

## 尖果沙枣叶中3个新的没食子酸糖酯及其抗氧化活性与酪氨酸酶抑制活性

崔凤真<sup>1,2,3</sup>, 付建红<sup>1,2,3\*</sup>, 徐国燕<sup>1,2,3</sup>, 阿依卡买尔·艾克拜尔<sup>1,2,3</sup>, 马畅达<sup>1,2,3</sup>

(1. 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 干旱区植物逆境生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017; 3. 新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830017)

**摘要:** 采用基于分离富集模式的反相多维液相制备色谱体系对尖果沙枣 (*Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend) 叶水提取物进行分离纯化, 得到5个化合物。通过NMR、MS、UV、IR等波谱数据结合文献确定化合物的结构, 分别鉴定为尿嘧啶 (1)、沙枣叶没食子酸糖酯B (2)、沙枣叶没食子酸糖酯A (3)、沙枣叶没食子酸糖酯C (4)、没食子酸 (5), 其中化合物2~4为新化合物, 化合物1为首次从该植物中分离得到。运用二苯基苦基苯肼 (DPPH)、2'-联氨双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS)、铁氰化钾还原法及酪氨酸酶催化左旋多巴氧化速率法评价化合物的体外抗氧化活性、酪氨酸酶抑制活性, 发现化合物2~5具有抗氧化和抑制酪氨酸酶两种活性, 其中化合物4抗氧化活性最强, 其DPPH自由基清除能力 (IC<sub>50</sub>) 为  $3.59 \pm 0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ABTS自由基清除能力 (IC<sub>50</sub>) 为  $10.04 \pm 0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 总还原能力均强于Vc; 化合物3表现出较好的酪氨酸酶抑制活性, 其IC<sub>50</sub>为  $0.25 \pm 0.06 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 沙枣叶; 没食子酸糖酯; 结构鉴定; 抗氧化活性; 酪氨酸酶抑制活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0434-08

## Three new gallic acid sugaresters from *Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend leaves and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities

CUI Feng-zhen<sup>1,2,3</sup>, FU Jian-hong<sup>1,2,3\*</sup>, XU Guo-yan<sup>1,2,3</sup>, Ayekabayr·EKBAYR<sup>1,2,3</sup>, MA Chang-da<sup>1,2,3</sup>

(1. Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Urumqi 830017, China; 2. Key Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, Urumqi 830017, China; 3. College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830017, China)

**Abstract:** Five compounds were isolated and purified from the water extract of *Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend leaf by multi-dimensional reversed-phase preparative liquid chromatographic system based on the separation and enrichment model. Their structures were identified by spectral analysis such as NMR, MS, UV, IR and by comparison with literature information as 2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedione (1), elaeagnussugarester B (2), elaeagnussugarester A (3), elaeagnussugarester C (4), gallic acid (5). Compounds 2–4 are new compounds, compound 1 was isolated from *Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend for the first time. The antioxidant and anti-tyrosinase activities of these compounds were evaluated by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method, the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical method, the potassium ferricyanide reduction method and the colorimetric method with *L*-tyrosine as substrate. The results showed that compounds 2–5 have good antioxidant activities and inhibitory effect on tyrosinase. Compound 4

收稿日期: 2024-09-12; 修回日期: 2024-11-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32260226); 新疆维吾尔自治区“天山创新团队计划” (2022D14004); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2021D01A122).

\*通讯作者 Tel: 13659907197, E-mail: fjh\_719@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0897

exhibited the most strong antioxidant activities, with  $IC_{50} = 3.59 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for DPPH free radical scavenging ability,  $IC_{50} = 10.04 \pm 0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for ABTS free radical scavenging ability, and total reduction capacity of compound **4** was better than vitamin C respectively. Compound **3** possessed better inhibitory effect on tyrosinase with  $IC_{50} = 0.25 \pm 0.06 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Key words:** *Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend leaf; gallic acid sugarester; structure identification; antioxidant activity; tyrosinase inhibitory activity

尖果沙枣 (*Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend) 为胡颓子科 (Elaeagnaceae) 胡颓子属 (*Elaeagnus*) 植物, 别名银柳、香柳、七里香和桂香柳等, 生长于半干旱、干旱、半荒漠、荒漠地, 主要分布于我国新疆、山西、河北及东北等地区<sup>[1]</sup>。沙枣枝、叶、花、果都具有较高的经济价值和药用价值, 是重要的中药材<sup>[2]</sup>。《中草药大典》记载了“沙枣叶, 味辛、涩, 性凉, 具有清热解毒、抗菌消炎、活血止血等功效”, 多用于细菌性痢疾、肠炎腹泻、慢性支气管炎、冠心病等疾病的治疗<sup>[3]</sup>。目前, 国内外对沙枣叶化学成分和药理作用方面的研究报道较少。有研究发现沙枣叶中主要含有多种微量元素和维生素C、绿原酸、黄酮等成分<sup>[4]</sup>。通过化学成分预试验初步判定新疆沙枣叶中含有多肽、蛋白质、有机酸、酚类、鞣质、皂苷、黄酮、甾体、三萜类等成分, 采用TLC法鉴别新疆沙枣叶水提部位含有没食子酸和鞣花酸<sup>[5]</sup>。据文献<sup>[6-8]</sup>报道沙枣叶提取物具有抗氧化、降糖和杀虫活性。

酪氨酸酶是黑色素形成的关键酶, 酪氨酸酶活性增高会导致面部黄褐斑等色素沉着性疾病。此外, 氧化是肌肤衰老的最大威胁。目前化学合成的抗氧化、美白产品会对人体产生一定不良反应, 因此, 从植物中分离具有抗氧化活性的酪氨酸酶抑制剂引起了国内外学者的普遍关注, 已成为开发美白美容化妆品的一种途径。本课题组前期研究发现, 新疆沙枣叶60%乙醇提取物具有很好的抗氧化作用和酪氨酸酶抑制活性, 并且从沙枣叶醇提物中分离得到具有酪氨酸酶抑制活性的黄酮醇苷类化合物和杂环类化合物。为丰富沙枣叶不同提取物的药效物质基础研究, 寻找具有多种生物活性的先导化合物, 本研究从尖果沙枣叶水提取物中分离得到5个化合物(图1), 包括3个新的没食子酸糖酯(**2~4**), 以及1个首次从沙枣中分离得到的尿嘧啶(**1**)。对化合物**1~5**进行体外抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性筛选, 结果表明, 化合物**2~5**同时具有抗氧化和抑制酪氨酸酶两种活性。

## 结果与讨论

### 1 结构鉴定

化合物**2** 白色粉末, HR-ESI-MS给出准分子离

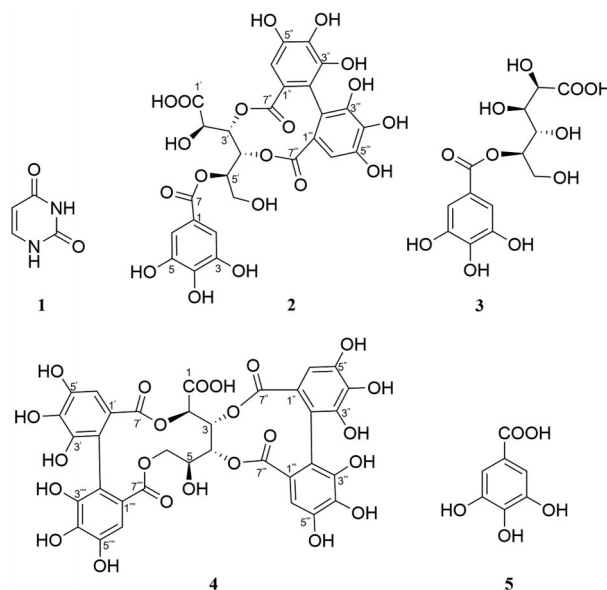


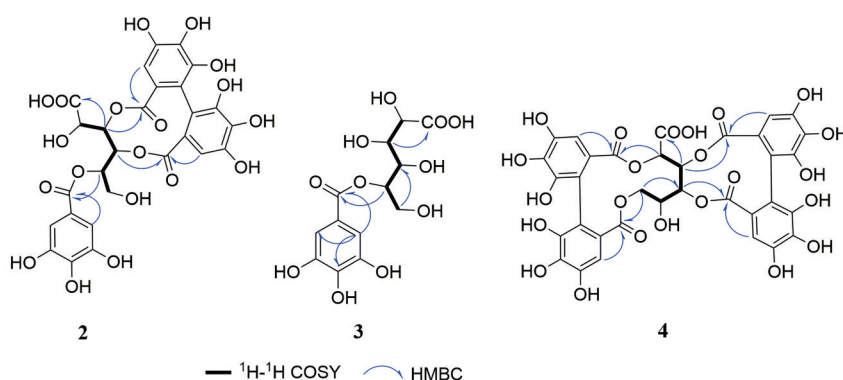
Figure 1 Chemical structures of compounds 1-5

子峰  $m/z$  651.084 1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 推测该化合物的分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{19}$ , 计算其不饱和度为 17, 红外光谱中存在羟基 ( $3\ 264\ \text{cm}^{-1}$ ) 和羰基 ( $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$ ) 的特征吸收峰。化合物**2**的 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) 数据(表1)显示低场区  $\delta_{\text{H}}$  6.99 处有 1 组峰面积为 2 个氢的单峰信号, 表明存在 1 个对称四取代苯环; 低场区  $\delta_{\text{H}}$  6.66、6.64 两个峰面积为 1 个氢的单峰, 表明有两个五取代苯环存在。化合物**2**的 $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) 显示 25 个碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  110.0 和  $\delta_{\text{C}}$  144.4 各对应 2 个碳原子), 包含 1 个亚甲基、8 个次甲基和 18 个季碳, 其中  $\delta_{\text{C}}$  170.3、169.6、169.1 和 167.0 为酯基/羧基碳信号, 表明存在 4 个酯基/羧基;  $\delta_{\text{C}}$  110.0 和 144.4 各对应 2 个碳原子, 表明该化合物存在局部对称结构, 结合化学位移及上述对称四取代苯环的推断, 可知存在 1 个没食子酸片段。

为了进一步确认化合物**2**的结构, 对化合物**2**进行了 2D NMR 测试。在 $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY 谱中(图2)显示存在 5.65 (d,  $J = 9.5\ \text{Hz}$ , 1H, H-2') 与 5.18 (dd,  $J = 9.5, 1.6\ \text{Hz}$ , 1H, H-3') 相关, 5.18 (dd,  $J = 9.5, 1.6\ \text{Hz}$ , 1H, H-3') 与 4.50 (dd,  $J = 9.6, 1.6\ \text{Hz}$ , 1H, H-4') 相关, 4.50 (dd,  $J = 9.6, 1.6\ \text{Hz}$ , 1H, H-4') 与 5.17 (m, 1H, H-5') 相关, 5.17 (m, 1H, H-5') 与 3.88 (m, 2H, H-6') 相关, 在 HMBC 谱

**Table 1**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data of compound **2** in  $\text{DMSO}-d_6$ 

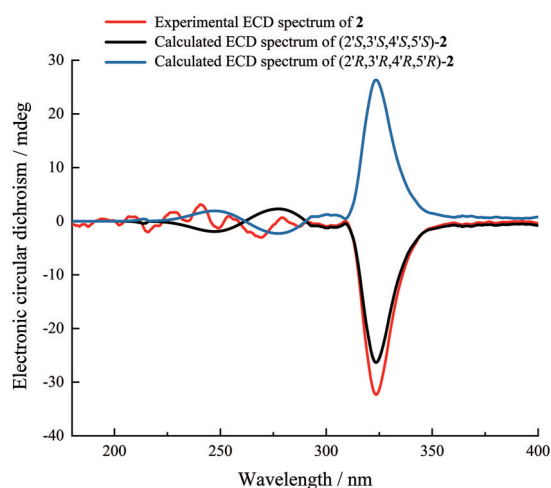
No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	120.1 (s)	–	2''	112.7 (s)	–
2	110.0 (d)	6.99 (s, 2H)	3''	144.8 (s)	–
3	144.4 (s)	–	4''	135.4 (s)	–
4	138.4 (s)	–	5''	143.5 (s)	–
5	144.4 (s)	–	6''	106.9 (d)	6.64 (s, 1H)
6	110.0 (d)	6.99 (s, 2H)	7''	169.6 (s)	–
7	167.0 (s)	–	1'''	125.0 (s)	–
1'	170.3 (s)	–	2'''	112.6 (s)	–
2'	75.2 (d)	5.65 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H)	3'''	144.7 (s)	–
3'	73.0 (d)	5.18 (dd, $J = 9.5, 1.6$ Hz, 1H)	4'''	135.3 (s)	–
4'	66.1 (d)	4.50 (dd, $J = 9.6, 1.6$ Hz, 1H)	5'''	143.4 (s)	–
5'	76.1 (d)	5.17 (m, 1H)	6'''	107.2 (d)	6.66 (s, 1H)
6'	60.6 (t)	3.88 (m, 2H)	7'''	169.1 (s)	–
1''	125.2 (s)	–			

**Figure 2** Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compounds **2**–**4**

中(图2)观察到 $\delta_{\text{H}}$  5.18 (dd,  $J = 9.5, 1.6$  Hz, 1H, H-3')与 $\delta_{\text{C}}$  170.3 (s, C-1')相关,可推断一个链状六碳糖酸片段的的存在。剩余14个碳原子和11个不饱和度,包含2个次甲基和12个季碳,结合化学位移,可推测存在两个没食子酸片段,并且这两个没食子酸片段以共价键相连,与上述链状六碳糖酸片段形成1个环,该推断可被HMBC谱中 $\delta_{\text{H}}$  5.18 (dd,  $J = 9.5, 1.6$  Hz, 1H, H-3')、 $\delta_{\text{H}}$  6.64 (s, 1H, H-6'')与 $\delta_{\text{C}}$  169.6 (s, C-7'')相关, $\delta_{\text{H}}$  4.50 (dd,  $J = 9.6, 1.6$  Hz, 1H, H-4')、 $\delta_{\text{H}}$  6.66 (s, 1H, H-6''')与 $\delta_{\text{C}}$  169.1 (s, C-7''')相关所证实。据文献<sup>[9–11]</sup>报道, $^3J_{\text{H,H}}$ 耦合常数常被用来确定难以结晶的多羟基化合物中羟基的立体构型,相邻两个羟基空间朝向相反时其耦合常数远大于取向相同时的耦合常数。如表1所示, $^1\text{H}$  NMR图谱表明H-2'对H-3'的耦合常数为9.5 Hz, H-4'对H-3'的耦合常数为1.6 Hz, H-5'与H-4'的耦合常数为9.6 Hz,从而可推断H-2'与H-3'空间取向相反, H-3'与H-4'空间取向相同, H-4'与H-5'取向相反,该推断也与C-3'、C-4'上的羟基能够与两个没食子酸形成平面结构的取向要求相吻合。综上确定该化合物的相对立体构型。通过TDDFT ECD模拟计算,当C-2'、C-3'、C-4'、C-5'位

为S构型时,化合物的理论计算ECD谱与实际测试图较为一致,进而确定化合物**2**的立体构型(图3),并命名为沙枣叶没食子酸糖酯B (elaeagnussugarester B)。

化合物**3** 白色粉末,HR-ESI-MS给出准分子离子峰 $m/z$  349.077 1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,推测其分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{11}$ ,不饱和度为6。化合物**3**的红外光谱显示了羟基

**Figure 3** Experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) spectra of compound **2**

(3 314  $\text{cm}^{-1}$ )、羰基 (1 620  $\text{cm}^{-1}$ ) 的特征吸收。化合物 **3** 的  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 数据 (表 2) 显示低场区  $\delta_{\text{H}}$  6.97 处有 1 组峰面积为 2 个氢的单峰信号, 表明存在 1 个对称四取代苯环; 化合物 **3** 的  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 显示 11 个碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  109.2 和  $\delta_{\text{C}}$  145.7 各对应 2 个碳原子), 包含 1 个亚甲基、6 个次甲基和 6 个季碳, 其中  $\delta_{\text{C}}$  174.6、165.7 为酯基/羧基碳信号。 $\delta_{\text{C}}$  109.2 和 145.7 各对应 2 个碳原子, 表明该化合物存在局部对称结构, 结合化学位移, 可知存在 1 个没食子酸片段; 剩余 1 个亚甲基、4 个次甲基和 1 个羧基, 结合  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY 图谱 (图 2), 可推断一个链状六碳糖酸片段的的存在; 在 HMBC 谱中 (图 2) 观察到  $\delta_{\text{H}}$  4.92 (m, 1H, H-5') 与  $\delta_{\text{C}}$  165.7 (s, C-7) 相关, 表明该六碳糖酸片段的 C-5 位与上述没食子酸片段以酯的形式相结合。综合以上信息, 确定了化合物 **3** 的结构 (图 1), 并命名为沙枣叶没食子酸糖酯 A (elaegnussugarester A)。

化合物 **4** 白色粉末, HR-ESI-MS 给出准分子离子峰  $m/z$  818.107 2  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 推测分子式为  $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{O}_{23}$ , 不饱和度为 23, IR 谱显示含有羟基 (3 279  $\text{cm}^{-1}$ ) 和羰基 (1 694  $\text{cm}^{-1}$ )。化合物 **4** 的  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 数据 (表 3) 显示低场区  $\delta_{\text{H}}$  6.46、6.41、6.32 和 6.29 四个峰面积为 1 个氢的单峰信号, 表明有 4 个五取代苯基存

在。化合物 **4** 的  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) 显示 34 个碳信号, 包含 1 个亚甲基、8 个次甲基和 25 个季碳, 其中  $\delta_{\text{C}}$  169.1、168.6、168.4、167.7 和 167.5 为酯基/羧基碳信号, 表明存在 5 个酯基/羧基。

通过 2D NMR 实验进一步确定化合物 **4** 的平面结构, 在  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY 谱中 (图 2) 显示存在  $\delta_{\text{H}}$  5.12 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H-2) 与 5.58 (dd,  $J = 9.8, 1.3$  Hz, 1H, H-3) 相关, 5.58 (dd,  $J = 9.8, 1.3$  Hz, 1H, H-3) 与 5.07 (dd,  $J = 9.6, 1.3$  Hz, 1H, H-4) 相关, 5.07 (dd,  $J = 9.6, 1.3$  Hz, 1H, H-4) 与 4.09 (m, 1H, H-5) 相关, 4.09 (m, 1H, H-5) 与 4.56 (m, 1H, H-6 $\alpha$ ) 和 3.80 (m, 1H, H-6 $\beta$ ) 相关, 在 HMBC 谱中 (图 2) 观察到  $\delta_{\text{H}}$  5.58 (dd,  $J = 9.8, 1.3$  Hz, 1H, H-3) 与  $\delta_{\text{C}}$  167.7 (s, C-1) 相关, 可推断一个链状六碳糖酸片段的的存在。剩余 28 个碳原子和 22 个不饱和度, 其中包含 4 个次甲基和 24 个季碳, 结合化学位移, 推测可能存在 4 个没食子酸片段, 并且这 4 个没食子酸片段两两以共价键相连, 与上述链状六碳糖酸片段形成 2 个环, 该推断可被 HMBC 谱中  $\delta_{\text{H}}$  5.12 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H-2)、6.29 (s, 1H, H-6') 与  $\delta_{\text{C}}$  167.5 (s, C-7') 相关、 $\delta_{\text{H}}$  5.58 (dd,  $J = 9.8, 1.3$  Hz, 1H, H-3)、6.46 (s, 1H, H-6'') 与  $\delta_{\text{C}}$  168.6 (s, C-7'') 相关、 $\delta_{\text{H}}$  5.07 (dd,  $J = 9.6, 1.3$  Hz, 1H, H-4)、6.41 (s, 1H, H-6''') 与  $\delta_{\text{C}}$  168.4 (s, C-7''') 相关、

**Table 2**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data of compound **3** in  $\text{DMSO-}d_6$

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	120.4 (s)	-	1'	174.6 (s)	-
2	109.2 (d)	6.97 (s, 2H)	2'	72.6 (d)	4.10 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H)
3	145.9 (s)	-	3'	71.2 (d)	3.72 (m, 2H)
4	138.7 (s)	-	4'	69.9 (d)	3.87 (dd, $J = 7.1, 3.4$ Hz, 1H)
5	145.9 (s)	-	5'	74.8 (q)	4.92 (m, 1H)
6	109.2 (d)	6.97 (s, 2H)	6'	59.9 (t)	3.72 (m, 2H)
7	165.7 (s)	-			3.63 (m, 1H)

**Table 3**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data of compound **4** in  $\text{DMSO-}d_6$

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	167.7 (s)	-	5''	144.9 (s)	-
2	72.7 (d)	5.12 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H)	6''	105.2 (d)	6.46 (s, 1H)
3	73.3 (d)	5.58 (dd, $J = 9.8, 1.3$ Hz, 1H)	7''	168.6 (s)	-
4	71.8 (d)	5.07 (dd, $J = 9.6, 1.3$ Hz, 1H)	1'''	125.6 (s)	-
5	66.9 (d)	4.09 (m, 1H)	2'''	115.0 (s)	-
6	67.8 (t)	4.56 (m, 1H)	3'''	145.3 (s)	-
		3.80 (m, 1H)	4'''	135.9 (s)	-
1'	125.3 (s)	-	5'''	145.0 (s)	-
2'	113.5 (s)	-	6'''	105.6 (d)	6.41 (s, 1H)
3'	145.2 (s)	-	7'''	168.4 (s)	-
4'	135.3 (s)	-	1''''	124.4 (s)	-
5'	145.1 (s)	-	2''''	113.3 (s)	-
6'	105.1 (d)	6.29 (s, 1H)	3''''	145.1 (s)	-
7'	167.5 (s)	-	4''''	135.2 (s)	-
1''	123.8 (s)	-	5''''	144.7 (s)	-
2''	115.9 (s)	-	6''''	105.3 (d)	6.32 (s, 1H)
3''	145.2 (s)	-	7''''	169.1 (s)	-
4''	134.9 (s)	-			

$\delta_{\text{H}}$  4.56 (m, 1H, H-6 $\alpha$ )、3.80 (m, 1H, H-6 $\beta$ )、 $\delta_{\text{H}}$  6.32 (s, 1H, H-6''') 与  $\delta_{\text{C}}$  169.1 (s, C-7''') 相关所证实。通过 $^3J_{\text{H,H}}$ 耦合常数确定化合物**4**中羟基的立体构型。如表3所示, $^1\text{H}$  NMR图谱表明H-2对H-3的耦合常数为9.8 Hz, H-4对H-3的耦合常数为1.3 Hz, H-5与H-4的耦合常数为9.6 Hz, 从而可推断H-2与H-3空间取向相反, H-3与H-4空间取向相同, H-4与H-5取向相反, 该推断同样与C-3、C-4上的羟基能够与两个没食子酸形成平面结构的取向要求相吻合。化合物**4**和**2**的CD谱相似, 综合以上信息, 确定了化合物**4**的结构(图1), 并命名为沙枣叶没食子酸糖酯C (elaegnussugarester C)。

## 2 化合物活性评价

### 2.1 抗氧化活性

用DPPH法、ABTS法以及铁氰化钾还原法对化合物**1**~**5**进行抗氧化活性检测。结果(图4A)显示化合物**2**~**5**均表现出很强的DPPH自由基清除能力, 进一步测定并计算这些化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值, 结果表明, 化合物**4**的抗氧化活性最强, 其 $\text{IC}_{50}$ 为 $3.59 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 明显强于阳性对照Vc ( $\text{IC}_{50}$ 为 $50.04 \pm 0.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。化合物**2**~**5**对DPPH自由基清除能力与浓度基本呈正量效关系, 表明其抗氧化活性随着化合物质量浓度的提高而增强。从图4B可以看出, 化合物**2**~**5**对ABTS自由基的清除率均呈正量效关系, 当化合物质量浓度达 $125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 清除率曲线变化缓慢, 说明大于此浓度的化合物对自由基的清除能力接近饱和, 继续增加浓度清除率趋于平衡。结合各化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值, 确定化合物**4**对ABTS自由基清除能力最强, 其 $\text{IC}_{50}$ 值为 $10.04 \pm 0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而Vc的 $\text{IC}_{50}$ 值为 $68.05 \pm 1.10$

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 $0\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 化合物**2**~**5**及Vc的还原能力随着浓度的增大而不断增大, 化合物**2**~**5**的还原能力均强于Vc(图4C)。

### 2.2 酪氨酸酶抑制活性

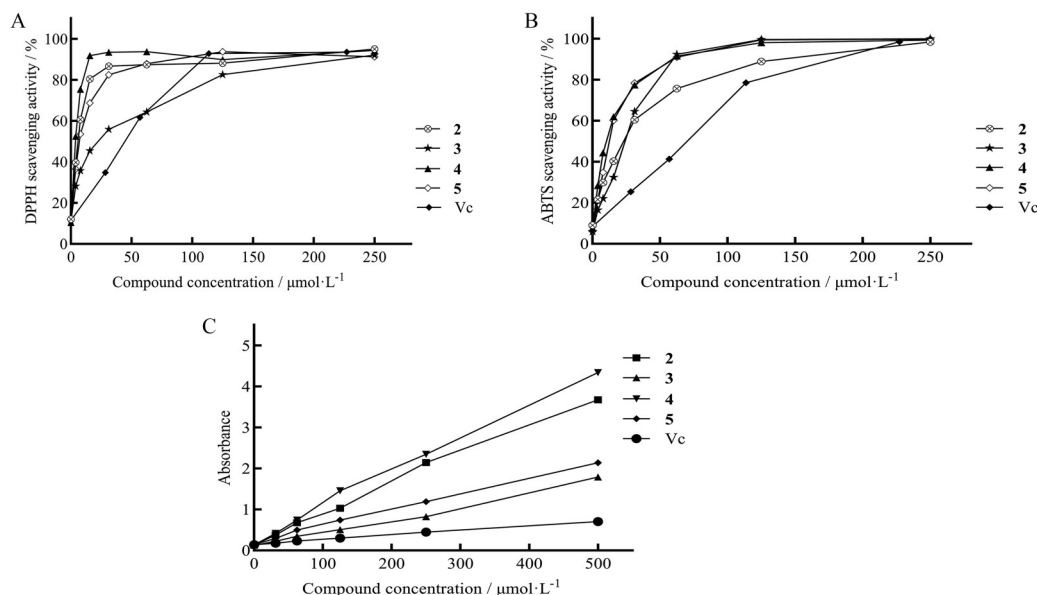
运用酪氨酸酶催化左旋多巴(L-DOPA)氧化速率的方法测定化合物**1**~**5**对酪氨酸酶抑制活性, 从表4可以看出, 化合物**2**~**5**在 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下表现出一定的酪氨酸酶抑制活性。进一步测定这些化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值, 结果表明, 化合物**3**的酪氨酸酶抑制剂活性最好, 其 $\text{IC}_{50}$ 值为 $0.25 \pm 0.06 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。随着浓度的增大, 化合物对酪氨酸酶活性的抑制能力逐渐增大, 呈剂量依赖性。

**Table 4** Screening of tyrosinase inhibitory activity.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . - indicates no activity; \* indicates positive control

Compd. ( $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Inhibition rate/%	$\text{IC}_{50}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>1</b>	$14.38 \pm 0.54$	-
<b>2</b>	$36.95 \pm 0.80$	$1.93 \pm 0.04$
<b>3</b>	$57.70 \pm 0.51$	$0.25 \pm 0.06$
<b>4</b>	$44.50 \pm 0.79$	$0.54 \pm 0.02$
<b>5</b>	$22.86 \pm 0.96$	$4.51 \pm 0.08$
Kojic acid*	$96.85 \pm 0.75$	$0.02 \pm 0.01$

## 3 小结

本研究采用反相多维液相制备色谱技术从沙枣叶水提物中分离纯化得到5个化合物, 其中化合物**2**~**4**为新化合物, 化合物**1**为首次从沙枣中分离得到。通过DPPH、ABTS和总还原力测定对化合物总体抗氧化活性进行评价。结果发现, 化合物**2**~**5**表现出较强的抗氧化活性, 且化合物的抗氧化活性与酪氨酸酶抑制



**Figure 4** Antioxidant activities of compounds **1**–**5**. A: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity; B: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity; C: Total reduction capacity

活性是相关联的, 化合物**2**~**5**也显示出一定的酪氨酸酶抑制活性, 这与文献<sup>[12]</sup>报道的酪氨酸酶是多酚氧化酶, 黑色素最终合成反应是由该酶催化超氧自由基等引发的过程相吻合。DPPH、ABTS两种方法中涉及的自由基可能与分离化合物对酪氨酸酶活性抑制机制有关, 具体的作用机制需要进一步的研究。有研究报道化合物**5**具有良好的抗氧化作用<sup>[13]</sup>, 其对酪氨酸酶活性的抑制作用尚未见报道。本研究在一定程度上充实了沙枣的药效物质基础, 为沙枣资源在抗氧化和抑制酪氨酸酶活性方面的应用提供科学依据和理论支持。

## 实验部分

Bruker-400型超导核磁共振光谱仪(德国Bruker公司); 岛津HPLC/SCIEX 500B Q-TOF高分辨液相-质谱联用仪(岛津企业管理中国有限公司); 制备型HPLC色谱仪(汉邦科技股份有限公司); 分析型HPLC色谱仪(美国沃特世公司); UV-4802S型紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; FOLI10衰减全反射分子结构光谱仪[荧飒光学科技(上海)有限公司]; J-1500圆二色谱仪(日本JASCO公司); WXG-4日式圆盘旋光仪(上海仪电物光仪器有限公司); FFX10002-ROF中试系列超纯水机(富勒姆科技有限公司); R-300型、R-220Pro型旋转蒸发仪(瑞士Büchi公司); BZF-50真空干燥箱、SW-CJ-2FD超净工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); Alpha 2-4 LDplus冻干机(德国Christ公司); Feyond-A300型酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司); 分析型色谱柱Tnature C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 华谱科仪北京科技有限公司)、Ultimate XB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 月旭科技上海股份有限公司); 制备型色谱柱C18YE(100 mm × 250 mm, 30 μm)、C18(100 mm × 250 mm, 10 μm)、NBA(50 mm × 250 mm, 10 μm, 美国赛默飞世尔科技公司); 制备乙腈、甲醇(湖北弗顿生化科技有限公司); 其他分析试剂均为色谱纯[萨恩化学技术(上海)有限公司]。蘑菇酪氨酸酶(SLCN1560)、L-DOPA(SLBR0479V)、曲酸(BCBL6311V, 美国Sigma公司); L-抗坏血酸(210113, 上海蓝季发展有限公司); DPPH(C21PB535100B)、ABTS(C21PC281300B), 北京普西唐生物科技有限公司; 过硫酸钾(20201017)、三氯化铁(20210925), 天津市鑫铂特化工有限公司; 三氯乙酸(2021101901, 成都市克隆化学品公司)。

沙枣叶于2023年7月采自新疆五家渠市蔡家湖镇, 经新疆师范大学付建红教授鉴定为胡颓子科胡颓子属尖果沙枣(*Elaeagnus oxycarpa* Schlechtend)的叶,

标本(No. 2023-0726)存放于新疆师范大学生命科学学院表观遗传学实验室。

## 1 提取与分离

干燥的尖果沙枣叶11.48 kg粉碎后加水(5:1)80 °C浸泡提取6次, 过滤, 合并滤液后减压浓缩至16.5 L, 加入无水乙醇至含醇量达70%, 醇沉2次, 抽滤, 合并上清液进行浓缩除醇。10.5 L浓缩的上清液用等量的二氯甲烷萃取4次后获得水部位约2 190 g, 采用反相制备型色谱柱C18YE(4.6 mm × 250 mm, 30 μm)对水部位进行分段。流动相为A相(乙醇)-B相(0.1%甲酸水), 用0~5 min, 0% A; 6~15 min, 8% A; 16~25 min, 15% A; 26~35 min, 20% A; 36~50 min, 30% A; 51~60 min, 50% A; 61~65 min, 80%~90% A; 65~70 min, 90% A进行梯度洗脱, 共得到15个组分Fr.1~Fr.15。Fr.2抽滤, 得到上清液(54.98 g)用反相制备型色谱柱C18(10 μm, 100DAC, 1.5 kg)分离, 采用甲醇(A)-0.1%甲酸水(B)的体系0~30 min, 5%~25% A进行梯度洗脱得到12个组分(Fr.2-D1~Fr.2-D12)。将Fr.2-D4浓缩至干, 加少量的水超声, 过滤, 得到化合物**1**(249.65 mg)。Fr.2-D11经反相制备型色谱柱C18(10 μm, 100DAC, 1.5 kg)分离, 采用甲醇(A)-水(B)的体系13% A等度洗脱得到化合物**5**(573.68 mg)。Fr.2-D8经反相液相色谱(10 μm C18柱, 甲醇-0.1%甲酸水, 330 mL·min<sup>-1</sup>, 5%甲醇等度洗脱), 再用C18+乙腈脱酸除杂得到化合物**2**(866.64 mg)。Fr.2-D9经反相液相色谱(10 μm C18柱, 乙腈-0.1%甲酸水, 330 mL·min<sup>-1</sup>, 5%乙腈等度洗脱)分离纯化得到化合物**3**和化合物**4**。化合物**3**、**4**脱酸除杂采用制备型色谱柱C18YE(10 μm, 50DAC, 300 g)和甲醇(A)-水(B)体系梯度洗脱(0~10 min, 0% A; 10~40 min, 15% A), 最终制备得到化合物**3**(224.67 mg)和化合物**4**(138.4 mg)。

## 2 结构鉴定

化合物**1** 白色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$  111.011 7 [M-H]<sup>-</sup>, 157.113 8 [M+COOH]<sup>-</sup>, 分子式为C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.1(s, 1H, -NH), 10.8(s, 1H, -NH), 7.40(d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-6), 5.46(d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-5); <sup>13</sup>C NMR(100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 152.0(s, C-2), 164.8(s, C-4), 100.7(d, C-5), 142.7(d, C-6)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物**1**为尿嘧啶。

化合物**2** 白色粉末;  $[\alpha]_D^{25}$ : +7.80; UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$ (log  $e$ ) 296(4.51) nm; IR  $\nu_{\max}$  3 264, 2 950, 2 836, 1 737, 1 622, 1 450, 1 360, 1 213, 1 127, 1 012 cm<sup>-1</sup>; HR-ESI-MS  $m/z$  651.084 1 [M+H]<sup>+</sup>(C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>, 计算值650); <sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)和<sup>13</sup>C NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)

数据见表1,并进一步经HMBC图谱(图2)证实。

化合物3 白色粉末;  $[\alpha]_D^{25}$ : +19.80; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $e$ ) 293 (4.11) nm; IR  $\nu_{\max}$  3 314, 2 949, 2 838, 1 741, 1 620, 1 450, 1 305, 1 227, 1 175, 1 014  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  349.077 1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{11}$  计算值 348);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) 和  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) 数据见表2, 化学结构式和HMBC偶合关系见图2。

化合物4 白色粉末;  $[\alpha]_D^{25}$ : +25.00; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $e$ ) 300 (4.41) nm; IR  $\nu_{\max}$  3 279, 2 945, 2 834, 1 741, 1 694, 1 615, 1 447, 1 364, 1 222, 1 104, 1 019  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  818.107 2  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  ( $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{O}_{23}$  计算值 800);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) 和  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) 数据见表3, 结构式及主要的HMBC关系见图2。

化合物5 乳白色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$  169.024 1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 193.930 0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (计算值 170), 其分子式为  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6.93 (s, 2H, H-2, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  120.9 (s, C-1), 109.2 (d, C-2, C-6), 145.9 (s, C-3, C-5), 138.4 (s, C-4), 168.0 (s, C-7)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致, 确定该化合物为没食子酸。

### 3 活性测定

#### 3.1 抗氧化活性检测

**3.1.1 DPPH 自由基清除能力** 参照文献<sup>[16]</sup>方法并改进, 以L-抗坏血酸作为阳性对照, 阴性对照 $A_3$ 为加入无水乙醇和DPPH溶液各100  $\mu\text{L}$ , 空白组 $A_2$ 为分别加入化合物溶液和无水乙醇100  $\mu\text{L}$ 。样品组 $A_1$ 为一定浓度的化合物溶液和0.16  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DPPH的乙醇溶液各100  $\mu\text{L}$ 加入96孔板中, 混合均匀, 室温避光放置40 min, 在517 nm处测定吸光度, 平行3次, 按照公式 (DPPH 自由基清除率% =  $[A_3 - (A_1 - A_2)] / A_3 \times 100\%$ ) 计算DPPH自由基清除率, 并用SPSS软件计算 $\text{IC}_{50}$ 值。

**3.1.2 ABTS 自由基清除能力** 参照文献<sup>[17]</sup>方法并改进, 将7.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABTS溶液与2.6  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液1:1混合于棕色瓶中, 置于室温暗处过夜, 配制成ABTS母液。将ABTS母液用无水乙醇稀释, 使其在30  $^\circ\text{C}$ 、734 nm处的吸光度为 $0.70 \pm 0.02$ , 即得到ABTS工作液。分别取50  $\mu\text{L}$ 不同浓度的化合物样品溶液至96孔板中, 加入ABTS工作液150  $\mu\text{L}$ , 设置3个平行样品组 $A_1$ , 阴性对照组 $A_3$ 为加入无水乙醇代替化合物溶液, 空白组 $A_2$ 为加入化合物溶液而不含ABTS工作液。点样完毕后, 充分混匀, 室温避光静置10 min, 在734 nm处测定吸光度, 平行3次, 按照公式 (ABTS 自由基清除率% =  $[1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$ ) 计算ABTS自由基清除率, 并用SPSS软件计算 $\text{IC}_{50}$ 值。

#### 3.1.3 总还原力的测定

参照文献<sup>[18]</sup>方法并改进, 配制质量分数为1%铁氰化钾溶液、质量分数为0.1%三氯化铁溶液和质量分数为10%三氯乙酸溶液(TCA)。将不同浓度的化合物溶液1 mL与1%铁氰化钾溶液1 mL混匀, 50  $^\circ\text{C}$ 水浴20 min, 冷却后加入10% TCA溶液1 mL, 混匀, 在3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心10 min, 取上清, 加入双蒸水1 mL和0.1%三氯化铁溶液1 mL, 混匀, 室温静置10 min, 在700 nm处测定其吸光度。以蒸馏水为空白, 每个化合物重复测定3次。吸光度越高, 说明还原力越强, 则抗氧化活性越强。

#### 3.2 酪氨酸酶抑制活性的测定

参照文献<sup>[19]</sup>方法并改进, 化合物作为效应物溶于含5% DMSO的磷酸盐(PBS)缓冲液中, 配制成不同浓度的效应物溶液。以0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-DOPA (终浓度)为底物, 在0.05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液(pH 6.8)的200  $\mu\text{L}$ 测活体系中, 将不同浓度的效应物溶液、PBS缓冲液、底物依次加入到96孔板中, 30  $^\circ\text{C}$ 下保温15 min, 最后加入蘑菇酪氨酸酶溶液, 置于酶标仪振荡5 s进行混匀, 在475 nm波长处测定体系在不同时间的吸光度值, 制作吸光度随时间增长的直线, 从直线斜率求得酶活力, 再以剩余相对酶活力对效应物浓度作图得到效应物的浓度效应曲线, 并计算 $\text{IC}_{50}$ 值。

### 4 统计学分析

实验数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用SPSS 27.0进行统计学分析。

**作者贡献:** 付建红负责实验设计; 崔凤真负责实验实施、数据分析以及文章的撰写; 徐国燕协助提取分离和化合物生物活性的测定工作; 阿依卡买尔·艾克拜尔、马畅达参与数据处理和分析工作; 付建红负责文章的审阅和提出论文写作的建议, 并最终定稿。

**利益冲突:** 作者声明无利益冲突。

### References

- [1] Lin R, Chen YL, Shi T. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 52. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1983: 45.
- [2] Sun Y, Liu Y, Yan XH, et al. Determination of total flavonoids in *Elaeagnus angustifolia* from Xinjiang and optimization of the extraction process [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2012, 51: 3570-3571.
- [3] Chen SL, Lin YL. Quintessence of Materia Medica (中草药大典) [M]. Vol 1. Beijing: Military Medical Science Press, 2006: 226.
- [4] Baiyertai, Yu ZY, Guo TT, et al. Determination of trace elements and principal components analysis in *Elaeagnus angustifolia* L. leaves from different growing areas of Xinjiang [J]. Chem

- Reagents (化学试剂), 2017, 39: 271-275.
- [5] Aizezi X, Baiyertai, Sun Y. Preliminary study on identification and chemical composition of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves in Xinjiang [J]. J Xinjiang Med Univ (新疆医科大学学报), 2019, 42: 529-532, 540.
- [6] Wang PX, Wang PX, Xie NX, et al. Scavenging activity of each part of ethanol extract of leaf of *Elaeagnus angustifolia* L. against DPPH [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2011, 22: 1848-1849.
- [7] Tian HL, Gong HY, Feng Y, et al. The effects of extracts from *Elaeagnus angustifolia* L. leaves of Xinjiang on blood glucose of diabetic mice [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2017, 56: 103-106.
- [8] Pumnuan J, Sannongmueagng T, Inyod T, et al. Insecticidal properties of bastard oleaster (*Elaeagnus latifolia*) extracts against diamondback moth (*Plutella xylostella*) [J]. Acta Horti, 2019, (1259): 135-142.
- [9] Jarvis AP, Johnson S, Morgan ED, et al. Photooxidation of nimbin and salannin, tetranortriterpenoids from the neem tree (*Azadirachta indica*) [J]. J Chem Ecol, 1997, 23: 2841-2862.
- [10] Wang H, Geng CA, Xu HB, et al. Lignans from the fruits of *Melia toosendan* and their agonistic activities on melatonin receptor MT<sub>1</sub> [J]. Planta Med, 2015, 81: 847-854.
- [11] Ochi M, Kotsuki H, Kataoka T, et al. Limonoids from *Melia azedarach* Linn. var. *Japonica* Makino. III. The structures of ohchinal and ohchinin acetate [J]. Chem Lett, 1978, 7: 331-334.
- [12] Gao XR, Shi SQ, Song XQ. Inhibition of tyrosinase and scavenging of O<sup>2</sup>-radicals by certain drugs [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1992, 19: 70-71.
- [13] Guo XD, Song JJ, Wang D, et al. Physiological activities and research status of gallic acid and its derivatives [J]. Chem World (化学世界), 2020, 61: 585-593.
- [14] Bai HY, Zhao C, Sun YJ, et al. Chemical constituents from *Diphylleia sinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 366-403.
- [15] Chu LL, Zhou XD, Wu J, et al. Chemical constituents of roots of *Rodgersia aesculifolia* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 2767-2780.
- [16] Wu Y, Cui BY, Wang L, et al. Comparison on the antioxidant activity and tyrosinase inhibitory effect of five natural plant extracts 5 [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2018, 34: 81-86, 37.
- [17] Xie DH, Xu J, Li ZM, et al. Determination of total phenolic acids and total flavonoids in aerial roots of *Ficus microcarpa* L. and their antioxidation activity [J]. J Trop Biol (热带生物学报), 2016, 7: 373-375.
- [18] Sun Y, Yang B, Wu Y, et al. Structural characterization and antioxidant activities of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods [J]. Food Chem, 2015, 178: 311-318.
- [19] Fu JH, Qi R, Zheng J, et al. Inhibition of mushroom tyrosinase by flavonoid from *Sorbus tianschanica* Rupr in Xinjiang [J]. Chin J Bioprocess Eng (生物加工过程), 2015, 13: 63-67.