

文章编号:1001-6880(2016)12-1915-04

红背山麻杆根中 PTP1B 抑制活性成分研究

冯守爱¹,覃日懂²,韦康¹,李志华¹,陈义昌¹,宁振兴¹,刘绍华^{1*},梁鸿^{2*}¹广西中烟工业有限责任公司技术中心,南宁 530001; ²北京大学药学院天然药物学系,北京 100191

摘要:运用硅胶和凝胶色谱等天然产物分离技术从红背山麻杆根中分离得到9个化合物,结合各化合物物理化性质和光谱数据鉴定其结构,包括6个三萜类成分鲨烯(**1**)、乙酰基本油醇酸(**2**)、木栓酮(**3**)、3-乙酰氧基-12-齐墩果烯-28-酸甲酯(**4**)、马斯里酸(**5**)、马斯里酸甲酯(**6**)和3个甾醇成分 β -谷甾醇(**7**)、 β -谷甾醇-3-O-硬脂酸酯(**8**)、豆甾-4-烯-3,6-二酮(**9**)。化合物**2**、**3**和**7**为首次从该植物中分离得到,其余化合物均为首次从该属植物中分离得到。以体外酶学方法测定化合物PTP1B抑制活性,化合物**2**、**5**、**6**和**8**具有PTP1B抑制活性。

关键词:红背山麻杆;化学成分;三萜;PTP1B

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.011

Study on PTP1B Inhibitory Constituents from *Alchornea trewioides*

FENG Shou-ai¹, QIN Ri-dong², WEI Kang¹, LI Zhi-hua¹, CHEN Yi-chang¹,
NING Zhen-xing¹, LIU Shao-hua^{1*}, LIANG Hong^{2*}¹Technical center of China Tobacco Guangxi Industrial Co. Ltd., Nanning 530001, China;²Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Chemical investigation of the root of *Alchornea trewioides* led to the isolation of 9 compounds by silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography methods, their structures were elucidated as squalene (**1**), acetyl aleuritolic acid (**2**), friedelin (**3**), methyl-3-acetoxy-12-oleanen-28-oate (**4**), maslinic acid (**5**), methyl maslinate (**6**), β -sitosterol (**7**), β -sitosterol-3-O-stearate (**8**), and stigmasta-4-ene-3,6-dione (**9**) on the basis of spectroscopic analyses. Compounds **2**, **3** and **7** were isolated from the plant for the first time, and other compounds were isolated from the genus *Alchornea* for the first time. The PTP1B inhibitory activity was evaluated for the compounds isolated from the plant, compounds **2**, **5**, **6**, and **8** showed PTP1B inhibitory activity.

Key words: *Alchornea trewioides*; chemical constituents; triterpenes; PTP1B

红背山麻杆 [*Alchornea trewioides* (Benth.) Muell. Arg. var. *trewioides*] 为大戟科 (Euphorbiaceae) 山麻杆属 (*Alchornea* Sw.) 植物。山麻杆属植物全世界约有 70 种, 分布于热带、亚热带地区, 我国有 7 种、2 变种, 分布于西南部和秦岭以南热带和温暖带地区^[1]。该属植物主要含有黄酮、生物碱、木脂素、三萜和鞣质等类成分, 有抗菌、抗炎、抗癌、抗肝纤维化和抗氧化等活性。红背山麻杆以根、叶入药, 有解毒、除湿、止血的功效^[2]。2 型糖尿病的特征是胰岛素敏感组织对胰岛素抵抗, 蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶家族中的主要成员, 可以催化信

号分子酪氨酸去磷酸化, 从而使胰岛素受体底物等信号分子的酪氨酸去磷酸化而失活, 在胰岛素信号通路中起着重要的负调控作用, 维持血糖浓度的稳定, 从而发挥控制血糖的作用, 目前, PTP1B 抑制剂已成为胰岛素增敏剂的靶点之一。前期对红背山麻杆提取物进行体外 PTP1B 抑制活性筛选, 乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物有 PTP1B 抑制活性, 在 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 PTP1B 抑制率大于 80%, 因此, 本文对红背山麻杆乙酸乙酯萃取物进行化学成分研究, 在前期工作基础上, 从红背山麻杆乙酸乙酯萃取物中又分离得到 6 个三萜和 3 个甾醇, 其中化合物 **2**、**3** 和 **7** 为首次从该植物中分离得到, 其余化合物均为首次从该属植物中分离得到。对分离得到的化合物进行 PTP1B 抑制活性筛选, 4 个化合物具有 PTP1B 抑制活性, IC_{50} 值在 9.0 ~ 82.3 μM 之间。

1 仪器与材料

¹H NMR 和¹³C NMR 等核磁共振谱由 Bruker AVANCE III 400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标; EI-MS 谱由 Finnigan 公司的 TRACE MS 测定; ESI-TOF-MS 由 AB 公司 QSTAR 质谱仪测定。所用到的试剂均为北京化工厂分析纯产品; 柱色谱用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂产品。Sephadex LH-20 为瑞士 GE Healthcare 公司产品。PTP1B 购自 Sigma 公司; 96 孔培养板(美国 Corning 公司); Victor² 1420 多标记数仪(美国 PE 公司)。

红背山麻杆药材于 2009 年 7 月采自广西柳江县, 由广西中医药研究院覃德海研究员鉴定为大戟科山麻杆属植物红背山麻杆 *Alchornea trewioides* (Benth.) Muell. Arg. var. *trevioides* 的根, 样品保存在北京大学药学院天然药物学系(BMU200907)。

2 实验方法

2.1 提取与分离

红背山麻杆根 11.2 kg, 粉碎, 用 95% 乙醇渗漉提取, 提取液经薄膜蒸发仪浓缩后以水混悬, 依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到乙酸乙酯萃取物(163.0 g)、正丁醇萃取物(181.0 g)和水层浸膏。

乙酸乙酯萃取部分经硅胶柱色谱以氯仿-甲醇(100:1~0:100)梯度洗脱, 经 TLC 检测, 合并相同组分, 得到 5 个流分(E1~E5)。E2 流份经反复硅胶柱色谱以氯仿-甲醇(100:0~0:100)洗脱、Sephadex LH-20 柱色谱以氯仿-甲醇(1:1)洗脱以及 RP-C₁₈ 柱色谱以甲醇-水(0:100~100:0)洗脱, 分别得到化合物 1(6.2 mg)、2(3.5 mg)、3(5.0 mg)、4(7.1 mg); E3 流份经反复硅胶柱色谱以石

乙酸乙酯萃取物(163.0 g)经硅胶柱色谱分离以乙酸乙酯-甲醇(5:0~5:1)梯度洗脱, 经 TLC 检测, 合并相同组分, 得到 9 流份(A1~A9)。A1 流份经硅胶柱色谱以石油醚-乙酸乙酯(10:1~10:6)梯度洗脱, 经 TLC 检测, 合并相同组分, 得到 6 流份(A11~A16)。A11 流份经 Sephadex LH-20 柱色谱纯化以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得到 1(51.0 mg)和 8(33.7 mg)。A12 流份经反复硅胶柱色谱分离以石油醚-乙酸乙酯(25:1)洗脱、Sephadex LH-20 柱色谱分离以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱, 得到 2(16.8 mg)和 4(17.0 mg)。A14 流份经硅胶柱色谱分离以石油醚-丙酮(100:1)洗脱、Sephadex LH-20 柱色谱

分离以甲醇洗脱, 以及二氯甲烷-甲醇重结晶纯化得到 3(4.0 mg)、7(213.5 mg)和 9(12.4 mg)。A15 流份经硅胶柱色谱分离以石油醚-丙酮(10:1~5:1)洗脱、硅胶柱色谱分离以石油醚-乙酸乙酯(1:1)洗脱、Sephadex LH-20 柱色谱纯化以二氯甲烷-甲醇(1:1)洗脱得到 5(30.9 mg)、6(15.1 mg)。

2.2 PTP1B 抑制活性

以 5 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为反应底物, 在 0.01 mol/L NaAc-HAc、pH 5.0、1 mmol/L EDTA 钠盐体系中, 加入人重组 PTP1B 催化域蛋白, 37 °C 反应 15 min 后, 用酶标仪测定 405 nm 下的吸光值。人重组 PTP1B 催化域蛋白活性单位与酶反应前后体系中吸光值的变化(ΔA)呈线性关系。通过测定加入样品后体系中吸光值的变化(ΔA)即可测得样品对 PTP1B 的抑制活性。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 1 无色油状液体。EI-MS *m/z* 410 [M]⁺。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) (δ : 5.08~5.15 (6H, m, 6 × CH = C), 1.97~2.09 (20H, m, 10 × CH₂), 1.68 (6H, s, 2 × CH₃), 1.60 (18H, s, 6 × CH₃)。与鲨烯对照品共薄层, *R_f* 值一致, 以上数据与文献^[3]报道一致, 故鉴定化合物 1 为鲨烯。

化合物 2 白色针晶(氯仿), mp. 288~290 °C。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.53 (1H, dd, *J* = 3.6, 8.0 Hz, H-15), 4.47 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-3), 2.38 (1H, dd, *J* = 8.0, 14.0 Hz, H-16 β), 2.28 (1H, dd, *J* = 2.8, 14.0 Hz, H-16 α), 2.04 (3H, s, COCH₃), 0.95, 0.95, 0.94, 0.92, 0.91, 0.88, 0.85 (各 3H, s, 7 × CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) (δ : 37.4 (C-1), 23.5 (C-2), 80.9 (C-3), 37.7 (C-4), 55.6 (C-5), 17.3 (C-6), 40.7 (C-7), 39.0 (C-8), 49.1 (C-9), 37.9 (C-10), 18.7 (C-11), 33.3 (C-12), 37.3 (C-13), 160.5 (C-14), 116.9 (C-15), 31.3 (C-16), 51.5 (C-17), 41.4 (C-18), 35.3 (C-19), 29.3 (C-20), 33.7 (C-21), 30.6 (C-22), 27.9 (C-23), 16.6 (C-24), 26.2 (C-25), 15.6 (C-26), 22.5 (C-27), 184.4 (C-28), 31.9 (C-29), 28.6 (C-30), 171.0 (COCH₃), 21.3 (COCH₃)。以上数据与文献^[4]报道一致, 故鉴定化合物 2 为乙酰基木油醇酸。

化合物 3 白色针晶(氯仿), EI-MS *m/z* 426 [M]⁺。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 2.38 (1H, ddd,

$J = 12.0, 5.2, 2.0$ Hz, H-4), 2.29 (1H, dd, $J = 12.8, 6.4$ Hz, H-2a), 2.24 (1H, dd, $J = 13.2, 6.2$ Hz, H-2b), 1.18 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-30), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-23), 0.87 (3H, s, H-25), 0.73 (3H, s, H-24)。与木栓酮对照品共薄层, R_f 值一致,以上数据与文献^[5]报道一致,故鉴定化合物**3**为木栓酮。

化合物4 白色针晶(氯仿)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.27 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 4.49 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3 α), 3.62 (3H, s, OCH₃), 2.85 (1H, dd, $J = 13.6, 4.0$ Hz, H-18), 2.04 (3H, s, CH₃CO), 1.12, 0.92, 0.92, 0.89, 0.86, 0.85, 0.72, (各3H, s, 7 \times CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 38.1 (C-1), 23.5 (C-2), 80.9 (C-3), 37.7 (C-4), 55.3 (C-5), 18.2 (C-6), 32.6 (C-7), 39.3 (C-8), 47.5 (C-9), 36.9 (C-10), 23.0 (C-11), 122.3 (C-12), 143.8 (C-13), 41.3 (C-14), 28.0 (C-15), 23.4 (C-16), 46.7 (C-17), 41.6 (C-18), 45.8 (C-19), 30.6 (C-20), 33.8 (C-21), 32.4 (C-22), 28.0 (C-23), 16.6 (C-24), 15.3 (C-25), 16.8 (C-26), 25.8 (C-27), 178.2 (C-28), 23.6 (C-29), 33.1 (C-30), 170.9 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 51.4 (OCH₃)。以上数据与文献^[6]报道一致,故鉴定化合物**4**为3-乙酰氧基-12-齐墩果烯-28酸甲酯。

化合物5 白色粉末,mp 290~291 °C。ESI-MS m/z 474 [M-H]⁻。 ^1H NMR (400 MHz, pyridine-d₅) δ : 5.45 (1H, br s, H-12), 4.08 (1H, m, H-2 β), 3.36 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3 α), 3.27 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-18), 1.25, 1.25, 1.06, 1.00, 0.99, 0.97, 0.93, (各3H, s, 7 \times CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, pyridine-d₅) δ : 48.2 (C-1), 69.1 (C-2), 84.3 (C-3), 40.3 (C-4), 56.4 (C-5), 19.4 (C-6), 33.8 (C-7), 40.4 (C-8), 48.7 (C-9), 39.1 (C-10), 24.2 (C-11), 123.0 (C-12), 145.4 (C-13), 42.7 (C-14), 28.8 (C-15), 24.4 (C-16), 47.2 (C-17), 42.5 (C-18), 47.0 (C-19), 31.5 (C-20), 34.7 (C-21), 33.7 (C-22), 29.9 (C-23), 18.2 (C-24), 17.4 (C-25), 18.0 (C-26), 26.7 (C-27), 180.7 (C-28), 33.7 (C-29), 24.3 (C-30)。以上数据与文献^[7]报道一致,故鉴定化合物**5**为马斯里酸。

化合物6 白色针晶(氯仿)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.30 (1H, br s, H-12), 3.70 (1H, m,

H-2 β), 3.64 (3H, s, OCH₃), 3.02 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3 α), 2.87 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-18), 1.15, 1.05, 1.00, 0.94, 0.92, 0.84, 0.74 (各3H, s, 7 \times CH₃)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 46.4 (C-1), 69.0 (C-2), 84.0 (C-3), 39.4 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 32.6 (C-7), 39.2 (C-8), 47.6 (C-9), 38.3 (C-10), 23.1 (C-11), 122.2 (C-12), 143.9 (C-13), 41.7 (C-14), 27.7 (C-15), 23.5 (C-16), 46.7 (C-17), 41.3 (C-18), 45.9 (C-19), 30.7 (C-20), 33.9 (C-21), 32.4 (C-22), 28.6 (C-23), 16.9 (C-24), 16.7 (C-25), 16.6 (C-26), 26.0 (C-27), 178.3 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), 51.5 (OCH₃)。其数据与文献^[8]报道一致,鉴定为马斯里酸甲酯。

化合物7 白色针状结晶。与 β -谷甾醇对照品共薄层对照, R_f 值一致,鉴定为 β -谷甾醇。

化合物8 白色结晶,mp. 79~80 °C。EI-MS m/z : 397 [M-CH₃(CH₂)₁₆COO]⁺, 382, 367, 339, 288, 255, 213。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.36 (1H, m, H-6), 4.61 (1H, m, H-3), 1.25 (28H, br s, 14 \times CH₂), 1.02 (3H, s, CH₃), 0.80~0.93 (15H, 5 \times CH₃), 0.68 (3H, s, CH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 173.3 (RCOO), 33.9, 31.9, 29.1~29.7 (多), 25.1, 22.7, 14.1, 与硬脂酸数据吻合。此外,尚有 C₁~C₂₉ δ : 37.0, 31.9, 73.7, 42.3, 139.7, 122.6, 31.9, 34.7, 50.0, 36.6, 21.0, 38.2, 45.8, 56.7, 24.3, 26.1, 56.0, 14.1, 19.8, 34.7, 19.0, 36.1, 23.0, 39.7, 28.2, 19.3, 18.8, 27.8, 11.8, 与 β -谷甾醇吻合。2 mol/L HCl 加热水解,水解产物中检出 β -谷甾醇和硬脂酸(与对照品共薄层, R_f 值一致),其数据与文献^[9]报道数据一致,鉴定为 β -谷甾醇-3-O-硬脂酸酯。

化合物9 淡黄色片状结晶(氯仿),mp. 165~166 °C。EI-MS m/z 426 [M]⁺。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.17 (1H, s, H-4), 1.16 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.85 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-29), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.73 (3H, s, H-18)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 35.5 (C-1), 33.8 (C-2), 199.4 (C-3), 125.4 (C-4), 161.0 (C-5), 202.2 (C-6), 46.8 (C-7), 39.1 (C-8), 51.0 (C-9), 33.9 (C-10), 20.9 (C-11), 39.8 (C-12), 42.5 (C-13), 55.8 (C-14), 23.9 (C-15), 28.0 (C-16), 56.5 (C-17), 12.0 (C-18), 17.5 (C-19), 36.0 (C-20), 18.7 (C-

21), 34.2(C-22), 26.0(C-23), 45.8(C-24), 29.1(C-25), 19.8(C-26), 19.0(C-27), 23.1(C-28), 11.9(C-29)。以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物9为豆甾-4-烯-3,6-二酮。

3.2 PTP1B 抑制活性

红背山麻杆乙酸乙酯萃取物有PTP1B抑制活性,在25.0 μg/mL时PTP1B抑制率大于80%,因此,对从乙酸乙酯萃取物中分离得到的6个三萜和3个甾醇进行PTP1B抑制活性筛选,结果表明,化合物2、5、6和8有PTP1B抑制活性,IC₅₀值分别为12.5 μM、9.0 μM、82.3 μM和66.2 μM,阳性对照药Na₃VO₄ IC₅₀值为4.0 μM。

4 结论

从红背山麻杆根中分离得到9个化合物,包括6个三萜类成分和3个甾醇成分,4个化合物显示PTP1B抑制活性。化合物2和5为五环三萜,28位羧基游离,PTP1B抑制活性比较好,化合物6活性比化合物5弱,可能是因为28位羧基甲酯化,文献报道齐墩果酸具有很强的PTP1B抑制活性,本文报道的活性结果与文献是一致的。本文研究结果丰富了红背山麻杆化学成分及生物活性研究内容,为红背山麻杆的进一步研究提供了参考资料。

参考文献

- Flora of China Editorial Committee(中国植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 1996, Vol 44(2), 66.
- Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Chinese Dictionary(中药大辞典). Shanghai: Shanghai Science and

Technology Press, 1977. Vol 1, 1005.

- Zhang Y(张炎), Deng ZW(邓志威), Gao TX(高天翔), et al. Chemical constituents from the mangrove plant *Ceriops tagal*. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2005, 40: 935-939.
- Ma M(马明), Wang SJ(王素娟), Li S(李帅), et al. Triterpenes with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity from *Macaranga adenantha*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37: 1128-1131.
- Yang J(杨娟), Lou FM(娄方明), Niu YK(牛煜坤). Studies on chemical constituents of *Helwingia chinensis*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32: 1416-1417.
- Yang SM(杨淑敏), Liu XK(刘锡葵), Qing C(卿晨), et al. Chemical constituents from the roots of *Homonoia riparia*. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2007, 42: 292-296.
- Ju JH(鞠建华), Zhou L(周亮), Lin G(林耕), et al. Studies on constituents of triterpene acids from *Eriobotrya japonica* and their anti-inflammatory and antitussive effects. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2003, 38: 752-757.
- Seo S, Tomita Y, Tori K. Biosynthesis of oleanene- and ursene-type triterpenes from [4-13C] mevalonolactone and [1,2-13C₂] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara. *J Am Chem Soc*, 1981, 103: 2075-2080.
- Cai LN(蔡立宁), Wang HS(王红妹), Cao HX(曹红兴), et al. The constituents from the rhizome of *Alisma orientalis* (SAM) JUZEP. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 1996, 8: 5-9.
- Gao XZ(高晓忠), Zhou CX(周长新), Zhang SL(张水利), et al. Studies on the chemical constituents in herb of *Ranunculus sceleratus*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30: 124-125.

(上接第1895页)

- Ma J, Xu H, Wu J, et al. Linalool inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting NF-κB activation. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29: 708-713.
- Shahid A, Ali R, Ali N, et al. Attenuation of genotoxicity, oxidative stress, apoptosis and inflammation by rutin in benzo(a)pyrene exposed lungs of mice: plausible role of NF-κB,

TNF-α and Bcl-2. *J Complement Integr Med*, 2016, 13: 17-29.

- Chi G, Wei M, Xie X, et al. Suppression of MAPK and NF-κB pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation*, 2013, 36: 501-511.