曼投影式和 1D NOESY 相关

Figure 3 Newman projections and 1D NOESY correlations of compound **1a**

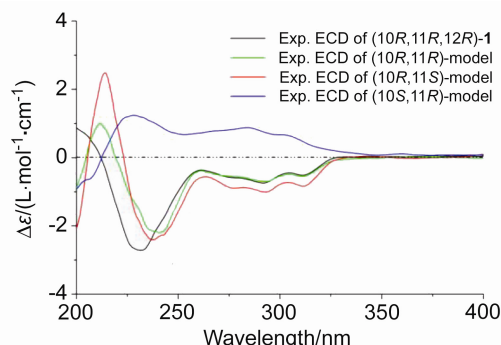


图 4 化合物 **1** 与模型化合物的实验 ECD 谱图

Figure 4 Experimental ECD spectra of **1** and model compounds

$[\alpha]_D^{20}$ -82.5 (c 0.10, MeOH), UV-Vis (MeOH) λ_{max} [$\log \epsilon/(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$]: 224 (4.56), 255 (3.86), 287 (3.99), 336 (4.14) nm; 其 HR-ESIMS 和 ^{13}C NMR 谱提示分子量为 $C_{22}H_{28}O_{13}$ (calcd for $C_{22}H_{28}O_{13}Na$ $[M+Na]^+$ 523.1428, found 523.1438), 不饱和度为 9. 该化合物的红外光谱提示结构中存在羟基(3406 cm^{-1})、共轭羰基(1710 cm^{-1})和苯环($1616, 1515\text{ cm}^{-1}$). 结合 HSQC 二维谱, 1H NMR 谱(表 1)显示 1 组 $\Delta^{3,4}$ 烯键信号 δ_H 6.26, 7.86, 其 3J 值(9.5 Hz)提示为顺式构型; 2 个孤立的芳香氢信号 δ_H 7.10, 7.27; 1 组甲氧基氢信号 δ_H 3.87; 2 组糖取代基氢信号, 其端基的 3J 值为 1.0 和 7.5 Hz. ^{13}C NMR 谱(表 1)中可推

断出 8 个芳香碳信号 δ_{C} 113.3, 144.4, 113.0, 143.2, 152.9, 100.4, 150.1, 111.2; 1 个共轭羰基碳信号 δ_{C} 160.5; 1 组吡喃葡萄糖基信号 δ_{C} 100.4, 73.1, 76.8, 69.9, 75.6, 66.4 和 1 组吡喃鼠李糖基信号 δ_{C} 100.5, 70.4, 70.7, 72.0, 68.4, 17.9, 其相对构型由端基氢的 3J 值分别确定为 α 和 β 构型(葡萄糖基和鼠李糖基的绝对构型通过气相色谱法分别确定为 D 和 L)。除糖取代基和甲氧基信号外, 碳谱中的 8 个芳香碳信号和 1 个共轭羰基碳信号, 提示结构中存在 1 个 $\text{C}^6\text{-C}^3$ 单元, 该化合物为香豆素母核^[15], 结合氢谱中的信号, 进一步推测该化合物为 6,7-二连氧取代型的香豆素类骨架。HMBC 二维谱(图 2)显示, 甲氧基氢($\text{H}_3\text{-11}$)与 C-7 存在相关, 葡萄糖基的 H-1' 与 C-6 存在相关, 鼠李糖基的 H-1'' 与葡萄糖基的 C-6 存在相关。确证化合物 **2** 的结构为 isoscopoletin 6- O - α - L -吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- β - D -吡喃葡萄糖苷。

1.3 体外药理活性筛选

化合物 **1** 和 **2** 对 α -葡萄糖苷酶以及蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 表现出弱的抑制活性。在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 化合物 **1** 和 **2** 对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制活性分别为 20.4% 和 9.7%; 对 PTP1B 的体外抑制活性分别为 3.0% 和 18.0%。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

JASCO P-2000 型旋光光度仪; JASCO V-650 型紫外可见分光光度计; JASCO J-815 型圆二色光谱仪; Nicolet 5700 型红外光谱分析仪; Bruker AVANCE III 500 型和 Agilent/Varian Directdrive2 500 型核磁共振仪(残留溶剂峰为内标); Agilent 6520 型高分辨质谱仪; Agilent 1260 型高效液相色谱仪; Shimadzu LC-10AT 制备型高效液相色谱仪; Rp-18 型十八烷基键合反相硅胶($50\ \mu\text{m}$, 日本 YMC 公司); LH-20 型葡聚糖凝胶(瑞典 Pharmacia 精细化工); HP-20 型大孔吸附树脂(日本三菱化学公司); ODS 反相制备色谱柱($25\ \text{cm}\times 20\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$, 日本 YMC 公司); Apollo C_{18} 分析色谱柱($25\ \text{cm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)。

2.2 实验样品

茅苍术根茎于 2014 年 6 月购自湖北省黄冈市, 经中国医学科学院(北京协和医学院)药物研究所的马林老师鉴定为 *Atractylodes lancea*。该植物标本(ID-s-2596)现存放于中国医学科学院(北京协和医学院)药物研究所标本室。

2.3 提取与分离

将 $100\ \text{kg}$ 干燥的茅苍术根茎粉碎, 80% 乙醇浸泡 $12\ \text{h}$, 然后在 $85\ ^\circ\text{C}$ 下回流提取($150\ \text{L}\times 3$), 每次提取 $2\ \text{h}$ 。

合并后的提取液经减压浓缩后得 $25.6\ \text{kg}$ 浸膏。用 $50\ \text{L}$ 蒸馏水将浸膏充分分散, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取。正丁醇萃取液经减压浓缩、冷冻干燥后得 $1.2\ \text{kg}$ 萃取物。用 $1.5\ \text{L}$ 蒸馏水超声溶解正丁醇萃取物, 过滤后经 HP-20 型大孔吸附树脂柱($120\ \text{cm}\times 15\ \text{cm}$)进行梯度洗脱, 洗脱溶剂依次为蒸馏水、 15% 乙醇、 30% 乙醇、 50% 乙醇及 95% 乙醇。各梯度溶液洗脱 $40\ \text{L}$, 合并流份后减压回收溶剂, 得水部位 $824.0\ \text{g}$ (A), 15% 乙醇亚部位 $88.6\ \text{g}$ (B), 30% 乙醇亚部位 $106.4\ \text{g}$ (C), 50% 乙醇亚部位 $53.3\ \text{g}$ (D), 95% 乙醇亚部位 $19.5\ \text{g}$ (E)。选择 30% 乙醇亚部位($96.4\ \text{g}$)进行 Rp-18 型反相硅胶柱($50\ \text{cm}\times 8\ \text{cm}$, $50\ \mu\text{m}$)的中压梯度洗脱, 洗脱液为 $0\sim 100\%$ 甲醇溶液, 每个梯度洗脱约 $4\ \text{L}$ 流动相。按照每 $500\ \text{mL}$ 为 1 瓶流份收集样品, 根据 HPLC-DAD 检测结果合并流份, 得 10 个亚部位(Fr.C1~Fr.C10)。Fr.C1 亚部位($30.5\ \text{g}$)经 LH-20 型葡聚糖凝胶柱($80\ \text{cm}\times 6\ \text{cm}$)进行洗脱, 洗脱液为蒸馏水, 共得到 123 瓶流份($100\ \text{mL}/\text{瓶}$, Fr.C1.1~Fr.C1.123)。各组经 HPLC-DAD 分析后, 减压回收溶剂、冷冻干燥得干燥固体。Fr.C1.49~Fr.C1.56 部位直接经 C_{18} 反相制备液相色谱柱($250\ \text{mm}\times 20\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)纯化 [$V(\text{甲醇}): V(\text{水})=20: 80$] 后得化合物 **1** ($22.9\ \text{mg}$)。Fr.C1.(57~95).8~Fr.C1.(57~95).9 部位经 C_{18} 反相制备液相色谱柱($25\ \text{cm}\times 20\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)纯化 [$V(\text{甲醇}): V(\text{水})=20: 80$] 后得化合物 **2** ($19.2\ \text{mg}$)。

2.4 糖取代基绝对构型的确定

将 $5.0\ \text{mg}$ 化合物 **1** 溶于 $3\ \text{mL}$ 水中, 加入 $10\ \text{mg}$ 蜗牛酶, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴加热 $6\ \text{h}$, 水解液用乙酸乙酯萃取($5\ \text{mL}\times 3$), 水相经冷冻干燥后备用。将 $5.0\ \text{mg}$ 化合物 **2** 溶于 $5\ \text{mL}$ 三氟乙酸溶液中($1\ \text{mol/L}$), $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴加热 $1\ \text{h}$, 回收溶剂, 残渣经冷冻干燥后备用。将上述样品溶于 $1\ \text{mL}$ 吡啶溶液, 加入 $3\ \text{mg}$ L -半胱氨酸甲酯盐酸盐, $60\ ^\circ\text{C}$ 水浴加热 $1\ \text{h}$ 。减压回收溶剂后, 加入 $0.5\ \text{mL}$ 三甲基硅烷咪唑, $60\ ^\circ\text{C}$ 继续水浴加热 $1\ \text{h}$ 。然后, 加入 $2\ \text{mL}$ 水至反应液中, 用正己烷溶液萃取($2\ \text{mL}\times 3$)。有机相浓缩至 $2\ \text{mL}$, 过滤后进气相色谱分析。称取 $2\ \text{mg}$ 单糖标准品(D -葡萄糖, L -鼠李糖), 按照同样方法进行衍生化处理, 过滤后进气相色谱分析。通过比较样品与对照品的保留时间(D -葡萄糖和 L -鼠李糖的保留时间分别为 20.56 和 $16.61\ \text{min}$), 确定单糖的绝对构型。

2.5 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

测试样品为已配制好的 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物储备液。在实验组和空白组分别加入 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液 50 和 $80\ \mu\text{L}$; 各加入样品 $10\ \mu\text{L}$, α -葡萄糖苷酶 $20\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温摇床中反应 $5\ \text{min}$, 再各加入 4 -硝基苯基- α - D -吡喃葡萄糖苷(pNPG, $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $20\ \mu\text{L}$, 然后

37 °C 恒温摇床中反应 15 min, 最后用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 50 μL 终止反应. 酶标仪 400 nm 测 OD 值. 计算样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{OD}_{\text{空白组}} - \text{OD}_{\text{给药组}}) / \text{OD}_{\text{空白组}} \times 100\%.$$

2.6 对蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B 的抑制作用

测试样品为已配制好的 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物储备液. 采用对硝基苯酚磷酸酯(pNPP)作为人基因重组 PTP1B 的底物. 将化合物与酶在室温下孵育 5 min, PTP1B 催化的 pNPP 水解反应在 100 μL 反应体系中测定. 每个反应液含有 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT), $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(EDTA)以及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pNPP, pH 为 7.0; 在 30 °C 下孵育 10 min; 加入 50 μL $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液终止酶反应. 水解产物对硝基苯酚钠在 405 nm 处有很强的光吸收, 采用酶标仪测出各孔的 OD 值, 即可计算出测试样品对酶促水解的抑制作用.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1**, **1a** 和 **2** 的 UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HR-ESIMS, HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY 和 ECD 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Chinese Flora Editorial Board of Chinese Academy of Sciences *Flora of China*, Vol. 78, Science Press, Beijing, **1985**, pp. 25~27

- (in Chinese).
(中国科学院中国植物志编辑委员, 中国植物志, 第 78 卷, 科学出版社, 北京, **1987**, pp. 25~27.)
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission *Chinese Pharmacopoeia*, Vol. 1, China Medical Science and Technology Press, Beijing, **2015**, p. 161, p. 162 (in Chinese).
(国家药典委员会, 中国药典(第一部), 中国医药科技出版社, 北京, **2015**, p. 161, p. 162.)
- [3] Koonrunsesomboon, N.; Na-Bangchang, K.; Karbwang, J. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, 7, 421.
- [4] Yu, Y.; Jia, T. Z.; Cai, Q.; Jiang, N.; Ma, M. Y.; Min, D. Y.; Yu, Y. J. *Ethnopharmacol.* **2015**, 160, 211.
- [5] Kitajima, J.; Kamoshita, A.; Ishikawa, T.; Takano, A.; Fukuda, T.; Isoda, S.; Ida, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 673.
- [6] Duan, J. A.; Wang, L. Y.; Qian, S. H.; Su, S. L.; Tang, Y. P. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, 31, 965.
- [7] Tanaka, K.; Ina, A. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, 4, 1095.
- [8] Chen, Y. J.; Wu, Y. X.; Wang, H. X.; Gao, K. *Fitoterapia* **2012**, 83, 199.
- [9] Kamauchi, H.; Kinoshita, K.; Takatori, K.; Sugita, T.; Takahashi, K.; Koyama, K. *Tetrahedron* **2015**, 71, 1909.
- [10] Xu, K.; Jiang, J. S.; Feng, Z. M.; Yang, Y. N.; Li, L.; Zang, C. X.; Zhang, P. C. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 1567.
- [11] He, J.; Shen, Y.; Jiang, J. S.; Yang, Y. N.; Feng, Z. M.; Zhang, P. C.; Yuan, S. P.; Hou, Q. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 1903.
- [12] He, J. Y.; Zhu, S.; Komatsu, K. *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 213.
- [13] Hu, Y. C.; Wang, K. Z.; MacMillan, J. B. *Org. Lett.* **2013**, 15, 390.
- [14] Xu, K.; Yang, P. F.; Yang, Y. N.; Feng, Z. M.; Jiang, J. S.; Zhang, P. C. *Org. Lett.* **2017**, 19, 686.
- [15] Feng, W. S.; Wang, J. C.; He, Y. H.; Zheng, X. K.; Song, K.; Zhang, Y. L.; Li, M.; Zhao, W. *Chin. Pharm. J.* **2015**, 50, 2103 (in Chinese).
(冯卫生, 王建超, 何玉环, 郑晓珂, 宋楷, 张艳丽, 李孟, 赵威, 中国药学杂志, **2015**, 50, 2103.)

(Zhao, C.)