

太白茶 HPLC 指纹图谱的建立及 UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS 联用分析*

李莎莎¹, 李雅娟², 王晓婷¹, 毛阿娟¹, 李凡¹, 李芳¹, 张红¹, 王卫锋^{1**}

(1. 陕西省中医药研究院, 西安 710003; 2. 陕西中医药大学, 咸阳 712046)

摘要 目的: 建立太白茶药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析方法, 并运用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS)法对太白茶中的特征峰进行定性分析。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 年版”, 建立指纹图谱并进行相似度评价。化学成分分析选用 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 技术, 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C; 质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 负离子模式扫描, 扫描范围 *m/z* 80 ~ 1 200。结果: 建立的太白茶特征指纹图谱中, 标定共有峰 8 个, 10 批太白茶药材相似度均 ≥ 0.9, 各批次之间共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.5%。对 8 个共有峰中的 4 个峰进行了结构指认, 依次为鳞片衣酸、羊角衣酸、thamnoliadepsides B、坝巴酸。结论: 所建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可靠, 专属性好, 结合 UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 的定性分析, 可用于太白茶药材的整体质量综合评价。

关键词: 太白茶; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量评价; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 定性分析

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)04-0585-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.04.05

Establishment of HPLC fingerprint of lichens of *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. and its UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS analysis*

LI Sha-sha¹, LI Ya-juan², WANG Xiao-ting¹, MAO A-juan¹,
LI Fan¹, LI Fang¹, ZHANG Hong¹, WANG Wei-feng^{1**}

(1. Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract Objective: To establish a quality assessment method for lichens of *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. based on HPLC fingerprint, and qualitative analysis of the chemical constituents by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass

* 陕西省中医药管理局中医药全省性专款专项项目(2021-QYZL-01); 陕西省中医药研究院“苗圃培育计划”项目(2021-16, 2021-21); 陕西省中医药管理局传承创新暨“秦药”开发重点科学研究项目(2021-02-GJ-021); 陕西省重点研发计划一般项目(2022SF-301, 2024SF-YBXM-481)

** 通信作者 Tel: 13572021669; E-mail: 1196821692@qq.com

第一作者 Tel: 15829736183; E-mail: lisha988118@163.com

spectrometry (UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS). **Methods:** Agilent TC - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used, the mobile phase was methol - 0.1% phosphoric acid with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 10 μL. HPLC fingerprints of lichens of *Thamnolia subuliformis* was established. The software of similarity calculation for traditional Chinese medicines fingerprints (version 2012) was used to establish the fingerprinting of lichens of *Thamnolia subuliformis*. The chemical constituents were analyzed by UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS, The chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with acetonitrile(A) - 0.1% formic acid aqueous solution(B) as mobile phase for gradient elution, the flow rate was 0.3 mL · min⁻¹ and the column temperature was 30 °C. Mass spectrometry was performed using an electrospray ionization and data was collected in negative ion modes in the range of *m/z* 80 - 1 200. **Results:** Eight common peaks were identified from fingerprints of 10 batches of samples. The RSD values of relative retention time of 8 common peaks of chromatograms of samples were all below 0.5% and the similarities were above 0.9. 4 of the identified peaks were further confirmed by UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS as squamatic acid, baeomycesic acid, thamnoliadepsides B, barbatinic acid. **Conclusion:** The established method of fingerprint is stable, reliable, and specific, which can be used for quality evaluation of lichens of *Thamnolia subuliformis*.

Keywords: *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb.; HPLC; fingerprinting; quality evaluation; UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS; qualitative analysis

太白茶, 别名雪茶、地茶, 为雪地茶 *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. 或地茶 *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer. 的地衣体, 主要生长在高寒地带, 如陕西太白山、云南、西藏等地, 具有清热解毒、安神养心、清心明目的功效^[1-3]。在《全国中草药汇编》^[4]及《中药大辞典》^[5]中其名为雪茶, 民间常作汤剂或泡茶饮, 主要用于治疗中暑、心烦口渴、肺热咳嗽、咽喉肿痛、虚劳骨蒸、癫痫狂躁、失眠、目涩等症。2015年版《陕西省药材标准》^[6]中收录的太白茶为雪地茶 *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. 的地衣体。现代研究表明, 太白茶是一类独特的由共生菌和共生藻组成的复合生物有机共生体, 其代谢产物主要分为初生代谢物和次生代谢物。初生代谢物主要包括多糖、氨基酸等物质, 次生代谢物主要为地衣酸类, 具有抗菌、调节免疫、抗衰老、抗癌等药理活性^[7-9], 并被用于辅助治疗阿尔兹海默症、高血压、肥胖和神经衰弱等症^[10-12]。但目前国内外关于太白茶的研究报道较少, 质量控制方面的研究更是稀缺, 因此, 本实验拟通过建立太白茶的 HPLC 指纹图谱, 并采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS) 技术对其共有峰成分进行定性分析, 以

期为太白茶的质量综合评价提供可行方法, 并为该药材后续药效物质基础研究提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪和 Q Exactive Focus 型质谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); Peak View 数据处理软件 (Thermo Fisher Scientific 公司); BT25S 型十万分之一电子分析天平和 BS210S 型万分之一电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); DFT - 200A 粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); KQ - 5200E 台式超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品: 苔色酸 (批号 CHB210121)、松萝酸 (批号 CHB201214), 纯度 ≥ 98%, 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 黑茶渍素 (批号 OK201912B), 纯度 ≥ 98%, 购自北京沃凯生物科技有限公司。甲醇、乙腈、甲酸为色谱级; 水为屈臣氏蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

10 批太白茶样品, 其中云南省 2 批 (香格里拉编号 S3; 丽江编号 S4), 四川阿坝 1 批 (编号 S5), 陕西省 7 批 (周至县编号 S2; 眉县编号 S10; 太白县 5 批分

别编号 S1、S6、S7、S8、S9), 经陕西省中医药研究院杨智锋主任药师鉴定为管枝衣科植物雪地茶 *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. 的地衣体。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取苔色酸、松萝酸、黑茶渍素的对照品适量, 分别置 10 mL 量瓶中, 以三氯甲烷约 1 mL 溶解, 加甲醇定容至刻度, 分别配制成质量浓度为 0.2、0.5、0.2 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液, 备用。

2.1.2 供试品溶液 取太白茶样品(粉碎, 过 60 目筛) 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞三角瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称量, 超声(功率 400 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 放置至室温, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 太白茶液相指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent TC - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B) 为流动相, 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 30% A → 45% A; 10 ~ 80 min, 45% A → 80% A; 80 ~ 90 min, 80% A → 95% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。

2.2.2 方法学考察 取“2.1.2”项下供试品溶液(样品编号 S6) 适量, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 4 号色谱峰的保留时间和峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间的

RSD ≤ 0.13% (n = 6)、相对峰面积的 RSD ≤ 1.8% (n = 6), 表明仪器的精密度良好。

取“2.1.2”项下供试品溶液(样品编号 S6) 适量, 分别于室温放置 0、2、4、8、10、12 h, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以 4 号色谱峰的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出 8 个共有峰的相对保留时间的 RSD ≤ 0.81% (n = 6), 相对峰面积的 RSD ≤ 3.0% (n = 6), 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内稳定性良好。

取同一批次(样品编号 S6) 药材粉末 6 份, 每份 0.5 g。按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以 4 号色谱峰的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出 8 个共有峰的相对保留时间的 RSD ≤ 0.11% (n = 6), 相对峰面积的 RSD ≤ 3.1% (n = 6), 表明本方法重复性良好。

2.2.3 HPLC 指纹图谱的建立 取 10 批次太白茶样品, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》, 以编号 S6 的样品色谱图为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1, 以中位数法生成对照指纹图谱(R), 得到的 10 批太白茶药材 HPLC 叠加图谱均有 8 个共有峰, 见图 1。以 4 号色谱峰为参照峰, 计算 10 批太白茶样品共有峰的相对峰面积及相对保留时间, 结果见表 1、2。

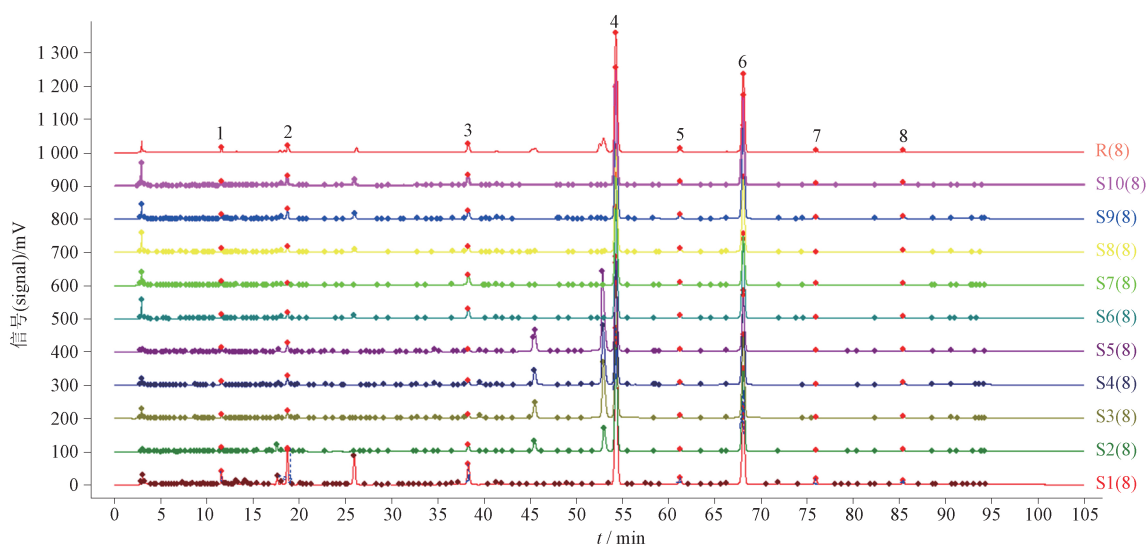


图 1 10 批太白茶的 HPLC 叠加图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of lichens of *Thamnolia subuliformis*

表 1 10 批太白茶指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab. 1 Relative peak areas of common peaks in the fingerprint of 10 batches of lichens of *Thamnolia subuliformis*

峰号 (peak No.)	相对峰面积(relative peak area)									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.045 9	0.017 4	0.016 8	0.017 4	0.025 9	0.016 8	0.017 8	0.017 9	0.018 1	0.020 4
2	0.151 9	0.007 8	0.005 0	0.006 3	0.006 4	0.036 7	0.015 0	0.037 4	0.050 3	0.056 2
3	0.125 0	0.061 7	0.026 1	0.033 3	0.021 6	0.085 5	0.093 2	0.054 6	0.059 7	0.085 4
4	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
5	0.040 6	0.017 7	0.020 1	0.021 4	0.016 4	0.030 2	0.027 2	0.037 2	0.029 2	0.038 5
6	0.518 1	0.794 2	0.641 6	0.810 6	0.623 0	0.738 0	0.474 0	0.739 4	0.732 0	0.799 9
7	0.039 9	0.013 1	0.002 6	0.002 8	0.004 7	0.007 9	0.014 8	0.001 3	0.011 7	0.017 6
8	0.023 0	0.012 8	0.010 0	0.019 7	0.011 6	0.015 3	0.013 4	0.016 4	0.014 2	0.021 7

表 2 10 批太白茶指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab. 2 Relative retention time of common peaks in the fingerprint of 10 batches of lichens of *Thamnolia subuliformis*

峰号 (peak No.)	相对保留时间(relative retention time)										RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.211 4	0.211 3	0.211 3	0.211 2	0.211 6	0.211 7	0.211 2	0.211 5	0.211 6	0.211 3	0.17
2	0.350 7	0.350 7	0.350 6	0.350 4	0.351 1	0.351 2	0.350 7	0.350 9	0.351 0	0.350 7	0.11
3	0.699 8	0.699 9	0.699 3	0.698 7	0.700 2	0.700 5	0.700 4	0.701 1	0.701 3	0.700 9	0.074
4	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
5	1.131 3	1.131 3	1.131 0	1.131 7	1.131 3	1.130 8	1.129 9	1.130 4	1.130 5	1.130 6	0.028
6	1.258 8	1.258 9	1.258 8	1.259 9	1.258 9	1.258 2	1.257 2	1.257 0	1.256 6	1.257 3	0.056
7	1.404 7	1.404 7	1.404 7	1.404 6	1.104 4	1.403 4	1.401 3	1.401 4	1.401 4	1.401 7	0.11
8	1.581 6	1.581 0	1.581 5	1.583 6	1.580 8	1.579 9	1.577 5	1.577 0	1.577 2	1.577 3	0.12

由表 1 可知,10 批太白茶色谱峰中有 8 个共有峰。以最大峰面积的 4 号峰为对照峰,峰面积设为 1,每个太白茶图谱中的其他共有峰峰面积与之峰面积相除得到相对峰面积。同理,表 2 则提供了 8 个共有峰的保留时间,由表中数据可知,每个太白茶色谱图中共有峰保留时间的标准差(SD)均 < 1,说明这些峰的选取符合共有峰的特点。

2.2.4 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》对 10 批样品进行相似度评价,结果见表 3。软件相似度计算是采用向量夹角余弦法,相似度结果在 0.9 ~ 1.0,符合要求。由表中数据可知,各批次样品 S1 ~ S10 的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.970 ,符合指纹图谱的技术要求,表明 10 批药材之间具有较好的一致性,本方法可用于综合评价太白茶药材的整体质量。

2.3 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 分析

2.3.1 色谱-质谱条件 采用 Waters Acquity UPLC

BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以乙腈(A) - 0.1% 甲酸水(B) 为流动相,梯度洗脱(0 ~ 8 min, 10% A → 45% A; 8 ~ 15 min, 45% A → 60% A; 15 ~ 20 min, 60% A → 95% A; 20 ~ 22 min, 95% A), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 1 μL。采用加热电喷雾离子源(ESI), 负离子监测模式, 喷雾电压为 3.0 kV, 毛细管温度 350 °C, 雾化温度 320 °C。扫描方式为一级全扫描/数据依赖型二级质谱扫描(Full MS/dd - MS²), Full MS 分辨率 70 000, dd - MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100 ~ 1 500, 碰撞能量(CE) 设定 15 eV。数据分析采用 Xcalibur 4.0 软件。

2.3.2 共有峰的指认 取“2.1.1”与“2.1.2”项下对照品储备液和供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱-质谱条件进行测定,得到总离子流图,见图 2,结合对照品以及查阅文献相关报道^[13-17],对指纹图谱中的一些共有峰的结构归属进行判断,详细信息见表 4。太白茶中的主要成分为地衣酸类成分,主要

表 3 10 批太白茶相似度评价结果

Tab. 3 Similarity evaluation results of 10 batches of lichens of *Thamnolia subuliformis*

编号 (peak No.)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.971	0.985	0.970	0.989	0.981	0.991	0.979	0.981	0.976	0.987
S2	0.971	1.000	0.994	0.999	0.992	0.999	0.973	0.999	0.999	0.999	0.997
S3	0.985	0.994	1.000	0.994	1.000	0.997	0.990	0.997	0.998	0.993	0.999
S4	0.970	0.999	0.994	1.000	0.992	0.998	0.970	0.999	0.998	0.999	0.996
S5	0.989	0.992	1.000	0.992	1.000	0.995	0.990	0.996	0.997	0.992	0.998
S6	0.981	0.999	0.997	0.998	0.995	1.000	0.981	1.000	1.000	0.999	0.999
S7	0.991	0.973	0.990	0.970	0.990	0.981	1.000	0.980	0.981	0.973	0.987
S8	0.979	0.999	0.997	0.999	0.996	1.000	0.980	1.000	1.000	0.999	0.999
S9	0.981	0.999	0.998	0.998	0.997	1.000	0.981	1.000	1.000	0.999	0.999
S10	0.976	0.999	0.993	0.999	0.992	0.999	0.973	0.999	0.999	1.000	0.997
R	0.987	0.997	0.999	0.996	0.998	0.999	0.987	0.999	0.999	0.997	1.000

包括二苯并呋喃类、缩酚酸及其衍生物和单本环衍生物,采用已有对照品比对,鉴定出太白茶药材中的单苯环取代物苔色酸、缩酚酸类黑茶渍素和二苯并呋喃类松萝酸,然而在质谱中三者的响应值较低,且在 HPLC 中色谱峰也很小,几乎检测不到,故未加入指纹图谱中的共有特征峰。而图 1 的共有峰峰 4、峰 6、峰 7 及峰 8

的响应值相对较高,分离度较好,采用制备液相色谱仪按照“2.2.1”项下色谱条件对共有峰峰 4、峰 6、峰 7 及峰 8 进行分离纯化,采用 UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS 进行定性分析,指认其均属于缩酚酸类化合物,依次为鳞片衣酸、羊角衣酸、thamnoliadepsides B、坝巴酸,其二级质谱图见图 3。

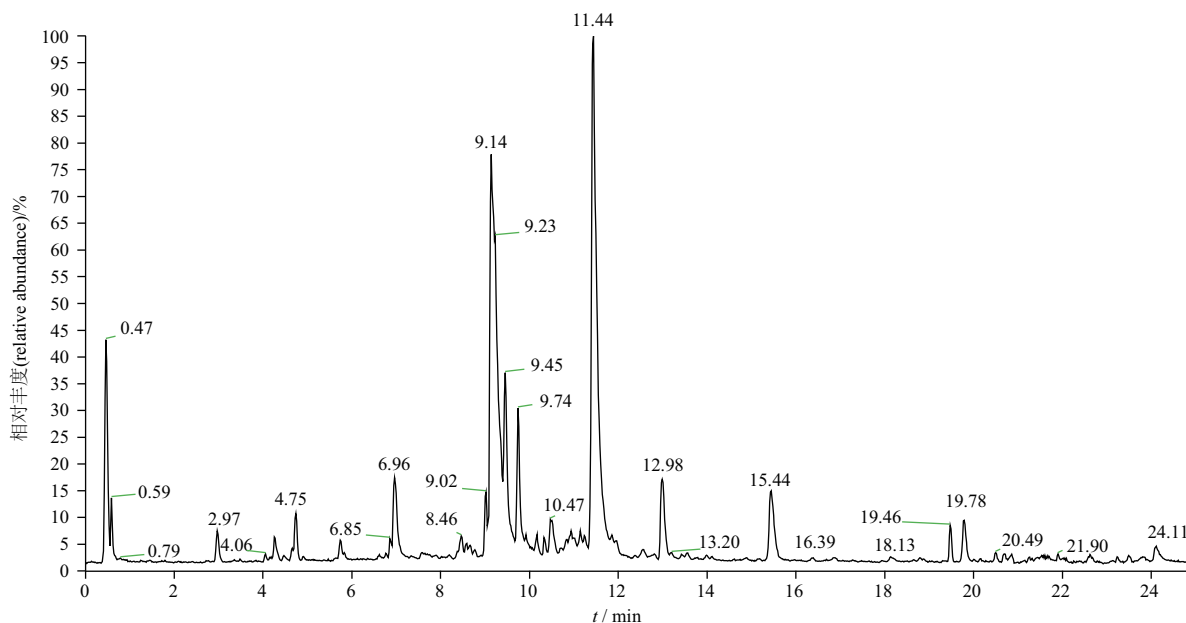


图 2 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram

2.3.3 主要化学成分质谱裂解规律 单本环取代物在负离子模式下主要以 $[M - H]^-$ 的准分子离子峰形式存在,发生裂解时,母核易出现连续丢失 CO_2 、 H_2O 等小分子。保留时间为 4.19 min 时,

根据结构和对照品二级碎片,离子鉴定化合物为苔色酸,一级质谱出现准分子离子峰为 m/z 167.0350 $[M - H]^-$,根据数据库匹配出分子式为 $C_8H_8O_4$,二级质谱中失去一分子 H_2O ,产生 m/z

149.024 6 [M - H - H₂O]⁻, 或直接失去 1 个 CO₂, 获得 *m/z* 123.045 4 [M - H - CO₂]⁻, 再失去一分子 H₂O, 得到 *m/z* 105.034 8 [M - H - CO₂ - H₂O]⁻, 其裂解途径见图 4。

表 4 共有峰成分鉴定结果

Tab. 4 Identification results of common peaks

峰号 (peak No.)	<i>t_R</i> / min	分子式 (formula)	测定值 (measured) <i>m/z</i>	理论值 (actual) <i>m/z</i>	碎片离子 (fragment ion) <i>m/z</i>	误差 (error)/ 10 ⁻⁶	名称 (compound)
4	53.551	C ₁₉ H ₁₈ O ₉	389.088 6	389.087 8	389.087 0, 345.098 6, 327.088 6, 225.040 9, 181.051 0, 163.040 4, 137.061 1	2.06	鱗片衣酸(squamatic acid)
6	67.411	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.093 8	373.092 9	373.093 2, 181.051 1, 163.040 5, 137.061 2, 119.050 5	2.41	羊角衣酸(baeomycesic acid)
7	75.222	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	345.098 9	345.098 0	345.098 9, 181.051 2, 163.040 6, 137.061 2, 119.050 7	2.61	thamniadepsides B
8	84.698	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	359.114 7	359.113 6	359.114 9, 181.051 2, 163.040 5, 137.061 2, 119.050 6	3.07	坝巴酸(barbatinic acid)



图 3 共有峰峰 4(A)、峰 6(B)、峰 7(C) 及峰 8(D) 的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of common peak 4(A), peak 6(B), peak 7(C), and peak 8(D)

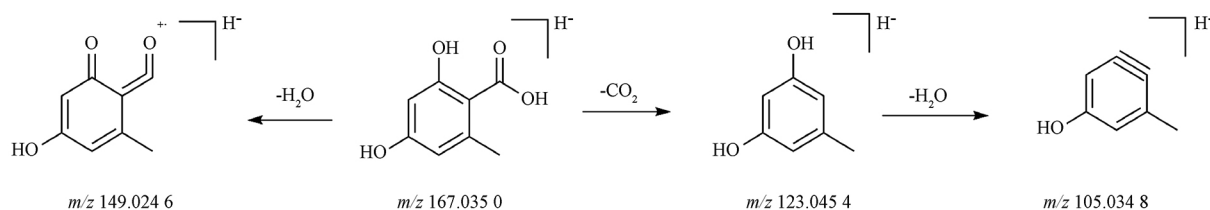


图 4 苔色酸的裂解规律图

Fig. 4 Mass spectrometric fragmentation pattern of β -resorcylic acid

缩酚酸类化合物发生裂解时,一方面母核易出现 CO、CO₂、CH₃等中性分子的连续丢失或组合丢失,另一方面通过打破八元环过渡态氢重排的酯键与水杨酸部分 A 和苯酚部分 B 进行竞争,断裂为 A 和 B 2 个部分,再由 A 或 B 部分连续丢失 CH₃、CO、CO₂或组合丢失^[13]。以对照品黑茶渍素为例,其保留时间为 16.59 min 时,一级质谱出现准分子离子峰 m/z 373.094 3 [M - H]⁻,经计算分子式为 C₁₉H₁₈O₈, m/z 195.067 3 [M - H - C₉H₇O₄]⁻ 为相应酯键断裂的

B 部分, m/z 181.051 0 [M - H - C₉H₇O₄ - CH₃]⁻、 m/z 163.040 8 [M - H - C₉H₇O₄ - CH₃ - H₂O]⁻ 和 m/z 119.050 5 [M - H - C₉H₇O₄ - CH₃ - H₂O - CO₂]⁻ 则分别是由 B 部分失去 CH₃、H₂O 和 CO₂所形成的;而 m/z 177.019 8 [M - H - C₁₀H₁₁O₄ - H₂O]⁻、 m/z 133.029 9 [M - H - C₁₀H₁₁O₄ - H₂O - CO₂]⁻ 和 m/z 105.035 0 [M - H - C₁₀H₁₁O₄ - H₂O - CHO]⁻ 则分别是由相应酯键断裂的 A 部分连续失去 H₂O、CO₂和 CHO 所形成的^[14-15],其裂解途径见图 5。

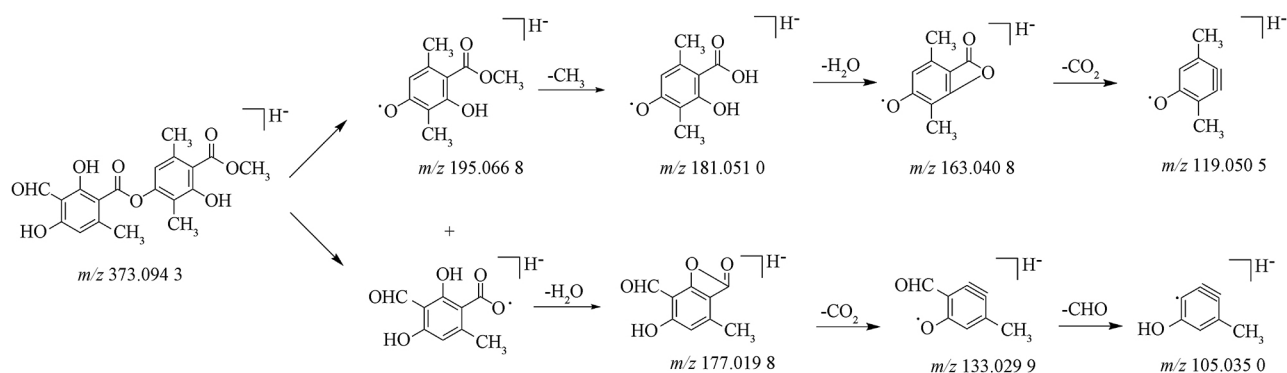


图 5 黑茶渍素的裂解规律图

Fig. 5 Mass spectrometric fragmentation pattern of atranorin

二苯并呋喃类发生裂解时,一方面母核连续脱去 CH₃、CO 等中性小分子,另一方面该类化合物在高温高热环境中易发生逆 Diels - Alder (RDA) 重排,多形成 m/z 84 (C₄H₄O₂) 和 m/z 112 (C₅H₄O₃) 特征片段^[16]。保留时间为 15.98 min 时,根据结构和对照品二级碎片离子鉴定其为松萝酸^[16-17],一级质谱出现准分子离子峰 m/z 343.083 3 [M - H]⁻,计算出分子式为 C₁₈H₁₆O₇,在二级质谱中失去 1 个 CH₃ 得到 m/z 328.060 0 [M - H - CH₃]⁻、再连续失去 2 个 CH₃、CH₂ 得到 m/z 313.036 8 [M - H - 2CH₃]⁻ 与 m/z 299.093 6 [M - H - 2CH₃ - CH₂]⁻;或直接发生 RDA 重排得到 m/z 259.061 9 [M - H - C₄H₄O₂]⁻ 和 m/z 231.067 0 [M - H - C₅H₄O₃]⁻,其裂解途径见图 6。

3 讨论

3.1 提取溶剂及方法的选择

本实验对不同提取溶剂(甲醇、乙醇、三氯甲烷)进行考察时,发现甲醇作为提取溶剂时,得到的峰最多;继续考察不同比例(50%、60%、70%、80%、100%)的甲醇,结果以 100% 甲醇为提取溶剂时,仪

器响应较高,图谱基线较为平稳,得到峰较多,故选择 100% 甲醇作为提取溶剂。分别考察超声法和回流法 2 种提取方法,发现大部分成分的提取效率相当,仅个别成分如 4 号峰加热回流法相比超声提取响应值稍大,综合考虑超声提取更加简便,因此选择了超声法。

3.2 检测波长及流动相的选择

建立指纹图谱时先采用全波长(190 ~ 400 nm)对供试品溶液进行扫描,发现在 254 nm 下各色谱峰均得到清晰的表达,因此选择 254 nm 作为太白山茶的检测波长。前期也比较了甲醇 - 水、甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液、甲醇 - 0.1% 甲酸水溶液、乙腈 - 水、乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液和乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液等不同流动相系统。结果发现,以甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各成分的色谱峰分离效果较好,而在 UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS 分析时则以乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各成分的色谱峰形较好。因此在指纹图谱建立及 UHPLC - Q Exactive Focus MS/MS 分析时分别选择这 2 种流动相进行洗脱。

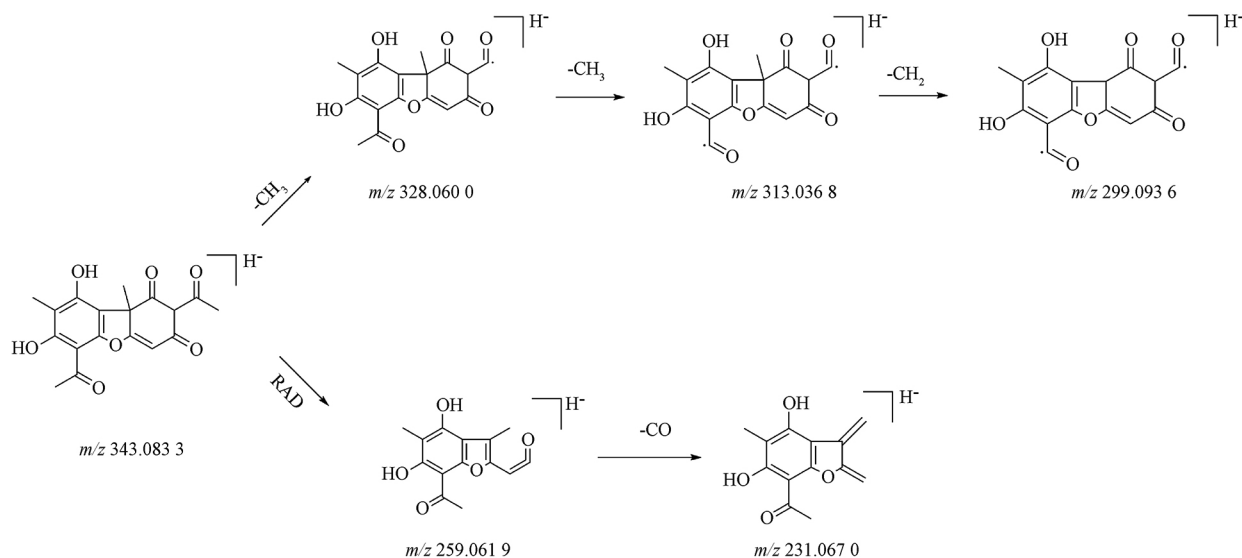


图6 松萝酸的裂解规律图

Fig. 6 Mass spectrometric fragmentation pattern of usnic acid

3.3 结果分析

本实验建立太白茶指纹图谱,确定了8个共有峰;对10批样品指纹图谱的相似度进行评价,结果表明与对照指纹图谱有良好的相似性。根据色谱峰的分离情况,4号色谱峰分离度较好,峰面积相对较大,且位置居中,故选择该峰为参照峰。采用UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析鉴别共有峰时,分别以正负离子模式对各成分进行检测,发现各成分均在负离子模式下响应较高,这可能与太白茶中的主要成分为地衣酸类有关,故最终采用负离子模式进行样品测定。

对太白茶中特征性成分的离子碎片信息进行采集分析,结合文献及数据分析,指认了其指纹图谱中4个成分。由于太白茶中主要成分的对照品比较难获得,通过制备液相色谱及质谱技术所得化合物的碎片离子峰对4个共有峰进行了推测,尚有4个共有峰未鉴定,后续研究可进一步通过制备色谱分离纯化后对其结构进行确定。

综上所述,本研究建立的太白茶药材HPLC指纹图谱,同时采用UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS技术,对指纹图谱中的4个共有特征峰进行了鉴定分析,为太白茶药材的质量评价提供了依据,也为后续太白茶药效物质基础研究提供了参考。

参考文献

[1] ONUT BI, BENJAMIN M, SCOFIELD DG, et al. Sharing of pho-

tobionts in sympatric populations of *Thamnolia* and *Cetraria* lichens: evidence from high-throughput sequencing[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4406

[2] 杨美霞,王立松,王欣宇. 中国地茶属地衣的分类及地理分布研究[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(2):133

YANG MX, WANG LS, WANG XY. Taxonomic and geographic study on the lichen genus *Thamnolia* from China[J]. *Plant Sci J*, 2015, 33(2):133

[3] 四川省藏药材标准2014年版[S]. 2014: 247
Standard of Chinese Medicinal Materials in Sichuan 2014[S]. 2014: 247

[4] 谢宗万. 全国中草药汇编(下)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 527

XIE ZW. The Compilation of National Chinese Herbal Medicine (Vol II) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978: 527

[5] 苗明三,孙玉信,王晓田. 中药大辞典[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2017: 730

MIAO MS, SUN YX, WANG XT. Dictionary of Traditional Chinese Medicine[M]. Taiyuan: Shanxi Science & Technology Publishing House, 2017: 730

[6] 陕西省药材标准2015年版[S]. 2015: 130
Standard of Chinese Medicinal Materials in Shaanxi 2015[S]. 2015: 130

[7] 任国媛,郭启新,王静,等. 雪地茶甲醇提取物体外抑菌活性及其稳定性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1):147

REN GY, GUO QX, WANG J, et al. Antibacterial activity and stability of methanol extract from *Thamnolia subuliformis* in vitro [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(1):147

[8] DENG YX, ZHAO SY, BIAN YG, et al. Anti-inflammatory ac-

- tivity of polysaccharide isolated from *Thamnia subuliformis*[J]. *J Donghua Univ(Eng Ed)*, 2017, 34(5):641
- [9] YU HY, SHEN X, LIU D, *et al.* The protective effects of β -sitosterol and vermicularin from *Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging *in vitro*[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2019, 91(4):e20181088
- [10] YU X, CAI Y, ZHAO X, *et al.* Investigation of the chemical structure of anti-amyloidogenic constituents extracted from *Thamnia vermicularis*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115059
- [11] LI C, GUO XD, LEI M, *et al.* *Thamnia vermicularis* extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both A β and Tau pathologies[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(1):9
- [12] CHOI RY, HAM JR, YEO J, *et al.* Anti-obesity property of lichen *Thamnia vermicularis* extract in 3T3-L1 cells and diet-induced obese mice[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22(4):285
- [13] SALGADO F, ALBORNOZ L, CORTÉZ C, *et al.* Secondary metabolite profiling of species of the genus usnea by UHPLC-ESI-OT-MS-MS[J]. *Molecules*, 2017, 23(1):54
- [14] KUMAR K, SIVA B, SARMA VUM, *et al.* UPLC-MS/MS quantitative analysis and structural fragmentation study of five *Parmotrema* lichens from the eastern ghats[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 45
- [15] LE PP, LE LAC, LEGOUIN B, *et al.* In situ DART-MS as a versatile and rapid dereplication tool in lichenology: chemical fingerprinting of *Ophioparma ventosa*[J]. *Phytochem Anal*, 2016, 27(6):354
- [16] JIN Y, MA Y, XIE W, *et al.* UHPLC-Q-TOF-MS/MS-oriented characteristic components dataset and multivariate statistical techniques for the holistic quality control of *Usnea*[J]. *RSC Adv*, 2018, 8(28):15487
- [17] 马英华, 田婷婷, 解伟伟, 等. 采用 UHPLC-Triple-TOF-MS 法鉴定松萝主要酚酸类化学成分[J]. *中草药*, 2016, 47(3):392
- MA YH, TIAN TT, XIE WW, *et al.* Major phenolic acids in *Usnea Filum* by UHPLC-Triple-TOF-MS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(3):392

(本文于 2024 年 3 月 9 日修改回)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。