

# 老瓜头乙酸乙酯提取部位化学成分及其抗氧化与酪氨酸酶抑制活性研究

孙茹茹, 杨静玲, 南泽东, 江志波, 马晓莉\*

北方民族大学化学与化学工程学院 化工技术基础国家民委重点实验室, 银川 750021

**摘要:** 为挖掘药用植物老瓜头的活性成分, 对老瓜头全草的乙酸乙酯提取部位进行化学成分分离, 并考察其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性。采用各种色谱手段从中分离得到 10 个化合物, 通过波谱学方法鉴定结构为 3-甲氧基-4-羟基苯乙酮 (1)、3,4-二甲氧基苯乙酮 (2)、6,7-二甲氧基香豆素 (3)、6-甲氧基-7-羟基香豆素 (4)、对羟基苯丙酮 (5)、对羟基苯乙酮 (6)、10a,12a-dimethyl-4,4a,4b,10b,11,12-hexahydro-3H-naphtho[2,1-f]chromene-2,8-dione (7)、ent-13S-hydroxy-16-atrisene-3,14-dione (8)、3-吡啶甲醛 (9)、反式肉桂酸 (10)。其中化合物 7~10 为首次从老瓜头中分离得到。分别通过 DPPH 自由基清除法和酪氨酸酶催化左旋多巴氧化速率法考察化合物的抗氧化活性和酪氨酸酶抑制活性。结果表明化合物 1、2、4 和 5 对 DPPH 自由基有一定的清除能力, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 37.3、44.3、51.4、48.2 μg/mL。化合物 1、2、3、4 和 6 对酪氨酸酶有显著的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 15.7、22.3、8.3、7.1、39.8 μg/mL, 均强于阳性对照熊果苷。

**关键词:** 老瓜头; 化学成分; 抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities

SUN Ru-ru, YANG Jing-ling, NAN Ze-dong, JIANG Zhi-bo, MA Xiao-li\*

Key Laboratory for Chemical Engineering and Technology of State Ethnic Affairs Commission, School of Chemistry and Chemical Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China

**Abstract:** In order to systematically explore the active ingredients of the medicinal plant *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski, compounds were isolated by various chromatographic techniques from the ethyl acetate extraction of *C. komarovii* whole plant, and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities were also studied. As a result, ten compounds were obtained and their structures were identified by spectroscopy methods as 3-methoxy-4-hydroxyacetophenone (1), 3,4-dimethoxyacetophenone (2), 6,7 -dimethoxycoumarin (3),

6-methoxy-7-hydroxycoumarin (4), *p*-hydroxypropiophenone (5), *p*-hydroxyacetophenone (6), 10a,12a-dimethyl-4,4a,4b,10b,11,12-hexahydro-3H-naphtho[2,1-f]chromene-2,8-dione (7), ent-13S-hydroxy-16-atrisene-3,14-dione (8), 3-indole formaldehyde (9), *trans*-cinnamic acid (10). Compounds 7-10 were isolated from *Cynanchum komarovii* for the first time. The antioxidant and anti-tyrosinase activities of these compounds were investigated by using the DPPH free radical method and colorimetric method with *L*-tyrosine as substrate. The results showed that compounds 1, 2, 4 and 5 have certain scavenging ability on DPPH free radicals with the IC<sub>50</sub> are 37.3, 44.3, 51.4 and 48.2 μg/mL, respectively. Compounds 1, 2, 3, 4 and 6 showed significant tyrosinase inhibitory effects, with the IC<sub>50</sub> are 15.7, 22.3, 8.3, 7.1 and 39.8 μg/mL, respectively, stronger than the positive control arbutin.

**Keywords:** *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski; chemical constituents; antioxidant activity; tyrosinase inhibitory activity

老瓜头 (*Cynanchum komarovii* Al. Iljinski), 为萝藦科 (Asclepiadaceae) 鹅绒藤属 (*Cynanchum* Linn.) 多年生草本植物, 又名牛心朴子草、黑心脖子, 广泛分布于我国西北荒漠和干旱沙漠地带, 集中分布于宁夏、甘肃、河北和内蒙古等省区, 常见于海拔 2 000 m 左右的沙漠及黄河岸边或荒山坡, 是干旱草原、荒漠草原标志性植物之一<sup>[1]</sup>。老瓜头味苦、性温, 具有活血、镇痛、消炎、抗菌等作用, 是多个民族的民间习用药材, 在《内蒙古植物志》中有记录<sup>[2]</sup>。蒙医多用于治疗各种关节疼痛, 牙痛; 藏医用于止泻、退烧, 也可用于治疗胆囊炎。另外, 从老瓜头中提取的总生物碱可用作杀虫的农药<sup>[3]</sup>。

早期研究表明, 老瓜头中含有挥发性油、生物碱、多糖、黄酮类、C<sub>21</sub>甾体等化合物, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌, 镇痛、止咳等药理作用<sup>[4-6]</sup>。Qi 等<sup>[7]</sup>对老瓜头植物的总生物碱进行分离研究, 共得到 4 个生物碱单体。Wang 等<sup>[8]</sup>对老瓜头 90%乙醇粗提取物进行分离, 从氯仿萃取段分离得到 5 种新的 C<sub>21</sub>甾体苷和 2 种已知的 C<sub>21</sub>甾体苷, 并通过波谱学方法确定了这些糖苷的化学骨架。Yang 等<sup>[9]</sup>通过 MTT 法检测老瓜头生物总碱对 B16 细胞增殖的抑制作用, 结果表明老瓜头生物总碱可抑制 B16 细胞增殖, 且呈时间依赖性和浓度依赖性, 同时可以诱导 B16 细胞凋亡。Dan 等<sup>[10]</sup>从老瓜头全草 95%乙醇提取物中分离得到 2 种新的 C<sub>21</sub>甾体, 采用 MTT 法测定出 2 种化合物对 HL-60 细胞系 (人白血病早幼粒细胞) 有较强的抑制活性。目前大多数报道主要集中在老瓜头中生物碱和 C<sub>21</sub>甾体类化学成分分离及活性的研究, 而对其他化学成分报道相对较少。为进一步探究老瓜头全草中其他活性成分及其药用价值, 本研究采用各种色谱手段及波谱学技术对老瓜头乙酸乙酯提取部位进行了系统的

化学成分分离，通过 DPPH 自由基清除实验和酪氨酸酶催化左旋多巴氧化实验对单体化合物的抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性进行考察，以期为老瓜头在抗氧化剂和酪氨酸酶抑制剂等方面的应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器与试剂

老瓜头药材于 2021 年 8 月采自宁夏灵武市，由四川省食品药品学校秦运潭副教授鉴定为萝藦科鹅绒藤属植物老瓜头 (*Cynanchum komarovii* Al. Iljinski) 的全草。标本保存于北方民族大学植物标本室。

A Bruker Avance AVIII-500、400 核磁共振仪 (美国 Bruker 公司)；高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。Zorbax XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm, 美国 Agilent Technology 公司)；葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Pharmacia 公司)；薄层硅胶板 (青岛海洋化工厂)；正相硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂)；薄层硅胶预制板 (P-SGF200200100, 烟台华阳新材料科技有限公司)；石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇等 (分析纯, 天津大茂试剂厂)；乙腈、甲醇 (色谱纯, 伊诺凯有限公司)；DPPH (纯度: 99.9%, 批号: Z6B8N-SO, 上海麦克林生化科技有限公司)；抗坏血酸 (V<sub>C</sub>) (纯度: 99.9%, 批号: P1552401, 天津市大茂化学试剂厂)；PBS 缓冲液 (浓度: 0.2 mol/L, 批号: 3070596, 上海尚宝生物科技有限公司)；酪氨酸酶 (纯度: 99.5%, 批号: 9002-10-2, 上海麦克林生化科技有限公司)；左旋多巴 (纯度: 99.5%, 批号: 100170-202105, 上海麦克林生化科技有限公司)；熊果苷 (纯度: 99.5%, 批号: 111951-202001, 罗恩试剂有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 化合物的提取分离

取老瓜头干燥全草 (干重 6.5 kg) 粉碎, 加 90%乙醇-水加热回流 0.5h, 重复提取 3 次, 合并提取液, 减压蒸馏得到 500 g 残留物。加 1L 纯净水超声混悬, 依次使用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取, 减压蒸馏回收溶剂, 分别得到残留物 160.6 g、110 g 和 164 g。将乙酸乙酯提取物经正相硅胶分离 (石油醚-乙酸乙酯, 50 : 1 → 1 : 1) 得到 5 个主要流分 C1~C5。C2 部分 (25 g) 经硅胶分离, 用石油醚-二氯甲烷-甲醇 (20 : 20 : 1 → 2 : 2 : 1) 梯度洗脱, 得 4 个主要流分 C2A~C2D。C2A1 经 MCI 柱色谱 (甲醇-水) 洗脱得 5 个主要流分 A1a~A1e, A1a 经硅胶反复分离最后经 Sephadex LH-20 凝胶纯化得化合物 **6** (7 mg) 和 **8** (8 mg)。A1c1 部分经正相硅胶 (石油醚-二氯甲烷, 2 : 1) 等度洗脱后经 HPLC (Zorbax XDB-C<sub>18</sub>,

乙腈/水=30：70，流速 2.0 mL/min) 色谱分离，得到化合物 **1** (42 mg)。A1c3 经制备板分离 (二氯甲烷-甲醇，1：1)，后经 Sephadex LH-20 纯化得化合物 **2** (2.5 mg) 和 **3** (2.6 mg)。A1c2 经反复硅胶分离后经制备板分离 (二氯甲烷-甲醇，1：1)，后经 Sephadex LH-20 凝胶纯化得化合物 **5** (5 mg)。A1d1 部分经反复硅胶分离后经 HPLC (Zorbax XDB-C<sub>18</sub>，乙腈/水=25：75，流速 2.0 mL/min) 色谱分离，得到化合物 **7** (7 mg)。A1d4 部分经制备板分离 (二氯甲烷-甲醇，1：1)，后经 Sephadex LH-20 凝胶纯化得化合物 **10** (9 mg)。C2A2 经 MCI 柱色谱 (甲醇-水) 洗脱得 5 个主要流分 A2a~A2e，A2b1 部分经反复硅胶分离后经 Sephadex LH-20 凝胶纯化得化合物 **9** (9 mg)。A2b2 经制备板分离 (二氯甲烷-甲醇，1：1)，后经 Sephadex LH-20 纯化得化合物 **4** (5 mg)。

### 1.2.2 抗氧化活性测试

本实验采用 DPPH 自由基清除活性的方法<sup>[11]</sup>。采用 96 孔板加样，以浓度为 0.15 mmol/L DPPH 为底物。实验分为 3 组：其中 A 组为阴性对照，含 160 μL DMSO+40 μL DPPH；B 组为测试样品，含 160 μL 样品溶液+40 μL DPPH；C 组为测试样品对照，含 160 μL 样品溶液+40 μL DMSO；阳性对照为 V<sub>C</sub>，含 160 μL V<sub>C</sub> 溶液+40 μL DPPH。样品在避光条件下反应 30 min，在全波长酶标仪中测定其吸光值 (517nm)，实验重复 3 次，按公式 (1) 计算出 DPPH 自由基清除率 (R<sub>1</sub>)，并计算 IC<sub>50</sub> 值。

$$R_1 = \frac{A_A - (A_B - A_C)}{A_A} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.3 酪氨酸酶抑制活性测试

本实验对酪氨酸酶催化左旋多巴 (L-DOPA) 氧化速率的方法进行了改进<sup>[12]</sup>。采用 96 孔板加样，以 0.2 mol/L PBS 缓冲液作为溶剂，将酪氨酸酶配置成 60 U/mL，左旋多巴配置成 0.5 mmol/L。实验分为 4 组：其中 A 组为空白，含 120 μL PBS；B 组为空白对照，含 90 μL PBS+30 μL 酪氨酸酶溶液；C 组为测试样品对照，含 100 μL PBS+20 μL 样品溶液；D 组为测试样品，含 70 μL PBS+30 μL 酪氨酸酶溶液+20 μL 样品溶液；阳性对照为熊果苷，含 70 μL PBS+30 μL 酪氨酸酶溶液+20 μL 熊果苷溶液。样品在恒温箱中 30 °C 孵育 5 min，后加入 100 μL 左旋多巴，继续孵育 10 min，在全波长酶标仪中测定其吸光值 (492nm)，实验重复 3 次，按公式 (2) 计算酪氨酸酶的抑制率 (R<sub>2</sub>)，并计算 IC<sub>50</sub> 值。

$$R_2 = \frac{(A_B - A_A) - (A_D - A_C)}{(A_B - A_A)} \times 100\% \quad (2)$$

## 2 结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 浅黄色固体；ESI-MS:  $m/z$  189.05  $[M+Na]^+$ ，结合 NMR 数据分析推测分子式为  $C_9H_{10}O_3$ ； $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.52 (1H, dd,  $J=8.3, 2.1$  Hz, H-6)，7.48 (1H, s, H-2)，6.82 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-5)，3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>)，2.50 (3H, s, H-8)； $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 130.2 (C-1)，111.7 (C-2)，149.0 (C-3)，153.8 (C-4)，115.8 (C-5)，125.2 (C-6)，199.4 (C-7)，26.2 (C-8)，56.3 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致，确定化合物 **1** 为 3-甲氧基-4-羟基苯乙酮。

**化合物 2** 黄色固体；ESI-MS:  $m/z$  181.21  $[M+H]^+$ ，结合 NMR 数据分析推测分子式为  $C_{10}H_{12}O_3$ ； $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.58 (1H, dd,  $J=8.3, 2.0$  Hz, H-6)，7.53 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2)，6.89 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-5)，3.95 (3H, s, H-9)，3.93 (3H, s, H-10)，2.57 (3H, s, H-8)； $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 130.6 (C-1)，110.2 (C-2)，149.1 (C-3)，153.4 (C-4)，110.1 (C-5)，123.4 (C-6)，197.0 (C-7)，26.4 (C-8)，56.1 (3-OCH<sub>3</sub>)，56.0 (4-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致，确定化合物 **2** 为 3,4-二甲氧基苯乙酮。

**化合物 3** 无色晶体 (MeOH)；ESI-MS:  $m/z$  207.06  $[M+H]^+$ ，结合 NMR 数据分析推测分子式为  $C_{11}H_{10}O_4$ ； $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.62 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-4)，6.85 (2H, d,  $J=4.2$  Hz, H-5, 8)，6.29 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-3)，3.95 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>)，3.92 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>)； $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 161.6 (C-2)，113.7 (C-3)，143.4 (C-4)，108.1 (C-5)，150.2 (C-6)，153.0 (C-7)，100.2 (C-8)，146.5 (C-9)，111.6 (C-10)，56.5 (6-OCH<sub>3</sub>)，56.5 (7-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致，确定化合物 **3** 为 6,7 二甲氧基香豆素。

**化合物 4** 白色针状结晶 ( $CH_2Cl_2$ )；ESI-MS:  $m/z$  192.07  $[M+H]^+$ ，结合 NMR 数据分析推测分子式为  $C_{10}H_8O_4$ ； $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.60 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-4)，6.92 (1H, s, H-5)，6.85 (1H, s, H-8)，6.27 (1H, d,  $J=9.4$  Hz, H-3)，6.15 (1H, br s, 7-OH)，3.96 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>)； $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 161.5 (C-2)，107.6 (C-3)，143.4 (C-4)，113.6 (C-5)，144.0 (C-6)，149.8 (C-7)，103.3 (C-8)，150.4 (C-9)，111.6 (C-10)，56.6 (6-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致，确定化合物 **4** 为 6-甲氧基-7-羟基香豆素。

**化合物 5** 浅黄色块状晶体 (MeOH)；ESI-MS:  $m/z$  149.84  $[M-H]^-$ ，结合 NMR 数据分析推测分子式为  $C_9H_{10}O_2$ ； $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.89 (2H, d,  $J=8.8$  Hz,

H-2, 6), 6.83 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3, 5), 2.97 (2H, q,  $J = 7.3$  Hz, H-2'), 1.16 (3H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-3');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 129.8 (C-1), 131.7 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 163.8 (C-4), 202.1 (C-7), 32.1 (C-8), 9.0 (C-9)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **5** 为对羟基苯丙酮。

**化合物 6** 白色针状结晶 (MeOH); ESI-MS:  $m/z$  135.82 [M-H]<sup>-</sup>, 结合 NMR 数据分析推测分子式为  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.88 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2, 6), 6.83 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3, 5), 2.52 (3H, s, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 130.2 (C-1), 132.1 (C-2, 6), 116.2 (C-3, 5), 163.9 (C-4), 199.5 (C-7), 26.3 (C-8)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **6** 为对羟基苯乙酮。

**化合物 7** 黄色油状物; ESI-MS:  $m/z$  298.38 [M+H]<sup>+</sup>, 结合 NMR 数据分析推测分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.07 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-1), 6.36 (1H, dd,  $J = 10.0, 3.0$  Hz, H-2), 6.31 (1H, dd,  $J = 10.2, 1.9$  Hz, H-6), 6.13 (1H, dd,  $J = 9.9, 2.2$  Hz, H-7), 6.08 (1H, dd,  $J = 1.8, 0.9$  Hz, H-4), 1.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.19 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 151.8 (C-1), 128.7 (C-2), 186.0 (C-3), 124.6 (C-4), 160.7 (C-5), 129.1 (C-6), 133.8 (C-7), 40.1 (C-8), 46.9 (C-9), 40.9 (C-10), 22.6 (C-11), 38.9 (C-12), 82.2 (C-13), 43.9 (C-14), 19.6 (C-15), 28.3 (C-16), 170.6 (C-17), 20.1 (C-18), 20.5 (C-19)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **7** 为 10a,12a-dimethyl-4,4a,4b,10b,11,12-hexahydro-3H-naphtho[2,1-f]chromene-2,8-dione。

**化合物 8** 白色针状结晶 (MeOH); ESI-MS:  $m/z$  317.21 [M+H]<sup>+</sup>, 结合 NMR 数据分析推测分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.02 (1H, br s, H-17), 4.86 (1H, br s, H'-17), 3.88 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-13), 2.82 (1H, ddd,  $J = 3.1, 3.1, 3.1$  Hz, H-12), 2.55 (1H, ddd,  $J = 15.8, 13.2, 6.3$  Hz, H-2), 2.41 (1H, ddd,  $J = 13.5, 4.1, 4.1$  Hz, H-7), 2.32 (1H, m, H-15), 1.86 (1H, ddd,  $J = 13.3, 9.6, 3.2$  Hz, H-1), 1.76 (1H, m, H'-11), 1.08 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.00 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 0.84 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -20);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 36.8 (C-1), 34.2 (C-2), 216.3 (C-3), 47.4 (C-4), 55.2 (C-5), 20.1 (C-6), 30.5 (C-7), 47.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.7 (C-10), 25.4 (C-11), 44.9 (C-12), 75.2 (C-13), 218.2 (C-14), 43.8 (C-15),

142.4 (C-16), 111.3 (C-17), 26.3 (Me, C-18), 22.0 (Me, C-19), 13.8 (Me, C-20)。

以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **8** 为 ent-13S-hydroxy-16-atrisene-3,14-dione。

**化合物 9** 白色固体; ESI-MS:  $m/z$  144.04 [M-H]<sup>-</sup>, 结合 NMR 数据分析推测分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.88 (1H, s, -CHO), 8.14 (1H, d,  $J=7.8$ Hz, H-4), 8.11 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-7), 7.24 (2H, m, H-5, 6); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 139.8 (C-2), 120.1 (C-3), 122.4 (C-4), 123.6 (C-5), 125.0 (C-6), 113.1 (C-7), 138.9 (C-8), 125.7 (C-9), 187.4 (3-CHO)。以上数据与文献<sup>[21]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **9** 为 3-吡啶甲醛。

**化合物 10** 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  149.01 [M+H]<sup>+</sup>, 结合 NMR 数据分析推测分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.64 (1H, d,  $J=13$  Hz, H-7), 7.56 (2H, m, H-2, 6), 7.39 (3H, m, H-3, 4, 5), 6.49 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 136.1 (C-1), 130.0 (C-2, 6), 129.1 (C-3, 5), 131.2 (C-4), 145.3 (C-7), 120.7 (C-8), 171.4 (C-9)。以上数据与文献<sup>[22]</sup>报道基本一致, 确定化合物 **10** 为反式肉桂酸。

化合物 **1~10** 的化学结构见图 1。

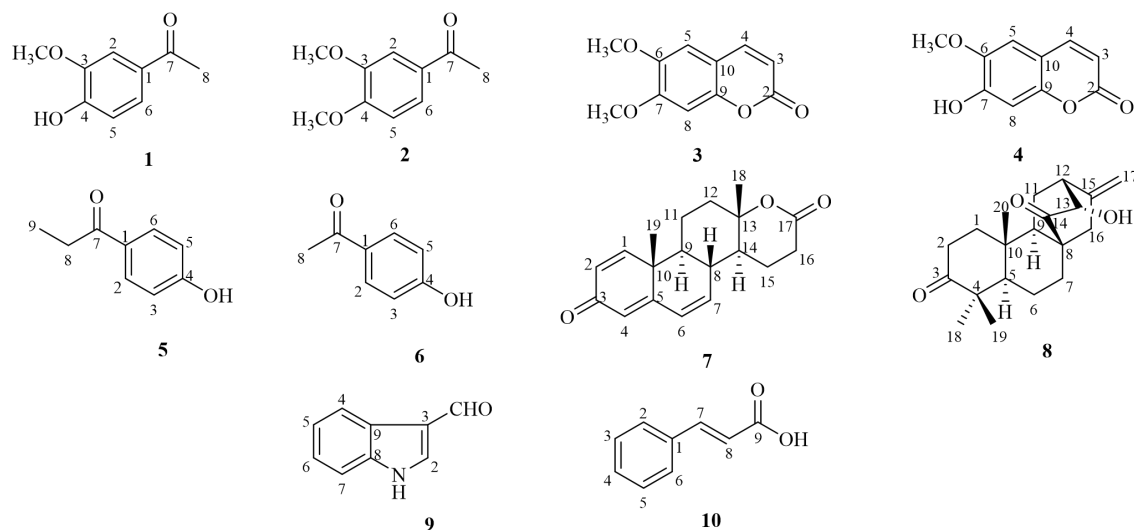


图 1 化合物 **1~10** 的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds **1-10**

## 2.2 化合物抗氧化活性结果

实验以 Vc 溶液为阳性对照, 其清除率为 75.1%, IC<sub>50</sub> 为 24.4  $\mu$ g/mL。对 10 个单体化合物进行抗氧化活性测试, 发现化合物 **1**、**2**、**4**、**5** 在浓度为 100  $\mu$ g/mL 下清除率均高于 50%, 具有一定的 DPPH 自由基清除能力 (表 1)。进一步计算化合物的 IC<sub>50</sub> 值, 结果表明 **1** 的抗

氧化活性最高，其  $IC_{50}$  为  $37.3 \mu\text{g/mL}$ 。不同浓度化合物 DPPH 自由基清除结果见图 2，其中化合物 1、4 和 5 清除能力与浓度基本成正量效关系，说明其抗氧化活性随化合物浓度升高而增大。

表 1 化合物 1-10 对 DPPH 自由基的清除能力 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 The scavenging ability of compounds 1-10 on DPPH radicals ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物	清除率	$IC_{50}$
Compound	Scavenging rate (%)	( $\mu\text{g/mL}$ )
1	56.7	37.3
2	50.2	44.3
3	47.9	—
4	52.9	51.4
5	51.9	48.2
6	46.7	—
7	30.4	—
8	38.0	—
9	41.5	—
10	36.4	—
V <sub>C</sub>	75.1	24.4

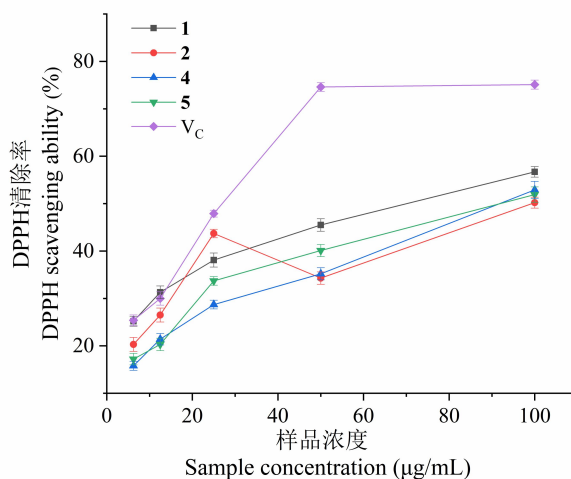


图 2 不同浓度样品对 DPPH 的清除率

Fig. 2 Effects of samples at different concentrations on DPPH radical scavenging activity

### 2.3 化合物酪氨酸酶抑制活性结果

实验中以熊果苷溶液作为阳性对照，其抑制率为 51.4%， $IC_{50}$  为  $41.1 \mu\text{g/mL}$ 。对 10 个



单体化合物进行酪氨酸酶抑制活性测试，发现化合物 **1**、**2**、**3**、**4**、**6** 在浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  下抑制率均高于 50%，具有显著的酪氨酸酶抑制活性（见表 2）。进一步计算化合物的  $\text{IC}_{50}$  值，结果表明，实验条件下上述 5 个化合物的抑制活性均优于阳性对照（41.1  $\mu\text{g/mL}$ ），特别是化合物 **4**，表现出最高的酪氨酸酶抑制活性，其  $\text{IC}_{50}$  为 7.1  $\mu\text{g/mL}$ 。不同浓度化合物酪氨酸酶抑制结果见图 3，其抑制能力与浓度基本成正量效关系，表明其抑制活性随化合物浓度的升高而增大。

表 2 化合物 1~10 对酪氨酸酶的抑制能力 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 The inhibitory ability of compounds 1-10 on tyrosinase ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物	抑制率	$\text{IC}_{50}$
Compound	Inhibition rate (%)	( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>1</b>	85.4	15.7
<b>2</b>	75.8	22.3
<b>3</b>	88.9	8.3
<b>4</b>	95.3	7.1
<b>5</b>	28.5	—
<b>6</b>	71.8	39.8
<b>7</b>	45.6	—
<b>8</b>	24.9	—
<b>9</b>	24.7	—
<b>10</b>	36.9	—
熊果苷 Arbutin	51.4	41.1

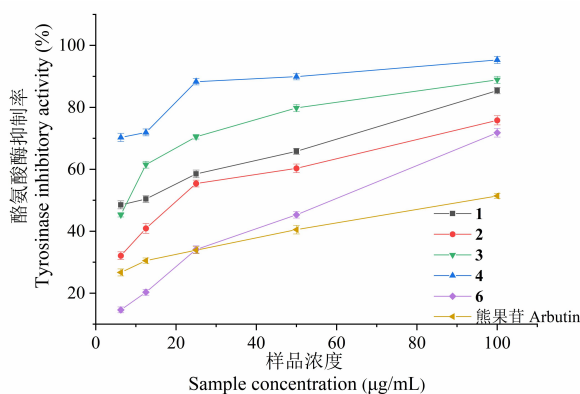


图 3 不同浓度样品对酪氨酸酶的抑制率

Fig. 3 Inhibitory activity of samples at different concentrations on tyrosinase

### 3 讨论与结论

本研究运用各种色谱分离技术和波谱学方法从老瓜头的乙酸乙酯提取部位分离得到 10 个单体化合物, 其中化合物 7~10 为首次从老瓜头中分离得到。对分离得到的单体化合物进行抗氧化活性和酪氨酸酶抑制活性的测试。结果发现化合物 1、2、4、5 对 DPPH 自由基的清除率高于 50%, 具有一定的抗氧化活性。化合物 1、2、3、4、6 对酪氨酸酶有较高的抑制活性, 实验条件下其活性均强于对照熊果苷。这些活性化合物均含有羟基和烷氧基取代的芳烃结构, 其中化合物 1、2、5 和 6 是取代苯乙酮母核。有研究表明苯乙酮类化合物在抗氧化方面有显著的效果, 羟基取代的位置和个数对其活性有较大影响<sup>[23]</sup>。本研究中, 抗氧化活性的顺序为 1>2>5>4, 其中 1、2 和 5 均为取代苯乙酮结构, 且 1 和 2 取代基个数多于 5, 表明苯环上取代基个数越多活性越强。而化合物 1 为羟基取代且具有最高的抗氧化活性, 可能与酚羟基提供质子, 阻断自由基反应, 从而增强抗氧化活性有关<sup>[24]</sup>。酪氨酸酶抑制活性大小为 4>3>1>2>6, 其中化合物 3 和 4 为简单香豆素母核结构。有文献报道取代的香豆素类具有较好的酪氨酸酶抑制活性, 且作用强度与香豆素母核上取代基的种类以及位置密切相关<sup>[25]</sup>。本文中化合物 3 和 4 酪氨酸酶抑制活性的 IC<sub>50</sub> 分别为 8.3 和 7.1 μg/mL, 显著强于阳性对照, 其中 3 含两个烷氧基取代, 而 4 则是烷氧基和羟基取代, 表明羟基取代的香豆素类具有更高的酶抑制活性。多羟基取代易与酶活性中心的离子发生螯合, 且能与酪氨酸酶中氨基酸残基形成氢键, 从而改变酪氨酸酶活性中心的构象, 进而影响酶活性<sup>[26]</sup>。另外化合物 4 具有抗氧化活性亦与其母核中酚羟基取代有关。苯乙酮类化合物酪氨酸酶抑制能力普遍弱于香豆素类, 但是其活性依然高于对照熊果酸, 活性的差异主要与其取代基的个数有关, 环上取代基个数及酚羟基取代越多会提高其抑制能力。

本文系统地研究了老瓜头乙酸乙酯提取部位的化学成分及其抗氧化和酪氨酸酶抑制活性, 该研究结果为老瓜头中活性单体作为潜在药用先导化合物提供了理论依据和实体结构, 也为老瓜头全草的深入开发利用奠定了基础。

#### 参考文献

- 1 Editorial Committee of Flora of China. Flora Reipublicae Popularis Siniace(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 2020.
- 2 Inner Mongolia Flora Compilation Group. Inner Mongolia botanical annals(内蒙古植物志)[M]. Inner Mongolia: Inner Mongolia People's edition, 1990.
- 3 Zhang XY, Mi HL, Li YK, et al. A preliminary study on insecticidal activity of *Cynanchum komarovii* Al. compound solution[J]. Aota Agric Univ Jiangxi(江西农业大学学报), 2006, 28: 521-524, 558.

- 4 Zhang R,Fang SD,Chen Y,et al.The Chemical constituents in *Cynanchum komarovii* A1.Iljinski(continued)[J].Acta Bot Sin(植物学报),1991,33:870-875.
- 5 Fang SD,Zhang R,Chen Y,et al.The Chemical constituents from *Cynanchum komarovii* A1.Iljinski[J].Acta Bot Sin(植物学报),1989,31:934-938.
- 6 Lu YP,Ling ZF,Song JD,et al.The antitussive expectorant and antiasthmatic actions of *Cynanchum komarovii* A1.Iljinski[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),1997,22 :50-51,64.
- 7 Qi LM,Yang J,Jia JQ.Study on Alkaloids of *Cynanchum komarovii* A1.Iljinski widely grown in Ningxia[J].J Ningxia Med Coll(宁夏医学院学报),2002,24:336-339.
- 8 Wang LQ,Shen YM,Xu X,et al.Five new C<sub>21</sub> steroidal glycosides from *Cynanchum komarovii* A1. Iljinski[J].Steroids,2004,69:319-324.
- 9 Yang ZZ,Yu X,Yang WD.Inhibition of proliferation and promotion of apoptosis of mouse melanoma B16 cells by total alkaloid of *Cynanchum komarovii* A1. Iljinski[J].Pharm J Chin PLA(解放军药学报),2018,34:19-22.
- 10 Dan Z,Tang MX,Su SS,et al.Structure determination of two new C<sub>21</sub> steroidal glycosides from *Cynanchum komarovii*[J].J Asian Nat Prod Res,2018,9:852-859.
- 11 Zhou LQ,Xiong Y,Chen JL,er al.Study on the chemical constituents from the aerial parts of *Blumea balsamifera* DC. and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1112-1120.
- 12 Demirkiran O,Sabudak T,Ozturk M,et al.Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of flavonoids from *Trifolium nigrescens* subsp. *petrisavi*[J].J Agr Food Chem,2013,61:12598-12603.
- 13 Liu JJ,Lv JJ,Zhang JK,et al.Chemical constituents from the *Rehmanniae Radix Preparata*[J].Chin Phorm J(中国药学杂志),2021,56:449-456.
- 14 Xie FX,Yuan WY,Shi PX,et al.Study on secondary metabolites of endophytic fungus *Fusarium oxysporum* from bamboo[J].J Anhui Agric Sci(安徽农业科学),2019,47:174-175.
- 15 Yan ZW,Zhou MJ,Lu D,et al.Chemical constituents from the Pulp of *Acanthopanax senticosus*(Pupr.Maxim) Harms[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2010,22:1015-1017.
- 16 Yuan SQ,Zhao YQ,You Y,et al.Studies on chemical constituents of hairy roots of sweet potato Symon I(II)[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2005,36:186-187.
- 17 Wei F,Deng JT,Cheng HT,et al.A pair of new phenylpropanoid enantiomers from *Cordia dichotoma*

- fruits[J].Acta Pharm Sin(药学学报),2022,57:1863-1867.
- 18 Qiu YK,Dou DQ,Yoshikawa M,et al.Studies on the chemical constituents from the stems of *Opuntia dillenii*[J].J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报),2005,22:263-266.
  - 19 Huan C,Li Q,Yuzhi Z,et al.Structure determination of a C-19 steroid from the roots of *Cynanchum amplexicaule*[J].Asian J Tradit Med,2007,2:115.
  - 20 Abad A,Agulló C,Cuñat A C,et al.Diastereoselective synthesis of antiquorin and related polyoxygenated atisene-type diterpenes[J].Tetrahedron,2007,63:1664-1679.
  - 21 Yan YM,Dong XP,Li Y,et al.Chemical constituents in Yi medicine *Blaps japonensis* and their cytotoxic activities[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2013,44:269-271.
  - 22 Che T,Yang M,Li Z,et al.Isolation and identification of sweet substances and sweet aftertaste substances in the fruit of *Phyllanthus emblica*[J].Eur Food Res Technol,2022,248:3003-3013.
  - 23 Sun DF.Studies on chemical constituents and biological effect of *Cynanchum bungei* Decne[D].Jinan :University of Jinan(济南大学),2015.
  - 24 Ng TB,Liu F,Wang ZT.Antioxidative activity of natural products from plants[J].Life Sci,2000,66:709-723.
  - 25 Masamoto Y,Ando H,Murata Y,et al.Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L.[J].Biosci Biotechnol Biochem,2003,67:631-634.
  - 26 Wen YT.Studies on the anti-tyrosinase mechanism of five coumarins and their anti-browning mechanism in fresh-cut apple[D].Nanchang:Jiangxi Normal University(江西师范大学),2023.

收稿日期: 2024-04-10            接受日期:

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2023AAC03319, 2023AAC05048); 国家自然科学基金地区项目(82160672)

\*通信作者 E-mail: mxl@nmu.edu.cn