

盐炙小茴香醋酸乙酯部位化学成分及抗酪氨酸酶活性研究

董维茂, 朱奎霖, 杨 兴, 尹 蕊, 邓徐丽, 陈章贤, 张洪川, 王一谋, 何红平*, 董发武*

云南中医药大学中药学院 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要:目的 对小茴香 *Foeniculum vulgare* 醋酸乙酯部位化学成分及其对酪氨酸酶活性影响的研究。方法 利用硅胶、D101 大孔吸附树脂、MCI、ODS、Sephadex LH-20 及半制备型高效液相等色谱技术进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构; 运用酪氨酸酶催化 *L*-酪氨酸速率法筛选化合物的酪氨酸酶抑制活性, 对从盐炙小茴香分离出的化合物进行抗酪氨酸酶活性评价, 最后通过分子对接技术对其进行验证。结果 从盐炙小茴香醋酸乙酯部位分离得到 20 个化合物, 分别鉴定为 bombasinol A (1)、齐墩果酸 (2)、山柰素 (3)、槲皮素 (4)、(1*R*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (5)、(1*S*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (6)、(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (7)、齐墩果酮酸 (8)、刺五加酮 (9)、phenylpropanoid (10)、(Z)-4-[30-(β -D-glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (11)、3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside (12)、(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷 (13)、*trans*-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside (14)、1-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene (15)、3-hydroxyestragole β -D-glucopyranoside (16)、黄花夹竹桃黄酮 (17)、3,5-dihydroxyestragole 3-*O*- β -D-glucopyranoside (18)、水杨酸 (19) 和 benzyl β -D-glucopyranoside (20)。酪氨酸酶活性抑制实验表明, 盐炙小茴香中分离得到的 20 个化合物中 5 个 (化合物 4、13~15 和 17) 具有良好的抗酪氨酸酶活性, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值分别为 0.783、0.532、0.575、0.113、0.092 mg/mL, 阳性药 β -熊果苷 IC₅₀ 值为 1.784 mg/mL, 同时分子对接结果也显示化合物 17 的结合能为 -5.74 kJ/mol, 化合物 15 的结合能为 -3.5 kJ/mol。结论 化合物 1 为伞形科首次分离得到, 化合物 3、7~17 为茴香属首次分离得到; 化合物 4、13~15 和 17 均具有较好的抑制酪氨酸酶活性, 其中化合物 15 和 17 抑制效果最好, 分子对接结果也显示化合物 17 抑制效果强于化合物 15, 与实验结果一致。

关键词: 盐炙小茴香; 酪氨酸酶活性; 分子对接; 槲皮素; 黄花夹竹桃黄酮

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)24-7967-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.003

Chemical compositions of the ethyl acetate part from salt-processed *Foeniculi Fructus* and their anti-tyrosinase activities

DONG Wei-mao, ZHU Kui-lin, YANG Xing, YIN Rui, DENG Xu-li, CHEN Zhang-xian, ZHANG Hong-chuan, WANG Yi-mou, HE Hong-ping, DONG Fa-wu

Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southern medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the chemical compositions of the ethyl acetate part of *Foeniculi Fructus* and their effects on tyrosinase activities. **Methods** The compounds were isolated and purified by using various chromatographic techniques, including silica gel, D101 macroporous resins, MCI, ODS, Sephadex LH-20 and semi-preparative high performance liquid phase. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectral data. The tyrosinase inhibitory activities of compounds was screened by tyrosinase catalytic *L*-tyrosine rate method to evaluate the anti-tyrosinase activities of compounds isolated from salt-processed *Foeniculi Fructus*. Finally, the compounds were verified by molecular docking technique. **Results** A

收稿日期: 2023-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260758); 国家自然科学基金资助项目 (31860092); 云南省高层次人才支持计划“青年拔尖人才”专项 (YNWR-QNBJ-2020-255); 云南省基础研究计划面上项目 (202101AT070254); 云南省科技人才和平台计划 (202105AG070012XS23004)

作者简介: 董维茂 (1998—), 男, 硕士生, 从事中药民族药药效物质基础研究。Tel: 17394944923 E-mail: 2911307337@qq.com

何红平 (1972—), 男, 博士, 研究员, 从事药物化学研究。Tel: (0871)63961514 E-mail: 95431111@qq.com

***通信作者:** 董发武 (1985—), 男, 副教授, 从事中药民族药改善男性不育相关疾病药效物质基础研究。

Tel: 15087182863 E-mail: 593742545@qq.com

total of 20 compounds were isolated from the ethyl acetate part of *Foeniculi Fructus*, which were identified as bombasinol A (**1**), oleanolic acid (**2**), kaempferide (**3**), quercetin (**4**), (1*R*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (**5**), (1*S*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (**6**), (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (**7**), oleanonic acid (**8**), acanthone (**9**), phenylpropanoid (**10**), (Z)-4-[30-(β -D-glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (**11**), 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside (**12**), (+)-pinoresinol- β -D-glucopyranoside (**13**), *trans*-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside (**14**), 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene (**15**), 3-hydroxyestragole β -D-glucopyranoside (**16**), thevetiaflavone (**17**), 3,5-dihydroxyestragole 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**18**), salicylic acid (**19**) and benzyl β -D-glucopyranoside (**20**). Tyrosinase activities inhibition assay showed that five of the 20 compounds isolated from salt-processed *Foeniculi Fructus* had good anti-tyrosinase activities with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 0.783, 0.532, 0.575, 0.113, 0.092 mg/mL, respectively, and the positive drug, β -arbutin, had an IC₅₀ value of 1.784 mg/mL. Meanwhile, the molecular docking results showed the binding energy of compound **17** was -5.74 kJ/mol, and that of compound **15** was -3.5 kJ/mol. **Conclusion** Compound **1** was isolated for the first time from Umbelliferae, compounds **3**, **7**—**17** were isolated for the first time from Anethole, compounds **4**, **13**—**15** and **17** all had good tyrosinase inhibitory activities, among which compounds **15** and **17** had the best inhibitory effect, and the molecular docking results also showed that the inhibitory effect of compound **17** was stronger than that of compound **15**, which was in agreement with the experimental results.

Key words: salt-processed *Foeniculi Fructus*; tyrosinase activities; molecular docking; quercetin; thevetiaflavone

小茴香为伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 的干燥成熟果实^[1], 其原名蘘香。其药用历史悠久, 始载于《唐本草》, 有 1 千多年药用历史^[2]。除药用外, 小茴香还是常用的食品香料, 故为药食两用之佳品。小茴香分布广泛, 主要分布于地中海地区^[3], 我国主要分布于西北地区的山西、甘肃、内蒙古, 以及东北地区的辽宁等地区^[4], 其资源丰富, 以栽培为主, 栽培面积广泛, 其中以山西产量最大、内蒙古河套附近产品质优。

小茴香味辛、性温, 具有散寒止痛、理气和胃之功效^[5-6]。小茴香化学成分主要为苯丙素, 以及糖苷、脂肪油、黄酮、酚酸等多种类型的化合物^[7]以及部分含量较少的无机元素。现代研究表明, 小茴香具有改善肠道微生物平衡、促进胃肠运动、抗菌、抗肿瘤、镇痛抗炎等的作用^[8-15]。其中主要成分苯丙素类化合物还具有抑制酪氨酸酶活性的作用^[16]。包括雀斑在内的皮肤病都与黑色素的合成有关, 其中酪氨酸酶作为黑色素形成的关键性调节酶^[17-20]。因此, 从天然产物中寻找抑制酪氨酸酶活性的化合物成为该领域中研究的热点。目前, 对小茴香生品的研究主要注重于挥发油成分, 然而关于小茴香盐炙品化学成分及药理活性研究报道不多, 因此本实验对小茴香盐炙品进行成分分离纯化, 从其醋酸乙酯部位分离得到 20 个化合物, 分别鉴定为 bombasinol A (**1**)、齐墩果酸 (oleanolic acid, **2**)、山柰素 (kaempferide, **3**)、槲皮素 (quercetin, **4**)、(1*R*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (**5**)、

(1*S*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol (**6**)、(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (**7**)、齐墩果酮酸 (oleanonic acid, **8**)、刺五加酮 (acanthone, **9**)、phenylpropanoid (**10**)、(Z)-4-[30-(β -D-glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (**11**)、3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside (**12**)、(+)-松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷 [(+)-pinoresinol- β -D-glucopyranoside, **13**]、*trans*-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside (**14**)、1-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene (**15**)、3-hydroxyestragole β -D-glucopyranoside (**16**)、黄花夹竹桃黄酮 (thetiaflavone, **17**)、3,5-dihydroxyestragole 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**18**)、水杨酸 (salicylic acid, **19**) 和 benzyl β -D-glucopyranoside (**20**)。并对分离的单体成分进行了体外抗酪氨酸酶的活性研究。此外, 通过分子对接推测其可能的相互作用机制。

1 材料与仪器

1.1 材料

酪氨酸酶 (Sigma-Aldrich 公司); L-酪氨酸 (上海麦克林生化科技有限公司); β -熊果苷 (上海源叶生物科技有限公司, 质量分数 98%); 色谱硅胶 (200~300、300~400 目, 青岛海洋化工厂); GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 美国 Pharmacia 公司); MCI 树脂 (日本三菱化学公司); 反相 C₁₈ 柱色谱材料 (ODS, 德国 Merck 公司); D101 大孔吸附树脂

(天津市大钧科技有限公司); 薄层色谱显色剂(10% 硫酸乙醇溶液); 甲醇、乙醇、丙酮、正丁醇、醋酸乙酯、二氯甲烷、石油醚等试剂为重蒸的工业或化学纯溶剂; 色谱乙腈(上海星可高纯溶剂有限公司)。

小茴香药材于 2022 年 9 月购自新螺蛳湾药材市场, 由云南中医药大学李宏哲副教授鉴定为伞形科植物茴香 *F. vulgare* Mill. 的干燥成熟果实, 标本(D2022-001)保存于云南省高校民族药质量标准研究重点实验室。

1.2 仪器

Synergy2 多功能酶标仪(美国 BIOTEK 公司); Bruker Avance III 400 MHz 及 Bruker DRX 500 MHz 超导核磁共振仪, TMS 为内标(德国 Bruker 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 离子阱飞行时间质谱仪 Esquire HCT 型(德国 Bruker 公司); 万分之一分析天平 FA2004(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 循环水式多用真空泵 SHB-III(巩义市予华仪器有限公司); 海道夫旋转蒸发仪 Hei-VAP Core HL/G(德国 heidolph 公司)。

2 提取与分离

2.1 小茴香的盐炙

取小茴香 20 kg, 加入 2000 mL 配制好的 0.2 g/mL 盐水, 密封, 焖透 30 min, 而后置炒制容器内, 以文火加热, 不间断翻炒, 并炒至微黄且至规定程度时, 取出, 放凉备用。

2.2 提取

盐炙小茴香样品 20 kg 粉碎过筛(10 目), 在 10 L 的 75%乙醇中(10 L×2 h×5)回流提取。合并得提取液, 通过减压浓缩得到 2.387 kg 粗提物, 粗提物加水混悬并使用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇依次分别萃取 5 次, 合并萃取液, 减压浓缩得到石油醚相(203.6 g)、醋酸乙酯相(73.9 g)、正丁醇相(316.7 g)和水相(759.3 g)。

2.3 分离及纯化

醋酸乙酯部位经正向硅胶色谱(200~300 目), 以二氯甲烷-甲醇(100:1~1:1)梯度洗脱, 得到 7 个组分(Fr. 1~7)。Fr. 2(13.9 g)经 MCI 柱色谱以甲醇-水(30:70~100:0)梯度洗脱, 得到 6 个流分(Fr. 2.1~2.6), Fr. 2.3 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)进行分离, 再通过二次凝胶得到 Fr. 2-3-1-1, Fr. 2-3-1-1 经半制备液相(乙腈-水 24:76; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 1(3.0 mg)。Fr. 2.4 经反相 ODS 柱色谱, 以甲醇-水

(30:70~100:0)洗脱, 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)纯化得化合物 2(52.4 mg)。Fr. 2.5 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离再经半制备液相(乙腈-水 20:80; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 19(13.4 mg)。Fr. 2.6 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离纯化得化合物 3(2.4 mg)。Fr. 2.6.5 经 MCI 柱色谱以甲醇-水(30:70~100:0)梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离纯化得化合物 4(8.8 mg)。Fr. 4(9.1 g)经正向硅胶色谱(200~300 目), 以石油醚-醋酸乙酯(6:1~1:1)梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离得化合物 7(1.9 mg)和 8(4.0 mg), 再通过半制备液相(乙腈-水 15:85; 体积流量 3 mL/min; 检测波长: 365 nm)纯化得化合物 5(17.6 mg)和 6(12.9 mg)。Fr. 5(8.2 g)经正向硅胶色谱(200~300 目), 以石油醚-醋酸乙酯(2:1~1:1)梯度洗脱, 反相 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(20:80~100:0)洗脱, 再通过半制备液相(乙腈-水 21:79; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 254 nm)纯化得化合物 9(3.0 mg)。Fr. 26(11.0 g)经正向硅胶色谱(100~200 目), 以二氯甲烷-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离半制备液相(乙腈-水 26:74; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 254 nm)纯化得化合物 10(3.0 mg)。Fr. 7(12.1 g)经正向硅胶色谱(100-200 目), 以二氯甲烷-甲醇(50:1~1:1)梯度洗脱得到 9 个流分(Fr. 7.1~7.9), Fr. 7.5 以反相 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(20:80~100:0)梯度洗脱得到 6 个流分, Fr. 7.5.3 以 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离得到化合物 13(5.0 mg), 再以半制备液相色谱(乙腈-水 33:67; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 11(6.0 mg)和 12(6.0 mg), Fr. 7.5.6 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离得再以半制备液相(乙腈-水 46:54; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 20(18.8 mg), Fr. 7.6 以反相 ODS 柱色谱, 以甲醇-水(20:80~100:0)梯度洗脱得到 6 个流分, Fr. 7.6.4 经正向硅胶二氯甲烷-甲醇(50:1)等度洗脱再以半制备液相(乙腈-水 12:88; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 16(17.0 mg), Fr. 7.6.2 经 Sephadex LH-20 色谱(甲醇)分离得再以半制备液相(乙腈-水 15:85; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 365 nm)纯化得化合物 14(9.9 mg)和

15 (24.3 mg), Fr. 7.9 以正向硅胶色谱 (100~200 目), 以二氯甲烷-甲醇 (30:1~1:1) 梯度洗脱得 Fr. 7.9.2, Fr. 7.9.2 经 MCI 柱色谱以甲醇-水 (20:80~100:0) 梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 色谱 (甲醇) 分离最后以半制备液相 (乙腈-水 23:77; 体积流量 3 mL/min; 检测波长 254 nm) 纯化得化合物 17 (4.2 mg) 和 18 (32.6 mg)。

3 酪氨酸酶抑制活性测试

3.1 溶液的配制

3.1.1 磷酸盐缓冲液的配制 精密量取 20 mL 10× PBS 缓冲液, 用超纯水稀释至 200 mL, 最后使用 0.2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 6.5~7.5 (规定范围) 即得 PBS 缓冲液。

3.1.2 酪氨酸酶试液的配制 精密移取提前分装好的 1000 units/mL 的酪氨酸酶 9 mL, 加入 PBS 缓冲液稀释至 30 mL 即得 300 units/mL 的酪氨酸酶试液, 将试液放入 -20 °C 冰箱待用。

3.1.3 L-酪氨酸溶液的配制 精密称取 5 mg L-酪氨酸粉末于 100 mL EP 管中加入 50 mL PBS 缓冲液, 摇匀, 即得 0.1 mg/mL L-酪氨酸溶液, 放置, 待用。

3.1.4 样品溶液的配制

(1) 阳性药溶液的配制: 精密称取 β-熊果苷 4 mg, 加入 30 μL DMSO 使其完全溶解, 再使用移液枪精密加入 970 μL PBS 即得 4 mg/mL 阳性药试液, 再将阳性药依次梯度稀释浓度为 2、1、0.5、0.25 mg/mL, 待用。

(2) 待测样品溶液的配制: 精密称取样品适量, 加入 30 μL DMSO 使其完全溶解, 再精密加入 PBS 使其质量浓度依次为 1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg/mL; 其中化合物 15 稀释质量浓度依次为 0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 625 mg/mL, 待用。

3.2 酪氨酸酶活性抑制率的测定

用移液枪按表的体积向 96 孔板依次加入 PBS 缓冲液、不同浓度梯度的化合物受试液、不同浓度梯度的熊果苷对照液和酪氨酸酶液, 37 °C 下孵育 10 min 后, 加入 L-酪氨酸试液, 同等条件下孵育 30 min, 孵育完成后立即放入多功能酶标仪在 492 nm 测定其吸光度 (A), 并记录数据, 每个浓度实验做 3 个平行组, 使用 3 组数据的平均值, 按照公式计算测定化合物对酪氨酸酶的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_T - A_B) / (A_C - A_N)$$

T 为加样品且加酪氨酸的反应液组别; B 为加样品且未加酪氨酸的反应液组别; C 为未加样品且加酪氨酸的反应液组别;

N 为未加样品且未加酪氨酸的反应液组别; A_T 为 T 组反应液在 492 nm 处测得的 A 值; A_B 为 B 组反应液在 492 nm 处测得的 A 值; A_C 为 C 组反应液在 492 nm 处测得的 A 值; A_N 为 N 组反应液在 492 nm 处测得的 A 值

3.3 数据处理与分析

运用 IBM SPSS Statistics 26 进行计算 IC₅₀, 并采用 GraphPad Prism 9 软件进行做图。

4 分子对接

4.1 化合物结构的获取与处理

在 Chemdraw 2D 中画出所需化合物的 2D 平面结构, 再通过 Chemdraw 3D 将其转化为 PDB 格式的 3D 结构文件。

4.2 靶蛋白的获取与处理

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得酪氨酸酶蛋白的 PDB 格式的三维晶体结构文件, 运用 OpenBabel 2.4.1、AutoDockTools 1.5.7 软件进行前期处理, 得到相对应的 PDB 文件, 备用。

4.3 化合物与靶蛋白的对接

将上述处理好的化合物与靶蛋白文件导入 Autodock vina, 并通过 Autodock vina 进行分子对接, 最后将 Autodock vina 对接并对对接结果打分, 将得到的 PDB 格式文件, 使用 PyMol 软件对分子对接结果进行可视化。

5 结果与分析

5.1 结构鉴定

化合物 1: 黄色油状物, 分子式为 C₂₁H₂₄O₆, HR-ESI-MS *m/z*: 395.146 0 [M+Na]⁺ (计算值 395.146 5)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.95 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.66 (2H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2, 6), 4.72 (2H, d, *J* = 4.2 Hz, H-7, 7'), 4.25 (2H, dd, *J* = 9.1, 6.7 Hz, H-9α, 9'α), 3.88 (3H, s, 3'-OMe), 3.86 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.85 (2H, dd, *J* = 8.5, 3.5 Hz, H-9β, 9'β), 3.15 (2H, m, H-8, 8'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 149.4 (C-3, 5), 149.2 (C-3'), 147.4 (C-4'), 134.3 (C-1), 133.8 (C-1'), 120.1 (C-6'), 116.1 (C-5'), 111.0 (C-2'), 106.2 (C-4), 104.5 (C-2, 6), 87.7 (C-7), 87.5 (C-7'), 72.7 (C-9), 72.6 (C-9), 56.8 (3, 5-OMe), 56.4 (3'-OMe), 55.6 (C-8), 55.3 (C-8')。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 1 为 bombasinol A。

化合物 2: 白色固体, 分子式为 C₃₀H₄₈O₃, HR-ESI-MS *m/z*: 479.348 8 [M+Na]⁺ (计算值

479.349 6)。¹H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 5.52 (1H, s, H-12), 3.47 (1H, m, H-3a), 3.33 (1H, dd, *J* = 14.1, 4.6 Hz, H-18), 1.31 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.05 (9H, s, H-24, 25, 30), 0.97 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-26); ¹³C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 180.7 (C-28), 145.3 (C-13), 123.0 (C-12), 78.6 (C-3), 56.3 (C-5), 48.6 (C-4), 47.2 (C-9), 46.9 (C-17), 42.7 (C-19), 42.5 (C-14), 40.2 (C-18), 39.9 (C-1), 39.4 (C-8), 37.9 (C-10), 37.7 (C-2), 33.8 (C-21), 33.8 (C-29), 33.7 (C-22), 31.4 (C-7), 29.3 (C-20), 28.8 (C-15), 28.6 (C-23), 26.6 (C-27), 24.3 (C-30), 24.2 (C-1), 24.2 (C-16), 19.3 (C-24), 17.9 (C-6), 17.0 (C-26), 16.0 (C-25)。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 2 为齐墩果酸。

化合物 3: 黄色粉末, 分子式为 C₁₆H₁₂O₆, HR-ESI-MS *m/z*: 323.052 4 [M+Na]⁺ (计算值 323.052 6)。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.08 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 3.34 (3H, s, 4'-OMe); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 177.4 (C-4), 165.6 (C-7), 162.5 (C-9), 160.6 (C-4'), 158.3 (C-5), 148.1 (C-2), 137.2 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 123.8 (C-1'), 116.3 (C-3', 5'), 104.5 (C-10), 99.3 (C-6), 94.4 (C-8), 56.5 (4'-OMe)。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 3 为山奈素。

化合物 4: 黄色粉末, 分子式为 C₁₅H₁₀O₇, HR-ESI-MS *m/z*: 303.049 2 [M+H]⁺ (计算值 303.049 9)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.75 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.65 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 177.4 (C-4), 165.6 (C-7), 162.5 (C-5), 158.2 (C-9), 148.8 (C-2), 148.0 (C-4'), 146.2 (C-3'), 137.3 (C-3), 124.2 (C-1'), 121.7 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.9 (C-2'), 104.5 (C-10), 99.2 (C-6), 94.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 4 为槲皮素。

化合物 5: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 C₁₀H₁₄O₃, HR-ESI-MS *m/z*: 205.082 6 [M+Na]⁺ (计算值 205.083 5)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.26 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2, 6), 6.86 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3, 5), 5.08 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-1'), 4.40 (1H, dq, *J* = 5.0, 6.0 Hz, H-2'), 3.75 (3H, s, 4-OMe), 1.09 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz,

CD₃OD) δ: 160.5 (C-4), 135.4 (C-1), 129.2 (C-2, 6), 114.4 (C-3, 5), 78.7 (C-1'), 72.4 (C-2'), 55.6 (4-OMe), 18.4 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 5 为 (1*R*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol。

化合物 6: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 C₁₀H₁₄O₃, HR-ESI-MS *m/z*: 205.082 5 [M+Na]⁺ (计算值 205.083 5)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.23 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2, 6), 6.86 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3, 5), 4.26 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 3.82 (1H, dq, *J* = 6.0, 7.0 Hz, H-2'), 3.75 (3H, s, 4-OMe), 0.91 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 160.7 (C-4), 135.3 (C-1), 129.3 (C-2, 6), 114.6 (C-3, 5), 79.9 (C-1'), 72.9 (C-2'), 55.6 (4-OMe), 19.2 (C-3')。以上数据与文献报道一致^[25], 故鉴定化合物 6 为 (1*S*,2*R*)-1-(4-methoxyphenyl) propane-1,2-diol。

化合物 7: 白色针状结晶 (甲醇), 分子式为 C₁₃H₂₂O₄, HR-ESI-MS *m/z*: 265.142 5 [M+Na]⁺ (计算值 265.141 0)。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.15 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-7), 6.16 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, H-8), 3.74 (1H, m, H-3), 2.29 (1H, ddd, *J* = 14.3, 5.0, 1.7 Hz, H-4a), 2.28 (3H, s, H-10), 1.64 (1H, dd, *J* = 14.3, 9.2 Hz, H-4b), 1.56 (1H, ddd, *J* = 12.9, 3.4, 1.7 Hz, H-2a), 1.25 (1H, m, H-2b), 1.18 (3H, s, H-12), 1.16 (3H, s, H-13), 0.94 (3H, s, H-11); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 200.3 (C-9), 145.4 (C-7), 133.8 (C-8), 70.8 (C-6), 68.8 (C-5), 64.4 (C-3), 47.7 (C-2), 41.3 (C-4), 36.1 (C-1), 29.8 (C-12), 27.4 (C-10), 25.1 (C-11), 20.0 (C-13)。以上数据与文献报道一致^[26], 故鉴定化合物 7 为 (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one。

化合物 8: 白色无定形粉末, 分子式为 C₃₀H₄₆O₃, HR-ESI-MS *m/z*: 455.351 4 [M+H]⁺ (计算值 455.352 0)。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.30 (1H, s, H-12), 2.84 (1H, m, H-18), 2.54 (1H, m, H-2), 2.36 (1H, m, H-2), 1.14 (3H, s, H-27), 1.08 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-29), 0.81 (3H, s, H-26); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 217.9 (C-3), 183.7 (C-28), 143.8 (C-13), 122.6 (C-12), 55.5 (C-5), 47.6 (C-4), 47.0 (C-9), 46.7 (C-17), 45.9 (C-19), 41.9 (C-14), 41.2 (C-18), 39.4 (C-1), 39.3 (C-8), 36.9

(C-10), 34.3 (C-2), 33.9 (C-21), 33.2 (C-29), 32.6 (C-22), 32.3 (C-7), 30.8 (C-20), 27.8 (C-15), 26.6 (C-23), 25.9 (C-27), 23.7 (C-30), 23.6 (C-1), 23.1 (C-16), 21.6 (C-24), 19.7 (C-6), 17.2 (C-26), 15.2 (C-25)。以上数据与文献报道一致^[27], 故鉴定化合物 **8** 为齐墩果酮酸。

化合物 **9**: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{22}H_{26}O_9$, HR-ESI-MS m/z : 435.165 3 $[M+H]^+$ (计算值 435.165 0)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.35 (2H, s, H-2, 6), 6.69 (2H, s, H-2', 6'), 4.61 (1H, s, H-7'), 4.26 (1H, m, H-8), 4.19 (2H, m, H-9a, 9b), 3.88 (6H, s, 3, 5-OMe), 3.82 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.64 (2H, m, H-9'a, 9'b), 2.61 (1H, m, H-8'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 200.3 (C-7), 149.2 (C-3', 5'), 148.1 (C-3, 5), 136.2 (C-4), 132.9 (C-1'), 128.0 (C-1), 107.7 (C-2, 6), 105.1 (C-2', 6'), 85.4 (C-7'), 71.6 (C-9), 61.3 (C-9'), 56.9 (3, 5-OMe), 56.8 (3', 5'-OMe), 55.2 (C-8'), 49.9 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[28], 故鉴定化合物 **9** 为刺五加酮。

化合物 **10**: 无色油状物, 分子式为 $C_{10}H_{14}O_4$, HR-ESI-MS m/z : 221.077 5 $[M+Na]^+$ (计算值 221.078 4)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.30 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 4.55 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-1), 3.78 (3H, s, 4'-OMe), 3.66 (1H, m, H-2), 3.47 (1H, m, H-3b), 3.34 (1H, m, H-3a); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 160.7 (C-4'), 135.3 (C-1'), 129.1 (C-2', 6'), 114.6 (C-3', 5'), 77.6 (C-2), 75.2 (C-1), 64.2 (C-3), 55.7 (4'-OMe)。以上数据与文献报道一致^[29], 故鉴定化合物 **10** 为 phenylpropanoid。

化合物 **11**: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{19}H_{30}O_7$, HR-ESI-MS m/z : 393.188 0 $[M+Na]^+$ (计算值 393.188 4)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.97 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 5.91 (1H, s, H-2), 4.43 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.04 (1H, m, H-3'), 2.62 (2H, m, H-2'), 2.37 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 2.30 (3H, s, H-9), 1.34 (3H, d, $J = 5.3$ Hz, H-4'), 1.22 (6H, s, H-7, 8); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 202.1 (C-1), 159.1 (C-3), 143.7 (C-4), 134.4 (C-1'), 125.6 (C-2), 103.9 (C-1''), 78.2 (C-3''), 77.9 (C-3'), 77.2 (C-5''), 75.3 (C-2''), 71.7 (C-4''), 62.8 (C-6''), 54.7 (C-6), 39.3 (C-5), 37.7 (C-2'), 29.3 (C-8), 29.2 (C-7), 22.7 (C-9), 22.2 (C-4')。以上数据与文献报道一致^[30], 故鉴定

化合物 **11** 为 (Z)-4-[30-(β -D-glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one。

化合物 **12**: 无色固体, 分子式为 $C_{19}H_{30}O_7$, HR-ESI-MS m/z : 393.188 2 $[M+Na]^+$ (计算值 393.188 4)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.88 (1H, s, H-4), 5.74 (1H, dd, $J = 15.4, 9.3$ Hz, H-7), 5.58 (1H, dd, $J = 15.4, 7.8$ Hz, H-8), 4.49 (1H, m, H-9), 4.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, $J = 11.9, 2.1$ Hz, H-6'a), 3.64 (1H, dd, $J = 11.9, 5.9$ Hz, H-6'b), 3.23 (4H, m, H-2'), 2.71 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-6), 2.44 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-2b), 2.07 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-2a), 1.94 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-13), 1.28 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-10), 1.05 (3H, s, H-11), 1.03 (3H, s, H-12); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 201.9 (C-3), 165.5 (C-5), 137.1 (C-8), 131.4 (C-7), 126.2 (C-4), 101.0 (C-1'), 78.3 (C-3'), 78.2 (C-5'), 75.0 (C-2'), 74.8 (C-9), 71.8 (C-4'), 62.9 (C-6'), 56.9 (C-6), 48.4 (C-2), 37.1 (C-1), 28.1 (C-12), 27.7 (C-11), 23.7 (C-13), 22.2 (C-10)。以上数据与文献报道一致^[31], 故鉴定化合物 **12** 为 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside。

化合物 **13**: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{26}H_{32}O_{11}$, HR-ESI-MS m/z : 519.187 3 $[M-H]^-$ (计算值 519.187 2)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.86 (6H, m, H-2, 5, 6, 2', 5', 6'), 4.85 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.74 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7), 4.69 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7'), 4.22 (2H, m, H-9, 9'), 3.85 (6H, s, 3, 3'-OMe), 3.11 (2H, m, H-8, 8'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 150.9 (C-3'), 149.1 (C-3), 147.5 (C-4), 147.3 (C-4'), 137.5 (C-1'), 133.7 (C-1), 120.1 (C-6), 119.8 (C-6'), 117.9 (C-5), 116.1 (C-5'), 111.6 (C-2), 110.9 (C-2'), 102.8 (C-1''), 87.5 (C-7'), 87.1 (C-7), 78.2 (C-5''), 77.8 (C-3''), 74.9 (C-2''), 72.7 (C-9'), 72.7 (C-9), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 56.7 (3-OMe), 56.4 (3'-OMe), 55.5 (C-8'), 55.4 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[32], 故鉴定化合物 **13** 为 (+)-pinoresinol- β -D-glucopyranoside。

化合物 **14**: 白色粉末状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{15}H_{20}O_6$, HR-ESI-MS m/z : 319.115 2 $[M+Na]^+$ (计算值 319.115 2)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.36 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.15 (1H, dq, $J = 15.8, 6.5$ Hz, H-8), 3.80 (5H, m, H-2'~6'), 1.85 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 158.1 (C-4), 133.8 (C-1), 131.6 (C-7), 127.8 (C-2, 6), 124.8

(C-8), 117.8 (C-3, 5), 102.4 (C-1'), 78.1 (C-3'), 77.9 (C-5'), 74.9 (C-2'), 71.4 (C-4'), 62.5 (C-6'), 18.5 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[33], 故鉴定化合物 **14** 为 *trans*-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside。

化合物 **15**: 白色粉末状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{15}H_{20}O_6$, HR-ESI-MS m/z : 319.114 9 $[M+Na]^+$ (计算值 319.115 2)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.11 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6), 7.03 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5), 5.95 (1H, m, H-8), 5.06 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-9b), 5.02 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-9a), 3.90 (1H, dd, $J = 12.0, 1.9$ Hz, H-6b), 3.71 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6a), 3.45 (4H, m, H-2'~5'), 3.33 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 157.5 (C-4), 139.2 (C-8), 135.2 (C-1), 130.5 (C-3, 5), 117.8 (C-2, 6), 115.7 (C-9), 102.5 (C-1'), 78.0 (C-3'), 77.9 (C-5'), 74.9 (C-2'), 71.4 (C-4'), 62.5 (C-6'), 40.3 (C-7)。以上数据与文献报道一致^[34], 故鉴定化合物 **15** 为 1-O- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene。

化合物 **16**: 无定形粉末, 分子式为 $C_{16}H_{22}O_7$, HR-ESI-MS m/z : 350.1292 $[M+Na]^+$ (计算值 350.129 2)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.83 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 5.96 (1H, ddt, $J = 17.0, 10.0, 6.8$ Hz, H-2'), 5.69 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 5.09 (1H, dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-3'), 5.02 (1H, dd, $J = 17.0, 2.0$ Hz, H-3'), 3.84 (3H, s, 4-OMe), 3.32 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1')。 ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 149.1 (C-3), 147.9 (C-4), 139.0 (C-2'), 134.6 (C-1), 123.8 (C-6), 118.5 (C-2), 115.8 (C-3'), 113.8 (C-5), 102.9 (C-1''), 78.2 (C-3''), 77.8 (C-5''), 74.9 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 56.9 (4-OMe), 40.5 (C-1')。以上数据与文献报道一致^[35], 故鉴定化合物 **16** 为 3-hydroxyestragole β -D-glucopyranoside。

化合物 **17**: 淡黄色粉末, 分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, HR-ESI-MS m/z : 307.057 0 $[M+Na]^+$ (计算值 307.057 7)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.45 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.22 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 3.78 (3H, s, 5-OMe); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 175.9 (C-4), 162.1 (C-7), 160.5 (C-4'), 160.1 (C-2), 159.8 (C-5), 159.6 (C-9), 127.5 (C-2', 6'), 121.6 (C-1'), 115.9 (C-3', 5'), 106.9 (C-3), 106.7 (C-10), 96.7 (C-6), 96.0 (C-8), 57.6 (4-OMe)。

以上数据与文献报道一致^[36], 故鉴定化合物 **17** 为 黄花夹竹桃黄酮。

化合物 **18**: 无色针状结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{16}H_{22}O_8$, HR-ESI-MS m/z : 365.120 6 $[M+Na]^+$ (计算值 365.120 7)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.93 (1H, ddt, $J = 16.9, 10.0, 6.7$ Hz, H-2'), 5.73 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 5.07 (1H, dd, $J = 16.9, 2.2$ Hz, H-3'b), 5.02 (1H, dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz, H-3'a), 3.83 (3H, s, 4-OMe), 3.25 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 152.1 (C-5), 151.6 (C-3), 138.7 (C-2'), 137.6 (C-4), 136.7 (C-1), 115.9 (C-3'), 111.6 (C-6), 109.2 (C-2), 102.6 (C-1''), 78.1 (C-3''), 78.0 (C-5''), 74.9 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 61.6 (4-OMe), 40.0 (C-1')。以上数据与文献报道一致^[37], 故鉴定化合物 **18** 为 3,5-dihydroxyestragole 3-O- β -D-glucopyranoside。

化合物 **19**: 白色结晶性粉末, 分子式为 $C_7H_6O_3$, HR-ESI-MS m/z : 139.038 2 $[M+H]^+$ (计算值 139.039 0)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.02 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.77 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-4), 7.34 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 174.3 (C=O), 163.1 (C-2), 136.1 (C-4), 131.6 (C-6), 119.9 (C-5), 117.9 (C-3), 110.9 (C-1)。以上数据与文献报道一致^[38], 故鉴定化合物 **19** 为 水杨酸。

化合物 **20**: 白色无定形粉末, 分子式为 $C_{13}H_{18}O_6$, HR-ESI-MS m/z : 293.099 3 $[M+Na]^+$ (计算值 293.099 6)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.31 (5H, m, H-2~6), 4.91 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-7b), 4.63 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-7a), 4.32 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'a), 3.86 (1H, dd, $J = 11.9, 2.1$ Hz, H-6'b), 3.66 (1H, dd, $J = 11.9, 5.7$ Hz, H-6'a); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 139.0 (C-1), 129.3 (C-3, 5), 129.2 (C-2, 6), 128.7 (C-4), 103.2 (C-1'), 78.1 (C-3'), 78.0 (C-5'), 75.1 (C-2'), 71.7 (C-7), 71.7 (C-4'), 62.8 (C-6')。以上数据与文献报道一致^[39], 故鉴定化合物 **20** 为 benzyl β -D-glucopyranoside。

5.2 化合物对酪氨酸酶抑制活性的影响

采用酪氨酸酶催化 L-酪氨酸的方法, 对小茴香醋酸乙酯部位分离出的 20 个化合物进行体外酪氨酸酶抑制活性筛选, 共筛选出 5 个活性较好的具有酪氨酸酶抑制作用的化合物 (**4**、**13**~**15**、**17**), 其

中以化合物 **15** 和 **17** 对酪氨酸酶的抑制作用最为明显, 在实验浓度范围内, 化合物 **17** 对酪氨酸酶的抑制率已达到 88.27%。各化合物 IC_{50} 结果见表 1。5 个化合物 IC_{50} 均小于阳性药 β -熊果苷, 其中化合物 **15** 和 **17** 的 IC_{50} 值最小, 表明这 2 个化合物对酪氨酸酶抑制作用最强, 抑制效果最好, 化合物 **13** 和 **14** 对酪氨酸酶的抑制率相当, 化合物 **4** 在其中抑制效果较弱。

5.3 分子对接结果

通过对酪氨酸酶抑制活性最好的 2 个化合物 (**15**、**17**) 进行分子对接并对其打分。

化合物 **15** 对接结果如图 1 所示, 化合物 **15** 分别通过与酪氨酸酶蛋白中的半胱氨酸 (Cys)、甘氨酸 (Gly) 残基形成氢键, 其键长分别为 1.9、2.0、2.3、2.8、3.2, 分子对接结合能为 -3.5 kJ/mol, 表明

其具有良好的自由能结合能力。

化合物 **17** 对接结果如图 2 所示, 化合物 **17** 分别通过与酪氨酸酶蛋白中的 Cys 残基形成氢键, 其键长分别为 2.0、2.0、2.4、2.8, 分子对接结合能为 -5.74 kJ/mol, 表明其具有良好的自由能结合能力。

表 1 各化合物的酪氨酸酶抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	$IC_{50}/(mg \cdot mL^{-1})$
4	0.783 ± 0.024
13	0.532 ± 0.091
14	$0.575 \pm 0.022^*$
15	$0.113 \pm 0.032^*$
17	$0.092 \pm 0.011^*$
β -熊果苷	1.784 ± 0.240

与 β -熊果苷相比: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs β -arbutin

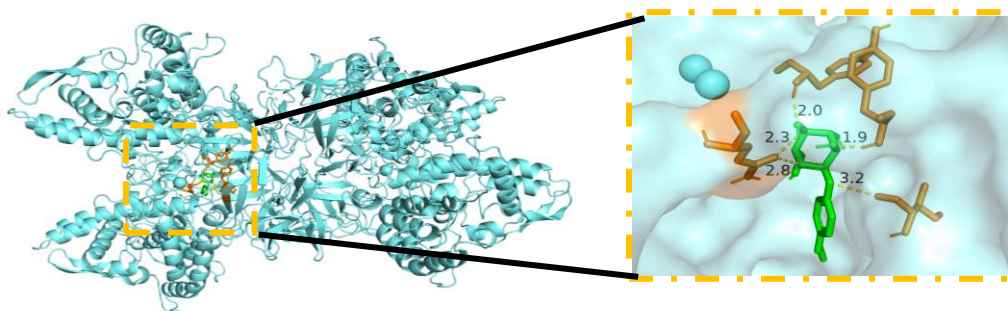


图 1 化合物 15 分子对接结果

Fig. 1 Molecular docking results of compound 15

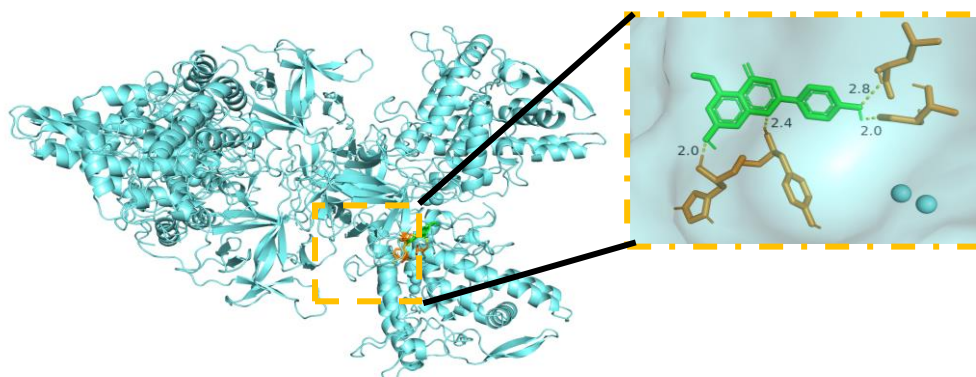


图 2 化合物 17 分子对接结果

Fig. 2 Molecular docking results of compound 17

6 讨论

酪氨酸酶是一种氧化还原酶, 广泛存在于植物和动物体中, 是生物体合成黑色素的关键酶。黑色素的生物合成是由酪氨酸酶催化体内 L -酪氨酸

(L -Tyr) 生成多巴, 多巴经过进一步氧化生成多巴醌, 多巴醌再经过一系列的化学反应, 最后生成黑色素的过程, 研究表明^[40], 酪氨酸酶的活性与黑色素合成量相关, 控制其活力即可控制黑色素生成量。

本研究报道了 20 个从小茴香醋酸乙酯部位分离出来的化合物, 并对其进行抑制酪氨酸酶活性实验, 实验结果显示化合物 **4**、**13**~**15**、**17** 具有良好的酪氨酸酶抑制活性, 抑制效果均高于阳性药 β -熊果苷, 其中化合物 **15** 和 **17** 效果最好, 其 IC_{50} 分别为 0.113、0.092 mg/mL, 基于此对化合物 **15** 和 **17** 进行分子对接, 分子对接结果显示化合物 **15** 具有更好的与酪氨酸酶蛋白结合的能力, 该结果与活性实验结果一致。化合物 **15** 抑制效果优于化合物 **14**, 可能由于化合物 **15** 的末端双键具有更好的代替多巴被氧化成黑色素这一过程, 因此化合物 **15** 的效果优于化合物 **14**。本研究结果将为小茴香化学成分美白效果的进一步开发和利用提供科学依据和参考价值。

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: 49-50.
- [2] 张红, 王明友. 茴香种子发芽特性的初步研究 [J]. 北方园艺, 2011(19): 38-39.
- [3] 李述成. 海原县小茴香产业发展现状及制约因素分析 [J]. 宁夏农林科技, 2007, 48(6): 43.
- [4] 蒋军辉, 徐小娜, 杨慧仙, 等. GC-MS 结合直观推导式演进特征投影法(HELP)分析大茴香和小茴香挥发性化学成分 [J]. 南华大学学报: 自然科学版, 2011, 25(4): 91-96.
- [5] 刘昆言, 禹双双, 刘琪龙, 等. 小茴香研究进展 [J]. 农产品加工, 2020(17): 67-73.
- [6] 王金金, 毋启桐, 时博, 等. 小茴香炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 178-190.
- [7] 阴健. 中药现代研究与临床应用-II [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1995: 37-38.
- [8] Asano T, Aida, Suemasu S, et al. Anethole restores delayed gastric emptying and impaired gastric accommodation in rodents [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 125-130.
- [9] Gavanji S, Zaker S R, Nejad Z G, et al. Comparative efficacy of herbal essences with amphotricin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the *in vitro* condition [J]. *Integr Med Res*, 2015, 4(2): 112-118.
- [10] Ghasemian A, Al-Marzoqi A H, Mostafavi S K S, et al. Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of *Foeniculum vulgare* mill essential oils [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(1): 260-266.
- [11] Cabral C, Miranda M, Gonçalves M J, et al. Assessment of safe bioactive doses of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil from Portugal [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(22): 2654-2659.
- [12] El-Garawani I, El Nabi S H, Nafie E, et al. *Foeniculum vulgare* and *Pelargonium graveolens* essential oil mixture triggers the cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(9): 1103-1113.
- [13] Singh S, Gupta P, Gupta J. Virtual structural similarity elucidates bioactivity of fenchone: A phytochemical enriched in fennel essential oil [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2020, 17(5): 619-630.
- [14] Lall N, Kishore N, Binneman B, et al. Cytotoxicity of syringin and 4-methoxycinnamyl alcohol isolated from *Foeniculum vulgare* on selected human cell lines [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(18): 1752-1756.
- [15] Mesfin M, Asres K, Shibeshi W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 310.
- [16] Li Z Y, Zhao P, Song S J, et al. Chiral resolution of racemic phenylpropanoids with tyrosinase inhibitory activities from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bge [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(10): e14304.
- [17] Liu C Y, Ma C Y, Lu J, et al. A rapid method and mechanism to identify the active compounds in *Malus micromalus* Makino fruit with spectrum-effect relationship, components knock-out and molecular docking technology [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 150: 112086.
- [18] Hasan A, Zhang M, Shang Z P, et al. Bioactive prenylated phenolic compounds from the aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Phytochemistry*, 2022, 201: 113284.
- [19] Yu Q, Fan L P, Ding Z Y. The inhibition mechanisms between *Asparagus* polyphenols after hydrothermal treatment and tyrosinase: A circular dichroism spectrum, fluorescence, and molecular docking study [J]. *SSRN Journal*, 2022, 48: 101790.
- [20] Zhai Y J, Huo G M, Zhang Q, et al. Phaeosphaones: Tyrosinase inhibitory thiodiketopiperazines from an endophytic *Phaeosphaeria fuckelii* [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(5): 1592-1597.
- [21] Wang G K, Lin B B, Rao R, et al. A new lignan with anti-HBV activity from the roots of *Bombax ceiba* [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(15): 1348-1352.
- [22] Wang S R, Fang W S. Design and synthesis of a dual linker for solid phase synthesis of oleanolic acid derivatives [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4748-4763.
- [23] 陈封政, 赵卫权, 何永华, 等. 川滇蔷薇和多苞蔷薇化

- 学成分的研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 334-336.
- [24] 娜黑芽, 张晓玲, 陈怡璇, 等. 药用沙棘果汁中 1 个新的黄酮苷类化合物 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 659-666.
- [25] Ishikawa T, Fujimatu E, Kitajima J. Water-soluble constituents of anise: New glucosides of anethole glycol and its related compounds [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(11): 1460-1466.
- [26] 黄乐怡, 孙煜铮, 陈倩倩, 等. 白花败酱的化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7088-7095.
- [27] 刘建宇, 周楠, 宫益霞, 等. 东北铁线莲化学成分的分 离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2016, 26(1): 56-60.
- [28] 崔泽旭, 徐晔, 杨秀伟, 等. 细叶十大功劳茎水提取物 脂溶性部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 80-89.
- [29] 冯卫生, 张靖柯, 吕锦锦, 等. 泡桐花化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(18): 1547-1551.
- [30] Lee H J, Dhodary B, Lee J Y, *et al.* Dereplication of components coupled with HPLC-qTOF-MS in the active fraction of *Humulus japonicus* and its protective effects against Parkinson's disease mouse model [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1435.
- [31] 徐博, 金英今, 王一涵, 等. 葎草茎叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1228-1231.
- [32] Konishi T, Narumi Y, Watanabe K, *et al.* Comparative studies on the constituents of a parasitic plant and its host. III. On the constituents of *Boschniakia rossica* Fedtsch. *et* Flerov. (2) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(10): 4155-4161.
- [33] 刘布鸣, 卢文杰, 牙启康, 等. 棒柄花中反式-4-(1-丙烯基)-苯酚- β -D-吡喃葡萄糖苷的化学结构分离鉴定 [J]. 广西科学, 2005(3): 214-215.
- [34] Zhou J G, Tang Q J, Wu T, *et al.* Improved TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of tyrosinase inhibitors in natural products [J]. *Phytochem Anal*, 2017, 28(2): 115-124.
- [35] Fujimatu E, Ishikawa T, Kitajima J. Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(5): 609-616.
- [36] 马瑞婧, 杨巡纭, 王吉华, 等. 喙荚云实酚性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1014-1017.
- [37] Kitajima J, Ishikawa T, Tanaka Y, *et al.* Water-soluble constituents of fennel. V. glycosides of aromatic compounds [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(10): 1587-1590.
- [38] Carvalho M J, Carvalho L M, Ferreira A M, *et al.* A new xanthone from *Hedychium gardnerianum* [J]. *Nat Prod Res*, 2003, 17(6): 445-449.
- [39] Fujita T, Funayoshi A, Nakayama M. A phenylpropanoid glucoside from *Perilla frutescens* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(2): 543-546.
- [40] Álvaro S F, JoséNeptuno R L, Francisco G C, *et al.* Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1247(1): 1-11.

[责任编辑 王文倩]