

华泽兰根化学成分及其抑制 α -葡萄糖苷酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的活性研究

赵金诺*, 覃怡发, 张 轩, 张梦娇, 晏晶晶, 梁皓皓

三峡大学 生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(中国轻工业功能酵母重点实验室),

宜昌 443002

摘 要: 为研究华泽兰 *Eupatorium chinense* 根部的化学成分及其抗糖尿病活性, 采用正相硅胶柱色谱、薄层色谱、凝胶柱色谱及半制备高效液相色谱等色谱方法, 从华泽兰根部分离得到 15 个单体化合物, 并通过现代波谱技术鉴定其结构分别为: 8S-9-hydroxythymol (1)、8,10-dehydro-9-hydroxythymol (2)、1-[4-hydroxy-3-methoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)phenyl]wethanone (3)、speciosin L (4)、(R)-8-hydroxy-9-isobutyryloxythymol (5)、1,4-[13C]-1,2,3,4-tetrahydro-5-naphthyl-amin (6)、eupatriol (7)、3 β ,6-hydroxytremetone (8)、泽兰酮 (9)、(2R, 3S)-5-acetyl-6-hydroxyl-2-isopropenyl-3-ethoxy-dihydrofuran (10)、(2R, 3S)-5-乙酰基-6-羟基-2-异丙烯基-3-乙氧基-苯并二氢呋喃 (11)、6-羟基-2H-苯并呋喃-3-酮 (12)、3,5-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuran (13)、2,4-bis-(5-acetyl-6-hydroxy-benzofuran-2-yl)-4-methyl-pent-1-ene (14)、1,1'-[[[(2E)-4-methylpent-2-ene-2,4-diyl]bis(6-hydroxy-1-benzofuran-2,5-diyl)]diethanone (15)。其中化合物 3 为首次从泽兰属植物中分离获得, 化合物 14 为首次从华泽兰中分离获得。采用对硝基苯基- β -吡喃半乳糖苷法与对硝基苯磷酸盐法分别测定所有化合物对诱导糖尿病发生的 α -葡萄糖苷酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 的抑制活性进行评价, 化合物 3、4、5 和 12 具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 其 IC₅₀ 值分别为 3.7、10.1、21.3、22.5 μ g/mL, 其中化合物 3 的抑制活性优于良性药阿卡波糖 (4.6 μ g/mL); 化合物 1、3、4 和 12 具有良好的 PTP1B 抑制活性, 其 IC₅₀ 值分别为 15.2、8.6、2.2 和 21.2 μ g/mL, 其中化合物 3 的抑制活性优于良性药齐墩果酸 (12.5 μ g/mL), 化合物 4 的抑制活性优于阳性药正钒酸钠 (7.5 μ g/mL) 和齐墩果酸 (12.5 μ g/mL)。研究表明, 炔类化合物 3 和 4 均具有较明显的 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 抑制活性。利用分子对接技术计算化合物 3 和 4 分别与 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 的相互作用, 结果表明化合物 3 和 4 与 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 均具有较强的结合力。本文首次采用双靶点对华泽兰根部的化学成分进行了抗糖尿病活性及构效研究, 发现化合物 3 和 4 可作为抗糖尿病的先导化合物。

关键词: 华泽兰; 化学成分; 抗糖尿病活性; α -葡萄糖苷酶; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B

中图分类号: R284

文献标识码: A

Chemical constituents from *Eupatorium chinense* roots and their inhibitory activities on α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B

ZHAO Jin-nuo*, QIN Yi-fa, ZHANG Xuan,

ZHANG Meng-jiao, YAN Jing-jing, LIANG Hao-hao

Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development(China Key Laboratory of Light Industry Functional Yeast), College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang

Abstract: This study aims to investigate the chemical constituents of *Eupatorium chinense* roots and their antidiabetic activities. Normal-phase silica gel column chromatography, thin-layer chromatography, gel column chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography were used to investigate the chemical constituents of roots of *E. chinense*. Fifteen compounds were isolated and then identified as 8*S*-9-hydroxythymol (**1**), 8,10-dehydro-9-hydroxythymol (**2**), 1-[4-hydroxy-3-methoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl) phenyl] ethenone (**3**), speciosin L (**4**), (*R*)-8-hydroxy-9-isobutyryloxythymol (**5**), 1,4-[13C]-1,2,3,4-tetrahydro-5-naphthyl-amin (**6**), eupatriol (**7**), 3*β*,6-hydroxytremetone (**8**), 6-methoxyluteolin (**9**), (2*R*, 3*S*)-5-acetyl-6-hydroxyl-2-isopropenyl-3-ethoxy-dihydrofuran (**10**), (2*R*, 3*S*)-5-Acetyl-6-hydroxy-2-isopropenyl-3-ethoxy-benzodihydrofuran (**11**), 6-hydroxy-2*H*-benzofuran-3-one (**12**), 3,5-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuran (**13**), 2,4-bis-(5-acetyl-6-hydroxy-benzofuran-2-yl)-4-methyl-pent-1-ene (**14**), 1,1'-[[[(2*E*)-4-methylpent-2-ene-2,4-diyl] bis (6-hydroxy-1-benzofuran-2,5-diyl)] diethanone (**15**). Among them, compound **3** was isolated for the first time from *Eupatorium* and compound **14** was isolated for the first time from *Eupatorium chinense*. The inhibitory activities of α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) of the compounds were determined by *p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside method and *p*-nitrophenyl phosphate method. Compounds **3**, **4**, **5** and **12** showed good α -glucosidase inhibitory activity with IC₅₀ values of 3.7, 10.1, 21.3 and 22.5 μ g/mL, respectively, with compound **3** showing better inhibitory activity than the benign drug acarbose (4.6 μ g/mL); compounds **1**, **3**, **4** and **12** showed good PTP1B inhibitory activity with IC₅₀ values of 15.2, 8.6, 2.2 and 21.2 μ g/mL, respectively, of which the inhibitory activity of compound **3** was superior to that of the benign drug oleanolic acid (12.5 μ g/mL), and the inhibitory activity of compound **4** was superior to that of the positive drugs sodium orthovanadate (7.5 μ g/mL) and oleanolic acid (12.5 μ g/mL). It was shown that both alkyne compounds **3** and **4** have more pronounced α -glucosidase and PTP1B inhibitory activities. Molecular docking technique was used to calculate the interactions of compounds **3** and **4** with α -glucosidase and PTP1B, respectively, and the calculated results showed that compounds **3** and **4** have strong binding to both α -glucosidase and PTP1B. This thesis presents the first dual-targeted study of the antidiabetic activities of the chemical constituents of *Eupatorium chinense* roots, and the results suggest that compounds **3** and **4** could be used as antidiabetic lead compounds for subsequent studies.

Key words: *Eupatorium chinense*; Chemical constituents; antidiabetic activity; α -glucosidase; protein tyrosine phosphatase 1B

华泽兰 *Eupatorium chinense* 是菊科 (Compositae) 泽兰属 (*Eupatorium*) 植物, 民间以其干燥根茎入药, 具有清热解毒、凉血利咽、抗炎镇痛等功效^[1], 主要用于治疗白喉、咽喉肿痛等喉部疾病, 有“喉科圣药”之称^[2]。目前研究表明, 华泽兰中主要的化学成分有苯并呋喃类和倍半萜类化合物, 对其药理活性研究主要集中在抗肿瘤和抑菌方面, 而对其抗糖尿病活性相关的研究则鲜有报道。在江浙一带, 华泽兰根常被切成饮片泡茶以控制血糖升高, 但其改善血糖的活性成分仍不明确。目前, α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 的双靶点筛选方式可作为糖尿病药物筛选的研究方向之一^[3], 为了进一步研究华泽兰根部的降糖物质基础, 本实验对华泽兰根部化学成分进行分离鉴定, 并检测其 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 的抑制活性, 为华泽兰等天然产物应用于抗糖尿病提供了可能的先导化合物, 并为华泽兰在民间应用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物来源

华泽兰植物于 2021 年 10 月采自湖北长阳,经三峡大学生物技术中心王玉兵教授鉴定为 *Eupatorium chinense*, 植物标本 (TRCW20211031) 现保存于天然产物研究与利用湖北省重点实验室 (三峡大学)。本实验取自此植物的根部。

1.2 试剂与仪器

蛋白酪氨酸磷酸酶 (纯度 \geq 90%, 批号: SLCG8506, Sigma-Aldrich 公司); PBS (纯度 \geq 98%, 批号: P1010, 北京 Solarbio 公司); α -葡萄糖苷酶 (纯度 \geq 99%, 批号: G5003, Sigma-Aldrich 公司); 正相色谱硅胶 (200~300 目, 烟台化学工业研究所); 葡聚糖凝胶 (200~300 目, 批号: 131118, 上海蓝季科技有限公司); 柠檬酸 (纯度 \geq 99%, 批号: C108869, Aladdin 公司); 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) (纯度 \geq 99%, 批号: D104859, Aladdin 公司); 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (纯度 \geq 99%, 批号: E112489, Aladdin 公司); 阿卡波糖 (纯度 \geq 98%, 批号: A129816, Aladdin 公司); 正钒酸钠 (纯度 \geq 99%, 批号: S105283, Aladdin 公司); 齐墩果酸 (纯度 \geq 98%, 批号: O110087, Aladdin 公司); 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl- β -galactopyranoside, *p*-NPG) (纯度 \geq 98%, 批号: N1627, Sigma-Aldrich 公司); 对硝基苯基磷酸酯 (*p*-nitrophenyl phosphate, *p*-NPP) (纯度 \geq 98%, 批号: 20106, Sigma-Aldrich 公司); 乙腈 (色谱纯, 美国天地有限公司); 二氯甲烷、NaCl 等其他试剂 (分析纯, 天力化学试剂有限公司)。

Bruker AVANCE 400 MHz 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker 公司); Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (美国戴安公司); YMC-Pack ODS-A 液相色谱分析柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) (日本 YMC 公司)。

1.3 华泽兰根部的化学成分分离

取华泽兰根部 (4.2 kg), 干燥后进行粉碎, 室温条件下用 95% 工业乙醇 15 L 隔夜浸提 3 次。再将浓缩合并的根部乙醇提取液通过旋转蒸发器浓缩后悬浮于水 (3L) 中, 得到样品混悬液, 随后用石油醚重复萃取 4 次, 利用旋转蒸发器减压浓缩, 得到石油醚部位浸膏 20.25 g。后于浸膏中加入 16 g 硅胶拌样, 另取 500 g 正相硅胶 (200~300 目) 加二氯甲烷充分浸泡 1 h 后湿法装柱, 干法上样后采用二氯甲烷-甲醇=100:0 \rightarrow 0:100 (体积比) 梯度洗脱, 洗脱结束得到 20 个馏分。对所有馏分进行 TLC 检测, 展开体系为分别为石油醚/乙酸乙酯=5:1 和二氯甲烷/甲醇=10:1 (均为体积比), 在 256 nm 和 365 nm 紫外灯下观察点分布情况, 高相液相色谱采用乙腈/水=100:0 \rightarrow 90:10 (体积比) 进行分析后, 将相同的馏分进行合并, 最后得到 8 个片段 (Fr.a~Fr.h)。

取 Fr.c, 用少量甲醇溶解, 与 2 g 正相硅胶 (200~300 目) 进行拌样, 另取 100 g 正相硅胶加二氯甲烷充分浸泡 30 分钟后湿法装柱, 层析柱体积为 150 mL, 干法上样后采用二氯甲烷/甲醇=100:0 \rightarrow 0:100 (体积比) 梯度洗脱, 期间设置 5 个梯度, 每个梯度洗脱剂用量

为2个柱体积，洗脱结束得到4个片段(Fr.c.1~Fr.c.4)。取Fr.c.2，经半制备高效液相色谱(乙腈/水=48:52, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物10(6.5 mg, t_R =8 min)和化合物2(3.8 mg, t_R =5 min)。取Fr.d，经半制备高效液相色谱(乙腈/水=45:55, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物6(3.2 mg, t_R =9 min)、化合物7(10.6 mg, t_R =18.5 min)和化合物11(6.3 mg, t_R =6 min)。取Fr.e，经半制备高效液相色谱(乙腈/水=10:90→60:40, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物8(4.2 mg, t_R =17 min)、化合物5(17.2 mg, t_R =19.5 min)和化合物14(10.8 mg, t_R =15.5 min)。取Fr.f，经过Sephadex LH-20(二氯甲烷/甲醇=1:1)初步分离后，得到6个片段(Fr.f.1~Fr.f.6)。取Fr.f.2，经半制备高效液相色谱(乙腈/水=20:80→50:50, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物1(7.4 mg, t_R =10.5 min)和化合物3(8.3 mg, t_R =20 min)。取Fr.f.4，经半制备高效液相色谱(乙腈/水=10:90, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物12(3.6 mg, t_R =18 min)、化合物13(9.8 mg, t_R =19 min)和化合物15(6.3 mg, t_R =10.5 min)。取Fr.g，经半制备半制备高效液相色谱(乙腈/水=45:55, 2.0 ml/min)进行分离，得到化合物4(8.3 mg, t_R =20 min)和化合物9(4.2 mg, t_R =8 min)。

1.4 酶抑制活性测试

1.4.1 化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

参考本课题组活性测定方法^[4]，对化合物1~15进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选。样品组：加80 μ L样品溶液、20 μ L酶溶液，混匀，在37 $^{\circ}$ C孵育15 min，加20 μ L 5 mmol/L *p*-NPG反应，孵育15 min，加80 μ L 1 mol/L Na₂CO₃终止反应；样品空白组：加20 μ L 1% PBS代替酶溶液；酶活性组：加20 μ L酶溶液，混匀，在37 $^{\circ}$ C孵育15 min，加20 μ L 5 mmol/L *p*-NPG和80 μ L 1% PBS反应，孵育15 min，加80 μ L 1 mol/L Na₂CO₃终止反应；酶空白组：加100 μ L 5 mmol/L *p*-NPG和20 μ L 5 mmol/L *p*-NPG反应，孵育15 min，加80 μ L 1 mol/L Na₂CO₃终止反应。以405 nm处吸光度定量*p*-NPG释放量，按式(1)计算抑制率(*I*)。

$$I=[1-(A_1-A_2)/(A_3-A_4)]\times 100\% \quad (1)$$

式中， A_1 ：样品组吸光度； A_2 ：样品空白组吸光度； A_3 ：酶活性组吸光度； A_4 ：酶空白组吸光度。

1.4.2 化合物对PTP1B抑制活性测定

参考本课题组活性测定方法^[4]，对化合物1~15进行PTP1B抑制活性筛选。样品组：加170 μ L样品溶液、20 μ L酶溶液，混匀，在37 $^{\circ}$ C孵育15 min，加10 μ L 5 mmol/L *p*-NPP反应，孵育15 min，加80 μ L 1 mol/L NaOH终止反应；样品空白组：20 μ L 1% PBS代替酶溶液；酶活性组：加20 μ L酶溶液，混匀，在37 $^{\circ}$ C孵育15 min，加10 μ L 5 mmol/L *p*-NPP和170 μ L 1% PBS反应，孵育15 min，加80 μ L 1 mol/L NaOH终止反应；酶空白组：加10 μ L 5

mmol/L *p*-NPP 和 190 μ L 5 mmol/L *p*-NPP 反应, 孵育 15 min, 加 80 μ L 1 mol/L NaOH 终止反应。以 405 nm 处吸光度定量 *p*-NPP 释放量, 按式 (1) 计算抑制率。

1.4.3 分子对接实验

参考本课题组分子对接实验方法^[4], 对含炔基化合物 **3** 和 **4** 进行分子构建。 α -葡萄糖苷酶 (PDB ID: 5ZCE)、PTP1B (PDB ID: 5QG3) 蛋白结构来自于 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)。将蛋白结构在 Pymol 与 Autodock 平台进行去水分子、去配体、加氢等处理, 对蛋白进行能量最小化, 以及几何结构的优化并导出为 PDBQT 文件, 观察化合物与蛋白的结合方式。

2 实验结果

2.1 化合物结构测定

化合物 1 黄色固体; ESI-MS: m/z 167.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₀H₁₄O₂; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.99 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-5), 6.50 (1H, s, H-6), 6.41 (1H, s, H-2), 4.02 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-9), 3.12 (1H, s, H-8), 2.41 (3H, s, H-7), 1.23 (3H, m, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 136.5 (C-1, C-4), 117.2 (C-2), 152.8 (C-3), 125.0 (C-5), 120.9 (C-6), 22.4 (C-7), 36.2 (C-8), 70.0 (C-9), 15.6 (C-10)。化合物 **1** 的 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱与文献^[5]对比一致, 故鉴定该化合物为 8S-9-hydroxythymol。

化合物 2 无色油状物; ESI-MS: m/z 165.1[M+H]⁺, 分子式 C₁₀H₁₂O₂; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.95 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5), 6.61 (1H, s, H-2), 6.56 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-6), 5.30 (1H, q, J = 1.9 Hz, H-10a), 5.10 (1H, q, J = 1.4 Hz, H-10b), 4.21 (2H, t, J = 1.6 Hz, H-9), 2.19 (3H, s, H-7); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 138.2 (C-1), 116.6 (C-2), 154.9 (C-3), 124.9 (C-4), 129.9 (C-5), 120.1 (C-6), 21.2 (C-7), 148.7 (C-8), 63.8 (C-9), 112.6 (C-10)。化合物 **2** 的 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱与文献^[6]对比一致, 故鉴定该化合物为 8, 10-dehydro-9-hydroxythymol。

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS: m/z 231.1 [M+H]⁺, 分子式 C₁₄H₁₄O₃; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.55 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 7.42 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.40 (1H, s, OH), 5.25 (1H, s, H-13a), 5.12 (1H, s, H-13b), 4.02 (3H, s, H-14), 2.47 (3H, s, H-8), 2.06 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 150.8 (C-1), 109.1 (C-2, 5), 145.2 (C-3), (C-4), 126.0 (C-6), 195.2 (C-7), 25.8 (C-8), 81.6 (C-9), 95.8 (C-10), 125.4 (C-11), 22.2 (C-12), 121.6 (C-13), 56.2 (C-14)。化合物 **3** 的 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱与文献^[7]对比一致, 故鉴定该化合物为 1-[4-hydroxy-3-

methoxy-5-(3-methylbut-3-en-1-ynyl) phenyl] ethanone。

化合物 4 淡黄色油状物; ESI-MS: m/z 179.1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{10}H_{10}O_3$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.87 (1H, dd, $J=17.4, 11.35$ Hz, H-9), 5.69 (1H, dd, $J=17.4, 2.1$ Hz, H-10), 5.68 (1H, m, H-3), 5.58 (1H, m, H-2), 5.57 (1H, dd, $J=11.3, 2.1$ Hz, H-10), 4.54 (1H, s, H-1), 4.28 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-4), 3.50 (1H, t, $J=2.1$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 63.4 (C-1), 129.4 (C-2), 126.0 (C-3), 56.1 (C-4), 62.1 (C-5), 56.1 (C-6), 87.7 (C-7), 83.0 (C-8), 110.7 (C-9), 128.4 (C-10)。化合物 4 的 1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[8]对比一致, 故鉴定该化合物为 speciosin L。

化合物 5 黄色油状物; ESI-MS: m/z 253.1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{14}H_{20}O_4$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.11 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5), 6.47 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6), 6.34 (1H, s, H-2), 4.10 (1H, d, $J=10.2$ Hz, H-9a), 4.02 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-9b), 2.40 (1H, m, H-2'), 2.12 (3H, s, H-7), 1.36 (3H, s, H-10), 1.17 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-4'), 1.02 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-3'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 136.4 (C-1), 116.9 (C-2), 153.8 (C-3), 126.0 (C-4), 126.7 (C-5), 120.0 (C-6), 20.3 (C-7), 74.1 (C-8), 70.0 (C-9), 25.1 (C-10), 175.4 (C-1'), 33.2 (C-2'), 18.8 (C-3'), 17.9 (C-4')。化合物 5 的 1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[9]对比一致, 故鉴定该化合物为 (*R*)-8-hydroxy-9-isobutyryloxythymol。

化合物 6 淡黄色固体, ESI-MS: m/z 269.1 $[M]^+$, 分子式 $C_{14}H_{20}O_5$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.00 (1H, d, $J=6.7$ Hz, H-5), 6.36 (1H, dd, $J=8.9, 2.0$ Hz, H-6), 6.05 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2), 4.56 (2H, d, $J=10.5$ Hz, H-10), 3.63 (2H, d, $J=10.5$ Hz, H-9), 2.35 (1H, m, H-2'), 2.15 (3H, s, H-7), 1.00 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-3'), 0.85 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-4'); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 136.8 (C-1), 116.2 (C-2), 157.5 (C-3), 123.2 (C-4), 126.9 (C-5), 120.0 (C-6), 20.6 (C-7), 76.0 (C-8), 65.1 (C-9), 66.9 (C-10), 175.0 (C-1'), 33.7 (C-2'), 18.7 (C-3'), 18.0 (C-4')。化合物 6 的 1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[10]对比一致, 故鉴定该化合物为 1,4-[^{13}C]-1,2,3,4-tetrahydro -5-naphthyl-amin

化合物 7 淡黄色固体; ESI-MS: m/z 183.1 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{10}H_{14}O_3$; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.21 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5), 5.96 (1H, dd, $J=7.5, 1.9$ Hz, H-6), 6.32 (1H, s, H-2), 3.60 (2H, d, $J=1.5$ Hz, H-9), 2.26 (3H, s, H-7), 1.55 (3H,

s, H-10) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 136.5 (C-1) , 117.0 (C-2) , 154.0 (C-3) , 127.3 (C-4) , 126.8 (C-5) , 118.2 (C-6) , 22.1 (C-7) , 75.0 (C-8) , 69.2 (C-9) , 24.5 (C-10) 。化合物 7 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[11]对比一致, 故鉴定该化合物为 eupatriol。

化合物 8 无色油状物; ESI-MS: m/z 235.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.54 (1H, s, H-4) , 6.30 (1H, s, H-7) , 4.99 (2H, d, $J=1.9$ Hz, H-14) , 4.85 (1H, d, $J=0.9$ Hz, H-3) , 4.50 (1H, d, $J=3.6$ Hz, H-2) , 2.47 (3H, s, H-11) , 1.57 (3H, s, H-13) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 95.9 (C-2) , 74.2 (C-3) , 128.0 (C-4) , 115.3 (C-5) , 165.0 (C-6) , 99.0 (C-7) , 163.9 (C-8) , 122.7 (C-9) , 202.3 (C-10) , 27.2 (C-11) , 144.0 (C-12) , 17.8 (C-13) , 111.0 (C-14) 。化合物 8 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[12]对比一致, 故鉴定该化合物为 3 β ,6-hydroxytremetone。

化合物 9 黄色固体; ESI-MS: m/z 219.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.20 (1H, s, H-4) , 7.49 (1H, s, H-7) , 7.12 (1H, s, H-3) , 2.76 (3H, s, H-11) , 2.62 (3H, s, H-13) ; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 153.6 (C-2) , 100.4 (C-3) , 126.9 (C-4) , 119.7 (C-5) , 160.0 (C-6) , 113.1 (C-7) , 163.3 (C-8) , 118.4 (C-9) , 204.0 (C-10) , 26.9 (C-11) , 188 (C-12) , 26.4 (C-13) 。化合物 9 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[13]对比一致, 故鉴定该化合物为泽兰酮。

化合物 10 淡黄色油状物; ESI-MS: m/z 263.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.03 (1H, s, H-4) , 6.45 (1H, s, H-7) , 5.22 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2) , 5.00 (1H, q, $J=1.3$ Hz, H-13b) , 4.93 (1H, t, $J=1.8$ Hz, H-13a) , 4.74 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3) , 3.59 (2H, dd, $J=7.0, 2.3$ Hz, H-15) , 2.47 (3H, s, H-11) , 1.62 (3H, s, H-14) , 1.05 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-16) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 92.6 (C-2) , 81.4 (C-3) , 130.2 (C-4) , 118.0 (C-5) , 165.8 (C-6) , 99.1 (C-7) , 167.3 (C-8) , 113.7 (C-9) , 204.1 (C-10) , 26.1 (C-11) , 143.8 (C-12) , 111.9 (C-13) , 17.5 (C-14) , 64.3 (C-15) , 15.7 (C-16) 。化合物 10 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[14]对比一致, 故鉴定该化合物为 (2*R*,3*S*)-5-acetyl-6-hydroxyl-2-isopropenyl-3-ethoxy-dihydrofuran。

化合物 11 淡黄色油状物; ESI-MS: m/z 263.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.96 (1H, s, H-4) , 6.46 (1H, s, H-7) , 5.15 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2) , 4.99 (1H, q, $J=1.3$ Hz, H-13b) , 4.91 (1H, t, $J=1.8$ Hz, H-13a) , 4.81 (1H,

d, $J = 2.1$ Hz, H-3), 3.63 (2H, dd, $J = 7.0, 2.3$ Hz, H-15), 2.59 (3H, s, H-11), 1.67 (3H, s, H-14), 1.15 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 92.5 (C-2), 81.0 (C-3), 130.8 (C-4), 119.2 (C-5), 166.17 (C-6), 97.9 (C-7), 166.9 (C-8), 114.5 (C-9), 203.7 (C-10), 27.3 (C-11), 141.7 (C-12), 113.0 (C-13), 17.8 (C-14), 63.4 (C-15), 15.7 (C-16)。化合物 **11** 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[14]对比一致, 故鉴定该化合物为(2*R*, 3*S*)-5-乙酰基-6-羟基-2-异丙烯基-3-乙氧基-苯并二氢呋喃。

化合物 12 淡黄色油状物; ESI-MS: m/z 179.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.00 (1H, s, H-7), 6.90 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 2.42 (3H, s, H-10), 1.35 (3H, s, H-11); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 103.4 (C-2), 199.5 (C-3), 125.7 (C-4), 122.8 (C-5), 150.0 (C-6), 112.5 (C-7), 169.2 (C-8), 115.6 (C-9), 22.7 (C-10), 22.1 (C-11)。化合物 **12** 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[15]对比一致, 故鉴定该化合物为 6-羟基-2*H*-苯并呋喃-3-酮。

化合物 13 浅黄色油状物; ESI-MS: m/z 149.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.84 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7), 6.51 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.40 (1H, dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, H-5), 3.46 (1H, dd, $J = 10.1, 5.2$ Hz, H-2a), 3.19 (1H, dd, $J = 10.1, 5.2$ Hz, H-2b), 2.87 (1H, m, H-3), 2.12 (3H, s, H-10), 1.21 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 65.0 (C-2), 35.5 (C-3), 127.2 (C-4), 121.1 (C-5), 135.0 (C-6), 115.9 (C-7), 126.3 (C-8), 154.3 (C-9), 21.8 (C-10), 17.6 (C-11)。化合物 **13** 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[16]对比一致, 故鉴定该化合物为 3,5-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuran。

化合物 14 黄色粉末; ESI-MS: m/z 433.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.47 (1H, s, -OH), 12.45 (1H, s, -OH), 7.59 (1H, s, H-7'), 7.55 (1H, s, H-7), 6.97 (1H, s, H-4'), 6.82 (1H, s, H-4), 6.26 (1H, s, H-3), 6.15 (1H, s, H-3'), 5.78 (1H, s, H-11b), 5.00 (1H, s, H-11a), 2.77 (2H, s, H-12), 2.63 (3H, s, H-14'), 2.55 (3H, s, H-14), 1.43 (6H, s, H-11', H-12'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 157.3 (C-2), 102.1 (C-3), 98.9 (C-4), 116.4 (C-5), 161.2 (C-6), 122.8 (C-7), 159.1 (C-8), 121.6 (C-9), 133.6 (C-10), 117.1 (C-11), 44.8 (C-12), 204.0 (C-13, C-13'), 26.6 (C-14), 164.9 (C-2'), 101.5 (C-3'), 99.1 (C-4'), 116.4 (C-5'), 160.7 (C-6'), 123.1 (C-7'), 159.2 (C-8'), 121.4 (C-9'), 36.7 (C-10'),

26.3 (C-11', C-12'), 26.7 (C-14')。通过化合物 **14** 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱数据鉴定该化合物为 2, 4-bis-(5-acetyl-6-hydroxy-benzofuran-2-yl)-4-methyl-pent-1-ene, 但尚未有文献报道, 本文首次归属了该化合物的波谱数据。

化合物 15 黄色粉末; ESI-MS: m/z 433.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_6$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.54 (1H, s, -OH), 12.45 (1H, s, -OH), 7.90 (1H, s, H-4), 7.87 (1H, s, H-4'), 6.98 (2H, s, H-7, H-7'), 6.54 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-11'), 6.48 (1H, s, H-3'), 6.47 (1H, s, H-3), 2.69 (3H, s, H-14'), 2.68 (3H, s, H-14), 1.72 (3H, d, $J=1.2$ Hz, H-12'), 1.63 (6H, s, H-11, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.9 (C-2), 100.6 (C-3), 123.0 (C-4), 116.7 (C-5), 160.7 (C-6), 100.6 (C-7), 159.6 (C-8), 121.4 (C-9), 37.4 (C-10), 28.8 (C-11, C-12), 203.9 (C-13), 26.8 (C-14), 158.8 (C-2'), 101.6 (C-3'), 123.2 (C-4'), 116.7 (C-5'), 161.4 (C-6'), 99.6 (C-7'), 159.5 (C-8'), 121.9 (C-9'), 125.6 (C-10'), 134.3 (C-11'), 13.1 (C-12'), 203.9 (C-13'), 26.8 (C-14')。化合物 **15** 的 ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱与文献^[17]对比一致, 故鉴定该化合物为 1, 1'-[[*(2E)*-4-methylpent-2-ene-2,4-diyl] bis(6-hydroxy-1-benzofuran-2,5-diyl)] diethanone。

化合物 **1~15** 的化学结构见图 1。

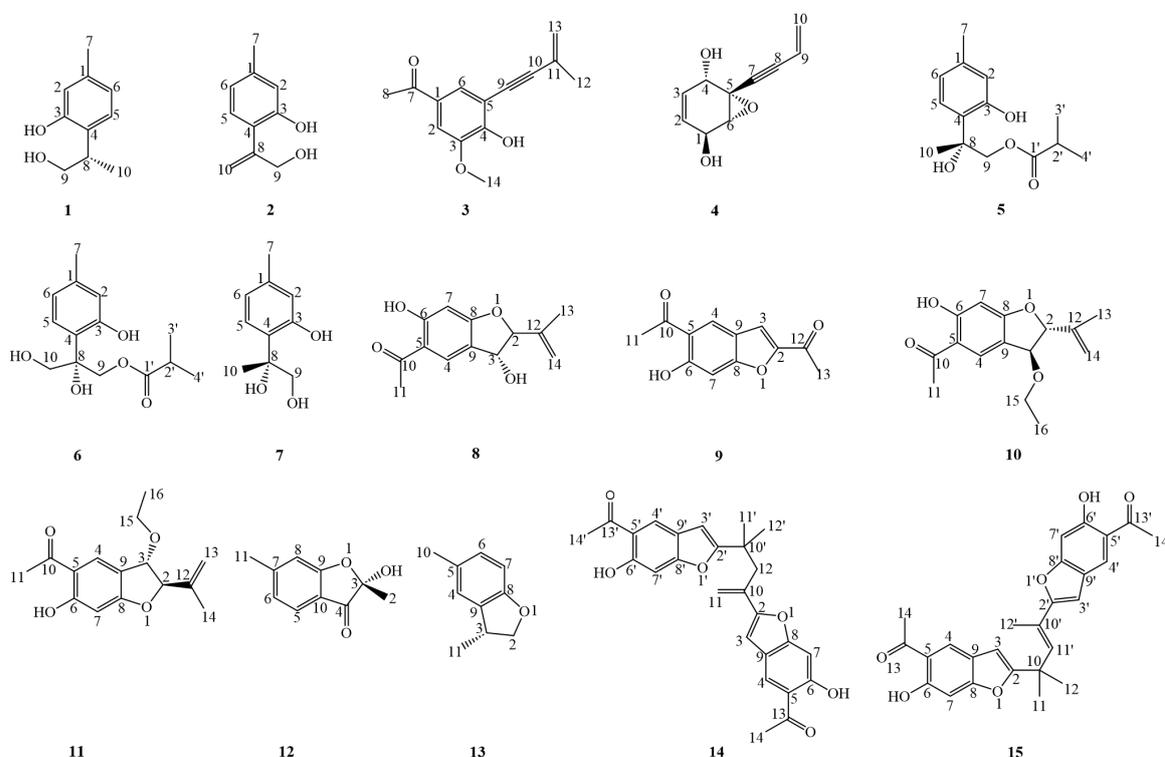


图 1 化合物 **1~15** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-15

2.2 酶抑制活性测试结果

2.2.1 化合物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定结果

本论文对前期分离得到的 15 个化合物进行 α -葡萄糖苷酶活性测定, 结果显示化合物 3、4、5 和 12 具有较明显 α -葡萄糖苷酶抑制活性 ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$) 且化合物 3 的活性优于阳性药阿卡波糖 ($4.6 \mu\text{g/mL}$), 其 IC_{50} 值为 $3.7 \mu\text{g/mL}$ (见表 1)。

表 1 化合物 1~15 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Inhibitory activity of compounds 1-15 against α -glucosidase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
阿卡波糖 Acarbose	4.61 ± 0.99	8	> 50
1	> 50	9	> 50
2	> 50	10	> 50
3	3.72 ± 1.26	11	> 50
4	10.16 ± 1.11	12	22.56 ± 1.13
5	21.35 ± 1.21	13	> 50
6	> 50	14	> 50
7	> 50	15	> 50

2.2.2 化合物对 PTP1B 抑制活性测定结果

本论文对前期分离得到的 15 个化合物进行 PTP1B 抑制活性测定, 结果显示化合物 1、3、4 和 12 具有较明显的蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制活性, 且化合物 4 的活性优于阳性药正钒酸钠 ($7.5 \mu\text{g/mL}$) 和齐墩果酸 ($12.5 \mu\text{g/mL}$), 其 IC_{50} 值为 $2.2 \mu\text{g/mL}$ (见表 2)。

表 2 化合物 1~15 对 PTP1B 的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Inhibitory activity of compounds 1-15 against the PTP1B ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	样品 Sample	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
正钒酸钠 Sodium orthovanadate	7.51 ± 0.99	8	> 50
齐墩果酸 Oleanolic acid	12.52 ± 0.99	9	> 50
1	15.23 ± 1.02	10	> 50
2	> 50	11	> 50

3	8.65±1.12	12	21.23±1.12
4	2.21±1.32	13	>50
5	41.32±1.35	14	>50
6	45.67±1.63	15	>50
7	>50		

2.2.3 分子对接结果

分子对接结果表明，含炔基化合物 **3** 和 **4** 与双靶点蛋白均存在氢键、疏水、 π - π 共轭等多种相互作用力且匹配度高（见图 2 和图 3），结合能均小于-6 kcal/mol（见表 3）。将对接后化合物与蛋白形成的复合物利用 Pymol2.1 软件进行可视化后可以得到化合物与蛋白的结合模式，根据结合模式可以很清晰地看到化合物与蛋白口袋的相结合的氨基酸残基。

化合物 **3** 与 α -葡萄糖苷酶蛋白活性位点的 LYS-135、GLY-131、PHE-151 氨基酸形成多个氢键或疏水相互作用，结合能力强，对锚定蛋白口袋中的小分子有着重要作用；化合物 **4** 与 α -葡萄糖苷酶蛋白活性位点的 PHE-163、PHE-144、ARG-411、TYR-63、ARG-197、GLN-256 氨基酸形成多个氢键或疏水相互作用，结合能力强，对锚定蛋白口袋中的小分子有着重要作用（见图 2）。

化合物 **3** 与 PTP1B 蛋白活性位点的 SER-1216、ALA-1217、ILE-1219、GLN-521、GLN-1262、PHE-1182、GLY-1220、ARG-1221 氨基酸形成多个氢键或疏水相互作用，结合能力强，对锚定蛋白口袋中的小分子有着重要作用；化合物 **4** 与 PTP1B 蛋白活性位点的 ARG-1024、ARG-524、ALA-764、ALA-1017、ALA-1264、TYR-1020 氨基酸形成多个氢键或疏水相互作用，结合能力强，对锚定蛋白口袋中的小分子有着重要作用（见图 3）。

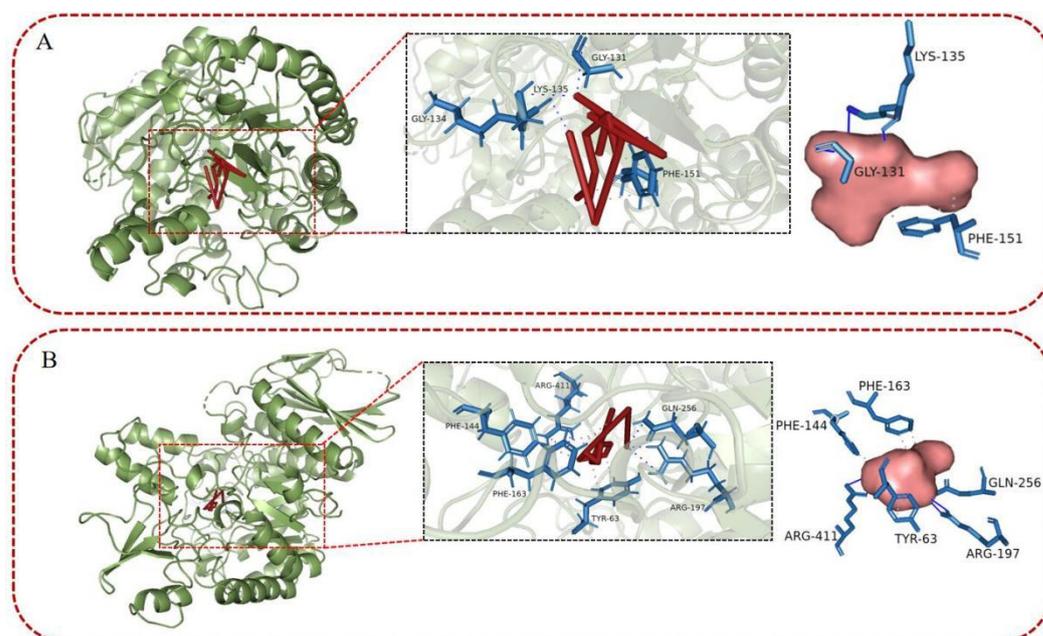


图 2 化合物 3 (A) 和 4 (B) 与 α -葡萄糖苷酶蛋白相互作用分析

Fig. 2 Interaction analysis of α -glucosidase protein with compounds 3 (A) and 4 (B)

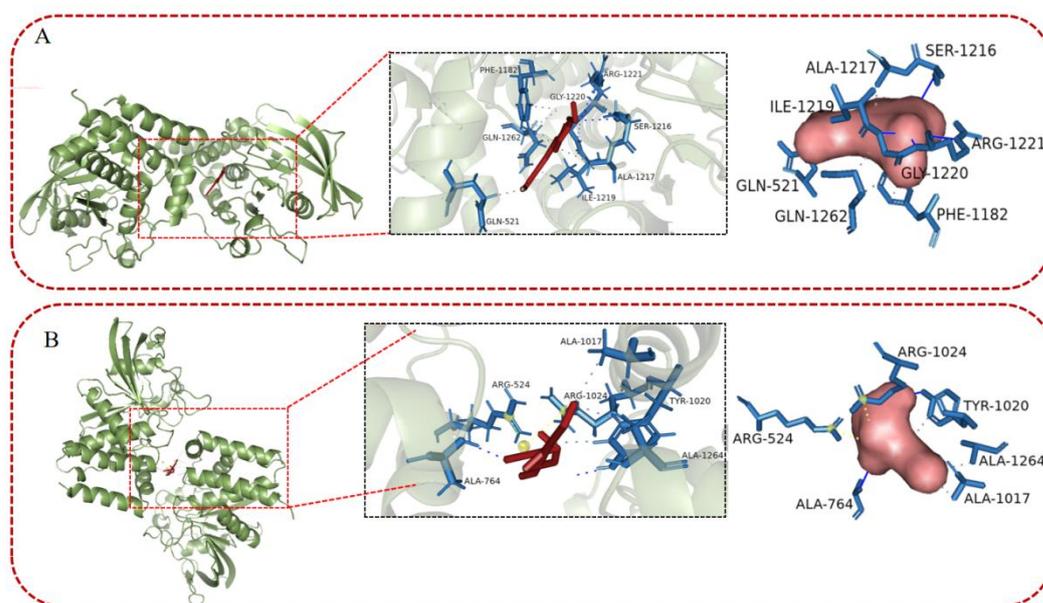


图 3 化合物 3 (A) 和 4 (B) 与 PTP1B 蛋白相互作用分析

Fig. 3 Interaction analysis of PTP1B protein with compounds 3 (A) and 4 (B)

表 3 α -葡萄糖苷酶靶标和 PTP1B 靶标与 2 个化合物的对接结果

Table 3 Docking results of α -glucosidase target and PTP1B target with two compounds

化合物 Compound	结合能 Binding energy (kcal/mol)	
	α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase	PTP1B
3	-6.1	-6.7
4	-7.7	-6.3

3 讨论与结论

本论文从华泽兰根部共分离鉴定得到 15 个单体化合物。包括 5 个百里香酚类化合物、2 个炔类和 8 个苯并呋喃类化合物，其中化合物 3 为首次从泽兰属植物中分离获得，化合物 14 为首次从华泽兰中分离获得。百里香酚类和苯并呋喃类化合物是华泽兰根部主要成分，而炔类化合物在华泽兰中比较少见，目前为止，只报道了一个炔类化合物^[17]，炔类化合物除具有不饱和三键结构外，往往还含有烯的结构，可以在一定程度上吸收紫外线，减少光解带来的副作用，经现代研究表明，天然炔类化合物通常具有良好的抗癌、抗炎、抗氧化等生物活性^[18]。经酶抑制活性测试表明化合物 3、4、5 和 12 具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性，化合物 3 的抑制活性优于良性药阿卡波糖 (4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)；化合物 1、3、4 和 12 具有良好的 PTP1B 抑制活性，化合物 3 的抑制活性优于良性药齐墩果酸 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，化合物 4 的抑制活性优于阳性药正钒酸钠 (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和齐墩果酸 (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。与其他化合物相比，

炔类化合物 **3** 和 **4** 均具有较明显的 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 抑制活性。因此进一步利用分子对接技术,证明了化合物 **3** 和 **4** 均与 α -葡萄糖苷酶及 PTP1B 靶点蛋白之间存在氢键、疏水、共轭等多种相互作用力,从而能够与蛋白形成稳定的复合物,与蛋白关联性较强,验证了活性测试结果。我们的研究结果不仅丰富了华泽兰的化学成分库,也为阐明华泽兰抗糖尿病活性物质基础提供了实验依据以及为天然产物应用于抗糖尿病提供了可能的先导化合物,从而为进一步设计开发新型抗糖尿病药物提供了灵感和模板。

参考文献

- 1 Li DG,Ke YQ,Zou K,et al.Anti-inflammatory activity of chemical constituents from petroleum ether fraction of *Eupatorium chinense* rhizome[J].Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2022,38:106-110.
- 2 Chen YU,Sun ZY,Yang YC,et al.Studies on the chemical constituents of *Eupatorium* flower parts and their antibacterial activity[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:57-62.
- 3 Wang JQ,Feng DD,Xiang YM,et al.Synthesis and inhibitory activity of *euparin* derivatives as potential dual inhibitors against α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B)[J].Fitoterapia,2023,169:105596.
- 4 Zhang MJ,Kuang TH,Zhao JN,et al.Secondary metabolites of endophytic fungus *Septoriella phragmitis* from *Eupatorium chinense* and its bioactivities[J/OL].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发):1-11 [2024-06-04].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20240205.1527.002.html>.
- 5 Breyer S,Effenberger K,Schobert R.Total synthesis and anticancer activities of (-)- and (+)-thespesone[J].J Org Chem,2010,75:6214-6218.
- 6 Bohlmann F,Kramp W,Gupta RK,et al.Four guaianolides and other constituents from three *Kaunia* species[J].Phytochemistry,1981,20:2375-2378.
- 7 Tori M,Ohara Y,Nakashima K,et al.Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*[J].J Nat Prod,2001,64:1048-1051.
- 8 Meng YJ,Yan L,et al.Isoprenylated cyclohexanoids from the basidiomycete *Hexagonia speciosa*[J].Phytochemistry,2011,72:923-928.
- 9 Zhang QQ,Zhou JH,Che Y,et al.Seven new chemical constituents from the underground parts of *Eupatorium chinense*[J].Fitoterapia,2020,146:104674.
- 10 Zhu JX,Qin JJ,Wang HR,et al.Monoterpenes and other chemical constituents from the aerial parts of *Inula japonica*[J].Chem Nat Compd+,2011,47:303-305.
- 11 Wu T,Niwa M,Furukawa H,et al.Eupatriol,a new monoterpene from *Eupatorium tashiroi* Hayata[J].Chem Pharm Bull,2008,33:4005-4006.
- 12 Bohlmann F,Jakupovic J,Robinson H,et al.Diterpenes and other constituents of *Morithamnus*

crassus[J].Phytochemistry,1980,19:2769-2771.

- 13 Liao PY,Zhang YJ,et al.Chemical Composition of *Thymol*[J].Acta Bot Yunnan(云南植物研究),2010,32:183-188.
- 14 Liu MY,Yu LJ,Li YC,et al.Studies on the chemical constituents of *Eupatorium* root and its *in vitro* antibacterial activity[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1905-1909.
- 15 Chen J,Tsai Y,Hwang T,et al.Thymol,benzofuranoid,and phenylpropanoid derivatives:anti-inflammatory constituents from *Eupatorium cannabinum*[J].J Nat Prod,2011,74:1021-1027.
- 16 Pauli L,Tannert R,Scheil R,et al.Asymmetric hydrogenation of furans and benzofurans with iridiumpyridine-phosphinite catalysts[J].Chem Eur J,2015,21:1377-1140.
- 17 Wang WJ,Wang L,Liu Z,et al.Antiviral benzofurans from *Eupatorium chinense*[J].Phytochemistry,2016,122:238-245.
- 18 Zhao XM,Hu RJ.Current status of research on natural alkyne compounds[J].Tianjin Pharm(天津药学),2007,19:60-63.

收稿日期: 2024-03-18 接受日期:

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(20231075023); 天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金项目(2022NPRD03)

*通信作者 Tel: 0717-6397478; E-mail: 18132111292@163.com