

## 在线抗氧化分析和超滤亲和液质联用技术快速筛选桂花抗氧化及抑制酪氨酸酶的活性成分

周慧吉, 李廷钊, 李 波

**Identification of Antioxidant Components and Tyrosinase Specific Inhibitors from *Osmanthus fragrans* Flower by Using Online UPLC-ABTS<sup>+</sup>-assay and UF- LC-MS Technology**

ZHOU Huiji, LI Tingzhao, and LI Bo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070130>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 溪蜜柚精油的抗氧化及其对B16细胞中酪氨酸酶的抑制效果

Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity in B16 cells of *Guanxi pomelo* essential oil

食品工业科技. 2018, 39(5): 86-89

#### 藜麦麸皮不同极性部位的抑菌及酪氨酸酶抑制活性研究

Bacteriostatic and Tyrosinase Inhibitory Activities of Different Polar Sites from Quinoa Bran

食品工业科技. 2019, 40(6): 82-88,94

#### 不同温度、pH、光照条件下毛蕊花苷的降解动力学

Degradation Kinetics of Verbascoside at Different Temperature, pH and Light

食品工业科技. 2020, 41(21): 48-52,66

#### 孜然乙醇提取物的工艺优化及对酪氨酸酶活性的抑制作用

Optimization of extraction process of ethanol extracts from cumin (*Cuminum cyminum* L.) and measurement of anti-tyrosinase activity

食品工业科技. 2018, 39(9): 164-169

#### 薰衣草提取物的体外抗氧化活性及酶抑制活性研究

Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Lavandula angustifolia* Mill. Extracts

食品工业科技. 2019, 40(16): 14-20,26

#### 不同品种甘薯叶提取物抗氧化及对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的研究

Antioxidant Activity and  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity of Sweet Potato(*Ipomoea batatas* L.) Leaf Extracts from Different Varieties

食品工业科技. 2019, 40(23): 283-289



关注微信公众号，获得更多资讯信息

周慧吉, 李廷钊, 李波. 在线抗氧化分析和超滤亲和液质联用技术快速筛选桂花抗氧化及抑制酪氨酸酶的活性成分 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 67-79. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070130

ZHOU Huiji, LI Tingzhao, LI Bo. Identification of Antioxidant Components and Tyrosinase Specific Inhibitors from *Osmanthus fragrans* Flower by Using Online UPLC-ABTS<sup>+</sup>-assay and UF- LC-MS Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 67-79. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070130

· 研究与探讨 ·

# 在线抗氧化分析和超滤亲和液质联用技术 快速筛选桂花抗氧化及抑制酪氨酸酶的 活性成分

周慧吉<sup>1</sup>, 李廷钊<sup>1,2</sup>, 李 波<sup>1,2,\*</sup>

(1. 安利 (上海) 科技发展有限公司, 上海 201203;

2. 安利 (中国) 植物研发中心, 江苏无锡 214145)

**摘 要:**目的: 研究桂花水提物的抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性, 并初步研究其活性化学成分。方法: 以 DPPH·清除能力、ABTS<sup>+</sup>清除能力和 FRAP 这 3 种抗氧化活性评价指标来衡量桂花水提取物及其化合物的抗氧化能力; 采用超高效液相-ABTS<sup>+</sup>-质谱 (UPLC-PDA-QDa-ABTS<sup>+</sup>) 在线法对桂花中的抗氧化活性成分进行定性鉴别, 同时采用超滤亲和-液质联用技术 (Ultra-filtration affinity-liquid chromatography spectrometry, UF-LC-MS), 筛选桂花中的酪氨酸酶抑制剂。用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致皮肤成纤维细胞氧化损伤模型, 评价桂花水提取物及其化合物对皮肤成纤维细胞的氧化应激保护作用。结果: 桂花水提取物清除 DPPH·及 ABTS<sup>+</sup>的半数有效浓度 (EC<sub>50</sub>) 值分别为 37.66 和 38.32 μg/mL。当桂花浓度达到 2 mg/mL 时, FRAP 值可高达 3.17。桂花水提取物抑制酪氨酸酶双酚酶的 EC<sub>50</sub> 为 595.9 μg/mL。通过 UPLC-Triple-TOF/MS 分析, 初步鉴定了桂花水提取物中 28 种化学成分。采用 UPLC-PDA-QDa-ABTS<sup>+</sup>在线法及 UF-LC-MS 技术, 快速筛选出桂花提取物中 5 种具有较好抗氧化作用并兼具显著酪氨酸酶结合率的化学成分, 鉴定其中主要的活性成分为毛蕊花糖苷。体外抗氧化和酪氨酸酶实验, 验证了毛蕊花糖苷具有显著抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性。毛蕊花糖苷清除 DPPH·及 ABTS<sup>+</sup>的 EC<sub>50</sub> 值分别为 10.27 和 14.96 μg/mL。当毛蕊花糖苷浓度达到 1 mg/mL 时, FRAP 值可高达 4.22。毛蕊花糖苷对酪氨酸酶单酚酶的 EC<sub>50</sub> 为 477.5 μg/mL, 对双酚酶的抑制活性几乎没有。利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致皮肤成纤维细胞氧化损伤模型, 进一步验证桂花提取物及毛蕊花糖苷对皮肤成纤维细胞氧化损伤具有显著保护作用。结论: 桂花水提取物及其主要活性成分毛蕊花糖苷具有很好的体外抗氧化能力、酪氨酸酶抑制活性及氧化应激保护能力。

**关键词:** 桂花, 毛蕊花糖苷, UPLC-ABTS<sup>+</sup>, 在线抗氧化, 超滤亲和-液质联用, 酪氨酸酶抑制剂

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)07-0067-13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070130

本文网刊:



## Identification of Antioxidant Components and Tyrosinase Specific Inhibitors from *Osmanthus fragrans* Flower by Using Online UPLC-ABTS<sup>+</sup>-assay and UF- LC-MS Technology

ZHOU Huiji<sup>1</sup>, LI Tingzhao<sup>1,2</sup>, LI Bo<sup>1,2,\*</sup>

(1. Amway (Shanghai) Technology Development Co., Ltd., Shanghai 201203, China;

2. Amway (China) Botanical R&D Center, Wuxi 214145, China))

**Abstract:** Objective: To investigate and analyze antioxidant activities and tyrosinase inhibition of the aqueous extract of *Osmanthus fragrans* flower (*O. fragrans*), as well as its active ingredients. Methods: In this study, antioxidant activities of

收稿日期: 2021-07-13

作者简介: 周慧吉 (1990-), 女, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 食品科学, E-mail: Cassie.Zhou@amway.com。

\* 通信作者: 李波 (1981-), 男, 博士, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: Robert.Li@amway.com。

extract of *O. fragrans* were carried out by using DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging assays and total antioxidant activity (FRAP). Qualitative analysis of major active components was performed by UPLC-PDA-QDa-ABTS<sup>+</sup> online method and UF-LC-MS method were used to qualitatively identify the antioxidant components and tyrosinase inhibitors from *O. fragrans* extract respectively. Oxidative damage model of skin fibroblasts induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to evaluate the protective effect of oxidative stress of *O. fragrans* aqueous extract and its chemical components. Results: Aqueous extract of *O. fragrans* had good scavenging effect on DPPH<sup>·</sup> and ABTS<sup>+</sup> free radical *in vitro*, and its EC<sub>50</sub> values of free radical scavenging effect on DPPH<sup>·</sup> and ABTS<sup>+</sup> were 37.66, 38.32 μg/mL, respectively. When the concentration of *O. fragrans* extract reached 2 mg/mL, FRAP value could be as high as 3.17. The EC<sub>50</sub> of tyrosinase diphenoloxidase inhibition of *O. fragrans* extract was 595.9 μg/mL. Through analysis of UPLC-Triple-TOF/MS, a total of 28 chemical compositions were preliminarily identified. Five antioxidant active compounds which also greatly combined with tyrosinase were screened out from *O. fragrans* extract by simultaneously using UPLC-PDA-QDa-ABTS<sup>+</sup> online method and UF-LC-MS method. Among them, the main active ingredient was verbascoside. Antioxidant and tyrosinase assay showed that verbascoside had significant antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity. EC<sub>50</sub> values of verbascoside of scavenging effect on DPPH<sup>·</sup> and ABTS<sup>+</sup> were 10.27, 14.96 μg/mL, respectively. When the concentration of verbascoside was 1 mg/mL, FRAP value could be up to 4.22. The EC<sub>50</sub> of tyrosinase monophenoloxidase inhibition of verbascoside was 477.5 μg/mL, but with little diphenoloxidase inhibitory effect. The oxidative damage model induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to further verify the significant protective effects of *O. fragrans* extract and verbascoside on oxidative damage of skin fibroblasts. Conclusion: The aqueous extract of *O. fragrans* and its main active component, verbascoside, had good antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity and oxidative stress protection ability.

**Key words:** *Osmanthus fragrans* Lour.; verbascoside; UPLC-ABTS<sup>+</sup>; online antioxidation; UF-LC-MS; tyrosinase inhibitors

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 属木犀科 (Oleaceae) 木犀属 (*Osmanthus*) 植物, 又名金粟、九里香, 是我国十大传统名花之一<sup>[1]</sup>, 具有观赏、食用价值, 有“全营养食品”之称<sup>[2]</sup>。桂花在我国有悠久的食用历史, 以“食”、“药”等方式融入养生保健, 至今还流行各式桂花饮、桂花酒、桂花糕点等<sup>[3]</sup>。据《本草纲目》记载, 桂花能“治百病、养精神、和颜色, 为诸药先聘通使, 久服轻身不老, 面生光华、媚好如童子”, 具有延缓衰老的作用<sup>[4]</sup>。文献研究表明, 桂花中的次生代谢产物丰富, 主要含有苯乙醇苷、黄酮、苯丙素、三萜等多种成分<sup>[5]</sup>。其中, 又以毛蕊花糖苷含量最为丰富<sup>[6-7]</sup>。

药食同源植物的活性成分研究一直是研究热点, 传统方法是将活性成分分离后再逐一进行活性测定, 耗时耗力, 且易出现活性丢失现象<sup>[8]</sup>。近年, 高效液相色谱-ABTS<sup>+</sup>在线抗氧化检测技术已被广泛应用于天然产物中抗氧化剂的分离和鉴定<sup>[9-10]</sup>, 将活性分析与现代分析仪器结合, 如甘小娜等<sup>[11]</sup>成功运用此技术筛选了藤茶中的抗氧化物质。然而, 目前抗氧化活性筛选鲜少有超高效液相 (UPLC) 的在线抗氧化运用。超滤亲和-质谱联用技术 (UF-LC-MS) 是将超滤技术与质谱技术相结合的一种高效药物筛选方法<sup>[12-13]</sup>, 以酶为靶点成功应用于复杂体系中活性成分的发现和鉴定<sup>[14-15]</sup>, 如 SONG 等<sup>[16]</sup>采用 UF-LC-MS 从菊花中筛选了黄嘌呤氧化酶抑制剂。然而, 国内外对酪氨酸酶的超滤亲和应用鲜少有报道。酪氨酸酶 (Tyrosinase) 是一种含铜氧化还原酶, 与动物体黑色素的合成、抗氧化、保护皮肤和果蔬的褐变密切相关, 可通过抑制其活性达到美白褪黑和保鲜果蔬的目的<sup>[17-18]</sup>。

本实验探究了桂花水提物的抗氧化活性及抑制酪氨酸酶的活性。且采用 UPLC-PDA-QDa-ABTS<sup>+</sup>法筛选桂花中抗氧化剂, 同时利用 UF-LC-MS 技术, 快速筛选桂花中酪氨酸酶抑制剂。此外, 对桂花活性成分的抗氧化能力及酪氨酸酶的抑制性进行了验证, 并进一步评价了桂花及其活性成分对皮肤成纤维细胞氧化损伤的保护作用。本文初步揭示了桂花抗氧化和美白活性药效物质基础, 并为桂花开发的抗氧化功能食品、预防食物酶促褐变以及口服美容保健功能产品提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

桂花 购自广西桂林, 由本单位孙帅博士鉴定为木犀科木犀属植物, 存样于安利 (中国) 研发中心中药材标本库; 甲醇、乙腈 (色谱纯) 德国 Merck 公司; 乙醇 (分析纯) GENERAL-REAGENT 公司; 甲酸 (色谱纯) 美国 Honeywell 公司; 2,2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)、过硫酸钾 (K<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)、PBS (C8020) Adamas Reagent 公司; 酪氨酸酶 (9002-10-2)、二甲基亚砜 DMSO (#D4540) 美国 Sigma 公司; 毛蕊花糖苷 (Batch NO.7335; CAS 61276-17-3; 纯度 99.8%) 上海诗丹德生物技术有限公司; B16 细胞株 中国科学院上海细胞生物所; DMEM 高糖培养基 (11965084)、胎牛血清 FBS (10099141C)、青霉素-链霉素 (10000 U/mL) PS (10378016)、0.25% 胰酶细胞消化液 (R001100)

美国 Gibco 公司; MTT 试剂盒 (G020-1-2) 南京建成公司; 活性氧检测试剂盒 (S0033S) 上海碧云天公司; 其他试剂 均购自上海泰坦科技股份有限公司

公司;超滤离心管(10 kDa) 美国 Microcon 公司;超纯水 自制,美国密理博 Milli-Q 超纯水机。

Acquity/H Class 超高效液相色谱仪(配 PDA-检测器,串联 QDa-质谱仪) 美国 Waters 公司;液质联用系统: Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;串联 AB Sciex Triple TOF® 4600 高分辨质谱 SCIEX 公司;Milli-Q 超纯水系统 上海技舟化工科技有限公司;XS2051/10 万分之一电子天平、MS3002S 型电子分析天平 梅特勒-托利多国际贸易有限公司;WF-600EHT 型超声波清洗机 宁波海曙五方超声设备有限公司;RWB3220CY-2 高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;SH-PG-010 恒温水浴锅 美国 Thermo 公司;FlexStation 3 多功能酶标仪 美国 Molecular 公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 桂花水提物的制备 桂花粉碎,准确称取 20.0 g,加入 240 mL 蒸馏水,100 ℃ 回流提取 2 次,每次 1 h,滤过后合并滤液,用旋转蒸发仪真空浓缩至小体积,浓缩液用冻干机低温干燥。冻干后-20 ℃ 保存备用。准确称取桂花水提物冻干粉 10 mg,加入蒸馏水 5 mL,配制成 2 mg/mL 的桂花溶液,并用蒸馏水稀释到低浓度。

### 1.2.2 体外抗氧化活性测定

1.2.2.1 DPPH·清除能力测定 参考文献方法<sup>[19]</sup>。精密称取 DPPH 粉末 4 mg,加入 100 mL 无水乙醇,4 ℃ 保存备用,自由基溶液有效期为 1 d,使用时用无水乙醇调节至吸光值 0.8(517 nm 波长),即为 DPPH 液。取 100 μL 样品溶液,加入 100 μL 的 DPPH 液,充分混合均匀,在避光条件下室温反应 30 min,测  $A_{517}$ ,每个样品重复 3 次。Trolox 作为阳性对照,乙醇作为空白对照。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

式中:  $A_1$  为样品组  $A_{517}$  值;  $A_0$  为空白对照组  $A_{517}$  值。

1.2.2.2 ABTS<sup>+</sup>清除能力测定 参考文献<sup>[20]</sup>,精密称取 ABTS 粉末约 50 mg,加适量 PBS 溶液溶解;精密称取过硫酸钾粉末约 50 mg,加入 10 mL PBS 溶解;取适量过硫酸钾溶液加入 ABTS 溶液中,混匀,即得 ABTS 终浓度为 3.6 nmol/L,过硫酸钾终浓度为 1.2 nmol/L;室温避光反应过夜(12~16 h),于 4 ℃ 保存备用(有效期为 2 d),使用时用 PBS 调节至所需吸光度(729 nm 波长下吸光度为  $0.8 \pm 0.02$ )。

将 100 μL 不同浓度的样品溶液与 200 μL 底物溶液混合,孵育 10 min 后测  $A_{734}$ 。每个样品重复 3 次。Trolox 作为阳性对照,PBS 作为空白对照。计算 ABTS<sup>+</sup>清除率。

$$\text{ABTS}^+\text{清除率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

式中:  $A_1$  为样品组  $A_{734}$  值;  $A_0$  为空白对照组  $A_{734}$  值。

1.2.2.3 总抗氧化能力(FRAP 法)测定 准确移取样品溶液,与 180 μL FRAP 工作液(按照试剂盒操作步骤配制)混合均匀后,37 ℃ 下孵育 5 min 后测定  $A_{593}$ 。每个样品平行重复 3 次。具体操作方法和计算公式均参照碧云天总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP)法。

### 1.2.3 酪氨酸酶抑制实验

1.2.3.1 酪氨酸酶的单酚氧化酶活力测定 酪氨酸酶单酚氧化酶测定参考文献<sup>[21]</sup>并对方法进行细微调整。以酪氨酸为底物,熊果苷为阳性对照,测定样品对酪氨酸酶单酚氧化酶的抑制活性。试验分为空白组、阳性对照组、样品组和背景组( $n=3$ )。空白组不加样品,背景组不加酪氨酸酶液。其余组依次加入 50 μL 的 L-酪氨酸(0.5 mmol/L)及 100 μL 样品液,混匀后 37 ℃ 孵育 5 min。随后加入 100 μL 酪氨酸酶溶液(250 U/mL),混匀后 37 ℃ 孵育 15 min,于 475 nm 处测定吸光度值。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right] \times 100$$

式中:  $A_1$ : 样品溶液加酶的吸光值;样品对照组  $A_2$ : 50 μL PBS 替代 50 μL 酪氨酸酶;空白组  $A_3$ : 100 μL PBS 替代 100 μL 样品溶液;空白对照组  $A_4$ : 100 μL PBS 替代 100 μL 样品溶液,并用 100 μL PBS 替代 100 μL 酪氨酸酶。

1.2.3.2 酪氨酸酶的双酚氧化酶活力测定 酪氨酸酶双酚氧化酶测定参考文献<sup>[22]</sup>并对方法进行了细微的调整。以多巴为底物,熊果苷为阳性对照,测定样品对酪氨酸酶双酚氧化酶的抑制活性。试验分为空白组、阳性对照组、样品组和背景组( $n=3$ )。空白组不加样品,背景组不加酪氨酸酶液。其余组依次加入 50 μL 的多巴溶液(0.5 mmol/L)及 100 μL 样品液,混匀后 37 ℃ 孵育 5 min。随后加入 100 μL 酪氨酸酶溶液(100 U/mL),混匀后 37 ℃ 孵育 5 min,于 475 nm 处测定吸光度值;抑制率计算公式同 1.2.3.1。

### 1.2.4 桂花中化学成分的 UPLC-Triple-TOF/MS 分析

色谱条件: Waters ACQUITY HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μm);柱温: 30 ℃;进样量: 1 μL;流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B: 乙腈;流速: 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 0~10 min, 90%~80% A; 10~15 min, 80%~70% A; 15~21 min, 70%~50% A; 21~23 min, 50%~20% A; 23~25 min, 20%~10% A; 25~28 min, 10%~90% A。

质谱条件: 离子源为 ESI 源;一级质谱参数为扫描范围: 50~1700;雾化气(kPa): 345;气帘气(kPa): 240;离子源电压(V): 5000;离子源温度(℃): 500;去簇电压(V): 100;碰撞能(eV): 10。二级质谱参数为扫描范围: 100~1500 m/z;去簇电压(V): 100;碰撞能(eV): 40;碰撞电压摆幅(eV): 20。

1.2.5 桂花在线抗氧化活性筛选 UPLC-QDa-ABTS<sup>+</sup>在线鉴别桂花中的抗氧化成分装置流程见图1<sup>[18]</sup>。

Line A: 样品溶液经色谱柱分离后,进入柱后反应模块,与柱后反应体系泵入的 PBS 缓冲液混合后先后流经 PDA 检测器和 Qda 检测器,即可得到化合物在 330 nm 下的正吸收峰图及质谱图。Line B: 将柱后体系中的溶剂置换成 ABTS<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>在 729 nm 处有最大吸收。当抗氧化剂存在时, ABTS<sup>+</sup>转变成结构稳定的 ABTS, 其在 729 nm 的吸收消失<sup>[23]</sup>。以相同的条件进样, 供试品溶液经分离后与柱后反应体系泵入的 ABTS<sup>+</sup>混合并反应后进入 PDA 检测器, 即可得到由于自由基的清除作用而形成的负吸收峰<sup>[24]</sup>。

UPLC 条件: 检测波长: 330 nm/729 nm; 进样量: 2  $\mu$ L; 其余条件均与 1.2.4 中色谱条件相同。

质谱条件: 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 负离子检测模式; 雾化器: N<sub>2</sub>; 锥孔电压(CV): 15 V; 质量扫描范围: 100~800 m/z。柱后反应系统条件: 反应环体

积: 1 mL; 柱后流动相: PBS/ABTS<sup>+</sup>溶液; 流速: 0.5 mL/min; 柱后反应模块温度: 37  $^{\circ}$ C。

1.2.6 超滤亲和技术筛选桂花中酪氨酸酶抑制剂如图2所示, 参考文献[25], 试验分为空白对照组、样品组和阻断性竞争样品对照组。空白组使用 PBS 替代酶; 样品组使用 PBS 代替竞争性配体与酶预孵化; 对照组加入 50  $\mu$ L 竞争性配体与 250  $\mu$ L 酪氨酸酶溶液(500 U/mL)预孵化, 置于 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中预孵化 30 min。将溶液转移至超滤离心管中 12000 r/min 的速度常温离心 15 min, 向滤膜中加入 PBS 清洗 3 次, 彻底洗去未结合的配体。舍弃离心液后, 依次往离心管中加入桂花水溶液(10 mg/mL, 50  $\mu$ L)和 250  $\mu$ L PBS 溶液, 37  $^{\circ}$ C 下继续孵育 30 min, 于 12000 r/min 的高速离心 15 min, 向滤膜中加入 300  $\mu$ L PBS, 离心清洗 2 次。收集过滤液, 混匀后 UPLC-MS 分析。竞争性配体溶液为 500  $\mu$ g/mL 白藜芦醇。

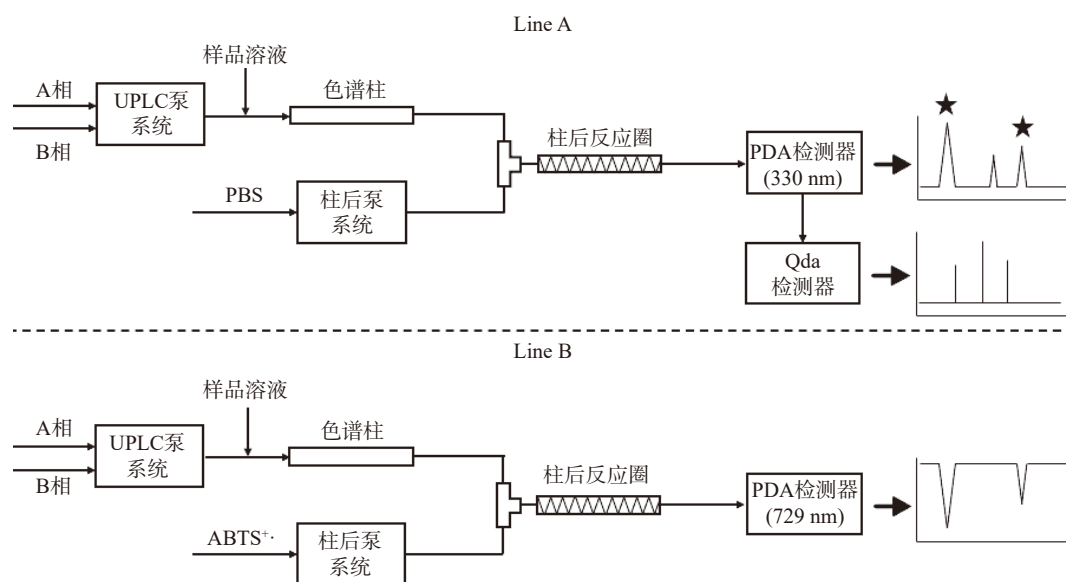


图1 在线检测桂花抗氧化成分流程图

Fig.1 Flow chart of online detection of antioxidants in *Osmanthus fragrans*

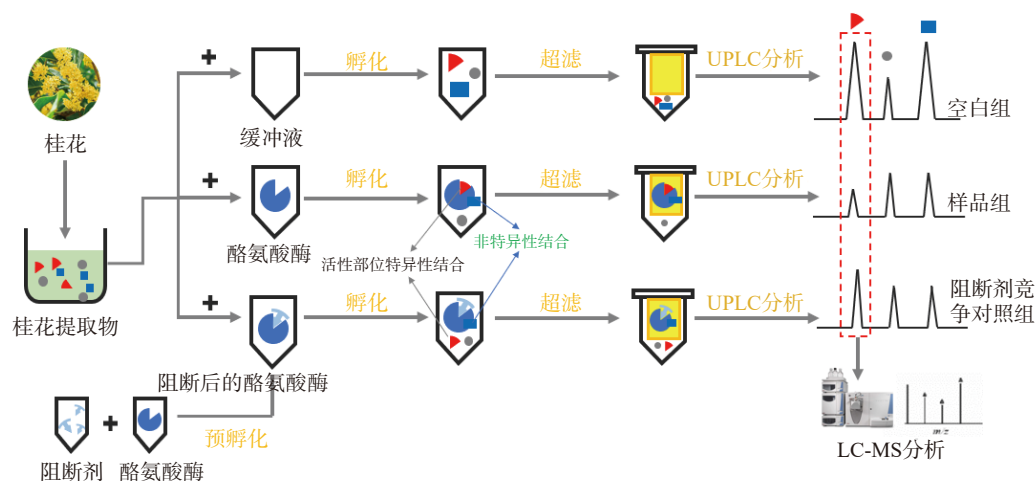


图2 UF-LC-MS 流程图

Fig.2 Principle of UF-LC-MS

### 1.2.7 成纤维细胞活性氧检测

**1.2.7.1 人皮肤成纤维细胞培养** 人皮肤成纤维细胞 HS27 培养于含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中(含 100 U/mL 青霉素, 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素), 置  $\text{CO}_2$  孵箱, 于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度环境下。每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化, 以 1:3~1:5 传代。当细胞生长状态稳定, 呈对数生长期时, 用于实验。

**1.2.7.2 MTT 法测定化合物对细胞活性的影响** 参考文献 [26], 当细胞生长至对数期时, 消化制成细胞悬液。每孔 100  $\mu\text{L}$ , 密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔板中。培养 24 h, 待细胞贴壁后, 弃去培养液。实验分为空白组: 只含培养基; 对照组: 加培养基正常培养细胞; 测试组: 含不同浓度桂花水提物溶液的培养基培养细胞。培养 48 h 后, 每孔加 MTT 溶液 50  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 振荡 20 min, 酶标仪于 570 nm 处测定各孔的吸光度。

按照公式计算细胞存活率:

细胞存活率(%)=(测试组  $A_{570}$  值-空白组  $A_{570}$  值)/(对照组  $A_{570}$  值-空白组  $A_{570}$  值) $\times 100$

**1.2.7.3 细胞抗氧化能力测定** 参考文献 [27], 细胞培养同上, 当细胞生长至对数期时, 消化制成细胞悬液, 以每孔体积 2 mL, 密度  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 6 孔板中。待细胞贴壁 24 h 后, 弃去培养液, PBS 洗涤两次。加药作用 24 h 后, 每孔加  $\text{H}_2\text{O}_2$  (叔丁基过氧化氢终浓度 500  $\mu\text{mol/L}$ ), 孵育 30 min。孵育结束后吸弃孔液, 用 PBS 清洗 1 次。按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使其终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。每孔中加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA。37  $^\circ\text{C}$  细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以除去为进入细胞内的 DCFH-DA。0.05% 胰酶消化细胞, 4  $^\circ\text{C}$  预冷 1.5 mL PBS 离心洗涤一次, 离心后用 150  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞, 过滤成单细胞, 用流式细胞仪检测。实验分为空白组: 无样品, 无  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 无探针; 阴性对照组: 无样品, 无  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 有探针; 模型组: 无样品, 有  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 有探针; 阳性对照组: 阳性药物, 有  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 有探针; 样品组: 有样品, 有  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 有探针。阳性药物为 200  $\mu\text{g/mL}$  Trolox。

### 1.3 数据处理

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验数据进行分析, 数据结果以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用  $t$  检验分析。 $P < 0.01$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 桂花的抗氧化活性及抑制酪氨酸酶活性

**2.1.1 桂花提取物的抗氧化活性** 桂花水提物的 DPPH $\cdot$ 清除能力、ABTS $^{+\cdot}$ 清除能力和 FRAP 结果分别见图 3、图 4、图 5。由图可知, 桂花水提物和 Trolox 清除 DPPH $\cdot$ 、ABTS $^{+\cdot}$ 能力及总抗氧化能力与二者的

质量浓度均呈现一定的量效关系。与相同质量浓度的 Trolox 相比较, 桂花水提物清除 DPPH $\cdot$ 、ABTS $^{+\cdot}$ 的能力略弱。桂花水提物和 Trolox 清除 DPPH $\cdot$ 的半数有效浓度( $\text{EC}_{50}$ )值分别为 37.66  $\mu\text{g/mL}$  及 17.17  $\mu\text{g/mL}$ 。桂花水提物和 Trolox 清除 ABTS $^{+\cdot}$ 的  $\text{EC}_{50}$  值分别为 38.32  $\mu\text{g/mL}$  及 11.80  $\mu\text{g/mL}$ 。结果显示, 桂花水提物具有良好的清除 DPPH $\cdot$  及 ABTS $^{+\cdot}$  的效果。不同浓度样品的总抗氧化能力用标准物质  $\text{FeSO}_4$  溶液浓度表示, 即 FRAP 值。当桂花浓度达到 2 mg/mL 时, FRAP 值可高达 3.17。

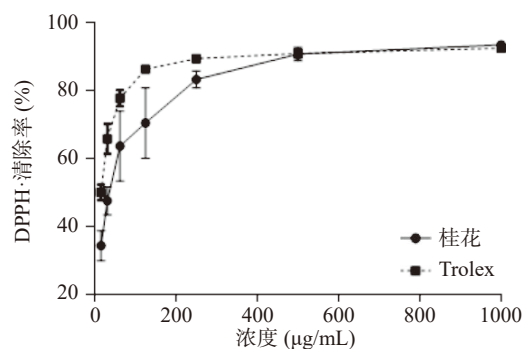


图 3 桂花提取物对 DPPH $\cdot$  的清除作用

Fig.3 DPPH $\cdot$  scavenging effect of *O. fragrans* extract

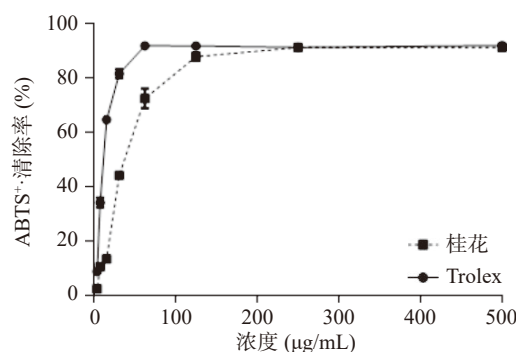


图 4 桂花提取物对 ABTS $^{+\cdot}$  的清除作用

Fig.4 ABTS $^{+\cdot}$  scavenging effect of *O. fragrans* extract

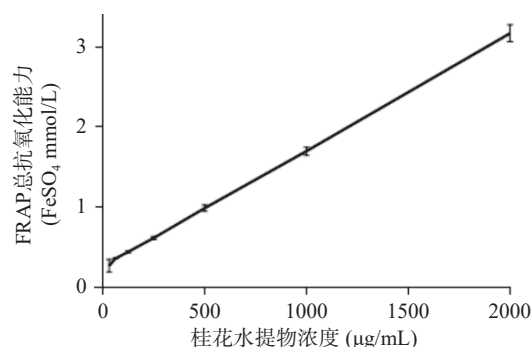


图 5 桂花提取物总抗氧化能力(FRAP)

Fig.5 Total antioxidant capacity of *O. fragrans* extract

因此, 桂花水提物具有较强的抗氧化作用, 结果与文献 [28] 报道一致。初步猜测是桂花提取物中含有丰富的总多酚及总黄酮。然而, 文献中的桂花基本都是乙醇提取, 且没有评价各成分对抗氧化的贡献。因此, 后续采用 UPLC-QDa-ABTS $^{+\cdot}$  在线筛选桂花水

提物中主要的抗氧化活性成分。

**2.1.2 桂花提取物对酪氨酸酶抑制活性** 桂花提取物对酪氨酸酶单酚酶、双酚酶的抑制活性测定结果见图 6。桂花提取物浓度在 8~500  $\mu\text{g/mL}$  范围内,酪氨酸酶单酚酶抑制率随样品浓度的升高而升高,呈现剂量依赖关系。但当桂花浓度大于 500  $\mu\text{g/mL}$  时,酪氨酸酶单酚酶抑制率却出现明显下降。而对于酪氨酸酶双酚酶,桂花提取物抑制活性随样品浓度的升高而升高,剂量依赖性明显,具有较好的双酚酶抑制效果,  $\text{EC}_{50}$  为 595.9  $\mu\text{g/mL}$ 。

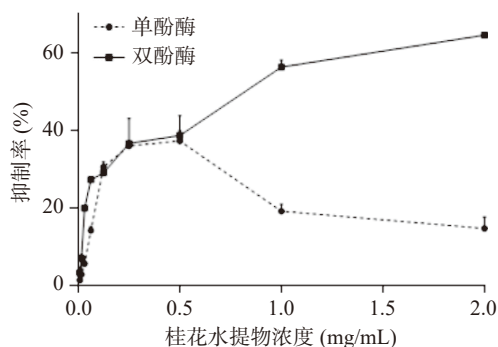


图 6 桂花水提物对酪氨酸酶的抑制作用

Fig.6 Inhibitory activity of *O. fragrans* extract against tyrosinase

文献 [29] 中发现桂花丙酮提取物对酪氨酸酶单酚酶的抑制率远远高于双酚酶。实验结果显示桂花水提物对酪氨酸酶双酶有更好地抑制效果,可能与不同溶剂提取的活性成分不同有关。

## 2.2 桂花化学成分的鉴定

通过 UPLC-Q-TOF-MS 对桂花提取液进行分析<sup>[30]</sup>,结合“Analyst 1.1.7”及“Peakview 1.2.0.3”软件中色谱峰对应的准分子离子信息、二级碎片信息,并参考相关文献(表 1),成功初步鉴定了 28 个化合物(见图 7)。其中,苯乙醇苷类成分 5 个,分别是红景天苷、橄榄苦苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和 2-乙酰基毛蕊花糖苷;黄酮类成分 8 个,分别为芦丁及其同分异构体、异槲皮苷、木犀草苷、山奈酚-3-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、山奈酚-3-O-鼠李糖苷和柚皮素;环烯醚萜类化合物 2 个,分别是特女贞苷和女贞苷;木脂素类化合物 3 个,分别是 r-连翘种

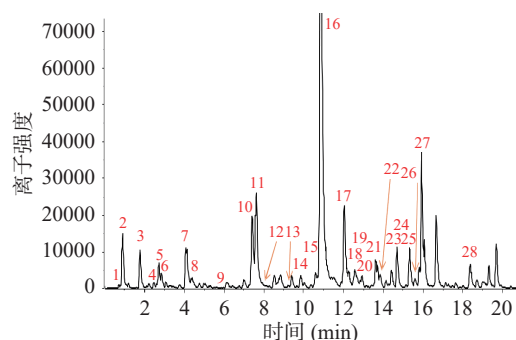


图 7 桂花的质谱总离子流图

Fig.7 Total ion chromatogram of *O. fragrans* flower samples

苷、s-连翘种苷和连翘苷;有机酸类成分 7 个,分别为奎宁酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对香豆酸和阿魏酸;糖类成分 1 个,为阿洛糖醇;其他 2 种化合物为 Caffeoyl rutinose ester 及一个未知物。

化合物 6 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 487.15,是毛蕊花糖苷脱离了  $-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$  (136 Da),与文献 [31] 报道的 Caffeoyl rutinose ester 相一致。化合物 7 的一级质谱准分子离子峰为  $m/z$  353.09, UPLC-Q-TOF-MS 根据数据处理软件计算其分子式可能为  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ , 其二级质谱碎片显示为  $m/z$  191, 推测为失去一分子咖啡酰基的奎尼酸。与商业化标准品进行比较后,进一步验证了化合物 7 为绿原酸,与文献 [32] 报道的结果相一致。化合物 16、17 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 623.20, 并在  $m/z$  461.17 生成主要离子碎片,推断为失去一分子葡萄糖(162 Da)的苷元。二者均显示相似的二级质谱碎片( $m/z$  161.02, 133.03), 推断进一步失去一分子咖啡酰基。与商业化标准品进行比较后,进一步验证了化合物 16、17 为同分异构体,分别为毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷,是桂花的主要活性成分,与文献 [7,33] 的报道结果相一致。化合物 27 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 523.18。其二级碎片  $m/z$  361.13 推测是失去一分子葡萄糖得到的,碎片  $m/z$  291.09 和 259.10 是由于该残基进一步失去  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$ 、 $\text{CH}_3\text{OH}$  产生的。二级质谱碎片  $m/z$  171.03 和 111.01 也与文献 [31] 报道一致,初步推断为女贞苷。其他化合物也依据其保留时间、碎片信息、参考文献进行初步推断,结果见表 1。

## 2.3 桂花提取物中抗氧化成分的鉴定

桂花供试品溶液经色谱分离后在 330 nm 波长下进行检测,得到呈正峰的色谱分析图(图 8A)。另外供试品溶液经过色谱分离后进入柱后衍生器和 ABTS 发生反应后在 729 nm 下进行检测,得到呈负峰的抗氧化活性分析图(图 8B)。由图 8A、B 显示,共有 6 个较明显的对应的正负峰,说明这 6 个化合物均有不同程度的抗氧化活性,其中主要抗氧化成分为化合物 16。分别对其中的质谱峰进行分析,得化合物 7 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 352.94, 化合物 10、11 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 639.19、639.21, 化合物 16、17 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 623.31、623.36(如图 8C: 分子量 623.3 的提取离子流图;图 8D: 毛蕊花糖苷的质谱图), 化合物 27 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$  的  $m/z$  值为 523.20。结合 2.2 的化学成分鉴定结果,根据化合物的紫外吸收、保留时间及分子量信息,初步推断化合物 7、10、11、16、17 和 27 分别为绿原酸、r-连翘种苷、s-连翘种苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及女贞苷。

根据文献 [6] 可知,毛蕊花糖苷是桂花的主要成分,含量高达 10%。结合 2.2 的 MS 图谱及图 8A、B,毛蕊花糖苷的正峰及负峰面积均为最大,说明毛蕊花糖苷是桂花水提物中最主要的抗氧化活性成分。

表 1 桂花提取物主要成分鉴定结果

Table 1 Compounds of *O. fragrans* flowers identified by UPLC-QTOF-MS

序号	保留时间 (min)	[M-H] <sup>+</sup> m/z	分子式	中文名	英文名	MS/MS 数据	参考文献
1	0.87	181.0718	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	阿洛糖醇	Allitol	181.0717;119.0369;101.0255; 89.0261;71.0143	[34]
2	0.92	191.0568	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	奎宁酸	Quinic acid	191.0561;127.0402;93.0347;85.0295	[35]
3	1.79	312.1092	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>7</sub>	未知	Unknown	161.0467;159.0311;150.0572;101.0249	
4	2.62	353.0891	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	新绿原酸	Neochlorogenic acid	191.0558;173.0441;135.0450;127.0401	[36]
5	2.74	299.1137	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	红景天苷	Salidroside	137.0239;119.0508;95.0316;89.0254	[32]
6	2.87	487.1475	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	/	Caffeoyl rutinose ester	487.1515;179.0371;161.0264; 135.0467;133.0317	[31]
7	4.14	353.0878	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	绿原酸	Chlorogenic acid	191.0571;161.0255;135.0463;127.0410	[32]
8	4.41	353.0883	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	隐绿原酸	4-Dicaffeoylquinic acid	191.0558;179.0341;161.0243; 135.0441;127.0390	[32]
9	5.39	179.0356	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	咖啡酸	Caffeic acid	143.8633;135.0459;134.0393; 107.0490;79.0547	[36]
10	7.43	639.1924	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	r-连翘种苷	r-Suspensaside	639.1947;621.1817;179.0344; 161.0237;151.0395	[37]
11	7.63	639.1925	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	s-连翘种苷	s-Suspensaside	639.1953;621.1850;179.0354; 161.0257;151.0404	[38]
12	8.13	163.0405	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	对香豆酸	p-Coumaric acid	162.8371;119.0495;93.0340	[39]
13	9.30	193.0513	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	阿魏酸	Ferulic acid	178.0246;149.0614;134.0370;133.0294	[6]
14	10.05	609.148	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	芦丁	Rutin	609.1433;609.1841;301.0321; 300.0258;271.0208	[40]
15	10.72	463.0885	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	异槲皮苷	Isoquercitrin	463.0877;301.0306;300.0270;271.0254; 178.9921;151.0015	[31]
16	10.88	623.1963	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	毛蕊花糖苷	Verbascoside	623.1975;461.1676;161.0250;133.0298	[7]
17	12.06	623.1985	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	异毛蕊花糖苷	Isoacteoside	623.1975;461.167;161.0253;133.0293	[33]
18	12.25	609.1473	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	芦丁同分异构体	Isomer of rutin	609.1473;300.0230;301.0347; 255.0298;178.9968	[41]
19	12.41	449.1091	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	木犀草苷	Luteoloside	287.0577;258.0527;145.0521	[31]
20	12.59	447.0937	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	山奈酚-3-O-葡萄糖苷	Kaemferol-3-O-glucopyranoside	447.0915;284.0320;255.0285;227.0339	[35]
21	13.64	665.2086	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	2-乙酰基毛蕊花糖苷	2-Acetylacteoside	665.2064;623.1952;461.1631; 161.0240;133.0289	[41]
22	13.86	593.1515	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	山奈酚-3-O-芸香糖苷	Kaempferol 3-rutinoside	593.1504;285.0389;284.0304;229.0512	[42]
23	14.15	539.1769	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	橄榄苦苷	Oleuropein	539.1787;377.1211;307.0847; 149.0247;89.0235	[31]
24	14.42	431.0984	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	山奈酚-3-O-鼠李糖苷	Kaempferol-3-O-rhamnoside	285.0380;284.0296;255.0286; 229.0492;227.0337	[43]
25	15.34	579.2082	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	连翘苷	Phillyrin	579.2087;533.2042;371.1501; 356.1283;161.0488	[44]
26	15.61	685.2349	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>17</sub>	特女贞苷	Specnuezhenide	361.1288;291.0864;223.017; 127.0417;89.0255	[31]
27	15.94	523.1828	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	女贞苷	Ligustroside	523.1785;361.1268;291.0855;259.0952; 171.0291;111.0083;59.0140	[31]
28	18.39	271.0613	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	柚皮素	Naringenin	271.0612;177.0189;151.0036; 119.0497;107.0126	[45]

2.4 超滤离心法分析桂花提取物中抑制酪氨酸酶的活性成分

与桂花提取物的色谱图(空白组, 图 9a)相比, 样品组(图 9b)的桂花提取物中部分成分色谱峰面积要低于空白组, 提示桂花提取物中部分化合物能够与酪氨酸酶结合。为排除非特异性结合而造成的假阳性结果, 设计以白藜芦醇为阳性对照的竞争性抑制试验阳性对照组(图 9c)。酪氨酸酶与白藜芦醇预孵化后, 白藜芦醇会提前占据酪氨酸酶的活性位点。此时桂花提取物中活性成分则无法与酪氨酸酶进一步结

合, 活性成分的色谱峰面积较样品组则会升高。试验结果显示, 桂花中化合物 7、10、11、16、17 的峰面积较空白组(图 9a)有较明显的降低(图 9b)。而在添加了竞争性配体白藜芦醇后, 这 5 个化合物的峰面积又得以恢复(图 9c), 因此, 推测 5 个化合物与酪氨酸酶发生了特异性结合, 可能是潜在的酶抑制剂。结合 2.2 数据, 比对相应化合物的分子离子峰数据, 推断化合物 7、10、11、16、17 分别为绿原酸、r-连翘种苷、s-连翘种苷、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷。由于毛蕊花糖苷(化合物 16)的下降程度最为明显, 推测

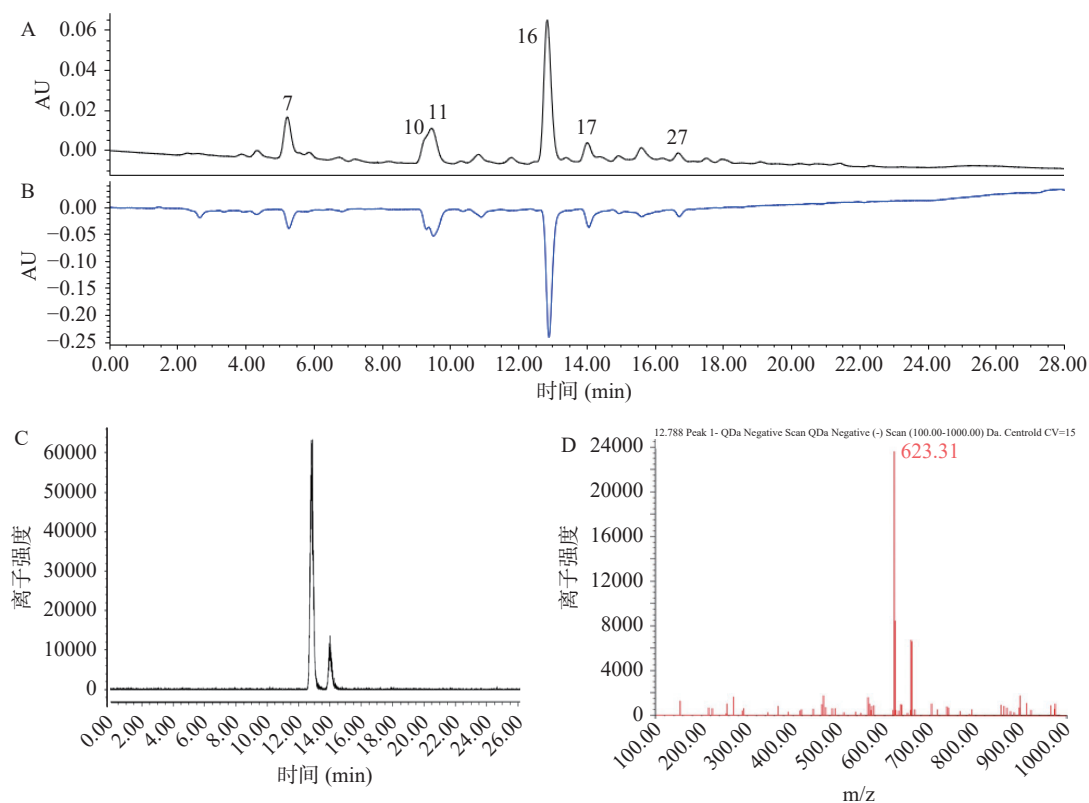


图 8 桂花提取物在线抗氧化图谱

Fig.8 Online antioxidant chromatogram of *O. fragrans* extract

注: 桂花样本原色谱图(A)、在线 ABTS 色谱图(B)、毛蕊花糖苷的提取离子流图(C)及毛蕊花糖苷的 MS 图(D)。

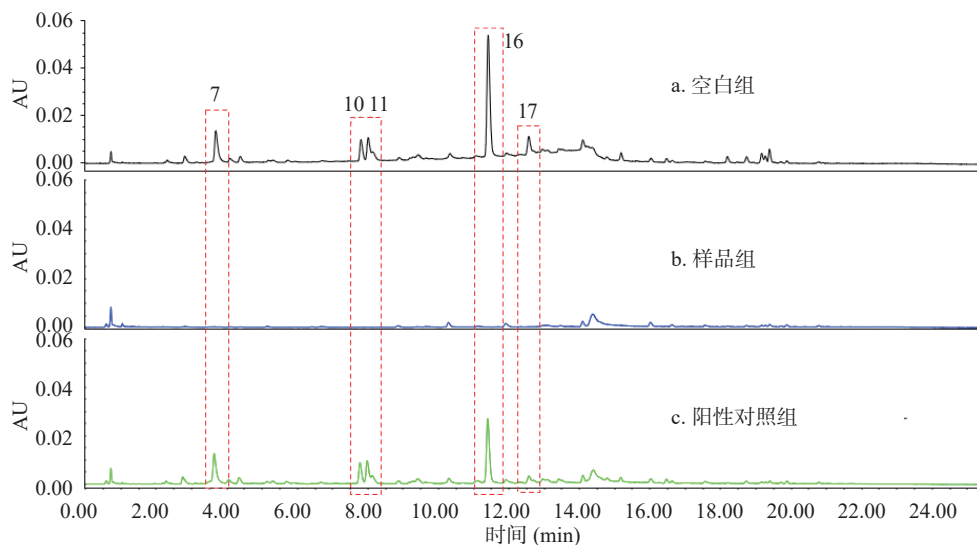


图 9 UF-UPLC-MS 技术分析桂花提取物中抑制酪氨酸酶的活性成分

Fig.9 Analysis of tyrosinase inhibitory components in *O. fragrans* flower extract by UF-UPLC-MS analysis

其是主要的酪氨酸酶抑制剂。

## 2.5 毛蕊花糖苷体外抗氧化能力及对酪氨酸酶抑制活性验证

**2.5.1 毛蕊花糖苷抗氧化活性** 毛蕊花糖苷的 DPPH·清除能力、ABTS<sup>+</sup>清除能力和 FRAP 结果分别见图 10、图 11、图 12。由图可知,毛蕊花糖苷和 Trolox 清除 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>能力及总抗氧化能力与二者的质量浓度均呈现一定的量效关系。同批次实验下,毛蕊花糖苷和 Trolox 清除 DPPH·的 EC<sub>50</sub> 值分别为

10.27 及 18.77 μg/mL。毛蕊花糖苷和 Trolox 清除 ABTS<sup>+</sup>的 EC<sub>50</sub> 值分别为 14.96 及 12.20 μg/mL。不同浓度样品的总抗氧化能力用标准物质 FeSO<sub>4</sub> 溶液浓度表示,即 FRAP 值。当毛蕊花糖苷浓度达到 1 mg/mL 时,FRAP 值可高达 4.22。因此,毛蕊花糖苷具有较强的抗氧化能力。

**2.5.2 毛蕊花糖苷抑制酪氨酸酶活性** 毛蕊花糖苷对酪氨酸酶单酚酶、双酚酶的抑制活性测定结果见图 13。毛蕊花糖苷浓度在 4~1000 μg/mL 范围内,

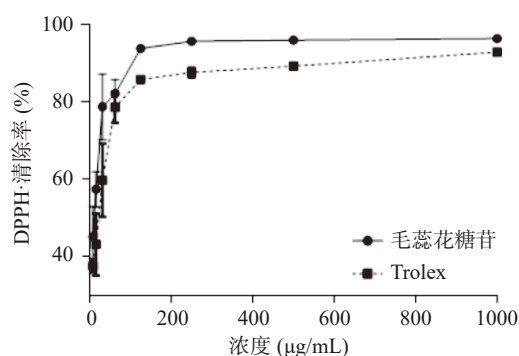


图 10 毛蕊花糖苷对 DPPH· 的清除作用

Fig.10 DPPH· radical scavenging activity of verbascoside

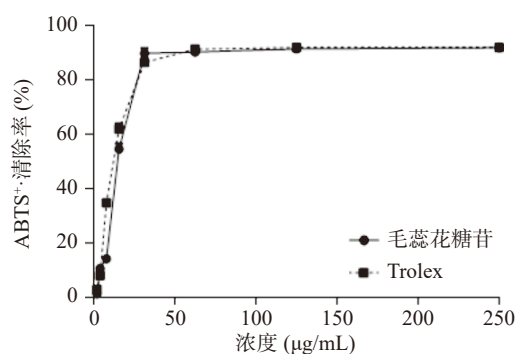


图 11 毛蕊花糖苷对 ABTS·+ 的清除作用

Fig.11 ABTS·+ radical scavenging activity of verbascoside

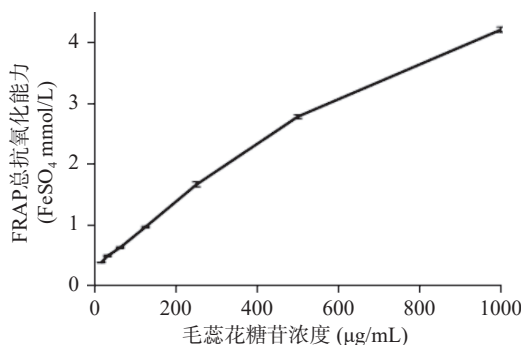


图 12 毛蕊花糖苷总抗氧化能力(FRAP)

Fig.12 Total antioxidant capacity of verbascoside

酪氨酸酶单酚酶抑制率随浓度的升高而升高,且呈现剂量依赖性;然而对酪氨酸酶双酚酶几乎无抑制作用。综上,毛蕊花糖苷有较好的酪氨酸酶的单酚酶抑制效果,EC<sub>50</sub> 为 477.5 μg/mL。

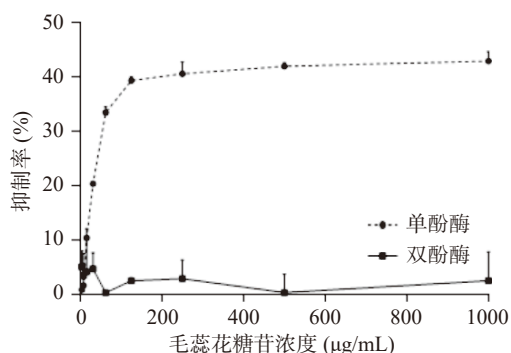


图 13 毛蕊花糖苷对酪氨酸酶的抑制作用

Fig.13 Inhibitory activity of verbascoside against tyrosinase

然而,实验发现桂花具有较好的双酚酶抑制效果,毛蕊花糖苷则只有较好的单酚酶活性,几乎没有双酚酶抑制活性,表明两者对酶的作用机制并不相同,猜测与竞争性底物不同有关<sup>[46]</sup>。超滤亲和技术主要探索的是酶与小分子化合物的结合效果,并不能深层次解释酶的抑制机理,因此化合物的酶抑制效果及具体作用机理需要后期进一步验证。

## 2.6 桂花与毛蕊花糖苷对人皮肤成纤维细胞氧化损伤的保护作用

### 2.6.1 桂花提取液及毛蕊花糖苷的安全浓度范围

不同浓度桂花提取液(1.563~50 μg/mL)及毛蕊花糖苷(3.125~100 μmol/L)分别加入细胞培养液孵育。48 h 后 MTT 法检测各组 HS27 成纤维细胞存活率。结果显示毛蕊花糖苷 100 及 50 μmol/L 两组细胞存活率明显下降,与未加药组相比差异有统计学意义( $P<0.0001$ ),见图 14。上述结果表明,桂花提取液 $\leq 50$  μg/mL 均没有明显毒性,毛蕊花糖苷的安全浓度范围为 $\leq 25$  μmol/L。因此进一步选择安全浓度范围内的桂花提取液及毛蕊花糖苷进行后续实验。

### 2.6.2 桂花提取液及毛蕊花糖苷对细胞中 ROS 水平的影响

成纤维细胞是皮肤衰老过程中最主要的效应细胞,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种常见的活性氧,极易透过细胞膜导致细胞结构的氧化损伤或诱发细胞凋亡<sup>[47]</sup>。利用离体细胞氧化损伤模型研究 ROS 的作用机制并筛选抗氧化损伤物质是较为有效的技术方法<sup>[48]</sup>。ROS

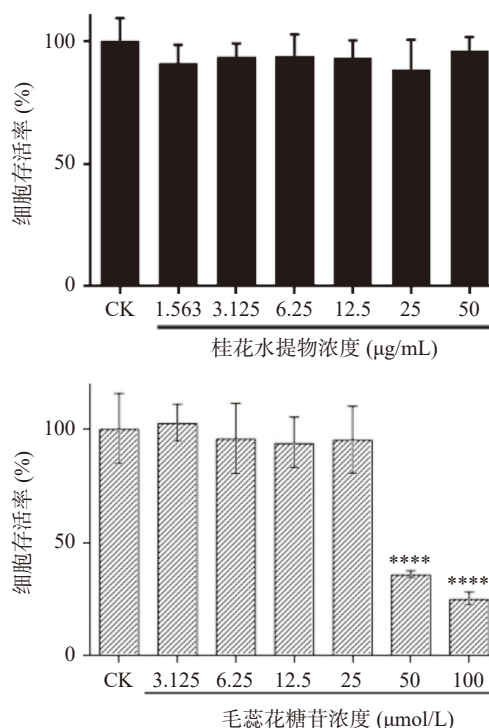


图 14 桂花提取液及毛蕊花糖苷的 MTT 测定结果

Fig.14 MTT results of *O. fragrans* flower extract and verbascoside

注: 各组细胞存活率以占空白对照组的百分率表示;\*\*\*\*表示与未加药空白对照组相比差异极显著, $P<0.0001$ 。

是氧化应激反应后生成的一种自由基。细胞内 ROS 过多或未被及时清除,细胞会对刺激性因子产生急性的应激性反应,使细胞结构等发生不可逆性的改变和功能失常,从而促使机体细胞衰老、脏器功能减退等<sup>[49]</sup>。为了进一步了解桂花水提取物及毛蕊花糖苷延缓人皮肤成纤维细胞因氧化应激所致衰老的可能机制,本文进一步观察了干扰后细胞经  $H_2O_2$  处理后细胞中 ROS 水平。

如图 15A 所示,空白组荧光响应值很低,说明细胞本身发出的背景荧光很弱。阴性对照组为在无  $H_2O_2$  存在下细胞自身 ROS 水平。模型组为在  $H_2O_2$  刺激下细胞内部的 ROS 水平,模型组相比较阴性对照组荧光强度显著升高,说明造模成功。由 2.6.1 结果可知,50  $\mu\text{g/mL}$  桂花提取物及 25  $\mu\text{mol/L}$  毛蕊花糖苷均没有细胞毒性,因此选用该浓度进行样品功效分析。由图 15B 可知,50  $\mu\text{g/mL}$  桂花提取物及 25  $\mu\text{mol/L}$  毛蕊花糖苷处理后的细胞 ROS 水平与模型组相比差异极显著( $P<0.0001$ ),说明桂花提取物及毛蕊花糖苷对皮肤成纤维细胞氧化损伤具有显著保护作用。

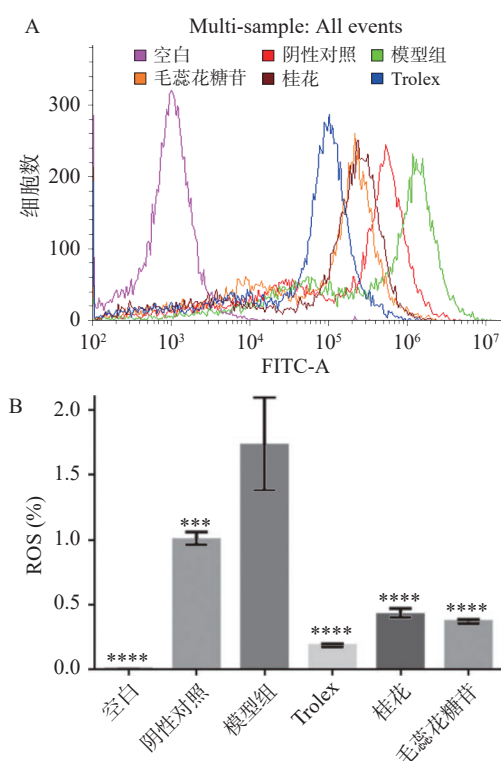


图 15 桂花及毛蕊花糖苷对 HS27 细胞中 ROS 水平的影响  
Fig.15 Effects of *O. fragrans* and verbascoside on ROS levels in HS27 cells by flow cytometry

注: A: 流式细胞仪分析图; B: 数据分析图; \*\*\*表示与模型组相比差异显著,  $P<0.001$ ; \*\*\*\*表示与模型组相比差异极显著,  $P<0.0001$ 。

### 3 讨论与结论

在体外的抗氧化实验中,桂花水提取物对 DPPH·清除能力、ABTS<sup>+</sup>·清除能力和 FRAP 3 种抗氧化活性评价指标均表现出优异效果,  $EC_{50}$  值与 Trolox 阳

性对照基本接近;此外,桂花水提取物对酪氨酸酶也有显著的抑制作用。说明桂花水提取物具有明显的抗氧化作用及抑制酪氨酸酶活性。经过对桂花水提取物液质联用分析研究,从桂花水提取物中共鉴定了 28 个化合物,主要为苯乙醇苷类、黄酮类、环烯醚萜类、木脂素类及有机酸类成分。通过本研究通过在线-UPLC-ABTS<sup>+</sup>·方法及超滤亲和-液质联用技术分别从桂花水提取物中快速简便地筛选出抗氧化剂及酪氨酸酶抑制剂,初步推断毛蕊花糖苷是桂花中的主要活性成分。体外抗氧化实验及酶活性试验也进一步验证了毛蕊花糖苷具有显著的抗氧化活性及酪氨酸酶抑制作用。结合文献<sup>[50]</sup>报道的抑制黑色素实验,桂花水提取物及毛蕊花糖苷具有潜在美白功效。

为了进一步了解桂花水提取物及毛蕊花糖苷延缓人皮肤因氧化应激所致衰老的可能机制,本文进一步观察了人皮肤成纤维细胞经  $H_2O_2$  处理后的 ROS 水平。实验结果显示,桂花水提取物及毛蕊花糖苷均能显著降低  $H_2O_2$  处理后细胞的活性氧水平,对皮肤成纤维细胞氧化损伤具有显著保护作用。该结果为以后桂花质量标准的提升和桂花保健美容功能的综合开发提供参考和数据支持。

由于本文运用的两种快速筛选技术的原理不一样,无法实现同时评估。后期可尝试将超滤亲和处理后的样品也同时引入柱后反应体系,在 lineA 系统中分析超滤亲和处理后的 3 个样品。省去不同体系转化的时间,减少进样次数,将两种体系合为一体,从而实现同时在线分析不同体系的活性成分。但是,柱后反应体系的加入,会极大地影响色谱峰的分离度,对于成分复杂的提取物具有较大挑战。

### 参考文献

- [1] 施婷婷, 杨秀莲, 王良桂. 3 个桂花品种花香组分动态特征及花被片结构解剖学观测[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2020, 44(4): 12-20. [SHI Tingting, YANG Xiulian, WANG Liangui. Observation on the dynamic characteristics of floral components of three *Osmanthus fragrans* varieties and the structural anatomy of tepals[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2020, 44(4): 12-20.]
- [2] 薛锦赢, 殷佳雅, 黄秀玉, 等. 发酵型桂花酒的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(10): 6. [XUE Jinying, YIN Jiaya, HUANG Xiuyu, et al. Process optimization of fermented osmanthus wine[J]. Food Research and Development, 2021, 42(10): 6.]
- [3] 李振兴, 白杨. 纷纷加码“中国味”百事可乐和可口可乐的竞争再升级[J]. 中国食品, 2020, 794(10): 76-77. [LI Zhengxing, BAI Yang. The competition between Pepsi and Coca-Cola is escalating[J]. China Food, 2020, 794(10): 76-77.]
- [4] 刘有停, 张卫红, 周桐, 等. 桂花提取液在抗皮肤老化方面的功效研究[J]. 香料香精化妆品, 2019, 173(2): 29-32. [LIU Youting, ZHANG Weihong, ZHOU Tong, et al. Study on the efficacy of *Osmanthus fragrans* extract in anti-aging skin[J]. Fragrance, Fragrance and Cosmetics, 2019, 173(2): 29-32.]
- [5] 赵东, 袁志彬, 孙琳, 等. 桂花及桂花酒的研究进展[J]. 酿酒

- 科技, 2017(1): 90–94. [ ZHAO Dong, YUAN Zhibin, SUN Lin, et al. Research progress of *Osmanthus* and *Osmanthus* wine[J]. Wine Science and Technology, 2017(1): 90–94. ]
- [ 6 ] 宋晓芳, 范宝磊, 曾祥玲, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定不同桂花品种中 7 个多酚类活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10): 1811–1820. [ SONG Xiaofang, FANG Baolei, ZENG Xiangling, et al. HPLC-MS/MS simultaneous determination of the contents of 7 polyphenolic active components in different *Osmanthus* species[J]. Journal of Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(10): 1811–1820. ]
- [ 7 ] 丁立新, 李煥, 范宝俭, 等. HPLC 法测定不同产地桂花中红景天苷和毛蕊花糖苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 894–897. [ DING Lixin, LI Huan, FAN Baojian, et al. Determination of salidroside and verbascoside in *Osmanthus fragrans* from different origins by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(5): 894–897. ]
- [ 8 ] SHI Yunshi, PENG Mijun, ZHANG Yuping, et al. Combination of preparative HPLC and HSCCC methods to separate phosphodiesterase inhibitors from *Eucommia ulmoides* bark guided by ultrafiltration-based ligand screening[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(12): 4213–4223.
- [ 9 ] AYA A K, MURAT K, et al. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 106–114.
- [ 10 ] YANG Yinjun, SUN Xinguang, LIU Jinjun, et al. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids and phenolic acids in snow chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) by HPLC-DAD and UP-LC-ESI-QTOF-MS[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1307.
- [ 11 ] 甘小娜, 彭博, 李廷钊, 等. UPLC-PDA-MS-ABTS 阳离子自由基在线分析藤茶的抗氧化活性成分[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 254–259. [ GAN Xiaona, PENG Bo, LI Tingzhao, et al. Cationic free radical online analysis of the antioxidant active components of vine tea[J]. Food Science, 2020, 41(18): 254–259. ]
- [ 12 ] RANI M P, PADMAKUMARI K P. HPTLC and reverse phase HPLC methods for the simultaneous quantification and in vitro screening of antioxidant potential of isolated sesquiterpenoids from the rhizomes of *Cyperus rotundus*[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2012, 904: 22–28.
- [ 13 ] CALDERN M A I. Development of an ultrafiltration-liquid chromatography/mass spectrometry (UF-LC/MS) based ligand-binding assay and an LC/MS based functional assay for *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(9): 3616–3621.
- [ 14 ] S FANG, L SHEN, Z MA. Screening for ligands of human aromatase from mulberry (*Mori alba* L.) leaf by using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1337–1343.
- [ 15 ] CHOI Y, JERMIHOV K, NAM S J, et al. Correction to screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC-MS[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(11): 4325–4325.
- [ 16 ] SONG H P, ZHANG H, FU Y, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 961: 56–61.
- [ 17 ] LI Y, DENG B, YANG S, et al. A colorimetric fluorescent probe for the detection of tyrosinase and its application for the food industry[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry, 2021, 419(13): 113458.
- [ 18 ] VALVERDE P, GARCIA J C, JIMENEZ-CERVANTES C, et al. Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 2. Differential activation by alpha-melanocyte-stimulating hormone[J]. Febs Journal, 2010, 217(2): 541–548.
- [ 19 ] LIU M C, YANG S J, DA H, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. Chemistry Central Journal, 2016, 10: 39–39.
- [ 20 ] 王计瑞, 谭均, 李隆云, 等. 国槐不同组织器官中多成分分析及抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2020, 51(17): 4513–4520. [ WANG Jirui, TAN Jun, LI Longyun, et al. Multi-component analysis and antioxidant activity in different tissues and organs of Chinese Sophora japonicus[J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(17): 4513–4520. ]
- [ 21 ] HIMANI Singh, MADHURI Kaushish Lily, KOUSHALYA Dangwal. Viburnum mullaha D. DON fruit (Indian Cranberry): A potential source of polyphenol with rich antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase and anti-tyrosinase activities[J]. International Journal of Food Properties, 2016, 20(5-8): 1729–1739.
- [ 22 ] 王苗苗, 严欢, 田合, 等. 薰衣草提取物的体外抗氧化活性及酶抑制活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 14–26. [ WANG Miaomiao, YAN Huan, TIAN He, et al. Study on the antioxidant activity and enzyme inhibition activity of lavender extract in vitro[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(16): 14–26. ]
- [ 23 ] 王丹, 时志春, 李军, 等. HPLC-ABTS<sup>+</sup>在线检测快速评价茶叶总抗氧化能力[J]. 食品工业, 2020, 41(8): 280–283. [ WANG Dan, SHI Zhichun, LI Jun, et al. HPLC-ABTS<sup>+</sup> on-line detection to quickly evaluate the total antioxidant capacity of tea[J]. Food Industry, 2020, 41(8): 280–283. ]
- [ 24 ] 陈菁, 周建桥, 谭国英, 等. 在线提取 HPLC-ABTS 联用快速分析枳椇子中抗氧化成分[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(2): 203–209. [ CHEN Jing, ZHOU Jianqiao, TAN Guoying, et al. On-line extraction of HPLC-ABTS combined with rapid analysis of the antioxidant components in *Hovenia dulcis*[J]. Chinese Journal of Pharmaceutic, 2021, 41(2): 203–209. ]
- [ 25 ] LIM, SOON, SUNG. Identification of tyrosinase specific inhibitors from *Xanthium strumarium* fruit extract using ultrafiltration-high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1002: 319–328.
- [ 26 ] CHANG J L, PARK S K, JIN Y K, et al. Melanogenesis regulatory activity of the ethyl acetate fraction from *Arctium lappa* L. leaf on  $\alpha$ -MSH-induced B16/F10 melanoma cells[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 138: 111581.
- [ 27 ] 王春宇, 姜民, 侯冠宇, 等. 小柴胡汤对过氧化氢诱导的人

- 皮肤成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(6): 1074-1077. [WANG Chunyu, JIANG Min, HOU Guanyu, et al. Protective effect of Xiaochaihu decoction on oxidative stress damage of human skin fibroblasts induced by hydrogen peroxide[J]. Chinese Laboratory Diagnosis, 2018, 22(6): 1074-1077.]
- [28] 黄玲艳. 桂花提取物的抗氧化及延缓衰老作用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017. [WANG Lingyan. The antioxidant and anti-aging effects of *Osmanthus fragrans* extract[D]. Yangzhou: Yangzhou university, 2017.]
- [29] WU L C, CHANG L H, CHEN S H, et al. Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonetic extract of *Osmanthus fragrans*: A potential natural and functional food flavor additive[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(9): 1513-1519.
- [30] FEI Z, PENG J, ZHAO Y. Varietal classification and antioxidant activity prediction of *Osmanthus fragrans* Lour. flowers using UPLC-PDA/QTOF-MS and multivariable analysis[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 490-497.
- [31] LIAO X, HONG Y, CHEN Z. Identification and quantification of the bioactive components in *Osmanthus fragrans* roots by HPLC-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 11(3): 299-307.
- [32] 钟询龙, 王若伦, 段炼, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术分析女贞子与墨旱莲配伍协同增效的物质基础[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(19): 1887-1891. [ZHONG Xunlong, WANG Ruolun, DUAN Lian, et al. Based on UPLC/Q-TOF-MS technology to analyze the material basis of the synergy of the compatibility of *Ligustrum lucidum* and *Eclipta prostrata*[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2017, 37(19): 1887-1891.]
- [33] 夏玉英, 陈铃, 刘方乐, 等. LC-MS/MS 法测定脑透析液中 3 种苯乙醇苷类成分的浓度及其体内回收率考察[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1841-1845. [XIA Yuying, CHEN Ling, LIU Fangle, et al. Determination of the concentration of three phenethyl alcohol glycosides in cerebral dialysis fluid by LC-MS/MS and investigation of the probe recovery rate *in vivo* and *in vitro*[J]. Research and Development of Natural Products, 2017, 29(11): 1841-1845.]
- [34] 尹伟, 宋祖荣, 刘金旗, 等. 桂花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 679-685. [YI Wei, SONG Zurong, LIU Jinqi, et al. Study on the chemical constituents of *Osmanthus fragrans*[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 40(4): 679-685.]
- [35] 吴超然, 房仙颖, 萧伟. 桂花非挥发性成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(8): 1439-1448. [WU Chaoran, FANG Xianying, XIAO Wei. Research progress on non-volatile constituents and pharmacological activities of *Osmanthus fragrans*[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(8): 1439-1448.]
- [36] 林秀莲, 宋粉云, 潘玄玄, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析补肾强身片中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 61-67. [LIN Xiulian, SONG Fenyun, PAN Xuanxuan, et al. Chemical constituents in the kidney tonifying and body strengthening tablets[J]. Chinese Journal of Experimental Formulas, 2018, 24(19): 61-67.]
- [37] CUI Y, WANG Q, SHI X, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia suspensa* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry[J]. Phytochemical Analysis Pca, 2010, 21(3): 253-260.
- [38] HAN J, MIN Y, HUI G, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSn[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2): 430-438.
- [39] 常冰. 不同桂花品种 GC/MS 和 HPLC 指纹图谱分析[D]. 开封: 河南大学, 2019. [CHANG Bing. GC/MS and HPLC fingerprint analysis of different *Osmanthus fragrans* varieties[D]. Kaifeng: Henan University, 2019.]
- [40] 宋晓芳. 桂花中多酚类成分分析和过氧化麦角甾醇抗肿瘤活性研究[D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2019. [SONG Xiaofang. Analysis of polyphenols in *Osmanthus fragrans* and study on anti-tumor activity of ergosterol peroxide[D]. Xianning: Hubei University of Science and Technology, 2019.]
- [41] 吴金凤, 尹权微, 潘有智, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析苘蓉总苷胶囊化学成分[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3244-3251. [WU Jingfeng, YI Quanwei, PAN Youzhi, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS quick analysis of chemical components of cistanche glycoside capsules[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 41(17): 3244-3251.]
- [42] 梁世骅, 刘飞, 杜飞飞, 等. LC-MS/MS 法测定血浆中山奈酚-3-O-芸香糖苷浓度及其在大鼠药动学研究中的应用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(5): 491-496. [LIANG Shipiao, LIU Fei, DU Feifei, et al. LC-MS/MS method for determination of kaempferol-3-O-rutinoside in plasma and its application in rat pharmacokinetics[J]. Chinese Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2006, 11(5): 491-496.]
- [43] 赵明慧, 姜子涛, 刘韬, 等. 平榛叶中黄酮类化合物成分的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 235-240. [ZHAO Minghui, JIANG Zitao, LIU Tao, et al. Study on the flavonoids in the leaves of *Corylus heterophylla* Fisch[J]. Modern Food Technology, 2014, 30(12): 235-240.]
- [44] 元新霞. 桂花花期及采后储藏过程中连翘脂素含量变化规律研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013. [YUAN Xinxia. Study on the change of forsythiaside content in *Osmanthus fragrans* during flowering and postharvest storage[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.]
- [45] 代纯, 靳熙茜, 汪海波, 等. 桂花乙醇萃取物的抗氧化活性及主成分结构的鉴定[J]. 武汉轻工大学学报, 2019, 38(1): 9-16. [DAI Chun, JIN Xiqian, WANG Haibo, et al. Antioxidant activity of ethanol extract of *Osmanthus fragrans* and identification of main component structure[J]. Journal of Wuhan University of Light Industry, 2019, 38(1): 9-16.]
- [46] 刘东茹, 任亚梅, 伯继芳, 等. 根皮苷及苹果幼果多酚对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 113-119. [LIU Dongru, REN Yamei, BO Jifang, et al. Inhibition of phlorizin and polyphenols from green apple on tyrosinase activity[J]. Modern Food Technology, 2019, 35(8): 113-119.]

[47] 史莎莎, 阎胜利, 张方华. 维生素 E 对  $H_2O_2$  诱导的人甲状腺细胞凋亡的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(6): 45-52.

[SHI Shasha, YAN Shengli, ZHANG Fanghua. The protective effect of vitamin E on the apoptosis of human thyroid cells induced by  $H_2O_2$ [J]. Journal of Immunology, 2011, 27(6): 45-52.]

[48] 金明, 王玉娇, 金梅花, 等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324-326.

[JIN ming, WANG yujiao, JIN meihua, et al. Comparison of two kinds of cells to establish hepatocyte oxidative damage model[J]. Chinese Public Health, 2015, 31(3): 324-326.]

[49] 刘雷山. 两种皮肤细胞对过氧化氢的不同反应及 CD147 在氧化应激所致人皮肤成纤维细胞衰老中的机制研究 [D]. 长沙:

中南大学, 2012. [LIU Leishan. Study on the different reactions of two kinds of skin cells to hydrogen peroxide and the mechanism of CD147 in the senescence of human skin fibroblasts induced by oxidative stress[D]. Changsha: Zhongnan University, 2012.]

[50] WANG Z. *Osmanthus fragrans* flower aqueous extract and its enriched acteoside inhibit melanogenesis and ultraviolet-induced pigmentation[J]. Natural Product Communications, 2018, 13(5): 575-580.