



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103351420 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 16

(21) 申请号 201310277879. X

C07J 75/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 03

A61K 31/58(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

(71) 申请人 沈阳药科大学

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路  
103 号

(72) 发明人 赵余庆 曾珂 曹家庆 毕秀丽  
杨娣 何燕妮

(74) 专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限  
公司 21207

代理人 李宇彤

(51) Int. Cl.

C07J 71/00(2006. 01)

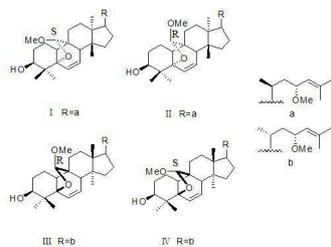
权利要求书2页 说明书9页

(54) 发明名称

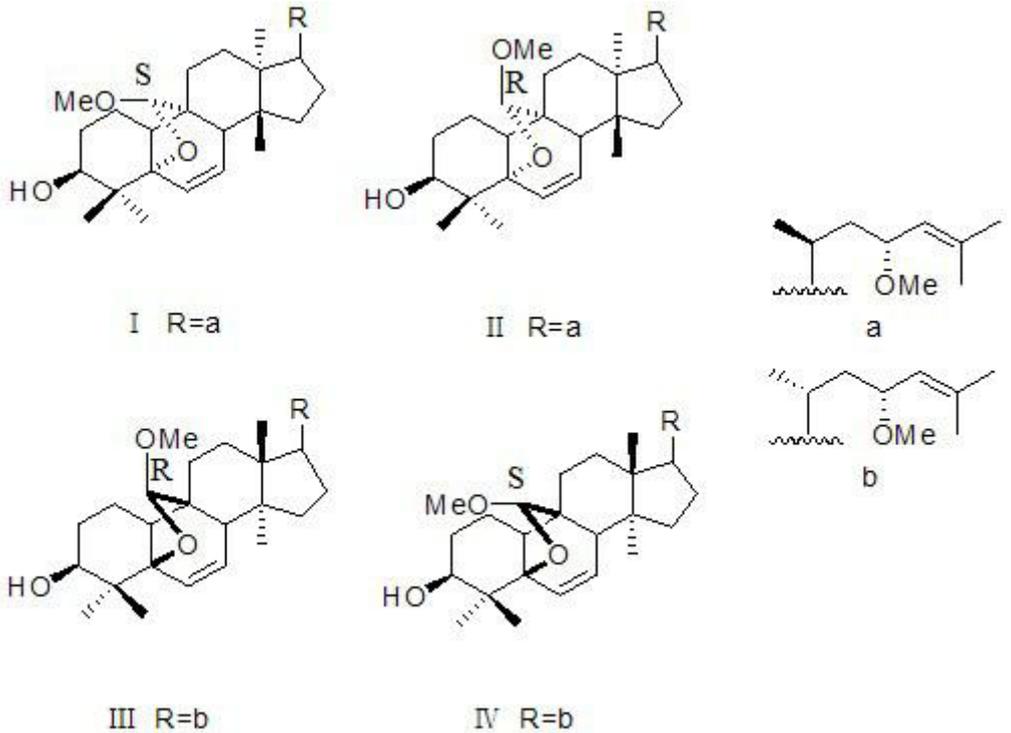
从苦瓜中分离的化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,公开了一组从苦瓜中分离的新化合物 5  $\alpha$ , 19S-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3  $\beta$ -ol, 5  $\alpha$ , 19R-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3  $\beta$ -ol, 5  $\beta$ , 19R-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3  $\beta$ -ol, and 5  $\beta$ , 19S-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3  $\beta$ -ol 及其制备方法和应用,将干燥的苦瓜通过醇提取,浓缩,再经水解和硅胶柱色谱得 I、II、III和IV粗品,重结晶后即得 K4, K4 经高效液相色谱方法制备,得到新化合物 I、II、III和IV。本发明制备的 I、II、III和IV具有较好的降血糖活性。



1. 具有下式结构的化合物 I、II、III或IV：



2. 如权利要求 1 所述化合物的制备方法,包括以下步骤:

a) 取干燥的苦瓜用醇、水或醇-水任意比例混合提取,提取液浓缩,浓缩后将浓缩液经酸水解,水解后的反应液加水离心或静置,收集沉淀部分,或者水解后的反应液经碱中和后用有机溶剂萃取,收集有机溶剂部分;

b) 干燥沉淀部分或有机溶剂部分,即得苦瓜水解产物,将苦瓜水解产物上硅胶分离,用溶剂洗脱,硅胶薄层定性,合并相同组分,即得粗品;

c) 粗品用溶剂重结晶,即得含有化合物 I、II、III和IV的混合物;该混合物经高效液相色谱方法制备,用甲醇-水作流动相洗脱,分别得到化合物 I、II、III和IV的单体。

3. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:步骤 a)中所述苦瓜是指来自葫芦科苦瓜属植物苦瓜的未成熟果实。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的制备方法,其特征在于:步骤 a)中所述的醇为甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇之一或两种以上的混合物;所述醇-水的比例是 1%-95% 体积比,优选 70% 体积比;所述提取的方式选自加热回流提取或渗滤提取或超声提取或微波提取或闪式提取;所述用醇提取包括将干燥后的苦瓜用醇提取 2 次,每次提取 2 小时,合并提取液,提取液减压浓缩。

5. 如权利要求 2-4 中任何一项所述的制备方法,其特征在于:步骤 a)中所述经酸水解是在酸性水溶液或有机溶剂中在超声条件下进行,其中浓缩液的用量 10-800 g/L;酸为盐酸、硫酸、高氯酸、磷酸、冰乙酸或甲酸,浓度为 0.2-9 mol/L 或为上述酸的饱和酸;或者为有机酸;超声条件:频率:20-70 kHz;功率:2.4-6 KW;时间:1 分钟-5 天;水温:25-100 °C;水解后的反应液用氢氧化钠或氢氧化钾中和,其浓度优选 0.2-9mol/L;萃取用的有机溶剂为石油醚、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、氯仿、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯或正丁醇。

6. 如权利要求 2-5 任何一项所述的制备方法,其特征在于:步骤 a)中所述经酸水解的水解温度为 25-100 °C,时间 1 分钟-5 天。

7. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 b 的溶剂为石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮的任意两者或三者的组合;步骤 c 重结晶溶剂是乙酸乙酯。

8. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:步骤 b) 包括干燥沉淀部分,即得苦瓜水解产物,将苦瓜水解产物上 200-300 目硅胶分离,用石油醚-乙酸乙酯 50:15:1 的混合液依次洗脱,每个梯度洗脱 5 个柱体积,硅胶薄层定性,合并相同组分,30:1 组分得到粗品。

9. 一种药物组合物,其特征在于:以权利要求 1 所述化合物中的至少一种作为活性成分。

10. 权利要求 1 所述化合物或权利要求 9 所述的组合物在制备降血糖药物中的应用。

11. 一种合成降血糖药物的方法,其特征在于:以权利要求 1 所述化合物中的至少一种作为先导化合物,进行合成。

## 从苦瓜中分离的化合物及其制备方法和应用

### 技术领域：

[0001] 本发明属于药物技术领域，涉及一组新化合物及其制备方法，以及该化合物在制备降血糖药物中的应用。

### 背景技术：

[0002] 糖尿病是由于胰腺的功能失调导致胰岛素分泌相对或绝对不足，或靶细胞对胰岛素的敏感性降低而引起的一系列全身性代谢紊乱疾病。据世界卫生组织资料，全世界有 3.46 亿人患有糖尿病，严重威胁人类健康。目前的治疗药物主要有胰岛素类、胰岛素分泌促进剂、胰岛素增敏剂和碳水新化合物。胰岛素类药物对于胰岛素依赖型糖尿病患者，不用胰岛素病情就恶化，一旦用上就难以撤除；胰岛素分泌促进剂如磺脲类，血糖浓度依赖，易低血糖，易导致腹型肥胖；增加胰岛  $\beta$  细胞负荷，导致胰岛功能衰竭；长效用药导致严重的低血糖难以纠正等；胰岛素增敏剂，其中双胍类易引起胃肠道和消化道不良反应，而噻唑烷二酮类价格高，应用前提是胰岛功能尚可而胰岛素受体结合率低；碳水新化合物，消化道副作用强，肝功能不全者也应慎用。

[0003] 鉴于上述种种原因，人们把目光转向天然降血糖药物的研发上。天然药物降血糖在毒副作用方面比化学药物具有独到之处，因此，从祖国医药宝库中寻找疗效确切的降血糖天然药物，明确其药效物质基础，进而开发出高效低毒的新药，成为中医药领域多年研究的焦点。

[0004] 苦瓜 *Momordica charantia* L. 始载于《滇南本草》和《本草纲目》列于菜部菜类，曰：“苦寒无毒，除邪热，解劳乏，清心明目。”苦瓜广泛分布于热带、亚热带和温带地区，在许多国家和地区都有入药记载。苦瓜药食同源的特性和显著的生理活性使其成为近年来人们研究的热点。在传统中医领域中的《救荒本草》和《本草纲目》等古文献里，都曾经提到苦瓜能止渴，主治烦热渴引饮，在治疗消渴症即糖尿病方面有独特功效。

[0005] 本发明在针对苦瓜降血糖有效成分的研究中，经过醇提取、色谱分离纯化与细胞活性检测相结合的方法，最终获得了具有降血糖活性的一组新化合物，并采用质谱与高分辨核磁共振和单晶衍射等技术，确定了各个新化合物的化学结构。上述新化合物均具有良好的降血糖活性，可以开发制成适合于临床使用的降血糖药物。如作为先导新化合物，通过结构改造和对其构效关系进行进一步的研究，可合成一系列的降血糖药物和新的药物组合。也可作为苦瓜药材及其制剂质量评价的指标成分，实现苦瓜药材及其制剂质量的稳定和可控，为一类降血糖创新药物的研究突破目前苦瓜研究开发的瓶颈奠定基础。

### 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一组从中药苦瓜中提取分离得到的新化合物。

[0007] 本发明另一目的是提供上述新化合物的制备方法。

[0008] 本发明另一目的是提供上述新化合物在制备降血糖药物中的用途。

[0009] 本发明另一目的是提供上述新化合物作为先导药物的用途，用于合成降血糖药

物。

[0010] 本发明另一目的是提供上述新化合物作为中药对照品的用途,用于检测和鉴别苦瓜药材。

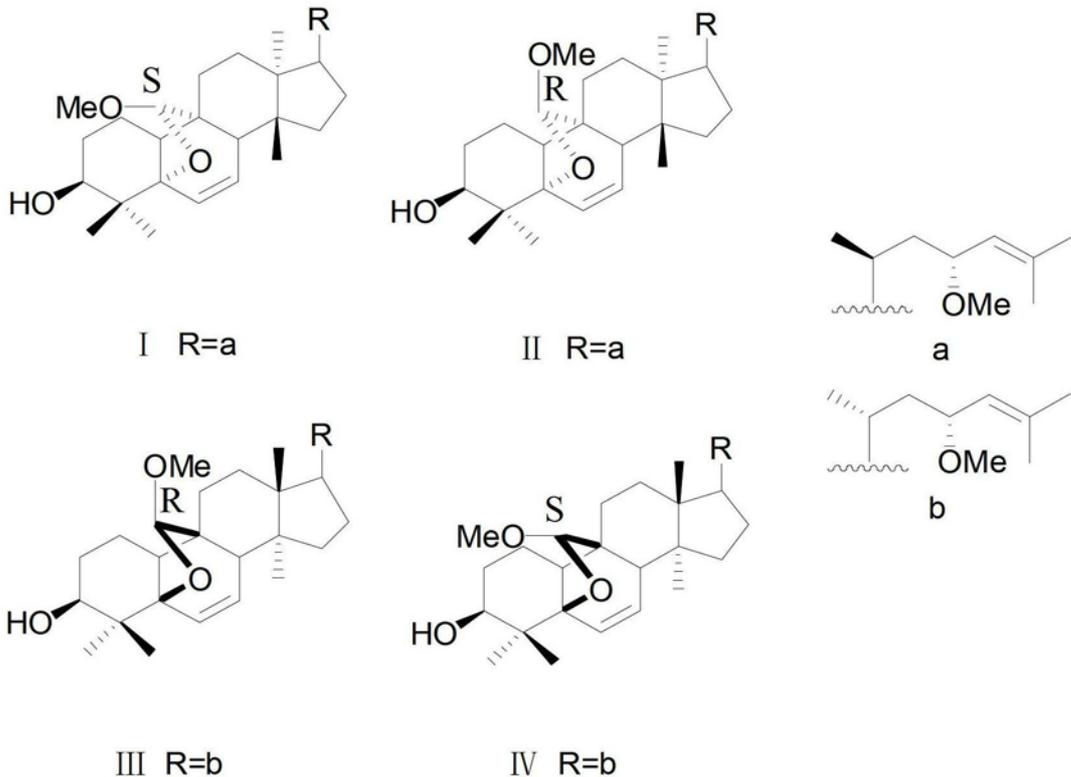
[0011] 本发明另一目的是提供含有上述新化合物的药物组合物,可用于治疗糖尿病。

[0012] 本发明另一目的是提供中药苦瓜的检测方法,该方法中以上述新化合物作对照品。

[0013] 上述目的通过以下技术方案实现:

[0014] 化合物,其具有下式结构 I、II、III和IV之一:

[0015]



[0016] 上述化合物 I、II、III和 / 或IV的制备方法是:a) 取干燥的苦瓜用醇、水或醇-水任意比例混合提取,提取液浓缩,浓缩后将浓缩液经酸水解,水解后的反应液加水离心或静置,收集沉淀部分,或者水解后的反应液经碱中和后用有机溶剂萃取,收集有机溶剂部分;b) 干燥沉淀部分或有机溶剂部分,即得苦瓜水解产物,将苦瓜水解产物上 200-300 目硅胶分离,用溶剂洗脱,硅胶薄层定性,合并相同组分,即得粗品;c) 粗品用溶剂重结晶,即得含有化合物 I、II、III和IV的混合物;该混合物经高效液相色谱方法制备,用甲醇-水作流动相洗脱,分别得到化合物 I、II、III和IV的单体。

[0017] 作为优选的实施方式,上述制备方法中所述的步骤 b)的溶剂为石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮的任意两者或三者的组合;步骤 c)的溶剂为 92% 甲醇-水;步骤 a)所述的醇为甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇之一或两种以上的混合物;所述醇-水的比例是 1%-95% 体积比,优选 70% 体积比。

[0018] 作为优选的实施方式,上述制备方法中的苦瓜是指来自葫芦科苦瓜属植物苦瓜的未成熟果实。

[0019] 作为优选的实施方式,上述制备方法中所述步骤 a) 中的提取是加热回流提取或

渗滤提取或超声提取或微波提取或闪式提取 ;所述用醇提取包括将干燥后的苦瓜用醇提取 2 次,每次提取 2 小时,合并提取液,提取液减压浓缩至 25℃时密度为 1.00-1.50。

[0020] 作为优选的实施方式,上述制备方法中步骤 a) 的浓缩液经酸水解具体是在酸性水溶液或有机溶剂中在超声条件下进行,其中浓缩液的用量 10-800g/L, g 指醇提取物的质量单位 ;酸为盐酸、硫酸、高氯酸、磷酸、冰乙酸或甲酸,浓度为 0.2-9mol/L 或为上述酸的饱和酸 ;或者为有机酸,例如苹果酸、柠檬酸、草酸、酒石酸、抗坏血酸、苯甲酸、水杨酸或咖啡酸等。超声条件 :频率 :20-70kHz ;功率 :2.4-6KW ;时间 :1-120 分钟 ;水温 :25-100℃ ;中和萃取为第一种方法,水解后的反应液用氢氧化钠或氢氧化钾中和,其浓度优选 0.2-9mol/L ;萃取用的有机溶剂为石油醚、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、氯仿、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯或正丁醇 ;柱层析用硅胶粒度为 200-300 目 ;水解温度为 :25-100℃,时间 1 分钟-5 天。

[0021] 作为优选的实施方式,上述制备方法中 :取干燥的苦瓜用醇提取,提取液浓缩,浓缩后将浓缩液经盐酸水解,加水离心,收集沉淀部分,干燥沉淀部分即得苦瓜水解产物,离心沉淀为第二种方法。将苦瓜水解产物上 200-300 目硅胶分离,用石油醚-乙酸乙酯 50:1, 30:1, 15:1 的混合液依次洗脱,每个梯度洗脱 5 个柱体积,硅胶薄层定性,合并相同组分, 30:1 组分得到粗品,粗品用乙酸乙酯重结晶后即得含有化合物 I、II、III 和 IV 的混合物,该混合物经高效液相色谱方法制备,用甲醇-水作流动相洗脱,分别得到化合物 I、II、III 和 IV 的单体。

[0022] 上述化合物 I、II、III 和 IV 在制备降血糖药物中的应用。

[0023] 本发明具有以下有益效果 :

[0024] 1、本发明提供了一组具有降血糖作用的新化合物,通过对 PTP1B 抑制试验和药理学试验,证明了该组化合物具有优良的降血糖活性,可制成适合于临床使用的降血糖药物。

[0025] 2、采用本实验的筛选方法从中药苦瓜中分离纯化了化合物 I、II、III 和 IV,且纯度达到 98% 以上。上述化合物为从天然植物中提取分离,具有结构新颖、作用独特的优点,一方面可与药物赋形剂制成适合于临床使用的降血糖药物,另一方面也可作为先导新化合物,对其构效关系进行进一步研究,合成一系列的降血糖药物和药物组合。

[0026] 3、中药及其制剂质量的稳定和可控一直是中药现代化的瓶颈,上述化合物为中药苦瓜的有效成分之一,可以作为苦瓜药材及其制剂质量控制的指标,在其基础上建立以该成分为指标的鉴别和含量测定项目的质量控制标准,实现苦瓜药材及其制剂质量的稳定和可控,上述化合物将作为中药对照品广泛使用。

## 具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但发明的实施方式不限于此。

[0028] 实施例 1 :

[0029] 取干燥的苦瓜未成熟果实用 70% 乙醇加热回流提取,提取 2 次,每次提取 2 小时,过滤,合并滤液,减压回收溶剂得到乙醇苦瓜提取物。经酸水解(方法见实施例 3-9),制得苦瓜水解产物。将苦瓜水解产物上 200-300 目硅胶分离,用石油醚-乙酸乙酯 50:1, 30:1, 15:1 梯度洗脱,每个梯度洗脱 5 个柱体积,硅胶薄层定性,合并相同组分,30:1 洗脱收集部分得到化合物 I、II、III 和 IV 的混合物。该混合物经高效液相色谱方法制备,液相条件为 :温度 :室温 ;紫外检测波长 :203nm ;流动相 :92% 甲醇-水 ;流速 :3.5mL/min ;最大进样量 /

次： $< 1\text{mg}$ ，4 个色谱峰之间有良好的分离度，故确定此条件为制备分离的最佳液相条件，峰 1（化合物 I）的保留时间为 27.8 分钟，峰 2（化合物 II）的保留时间为 31.6 分钟、峰 3（化合物 III）的保留时间为 35.2 分钟、峰 4（化合物 IV）的保留时间为 40.2 分钟。经过拆分，得到化合物 I 为 20mg、化合物 II 为 12mg、化合物 III 为 40mg、化合物 IV 为 20mg，纯度均为 98%。

#### [0030] 新化合物的结构测定

[0031] 用 Shimadzu UV-2201 分光光度计测定紫外光谱，用 Bruker IFS-55 (KBr 压片) 分光光度计测定红外光谱，用 Perkin-Elmer polarimeter 测定旋光度，用 LCQ mass analyzer 测定 ESI-MS，用 BIC micro TOF-Q mass spectrometer 测定 HR-TOF-MS， $^1\text{H}$ - 和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱用 Bruker AV-600 和 ARX-300，TMS 做内标。

[0032] 化合物 I 白色粉末（甲醇）。UV(cyclohexane)  $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$  211.0(3.20) nm； $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -98(\text{c}0.2, \text{cyclohexane})$ ；IR(KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3501、2917、2849、1702、1646、1471、1383、1115、1083 $\text{cm}^{-1}$ ；HR-ESI-MS 的准分子离子峰： $m/z$  523.3731  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$ ，计算值为 523.3758)，结合 NMR 推测化合物的分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )： $\delta$  0.851(3H, s)、0.853(3H, s)、0.88(3H, s)、1.25(3H, s)、1.70(3H, s)、1.78(3H, s)、0.91(3H, d,  $J=6.3\text{Hz}$ ) 为七个甲基质子信号， $\delta$  3.23(3H, s)、3.43(3H, s) 为两个甲氧基质子信号，同时存在  $\delta$  5.98(1H, dd,  $J=3.3, 9.6\text{Hz}$ )、5.64(1H, dd,  $J=3.0, 9.6\text{Hz}$ ) 和 4.95(1H, d,  $J=8.7\text{Hz}$ ) 烯氢质子信号。 $^{13}\text{C}$  NMR(75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出了 32 个碳信号。 $\delta$  55.2、58.1 为两个甲氧基碳信号， $\delta$  136.3、132.7、130.9 和 126.2 为烯碳信号， $\delta$  86.7 一个连氧次甲基碳信号， $\delta$  112.4 一个缩醛次甲基碳信号。综上所述故鉴定化合物 I 为  $5\alpha, 19\text{S-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3}\beta\text{-ol}$  为一未见报道的新化合物，碳氢谱数据归属和化学结构见表 1。

[0033] 化合物 II 白色粉末（甲醇）。UV(cyclohexane)  $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$  211.2(3.20) nm； $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -67(\text{c}0.2, \text{cyclohexane})$ ；IR(KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3526、2953、2876、1732、1647、1466、1383、1111、1080 $\text{cm}^{-1}$ ；HR-ESI-MS 的准分子离子峰： $m/z$  523.3746  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$ ，计算值为 523.3758)，结合 NMR 推测化合物的分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )： $\delta$  0.85(3H, s)、1.78(3H, s)、1.71(3H, s)、0.88(3H, s)、1.25(3H, s)、0.85(3H, s)、0.91(3H, d,  $J=6.3\text{Hz}$ ) 为七个甲基质子信号， $\delta$  3.23(3H, s)、3.43(3H, s) 为两个甲氧基质子信号，同时存在  $\delta$  5.50(1H, dd,  $J=3.6, 9.6\text{Hz}$ )、6.08(1H, dd,  $J=1.8, 9.6\text{Hz}$ ) 和 4.91(1H, br d,  $J=9.6\text{Hz}$ ) 烯氢质子信号。 $^{13}\text{C}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出了 32 个碳信号。 $\delta$  55.2、57.2 为两个甲氧基碳信号， $\delta$  136.3、133.0、130.4 和 126.1 为烯碳信号， $\delta$  85.0 一个连氧次甲基碳信号， $\delta$  114.7 一个缩醛次甲基碳信号。化合物 II 的晶体属于斜方晶系，晶胞参数为  $a = 11.875(9) \text{ \AA}$ ， $b = 9.375(7) \text{ \AA}$ ， $c = 13.860(10) \text{ \AA}$ ， $\alpha = 90^\circ$ ， $\beta = 105.950(8)^\circ$ ， $\gamma = 90^\circ$ ， $V = 1483.6(19) \text{ \AA}^3$ ， $Z=1$ ， $D_c=0.968\text{mg}/\text{cm}^3$ ，最终获得一致性因子  $R_1=0.0413$ ， $wR_2=0.0934(w=1/\sigma |F|^2)$ ， $S=1.064$ 。X 射线单晶衍射结构分析显示，化合物 2 含有三个六元环和两个五元环结构。相对构型由 NOESY 谱图阐明，绝对构型见前文结构式 II。综上所述故鉴定化合物 II 为  $5\alpha, 19\text{R-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3}\beta\text{-ol}$  为一未见报道的新化合物，碳氢谱数据归属和化学结构见表 1。

[0034] 化合物 III 白色粉末 ( 甲醇 )。UV(cyclohexane)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  210.4(3.20) nm;  $[\alpha]_D^{20} = -74$ (c0.2, cyclohexane); IR(KBr)  $\nu_{\max}$  3471、2926、2882、1732、1647、1469、1383、1115、1084  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-ESI-MS 的准分子离子峰 :m/z 523.3752  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$ , 计算值为 523.3758), 结合 NMR 推测化合物的分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。  $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88(3H, s)、1.74(3H, s)、1.68(3H, s)、0.85(3H, s)、1.22(3H, s)、0.85(3H, s)、0.925(3H, d, J=6.6Hz) 为七个甲基质子信号,  $\delta$  3.12(3H, s)、3.43(3H, s) 为两个甲氧基质子信号, 同时存在  $\delta$  5.964(1H, dd, J=3.3, 9.3Hz)、5.63(1H, dd, J=3.0, 9.3Hz) 和 5.023(1H, br d, J=8.4Hz) 烯氢质子信号。  $^{13}\text{C}$  NMR(75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出了 32 个碳信号。  $\delta$  55.7、57.2 为两个甲氧基碳信号,  $\delta$  134.4、132.8、130.9 和 127.0 为烯碳信号,  $\delta$  86.7 一个连氧次甲基碳信号,  $\delta$  112.0 一个缩醛次甲基碳信号。化合物 3 的晶体属于斜方晶系、晶胞系数为  $a = 7.365(2) \text{ \AA}$ ,  $b = 9.140(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 44.174(12) \text{ \AA}$ ,  $a = b = c = 90^\circ$ ,  $V = 2973.6(13) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 1$ ,  $D_c = 1.001 \text{ mg/cm}^3$ , 最终获得一致性因子  $R_1 = 0.0729$ ,  $wR_2 = 0.1449$  ( $w = 1/s|F|^2$ ),  $S = 1.019$ 。X 射线单晶衍射结构分析显示, 化合物 3 含有三个六元环和两个五元环结构。23 位甲氧基是在平面下。相对构型由 NOESY 谱图证明, 绝对构型见前文结构式 III。综上所述故鉴定化合物 III 为 5 $\beta$ , 19R-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3 $\beta$ -ol, 为一未见报道的新化合物。碳氢谱数据归属和化学结构见表 1。

[0035] 化合物 IV 白色粉末 ( 甲醇 )。UV(cyclohexane)  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$  210.8(3.20) nm;  $[\alpha]_D^{20} = -26.5$ (c0.2, cyclohexane); IR(KBr)  $\nu_{\max}$  3525、2939、2875、1732、1647、1466、1382、1113、1083  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-ESI-MS 的准分子离子峰 :m/z 523.3750  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Na}$ , 计算值为 523.3758), 结合 NMR 推测化合物的分子式为  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。  $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.88(3H, s)、1.74(3H, s)、1.68(3H, s)、0.88(3H, s)、1.25(3H, s)、0.85(3H, s)、0.94(3H, d, J=6.3Hz) 为七个甲基质子信号,  $\delta$  3.21(3H, s)、3.40(3H, s) 为两个甲氧基质子信号, 同时存在  $\delta$  5.51(1H, dd, J=3.6, 9.9Hz)、6.08(1H, dd, J=1.5, 9.6Hz) 和 5.02(1H, br d, J=8.7Hz) 烯氢质子信号。  $^{13}\text{C}$  NMR(75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 给出了 32 个碳信号。  $\delta$  55.7、57.3 为两个甲氧基碳信号,  $\delta$  134.5、133.0、130.5 和 127.0 为烯碳信号,  $\delta$  85.1 一个连氧次甲基碳信号,  $\delta$  114.7 一个缩醛次甲基碳信号。综上所述故鉴定化合物 IV 为 5 $\beta$ , 19S-epoxy-19, 23-dimethoxycucurbita-6, 24-dien-3 $\beta$ -ol 为一未见报道的新化合物, 碳氢谱数据归属和化学结构见表 1。

[0036] 表 1 化合物 I - IV 的  $^{13}\text{C}$  NMR(75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 和  $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 光谱数据  
[0037]

碳原子	<sup>13</sup> C NMR				<sup>1</sup> H NMR			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	17.4	16.5	17.4	16.5	1.51	1.37,1.97	1.50	1.36,2.03
2	27.1	27.1	27.2	27.1	1.78	1.73	1.8	1.74
3	76.5	76.2	76.5	76.2	3.43(br, s)	3.39(br, s)	3.43(br, s)	3.44(br, s)
4	37.2	37.0	37.3	37.1				
5	86.7	85.0	86.8	85.0				
6	132.7	133.0	132.8	133.0	5.64(dd,3.0, 9.3)	6.08(dd,1.8, 9.6)	5.63(dd,3. 0,9.3)	6.08(dd,1. 5,9.6)
7	130.9	130.4	130.9	130.5	5.98(dd,3.3, 9.3)	5.50(dd,3.6, 9.6)	5.96(dd,3. 3,9.3)	5.51(dd,3. 6,9.9)
8	41.6	49.7	41.6	49.8	2.88(br, s)	2.24(br, s)	2.89(br, s)	2.26(br, s)
9	48.3	48.9	48.3	49.0				
10	40.5	37.8	40.5	37.9	2.42(dd)	2.31(dd,6,1 2)	2.40(dd)	2.31(dd,6, 12)
11	23.1	21.4	23.2	21.4	1.77, 1.62	1.73, 1.65	1.74, 1.61	1.74,1.65
12	30.6	30.4	30.7	30.6	1.61	1.62	1.61	1.63
13	45.0	45.1	45.1	45.2				
14	48.0	48.0	48.0	48.1				
15	33.4	33.4	33.4	33.4	1.32	1.29	1.31	1.29
16	28.1	28.0	28.0	27.9	1.96, 1.35	1.97, 1.30	1.92,1.40	1.93,1.40
17	50.9	51.0	51.0	51.0	1.47	1.46	1.40	1.40
18	14.5	14.8	14.7	15.0	0.85(s)	0.85(s)	0.88(s)	0.88(s)
19	112.0	114.7	112.1	114.7	4.63(s)	4.42(s)	4.65(s)	4.42(s)
20	33.1	33.1	32.5	32.5	1.38	1.38	1.725	1.74
21	19.4	19.4	18.7	18.7	0.91(d,6.3)	0.91(d,6.3)	0.93(d,6.6)	0.94(d,6.3)
22	42.2	42.2	42.8	42.8	1.52,1.39	1.52, 1.38	1.69, 0.99	1.70, 1.00
23	76	75.9	74.7	74.6	3.93(dt,3.0, 9.3)	3.92(dt,3.9, 9.3)	3.95(dt,3. 0,9.3)	3.94(dt,3. 0,9.3)

[0038]

24	126.2	126.2	128	127	4.95(br d,8.7)	4.91(br d,9.6)	5.02(br d,8.4)	5.02(br d,8.7)
25	136.3	136	134.5	134				
26	25.8	25.8	25.8	25.8	1.78(s)	1.78(s)	1.74(s)	1.74(s)
27	18.4	18.4	18.1	18.1	1.70(s)	1.71(s)	1.68(s)	1.68(s)
28	24	24.4	24.1	24.4	0.88(s)	0.88(s)	0.85(s)	0.88(s)
29	20.4	20.6	20.5	20.6	1.25(s)	1.25(s)	1.22(s)	1.25(s)
30	19.7	19.9	19.8	19.9	0.85(s)	0.85(s)	0.85(s)	0.85(s)
OMe-19	58.1	57.2	58.2	57.2	3.43(s)	3.43(s)	3.43(s)	3.40(s)
OMe-23	55.2	55.2	55.6	55.7	3.23(s)	3.23(s)	3.21(s)	3.21(s)

[0039] 实施例 2

[0040] 上述化合物抑制 PTP1B 的活性实验

[0041] 抑制 PTP1B 酶的活性实验在 96 孔板中进行, 实验组依次加入 83  $\mu$  L 含酶缓冲溶液、10  $\mu$  L 待测样品溶液和 4  $\mu$  L 底物溶液, 阳性对照组依次加入 83  $\mu$  L 含酶缓冲溶液、10  $\mu$  L 钒酸钠溶液和 4  $\mu$  L 底物溶液。试剂对照组加入 83  $\mu$  L 含酶溶液、10  $\mu$  L DMSO 溶液和 4  $\mu$  L 底物溶液, 在恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟后, 用 5  $\mu$  L NaOH 终止反应。通过酶标仪测量产物在 410nm 处的紫外吸收强度。

[0042] 溶液配制

[0043] ①储存液

[0044] 分别取 0.6055g Tris 和 0.0584g EDTA 加蒸馏水稀释至 20mL, 用浓盐酸调节 pH 至 7.5。终浓度 Tris-HCl 为 250mM, EDTA 为 10mM。

[0045] 保存条件: 4 $^{\circ}$ C 可长期保存。

[0046] ②缓冲液

[0047] 取 1mL 储存液, 加蒸馏水稀释至 10mL, 并加入 0.0015g DTT 和 0.718  $\mu$  L  $\beta$ -mercaptoethanol。此时缓冲液含 25mM Tris-HCl、1mM EDTA、1mM DTT、2mM  $\beta$ -mercaptoethanol。

[0048] 此溶液需现用现配。

[0049] ③底物溶液

[0050] 称取 0.1856g 于 pNPP 1.5mL EP 管, 用 1mL 缓冲溶液稀释。

[0051] 保存条件: 用锡纸包裹, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 的冰柜中。

[0052] ④钒酸钠溶液

[0053] 取 0.816g 十二水钒酸钠, 加 100mL 蒸馏水, 将溶液加热沸腾至半透明, 并调节 pH 至 10 左右, 用移液枪取 1mL 溶液至 100mL 烧杯中, 用玻璃棒搅拌混匀, 再次加热至沸腾至半透明, 确保钒酸钠为单体形式, 待冷却后分装于 1.5mL EP 管中, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

[0054] ⑤ PTP1B 酶溶液

[0055] 原始包装为 50  $\mu$  g / 50  $\mu$  L, 含 25mM Tris-HCl (pH 7.5),

2mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mM EDTA, 1mM DTT 和 20%Glycerol。

[0056] 保存条件 :4℃冻存 2-4 周, -20℃冻存时间更长, 若长时间冻存可添加 0.1% 牛血清白蛋白或人血清白蛋白。避免反复冻融。

[0057] 使用时取 35.4  $\mu$ L 酶溶液加缓冲液稀释至 8.3mL, 可供 96 孔使用。可根据每次实验新化合物数量、浓度梯度、平行数量按比例配置 PTP1B 酶溶液。

[0058] ⑥待测样品溶液

[0059] 用 EP 管准确称量新化合物, 溶解在 DMSO 中, 使浓度为 10mmol/L, 成为原液。

[0060] 用移液枪取 30  $\mu$ L 原液, 加 970  $\mu$ L DMSO, 用振荡器混合均匀, 成为待测样品溶液 1。从待测样品溶液 1 中取 30  $\mu$ L 加 70  $\mu$ L DMSO, 成为待测样品溶液 2, 即为高浓度和低浓度待测样品溶液。

[0061] ⑦终止溶液

[0062] 2M NaOH。

[0063] 评价指标

[0064] 测定在不同浓度下对基因重组 PTP1B 的相对抑制率的计算公式如下：

[0065]

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

[0066] 其中对照组为试剂对照组。

[0067] 表 2 化合物对 PTP1B 的相对抑制率

[0068]

化合物	抑制率%(30 $\mu$ M)	抑制率%(9 $\mu$ M)
I	77 $\pm$ 1.3	57 $\pm$ 2.1
II	62 $\pm$ 1.3	44 $\pm$ 3.2
III	40 $\pm$ 2.6	32 $\pm$ 4.0
IV	62 $\pm$ 3.6	32 $\pm$ 4.0
阳性对照组 Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	抑制率 44 (30 $\mu$ M)	

[0069]

[0070] 以上实验数据表明, 化合物 I、II、III 和 IV 对 PTP1B 具有显著的抑制作用, 它们的浓度为 30  $\mu$ M 的抑制率分别为 77%, 62%, 40% 和 62%。

[0071] 实施例 3 苦瓜提取物的盐酸水解法

[0072] 3.1 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加浓盐酸 10mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 50kHz; 功率: 3KW; 时间: 30 分钟; 在温度 40℃水解 12h。水解后的反应液加水 1000mL, 静置后沉淀部分用水洗反复至中性后静置, 收集沉淀, 滤过, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0073] 3.2 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加浓盐酸 10mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 50kHz; 功率: 3KW; 时间: 30 分钟; 在温度 40°C 水解 12h, 水解液用 2.5mol/L 氢氧化钠中和后用氯仿萃取, 水洗至中性, 加无水硫酸钠脱水, 回收氯仿液后收集残余物, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0074] 实施例 4 苦瓜提取物的硫酸水解法

[0075] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加 44% 硫酸 15mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 50kHz; 功率: 3KW; 时间: 20 分钟; 在温度 40°C 水解 8 小时。水解后的反应液加水 1000mL, 静置后沉淀部分用水洗反复至中性后静置 24 小时, 收集沉淀, 滤过, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0076] 实施例 5 苦瓜提取物的高氯酸水解法

[0077] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加 43% 高氯酸 16mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 40kHz; 功率: 2KW; 时间: 30 分钟; 在温度 40°C 水解 12h, 水解液用 3.0mol/L 氢氧化钠中和后用氯仿萃取, 水洗至中性, 加无水硫酸钠脱水, 回收氯仿液后收集残余物, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0078] 实施例 6 苦瓜提取物的磷酸水解法

[0079] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加 45% 磷酸 15mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 50kHz; 功率: 3KW; 时间: 60 分钟; 在温度 40°C 水解 24h, 水解液用 2.5mol/L 氢氧化钠中和后用氯仿萃取, 水洗至中性, 加无水硫酸钠脱水, 回收氯仿液后收集残余物, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0080] 实施例 7 苦瓜提取物的冰醋酸水解法

[0081] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加冰醋酸 8.3mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 60kHz; 功率: 3KW; 时间: 50 分钟; 在温度 50°C 水解 12h, 水解液用 2.5mol/L 碳酸钠中和后用氯仿萃取, 水洗至中性, 加无水硫酸钠脱水, 回收氯仿液后收集残余物, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0082] 实施例 8 苦瓜提取物的甲酸水解法

[0083] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加甲酸 5.0mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 60kHz; 功率: 3KW; 时间: 50 分钟; 在温度 50°C 水解 12h, 水解后的反应液加水 1000mL, 静置后沉淀部分用水洗反复至中性后静置 24 小时, 收集沉淀, 滤过, 干燥后即得苦瓜水解产物。

[0084] 实施例 9 苦瓜提取物的柠檬酸水解法

[0085] 称取苦瓜提取物 10g, 超声溶于 50mL 甲醇, 缓缓滴加柠檬酸 3.0mL (同时搅拌) 后进行超声水解。超声条件: 频率: 60kHz; 功率: 3KW; 时间: 60 分钟; 在温度 50°C 水解 12h, 水解液用 2.0mol/L 碳酸钠中和后用氯仿萃取, 水洗至中性, 加无水硫酸钠脱水, 回收氯仿液后收集残余物, 干燥后即得苦瓜水解产物。