

基于 HPLC-ESI-QTOF-MS 技术的金桂花降糖活性物质基础研究

童俊^{1#}, 刘红兵^{2#}, 刘颖伟¹, 张帆¹, 孙丽娟^{1*}, 陈勇^{1*}

(1. 湖北大学健康科学与工程学院, 药物高通量筛选技术国家地方联合工程研究中心, 中药生物技术湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430062; 2. 中国科学院精密测量科学与技术创新研究院, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉磁共振中心, 湖北 武汉 430071)

摘要: 本文通过体外对 α -葡萄糖苷酶活性、糖基化产物形成及抗氧化能力的影响, 综合评价了金桂花水提物的降糖活性, 并采用高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-ESI-QTOF-MS) 技术对金桂花水提物的主要化学成分进行了定性分析。体外药理活性研究表明, 金桂花水提取物对 α -葡萄糖苷酶具有显著的抑制活性, 抑制率 ($IC_{50} = 2.11 \pm 0.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与阿卡波糖相当 ($IC_{50} = 2.88 \pm 0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 同时具有一定的抑制糖基化产物和抗氧化能力。金桂花水提取物中化合物质谱定性分析主要参考对照品毛蕊花糖苷质谱裂解规律和相关文献, 鉴定出其中 73 个化合物, 包括 58 个苯乙醇苷类化合物, 8 个咖啡酰奎宁酸类化合物, 1 个黄酮类化合物和几个植物中常见有机化合物。本研究初步推测 61 种为桂花中首次发现的化合物, 其中 8 个目前尚无法鉴定结构的生物碱类化合物。研究结果为进一步阐明金桂花的降糖活性成分及制定科学的桂花质量控制标准提供了科学依据。

关键词: 金桂花; 降糖; α -葡萄糖苷酶; 抗糖基化; 抗氧化

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0750-10

Research on hypoglycemic activity of *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* extract

TONG Jun^{1#}, LIU Hong-bing^{2#}, LIU Ying-wei¹, ZHANG Fan¹, SUN Li-juan^{1*}, CHEN Yong^{1*}

(1. National & Local Joint Engineering Research Center of High-throughput Drug Screening Technology, Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Health Science and Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, National Center for Magnetic Resonance in Wuhan, Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: This study aimed to assess the hypoglycemic activity, and *in vitro* inhibition of α -glucosidase, inhibition of the advanced glycation end products (AGEs), and total antioxidant capacity were used to clarify its bioactivity. Furthermore, the potential hypoglycemic active chemical constituents in the aqueous extract of *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* flower were characterized using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadruple time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS) method. The result showed that *in vitro* inhibition of α -glucosidase of the extract ($IC_{50} = 2.11 \pm 0.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) were similar to acarbose ($IC_{50} = 2.88 \pm 0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), and it inhibited the AGEs formation and the total antioxidant capacity in a certain extent. Based on the MS fragmentation pathway analysis of reference chemical acteoside contained in this extract,

收稿日期: 2022-09-23; 修回日期: 2022-12-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31400304); 波谱与原子分子物理国家重点实验室开放项目 (T151203).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: lijiansun1212@163.com; cy101610@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1071

and related references, 73 constituents were tentatively identified from the aqueous extract of *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* flower, including 58 phenylethanoids, 8 caffeoylquinic acids, 1 flavonoid vicenin-2, and 6 common organic chemicals in plant. Furthermore, 8 unknown alkaloids were characterized in this work. Among of these chemicals, 61 phenylethanoids were supposed to be detected for the first time. In conclusion, this work disclosed the potential hypoglycemic active constituents of *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* flower.

Key words: *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*; anti-hyperglycemic; α -glucosidase; anti-glycosylation; anti-oxidant

桂花 (*Osmanthus fragrans*) 别称岩桂、木犀, 是木犀科 (*Oleaceae*) 木犀属 (*Osmanthus*) 植物, 广泛分布在我国长江流域及其以南地区, 资源十分丰富。以花色和开花季节作为划分依据, 桂花可被分为金桂、银桂、丹桂和四季桂四大品种群。据《本草纲目》记载, 其味甘、辛, 性温, 具有疏肝理气、祛痰止咳和顺肺开胃的功效。桂花在我国有悠久的种植与应用历史, 它不仅是一种优良的园林树种, 还在香料、食品和医药等方面有广泛应用^[1-3]。近年来从桂花的叶、花、果实、皮、籽及地上部分共分离并得到 183 种化学成分, 包括黄酮类、酚类、萜类、木脂素类、苯丙素类、有机酸及部分甾醇和生物碱类, 并发现其中一些化合物具有抗炎、抑菌、抗氧化、降血糖、降血脂、抗癌等生物活性^[4,5]。

金桂花 (*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*, 以下简写 *O. fragrans* var. *thunbergii*) 花色呈金黄色, 香气浓郁, 是桂花的主要品种群^[6]。桂花是我国大众广为使用药食两用药材, 其中以桂花开水冲饮最为简单和常见。因此本文研究了金桂花水提物体外对 α -葡萄糖苷酶活性、糖基化产物形成及自由基清除能力的影响, 综合评价了金桂花水提物的降糖活性, 并采用高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱 (HPLC-ESI-QTOF-MS) 技术对金桂花水提物的主要化学成分进行了定性分析, 探讨了金桂降血糖的物质基础, 为深入开展金桂花的食用和药用研究, 以及质量控制标志物研究提供了实验基础。

材料与方 法

仪器与试剂 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (在线脱气单元、四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器等部件组成, 美国 Agilent 公司); micrOTOF-Q 质谱仪 (德国 Bruker Daltonic 公司); HH-W600 三相恒温水箱 (江苏金坛中大仪器厂); TDL-5-A 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); TriStar LB 941 微孔多功能分析仪 (德国 Berthold Technologies 公司); DZF-6021 真空干燥箱 (上海精密科学仪器有限公司); BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); RB-3000B 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); FD-1A-50 冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器

有限公司); YDS-35-125 液氮生物容器 (四川成都金凤液氮容器有限公司); SK250HP 超声波振荡仪 (上海科导超声仪器有限公司)。

自由基清除实验试剂盒 (ABTS)、总抗氧化实验试剂盒 (FRAP) 购自上海碧云天生物科技有限公司; α -葡萄糖苷酶、4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG)、二甲基亚砷 (DMSO)、氨基胍、丙酮醛 (MGO) 购自美国 Sigma 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、青霉素-链霉素 (penicillin-streptomycin solution, 双抗) 购自浙江吉诺生物医药技术有限公司; 阿卡波糖购自上海阿拉丁公司; 色谱纯乙腈购自美国 TEDIA 公司; 毛蕊花糖苷 (acteoside) 购自成都麦德生科技有限公司; 其余试剂购自国药集团化学试剂有限公司; HPLC 用水为实验室 Millipore 超纯水器制备的 18.2 M Ω 超纯水。

试药 金桂花为广西桂林市售, 经过湖北大学药物高通量筛选国家地方联合工程研究中心陈勇教授鉴定为木犀科木犀属植物金桂 (*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*) 的干燥花, 样本现保存于湖北大学中药生物技术省重点实验室样本库 (No. 20210713)。

金桂花水提物制备与样品溶液制备 称取金桂花样品 10 g 于 250 mL 烧杯中, 加入 60 °C 温水 100 mL 浸润后, 放入装有 60 °C 温水的超声提取器以 30 kHz 提取 30 min, 过滤收集滤液后, 滤渣再用 60 °C 温水 80 mL 超声提取 30 min, 过滤并合并两次提取滤液, 静置放冷后冷冻干燥得金黄色无定形粉末提取物, 放入棕色干燥器中备用。

称取 7.5 mg 金桂花干燥提取物, 转移至 2 mL EP 管, 用移液器加入超纯水 1.5 mL, 充分振摇使样品充分溶解, 然后以 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 将滤液收集于 2 mL Agilent 棕色样品瓶中, 以备液相色谱分析。

α -葡萄糖苷酶抑制实验^[7] 以 PNPG 为底物, 阿卡波糖为阳性对照, 用 DMSO-PBS (1:9, pH 6.8) 配制不同浓度 (1、2、4 和 8 mg·mL⁻¹) 的金桂花水提物, 加入 α -葡萄糖苷酶 (0.5 U·mL⁻¹), 于 37 °C 恒温反应 10 min, 然后加入 PNPG (5.0 mmol·L⁻¹), 37 °C 恒温反应 20 min, 最后加入 Na₂CO₃ 溶液 (0.3 mol·L⁻¹) 终止反应, 在 405 nm 检测吸收度 (*A*) 值, 并依据公式 1 计算化合物对 α -葡萄

糖苷酶活性的抑制率:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = 1 - [(A_{\text{样}} - A_{\text{样空}}) / (A_{\text{酶}} - A_{\text{酶空}})] \times 100\% \quad (1)$$

抗糖基化能力测定^[8] 避光条件下, 将 60 mmol·L⁻¹ MGO 溶液 1 mL 和 1 mL 的不同浓度 (2.5、5、7.5、10 和 12.5 mg·mL⁻¹) 金桂花水提取物溶液混合。空白对照组溶液中加入 1 mL PBS, 阳性对照组加入 1 mL 不同浓度的氨基胍溶液, 于 37 °C 光照培养箱中孵育 2 h。孵育后, 加入 BSA (30 mg·L⁻¹) 溶液 1 mL 混匀, 随后加入将一定量的双抗, 于 37 °C 光照培养箱中孵育 6 天, 在激发波长 355 nm, 发射波长 460 nm 的条件下测定不同浓度组的荧光值, 计算金桂花水提取物抑制糖基化的 IC₅₀。

抗氧化活性的测定

FRAP 实验 使用 FRAP 试剂盒进行检测, 实验结果用 FeSO₄ 标准溶液的相对浓度来表示, 即同样的吸收度下, 待测物浓度与标准品 FeSO₄ 的浓度倍数表示。

ABTS 实验 使用 ABTS 试剂盒进行检测, 实验结果以 Trolox 等效抗氧化能力 (trolox-equivalent antioxidant capacity, TEAC) 来表示, 即同样的吸收度下, 待测物浓度与标准品 Trolox 的浓度倍数表示。

金桂花水提取物的主要化学成分分析 HPLC-ESI-QTOF-MS 分析中, 二极管阵列检测器 (DAD) 与质谱检测器为并联方式, 即样品溶液经色谱柱分离后的洗脱液经三通分流, 95% 洗脱液进入 DAD 检测器检测, 5% 洗脱液进入电喷雾离子源后进行质谱检测。

LC-MS 条件 色谱条件: 色谱柱为 Eclipse XD-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相由含 0.1% 甲酸的超纯水 (A) 和色谱纯乙腈 (B) 组成, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。梯度洗脱程序如下: 0 min, 5% B 相; 40 min, 40% B 相。DAD 检测器的波长范围设置为 190~690 nm, 其中固定监测波长为 254 和 280 nm。

质谱条件: 电喷雾 (ESI) 离子源, 毛细管电压 4 000 V, 雾化气 (N₂) 压力 0.8 bar (1 bar = 0.1 MPa), 干燥气 (N₂) 流速 8.0 L·min⁻¹, 干燥氮气温度 200 °C, 质量扫描范围 100~1 600 Da, 分别以正和负离子模式采集数据。质谱数据采用外标法进行质量轴校正, 即在色谱系统死时间 2 min 内, 泵 10 μL·min⁻¹ 甲酸钠溶液 (0.2 min) 校正液, 质谱数据采集完成后, 以甲酸钠校正液为外标对采集的质谱数据进行质量轴校正。

首先根据 Data Analysis 4.0 软件中 Dissect 功能对一级质谱 TIC 数据进行分解, 软件自动分解出若干化合物, 然后在自动模式下采集二级质谱数据。

数据分析 降糖活性药理学实验数据均来自 3 次独立重复实验, 数据用 mean ± SD 表示。组间数据比较采用 SPSS 17.0 软件进行 *t* 检验。

结果

1 金桂花水提取物对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用

以 PNPG 为底物, 阿卡波糖为阳性对照, 不同浓度金桂花水提取物对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制能力如图 1 所示。金桂花水提取物对 α-葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 值为 2.11 mg·mL⁻¹, 强于阳性对照药物阿卡波糖 (IC₅₀ 值为 2.88 mg·mL⁻¹), 表明金桂花水提取物有较强的体外抑制 α-葡萄糖苷酶的能力。

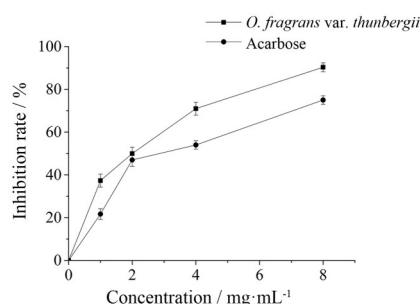


Figure 1 The inhibitive effect of the aqueous extract from *O. fragrans* var. *thunbergii* on α-glucosidase activity

2 金桂花水提取物对糖基化终产物生成的抑制作用

不同浓度金桂花水提取物对糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 形成的影响如图 2 所示。结果表明, 金桂花水提取物浓度依赖性地抑制了 AGEs 生成, IC₅₀ 值为 (9.90 ± 0.08) mg·mL⁻¹, 表明金桂花水提取物具有一定的抑制 AGEs 形成的能力。

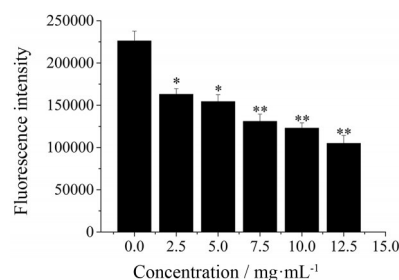


Figure 2 Fluorescence intensity of advanced glycation end products (AGEs) at different concentrations of the aqueous extract from *O. fragrans* var. *thunbergii*. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs control

3 金桂花水提取物的体外抗氧化能力

分别利用 FRAP 法和 ABTS 法评价了金桂花水提取物的体外抗氧化能力 (表 1)。结果表明, 金桂花水提取物抗氧化能力为对应浓度 Fe²⁺ 的 1.49 倍, 自由基清除能力相当于维生素 C 的 13%, 说明金桂花水提取物的体外抗氧化活性不明显。

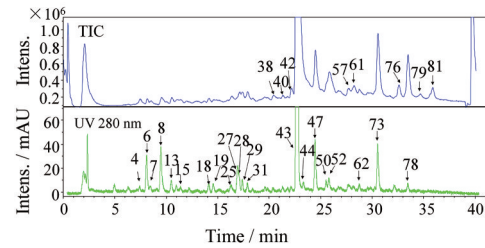
Table 1 *In vitro* antioxidant capacity and free radical scavenging capacity of the aqueous extract from *O. fragrans* var. *thunbergii* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). V_c: Vitamin C

Content	FRAP assay /mmol·g ⁻¹	ABTS assay /mmol·g ⁻¹
<i>O. fragrans</i> var. <i>thunbergii</i>	1.50 ± 0.13	0.73 ± 0.03
Fe ²⁺	1.00 ± 0.20	/
V _c	/	5.74 ± 0.08

4 金桂花水提物的主要化学成分鉴定

对比采集的正、负两种模式质谱数据发现, 负离子模式下(图3), 金桂花水提取物溶液中酚类化合物(苯乙醇苷与咖啡酰奎宁酸类)有着良好的质谱响应, 准分子离子峰和碎片离子强度均有高强度响应, 使得化合物的质谱鉴定相对容易; 而正离子模式下, 这些化合物的质谱图中会出现二聚离子峰、加合离子峰及二价离子峰, 对化合物准分子离子峰的确定及结构鉴定产生干扰, 因此本文主要对负离子模式下高分辨质谱数据进行了充分分析。结合对照品毛蕊花糖苷的二级质

谱特征和相关参考文献^[3,6,9-20], 初步鉴定出金桂花水提取物中73个化合物, 并标注出8种生物碱类化合物, 各化合物的实测值与理论值误差均在3 mDa之内(表2)。73种初步鉴定的化合物中包含58个苯乙醇苷类、8个咖啡酰奎宁酸类、1个黄酮维采宁-2和6个植物中常见有机化合物。比对桂花研究文献综述^[4,5], 以及桂花提取物物质谱鉴定相关文献^[3,6,9,10,12,13,16,18-23], 初步确认其中61种为首次从桂花中发现。

**Figure 3** The TIC and UV 280 nm chromatograms of aqueous extract of *O. fragrans* var. *thunbergii*. The peak numbers are consistent with those in Table 2**Table 2** Compounds identified in *O. fragrans* var. *thunbergii* by HPLC-ESI-QTOF-MS in negative ion polarity modes. *Phenylethanoids first discovered from *O. fragrans* var. *thunbergii*; #Compounds about alkaloid first discovered from *O. fragrans* var. *thunbergii*

Peak No.	<i>t_R</i> /min	[M-H] ⁻		Fragment ion	Chemical formula	Identification	Reference
		Detected	Expected				
1	2.1	191.058 8	191.056 1		C ₇ H ₁₁ O ₆	Quinic acid	9
2	2.2	499.166 9	499.166 8	191.055 5, 181.069 9, 173.043 9	C ₁₉ H ₃₁ O ₁₅	Quinic acid derivative	9
3	5.9	315.108 5	315.108 5	153.052 1	C ₁₄ H ₁₉ O ₈	Hydroxytyrosol glucoside	9
4	7.4	461.166 5	461.166 4	315.102 2, 297.090 0, 179.053 4, 161.043 1, 135.044 1	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	Verbasoside	10
5*	7.8	705.170 5	705.170 6	623.194 2	C ₂₉ H ₃₇ SO ₁₈	Acteoside sulfurous acid	
6	8.2	299.112 0	299.113 6	119.047 5	C ₁₄ H ₁₆ O ₇	Salidroside	3, 6, 9
7	8.5	487.142 3	487.145 7	179.031 9, 161.022 0, 135.043 4	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	Caffeoyl rhamnosyl glucoside	3, 9
8*	9.5	461.168 2	461.166 4	299.113 1, 179.051 0, 161.043 6	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	Tyrosol diglucoside	
9	9.6	431.155 5	431.155 8	299.109 9	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₁	Osmanthuside H isomer	
10*	9.7	337.093 8	337.092 9	163.041 2, 191.057 7	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	3-Coumaroylquinic acid	11
11*	9.8	705.169 9	705.170 2	623.196 9, 461.161 7	C ₂₉ H ₃₇ SO ₁₈	Acteoside sulfurous acid	
12*	10.0	431.155 3	431.155 9	392.110 6, 299.110 8, 179.051 4	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₁	Osmanthuside H	10
13	10.5	353.087 6	353.087 8	191.057 6	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	5-Caffeoylquinic acid	11
14*	10.8	705.170 1	705.170 6	623.195 1	C ₂₉ H ₃₇ SO ₁₈	Acteoside sulfurous acid	
15*	11.4	705.169 9	705.170 6	623.196 1, 461.161 7	C ₂₉ H ₃₇ SO ₁₈	Acteoside sulfurous acid	
16	11.5	353.087 6	353.087 8	191.052 3, 179.030 3, 173.041 7	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	4-Caffeoylquinic acid	11
17*#	13.0	620.117 2	620.119 8	448.101 2, 422.084 6, 171.004 0	C ₁₄ H ₂₂ NO ₁₁	Alkaloid	
18*	14.2	337.092 9	337.092 9	191.056 9, 163.035 4	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	5-Coumaroylquinic acid	11
19*	14.6	337.092 7	337.092 9	191.052 4, 173.046 1, 163.037 7	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	4-Coumaroylquinic acid	11
20*#	14.9	535.179 7	535.178 1	422.083 2, 371.132 5, 284.015 7, 220.057 8	C ₂₁ H ₃₁ N ₂ O ₁₄	Alkaloid	
21*	15.1	593.146 2	593.151 2	503.109 0, 473.101 6, 383.068 6, 353.059 0	C ₂₇ H ₃₉ O ₁₅	Vicenin-2	
22*#	15.4	436.104 3	436.103 8	304.910 0, 272.053 7, 174.953 9	C ₂₃ H ₁₈ NO ₈	Alkaloid	
23*	15.8	641.206 3	641.208 7	623.197 9, 461.166 6, 137.021 1	C ₂₉ H ₃₇ O ₁₆	Acteoside hydrator	
24*	16.2	703.151 7	703.151 6	541.115 6	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₈	Novel	
25*	16.3	367.103 6	367.103 5	191.056 3, 173.045 3	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	5-Feruloylquinic acid	11
26*#	16.5	450.115 8	450.116 5	422.085 3, 286.066 7, 220.055 6, 176.066 9	C ₂₄ H ₂₀ NO ₈	Alkaloid	
27*	16.8	785.250 1	785.251 0	623.193 5, 161.018 5	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₀	Echinacoside isomer	12
28	17.1	639.193 7	639.193 1	621.178 2, 529.153 4, 487.134 3, 179.031 3	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₆	<i>r</i> -Suspensaside	9, 10
29	17.4	639.193 7	639.193 1	621.178 2, 529.150 9, 487.139 1, 459.147 5, 179.031 3, 161.022 0	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₆	<i>s</i> -Suspensaside	9, 10
30*	17.6	459.092 3	459.093 3	413.081 5, 383.070 9, 321.021 9, 148.988 8	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁	Alkaloid	
31*	17.9	785.251 1	785.251 0	623.198 1, 179.030 5, 161.023 4, 135.041 5	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₀	Echinacoside isomer	12
32*	18.3	735.124 1	735.120 3	653.150 7, 487.133 1, 179.032 8	C ₃₂ H ₃₁ SO ₁₈	Novel	

Continued

Peak No.	t_R /min	[M-H] ⁻		Fragment ion	Chemical formula	Identification	Reference
		Detected	Expected				
33*#	19.0	493.221 4	493.225 0	422.084 2, 284.014 3, 220.054 9, 149.041 6	C ₂₄ H ₃₃ N ₂ O ₉	Alkaloid	
34*	19.3	461.104 6	461.103 1	411.068 0, 291.079 1, 259.086 6, 230.988 8	C ₂₉ H ₁₇ O ₆	Alkaloid	
35*	19.5	785.251 1	785.251 0	623.193 6, 161.017 2	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₀	Echinacoside isomer	12
36*	19.7	637.172 5	637.171 5	475.139 8	C ₃₆ H ₂₉ O ₁₁	Novel	
37*	20.0	569.221 7	569.224 0	329.136 0	C ₂₇ H ₃₇ O ₁₃	Novel	
38*	20.4	785.252 7	785.251 0	623.193 6, 461.159 7, 161.017 2	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₀	Echinacoside isomer	12
39*#	20.9	542.140 1	542.139 8	493.224 1, 422.082 0, 331.166 5, 284.018 7	C ₃₇ H ₂₀ NO ₄	Alkaloid	
40*	21.5	755.237 2	755.240 4	593.210 0, 179.031 0, 161.022 8, 135.041 9	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉	Forsythoside B	13
41*	21.6	797.249 6	797.251 0	623.196 5, 461.148 4, 161.017 4	C ₃₆ H ₄₅ O ₂₀	Luteoside A	14
42*#	22.1	422.085 0	422.088 1	340.110 6, 284.016 2, 220.056 1, 176.067 2	C ₂₂ H ₁₆ NO ₈	Alkaloid	
43	22.7	623.194 6	623.198 1	461.160 5, 179.029 2, 161.022 8, 133.027 7	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅	Acteoside	3, 6, 9, 10, 15, 16
44*#	23.4	739.208 1	739.209 1	623.193 8, 577.177 3, 461.165 4, 161.020 7	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	Malated acteoside	
45*	23.8	769.252 3	769.256 1	623.192 5, 607.226 8	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉	Ligupurpuroside A	17
46*	24.0	739.206 9	739.209 1	623.193 7, 161.022 5	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	Malated acteoside	
47	24.5	623.195 1	623.198 1	461.164 3, 179.032 7, 161.023 0, 133.027 7	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅	Isoacteoside	3, 6, 9, 10
48*	25.2	1 245.391 2	1 245.387 9	541.171 3, 461.165 9, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
49*	25.2	665.208 1	665.208 7	161.023 7	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	Acetylacteoside isomer	18
50*	25.5	607.203 9	607.203 2	445.167 2, 161.022 1	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	Syringalide A 3'- <i>O</i> -rhamnoside	19
51	25.7	1 245.391 2	1 245.387 9	541.171 3, 461.165 9, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
52*	25.8	607.202 4	607.203 2	461.164 3, 145.028 6	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	Isosyringalide 3'- <i>O</i> -rhamnoside	19
53*	25.8	929.240 4	929.241 6		C ₃₆ H ₄₉ O ₂₈	Acteoside derivative	
54*	26.6	1 245.387 0	1 245.387 9	541.176 4, 461.166 0, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
55*	26.7	637.212 6	637.213 7	461.162 6, 175.037 2	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	Leucosceptoside A	12
56*	27.2	607.203 3	607.203 2	461.160 3, 145.031 3	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₄	Isosyringalide 3'- <i>O</i> -rhamnoside isomer	19
57*	27.5	665.208 7	665.208 7	503.175 4, 461.167 0, 161.023 7	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	Acetylacteoside isomer	18
58*	27.6	723.213 4	723.214 2	623.193 3, 561.176 8, 461.163 8, 161.024 1	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₈	Succinylated acteoside	
59*	28.0	1 245.387 2	1 245.387 9	541.176 4, 487.145 6, 461.166 0, 179.031 8, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
60*	28.1	929.240 2	929.241 6	897.216 6, 847.267 8, 665.208 1, 623.195 6, 161.027 1	C ₃₆ H ₄₉ O ₂₈	Acteoside derivative	
61*	28.5	1 245.384 0	1 245.387 9	541.168 8, 487.139 1, 461.167 5, 179.034 2, 161.023 0	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
62*	28.7	591.205 2	591.208 3	445.166 4, 299.111 5, 163.037 6, 145.029 5	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	Osmanthuside B	4, 5, 18
63*	28.9	1 245.384 0	1 245.387 9	541.168 8, 487.142 2, 461.166 0, 179.034 2, 161.023 0	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
64*	29.0	685.235 1	685.234 9	565.165 4, 361.126 5	C ₃₁ H ₄₁ O ₁₇	Ligustroside 3'- <i>O</i> -glucoside isomer	
65*	29.5	1 245.384 0	1 245.387 9	541.168 8, 487.145 4, 461.166 0, 179.032 5, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
66	29.7	445.148 7	445.150 4	163.037 0, 145.027 3	C ₂₃ H ₂₅ O ₉	Osmanthuside A	4, 5
67	29.9	1 171.371 7	1 171.372 3	623.199 0	C ₅₂ H ₆₇ O ₃₀	Glucosideacteoside	18
68*#	30.0	422.086 2	422.088 1	284.016 1, 220.057 8, 176.069 8	C ₂₂ H ₁₆ NO ₈	Alkaloid	
69*	30.0	591.205 4	591.208 3	387.137 8, 163.038 0, 145.029 6	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	Osmanthuside B isomer	
70*	30.2	1 245.385 6	1 245.387 9	541.171 2, 487.139 4, 179.031 3, 161.021 6	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
71*	30.7	1 245.385 6	1 245.387 9	541.169 0, 487.139 7, 179.035 0, 161.022 5	C ₅₈ H ₆₉ O ₃₀	Acteoside dimer	
72*	30.7	665.208 1	665.208 7	503.171 5, 361.126 4, 161.023 7	C ₃₁ H ₃₇ O ₁₆	Acetylacteoside isomer	18
73	30.7	1 009.341 0	1 009.340 6	847.278 1, 623.198 1	C ₄₃ H ₆₁ O ₂₇	Oleoacteoside	18
74*	31.0	591.205 1	591.208 3		C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	Osmanthuside B isomer	4, 5
75*	31.6	1 009.341 0	1 009.340 6	847.278 1, 623.198 1	C ₄₃ H ₆₁ O ₂₇	Oleoacteoside	18
76	32.5	685.235 7	685.234 9	565.174 7, 361.127 9, 291.079 8, 259.090 8, 223.055 9	C ₃₁ H ₄₁ O ₁₇	Ligustroside 3'- <i>O</i> -glucoside	20
77*	33.1	711.286 0	711.287 0	531.218 3, 487.224 8, 299.114 8	C ₃₄ H ₄₇ O ₁₆	Salidroside derivative	
78	33.5	523.181 8	523.182 1	361.128 8, 291.081 7, 259.090 9, 223.055 4	C ₂₅ H ₃₁ O ₁₂	Ligustroside	6, 13
79	34.5	591.205 1	591.208 3		C ₂₉ H ₃₅ O ₁₃	Osmanthuside B isomer	4, 5
80*	35.3	1 009.341 0	1 009.340 6	847.278 1, 623.198 1	C ₄₃ H ₆₁ O ₂₇	Oleoacteoside isomer	18
81*	37.2	477.212 4	477.213 0	163.036 9, 145.026 4	C ₂₅ H ₃₃ O ₉	Osmanthuside A derivative	

4.1 58种苯乙醇苷类化合物鉴定 通过对比标准品毛蕊花糖苷在色谱保留时间和质谱特征, 确认TIC中保留时间为22.6 min的色谱峰为毛蕊花糖苷。毛蕊花糖苷的二级质谱(图4), 根据精确质量推测其裂解途径为准分子离子峰 m/z 623.1980在碰撞下脱去咖啡酰基产生特征碎片离子 m/z 461.1660, 脱去的咖啡酰基继续脱水产生特征碎片离子 m/z 161.0228^[15,16]。

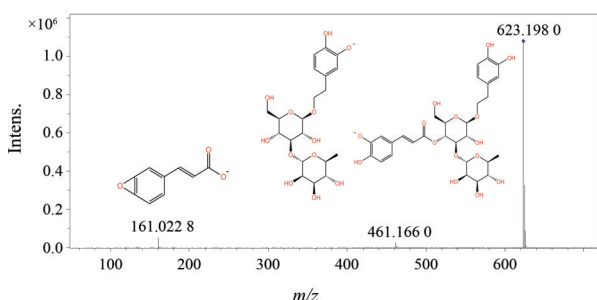


Figure 4 The MS/MS spectrum of acteoside

保留时间24.4 min的色谱峰具有与毛蕊花糖苷相同准分子离子峰与碎片离子, 根据桂花文献报道^[3,6], 推测该物质为异毛蕊花糖苷。

保留时间7.4和9.5 min的色谱峰是一对准分子离子分别为 m/z 461.1665和461.1682的同分异构体, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{20}H_{30}O_{12}$ 。这对化合物具有与毛蕊花糖苷的碎片离子 m/z 461.1660具有相同的质量, 可能具有相似的结构。7.4 min同分异构体二级质谱中, 产生碎片离子 m/z 315.1022和299.1131, 推测为分别脱去鼠李糖和葡萄糖基团后产生, 因此, 保留时间7.4 min的色谱峰应为桂花中已知化合物verbasoside^[9]。而9.5 min同分异构体二级质谱中主要碎片离子为 m/z 299.1131, 推测为准分子离子峰脱去葡萄糖基团后产生, 而 m/z 299.1131为与红景天苷(salidroside)的准分子离子峰(化学式 $C_{14}H_{19}O_7$, 理论值299.1136)具有相同结构, 因此推测此化合物为酪醇二糖苷, 推测为桂花中首次发现的化合物。

在9.6和10.0 min检测到一对准分子离子峰, 分别为431.1555和431.1553的同分异构体, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{19}H_{28}O_{11}$ 。此同分异构体均有 m/z 299.1099和299.1106碎片离子, 提示其结构中有红景天苷结构片段, 因此推测10.0 min含量较高的异构体为桂花中已知化合物桂叶苷H(osmanthuside H)^[4,5,9], 9.6 min异构体为桂花中首次发现的桂叶苷H异构体。

在15.8 min检测到准分子离子峰 m/z 641.2063, 根据精确质量推测分子式为 $C_{29}H_{38}O_{16}$ 。其二级质谱产生碎片离子 m/z 623.1979、461.1666和137.0221, 根据准分子离子峰 m/z 641.2063与碎片离子 m/z 623.1979

的质量差推测其为毛蕊花糖苷水合物, 可能为水加成的位点推测为咖啡酰基团上的双键, 为桂花中首次发现的化合物。

在16.8、17.9、19.5和20.4 min分别检测到准分子离子峰 m/z 785.2501、785.2511、785.2511和785.2527的四个同分异构体, 根据质谱特征推测其分子式为 $C_{35}H_{46}O_{20}$ 。这四个色谱峰的二级质谱均有 m/z 623.1980(理论值, 化学式 $C_{29}H_{35}O_{15}$)、461.1660(理论值, 化学式 $C_{20}H_{29}O_{12}$)和161.0244(化学式 $C_9H_5O_3$, 理论值 m/z 161.0244), 故推测为毛蕊花糖苷的四个葡萄糖衍生物。厚朴中曾经分离出毛蕊花糖苷的葡萄糖衍生物松果菊苷(echinacoside)^[12]。本研究发现的松果菊苷和/或同分异构体为桂花中首次发现。

在17.1和17.4 min检测到一对准分子离子峰 m/z 639.1937同分异构体, 其二级质谱具有相同碎片, 根据桂花参考文献^[9,10], 分别指认为*r*-和*s*-suspensaside。

在21.5 min检测到准分子离子峰 m/z 755.2372的色谱峰, 其二级质谱碎片 m/z 593.1901、179.0310、161.0228、135.0419, 根据准分子离子峰精确质量推测分子式为 $C_{34}H_{44}O_{19}$, 根据准分子离子峰与碎片离子 m/z 593.2100的质量差, 推测此化合物结构容易脱去外周 $[C_9H_6O_3]$ 碎片; 而碎片离子 m/z 179.0310、161.0228、135.0419进一步证实结构中存在咖啡酸结构片段, 根据此特征苯乙醇苷类化合物连翘酯苷B(forsythoside B)符合此特征^[13], 为桂花中首次发现的化合物。

在21.6 min检测到准分子离子峰 m/z 797.2496化合物, 根据其精确分子量推测其分子式为 $C_{36}H_{45}O_{20}$ 。其二级质谱碎片 m/z 623.1965、461.1484、161.0174, 根据精确质量推测为毛蕊花糖苷衍生物, 分子式为 $C_{36}H_{46}O_{20}$ 。根据此结构特征, 推测此化合物可能为luteoside A^[14], 为桂花中首次发现的化合物。

在23.4和24.0 min分别检测到准分子离子峰 m/z 739.2081和739.2069的一对同分异构体, 根据准分子离子峰精确质量推测分子式为 $C_{33}H_{40}O_{19}$ 。23.4 min化合物二级质谱碎片 m/z 623.1953、577.1772、461.1623和161.0174, 其中 m/z 577.1772为准分子离子峰失去外周 $[C_9H_6O_3]$ 片段后产生的碎片离子, 而24.0 min的化合物二级质谱仅有 m/z 623.1937与161.0225这两个碎片离子, 表明两化合物结构有一定差别。这对同分异构体的分子式, 与毛蕊花糖苷分子式相差 $[C_4H_4O_4]$, 推测化合物为苹果酰毛蕊花糖苷(malated acteoside), 为桂花提取物中首次检测到的新化合物。

在23.8 min检测到 m/z 769.2523, 根据准分子离子峰精确质量推测分子式为 $C_{35}H_{46}O_{19}$ 。其二级质谱碎片 m/z 623.1953和607.2268, 其中 m/z 607.2268为准

分子离子峰失去外周 $[C_9H_6O_3]$ 片段后的碎片离子, 根据质谱特征推测此化合物可能为紫茎女贞苷 A (ligu-purpurosido A)^[17], 为桂花中首次检测到的化合物。

在 25.5、25.8 和 27.2 min 分别检测到准分子离子峰 m/z 607.203 8、607.202 4 和 607.203 3 的三个同分异构体, 根据精确质量推测分子式为 $C_{30}H_{36}O_{14}$ 同分异构体, 比毛蕊花糖苷的分子式少一个氧原子。25.8 和 27.2 min 的两个化合物的二级质谱主要碎片离子 m/z 461.1660 (化学式 $C_{20}H_{29}O_{12}$, 理论质量 461.166 4)、145.028 0 (化学式 $C_9H_5O_2$, 理论质量 145.029 5) 和 161.017 4。根据毛蕊花糖苷的裂解规律, 推测 m/z 145.028 0 为准分子离子峰脱去的对羟基肉桂酸进一步失去一个水分子后产生的碎片离子。因此推测这两个化合物为 isosyringalide 3'-*O*-rhamnoside 及其同分异构体, 其分子式比毛蕊花糖苷少一个氧原子。而 25.5 min 化合物的二级质谱主要碎片离子为 m/z 445.167 2 (化学式 $C_{20}H_{29}O_{11}$, 理论质量 445.171 5) 与 161.017 4 (化学式 $C_9H_5O_3$, 理论值 m/z 161.024 4), m/z 445.167 2 与 461.166 0 之间精确质量差正好为一个氧原子, 因此推测此化合物为 syringalide A 3'-*O*-rhamnoside^[19]。根据桂花文献综述^[4,5], 这三个化合物为首次在金桂花中检测出。

在 26.7 min 检测到准分子离子峰 m/z 637.212 6, 根据精确质量推测分子式为 $C_{30}H_{38}O_{15}$ 。根据其二级质谱碎片离子 m/z 461.162 6 和 175.037 2, 推测其为毛蕊花糖苷类似物, 根据碎片离子 m/z 175.037 2 与 161.024 4 的精确质量差, 确定为一个亚甲基的差别, 从而推测 m/z 175.037 2 来自于阿魏酰基团, 因此推测此化合物为米团花苷 A (leucosceptoside A)^[12], 为首次从桂花中检测到的已知化合物。

在 25.2、27.5 和 30.6 min 分别检测到准分子离子峰 m/z 665.208 6、665.210 7 和 665.205 8 三个化合物, 根据精确质量推测分子式为 $C_{31}H_{38}O_{16}$, 比毛蕊花糖苷分子式相比多一个乙酰基^[3]。25.2 min 化合物的强度较低, 其二级质谱仅观察到 m/z 161.024 4 碎片离子, 而 27.5 min 的化合物二级质谱中碎片离子有 m/z 503.175 4、461.167 0 和 161.023 7, 30.6 min 的化合物二级质谱中碎片离子 m/z 503.171 5 和 161.023 7。从碎片离子 m/z 503.175 4 (化学式 $C_{22}H_{31}O_{13}$, 理论质量 503.177 0), 可知乙酰基连接在脱咖啡酰毛蕊花糖苷残基 (化学式 $C_{20}H_{29}O_{12}$, 理论值 m/z 461.166 4) 上。目前的质谱数据, 难以推断出更具体的乙酰基团连接位点。迄今为止, 2-乙酰毛蕊花糖苷、6-乙酰毛蕊花糖苷和 4"-乙酰毛蕊花糖苷等三个乙酰毛蕊花糖苷^[3,18]的文献报道, 桂花仅分离出 4"-乙酰毛蕊花糖苷, 因此本研究在桂花中又发现两种乙酰毛蕊花糖苷。

在 27.6 min 检测到准分子离子峰为 m/z 723.213 4 的化合物, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{33}H_{40}O_{18}$ 。其二级质谱有 m/z 623.201 1、561.179 1、461.163 7 和 161.024 1 等碎片离子, 根据碎片离子 m/z 561.179 1 精确推测其为准分子离子峰脱去咖啡酰基后产生。此化合物与毛蕊花糖苷分子式相比多 $[C_4H_4O_3]$ 片段, 推测为琥珀酰毛蕊花糖苷 (succinylated acteoside), 为桂花中首次发现, 并可确认为新化合物。

在 25.8 和 28.1 min 检测到准分子离子峰分别为 m/z 929.240 4 和 929.240 2 的一对同分异构体, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{36}H_{50}O_{28}$ 。28.1 min 化合物的二级质谱中有 m/z 897.216 6、847.267 8、665.208 1、623.195 6、561.179 1、461.163 7 和 161.024 1 等碎片离子, 可推测此化合物为毛蕊花糖苷衍生物。这两个化合物为桂花中首次发现, 确认为植物中发现的新化合物。

在 28.7、30.0、31.0 和 34.5 min 分别检测到准分子离子峰为 m/z 591.208 4、591.205 4、591.205 1 和 591.205 4 的同分异构体, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{29}H_{36}O_{13}$ 。28.7 min 化合物的二级质谱有 m/z 445.166 4、299.111 5、163.037 6 和 145.029 5 等碎片离子, 推测 m/z 299.111 5 为红景天苷负离子, m/z 163.038 0 为对羟基肉桂酸负离子, 而 m/z 145.029 6 为对羟基肉桂酸脱水产生的碎片离子, 因此推测此化合物为桂叶苷 B。30.0 min 同分异构体的二级质谱有 m/z 387.137 8、163.038 0 和 145.029 6 碎片离子。而 31.0 和 34.5 min 两个同分异构体含量较低而未得到有效二级质谱。因此推测后三个化合物为桂叶苷 B 同分异构体。在桂花中仅发现桂叶苷 B^[4,18], 另三种同分异构体尚未见文献报道, 为桂花中首次检测出桂叶苷 B 同分异构体。

在 29.7 min 检测到准分子离子峰 m/z 445.148 7 的化合物, 根据精确质量推测分子式为 $C_{23}H_{26}O_9$ 。根据二级质谱中碎片离子 m/z 163.037 0 和 145.027 4, 推测为桂花中已知化合物桂叶苷 A^[4]。

在 29.9 min 检测到准分子离子峰 m/z 1171.372 3 的化合物, 根据其精确质量推测其分子式为 $C_{52}H_{68}O_{30}$ 。推测此化合物为桂花分离出的苯乙醇苷类化合物 glu-cooleoacteoside^[18]。

在 30.7、31.6 和 35.4 min 检测准分子离子峰为 m/z 1 009.341 0 的三个同分异构体, 根据精确质量推测分子式为 $C_{43}H_{62}O_{27}$ 。三个同分异构体的二级质谱中 m/z 623.198 1 和 461.165 2 碎片离子, 证实其为毛蕊花糖苷衍生物。桂花中曾分离出化合物 oleoacteoside 满足此化合物的分子式特征^[18], 因此猜测 30.7 min 为 oleoacteoside, 另外两个同分异构体为桂花中首次发现的 oleoacteoside 同分异构体。

在 33.1 min 检测到准分子离子峰 m/z 711.286 0 的化合物, 根据其精确质量推测其分子式为 $C_{34}H_{48}O_{16}$ 。其二级质谱中有 m/z 531.218 3、487.224 8、299.114 8 等碎片离子, 其中 m/z 531.218 3 和 487.224 8 质量相差 44 Da, 为脱羧基过程, 而 m/z 299.114 0 (化学式 $C_{14}H_{19}O_7$, 理论值 m/z 299.113 6) 提示结构中可能有红景天苷基团, 暂推测此化合物为红景天苷衍生物。桂花提取物中未见此化合物文献报道, 为首次检测到的化合物。

在 33.5 min 检测到准分子离子峰为 523.181 8 的化合物, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{25}H_{32}O_{12}$ 。其二级质谱中有 m/z 361.128 8、291.081 7、259.090 9、223.055 4 等碎片离子, 其中 m/z 361.128 8 (化学式 $C_{19}H_{21}O_7$, 理论质量为 361.129 3) 为准分子离子峰脱去葡萄糖残基产生, 因此推测其为桂花中已知化合物女贞苷 (ligustroside)^[6,10]。

在 29.0 和 32.5 min 分别检测到准分子离子峰为 m/z 685.235 1 和 685.235 7 的一对同分异构体, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{31}H_{42}O_{17}$ 。在 32.5 min 异构体的二级质谱中母离子裂解成 m/z 565.174 7、361.127 9、291.079 8、259.090 8 与 223.055 9 等碎片离子, 其中 m/z 361.127 9 (化学式 $C_{19}H_{21}O_7$, 理论质量为 361.129 3) 为准分子离子峰脱去二糖单元后产生的碎片, 而 m/z 565.174 7 为 (化学式 $C_{23}H_{33}O_{16}$, 理论质量为 565.177 4) 准分子离子峰脱去苯乙醇基后产生, 因此鉴定为桂花中已知化合物女贞苷 3'-氧-葡萄糖苷^[20]。29.0 min 异构体质谱强度较低, 其二级质谱仅观察到碎片离子 m/z 361.126 5, 因此暂鉴定为桂花中首次发现的女贞苷 3'-氧-葡萄糖苷同分异构体。

在 37.2 min 检测到准分子离子峰 m/z 477.212 4 的化合物, 根据精确质量推测其分子式为 $C_{25}H_{34}O_9$ 。其二级质谱中有 m/z 163.036 9 和 145.026 4 碎片离子, 提示结构中有羟基肉桂酸片段, 推测结构为桂叶苷 A 类似物, 为桂花中首次发现的化合物。

除这些苯乙醇苷类化合物外, 还在 25.2、25.7、26.6、28.0、28.5、28.9、29.5、30.2 和 30.7 min 检测到一系列毛蕊花糖苷二聚体存在, 一级质谱中可观察到单电荷离子 m/z 1 245.385 3 (化学式 $C_{58}H_{69}O_{30}$, 理论质量 1 245.387 9) 和双电荷离子 m/z 622.188 8 (理论质量 m/z 622.190 3), 推测毛蕊花糖苷单元之间以醚键形式连接, 这类化合物尚未见文献报道。在双电荷离子 m/z 622.190 3 (理论质量) 的二级质谱中, 有 m/z 1 083.356 6、541.171 2、487.139 7、179.031 3、161.024 4 等碎片离子, 其中 m/z 1 083.356 6 (化学式 $C_{49}H_{63}O_{27}$, 理论质量 m/z 1 035.356 2) 为准分子离子峰脱去咖啡酰基后碎片, 而 m/z 487.139 7 可能为 caffeoyl rham-

nosyl glucoside。

此外, 在桂花中还检测到一类苯乙醇苷类和亚硫酸的复合物。在 7.8、9.6、10.8、11.4 min 检测到准分子离子峰 m/z 705.169 9、705.167 2、705.166 8、705.170 2 的同分异构体, 为桂花中首次发现的化合物。在二级质谱中, 这些同分异构体裂解产生 m/z 623.198 1 (化学式 $C_{29}H_{35}O_{15}$, 理论质量)、461.166 4 (化学式 $C_{20}H_{29}O_{12}$, 理论质量)、161.024 4 (化学式 $C_9H_5O_3$, 理论质量), 确定这类化合物为毛蕊花糖苷的衍生物, 并根据准分子离子精确质量推测其为含硫元素的化合物, 化学式为 $C_{29}H_{37}SO_{18}$ 。在 18.3 min 检测到准分子离子峰为 m/z 735.124 1 的化合物, 为桂花中首次发现的化合物。在二级质谱中, 此化合物产生 m/z 653.150 7、487.133 1、179.032 8 等碎片离子, 其中碎片离子 m/z 179.032 8 提示结构中有咖啡酸基团, 根据精确质量推测此同样为含硫元素的化合物, 化学式为 $C_{32}H_{31}SO_{18}$ 。

4.2 8种咖啡酰奎宁酸类化合物鉴定 咖啡酰奎宁酸类是植物中常见一类酚类化合物, 质谱技术在鉴定这类物质有成熟的文献可参考^[11], 本研究桂花中存在 8 个咖啡酰奎宁酸类化合物。在 2.1 min 检测到准分子离子峰 m/z 191.058 8, 根据精确质量推测为奎宁酸。在 2.2 min 检测到准分子离子峰 m/z 499.166 9, 其二级质谱产生碎片离子 m/z 191.055 5、181.069 9 和 173.043 9, 推测其为奎宁酸衍生物。在 10.5 和 11.5 min 检测到准分子离子峰 m/z 353.087 8, 以及二级质谱特征碎片, 分别鉴定为 5-咖啡酰奎宁酸和 4-咖啡酰奎宁酸。在 9.7、14.2、14.6 min 检测到准分子离子峰 m/z 337.092 9 (化学式 $C_{16}H_{17}O_8$, 精确质量), 根据二级质谱产生的碎片离子, 分别鉴定为 3-肉桂酰奎宁酸、5-肉桂酰奎宁酸和 4-肉桂酰奎宁酸。在 16.3 min 检测到准分子离子峰 367.103 6, 根据其二级质碎片离子, 鉴定为 5-阿魏酰奎宁酸。

4.3 其他类化合物 高分辨质谱数据分析中, 发现一些准分子离子或碎片离子名义质量为偶数的碎片离子, 根据氮规则, 推测水提取物中含有 8 种含生物碱类 (含氮) 化合物, 为桂花中首次检测发现。木樨植物中仅分离得到极少数含氮化合物^[4,5], 这些已知含氮化合物的分子式与本研究检测到的化合物均不相同, 因此判断这 8 种含氮化合物为桂花中首次检测发现。这 8 个化合物的碎片离子中有若干共同的碎片离子 m/z 422.084 6、284.016 2、220.054 9, 表明这些化合物在结构上的相关性。迄今为止, 仅从桂花中分离出极少含氮化合物, 与本研究中检测到的化合物无关联性, 因此缺乏足够信息去推测其结构与裂解途径, 暂无法鉴定其结构。

讨论

越来越多的研究发现,植物中次生代谢产物可以通过多种途径发挥降血糖作用,如清除自由基、脂质抗氧化、抑制肠道消化酶类、促进胰岛素合成与分泌、抑制葡萄糖转运、调节肠菌群等多种方式,降低人体内血糖水平^[24,25]。 α -葡萄糖苷酶是水解多糖的关键酶类,在碳水化合物代谢和糖蛋白加工中起到关键作用,其抑制剂 (AGI) 可抑制小肠内 α -葡萄糖苷酶的活性,延缓或抑制葡萄糖在肠道的吸收,从而有效控制餐后血糖水平^[26]。临床上使用的 AGI 种类较少,且存在各种不同的不良反应,如广泛应用的阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇存在腹泻、肠胃不适、腹痛等不良反应,米格列醇还能导致少数患者出现皮疹和低血清铁浓度^[21]。AGEs 是葡萄糖等还原糖与脂质、蛋白质或游离氨基酸之间的非酶促反应的终产物,体内过量蓄积的 AGEs 不仅可以激活 NF- κ B、ERK1/2 等炎症通路,还可与其受体结合,抑制细胞色素 c 的抗氧化活性以及 ATP 的生成,同时降低细胞膜的去极化,从而促进胰岛素抵抗和 β 细胞受损,产生糖调节受损和炎症反应,最终导致糖尿病及其并发症^[27]。2 型糖尿病的发生发展与氧化应激具有密切关联,当过多的自由基在体内积累时会引发氧化应激反应,对胰岛 β 细胞造成氧化损伤和胰岛素抵抗。抗氧化剂能淬灭糖尿病患者体内的自由基,改善氧化应激,进而治疗 2 型糖尿病^[28]。文献^[29]报道桂花甲醇提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性及 AGEs 生成具有较强抑制作用,从中分离的亚油酸、 α -亚麻酸、油酸、 α -紫罗酮和 β -紫罗兰酮的抑制能力均高于阳性对照阿卡波糖与氨基胍,不同品种桂花的叶和花的石油醚提取物具有抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[13],桂花醇提取物可以上调谷氨酸和 6-OHDA 的含量来降低 AKT 的蛋白表达,从而起到神经保护和抗氧化的作用^[30]。本研究发现金桂花水提取物抑制 α -葡萄糖苷酶强于阿卡波糖,且能浓度依赖性地抑制 AGE 生成,提示金桂花具有潜在地预防和治疗糖尿病作用。但本文发现金桂花水提物体外抗自由基的能力并不明显,这与文献^[21,26,31]报道的桂花水提取物和甲醇提取物对 DPPH 和 ABTS 具有较强的清除自由基活性有差异,提示不同桂花品种,其生理活性有差别。

施余杰^[32]发现桂花提取物的乙酸乙酯和/或正丁醇部位具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,并从中分离出了对 α -葡萄糖苷酶具有良好抑制活性的齐墩果酸与熊果酸。吴立鹏等^[22]总结了已发现的 572 种苯乙醇苷类化合物,这类化合物药理活性广泛,涉及抗菌、抗癌、抗糖尿病、抗炎、抗肥胖、抗氧化、抗病毒和神经保护等,Hamedi 等^[33]也报道了一种黄霉三糖苯乙醇苷具

有抑制 α -葡萄糖苷酶及氧化应激的活性,但这类化合物的生物利用度均较差。文献^[19]报道从管花肉苁蓉 (*Cistanche tubulosa*) 茎中分离出的松果菊苷、毛蕊花糖苷等苯乙醇苷类化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷具有降低小鼠餐后血糖,改善糖耐受的活性。毛蕊花糖苷具有抑制 AGEs 生成活性^[34],毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷还具有葡萄糖苷酶抑制剂活性^[23]。本研究从金桂花水提取物中鉴定出了以毛蕊花糖苷为代表的 58 种苯乙醇苷类化合物,其中 51 种苯乙醇苷类化合物是首次从金桂花水提取物中发现。此外,本研究中金桂花水提物色谱图中,毛蕊花糖苷为强度最高色谱峰,亦有文献^[3,6,10]表明毛蕊花糖苷为桂花中含量最高的化合物。本研究推测以毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类化合物可能是金桂花水提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性与 AGEs 形成的重要活性物质。

桂花中含氮类化合物的文献^[5]报道较少,本研究从金桂花水提取物中鉴定出 8 种未见文献报道的含氮类化合物。目前对这类化合物的结构与活性还知之甚少,因此根据本实验结果,有必要对金桂花苯乙醇苷类化合物和含氮类化合物进行降糖活性筛选研究,进一步揭示金桂花提取物降糖活性物质基础。

作者贡献: 童俊和刘红兵负责实验设计、实验实施以及文章的撰写;刘颖伟和张帆参与数据分析;孙丽娟和陈勇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: 所有作者和贡献者声明本研究内容没有任何利益冲突。

References

- [1] Yu YR, Liu MY, Huang J, et al. A new monoterpene from *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1080-1084.
- [2] Li JF, Liao LM. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Osmanthus fragrans* leaves [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2020, 41: 156-161.
- [3] Zhou HJ, Li TZ, Li B. Identification of antioxidant components and tyrosinase specific inhibitors from *Osmanthus fragrans* flower by using online UPLC-ABTS⁺-assay and UF-LC-MS technology [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2022, 43: 68-79.
- [4] Wu CR, Fang XY, Xiao W. Review on non-volatile components and pharmacological activity of *Osmanthus fragrans* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1439-1448.
- [5] Wang BJ, Luan F, Bao YW, et al. Traditional uses, phytochemical constituents and pharmacological properties of *Osmanthus fragrans*: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 293: 115273.
- [6] Zhou F, Zhao YJ, Peng JY, et al. Origin discrimination of *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* flowers using GC-MS and UPLC-

- PDA combined with multivariable analysis methods [J]. *Phytochem Anal*, 2017, 28: 305-315.
- [7] Wang JX, Tao G, Yang F, et al. Chemical composition and hypoglycemic activity of *Edgeworthia gardneri* [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2021, 56: 1434-1438.
- [8] Li XM, Deng RH, Kong YH, et al. Inhibitory effect of rutin on the formation of advanced glycation end products (AGEs) from bovine serum albumin [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2014, 35: 85-89.
- [9] Liao XY, Hong Y, Chen ZL. Identification and quantification of the bioactive components in *Osmanthus fragrans* roots by HPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11: 299-307.
- [10] Zhou F, Peng JY, Zhao YJ, et al. Varietal classification and antioxidant activity prediction of *Osmanthus fragrans* Lour. flowers using UPLC-PDA/QTOF-MS and multivariable analysis [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 490-497.
- [11] Michael NC, Kelly LJ, Susan K, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2900-2911.
- [12] Xue ZZ, Lai CJS, Kang LP, et al. Profiling and isomer recognition of phenylethanoid glycosides from *Magnolia officinalis* based on diagnostic/holistic fragment ions analysis coupled with chemometrics [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1611: 460583.
- [13] Yoo TK, Jeong WT, Kim JG, et al. UPLC-ESI-Q-TOF-MS-based metabolite profiling, antioxidant and anti-inflammatory properties of different organ extracts of *Abeliophyllum distichum* [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10: 70.
- [14] Michael R. K., Ambrose A, Chen JL, et al. Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61: 564-570.
- [15] Attia YM, El-Kersh DM, Wagdy HA, et al. Verbascoside: identification, quantification, and potential sensitization of colorectal cancer cells to 5-FU by targeting PI3K/AKT pathway [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 16939.
- [16] Qi M, Xiong AZ, Li PF, et al. Identification of acteoside and its major metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 940: 77-85.
- [17] Huang JF, He ZD, Huang Y, et al. Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens* [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 3113-3119.
- [18] Kao YT, Li HY, Yen IC, et al. New phenylethanoid from the flower of *Osmanthus fragrans* and their bioactivities on human dermal fibroblasts [J]. *Phytochem Lett*, 2020, 36: 127-133.
- [19] Morikawa T, Ninomiya K, Imamura M, et al. Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice [J]. *J Nat Med*, 2014, 68: 561-566.
- [20] Liu J, Nakamura S, Xu B, et al. Chemical structures of constituents from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. *Aurantiacus* [J]. *J Nat Med*, 2015, 69: 135-141.
- [21] Hung CY, Tsai YC, Li KY. Phenolic antioxidants isolated from the flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. *Molecules*, 2012, 17: 10724-10737.
- [22] Wu LP, Georgiev MI, Cao H, et al. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: a systematic review [J]. *Med Res Rev*, 2020, 40: 2605-2649.
- [23] Song XF, Fan BL, Zeng XL, et al. Simultaneous determination of seven active polyphenols in different *Osmanthus fragrans* cultivars by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 1811-1820.
- [24] Xu F, Chen LJ, Nie ZY, et al. Recent advances on the hypoglycemic effect and mechanism of dietary nutrients in type 2 diabetes mellitus [J]. *J Biol (生物学杂志)*, 2020, 37: 96-101.
- [25] Zhang M, Kou XJ. Analysis of the mechanism of natural products on lowering blood glucose of type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2021, 33: 667-676.
- [26] Wang Z, Yin Y, Bian YY, et al. Triterpenoids from *Gynostemma pentaphyllum* and their inhibition activity to α -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 6142-6150.
- [27] Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7: 526-539.
- [28] Peng D, Luo ZF, Tao Q, et al. Extraction of anthraquinone from fermented *Morinda officinalis* and its antioxidant and hypoglycemic activities [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2022, 43: 214-223.
- [29] Yang JY, Park JH, Chung N, et al. Inhibitory potential of constituents from *Osmanthus fragrans* and structural analogues against advanced glycation end products, α -amylase, α -glucosidase, and oxidative stress [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45746.
- [30] Lee HH, Lin CT, Yang LL. Neuroprotection and free radical scavenging effects of *Osmanthus fragrans* [J]. *J Biomed Sci*, 2007, 14: 819-827.
- [31] Song HY, Jeong DE, Lee M. Bioactivity-guided extract optimization of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* leaves and anti-inflammatory activities of phillyrin [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10: 1545.
- [32] Shi YJ. Study on α -Glucosidase Activity and Pharmacokinetic Factors of the *Osmanthus* Active Components *in vitro* (桂花有效成分体外 α -葡萄糖苷酶活性及药动因素研究) [D]. Kaifeng: Henan University, 2013.
- [33] Hamedi A, Pasdaran A, Pasdaran A, et al. A trisaccharide phenylethanoid glycoside from *Scrophularia flava* Grau with potential anti-type 2 diabetic properties by inhibiting α -glucosidase enzyme and decreasing oxidative stress [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103776.
- [34] Chukwuma CI, Matsabisa MG, Ibrahim MA, et al. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 235: 329-360.