

山豆根化学成分及降糖活性研究

闫晓云^{1,2}, 秦凌峰², 张 瑞², 杨桢楠², 田金英², 叶 菲², 张 旭^{2*},
张培成^{2*}, 王国成^{1*}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 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: 采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备 HPLC 对山豆根 95% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行分离纯化, 得到 11 个化合物, 根据理化性质并结合 UV、IR、HR-ESI-MS 和 NMR 等波谱技术分别鉴定为 7-hydroxy-8-isopentenylchromone (**1**)、furo[2,3-*f*]-1,3-benzodioxole-7-carboxylic acid (**2**)、6-[3-(2',4'-dihydroxyphenyl)acryloyl]-7-hydroxy-2,2-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2*H*-benzopyran (**3**)、flemichapparin B (**4**)、鸢尾苷元 (**5**)、染料木素 (**6**)、6-hydroxy-1,3-benzodioxole-5-carboxylic acid (**7**)、香草酸 (**8**)、原儿茶酸 (**9**)、2,4-二羟基苯甲酸 (**10**) 和对羟基苯甲酸 (**11**)。其中, 化合物 **1** 和 **2** 为新化合物。药理活性研究表明, 化合物 **3** 对 α -葡萄糖苷酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 均表现出显著的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 5.595 和 0.320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 山豆根; 化学成分; 色原酮; 苯并呋喃; α -葡萄糖苷酶抑制; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-3135-06

Chemical constituents and hypoglycemic activity of *Sophora tonkinensis*

YAN Xiao-yun^{1,2}, QIN Ling-feng², ZHANG Rui², YANG Ya-nan², TIAN Jin-ying², YE Fei²,
ZHANG Xu^{2*}, ZHANG Pei-cheng^{2*}, WANG Guo-cheng^{1*}

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2. State Key Laboratory of
Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical
Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Eleven compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of the 95% aqueous ethanol extract of the roots of *Sophora tonkinensis* by silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography, and semi-preparative RP-HPLC. Their structures were identified as 7-hydroxy-8-isopentenylchromone (**1**), furo[2,3-*f*]-1,3-benzodioxole-7-carboxylic acid (**2**), 6-[3-(2',4'-dihydroxyphenyl)acryloyl]-7-hydroxy-2,2-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2*H*-benzopyran (**3**), flemichapparin B (**4**), tectorigenin (**5**), genistein (**6**), 6-hydroxy-1,3-benzodioxole-5-carboxylic acid (**7**), vanillic acid (**8**), protocatechuic acid (**9**), 2,4-dihydroxybenzoic acid (**10**), and *p*-hydroxybenzoic acid (**11**) through extensive spectroscopic data (IR, UV, HR-ESI-MS, and NMR spectra). Among them, compounds **1** and **2** were new compounds. In addition, compound **3** showed significant α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) inhibitory activities with IC₅₀ values of 5.595 and 0.320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: *Sophora tonkinensis*; chemical constituent; chromone; benzofuran; α -glucosidase inhibition; protein tyrosine phosphatase-1B inhibition

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎, 主产于广西、云南、贵州等地。其味苦、性寒, 具有清热解毒、消肿利咽的功效, 临床上主要用于治疗咽炎、扁桃体炎、病毒性肝炎、齿龈肿痛、口舌生疮及肿瘤等疾病^[1,2]。化学成分研究表明, 山豆根含有生物碱、黄酮、三萜及木脂素等多种化学成分, 其中生物碱和黄酮是主要活性成分^[2-12]。现代药理学研究表明山豆根表现出抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、保护心血管等多方面的药理活性^[2,12-16]。近年来, 有研究首次报道了山豆根具有良好的降糖活性, 尤其是其所含黄酮类成分可通过促进葡萄糖转运蛋白4 (GLUT4) 转位来提高葡萄糖的摄取, 对治疗2型糖尿病具有潜在的应用价值^[17,18]。因此, 为了进一步探究山豆根中发挥降糖活性的物质基础, 本实验对山豆根95%乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行了研究, 共分离鉴定了11个化合物(1~11), 结构见图1, 其中化合物1和2为新化合物, 分别为色原酮和苯并呋喃类化合物。对分离鉴定的化合物进行降糖活性研究, 结果显示, 化合物3对 α -葡萄糖苷酶和蛋白酪氨酸磷酸酶1B (PTP1B) 均表现出显著的抑制活性, IC_{50} 值分别为5.595和0.320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

结果和讨论

1 新化合物结构鉴定

化合物1 白色无定形粉末, HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 231.101 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值为231.101 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 推测分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$, 不饱和度为8。红外光谱显示该化合物含有羟基(2 925 cm^{-1})、羰基(1 636 cm^{-1})、苯环(1 619、1 594、1 566 cm^{-1})。 ^1H NMR数据(表1)显示一组AB偶合系统的苯环氢信号 δ_{H} 7.71 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5)和6.94 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 两个顺式烯烃氢信号 δ_{H} 8.20 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2)和6.17 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3)。 ^{13}C NMR数据显示与以

上结构单元对应的碳信号以及一个羰基碳信号 δ_{C} 176.0。在化合物1的HMBC谱中(图2), H-2与C-4/C-9、H-3与C-10、H-5与C-4/C-7以及H-6与C-8/C-10的多组相关信号确定了色原酮的骨架。另外一组氢信号包括一个烯烃氢信号 δ_{H} 5.18 (1H, m, H-12)、两个甲基氢信号 δ_{H} 1.62 (3H, s, H-14)和1.76 (3H, s, H-15)以及一个亚甲基氢信号 δ_{H} 3.42 (2H, brd, $J = 7.0$ Hz, H-11)提示化合物1可能含有一个异戊烯基, 结合H-11与C-13/C-9/C-7以及H-12与C-15/C-14/C-8的多组HMBC关键相关信号确定了异戊烯基的存在且连接在化合物1的8位。综上, 化合物1的化学结构被确定为7-hydroxy-8-isopentenylchromone。

化合物2 白色无定形粉末, HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 205.014 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 计算值为205.014 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 推测分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_3$, 不饱和度为8, 红外光谱显示该化合物含有 α,β -不饱和羰基(1 670 cm^{-1})和苯环(1 566和1 465 cm^{-1})。 ^1H NMR数据(表1)显示两个芳香质子信号 δ_{H} 7.31 (1H, s, H-5)和7.36 (1H, s, H-11)、一个烯烃质子信号 δ_{H} 8.49 (1H, s, H-8)和一组亚甲二氧基质子信号 δ_{H} 6.09 (2H, s, H-2)。 ^{13}C NMR数据(表1)共显示10个碳信号, 分别为一个羰基碳信号 δ_{C} 164.4、一个亚甲二氧基碳信号 δ_{C} 101.7、一组烯烃碳信号 δ_{C} 115.2和151.0, 以及6个芳香碳信号。在化合物2的HMBC谱(图2)中, H-8与C-6/C-10、H-5与C-7/C-10/C-12以及H-11与C-4/C-6的多组相关信号确定了苯并呋喃的基本骨架; H-2与C-4/C-12的相关信号确定了亚甲二氧基的位置; H-8与C-10/C-13的关键相关信号说明羰基位于7位。因此, 化合物2的结构被鉴定为furo[2,3-*f*]-1,3-benzodioxole-7-carboxylic acid。

2 降糖活性筛选结果

选用 α -葡萄糖苷酶和PTP1B酶两种模型考察化合物的体外降糖活性, 结果显示化合物3对 α -葡萄糖苷酶和PTP1B酶均表现出显著的抑制活性, 抑

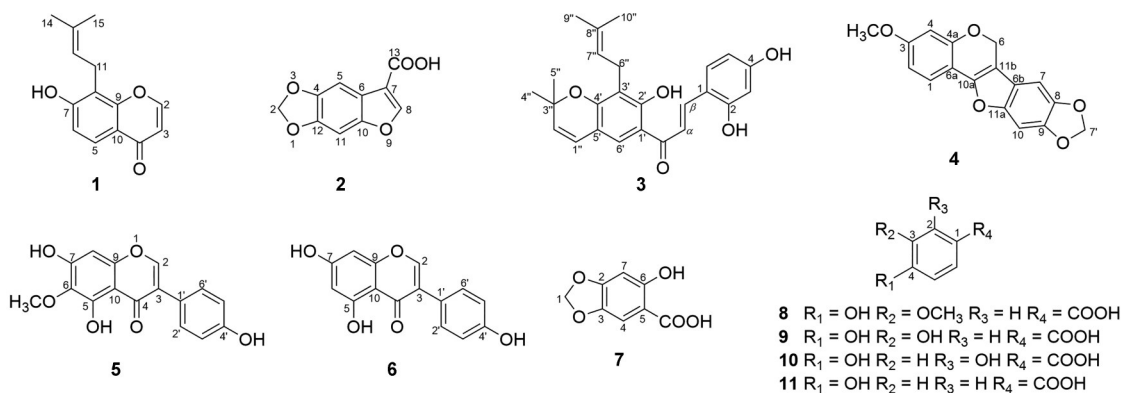
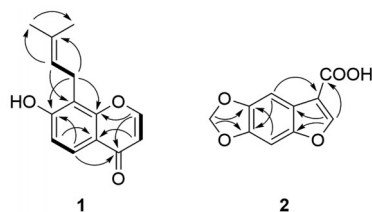


Figure 1 Chemical structures of compounds 1–11

Table 1 ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) spectroscopic data of compounds **1** and **2** in $\text{DMSO}-d_6$ (δ in ppm and J in Hz)

| No. | 1 | | 2 | |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | | | | |
| 2 | 8.20, d (6.0) | 156.0 | 6.09, s | 101.7 |
| 3 | 6.17, d (6.0) | 111.5 | | |
| 4 | | 176.0 | | 145.3 |
| 5 | 7.71, d (8.5) | 123.5 | 7.31, s | 99.5 |
| 6 | 6.94, d (8.5) | 114.5 | | 118.2 |
| 7 | | 161.1 | | 115.2 |
| 8 | | 114.9 | 8.49, s | 151.0 |
| 9 | | 155.7 | | |
| 10 | | 116.6 | | 150.2 |
| 11 | 3.42, d (7.0) | 21.8 | 7.36, s | 94.7 |
| 12 | 5.18, m | 121.9 | | 146.5 |
| 13 | | 131.3 | | 164.4 |
| 14 | 1.62, s | 25.5 | | |
| 15 | 1.76, s | 17.8 | | |


Figure 2 Key HMBC (—) and ^1H - ^1H COSY (—) correlations of compounds **1** and **2**

制率分别为 95.0% 和 97.5%, IC_{50} 值分别为 5.595 和 $0.320 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨论

本实验通过对山豆根化学成分的研究, 从中分离鉴定了 11 个化合物, 包括 1 个新的色原酮类、1 个新的苯并呋喃类、4 个黄酮类和 5 个芳香族类, 提升了山豆根化学成分多样性。此外, 本实验对分离鉴定的化合物进行了降糖活性筛选, 结果发现具有异戊烯基取代的查尔酮类化合物 **3** 对 α -葡萄糖苷酶和 PTP1B 酶均表现出显著的抑制活性。查阅文献发现黄酮类化合物 **5** 鸢尾昔元和化合物 **6** 染料木素均可通过保护胰岛 B 细胞来改善胰岛素分泌能力, 从而发挥降糖作用^[19]。因此, 通过本实验的结果进一步证实了黄酮类化合物可能是山豆根发挥降糖作用的物质基础之一, 有必要继续对山豆根进行系统的化学成分研究, 深入揭示其降糖活性物质基础。

实验部分

JASCO V-650 型紫外分光光度计 (日本 Jasco 公司), Nicolet 5700 型红外光谱仪 (美国 Thermo 公司),

Thermo-Scientific Q Exactive Focus 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), Shimadzu LC-10AT 制备型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Apollo C18 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) (美国 Alltech), Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶色谱填料 (瑞典 Pharmacia 精细化工), YMC-Pack ODS-A 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)、Rp-18 型十八烷基键合反相硅胶 ($50 \mu\text{m}$) (日本 YMC 公司); 硅胶色谱填料 (青岛海洋化工厂)。

山豆根药材于 2018 年 6 月购于安徽省亳州市, 该植物材料经中国医学科学院药物研究所马林副研究员鉴定为豆科苦参属植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根茎, 标本 (No. ID-S-2980) 存于中国医学科学院药物研究所标本室。

1 提取与分离

山豆根的干燥根茎共 50.0 kg, 粉碎后经 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤后收集上清液, 合并 3 次的提取液, 减压浓缩后得浸膏 (约 3.0 kg), 浸膏经水分散后, 使用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩后得到乙酸乙酯部位 239.0 g。乙酸乙酯部位用硅胶柱色谱分离, 依次用石油醚-乙酸乙酯 (100:0 \rightarrow 0:100) 进行梯度洗脱, 得到 11 个组分 (Fr.A~K), 在此过程中有白色固体析出得到化合物 **4** (5.7 mg)。Fr.I (19.3 g) 用中压 ODS 柱色谱分离, 依次用甲醇-水 (10:90 \rightarrow 100:0) 梯度洗脱后得到 36 个组分 (Fr.I1~Fr.I36)。Fr.I1 (103.0 mg) 用制备型 HPLC 纯化 (甲醇-水, 35:65, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **9** (2.1 mg) 和 **11** (60.6 mg)。Fr.I15 中有黄色固体析出, 然后用制备型 HPLC 进行纯化 (乙腈-水, 50:50, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **5** (30.0 mg) 和化合物 **6** (2.5 mg); Fr.I2 (357.0 mg) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (二氯甲烷-甲醇, 2:1), 得到 7 个组分 (Fr.I2.1~Fr.I2.7)。Fr.I2.4 (95.0 mg) 用制备型 HPLC 进行纯化 (乙腈-水, 15:85, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **8** (15.0 mg)。Fr.I2.5 (80.0 mg) 用制备型 HPLC 进行纯化 (乙腈-水, 10:90, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **10** (22.0 mg)。Fr.I4 (32.5 mg) 直接用制备型 HPLC 进行纯化 (甲醇-水, 45:55, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **7** (3.0 mg)。Fr.I17 (347.0 mg) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱分离 (二氯甲烷-甲醇, 2:1) 得到 5 个组分 (Fr.I17.1~Fr.I17.5)。Fr.I17.4 (162.9 mg) 用制备型 HPLC 进行纯化 (甲醇-水, 55:45, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **2** (4.8 mg)。Fr.I24 (1.0 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱进行分离 (二氯甲烷-甲醇, 2:1) 得到 4 个组分 (Fr.I24.1~Fr.I24.4)。Fr.I24.2 (150.0 mg) 用制备型 HPLC 进行纯化 (乙腈-水, 45:55, 0.2% 乙酸) 得到化合物 **1** (2.4 mg)。Fr.I31 (1.2 g) 用 Sephadex LH-20 凝胶柱

进行分离(二氯甲烷-甲醇, 2:1)得到6个组分(Fr.I31.1~Fr.I31.6)。Fr.I31.5 (50 mg)用制备型HPLC进行纯化(乙腈-水, 75:25, 0.2%乙酸)得到化合物**3** (2.7 mg)。

2 结构鉴定

化合物**1**: 白色无定形粉末; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 208 (4.22), 244 (4.16), 250 (4.21), 301 (3.82) nm; IR ν_{\max} : 2 925, 1 636, 1 619, 1 594, 1 566, 1 435, 1 413, 1 296, 1 255, 1 060 cm^{-1} ; ^1H 和 ^{13}C NMR 数据见表 1; HR-ESI-MS m/z 231.101 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3$ 计算值 231.101 6)。

化合物**2**: 白色无定形粉末; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 206 (4.42), 248 (3.82), 305 (3.95) nm; IR ν_{\max} : 1 670, 1 566, 1 465, 1 295, 1 136, 1 081, 1 045 cm^{-1} ; ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1; HR-ESI-MS m/z 205.014 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_5$ 计算值 205.014 3)。

化合物**3**: 橙黄色无定形粉末; ESI-MS: m/z 407.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 8.13 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- β), 7.70 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.60 (1H, s, H-6'), 7.56 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 6.35 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 6.37 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-5), 5.65 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2''), 5.20 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7''), 3.31 (2H, m, H-6''), 1.81 (3H, brs, H-9''), 1.67 (3H, brs, H-10''), 1.44 (6H, s, H-4'', 5''); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 194.4 (C=O), 164.9 (C-2'), 163.0 (C-4), 160.9 (C-2), 158.5 (C-4'), 142.2 (C- β), 132.2 (C-6), 131.9 (C-8''), 129.4 (C-2''), 126.6 (C-6'), 123.4 (C-7''), 122.9 (C-1''), 117.7 (C-3'), 117.4 (C- α), 115.6 (C-1), 115.1 (C-1'), 114.6 (C-5'), 109.1 (C-5), 103.5 (C-3), 78.8 (C-3''), 28.8 (C-4'', 5''), 26.0 (C-10''), 22.3 (C-6''), 18.1 (C-9'')。以上核磁数据与文献^[20]报道 6-[3-(2',4'-dihydroxyphenyl)acryloyl]-7-hydroxy-2,2-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2H-benzopyran 的数据基本一致,因此确定该化合物为 6-[3-(2',4'-dihydroxyphenyl)acryloyl]-7-hydroxy-2,2-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2H-benzopyran。

化合物**4**: 白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 297.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 7.34 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1), 7.34 (1H, s, H-7), 7.08 (1H, s, H-10), 6.60 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz, H-2), 6.56 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 6.06 (2H, s, -O- CH_2 -O-), 5.54 (2H, s, H-6), 3.75 (3H, s, H-O CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 160.6 (C-3), 154.6 (C-4a), 149.8 (C-10a), 146.7 (C-11a), 145.6 (C-9), 144.5 (C-8), 120.7 (C-1), 118.7 (C-6b), 109.2 (C-11b), 107.4 (C-2), 106.9 (C-6a),

102.6 (C-7), 101.5 (-O- CH_2 -O-), 98.1 (C-10), 94.2 (C-4), 64.9 (C-6), 55.4 (-O CH_3)。以上核磁数据与文献^[21]报道 flemichapparin B 的数据基本一致,因此确定该化合物为 flemichapparin B。

化合物**5**: 黄色无定形粉末; ESI-MS: m/z 299.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 13.04 (1H, s, 5-OH), 8.29 (1H, s, H-2), 7.36 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.43 (1H, s, H-8), 3.73 (3H, s, -O CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 180.3 (C-4), 157.4 (C-9, 4'), 153.8 (C-2), 153.1 (C-7), 153.0 (C-5), 131.8 (C-6), 130.2 (C-2', 6'), 121.7 (C-1'), 121.4 (C-3), 115.1 (C-3', 5'), 104.2 (C-10), 94.1 (C-8), 59.8 (-O CH_3)。以上核磁数据与文献^[22]报道 tectorigenin 的数据基本一致,因此确定该化合物为鸢尾苷元。

化合物**6**: 白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 271.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 12.96 (1H, s, 5-OH), 8.32 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 180.2 (C-4), 164.4 (C-7), 162.0 (C-5), 157.6 (C-4'), 157.4 (C-9), 154.0 (C-2), 130.2 (C-2', 6'), 122.3 (C-1'), 121.2 (C-3), 115.1 (C-3', 5'), 104.5 (C-10), 99.0 (C-6), 93.7 (C-8)。以上核磁数据与文献^[23]报道染料木素的数据基本一致,因此确定该化合物为染料木素。

化合物**7**: 白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 183.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 7.14 (1H, s, H-4), 6.57 (1H, s, H-7), 6.04 (2H, s, H-1); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 172.0 (-COOH), 159.7 (C-6), 153.4 (C-2), 140.1 (C-3), 106.9 (C-4), 104.2 (C-5), 101.9 (C-1), 97.9 (C-7)。以上核磁数据与文献^[24]报道 6-hydroxybenzo-1,3-dioxole-5-carboxylic acid 的数据基本一致,因此确定该化合物为 6-hydroxy-1,3-benzodioxole-5-carboxylic acid。

化合物**8**: 白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 169.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 7.56 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 7.55 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 3.89 (3H, s, -O CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 170.4 (-COOH), 152.5 (C-4), 148.6 (C-3), 125.2 (C-6), 123.6 (C-1), 115.8 (C-2), 113.7 (C-5), 56.3 (-O CH_3)。以上核磁数据与文献^[25]报道香草酸的数据基本一致,因此确定该化合物为香草酸。

化合物**9**: 淡紫色无定形粉末; ESI-MS: m/z 155.0

[M+H]⁺, 分子式为C₇H₆O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.43 (1H, overlap, H-2), 7.41 (1H, overlap, H-6), 6.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 170.4 (-COOH), 151.2 (C-4), 146.0 (C-3), 124.2 (C-1), 123.8 (C-6), 117.8 (C-2), 115.7 (C-5)。以上核磁数据与文献^[26]报道原儿茶酸的数据基本一致, 因此确定该化合物为原儿茶酸。

化合物 10: 白色无定形粉末; ESI-MS: *m/z* 155.0 [M+H]⁺, 分子式为C₇H₆O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.68 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.31 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, H-5), 6.27 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-3); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 173.7 (-COOH), 165.4 (C-2), 165.3 (C-4), 133.2 (C-6), 108.7 (C-5), 106.1 (C-1), 103.3 (C-3)。以上核磁数据与文献^[27]报道2,4-dihydroxybenzoic acid的数据基本一致, 因此确定该化合物为2,4-二羟基苯甲酸。

化合物 11: 白色无定形粉末; ESI-MS: *m/z* 139.0 [M+H]⁺, 分子式为C₇H₆O₃; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.88 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.81 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 170.2 (-COOH), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.8 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上核磁数据与文献^[28]报道对羟基苯甲酸的数据基本一致, 因此确定该化合物为对羟基苯甲酸。

3 生物活性实验

3.1 α-葡萄糖苷酶抑制实验 在实验组和空白组分别加入0.1 mol·L⁻¹ PBS缓冲液50和80 μL。各加入样品10 μL, α-葡萄糖苷酶20 μL, 37 °C恒温摇床中反应5 min, 再各加入pNPG (1 mmol·L⁻¹) 20 μL, 然后37 °C恒温摇床中反应15 min, 最后用0.4 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 50 μL终止反应。酶标仪400 nm测OD值。按下列公式计算样品对α-葡萄糖苷酶的抑制率: Inhibition (%) = {[OD (blank) - OD (sample)] / OD (blank)} × 100%。

3.2 PTP1B酶抑制实验 采用对硝基苯酚磷酸酯(pNPP)作为人基因重组PTP1B的底物。PTP1B催化的pNPP水解反应通过96孔板在pH值为7.0的100 μL反应体系下测定。化合物与酶在室温下预孵5 min, 加入含有50 mmol·L⁻¹ HEPES、5 mmol·L⁻¹ DTT、150 mmol·L⁻¹ NaCl、2 mmol·L⁻¹ EDTA及2 mmol·L⁻¹ pNPP的反应液。在30 °C下孵育10 min, 加入3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液50 μL终止酶反应。在405 nm处测出吸收OD值, 以未加酶的体系作为空白对照, 即可计算出测试样品对酶促水解的抑制作用的IC₅₀值。

致谢: 感谢中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所分析测试中心测试核磁数据; 感谢中国医学科学院、北京

协和医学院药物研究所药理室测试生物活性。

作者贡献: 闫晓云、秦凌峰、张瑞负责化合物的分离纯化和结构鉴定; 杨桢楠、闫晓云负责文献调研、整理及文章撰写和修改; 田金英和叶菲协助降糖活性测定实验; 共同通讯作者张培成负责指导实验的选题、设计和结构解析; 共同通讯作者张旭负责指导实验设计、结构解析和文章修改; 共同通讯作者王国成负责实验的设计和引导。

利益冲突: 本文不存在利益冲突。

References

- [1] Chai X, Meng YK, Bai ZF, et al. Mechanism of anti-hepatitis B virus activity of tonkinensis based on biological targets network [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 396-402.
- [2] Zhou SY, Chen JP, Liu ZD, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Sophora tonkinensis* Radix et Rhizoma [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 1510-1521.
- [3] An Q, Zhang J, Zhang P, et al. Three new quinolizidine alkaloids from the roots of *Sophora tonkinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2024, 26: 302-312.
- [4] Li X, Zhang N, Yang SL, et al. Unusual *N*-pyridinium amino acid-type alkaloids from roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* Gagnep [J]. Fitoterapia, 2023, 165: 105388.
- [5] Zhang P, Zhang J, An Q, et al. Matrine-type alkaloids with anti-tomato spotted wilt virus activity from the root of *Sophora tonkinensis* Gagnep [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71: 4394-4407.
- [6] Zhang YY, Liu D, Ye RR, et al. Anti-inflammatory quinolizidine alkaloids from the aerial parts of *Sophora tonkinensis* [J]. Phytochem Lett, 2021, 45: 121-125.
- [7] Tang Q, Luo D, Lin DC, et al. Five matrine-type alkaloids from *Sophora tonkinensis* [J]. J Nat Med, 2021, 75: 682-687.
- [8] Zhang YY, Zhang ZJ, Ye RR, et al. Alkaloids from the roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* and its anti-inflammatory activities [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2825-2829.
- [9] Li Z, Xie H, Tang CP, et al. Flavonoids from the roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* and their *in vitro* anti-SARS-CoV-2 activity [J]. Chin J Nat Med, 2023, 21: 65-80.
- [10] Chen DJ, Yuan S, Zhang P, et al. Two new isoflavones from the roots of *Sophora tonkinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2023, 25: 163-170.
- [11] Pel P, Chae HS, Nhoek P, et al. Chemical constituents from the roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* and their effects on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression [J]. ACS Omega, 2022, 7: 20952-20958.
- [12] Liang JJ, Zhang PP, Zhang W, et al. Biological activities and secondary metabolites from *Sophora tonkinensis* and its endophytic fungi [J]. Molecules, 2022, 27: 5562.

- [13] Liang L, Sun W, Wei X, et al. Oxymatrine suppresses colorectal cancer progression by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through mitophagy induction *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytother Res*, 2023, 37: 3342-3362.
- [14] Jin X, Lu Y, Chen S, et al. UPLC-MS identification and anticomplement activity of the metabolites of *Sophora tonkinensis* flavonoids treated with human intestinal bacteria [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2020, 184: 113176.
- [15] Ning X, Liu Y, Jia M, et al. Pectic polysaccharides from *Radix Sophorae Tonkinensis* exhibit significant antioxidant effects [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 262: 117925.
- [16] Zhao Q, Wei MJ, Zhang SB, et al. The water extract of *Sophora tonkinensis* Radix et Rhizoma alleviates non-alcoholic fatty liver disease and its mechanism [J]. *Phytomedicine*, 2020, 77: 153270.
- [17] Huang M, Deng SH, Han QQ, et al. Hypoglycemic activity and the potential mechanism of the flavonoid rich extract from *Sophora tonkinensis* Gagnep. in KK-Ay mice [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 288.
- [18] Yang X, Deng S, Huang M, et al. Chemical constituents from *Sophora tonkinensis* and their glucose transporter 4 translocation activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 1463-1466.
- [19] Mbara KC, Fotsing MCD, Ndinteh DT, et al. Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cell dysfunction: the potential therapeutic role of dietary flavonoids [J]. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*, 2024, 6: 100184.
- [20] Li XN, Sha N, Yan HX, et al. Isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora tonkinensis* [J]. *Phytochem Lett*, 2008, 1: 163-167.
- [21] Nayak M, Jung Y, Kim I. Syntheses of pterocarpenes and coumestans *via* regioselective cyclodehydration [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 8074-8087.
- [22] Zhou LP, Luo XW, Wang SK, et al. Chemical constituents ethyl acetate extract from *Moringa oleifera* leaves [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2024, 59: 136-141.
- [23] Fan CM, Tian XY, Qu TT, et al. Isoflavones from *Crotalaria sessiliflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 3297-3303.
- [24] Luo J, Preciado S, Xie P, et al. Carboxylation of phenols with CO₂ at atmospheric pressure [J]. *Chem Eur J*, 2016, 22: 6798-6802.
- [25] Wei F, Deng JT, Cheng HT, et al. A pair of new phenylpropanoid enantiomers from *Cordia dichotoma* fruits [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1863-1867.
- [26] Huang Y, Zhang CL, Lang WW, et al. A new oxoaporphine from *Sabia limoniacea* var. *ardisioides* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 778-781.
- [27] Kalmode HP, Vadagaonkar KS, Shinde SL, et al. Metal-free dehomologative oxidation of arylacetic acids for the synthesis of aryl carboxylic acids [J]. *J Org Chem*, 2017, 82: 3781-3786.
- [28] Gan J, Wei W, Tan JN, et al. The NO inhibitory constituents from *Illigera rhodantha* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1849-1854.