

樟叶越橘的酚类成分：二级质谱裂解行为和神经保护作用

周 堂¹, 王 吉¹, 乔温皓¹, 林芷淇¹, 朱红波¹, 常 月¹, 胡炜彦², 张荣平¹, 陈兴龙^{1,*}

(1. 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;

2. 昆明医科大学药学院, 云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘 要: 以樟叶越橘嫩芽为研究对象, 利用硅胶、小孔树脂、Sephadex LH-20和RP-18等分离材料, 结合制备型和半制备型高效液相色谱, 通过高分辨质谱和核磁等结构鉴定手段, 从樟叶越橘的嫩芽水提取物中分离鉴定16个酚类化合物, 包括7个熊果苷类、4个黄酮类、2个木脂素类和3个其他酚类化合物, 其中化合物2~5、7和11~16为首次从越橘属植物中分离得到。二级质谱分析发现在负离子模式下糖苷类成分断裂糖苷键是其主要裂解途径, 产生苷元部分或糖基部分的碎片, 苷元部分或糖基碎片会继续丢失H₂O、CO、CHO或CH₂O等中性碎片, 产生一系列子离子; 黄酮或木脂素类成分丢失羟基、羟甲基、甲氧基等取代基, 产生中性碎片或加合离子碎片; 逆狄尔斯-阿尔德裂解在黄酮母核的裂解过程中也较为常见。利用H₂O₂损伤的SH-SY5Y细胞, 评价了所有化合物的神经保护作用。结果表明化合物1~4、6、10和16对H₂O₂损伤SH-SY5Y细胞具有保护作用, 其中化合物3(淫羊藿次苷F2)在5、10、20 μmol/L剂量条件下其神经保护作用随浓度增加而提高, 且存活率在3个剂量浓度条件下均超过80%, 神经保护作用强于阳性药物表没食子儿茶素没食子酸酯。以上研究结果说明樟叶越橘含有丰富的酚类成分, 这些成分表现出较强的神经保护作用, 拓展了樟叶越橘嫩芽作为绿色健康食品的保健功能。

关键词: 樟叶越橘; 酚类成分; 二级质谱裂解行为; 神经保护作用

Phenols from *Vaccinium dunalianum* Wight: Secondary Mass Spectrometry Fragmentation and Neuroprotective Effect

ZHOU Tang¹, WANG Ji¹, QIAO Wenhao¹, LIN Zhiqi¹, ZHU Hongbo¹, CHANG Yue¹, HU Weiyan², ZHANG Rongping¹, CHEN Xinglong^{1,*}

(1. Yunnan Key Laboratory of Southern Medicine Utilization, College of Traditional Chinese Medicine,

Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, School of Pharmaceutical Sciences, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: In order to elucidate the health efficacy of *Vaccinium dunalianum* buds as a tea substitute and to reveal the material basis for its functionality, we studied the chemical constituents of *V. dunalianum* buds by using separation materials such as silica gel, MICHPL-20p gel, Sephadex LH-20, and RP-18 combined with preparative and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC), high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Totally 16 phenolic compounds were isolated and identified from the water extract of *V. dunalianum* buds, including seven arbutins, four flavonoids, two lignans and three other phenolic compounds, among which compounds 2–5, 7, and 11–16 were isolated from the *Vaccinium* genus for the first time. Secondary mass spectrometry (MS/MS) analysis revealed that the major fragmentation pathway of glycosides in the negative ion mode was the breakage of glycosidic bonds to produce fragments of aglycone or glycosyl units. Then, the aglycone or glycosyl units continued to lose neutral fragments such as H₂O, CO, CHO, and CH₂O to yield a series of sub-ions. Flavonoids or lignans lost their substituents such as hydroxyl, hydroxymethyl, and methoxyl groups to produce neutral fragments or additional ions. Besides, Retro-Diels-Alder (RDA) fragmentation was also common in the cleavage of the flavonoid skeleton. Compounds 1–4, 6, 10 and 16 had

收稿日期: 2024-04-18

基金项目: 云南省基础研究计划中医联合专项青年项目(202101AZ070001-113);

“云岭学者”支持计划专项(YNWR-YLXZ-2019-019); 云南省重点领域科技计划项目(202303AC100025);

云南省南药可持续利用重点实验室开放课题(202105AG070012XS23089)

第一作者简介: 周堂(1996—)(ORCID: 0009-0004-6209-509X), 男, 硕士, 研究方向为药食同源中药物质基础、功能成分。

E-mail: 1475131263@qq.com

*通信作者简介: 陈兴龙(1989—)(ORCID: 0000-0002-9005-1017), 男, 副教授, 博士, 研究方向为药食同源中药物质基础、功能成分。E-mail: chxkib@163.com

protective effects on SH-SY5Y cells damaged by H_2O_2 . The neuroprotective effect of compound 3 (Icariside F2) increased with increasing its concentration at 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$, and the survival rate exceeded 80% at all three concentrations. The neuroprotective effect was stronger than that of the positive drug epigallocatechin gallate. The above findings indicated that *V. dunalianum* buds was rich in phenolic compounds with obvious neuroprotective effects, which would expand the health functions of *V. dunalianum* buds as green health foods.

Keywords: *Vaccinium dunalianum* Wight; phenolic compounds; secondary mass spectrometry fragmentation; neuroprotective effect

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240418-175

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 23-0140-10

引文格式:

周堂, 王吉, 乔温皓, 等. 樟叶越橘的酚类成分: 二级质谱裂解行为和神经保护作用[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 140-149.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240418-175. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Tang, WANG Ji, QIAO Wenhao, et al. Phenols from *Vaccinium dunalianum* Wight: secondary mass spectrometry fragmentation and neuroprotective effect[J]. Food Science, 2024, 45(23): 140-149. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240418-175. <http://www.spkx.net.cn>

樟叶越橘 (*Vaccinium dunalianum* Wight) 为杜鹃花科常绿灌木^[1], 其嫩叶和花蕾在云南省楚雄州彝族聚居地区被加工成代茶饮品, 因其形状像麻雀的嘴而得名雀嘴茶, 当地人认为长期饮用雀嘴茶具有降血脂和降尿酸的功效。现代科学研究发现, 雀嘴茶对高血脂症^[2-3]、糖尿病^[4]以及肿瘤^[5]等疾病具有一定的改善作用。樟叶越橘嫩芽中主要含有熊果苷类^[6-7]、黄酮类^[8-9]和酚酸类^[7]化合物, 研究表明樟叶越橘嫩芽提取物或化学成分具有抗氧化^[10]、抗炎^[11]、抗菌^[12]、神经保护^[13-14]等作用。由此可见, 樟叶越橘嫩芽可作为保健食品使用, 但其发挥保健功能的物质基础尚不明确。

本课题组长期致力于研究药食同源植物的生物活性成分与功能, 已经从迷迭香^[15]、益智^[16]和高良姜^[17]等药食同源植物中发现多个具有神经保护作用的小分子, 对神经退行性疾病具有潜在的治疗作用。神经退行性疾病发病机制复杂, 对人类健康造成了严重的威胁, 研究发现氧化应激在神经退行性疾病中发挥着重要作用^[18]。中枢神经系统控制全身各组织器官的活动, 需要的能量较多, 内源或外源抗氧化剂的失衡进而使体内活性氧积累^[13]。活性氧与脑内黑质区的铁离子反应生成活性氧自由基, 攻击生物大分子, 消耗抗氧化物质, 导致线粒体内电子传递链受阻, 呼吸衰竭, 产生能量危机, 形成氧化应激和线粒体损伤的反馈循环, 最终导致神经元过度损伤和缺失。受损的神经元容易受到活性氧的攻击, 并造成氧化应激, 从而导致神经退行性疾病的发生^[19]。研究表明, 海棠新鲜嫩叶在西藏地区加工成代茶饮品, 并在其中发现酚类化合物具有清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基, 显著抑制 H_2O_2 诱导的HepG-2细胞内活性氧生成, 并上调抗氧化酶的表达, 减少细胞凋亡, 进而减轻氧化应激损伤^[20]。研究认为樟叶越橘提取物具有神经保护作用^[13], 但其具体的神经保护活性成分尚不明确。

为阐明樟叶越橘嫩芽作为代茶饮品的保健功效, 揭示其功能性食品的物质基础, 本研究以樟叶越橘嫩芽为研究对象, 利用硅胶、小孔树脂、Sephadex LH-20和RP-18等分离材料, 结合制备型和半制备型高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC), 通过高分辨质谱和核磁等结构鉴定手段, 从樟叶越橘的嫩芽水提取物中分离鉴定16个酚类化合物, 主要为苯酚苷类、黄酮苷类、木脂素和其他成分; 利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱技术对化合物进行二级质谱 (secondary mass spectrometry, MS/MS) 分析, 总结其质谱裂解规律; 利用 H_2O_2 损伤的SH-SY5Y细胞模型评价分离得到的16个化合物的神经保护作用, 以期将樟叶越橘开发为功能性食品的研究提供一定参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

樟叶越橘嫩芽于2021年2月采自云南省楚雄州武定县, 样本由昆明医科大学陆露教授鉴定为杜鹃花科越橘属植物樟叶越橘 (*V. dunalianum* Wight) 的嫩芽。标本编号: 2021-02-11, 保存于云南中医药大学云南省南药可持续利用研究重点实验室。

1.2 仪器与设备

Av600核磁共振波谱仪 布鲁克 (北京) 科技有限公司; G6530LC-MS-Q-TOF质谱仪、Eclipse XDB-C₁₈柱 (2.1 mm×50 mm, 3.5 μm) 美国Agilent公司; NU3000 serials制备型HPLC仪 江苏汉邦科技有限公司; LC-52半制备型HPLC仪 北京赛普锐斯科技有限公司; 小孔树脂 (粒径75~150 μm , 孔径300 Å) 日本三菱化学公司; Sephadex LH-20 瑞典Pharmacia公司; Basic C₁₈色谱柱 (10 mm×250 mm, 5 μm)、CN

色谱柱(10 mm×250 mm, 5 μm) 日本YMC公司; GF254薄层色谱板 青岛海洋化工有限公司; 柱色谱硅胶 上海皓鸿生物医药科技有限公司; 氘代试剂 北京伊诺凯有限公司; 乙腈(色谱纯) 德国默克公司。

1.3 方法

1.3.1 化合物提取与分离

取干燥的樟叶越橘嫩芽5.0 kg粉碎, 以5倍体积的热水浸泡提取3 h, 一共3次, 合并提取液, 浓缩后冷冻干燥得到干粉1.5 kg。取樟叶越橘冻干粉600 g溶解于纯水中, D101大孔树脂柱层析(6.0 kg, 20 cm×70 cm), 乙醇-水(10%、30%、50% (V/V, 下同))洗脱, 得到4个部分(Fr. 1~Fr. 4); Fr. 3经Rp-18柱层析(330 g, 6 cm×18 cm), 甲醇-水(10%、30%、50%)洗脱, 得到6个部分(Fr. 3-1~Fr. 3-6); Fr. 3-1经过Sephadex LH-20凝胶柱层析(1.5 cm×190 cm), 甲醇洗脱后, 有黄色固体析出, 得到化合物7(30 mg)。Fr. 3-2经硅胶柱层析(44 g, 8 cm×20 cm; 氯仿-甲醇-水, 9:1:0.1、8:2:0.2、7:3:0.3), 得到8个部分(Fr. 3-2-1~Fr. 3-2-8)。Fr. 3-2-1经制备型HPLC(C₁₈柱, 甲醇-水, 40%, λ=220/254 nm)仪分离, 得到化合物10(30 mg)和15(20 mg)。Fr. 3-2-2经制备型HPLC(CN柱, 甲醇-水, 10%~50%, λ=210/254 nm)仪分离, 得到化合物12(7 mg)和13(10 mg)。Fr. 3-3经硅胶柱层析(24 g, 5 cm×20 cm, 氯仿-甲醇-水, 9:1:0.1、8:2:0.2、7:3:0.3), 得到6个部分(Fr. 3-3-1~Fr. 3-3-6), 其中Fr. 3-3-5有固体析出, 为化合物4(5 mg)。Fr. 3-3-3经制备型HPLC(CN柱, 乙腈-水, 10%, λ=220/254 nm)仪分离, 得到化合物1(8 mg)和2(10 mg)。Fr. 3-3-4经制备型HPLC(C₁₈柱, 乙腈-水, 10%~50%, λ=210/254 nm)仪分离, 再用制备薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)(氯仿-甲醇, 8:2)纯化得到化合物5(5 mg)和16(7 mg)。Fr. 3-3-6用制备TLC(氯仿-甲醇-水, 8:2:0.2)纯化得到化合物3(20 mg), 剩余部分采用制备型HPLC(CN柱, 甲醇-水, 5%~18%, λ=220/254 nm)仪分离, 得到化合物14(5 mg)。Fr. 3-6经Rp-18柱层析(23 g, 甲醇-水, 10%、30%、50%、70%), 得到4个部分(Fr. 3-6-1~Fr. 3-6-4)。Fr. 3-6-3经硅胶柱层析(2.6 g, 1.5 cm×35 cm, 氯仿-甲醇-水, 9:1:0.1、8:2:0.2、7:3:0.3), 得到3个部分(Fr. 3-6-3-1~Fr. 3-6-3-3)。Fr. 3-6-3-3经制备型HPLC(C₁₈柱, 乙腈-水, 10%~50%, λ=220/254 nm)仪分离, 再结合制备TLC(氯仿-甲醇, 7:3)纯化得到化合物8(15 mg)和11(15 mg)。Fr. 3-6-4通过Sephadex LH-20凝胶柱层析(甲醇, 1.5 cm×190 cm), 有黄色固体析出, 为化合物9(14 mg), 剩余部分经制备型HPLC

(C₁₈柱, 乙腈-水, 5%~35%, λ=220/254 nm)仪分离, 得到化合物6(10 mg)。

1.3.2 MS/MS裂解行为分析

色谱条件: MS/MS分析在LCMS-Q-TOF质谱仪上进行, 采用Eclipse XDB-C₁₈柱(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm)。化合物1~16分别在甲醇中完全溶解, 配制质量浓度为0.05 mg/mL的溶液备用。流动相A为体积分数0.05%的甲酸溶液, B为乙腈, 流速为0.3 mL/min, 柱温30℃。梯度洗脱条件: 0~8 min, 95%~10% A、5%~90% B; 8~10 min, 10% A、90% B; 10~11 min, 10%~98% A、90%~2% B; 11~14 min, 98% A、2% B。

质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 三氟乙酸钠校正, 负离子模式检测。分析条件如下: 喷雾电压为4.00 kV或-3.50 kV; 干燥气压力为35.0 kPa; 喷雾气为氮气, 流速为8.0 mL/min; 曲形裂解器温度为350℃; 加热模块温度为280℃; 母离子选择范围为 $m/z \pm 0.2$ Da; 裂解能量为10、20、40 eV; 裂解气为氦气, 扫描范围为 m/z 50~1 500, 自动模式进行MS/MS分析。Agilent Qualitative Analysis 10.0软件用于预测分子式, 其他质谱条件参考文献[15]进行设置。

1.3.3 神经保护作用活性筛选

SH-SY5Y细胞接种于含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM高糖培养基中, 放置于5% CO₂的细胞培养箱37℃条件下培养。接种后, 让细胞生长24 h, 直到达到80%~90%的最终密度, 用于后续研究。

采用CCK-8法测试化合物1~16对H₂O₂损伤SH-SY5Y细胞的神经保护活性^[16]。将细胞分为对照组、H₂O₂组、药物I组和药物II组。将SH-SY5Y细胞接种于96孔细胞培养板上, 密度为 1×10^4 个/mL。1) 对照组分为溶剂对照组和空白对照组; 2) H₂O₂组用SH-SY5Y培养24 h后, 弃去旧培养基, 用300 μmol/L H₂O₂溶液处理24 h; 3) 药物I组以含有不同浓度(5、10、20 μmol/L)药物处理24 h, 用于评价化合物对神经细胞有无毒性; 4) 药物II组使用表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)(阳性对照)和不同浓度(5、10、20 μmol/L)药物预处理2 h后, 用300 μmol/L H₂O₂溶液处理24 h, 用于评价化合物的对受损的神经细胞有无保护作用。将细胞培养基更换为孔中含有10% CCK-8的DMEM, 孵育2 h后, 使用酶标仪在450 nm处读取每个孔的吸光度, 按下式计算各组细胞存活率, 实验重复3次。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_3} \times 100$$

式中: A_1 为药物组的吸光度; A_2 为溶剂对照组的吸光度; A_3 为空白对照组的吸光度。

1.4 数据统计

采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。3组数据使用单因素方差分析,然后进行Tukey的事后检验。所有检验均采用双侧 P 值,认为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

从樟叶越橘中分离获得16个化合物,结构如图1所示。

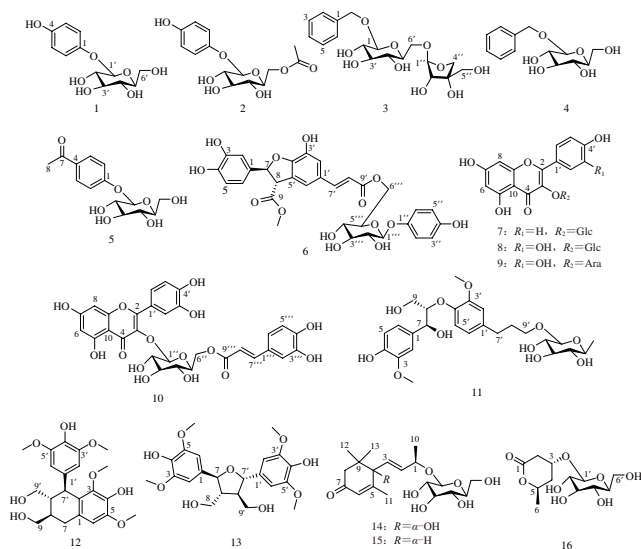


图1 化合物1~16结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-16

化合物1,白色粉末,分子式 $C_{12}H_{16}O_7$:高分辨电喷雾离子化质谱(high resolution-electrospray ionization-mass spectrometry, HR-ESI-MS) m/z : $[M-H]^-$ 271.081 9 (计算值: 271.082 3)。核磁共振氢谱(1H -nuclear magnetic resonance, 1H NMR) (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 6.97 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-3/5), 6.70 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2/6), 4.75 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1'), 3.99~3.81 (1H, m, H-6'a), 3.76~3.68 (1H, m, H-6'b), 3.52~3.32 (4H, m, H-2'/3'/4'/5'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 152.6 (s, C-1) 116.8 (d, C-2/6), 119.6 (d, C-3/5), 152.9 (s, C-4), 103.8 (d, C-1'), 75.1 (d, C-2'), 78.2 (d, C-3'), 71.6 (d, C-4'), 78.1 (d, C-5'), 62.7 (d, C-6')。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定其为熊果苷。

化合物2,白色固体,分子式为 $C_{14}H_{18}O_8$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 313.094 1 (计算值: 313.092 9)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 6.92 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2/6), 6.68 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3/

H-5), 4.71 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1'), 4.37 (1H, dd, $J=12.0, 2.0$ Hz, H-6'a), 4.24 (1H, dd, $J=12.0, 6.4$ Hz, H-6'b), 3.57 (1H, ddd, $J=8.8, 6.4, 2.2$ Hz, H-5'), 3.47~3.35 (3H, m, H-2'/3'/4'), 2.05 (3H, s, $COCH_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 153.8 (s, C-1), 119.5 (d, C-2/6), 116.6 (d, C-3/5), 152.1 (s, C-4), 103.5 (d, C-1'), 74.8 (d, C-2'), 77.7 (d, C-3'), 71.6 (d, C-4'), 75.1 (d, C-5'), 64.7 (t, C-6'), 173.0 (s, $COCH_3$), 20.8 (q, $COCH_3$)。以上数据与文献[21]报道基本一致,故鉴定其为6'-乙酰熊果苷。

化合物3,白色固体,分子式为 $C_{18}H_{26}O_{10}$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 401.144 7 (计算值: 401.145 3)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.32 (2H, d, $J=7.4$ Hz, H-2/6), 7.23 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3/5), 7.17 (1H, t, $J=7.2$ Hz, H-4), 4.96 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-1''), 4.79 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-7a), 4.55 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-7b), 4.23 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.91 (2H, dd, $J=17.8, 5.8$ Hz, H-6'a/2'), 3.84 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6'b), 3.68 (1H, overlap, H-3'), 3.53 (1H, dd, $J=11.3, 6.3$ Hz, H-4'), 3.50 (2H, s, H-4''), 3.32~3.28 (1H, m, H-5'), 3.23~3.18 (2H, m, H-1''/2''), 3.16 (2H, s, H-5''); ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (C) 138.9 (s, C-1), 129.3 (d, C-2/3/5/6), 128.7 (d, C-4), 103.1 (d, C-1'), 75.0 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 71.8 (d, C-4'), 76.9 (d, C-5), 68.6 (t, C-6'), 110.9 (d, C-1''), 78.0 (d, C-2''), 80.5 (d, C-3''), 74.9 (t, C-4''), 65.5 (t, C-5'')。以上数据与文献[22]报道基本一致,故鉴定其为淫羊藿次苷F2。

化合物4,白色固体,分子式为 $C_{27}H_{34}O_{13}$: HR-ESI-MS m/z : $[M+HCOO]^-$ 315.109 8 (计算值: 315.108 5)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.41 (2H, d, $J=7.3$ Hz, H-3/5), 7.32 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2/6), 7.27 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-4), 4.92 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-7a), 4.66 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-7b), 4.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.91~3.85 (1H, m, H-6'a), 3.71~3.64 (1H, m, H-6'b), 3.44~3.37 (1H, m, H-5'), 3.27~3.21 (3H, m, H-2'/3'/4'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 139.1 (s, C-1), 129.3 (d, C-2/6), 129.21 (d, C-3/5), 128.70 (d, C-4), 71.7 (t, C-7), 103.3 (d, C-1'), 75.2 (d, C-2'), 78.04 (d, C-3'), 71.7 (d, C-4'), 77.8 (d, C-5'), 62.8 (t, C-6')。以上数据与文献[23]报道基本一致,故鉴定其为苺基- β -D-葡萄糖苷。

化合物5, 白色固体, 分子式为 $C_{14}H_{18}O_7$: HR-ESI-MS m/z : $[M+HCOO]^-$ 343.105 2 (计算值: 343.103 5)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.97 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2/6), 7.16 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3/5), 5.02 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-1'), 3.87~3.81 (1H, m, H-6'a), 3.69 (1H, dd, $J=16.2, 4.2$ Hz, H-6'b), 3.49~3.45 (3H, m, H-2'/3'/4'), 3.43~3.39 (1H, m, H-5'), 2.55 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 132.6 (s, C-1), 132.14 (d, C-2/6), 117.24 (d, C-3/5), 163.09 (s, C-4), 199.43 (s, C-7), 26.47 (q, C-8), 101.6 (d, C-1'), 74.79 (d, C-2'), 78.31 (d, C-3'), 71.26 (d, C-4'), 77.92 (d, C-5'), 62.44 (t, C-6')。以上数据与文献[24]报道基本一致, 故鉴定其为云杉苷。

化合物6, 黄色固体, 分子式 $C_{31}H_{30}O_{14}$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 625.130 3 (计算值: 625.130 1)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.60 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-7'), 7.10 (1H, s, H-6'), 7.04 (1H, s, H-2'), 6.94 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2''/6''), 6.81 (1H, s, H-2), 6.76~6.72 (1H, m, H-6), 6.70 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.65 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3''/5''), 6.33 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-8'), 5.96 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-7), 4.72 (1H, t, $J=6.4$ Hz, H-1'''), 4.53 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-6''a), 4.38~4.34 (1H, m, H-6''b), 4.33 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-8), 3.81 (3H, s, 9-OCH₃), 3.77 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H-5'''), 3.48~3.40 (3H, m, H-2'''/3'''/4'''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 127.6 (s, C-1), 113.9 (d, C-2), 146.8 (s, C-3), 146.7 (s, C-4), 116.4 (d, C-5), 118.7 (d, C-6), 88.5 (d, C-7), 56.9 (d, C-8), 172.9 (s, C-9), 129.8 (s, C-1'), 117.2 (d, C-2'), 143.1 (s, C-3'), 150.8 (s, C-4'), 133.0 (s, C-5'), 118.4 (d, C-6'), 146.9 (d, C-7'), 115.8 (d, C-8'), 168.8 (s, C-9'), 103.6 (d, C-1''), 74.9 (d, C-2''), 78.0 (d, C-3''), 71.8 (s, C-4''), 75.4 (d, C-5''), 64.7 (t, C-6''), 152.3 (d, C-1'''), 119.6 (d, C-2'''), 153.9 (d, C-4'''), 117.1 (d, C-3'''/5'''), 119.6 (t, C-6'''), 53.3 (q, 9-OCH₃)。以上数据与文献[25]报道基本一致, 故鉴定其为Dunalianosides J。

化合物7, 黄色粉末, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{11}$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 447.095 1 (计算值: 447.093 3)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 8.05 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2'/6'), 6.88 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3'/5'), 6.40 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.25 (1H, d, $J=$

7.2 Hz, H-1''), 4.59 (1H, s, H-6''a), 3.70~3.65 (1H, m, H-6''b), 3.52 (1H, dd, $J=12.0, 5.4$ Hz, H-5''), 3.42 (2H, dt, $J=18.4, 9.0$ Hz, H-2''/3''), 3.22~3.17 (1H, m, H-4''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.5 (s, C-2), 135.4 (s, C-3), 179.6 (s, C-4), 161.6 (s, C-5), 99.9 (d, C-6), 166.1 (s, C-7), 94.7 (d, C-8), 163.1 (s, C-9), 105.7 (s, C-10), 122.8 (s, C-1'), 132.3 (d, C-2'/6'), 159.1 (s, C-4'), 116.1 (d, C-3'/5'), 104.0 (d, C-1''), 75.7 (d, C-2''), 78.5 (d, C-3''), 71.4 (d, C-4''), 78.0 (d, C-5''), 62.6 (t, C-6'')。以上数据与文献[10]报道基本一致, 故鉴定其为山柰酚-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物8, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{12}$: HR-ESI-MS m/z : $[M+H]^+$ 465.102 7 (计算值: 465.102 8)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.72 (1H, s, H-2'), 7.59 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, s, H-6), 6.40 (1H, s, H-8), 5.19 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-6'), 3.71 (1H, d, $J=11.3$ Hz, H-1'), 3.57 (1H, d, $J=13.8$ Hz, H-6''a), 3.53~3.41 (1H, m, H-6''b), 3.39~3.33 (4H, m, H-2''/3''/4''/5''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 159.3 (s, C-2), 135.6 (s, C-3), 179.6 (s, C-4), 163.1 (s, C-5), 99.9 (d, C-6), 166.4 (s, C-7), 95.0 (d, C-8), 158.6 (s, C-9), 105.8 (s, C-10), 123.1 (s/d, C-1'/6'), 117.8 (d, C-2'), 146.5 (s, C-3'), 150.1 (s, C-4'), 116.2 (d, C-5'), 123.41 (d, C-1'/6'), 104.6 (d, C-1''), 75.8 (d, C-2''), 78.5 (d, C-3''), 71.3 (d, C-4''), 78.2 (d, C-5''), 62.6 (d, C-6'')。以上数据与文献[26]报道基本一致, 故鉴定其为异槲皮苷。

化合物9, 分子式 $C_{20}H_{18}O_{11}$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 433.080 0 (计算值: 433.077 6)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.53 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 7.46 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.91 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.34 (1H, s, H-8), 6.16 (1H, s, H-6), 5.43 (1H, d, $J=5.0$ Hz, H-1''), 4.34~3.51 (5H, m, H-2''/3''/4''/H-5''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 159.1 (s, C-2), 134.8 (s, C-3), 179.8 (s, C-4), 162.9 (s, C-5), 100.0 (d, C-6), 165.9 (s, C-7), 94.7 (d, C-8), 158.4 (s, C-9), 105.5 (s, C-10), 122.9 (s, C-1'), 116.6 (d, C-2'), 146.3 (s, C-3'), 149.9 (s, C-4'), 116.2 (d, C-5'), 122.9 (d, C-6'), 109.5 (d, C-1''), 83.1 (d, C-2''), 78.6 (d, C-3''), 88.0 (d, C-4''), 62.5 (t, C-5'')。以上数据与文献[27]报道基本一致, 故鉴定其为扁蓄苷。

化合物10, 分子式为 $C_{30}H_{26}O_{15}$: HR-ESI-MS m/z : $[M+H]^+$ 627.125 1 (计算值: 627.134 4)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.59 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-7'''), 6.95 (1H, s, H-2'''), 6.77 (3H, dd, $J=13.2, 7.2$ Hz, H-5''/5'''/6'''), 6.26 (1H, s, H-8), 6.11 (1H, s, H-6), 6.04 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-8'''), 5.22 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.29 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-6''a), 4.20 (1H, dd, $J=11.6, 6.4$ Hz, H-6''b), 3.55~3.43 (2H, m, H-2''/3''), 3.38~3.32 (1H, m, H-4''), 3.32~3.28 (1H, m, H-5''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 159.1 (s, C-2), 135.2 (s, C-3), 179.3 (s, C-4), 162.9 (s, C-5), 100.5 (d, C-6), 167.4 (s, C-7), 95.2 (d, C-8), 158.5 (s, C-9), 105.2 (s, C-10), 123.3 (s/d, C-1'/6'), 114.6 (d, C-2'), 149.8 (s, C-3'), 149.6 (s, C-4'), 117.3 (d, C-5'), 104.0 (d, C-1''), 75.8 (d, C-2''), 78.1 (d, C-3''), 71.7 (d, C-4''), 75.7 (d, C-5''), 64.3 (d, C-6''), 127.7 (s, C-1'''), 115.1 (d, C-2'''), 145.9 (s, C-3'''), 146.7 (s, C-4'''), 116.5 (d, C-5'''), 123.2 (d, C-6'''), 146.9 (d, C-7'''), 115.9 (d, C-8'''), 168.9 (s, C-9''')。以上数据与文献[28]报道基本一致, 故鉴定其为槲皮素-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-咖啡酰基)- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物11, 白色固体, 分子式为 $C_{26}H_{36}O_{11}$: HR-ESI-MS m/z : $[M+Na]^+$ 547.212 6 (计算值: 547.215 0)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 7.00 (1H, s, H-2), 6.81 (2H, d, $J=7.8$ Hz, H-6/2'), 6.78 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-5), 6.74~6.71 (1H, m, H-5'), 6.65 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-6'), 4.82 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-7), 4.63 (1H, s, H-1''), 4.27 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-8), 3.84 (1H, overlap, H-2''), 3.75~3.73 (1H, m, H-9a), 3.65 (1H, overlap, H-3''), 3.66~3.62 (2H, m, H-9'a/5''), 3.59~3.54 (1H, m, H-9b), 3.38~3.33 (2H, m, H-9'b/4''), 3.79 (3H, s, 5-OCH₃), 3.78 (3H, s, 5'-OCH₃), 2.62 (2H, td, $J=13.8, 6.4$ Hz, H-7'), 1.90~1.81 (2H, m, H-8'), 1.22 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 134.1 (s, C-1), 111.8 (d, C-2), 148.7 (d, C-3), 147.3 (s, C-4), 115.6 (d, C-5), 121.0 (d, C-6), 74.1 (d, C-7), 86.6 (d, C-8), 62.1 (t, C-9), 137.7 (s, C-1'), 114.0 (d, C-2'), 151.9 (s, C-3'), 147.0 (s, C-4'), 119.6 (d, C-5'), 121.9 (d, C-6'), 33.0 (t, C-7'), 32.4 (t, C-8'), 67.7 (t, C-9'), 101.7

(d, C-1''), 72.4 (d, C-2''), 72.5 (d, C-3''), 74.0 (d, C-4''), 69.8 (d, C-5''), 18.0 (q, C-6''), 56.5 (q, 3-OMe), 56.3 (q, 3'-OMe)。以上数据与文献[29]报道基本一致, 故鉴定其为7*S*,8*S*-苏式-4,7,9-三羟基-3,3'-二甲氧基-8-*O*-4'-新木脂素-9'-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖苷。

化合物12, 分子式为 $C_{22}H_{28}O_8$: HR-ESI-MS m/z : $[M+Na]^+$ 443.170 3 (计算值: 443.167 6)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 6.61 (1H, s, H-6), 6.40 (2H, s, H-2'/6'), 4.33 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-7'), 3.88 (3H, s, 5-OCH₃), 3.76 (6H, s, 3'/5'-OCH₃), 3.63~3.60 (2H, m, H-9a/9'a), 3.52 (2H, d, $J=4.3$ Hz, H-9b/9'b), 2.72 (1H, dd, $J=14.8, 4.6$ Hz, H-7a), 2.63~2.51 (1H, m, H-7b), 2.01~1.96 (1H, m, H-8'), 1.71~1.59 (1H, m, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 130.2 (s, C-1), 126.2 (s, C-2), 147.7 (s, C-3), 139.3 (s, C-4/1'), 148.7 (s, C-5), 107.7 (d, C-6), 33.6 (t, C-7), 40.9 (d, C-8), 66.8 (t, C-9), 106.8 (d, C-2'/6'), 149.0 (s, C-3'/5'), 134.5 (s, C-4'), 42.3 (d, C-7'), 49.0 (d, C-8'), 64.1 (t, C-9'), 60.1 (q, 3-OCH₃), 56.7 (q, 3'/5'-OCH₃), 56.6 (q, 5-OCH₃)。以上数据与文献[30]报道基本一致, 故鉴定其为南烛木树脂酚。

化合物13, 分子式为 $C_{22}H_{28}O_9$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 435.167 7 (计算值: 435.166 1)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 6.73 (4H, s, H-2/6/2'/6'), 4.95 (2H, d, $J=6.8$ Hz, H-7/7'), 3.87 (12H, s, 3/5/3'/5'-OCH₃), 3.71 (1H, dd, $J=11.2, 2.6$ Hz, H-9a/9'a), 3.62 (1H, dd, $J=11.2, 4.2$ Hz, H-9b/9'b), 3.30 (2H, o, H-8/8'); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 149.3 (s, C-3/5/3'/5'), 136.2 (s, C-4/4'), 134.2 (s, C-1/1'), 104.8 (s, C-2/6/2'/6'), 84.6 (d, C-7/7'), 61.7 (t, C-9/9'), 56.8 (q, 3/5/3'/5'-OCH₃), 55.2 (d, C-8/8')。以上数据与文献[31]报道基本一致, 故鉴定其为Icariol A₂。

化合物14, 白色固体, 分子式为 $C_{19}H_{30}O_8$: HR-ESI-MS m/z : $[M-H]^-$ 385.188 2 (计算值: 385.186 8)。 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 5.89~5.81 (3H, m, H-2/3/6), 4.43~4.38 (1H, m, H-6'a), 4.33 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.84 (1H, dd, $J=12.0, 1.8$ Hz, H-6'b), 3.62 (1H, dd, $J=11.8, 5.4$ Hz, H-5'), 3.31~3.29 (1H, m, H-3'), 3.27~3.19 (1H, m, H-2'), 3.18~3.14 (1H, m, H-4'), 2.51 (1H, d, $J=16.9$ Hz, H-8a), 2.14 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-8b), 1.91 (3H, s, H-11), 1.28 (1H, d,

$J=6.4$ Hz, H-10), 1.03 (1H, s, H-12), 1.02 (1H, s, H-13); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 78.1 (d, C-1), 135.3 (d, C-2), 131.5 (d, C-3), 80.0 (s, C-4), 167.3 (s, C-5), 127.2 (d, C-6), 201.2 (s, C-7), 50.7 (t, C-8), 42.4 (s, C-9), 21.2 (q, C-10), 19.6 (q, C-11), 23.4 (q, C-12), 24.7 (q, C-13), 102.7 (d, C-1'), 75.2 (d, C-2'), 78.0 (d, C-3'), 71.6 (d, C-4'), 77.3 (d, C-5'), 62.8 (t, C-6')。以上数据与文献[32]报道基本一致, 故鉴定其为(1*R*,4*S*)-长寿花糖苷。

化合物15, 白色固体, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_7$: HR-ESI-MS m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 393.186 6 (计算值: 393.188 4)。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 5.87 (1H, s, H-6), 5.77 (1H, dd, $J=15.4$, 6.4 Hz, H-2), 5.64 (1H, dd, $J=15.4$, 9.1 Hz, H-3), 4.39 (1H, p, $J=6.8$ Hz, H-9), 4.34 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.82 (1H, dd, $J=11.8$, 2.4 Hz, H-6'a), 3.64 (1H, dd, $J=11.8$, 6.6 Hz, H-6'b), 3.27 (1H, overlap, H-4'), 3.16 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-2'), 2.42 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-8a), 2.04 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-8b), 1.93 (3H, s, H-11), 1.29 (1H, d, $J=5.4$ Hz, H-10), 1.02 (3H, s, H-13), 1.00 (3H, s, H-12); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 77.0 (d, C-1), 138.2 (d, C-2), 128.8 (d, C-3), 56.8 (d, C-4), 165.9 (s, C-5), 126.1 (d, C-6), 202.1 (s, C-7), 48.3 (t, C-8), 37.1 (s, C-9), 23.8 (q, C-10), 21.0 (q, C-11), 28.0 (q, C-12), 27.6 (q, C-13), 102.4 (d, C-1'), 75.3 (d, C-2'), 78.1 (d, C-3'), 71.5 (d, C-4'), 78.0 (d, C-5'), 62.7 (d, C-6')。以上数据与文献[33]报道基本一致, 故鉴定其为(1*R*,4*R*)-7-羰基- α -紫罗兰醇-1- O - β -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

化合物16, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_8$: HR-ESI-MS m/z : $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 337.111 1 (计算值: 337.114 0)。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (H) 4.72 (1H, overlap, H-5), 4.37 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 4.32 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-3), 3.29 (4H, dd, $J=7.4$, 5.8 Hz, H-2'/3'/4'/5'), 2.77~2.70 (1H, m, H-2a), 2.73 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-2b), 2.26 (1H, d, $J=14.5$ Hz, H-4a), 1.72 (1H, ddd, $J=14.2$, 11.6, 2.6 Hz, H-4b), 1.35 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ (C) 173.3 (s, C-1), 36.1 (t, C-2), 72.0 (d, C-3), 36.7 (t, C-4), 74.9 (d, C-5), 21.60 (q, C-6), 103.6 (d, C-1'), 74.8 (d, C-2'), 77.9 (d, C-3'), 71.5 (d,

C-4'), 77.9 (d, C-5'), 62.7 (t, C-6')。以上数据与文献[34]报道基本一致, 故鉴定其为Parasorboside。

2.2 樟叶越橘代表性化合物的MS/MS裂解行为

化合物1、3、6、7、9和12~14是樟叶越橘中代表的酚类成分, 因此对其进行MS/MS分析(表1), 总结其质谱裂解规律。现以化合物1为例对樟叶越橘中熊果苷类化合物的质谱裂解规律进行讨论。如图2所示, 化合物1的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰为 m/z 271.081 9, 表明其分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ 。以 m/z 271.081 9为母离子进行MS/MS裂解, 发现其容易断裂糖苷键, 产生碎片离子 m/z 161.045 3和108.021 6, 前者为葡萄糖基丢失一分子 H_2O 后产生, 后者为剩余的苯环碎片。类似地, 化合物3为苯乙醇苷类成分, 在MS/MS分析过程中也能检测到阿拉伯糖或葡萄糖基丢失产生的碎片, 如 m/z 269.102 3、161.044 9和113.023 9等。

表1 化合物1、3、6、7、9和12~14在负离子模式下的HR-ESI-MS/MS数据分析

Table 1 HR-ESI-MS/MS data of compounds 1, 3, 6, 7, 9 and 12~14 in the negative ion mode

化合物	m/z		分子式	m/z		误差/mDa
	母离子	子离子		子离子测量值	子离子计算值	
化合物1	272	271	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$	271.081 9	271.082 3	-0.43
		161	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5$	161.045 3	161.045 5	-0.15
		151	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$	151.039 6	151.040 1	-0.37
		108	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	108.021 6	108.021 7	-0.08
		401	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$	401.144 7	401.145 3	-0.62
化合物3	402	269	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_6$	269.102 3	269.103 1	-0.76
		233	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_7$	233.065 9	233.066 7	-0.78
		161	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5$	161.044 9	161.045 5	-0.65
		113	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$	113.023 9	113.024 4	-0.52
		101	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	101.024 2	101.024 4	-0.22
		89	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$	89.023 9	89.024 4	-0.52
		71	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$	71.013 7	71.013 9	-0.15
		625	$\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{O}_{14}$	625.158 8	625.159 8	+2.52
		593	$\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{13}$	593.130 3	593.130 1	+0.24
		483	$\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$	483.092 8	483.093 3	-0.49
化合物6	626	381	$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_8$	381.061 1	381.061 6	-0.49
		353	$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_7$	353.066 4	353.066 7	-0.28
		339	$\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{O}_7$	339.050 8	339.051 0	-0.23
		321	$\text{C}_{18}\text{H}_9\text{O}_6$	321.040 3	321.040 5	-0.16
		295	$\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_5$	295.060 0	295.061 2	-1.20
		269	$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$	269.045 1	269.045 5	-0.45
		161	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$	161.024 2	161.024 4	-0.22
		109	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	109.029 2	109.029 5	-0.30
		447	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$	447.095 1	447.093 3	+1.81
		284	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_6$	284.032 8	284.032 6	+0.16
化合物7	448	255	$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_5$	255.030 3	255.029 9	+0.40
		227	$\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_4$	227.035 0	227.035 0	+0.02
		151	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$	151.003 5	151.003 7	-0.18
		433	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_{11}$	433.080 0	433.077 6	+2.37
化合物9	434	300	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7$	300.027 7	300.027 6	+0.15
		271	$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_6$	271.024 8	271.024 8	-0.01
		255	$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_5$	255.029 5	255.029 9	-0.40
		151	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$	151.003 5	151.003 7	-0.18

续表1

化合物	m/z		分子式	m/z		误差/mDa
	母离子	子离子		子离子测量值	子离子计算值	
化合物12	420	419	$C_{22}H_{27}O_8$	419.175 0	419.171 1	+3.86
		404	$C_{21}H_{25}O_8$	404.148 0	404.147 7	+0.33
		389	$C_{20}H_{21}O_8$	389.124 5	389.124 2	+0.31
		373	$C_{20}H_{21}O_7$	373.129 3	373.129 3	+0.02
		359	$C_{19}H_{19}O_7$	359.113 5	359.113 6	-0.13
		344	$C_{18}H_{16}O_7$	344.089 3	344.090 2	-0.85
		327	$C_{18}H_{15}O_6$	327.087 2	327.087 4	-0.21
化合物13	436	435	$C_{22}H_{27}O_9$	435.166 4	435.166 1	+3.34
		417	$C_{22}H_{25}O_8$	417.155 5	417.155 5	+0.01
		405	$C_{21}H_{23}O_8$	405.156 1	405.155 5	+0.61
		375	$C_{20}H_{23}O_7$	375.145 4	375.144 9	+0.47
		357	$C_{20}H_{21}O_6$	357.134 8	357.134 4	+0.44
		385	$C_{19}H_{20}O_8$	385.187 3	385.186 8	+1.41
		223	$C_{13}H_{19}O_3$	223.134 4	223.134 0	+0.43
化合物14	386	179	$C_6H_{11}O_6$	179.056 7	179.056 1	+0.59
		161	$C_6H_9O_5$	161.045 8	161.045 5	+0.25
		119	$C_4H_7O_4$	119.034 9	119.035 0	-0.08
		101	$C_4H_5O_3$	101.024 5	101.024 4	+0.08
		89	$C_3H_5O_3$	89.024 2	89.024 4	-0.22

黄酮类化合物在MS/MS分析中容易丢失 CO 、 CO_2 、 H_2O 、 CH_3 等中性小分子^[35]。樟叶越橘中黄酮苷类成分中含有 O -糖苷键，因此在裂解过程中也容易先发生糖基的断裂丢失。化合物7为例对黄酮醇苷类质谱裂解规律进行讨论。如图2所示，化合物7的 $[M-H]^-$ 离子峰为 m/z 447.095 1，表明其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。碎片离子 m/z 284.032 8是母离子丢失葡萄糖残基产生的中性碎片；碎片离子 m/z 255.030 3是在离子 m/z 284.032 8的基础上丢失一分子 CHO 所形成；碎片离子 m/z 227.035 0则是在离子 m/z 255.030 3的基础上又丢失一分子 CO 所形成；此外 m/z 151.003 5是黄酮母核 γ -吡喃酮环裂解发生逆狄尔斯-阿尔德（Retro-Diels-Alder, RDA）重排产生的奇电子碎片离子^[36]。

木脂素类化合物则以化合物13为例，对其质谱裂解规律进行讨论。如图2所示，化合物13的 $[M-H]^-$ 峰为 m/z 435.166 4，表明其分子式为 $C_{22}H_{28}O_9$ 。碎片离子 m/z 417.155 5和405.156 1分别是母离子失去一分子 H_2O 和 CH_2O 所产生的； m/z 405.156 1离子继续丢失一分子 CH_2O 后生成碎片离子 m/z 375.145 4，该离子丢失一分子 H_2O 则得到 m/z 357.134 8。

其他酚类化合物以化合物14为例，对其质谱裂解规律进行讨论。如图2所示，化合物14的 $[M-H]^-$ 峰为 m/z 385.187 3表明其分子式为 $C_{19}H_{30}O_8$ 。其 $[M-H]^-$ 峰断裂糖苷键产生碎片离子 m/z 223.134 4和179.056 7， m/z 179.056 7继续丢失一分子 H_2O 生成 m/z 161.045 8，而碎片离子 m/z 119.034 9则是碎片离子 m/z 179.056 7丢失片段 $C_2H_2O_2$ 所得，它再丢失一分子 H_2O 后产生碎片离子 m/z 101.024 5。

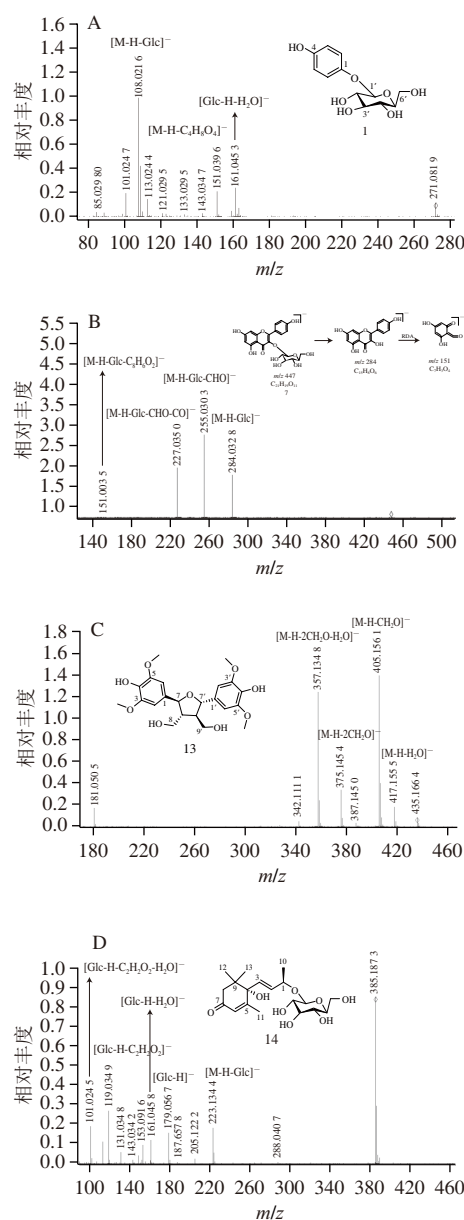
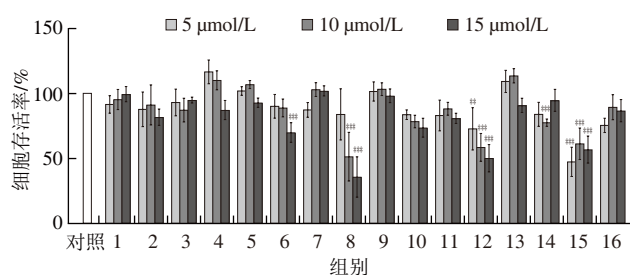


图2 化合物1 (A)、7 (B)、13 (C) 和14 (D) 的MS/MS图
Fig. 2 MS/MS spectra of compounds 1 (A), 7 (B), 13 (C), and 14 (D)

综上所述，可以发现对于樟叶越橘的酚类成分，对于糖苷类成分，糖苷键的断裂是其主要裂解途径，检测到苷元部分或糖基部分的碎片；苷元部分或糖基碎片会继续丢失 H_2O 、 CO 、 CHO 或 CH_2O 等中性碎片，产生一系列子离子。除此之外，对于黄酮或木脂素类成分，则会持续丢失羟基、羟甲基、甲氧基等取代基，产生中性碎片或加合离子碎片；此外RDA裂解在黄酮母核的裂解过程中也较为常见。由此可见，糖苷类成分中糖基的丢失为通过质谱分析判断樟叶越橘化学成分的结构类型提供了依据，丢失 H_2O 、 CO 、 CHO 或 CH_2O 等中性碎片产生的子离子或者发生RDA裂解则为通过质谱解析化学成分的细微结构差异提供了参考。

2.3 化合物1~16的神经保护作用

采用CCK-8法测试化合物1~16对SH-SY5Y细胞毒性以及H₂O₂损伤SH-SY5Y细胞的神经保护作用。细胞毒性筛选表明,除了化合物6、8和14在中、高浓度下对SH-SY5Y细胞表现出一定的毒性,化合物12和15在测试的3个浓度条件下对神经细胞均有毒性,其他化合物在5、10、20 μmol/L 3个浓度下细胞存活率和对照组(溶剂对照组,下同)接近,未对神经细胞造成损伤(图3),部分化合物在3个浓度下能提高细胞存活率,如化合物4、5、7、9和13,说明樟叶越橘大部分酚类成分在5、10、20 μmol/L浓度下对神经细胞无毒性,SH-SY5Y细胞模型可用于评价这些化合物的神经保护作用。

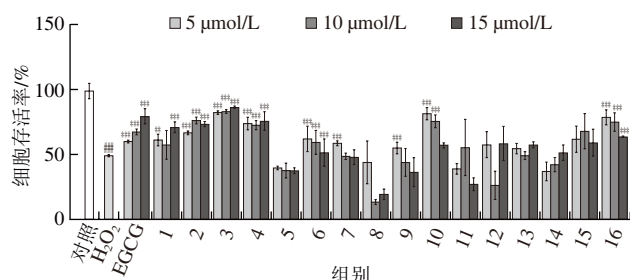


对比对照组, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 化合物1~16对SH-SY5Y细胞的存活率($n=3$)

Fig. 3 Effects of compounds 1-16 on cell viability of SH-SY5Y cells ($n=3$)

神经保护作用筛选表明H₂O₂组和对照组对比,神经细胞存活率显著下降(图4),说明H₂O₂损伤的SH-SY5Y细胞模型造模成功。与H₂O₂组相比,阳性药EGCG和化合物1~4、6、10和16作用于模型细胞后,细胞存活率显著提高(图4),表明化合物1~4、6、10和16对H₂O₂损伤的SH-SY5Y细胞具有保护作用。其中化合物2、3和10在5、10、20 μmol/L浓度条件下与EGCG组相比,细胞存活率明显升高,尤其化合物3,其细胞存活率随着浓度上升而提高,且存活率在3个剂量浓度下均超过80%,说明化合物3具有明显的神经保护活性,且呈剂量依赖关系。



对比对照组, ### $P < 0.01$; 对比H₂O₂组, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 化合物1~16对H₂O₂损伤的SH-SY5Y细胞的神经保护作用($n=3$)

Fig. 4 Neuroprotective effects of compounds 1-16 on H₂O₂-induced SH-SY5Y cells ($n=3$)

3 结论

本研究从樟叶越橘嫩芽的水提取分离得到16个化合物,分别鉴定为熊果苷、6'-乙酰熊果苷、淫羊藿次苷F2、苜蓿-β-D-葡萄糖苷、云杉苷、Dunalianosides J、山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、异槲皮苷、扁蓄苷、槲皮素-3-O-(6-O-(E)-咖啡酰基)-β-D-葡萄糖苷、7S,8S-苏式-4,7,9-三羟基-3,3'-二甲氧基-8-O-4'-新木脂素-9'-O-α-L-吡喃鼠李糖苷、南烛木树脂酚、Icariol A2、(1R,4S)-长寿花糖苷、(1R,4R)-7-羧基-α-紫罗兰醇-1-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷、Parasorboside。分析了代表性化合物1、7、13和14的MS/MS裂解规律,发现在负离子模式下糖苷类成分断裂糖苷键是其主要裂解途径,产生苷元部分或糖基部分的碎片,苷元部分或糖基碎片会继续丢失H₂O、CO、CHO或CH₂O等中性碎片,产生一系列子离子;黄酮或木脂素类成分丢失羟基、羟甲基、甲氧基等取代基,产生中性碎片或加合离子碎片,RDA裂解在黄酮母核的裂解过程中也较为常见。糖苷类成分中糖基的丢失为通过质谱分析判断樟叶越橘化学成分的结构类型提供了依据,丢失H₂O、CO、CHO或CH₂O等中性碎片产生的子离子或者发生RDA裂解则为通过质谱解析化学成分的细微结构差异提供了参考。神经保护作用筛选表明,樟叶越橘大部分酚类成分在测试浓度下对神经细胞无毒性,化合物1~4、6、10和16对H₂O₂损伤SH-SY5Y细胞具有保护作用,其中化合物3(淫羊藿次苷F2)的神经保护作用强于阳性药物EGCG,呈剂量依赖关系。以上研究结果说明樟叶越橘表现出较强的神经保护作用,其活性成分为酚苷类成分,可将樟叶越橘的嫩芽作为保健食品开发使用,拓展了雀嘴茶作为绿色健康食品的保健功能。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第76卷, 第2分册[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 93-94.
- [2] YANG J H, BAI T C, SHI L L, et al. Antihyperlipidemic effect of *Vaccinium dunalianum* buds based on biological activity screening and LC-MS[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 306: 116190. DOI:10.1016/j.jep.2023.116190.
- [3] ZHANG J K, ZHOU X L, WANG X Q, et al. Que Zui tea ameliorates hepatic lipid accumulation and oxidative stress in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Food Research International, 2022, 156: 111196. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111196.
- [4] MIGAS P, KRAUZE-BARANOWSKA M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics[J]. Phytochemistry Letters, 2015, 13: 35-40. DOI:10.1016/j.phytol.2015.05.015.
- [5] LI H L, JEONG Y M, KIM S Y, et al. Arbutin inhibits TCSP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21[J]. Die Pharmazie, 2011, 66(4): 306-309.
- [6] 李楚然, 李娜, 刘云, 等. 樟叶越橘叶2个新6-O-咖啡酰葡萄糖苷的分离鉴定[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2022, 42(4): 141-146. DOI:10.11929/j.swfu.202012053.

- [7] ZHAO P, TANAKA T, HIRABAYASHI K, et al. Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(18): 3087-3094. DOI:10.1016/j.phytochem.2008.06.001.
- [8] YANG F, SHAO J L, YANG B, et al. Analysis of nutritional components in *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Food Science and Technology International, 2011, 12: 99-102.
- [9] WU B X, ZHANG X, ZHU G L, et al. Phenolic compounds and triterpenes from the roots of *Vaccinium dunalianum* Wight and their chemotaxonomic significance[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2021, 95: 104228. DOI:10.1016/j.bse.2021.104228.
- [10] ZHAO T R, SUN M X, KONG L P, et al. Bioactivity-guided isolation of phytochemicals from *Vaccinium dunalianum* Wight and their antioxidant and enzyme inhibitory activities[J]. Molecules, 2021, 26(7): 2075. DOI:10.3390/molecules26072075.
- [11] WANG Y P, TIAN L, WANG Y D, et al. Protective effect of Que Zui tea hot-water and aqueous ethanol extract against acetaminophen-induced liver injury in mice via inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Food & Function, 2021, 12(6): 2468-2480. DOI:10.1039/d0fo02894k.
- [12] BLAUT M, BRAUNE A, WUNDERLICH S, et al. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(11): 1940-1947. DOI:10.1016/j.fct.2006.06.015.
- [13] GAO S H, ZHAO T R, LIU Y P, et al. Phenolic constituents, antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts of fruits, leaves and flower buds from *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131752. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131752.
- [14] CHENG C S, GU Q H, ZHANG J K, et al. Phenolic constituents, antioxidant and cytoprotective activities, enzyme inhibition abilities of five fractions from *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Molecules, 2022, 27(11): 3432. DOI:10.3390/molecules27113432.
- [15] CHEN X L, LUO Q Y, HU W Y, et al. Labdane and isopimarane diterpenoids from *Rosmarinus officinalis* solid wastes: MS/MS spectrometric fragmentations and neuroprotective effect[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 177: 114441. DOI:10.1016/j.indcrop.2021.114441.
- [16] QIU C X, MU L P, WANG J, et al. Sesquiterpenoids from the fruits of *Alpinia oxyphylla* Miq. and their neuroprotective effect[J]. Phytochemistry, 2023, 211: 113680. DOI:10.1016/j.phytochem.2023.113680.
- [17] 穆利萍, 王吉, 邱成省, 等. 高良姜中具有神经保护作用的化学成分研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(4): 627-635.
- [18] IONESCU-TUCKER A, COTMAN C W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease[J]. Neurobiology of Aging, 2021, 107: 86-95. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014.
- [19] 胡韶华. 抗辐射活性成分对Nrf2-Keap1信号通路激活在微波辐射后神经细胞损伤的保护作用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2015.
- [20] FAN Z F, WANG Y D, YANG M L, et al. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities[J]. Food Chemistry, 2020, 318: 126512. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126512.
- [21] AN N, ZHOU S B, CHEN X, et al. High-yield production of β -arbutin by identifying and eliminating byproducts formation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(20): 6193-6204. DOI:10.1007/s00253-023-12706-x.
- [22] 王鹏飞, 邓仕东, 屈晶, 等. 平滑苍耳果实中1个新的倍半萜内酯二聚体[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 532-536. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20180104.006.
- [23] TURGHUN C, BAKRI M, LIU G Y, et al. Phenolic glycosides from *Nitraria sibirica* leaves and their *in vitro* biological activities[J]. Natural Product Research, 2021, 35(8): 1388-1392. DOI:10.1080/14786419.2019.1647429.
- [24] LØKKE H. Picein and piceol concentrations in Norway spruce[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1990, 19(3): 301-309. DOI:10.1016/0147-6513(90)90032-Z.
- [25] LI N, ZENG W L, LUO X L, et al. A new arbutin derivative from the leaves of *Vaccinium dunalianum* Wight[J]. Natural Product Research, 2018, 32(1): 65-70. DOI:10.1080/14786419.2017.1333993.
- [26] LU Y R, FOO L Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace[J]. Food Chemistry, 1997, 59(2): 187-194. DOI:10.1016/S0308-8146(96)00287-7.
- [27] KIM S M, KANG K, JHO E H, et al. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lepedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide[J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(7): 1011-1017. DOI:10.1002/ptr.3387.
- [28] CALZADA F, CEDILLO-RIVERA R, MATA R. Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyza filaginoides*[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(5): 671-673. DOI:10.1021/np000442o.
- [29] XIE Y, WANG J, GENG Y M, et al. Phenolic compounds from the fruits of *Viburnum sargentii* Koehne[J]. Molecules, 2015, 20(8): 14377-14385. DOI:10.3390/molecules200814377.
- [30] ZHANG Z Z, GUO D A, LI C L, et al. Gauthierins A and B, two lignans from *Gaultheria yunnanensis*[J]. Phytochemistry, 1999, 51(3): 469-472. DOI:10.1016/S0031-9422(99)00029-1.
- [31] YAMAUCHI H, KAKUDA R, YAOITA Y, et al. Two new glycosides from the whole plants of *Glechoma hederacea* L.[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 55(2): 346-347. DOI:10.1248/cpb.55.346.
- [32] MAI N T, ANH B T M, XUAN V T, et al. Achyranbidens A-C: three new compounds from *Achyranthes bidentata* Blume[J]. Natural Product Research, 2024, 38(14): 2363-2372. DOI:10.1080/14786419.2023.2174534.
- [33] DU X M, IRINO N, FURUSHO N, et al. Pharmacologically active compounds in the *Anoetochilus* and *Goodyera* species[J]. Journal of Natural Medicines, 2008, 62(2): 132-148. DOI:10.1007/s11418-007-0169-0.
- [34] YRJÖNEN T, VUORELA P, KLIKA K D, et al. Application of centrifugal force to the extraction and separation of parasorboside and gerberin from *Gerbera hybrida*[J]. Phytochemical Analysis, 2002, 13(6): 349-353. DOI:10.1002/pca.665.
- [35] 杨祖凡, 王倩, 赵晴, 等. 基于UPLC-Q-Orbitrap MS技术的沙棘黄酮类成分分析[J]. 化学试剂, 2024, 46(2): 95-106. DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0726.
- [36] 李焱, 黄苇, 卢明剑, 等. 西番莲种籽中总黄酮的体内抗氧化活性及其成分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 203-208. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181102-023.