

## 榅桲籽的化学成分及其PTP1B抑制活性

哈及尼沙\*, 阿卜杜热合曼·努如拉, 李改茹, 马桂芝, 程煜凤

(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 采用硅胶、Sephadex LH-20及半制备液相等多种色谱方法从榅桲种子中分离得到11个化合物, 利用UV、1D、2D NMR、HR-ESI-MS等波谱技术分别鉴定为5,7-二羟基-2-正二十五烷基色烯-4-酮(1)、乌苏酸(2)、委陵菜酸(3)、齐墩果酸(4)、 $\beta$ -胡萝卜苷(5)、 $\beta$ -谷甾醇(6)、苦杏仁苷(7)、芦丁(8)、山柰酚(9)、槲皮素(10)和异槲皮素(11)。其中化合物1为新化合物, 3和5为首次从榅桲属中分离得到, 其他成分均为首次从榅桲籽中分离得到。用体外PTP1B抑制活性实验, 化合物1~4和8对PTP1B有抑制活性, 其 $IC_{50}$ 值分别为0.465、16.14、28.96、23.78和11.70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 榅桲籽; 化学成分; 5,7-二羟基-2-正二十五烷基色烯-4-酮; PTP1B抑制活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0510-04

## Chemical constituents of *Cydonia oblonga* seeds and their PTP1B inhibitory effects

Hajinisa\*, Abdurahman NURULLA, LI Gai-ru, MA Gui-zhi, CHENG Yu-feng

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**Abstract:** The chemical constituents of *Cydonia oblonga* (Quince) seeds were investigated using chromatographic methods, including silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative-HPLC. Eleven compounds were isolated and their structures were elucidated on 1D or 2D NMR, and HR-ESI-MS. These analyses have lead to identification of 5,7-dihydroxy-2-n-pentacosanyl chromen-4-one (1), ursolic acid (2), tormentic acid (3), oleanolic acid (4),  $\beta$ -daucoesterol (5),  $\beta$ -sitosterol (6), amygdalin (7), rutin (8), kaempferol (9), quercetin (10) and isoquercitrin (11). Among these, compound 1 is a new compound, and compounds 3, 5 were isolated from this plant for the first time. Compounds 1-4 and 8 showed significant PTP1B inhibitory activities with  $IC_{50}$  value of 0.465, 16.14, 28.96, 23.78 and 11.70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** *Cydonia oblonga* seed; chemical constituent; 5,7-dihydroxy-2-n-pentacosanyl chromen-4-one; PTP1B inhibitory effect

榅桲籽为蔷薇科榅桲属 (*Cydonia oblonga*) 植物榅桲的种子。榅桲原产中亚西亚、高加索等地, 在我国分布于陕西、福建、新疆等地。榅桲籽在《全国中草药汇编》中记载: “主治伤暑、呕吐、腹泻、消化不良、关节疼痛、腓肠肌痉挛”<sup>[1]</sup>。具有清除胃肠干热、生津止咳,

用于烦躁不安、咳嗽、肺结核等多种功效<sup>[2]</sup>。该药材在民间制成不同配方的糖浆和浸膏用于治疗消化器官疾病、糖尿病及心脑血管等器官疾病<sup>[3]</sup>。目前, 已从榅桲籽中发现酚酸类、黄酮类、三萜类、萜类、脂肪酸类化合物<sup>[4-6]</sup>, 现代药理研究表明, 具有抗氧化<sup>[7]</sup>、抗溶血<sup>[8]</sup>、抗肾癌细胞增殖<sup>[9]</sup>、抗皮肤毒性<sup>[10]</sup>等作用。本课题组在前期研究工作中发现, 榅桲籽不同提取部位对蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B (PTP1B) 有不同程度的抑制活性<sup>[11]</sup>。为进一步寻找活性成分, 利用生物活性导向, 采用硅

收稿日期: 2018-12-12; 修回日期: 2018-12-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360078); 新疆少数民族科技人才特殊培养项目 (2017D03004).

\*通讯作者 Tel: 86-991-4362471, E-mail: ajinsa@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1108

胶、Sephadex LH-20及半制备液相等多种色谱方法,从榧籽种籽中分离得到11个化合物,经UV、1D、2D NMR、HR-ESI-MS等波谱技术分别鉴定为:5,7-二羟基-2-正二十五烷基色烯-4-酮(1)、乌苏酸(2)、委陵菜酸(3)、齐墩果酸(4)、 $\beta$ -胡萝卜苷(5)、 $\beta$ -谷甾醇(6)、苦杏仁苷(7)、芦丁(8)、山柰酚(9)、槲皮素(10)和异槲皮素(11)。其中,化合物1为新化合物,3和5为首次从榧籽属植物中分离得到,其他成分均为首次从榧籽中分离得到,结构见图1。化合物1~4、8展示出较好的PTP1B抑制活性,其 $IC_{50}$ 值分别为0.465、16.14、28.96、23.78和11.70  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 结果与讨论

化合物1为白色粉末,mp 101~103  $^{\circ}\text{C}$ ,溶于氯仿。10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -乙醇溶液显淡黄色,  $\text{FeCl}_3$ 反应呈阳性,可能有酚羟基。HR-ESI-MS  $m/z$ : 527.808 1 (18)  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (计算值为527.808 3), 190.1 (100)  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{24}\text{H}_{49}]^-$ 和203.1 (53)等其他碎片离子峰,结合 $^1\text{H}$  NMR和 $^{13}\text{C}$  NMR数据推知分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_4$ ,不饱和度7,含有苯环。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )图谱中:在低场出现2个羟基质子信号,分别为 $\delta_{\text{H}}$  13.3 (5-OH)和 $\delta_{\text{H}}$  13.6 (7-OH); 3个芳香环质子 $\delta_{\text{H}}$  6.24 (1H, s, H-3)、 $\delta_{\text{H}}$  6.72 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-8)和 $\delta_{\text{H}}$  6.75 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-6),后两个(H-8和H-6)显示为色酮环上两个间位偶合的氢; $\delta_{\text{H}}$  2.48 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 1.60 (2H,

m, H-2')提示结构中有不连氧的亚甲基信号; $\delta_{\text{H}}$  1.27~1.33 (44H, m, H-3'~H-24')提示结构中有长链亚甲基质子信号; $\delta_{\text{H}}$  0.89 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-25')提示结构中含有长链末端甲基信号; $^{13}\text{C}$  NMR结合DEPT谱显示出34个碳信号:1个伯碳 [ $\delta_{\text{C}}$  14.7 (C-25)], 24个仲碳 [ $\delta_{\text{C}}$  34.5 (C-1'), 27.4 (C-2'), 29.6~32.6 (C-3'~C-24')], 推测该化合物含有长链 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{23}-\text{CH}_3$ 基片段, 3个叔碳 [ $\delta_{\text{C}}$  108.5 (C-3)、100.4 (C-6)、95.2 (C-8)]和6个季碳 [ $\delta_{\text{C}}$  183.3 (C-4)、171.1 (C-2)、166.3 (C-9)、163.7 (C-5)、159.4 (C-7)、105.3 (C-10)]信号。在 $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )谱中, $\delta_{\text{C}}$  183.3为羰基碳信号; $\delta_{\text{C}}$  166.3、163.7、159.4为3个含氧芳碳信号; $\delta_{\text{C}}$  108.5、105.3、100.4、95.2为4个芳香碳信号;在 $\delta_{\text{C}}$  27.4~34.5区域内给出了侧链上的若干碳信号。利用HSQC、HMBC谱对化合物1的 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR谱数据进行了归属(表1)。HSQC谱中, $\delta_{\text{H}}$  6.24与 $\delta_{\text{C}}$  108.5,  $\delta_{\text{H}}$  6.75与 $\delta_{\text{C}}$  100.4,  $\delta_{\text{H}}$  6.72与 $\delta_{\text{C}}$  95.2,  $\delta_{\text{H}}$  2.48与 $\delta_{\text{C}}$  34.5,  $\delta_{\text{H}}$  1.60与 $\delta_{\text{C}}$  27.4,  $\delta_{\text{H}}$  1.27~1.33与 $\delta_{\text{C}}$  29.6~32.6,  $\delta_{\text{H}}$  0.89与 $\delta_{\text{C}}$  14.7相关。根据以上数据确定化合物1的母核为烷基取代的5,7-二羟基色烯-4-酮。在HMBC谱中, $\delta_{\text{H}}$  2.48 (H-1')与 $\delta_{\text{C}}$  171.1 (C-2)相关外还与C-3、C-2'、C-(3'-24')有远程相关(图2),推测化合物结构中长链 $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{23}-\text{CH}_3$ 基连接位置在 $\delta_{\text{C}}$  171.1 (C-2)碳上。因此,确定化合物1结构式如图2所示,命名为5,7-二羟基-2-正二十五烷基色烯-4-酮。

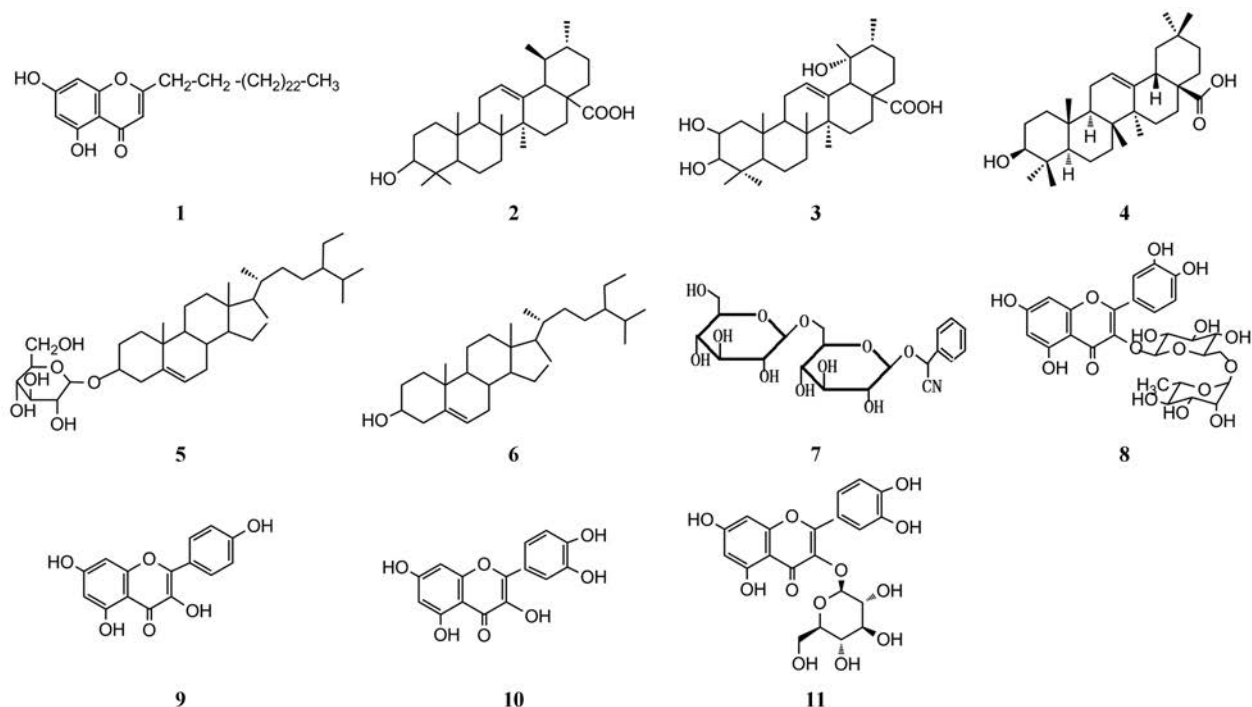
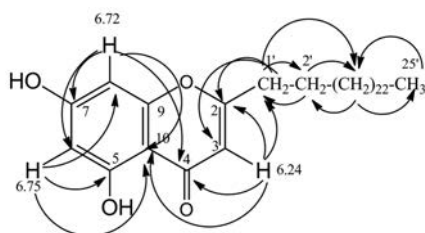


Figure 1 Structure of compounds 1-11

**Table 1** NMR data ( $^1\text{H}$ : 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) of compound **1**

No.	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	DEPT	HMBC
2		171.1	C	
3	6.24 (1H, s)	108.5	CH	C-1', C-2, C-4, C-10
4		183.3	C	
5		163.7	C	
6	6.75 (1H, d, $J = 1.6$ )	100.4	CH	C-5, C-8, C-10
7		159.4	C	
8	6.72 (1H, d, $J = 1.6$ )	95.2	CH	C-4, C-6, C-7, C-10
9		166.3	C	
10		105.3	C	
1'	2.48 (2H, t, $J = 7.2$ )	34.5	$\text{CH}_2$	C-2, C-3, C-2', C-(3'-24')
2'	1.60 (2H, m)	27.4	$\text{CH}_2$	C-1', C-(3'-24')
3'-24'	1.27-1.33 (44H, m)	29.6-32.6	$(\text{CH}_2)_{22}$	C-2', C-25'
25'	0.89 (3H, t, $J = 7.2$ )	14.7	$\text{CH}_3$	C-(3'-24')

**Figure 2** Key HMBC correlations of compound **1**

通过体外 PTP1B 活性检测实验, 测定化合物 **1**~**5**、**8** 的抑制 PTP1B 活性。结果, 化合物 **1**~**4**、**8** 表现出明显的抑制活性。

## 实验部分

INOVA-400 型核磁共振仪 (美国 VARIAN 公司); Varian VNMRS-600 NMR 核磁共振波谱仪 (美国 VARIAN 公司); QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS 质谱仪 (美国惠氏公司); Shimadzu 2550 型紫外可见光谱仪 (日本岛津公司); 半制备高效色谱仪 (DIONEX 公司); X-Bridge™ 半制备 C18 柱 (5  $\mu\text{m}$ , 10 mm $\times$ 250 mm, 美国 Waters 公司); 薄层硅胶 HSGF254 (山东烟台市芝罘黄务硅胶开发实验厂); 柱色谱硅胶 (100~200 目, 200~300 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司); Buchi B-540 熔点测定仪 (瑞士 Buchi 公司); ESJ-180A 型电子天平 (沈阳龙腾有限公司); KQ-100B 型超声波清洗仪 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); ELISA 酶标仪 (美国); HPLC 用甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 水为哇哈哈纯净水; 提取分离用试剂 (石油醚、乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、丙酮、甲醇、乙醇等) 均为分析纯。

榅桲籽为 2015 年 11 月采集于新疆阿图什市上阿图什乡, 经中国科学院新疆生态与地理研究所植物分类研究室沈观冕研究员鉴定为蔷薇科植物榅桲 (*Cydonia oblonga* MILL.) 的成熟种子。

## 1 提取与分离

榅桲种子 7 kg 粉碎后, 加石油醚浸泡 3 次, 每次 24 h, 脱脂。将浸泡液减压浓缩, 得到榅桲籽石油醚部位 (100 g)。脱脂后的榅桲籽用甲醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h。提取液减压浓缩至无醇味, 加水混悬, 依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取减压浓缩得到各部分浸膏。其中取乙酸乙酯部分 (80 g) 进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚-二氯甲烷-甲醇 (V/V, 100:0:0, 90:10:0, 80:20:0, 70:30:0, 1:1:0, 30:70:0, 0:100:0, 0:95:5, 0:90:10, 0:80:20) 梯度洗脱, 合并相同馏分, 依次得到 10 个馏分 (Fr.1~10)。其中 Fr.1 (8 g) 经 GC-GC/MS 分离鉴定 5 个化合物。Fr.2 (17 g) 经硅胶柱色谱 (正己烷-乙酸乙酯) (V/V, 100:0, 90:10, 80:20, 70:30) 梯度洗脱, TLC 检测合并为 4 个馏分 (Fr.2.1~2.4)。Fr.2.2 (1.5 g) 用 Sephadex LH-20 等度洗脱 (V/V, 氯仿-甲醇 1:1) 分离纯化得到化合物 **1** (12 mg)。Fr.8 (5.5 g) 用 Sephadex LH-20 等度洗脱 (V/V, 氯仿-甲醇 1:1) 分离纯化得到化合物 **2** (30 mg) 和 **3** (130 mg)。Fr.9 (4.2 g) 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 等度洗脱 (V/V, 氯仿-甲醇 1:1) 分离纯化得到化合物 **4** (8.4 mg)、**5** (80 mg) 和 **6** (12 mg)。

正丁醇部位 (200 g), 其中取 120 g 加水溶解, 过滤, 上大孔吸附树脂 AB-8, 依次用水、10%、30%、50%、70%、90% 乙醇-水梯度洗脱得到 6 个洗脱组分。其中 50% 和 70% 乙醇-水洗脱组分经 TLC 检测, 组分成分基本一致, 合并 (33 g), 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (V/V, 50:1, 40:1, 30:1, 10:1, 1:1) 梯度洗脱, 分离得到 5 个组分 (Fr.1~Fr.5)。Fr.4 组分经过 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 得到化合物 **7** (100 mg), Fr.5 通过 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇), 半制备高效液相色谱 (甲醇-水, 8:2) 纯化, 得到化合物 **8** (12 mg)。

取正丁醇部位 80 g 采用硅胶柱色谱, 以氯仿-丙酮 (V/V, 80:1, 50:1, 30:1, 10:1, 5:1, 1:1)、氯仿-甲醇

(5:1) 梯度洗脱, TLC 检测将相同组分合并得到 7 个组分 (Fr.1~Fr.7)。Fr.2 组分 (7 g) 经过硅胶柱色谱 (氯仿-丙酮 5:1), Sephadex LH-20 (甲醇) 洗脱分离, 半制备高效液相 (甲醇-水 8:2) 色谱纯化, 得到化合物 **9** (15 mg) 和化合物 **10** (9 mg)。Fr.5 组分 (4 g) 经硅胶柱 (氯仿-甲醇 1:1), Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇洗脱) 分离纯化, 得化合物 **8** (24 mg) 和化合物 **11** (5 mg)。

## 2 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末 (氯仿), mp 101~103 °C, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 乙醇溶液显色为淡黄色; ESI-MS *m/z*: 527.8 [M-H]<sup>-</sup>, 190.1 [M-H-C<sub>24</sub>H<sub>49</sub>]<sup>-</sup> (100), 203.1 (53), 217.3 (6), 231.0 (8), 246.4 (5), 259.1 (16), 273.0 (10), 287.2 (9), 303.4 (5), 315.2 (9), 329.1 (5), 343.0 (6), 357.1 (8), 371.2 (8), 399.4 (3), 413.0 (3), 441.1 (3), 427.3 (6), 455.2 (3), 469.2 (7), 497.4 (5); HR-ESI-MS *m/z*: 527.808 1 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>O<sub>4</sub> 527.808 3), 确定分子式为 C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>, 不饱和度为 4。NMR 数据见表 1。

## 3 化合物 **1**~**5**、**8** 对蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP1B) 抑制作用

以对-硝基苯基磷酸二钠 (pNPP) 作为底物, 根据 PTP1B 水解 pNPP 的磷酸基团而产生颜色反应来测定 PTP1B 的活性<sup>[12,13]</sup>。将化合物 **1**~**5**、**8** 和阳性对照品钒酸钠 (NaVO<sub>3</sub>) 用 DMSO 溶解, 取 1 μL 加入至 200 μL 反应体系中 (pH 6.0, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 3 mmol·L<sup>-1</sup> DDT, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸), 加入底物 pNPP 至 2 mmol·L<sup>-1</sup>, 加入人重组 PTP1B 酶 0.3 μg 开始反应, 37 °C 保温 30 min, 加入 5 mmol·L<sup>-1</sup> NaOH 20 μL 终结反应, 用酶标仪在 405 nm 测定吸收度, 以原钒酸钠作为阳性对照, 以不加 PTP1B 为空白对照, 计算抑制率, 应用 Origin 软件计算 IC<sub>50</sub> 值。抑制率 = (A<sub>405 空白</sub> - A<sub>405 样品</sub>) / A<sub>405 空白</sub> × 100%。

结果显示, 化合物 **1**~**4** 和 **8** 表现出明显的 PTP1B 抑制活性, IC<sub>50</sub> 分别为 0.465、16.14、28.96、23.78 和 11.70 μmol·L<sup>-1</sup>。

本研究以 PTP1B 生物活性为导向, 从楤棒籽中分离得到 11 个化合物, 5 个化合物具有抑制 PTP1B 的活性。抑制 PTP1B 活性是防治糖尿病及肥胖等代谢性疾病的有效途径<sup>[14]</sup>。因此, 本实验为进一步研究或能够找到潜在的用于治疗或改善 2 型糖尿病和肥胖症的新的 PTP1B 抑制剂提供科学依据。

## References

[1] National Compilation Group of Chinese Herbal Medicine. National Compilation of Chinese Herbal Medicine (全国中草药

汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978: 422.

- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmaceutical Standards of Sanitary Ministry of People's Republic of China (中华人民共和国卫生部药品标准) [S]. Urumqi: Xinjiang Health Technology Press, 1999: 104-105.
- [3] Editorial Committee of Chinese Medical Encyclopedia. Encyclopedia of Chinese Medicine (中国医学百科全书) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005: 177.
- [4] Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, et al. Composition of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids [J]. Nat Prod Res, 2005, 19: 275-281.
- [5] Federico F, Silva BM, Andrade PB, et al. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of Quince (*Cydonia oblonga*) [J]. Phytochem Anal, 2003, 14: 352-359.
- [6] Hajinisa, Wang Q, Aisa AA, et al. Fatty acid composition in seeds oil of *Cydonia oblonga* Mill. analyzed by GC/MS [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2011, 22: 2665-2666.
- [7] Silva BM, Andrade PB, Valentão P, et al. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 4405-4712.
- [8] Magalhaes AS, Silva BM, Pereira JA, et al. Protective effect of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47: 1372-1377.
- [9] Carvalho M, Silva BM, Silva R, et al. First report on *Cydonia oblonga* Miller anticancer potential: differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58: 3366-3370.
- [10] Ali AH, Hibatoallah K, Amir J, et al. Healing effect of quince seed mucilage on T-2 toxin-induced dermal toxicity in rabbit [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64: 181-186.
- [11] Amina M, Buzore A, Zhao HQ, et al. Screening PTP1B inhibitory activities of extracts from *Cydonia oblonga* fruits and seeds [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2017, 32: 400-402.
- [12] Huang M, Xu J, Fan L, et al. Design, synthesis and antidiabetic activities of 5-arylmethylene thiazolidine-2,4-dione derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1287-1298.
- [13] Zhao HQ, Xin XL, Aisa AA, et al. Screening study on the hypoglycemic fraction from *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2012, 23: 794-797.
- [14] Cui L, Li Zh, Sun YN, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of iridoid glucosides isolated from *Plantago asiatica* [J]. J Yanbian Univ (延边大学学报 自然科学版), 2011, 37: 180-183.