

• 化学成分 •

枸杞子中 1 个新的环香叶烷类单萜

张文静¹, 范雨欣¹, 胡梦雅¹, 刘云¹, 王小兰¹, 孙彦君^{1,2}, 李孟^{1,2}, 郭涛¹, 冯卫生^{1,2}, 陈辉^{1,2*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 研究宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 果实(枸杞子)正丁醇部位的化学成分。方法 运用 D101 大孔吸附树脂、硅胶、ODS 和 Sephadex LH-20 等柱色谱以及反相制备型 HPLC 等各种现代色谱分离技术进行系统的分离纯化, 根据化合物的光谱数据和理化性质进行结构鉴定。结果 从枸杞子正丁醇部位中分离得到 11 个化合物, 分别鉴定为 (3*S*,5*R*)-allenic ketodiol 5-*O*- β -*D*-glucosyl-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-glucoside (1)、citroside B (2)、alanganoside D (3)、turpinionoside D (4)、菝葜亭-7-*O*- β -*D*-木糖基-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 (5)、2-苯乙醇- β -*D*-葡萄糖苷 (6)、2-苯乙醇- β -纤维二糖苷 (7)、tuberoid A (8)、对羟基肉桂酸 (9)、3-甲氧基-4-羟基苯丙酸 (10)、阿魏酸 (11)。结论 化合物 1 为 1 个新的环香叶烷类单萜, 命名为柑橘苷 C。化合物 2 和 3 为首次从枸杞属植物中分离得到。体外降血糖活性实验表明, 化合物 1 和 4 在浓度 10.0 μ mol/L 时, 可以增加胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量。

关键词: 枸杞子; 柑橘苷 C; citroside B; turpinionoside D; 菝葜亭-7-*O*- β -*D*-木糖基-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷; 2-苯乙醇- β -*D*-葡萄糖苷; 胰岛素抵抗; 降血糖活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6653-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.001

A new cyclogeraniene monoterpene from fruits of *Lycium barbarum*

ZHANG Wen-jing¹, FAN Yu-xin¹, HU Meng-ya¹, LIU Yun¹, WANG Xiao-lan¹, SUN Yan-jun^{1,2}, LI Meng^{1,2}, GUO Tao¹, FENG Wei-sheng^{1,2}, CHEN Hui^{1,2}

1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-construction by Henan Province & Ministry of Education, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To isolate and identify the chemical constituents from the *n*-butanol part of the fruits of *Lycium barbarum*.

Methods The compounds were isolated and purified by various modern chromatographies, and their structures were identified by physicochemical properties and spectroscopic data. **Results** Eleven compounds were isolated from the *n*-butanol part of the fruits of *L. barbarum*, and elucidated as (3*S*, 5*R*)-allenic ketodiol 5-*O*- β -*D*-glucosyl-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-glucoside (1), citroside B (2), alanganoside D (3), turpinionoside D (4), scopoletin 7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside (5), 2-phenylethyl- β -*D*-glucoside (6), 2-phenylethyl β -cellobioside (7), tuberoid A (8), *p*-hydroxycinnamic acid (9), 3-methoxy-4-hydroxyphenylpropionic acid (10) and ferulic acid (11). **Conclusion** Compound 1 is a new cyclogeraniene monoterpene, named citroside C. Compounds 2 and 3 are isolated from *Lycium* genus for the first time. Compounds 1 and 4 could increase the glucose consumption in insulin-resistant HepG2 cells at a concentration of 10.0 μ mol/L.

Key words: fruits of *Lycium barbarum* L.; citroside C; citroside B; turpinionoside D; scopoletin 7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside; 2-phenylethyl- β -*D*-glucoside; insulin resistance; hypoglycemic activity

收稿日期: 2022-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22177027); 国家自然科学基金资助项目 (81860687)

作者简介: 张文静 (1998—), 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: 1787539013@qq.com

*通信作者: 陈辉 (1981—), 硕士研究生导师, 教授, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: chenhuixy@hactcm.edu.cn

枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实, 主要分布在我国宁夏、甘肃、新疆、青海等地区^[1-2]。始载于《神农本草经》, 被列为上品, 其味甘, 性平, 归肝、肾经, 具有滋补肝肾、益精明目之功效^[1]。枸杞子是传统的药食两用类名贵药材和滋补食品, 已被开发成多种产品^[3]。现代药理实验研究表明, 枸杞子具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、保肝、神经保护等重要药理作用^[4]。化学成分研究表明, 枸杞子中主要含有多糖、生物碱、黄酮、木脂素、萜类等成分^[5]。本课题组前期已对枸杞子醋酸乙酯部位的化学成分进行了初步研究^[6-7], 为进一步丰富枸杞子化学成分的研究, 完善其药效物质基础, 本实验继续对枸杞子正丁醇部位进行化学成分研究, 共分离鉴定了 11 个化合物, 其结构分别鉴定为 (3*S*, 5*R*)-allenic ketodiol 5-*O*- β -*D*-glucosyl-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-glucoside (**1**)、citroside B (**2**)、alangionoside D (**3**)、turpinionoside D (**4**)、菝葜亭-7-*O*- β -*D*-木糖基-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷 [scopoletin 7-*O*- β -*D*-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranoside, **5**]、2-苯乙醇- β -*D*-葡萄糖苷 (2-phenylethyl- β -*D*-glucoside, **6**)、2-苯乙醇- β -纤维二糖苷 (2-phenylethyl β -cellobioside, **7**)、tuberoid A (**8**)、对羟基肉桂酸 (*p*-hydroxycinnamic acid, **9**) (**10**)、3-甲氧基-4-羟基苯丙酸 (3-methoxy-4-hydroxyphenylpropionic acid, **10**)、阿魏酸 (ferulic acid, **11**)。其中化合物 **1** 为 1 个新化合物, 命名为柑橘苷 C。化合物 **2** 和 **3** 为首次从枸杞属植物中分离得到。体外降糖活性测试结果表明化合物 **1** 和 **4** 在浓度 10.0 μ mol/L 时, 可以增加胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量, 具有一定的降糖活性。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪、Bruker maxis HD 型飞行时间质谱 (德国, Bruker 公司); Autopol IV 全自动旋光仪 (美国, 鲁道夫公司); Chirascan q CD 光谱仪 (英国应用光物理公司); LC52 型高压制备液相色谱仪 (赛谱锐思北京科技有限公司, SP-5030 型半制备型高压输液泵, UV200 型紫外检测器, Easychrom 型色谱工作站; YMC-Pack ODS-A 色谱柱, 250 mm \times 20 mm, 5 μ m)。薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司); RP-C₁₈ (40~60 μ m, YMC); 大孔树脂 D101; 甲醇, 色谱纯 (天津市四友精细化学品

有限公司); 其他试剂均为分析级; 罗格列酮 (批号 17825A, 北京伊诺凯科技有限公司)。

人肝癌 HepG2 细胞购于中国科学院上海细胞库。

枸杞子于 2017 年 9 月采自青海省格尔木市, 经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定为茄科枸杞属植物宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的干燥成熟果实。凭证样本 (20170906A) 存放于河南中医药大学中药化学研究室。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥枸杞子药材 50 kg, 95% 乙醇回流提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩, 得浸膏 32.58 kg。浸膏加水混悬, 经大孔吸附树脂 D101 柱色谱分离, 依次用水、95% 乙醇、丙酮进行洗脱, 得到水洗脱部位 30 kg、95% 乙醇洗脱部位 1336 g、丙酮洗脱部位 52.5 g。95% 乙醇洗脱部位加水混悬, 依次用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 减压回收溶剂, 得醋酸乙酯部位 (183 g)、正丁醇部位 (386 g)。正丁醇部位经大孔吸附树脂柱色谱分离, 依次用乙醇-水 (0~95% 乙醇) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 (Fr. A~E)。Fr. D (168 g, 30% 乙醇-水洗脱部位) 经 MCI 柱色谱分离, 依次用甲醇-水 (10%~100%) 梯度洗脱, 得到 6 个亚组分 (Fr. D-1~D-6)。Fr. D-4 (40% 甲醇洗脱部位, 1.93 g) 经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇 (80:1 \rightarrow 0:1) 洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. D-4-1~D-4-6)。Fr. D-4-3 经制备型 HPLC 制备 (甲醇-水 40%) 得化合物 **9** (78.34 mg, $t_R = 23.0$ min)、**10** (6.84 mg, $t_R = 21.0$ min)。Fr. D-3 (30% 甲醇洗脱部位, 14.79 g) 经 ODS 柱色谱分离依次用甲醇-水 (5%~100%) 梯度洗脱, 得到 8 个流分 (Fr. D-3-1~D-3-8)。Fr. D-3-2 (10% 甲醇洗脱部位, 1.03 g) 经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇 (80:1 \rightarrow 0:1) 洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. D-3-2-1~D-3-2-6)。Fr. D-3-2-5 经制备型 HPLC 制备 (乙腈-水 12%) 得化合物 **5** (2.16 mg, $t_R = 18.0$ min)、**8** (3.34 mg, $t_R = 24.0$ min)。Fr. D-3-3 (15% 甲醇洗脱部位, 3.75 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离得 4 个流分 (Fr. D-3-3-1~D-3-3-4)。Fr. D-3-3-3 经制备型 HPLC 制备 (甲醇-水 25%) 得化合物 **11** (10.78 mg, $t_R = 34.0$ min)。Fr. D-3-3-2 经制备型 HPLC 制备 (甲醇-水 20%) 得化合物 **7** (5.79 mg, $t_R = 27.0$ min)、**6** (5.72 mg, $t_R = 16.0$ min)。Fr. D-3-4 (20% 甲醇洗脱部位, 5.89 g) 经硅胶柱色谱分离, 依次用二氯甲烷-甲醇

(80:1→0:1)洗脱,得到8个流分(Fr. D-3-4-1~D-3-4-8)。Fr. D-3-4-5经制备型HPLC制备(乙腈-水13%)得化合物**1**(2.13 mg, $t_R = 25.0$ min)、**2**(2.19 mg, $t_R = 24.0$ min)。Fr. D-3-4-6经制备型HPLC制备(乙腈-水10%)得化合物**3**(3.23 mg, $t_R = 15.0$ min)、**4**(2.99 mg, $t_R = 14.0$ min)。

2.2 化合物**1**的酸水解及糖的鉴定

化合物**1**(1.5 mg)溶于5 mL 2.0 mol/L 盐酸-甲醇溶液中,90 °C水浴搅拌反应2 h。水解产物用氮气吹干后,以醋酸乙酯和水进行萃取。水相以AgCO₃中和多余的酸后,浓缩干燥得糖部分,分别加入1 mL 吡啶、2 mg L-半胱氨酸乙酯盐酸盐,密闭60 °C搅拌1 h,然后加入0.2 mL 三甲基硅咪唑,密闭60 °C后再加热0.5 h,以正己烷和水萃取。正己烷萃取物经气相色谱分析[美国Finnigan TSQ7000型气相色谱仪,FID检测器,DB-5毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)]。通过和标准糖的衍生物进行比较,从水解产物糖部分鉴定出β-D-葡萄糖($t_R = 19.8$ min)。

2.3 细胞培养

HepG2细胞用含10% FBS的DMEM培养液培养,放置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。根据细胞生长状况,待细胞融合度为80%时,用0.25%的胰蛋白酶消化收集细胞并传代,取对数生长期的细胞用于实验。

2.4 CCK-8实验检测化合物对HepG2细胞活性的影响

取生长状态良好,融合度为90%的HepG2细胞,以5×10⁴/mL接种于96孔板上,每孔100 μL细胞悬液,于37 °C、5% CO₂培养箱中,用含10% FBS的DMEM培养液培养4 h。待细胞贴壁后,弃去原培养液,加入无血清培养液,培养24 h。同步化后,弃去原培养液,加入配制好的药物100 μL(10 μmol/L),同时设置不含药物、含培养液和细胞的对照组,干预24 h。24 h后弃去原培养液,加含10% CCK-8的培养液100 μL,设置空白组(不含细胞,只含10% CCK-8的培养液),在37 °C、5% CO₂培养箱中孵育1 h后,用酶标仪检测其在450 nm处的吸光度(A)值。实验每组设置3个复孔,重复3次,根据A值计算各组细胞相对活性。

$$\text{细胞相对活性} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 HepG2细胞胰岛素抵抗模型的制备和葡萄糖消耗量的检测

参照文献方法^[8-9],采用高浓度胰岛素诱导制备

HepG2细胞胰岛素抵抗模型,选取处于对数生长期的HepG2细胞,以5×10⁴/mL接种于96孔板上,每孔100 μL细胞悬液,于37 °C、5% CO₂培养箱中至贴壁,待细胞贴壁后,弃去原培养液,加入含1 μmol/L胰岛素的培养基诱导培养36 h,制备HepG2细胞胰岛素抵抗模型。造模成功后,设对照组、模型组、阳性药罗格列酮组和各化合物组,并设空白组。阳性药罗格列酮组和各化合物组均加入10 μmol/L的含药培养基。药物干预24 h后,再加含100 nmol/L胰岛素培养30 min,干预结束后吸取各孔上清,用于葡萄糖检测。葡萄糖含量采用葡萄糖测定试剂盒检测。实验每组设置3个复孔,重复3次。

$$\text{葡萄糖消耗量} = \text{培养液中葡萄糖含量} - \text{细胞上清液中葡萄糖含量}$$

2.6 ECD计算

化合物**1**的绝对构型是通过TDDFT ECD计算与实验ECD对比来确定的。将化合物**1**昔元的构象导入Gaussview 6.0.16软件中的MMFF94s程序,使用10 kcal/mol(1 kcal/mol=4.18 kJ/mol)的能量窗进行构象搜索。对搜索出来的优势构象使用Gaussian 16软件进行优化B3LYP/6-31G(d,p),优化后的构象在B3LYP/6-31G(d,p)水平下以甲醇为溶剂进行ECD计算,然后在SpecDis 1701软件中对ECD计算结果进行拟合。

3 结构鉴定

化合物**1**:白色粉末,易溶于甲醇,[α]_D²⁰+17.2°(c 0.02, MeOH)。UV显示该化合物在甲醇溶液中的最大吸收为204、229、281 nm。IR光谱显示有羟基(3387 cm⁻¹)和羰基(1668 cm⁻¹)的吸收。HR-ESI-MS谱给出准分子离子峰m/z 547.237 7[M-H]⁻(计算值为547.238 5),确定化合物**1**的分子式为C₂₅H₄₀O₁₃。¹H-NMR谱中(表1),显示有1个末端烯烃质子信号[δ_H 5.92(1H, s, H-8)];2个糖端基质子信号[δ_H 4.62(1H, d, J=7.8 Hz, H-1'), 4.54(1H, d, J=7.8 Hz, H-1'')];1个连氧次甲基质子信号[δ_H 4.39(1H, m, H-3)];2个亚甲基质子信号[δ_H 1.89(1H, m, H-2a), 1.29(1H, m, H-2b), 2.50(1H, m, H-4a), 1.27(1H, m, H-4b)];4个甲基质子信号[δ_H 2.27(3H, s, H-10), 1.45(6H, s, H-12, 13), 1.13(3H, s, H-11)]。分析¹³C-NMR及DEPT谱可知,该化合物存在25个碳原子,包括1个羰基碳[δ_C 212.9(C-9)];3个烯烃碳[δ_C 119.5(C-6), 202.0(C-7), 101.6(C-8)];2个饱和季碳[δ_C 37.0(C-1), 79.7(C-5)];1

个次甲基 [δ_C 63.7 (C-3)]; 2 个亚甲基 [δ_C 46.3 (C-4), 49.9 (C-2)]; 4 个甲基 [δ_C 27.2 (C-10), 27.5 (C-13), 29.6 (C-12), 32.7 (C-11)]。除去以上碳信号, 化合物 **1** 的结构中还剩 12 个碳信号, 进一步结合 ^1H - ^1H COSY、HSQC 和 HMBC 谱的相关信号(图 1),

表 1 化合物 **1** 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 波谱数据 (500/125 MHz, CD_3OD)

Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound **1** (500/125 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	DEPT
1		37.0	C
2	1.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.29 (1H, m)	49.9	CH_2
3	4.39 (1H, m)	63.7	CH
4	2.50 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 1.27 (1H, m)	46.3	CH_2
5		79.7	C
6		119.5	C
7		202.0	C
8	5.92 (1H, s)	101.6	CH
9		212.9	C
10	2.27 (3H, s)	27.2	CH_3
11	1.13 (3H, s)	32.7	CH_3
12	1.45 (6H, s)	29.6	CH_3
13	1.45 (6H, s)	27.5	CH_3
1'	4.62 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	98.0	CH
2'	3.27 (1H, m)	74.5	CH
3'	3.54 (1H, m)	89.0	CH
4'	3.37 (1H, m)	70.0	CH
5'	3.37 (1H, m)	77.4	CH
6'	3.88 (1H, dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz), 3.65 (1H, m)	62.6	CH_2
1''	4.54 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	105.3	CH
2''	3.27 (1H, m)	75.4	CH
3''	3.37 (1H, m)	78.2	CH
4''	3.37 (1H, m)	71.6	CH
5''	3.27 (1H, m)	77.8	CH
6''	3.81 (1H, dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz), 3.62 (1H, m)	62.6	CH_2

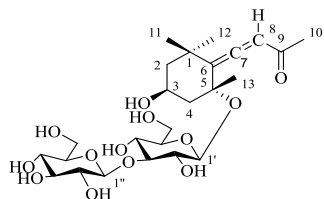


图 1 化合物 **1** 的结构

Fig. 1 Structure of compound **1**

推测这 12 个碳信号为 2 个糖基上的碳信号。以上信号信息提示化合物 **1** 为 1 个环香叶烷型单萜苷类化合物。

化合物 **1** 的氢谱和碳谱数据与已知化合物 citroside **B** 比较相似^[10], 主要区别在于化合物 **1** 比 citroside **B** 多出 1 组葡萄糖基信号。在 HMBC 图谱中, 葡萄糖基的端基氢 H-1' (δ_{H} 4.62) 与苷元的 C-5 位有明显远程相关信号, 说明葡萄糖基连接在 5 位碳上。另 1 个葡萄糖基的端基氢 H-1'' (δ_{H} 4.54) 与 C-3' 有相关, 证实 2 个葡萄糖基的连接方式是 1 \rightarrow 3 连接。进一步通过 ^1H - ^1H COSY、HMBC 谱(图 2)证实了化合物 **1** 的平面结构如图 1 所示。根据 2 个葡萄糖基端基质子的偶合常数 ($J_{\text{H-1}'} = 7.8$ Hz, $J_{\text{H-1}''} = 7.8$ Hz) 可确定其相对构型均为 β 构型。对化合物 **1** 进行酸水解和衍生化气相色谱分析, 确定化合物 **1** 中的 2 个葡萄糖基均为 β -D-葡萄糖。ROESY 谱中, 发现 H-8 与 H-13 有 NOE 相关, 而 H-8 与 H-3 无 NOE 相关, 说明 H-8 与 H-13 位于同侧, H-3 与 H-8 位于异侧, 由此可判断 3-OH/H-13/H-8 空间取向一致, 为 β 构型。由于化合物 **1** 的类似物 citroside **A**、citroside **B** 及其苷元化合物 allenic ketodiol 文献报道较早^[10-11], 且无 ECD 数据, 无法通过比较二者的 ECD 确定其绝对构型, 因此有必要通过计算 ECD 和实验 ECD 比较来确定化合物 **1** 的绝对构型。考虑到化合物 **1** 中的糖基部分对其 Cotton 效应并无贡献, 本实验对化合物 **1** 的苷元部分进行了 ECD 计算。在化合物 **1** 的实验 ECD 谱中, 可以观察到在 200~250 nm 处出现正 Cotton 效应, 在 250~300 nm 处出现负 Cotton 效应, 这一结果与 3*S*, 5*R* 构型的计算 ECD 曲线吻合(图 3), 因此确定化合物 **1** 苷元部分的绝对构型为 3*S*, 5*R*。综上所述, 化合物 **1** 鉴定为 (3*S*, 5*R*)-allenic ketodiol 5-*O*- β -D-glucosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucoside(图 1), 命名为柑橘苷 **C**, 为 1 个新的环香叶烷类化合物。

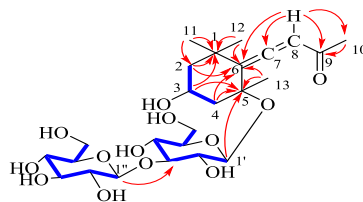


图 2 化合物 **1** 的关键 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关

Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound **1**

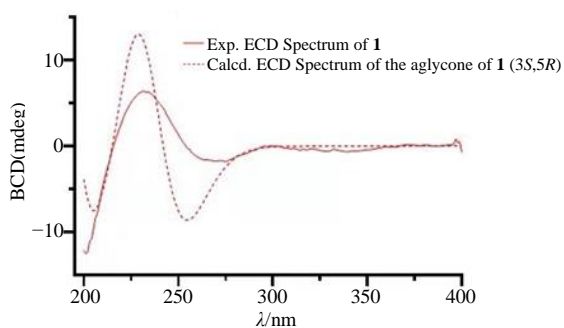


图3 化合物1的实验ECD和化合物1苷元的计算ECD谱
Fig. 3 Experimental ECD spectrum of compound 1 and calculated ECD spectrum of aglycone of compound 1

化合物2: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 409 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 5.94 (1H, s, H-8), 4.57 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.37 (1H, m, H-3), 3.81 (1H, dd, $J = 11.8, 2.0$ Hz, H-6'a), 3.64 (1H, dd, $J = 11.8, 5.0$ Hz, H-6'b), 3.37 (1H, m, H-3'), 3.29 (2H, m, H-4', 5'), 3.16 (1H, m, H-2'), 2.50 (1H, m, H-4a), 2.29 (3H, s, H-10), 1.90 (1H, m, H-2a), 1.46 (6H, s, H-12, 13), 1.31 (1H, m, H-2b), 1.27 (1H, m, H-4b), 1.14 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 212.9 (C-9), 202.0 (C-7), 119.4 (C-6), 101.5 (C-8), 98.4 (C-1'), 79.4 (C-3'), 78.7 (C-5), 77.7 (C-5'), 75.3 (C-2'), 71.5 (C-4'), 63.7 (C-6'), 62.7 (C-3), 49.8 (C-2), 46.8 (C-4), 36.9 (C-1), 32.7 (C-13), 29.8 (C-12), 27.4 (C-11), 27.2 (C-10)。ECD谱中, 在200~250 nm处显示正 Cotton 效应, 在250~300 nm处显示负 Cotton 效应, 与化合物1一致, 表明化合物2的绝对构型为3*S*, 5*R*, 以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物2为 citroside B。

化合物3: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 411 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.02 (1H, dd, $J = 16.0, 1.0$ Hz, H-7), 5.49 (1H, dd, $J = 16.0, 6.1$ Hz, H-8), 4.57 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.30 (1H, m, H-9), 3.99 (1H, qd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, H-4), 3.86 (1H, dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz, H-6'b), 3.83 (1H, ddd, $J = 13.0, 7.5, 3.5$ Hz, H-3), 3.68 (1H, dd, $J = 11.9, 5.1$ Hz, H-6'a), 3.36 (1H, m, H-3'), 3.21 (1H, dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, H-2'), 1.98 (1H, dd, $J = 13.0, 3.5$ Hz, H-2a), 1.75 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-13), 1.55 (1H, t, $J = 12.8$ Hz, H-2b), 1.26 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.09 (3H, s, H-12), 1.02 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 141.1 (C-6), 140.6 (C-8), 129.6 (C-5), 126.9 (C-7), 105.3 (C-1'), 81.9 (C-3), 78.1 (C-5'), 77.9

(C-3'), 76.9 (C-2'), 75.6 (C-4), 71.6 (C-4'), 69.4 (C-9), 62.7 (C-6'), 44.8 (C-2), 37.6 (C-1), 30.6 (C-12), 28.0 (C-11), 23.9 (C-10), 16.9 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物3为 alangionside D。

化合物4: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 413 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 4.57 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.94 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-4), 3.84 (1H, dt, $J = 13.0, 3.9$ Hz, H-3), 3.78 (1H, dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz, H-6'b), 3.73 (1H, dd, $J = 11.9, 5.1$ Hz, H-6'a), 3.68 (1H, m, H-9), 3.37 (1H, m, H-3'), 3.23 (1H, m, H-2'), 2.14 (1H, m, H-7a), 2.04 (1H, m, H-7b), 1.94 (1H, m, H-2a), 1.72 (3H, s, H-13), 1.52 (3H, m, H-2b, 8), 1.19 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.10 (3H, s, H-11), 1.07 (3H, s, H-12); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 141.7 (C-6), 128.7 (C-5), 105.3 (C-1'), 82.2 (C-3'), 78.1 (C-5'), 77.9 (C-3), 76.8 (C-2'), 75.6 (C-4'), 71.6 (C-4), 69.2 (C-9), 62.7 (C-6'), 40.0 (C-2), 40.1 (C-8), 38.6 (C-1), 30.3 (C-12), 28.1 (C-11), 26.1 (C-7), 23.3 (C-10), 15.0 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物4为 turpinionside D。

化合物5: 白色粉末。ESI-MS m/z : 509 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.96 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.30 (1H, s, H-5), 7.20 (1H, s, H-8), 6.33 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 5.36 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, OH), 5.18 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, OH), 5.11 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, OH), 5.10 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 4.89 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, OH), 4.84 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, OH), 4.80 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, OH), 4.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd, $J = 13.6, 4.4$ Hz, H-6'), 3.82 (3H, s, 6-OCH₃), 3.68 (1H, dd, $J = 12.0, 8.0$ Hz, H-5''), 3.61 (2H, dd, $J = 12.4, 4.4$ Hz, H-5', 6'), 3.28 (4H, m, H-2'~4', 4''), 3.05 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3''), 2.96 (2H, m, H-2'', 5''); ^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 160.5 (C-2), 149.8 (C-7), 148.9 (C-9), 146.0 (C-6), 144.1 (C-4), 113.4 (C-3), 112.3 (C-10), 109.7 (C-5), 104.0 (C-1''), 103.0 (C-8), 99.5 (C-1'), 76.6 (C-3', 3''), 75.3 (C-5'), 73.3 (C-2''), 73.00 (C-2'), 69.4 (C-4''), 69.2 (C-4'), 68.2 (C-6'), 65.6 (C-5''), 56.0 (6-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物5为 莨菪亭-7-*O*- β -*D*-木糖基-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物6: 黄色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 307 $[M+Na]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.27 (4H, m, H-2, 3, 5, 6), 7.18 (1H, m, H-4), 4.31 (1H, d,

$J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.10 (1H, m, H-8a), 3.87 (1H, dd, $J = 11.9, 1.7$ Hz, H-6'b), 3.77 (1H, m, H-8b), 3.67 (1H, dd, $J = 11.9, 5.3$ Hz, H-6'a), 3.35 (1H, dd, $J = 14.9, 5.9$ Hz, H-3'), 3.27 (2H, m, H-4', 5'), 3.20 (1H, dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, H-2'), 2.94 (2H, m, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 140.9 (C-1), 130.9 (C-2, 6), 130.2 (C-3, 5), 128.1 (C-4), 105.2 (C-1'), 79.0 (C-3'), 78.8 (C-5'), 76.0 (C-2'), 72.6 (C-8), 72.5 (C-4'), 63.6 (C-6'), 38.1 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为 2-苯乙醇- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **7**: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 469 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.30 (4H, m, H-2, 3, 5, 6), 7.20 (1H, m, H-4), 4.44 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.10 (1H, dt, $J = 9.7, 7.8$ Hz, H-8b), 3.90 (3H, m, H-6'', 6'b), 3.77 (1H, dt, $J = 9.7, 7.8$ Hz, H-8a), 3.69 (1H, dd, $J = 11.9, 6.3$ Hz, H-6'a), 3.56 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4'), 3.50 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3'), 3.40 (1H, m, H-5'), 3.35 (3H, m, H-3'', 4'', 5''), 3.26 (1H, dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz, H-2'), 3.23 (1H, dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz, H-2''), 2.94 (2H, m, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 140.9 (C-1), 130.9 (C-2, 6), 130.2 (C-3, 5), 128.1 (C-4), 105.5 (C-1''), 105.1 (C-1'), 81.6 (C-4'), 79.0 (C-5''), 78.7 (C-3''), 77.3 (C-5'), 77.3 (C-3'), 75.8 (C-2''), 75.7 (C-2'), 72.6 (C-8), 72.2 (C-4''), 63.3 (C-6''), 62.7 (C-6'), 38.1 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **7** 为 2-苯乙醇- β -纤维素二糖苷。

化合物 **8**: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 541 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.24 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 7.12 (1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, H-6), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.43 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.74 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.62 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃), 3.89 (1H, m, H-3'), 3.83 (2H, m, H-6''), 3.73 (2H, m, H-6'), 3.72 (1H, m, H-2'), 3.66 (1H, m, H-4'), 3.65 (1H, m, H-5''), 3.41 (1H, m, H-4''), 3.31 (1H, m, H-3''), 3.21 (1H, m, H-2''), 3.20 (1H, m, H-5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 168.5 (C-9), 151.8 (C-3), 150.3 (C-4), 148.9 (C-7), 128.5 (C-1), 125.3 (C-6), 117.4 (C-5), 115.8 (C-8), 112.7 (C-2), 106.0 (C-1''), 94.1 (C-1'), 82.6 (C-2'), 78.0 (C-3'), 77.8 (C-3''), 77.7 (C-5'), 77.7 (C-5''), 76.1 (C-2''), 72.5 (C-4'), 72.3 (C-4''), 63.6 (C-6'), 63.1 (C-6''),

57.4 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为 tuberonoid A。

化合物 **9**: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 165 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.62 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.45 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 171.3 (C-9), 161.8 (C-4), 146.8 (C-7), 131.2 (C-2, 6), 127.3 (C-1), 116.9 (C-3, 5), 115.7 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **9** 为对羟基肉桂酸。

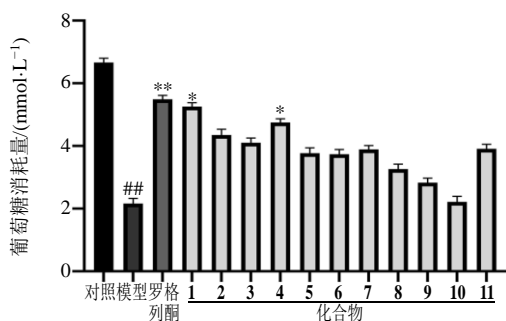
化合物 **10**: 白色粉末, 易溶于甲醇。ESI-MS m/z : 197 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.82 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.66 (1H, dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 2.84 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-7), 2.57 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 177.3 (C-9), 148.9 (C-4), 145.8 (C-3), 133.8 (C-1), 121.7 (C-6), 116.1 (C-5), 113.0 (C-2), 56.3 (3-OCH₃), 37.4 (C-8), 31.8 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **10** 为 3-甲氧基-4-羟基苯丙酸。

化合物 **11**: 无色针晶 (甲醇)。ESI-MS m/z : 195 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.15 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.03 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 170.9 (C-9), 150.5 (C-3), 149.3 (C-4), 146.9 (C-7), 127.8 (C-1), 124.0 (C-6), 116.4 (C-5), 115.9 (C-8), 111.7 (C-2), 56.4 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **11** 为阿魏酸。

4 化合物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

首先采用 CCK-8 法检测化合物 **1**~**11** 对 HepG2 细胞活性的影响, 考察其细胞毒性。结果表明, 化合物 **9** 和 **10** 在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HepG2 细胞的相对活性分别为 86.32%、62.24%, 其余化合物的细胞相对活性均在 100% 以上, 说明除化合物 **9** 和 **10** 外, 其余化合物对 HepG2 细胞均无细胞毒性。

化合物 **1**~**11** 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗葡萄糖消耗量实验结果 (图 4) 表明, 在浓度 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 下, 化合物 **1** 和 **4** 可以显著增加胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量, 与模型组对比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。



与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

##*P*<0.01 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group

图 4 化合物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of different compounds on glucose consumption of insulin-resistant HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5 讨论

本实验从枸杞子正丁醇部位中分离鉴定了 11 个化合物, 包括 4 个环香叶烷型单萜, 其中化合物 1 为 1 个新化合物, 化合物 2 和 3 为首次从枸杞属植物中分离得到, 并对以上化合物进行了体外降糖活性测试。目前有关枸杞属植物的化学成分研究主要集中于多糖、生物碱和黄酮类化合物, 而环香叶烷型单萜类化合物分离得到较少, 截止目前仅分离得到 5 个^[21]。因此, 本研究进一步丰富了枸杞属植物的化学成分结构类型。目前有关枸杞子的降糖活性研究多集中于含量较大的多糖类化合物^[22], 而对于其他类型化合物的降糖活性研究尚未见文献报道。本研究通过活性筛选发现有 2 个环香叶烷型单萜类化合物在体外具有一定的降糖活性, 研究结果对完善枸杞子抗糖尿病作用的物质基础具有一定意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 260.
 [2] 王汉卿, 王庆, 马玲, 等. 枸杞子药材生产区划研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3127-3131.
 [3] 马鹏生, 朱溶月, 白长财, 等. 宁夏枸杞植物资源及产业发展调查 [J]. 中成药, 2021, 43(11): 3245-3248.
 [4] 魏雪松, 王海洋, 孙智轩, 等. 宁夏枸杞化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2513-2520.
 [5] 潘福璐, 韩星, 冀艳华, 等. 基于多成分药物代谢的枸杞子质控成分遴选研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1865-1871.
 [6] 孔江波, 朱莹, 张文静, 等. 枸杞子醋酸乙酯部位非生物碱类化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7):

1877-1883.
 [7] Chen H, Kong J B, Zhang L, *et al.* Lycibarbarines A-C, three tetrahydroquinoline alkaloids possessing a spiro-heterocycle moiety from the fruits of *Lycium barbarum* [J]. *Org Lett*, 2021, 23(3): 858-862.
 [8] 唐文静, 卢敏, 唐标. 基于药效团和分子对接的黄芪甲苷改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用及机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 163-168.
 [9] 卢骋, 刘祥, 唐延婷, 等. 基于酪氨酸磷酸酶(PTP1B)的 II 型糖尿病药物设计、合成和体外活性及毒性的初步评价 [J]. 化学学报, 2016, 74(2): 155-164.
 [10] Umehara K, Hattori I, Miyase T, *et al.* Studies on the constituents of leaves of *Citrus unshiu* Marcov [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(12): 5004-5008.
 [11] Isoe S, Katsumura S, Be Hyeon S, *et al.* Biogenetic type synthesis of grasshopper ketone and loliolide and a possible biogenesis of allenic carotenoids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1971, 12(16): 1089-1092.
 [12] Otsuka H, Kamada K, Yao M, *et al.* Alangionosides C-F, megastigmane glycosides from *Alangium premnifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(6): 1431-1435.
 [13] Yu Q, Otsuka H, Hirata E, *et al.* Turpinionosides A-E: Megastigmane glucosides from leaves of *Turpinia ternata* nakai [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(5): 640-644.
 [14] Suchaichit N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, *et al.* Phytochemical investigation and acetylcholinesterase inhibitory activity of bark of *Hymenodictyon orixense* [J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(24): 2936-2939.
 [15] 赵蔚. 显脉旋覆花基于肌酸酐抑制途径影响杂环胺生成的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
 [16] Ma S J, Mizutani M, Hiratake J, *et al.* Substrate specificity of beta-primeverosidase, a key enzyme in aroma formation during oolong tea and black tea manufacturing [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(12): 2719-2729.
 [17] Han S H, Suh W S, Park K J, *et al.* Two new phenylpropane glycosides from *Allium tuberosum* rottler [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(7): 1312-1316.
 [18] 刘清茹, 李娟, 赵小芳, 等. 芦竹根化学成分的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1084-1089.
 [19] 王晓良, 陈明华, 王芳, 等. 板蓝根水提取物的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1172-1182.
 [20] 王红刚, 马远刚, 余伯阳, 等. 娃儿藤抗肿瘤活性部位的成分 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 352-354.
 [21] Qian D, Zhao Y X, Yang G, *et al.* Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): E911.
 [22] Masci A, Carradori S, Casadei M A, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects [J]. *Food Chem*, 2018, 254: 377-389.

[责任编辑 王文倩]