

UPLC – QQQ MS/MS 法同时测定松针中的 14 个成分*

王信¹, 李彬¹, 辛安琪¹, 王梦凡¹, 马趣环², 刘兴国³, 石晓峰^{2**}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 739946; 2. 甘肃省医学科学研究院, 兰州 730000; 3. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730000)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱串联质谱(UPLC – QQQ MS/MS)同时测定不同品种和产地的松针中 14 个成分的含量测定方法。方法: 运用 UPLC – QQQ MS/MS 技术, 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 柱温 35 °C, 以 0.1% 的甲酸 – 乙腈溶液(A)和 0.1% 的甲酸 – 水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL · min⁻¹; 电喷雾离子源, 多反应监测模式。各成分的监测离子对分别为 *m/z* 125.0/79.1(没食子酸)、*m/z* 105.1/77.2(对羟基苯甲醇)、*m/z* 109.1/91.1(原儿茶酸)、*m/z* 93.1/65.2(对羟基苯甲酸)、*m/z* 190.9/85.2(绿原酸)、*m/z* 151.8/108.2(香草酸)、*m/z* 135.1/89.2(咖啡酸)、*m/z* 167.0/122.9(丁香酸)、*m/z* 119.2/93.2(对香豆酸)、*m/z* 208.1/193.0(芥子酸)、*m/z* 82.0/77.2(苯甲酸)、*m/z* 91.3/65.3(苯乙酸)、*m/z* 93.1/65.2(水杨酸)、*m/z* 103.2/77.2(肉桂酸)。结果: 所测定的 12 份松针样品中各成分含量范围分别为没食子酸 0.34 ~ 3.42 mg · g⁻¹、对羟基苯甲醇 1.32 ~ 9.76 mg · g⁻¹、原儿茶酸 0 ~ 6.32 mg · g⁻¹、对羟基苯甲酸 0 ~ 19.06 mg · g⁻¹、绿原酸 0 ~ 18.78 mg · g⁻¹、香草酸 0.16 ~ 3.81 mg · g⁻¹、咖啡酸 0 ~ 6.68 mg · g⁻¹、丁香酸 0.09 ~ 4.64 mg · g⁻¹、对香豆酸 0.10 ~ 9.90 mg · g⁻¹、芥子酸 0.98 ~ 19.01 mg · g⁻¹、苯甲酸 1.28 ~ 18.21 mg · g⁻¹、苯乙酸 0.95 ~ 20.72 mg · g⁻¹、水杨酸 0 ~ 3.25 mg · g⁻¹、肉桂酸 0 ~ 0.27 mg · g⁻¹, 各成分在测试范围内线性关系良好, 平均加样回收率均在 98.0% ~ 101.7%, 14 个成分定量限介于 0.01 ~ 0.4 ng。结论: 本方法适用于常见松针中酚酸类成分的含量测定, 其中对羟基苯甲醇、绿原酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸 9 个成分为首次在松针中发现和测定, 可为松针中多种酚酸类成分含量测定提供参考。

关键词: 樟子松; 油松; 华山松; 白皮松; 雪松; 落叶松; 酚酸类成分; 三重四极杆液质联用; 同时测定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)10 – 1713 – 09

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024 – 0247

Simultaneous determination of 14 components in pine needles by using UPLC – QQQ MS/MS*

WANG Xin¹, LI Bin¹, XIN An – qi¹, WANG Meng – fan¹,
MA Qu – huan², LIU Xing – guo³, SHI Xiao – feng^{2**}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 739946, China; 2. Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Institute of Drug Control, Lanzhou 730000, China)

Abstract Objective: To establish a content determination method for 14 components in pine needles of different

* 甘肃省科技计划资助项目(23CXGA0038); 兰州市科技局指导性项目(2020 – ZD – 125)

** 通信作者 Tel: (0931) 2302664; E – mail: shixiaofeng2005@sina.com

第一作者 Tel: (0931) 2306684; E – mail: 8138762@qq.com

varieties and origins simultaneously by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-QQQ MS/MS). **Methods:** The UPLC-QQQ MS/MS was adopted. A Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) chromatographic column was used, with a column temperature of 35 °C. The mobile phase was a mixture of 0.1% formic acid-acetonitrile solution (A) and 0.1% formic acid-aqueous solution (B) for gradient elution, with a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. Electrospray ionization was used, and multiple reaction monitoring mode was employed. The monitored ion pairs of each component were *m/z* 125.0/79.1 (gallic acid), *m/z* 105.1/77.2 (*p*-hydroxybenzyl alcohol), *m/z* 109.1/91.1 (protocatechuic acid), *m/z* 93.1/65.2 (*p*-hydroxybenzoic acid), *m/z* 190.9/85.2 (chlorogenic acid), *m/z* 151.8/108.2 (vanillic acid), *m/z* 135.1/89.2 (caffeic acid), *m/z* 167.0/122.9 (syringic acid), *m/z* 119.2/93.2 (*p*-coumaric acid), *m/z* 208.1/193.0 (sinapic acid), *m/z* 82.0/77.2 (benzoic acid), *m/z* 91.3/65.3 (phenylacetic acid), *m/z* 93.1/65.2 (salicylic acid), and *m/z* 103.2/77.2 (cinnamic acid). **Results:** The content ranges of each component in the 12 determined pine needle samples were as follows: gallic acid 0.34–3.42 mg · g⁻¹, *p*-hydroxybenzyl alcohol 1.32–9.76 mg · g⁻¹, protocatechuic acid 0–6.32 mg · g⁻¹, *p*-hydroxybenzoic acid 0–19.06 mg · g⁻¹, chlorogenic acid 0–18.78 mg · g⁻¹, vanillic acid 0.16–3.81 mg · g⁻¹, caffeic acid 0–6.68 mg · g⁻¹, syringic acid 0.09–4.64 mg · g⁻¹, *p*-coumaric acid 0.10–9.90 mg · g⁻¹, sinapic acid 0.98–19.01 mg · g⁻¹, benzoic acid 1.28–18.21 mg · g⁻¹, phenylacetic acid 0.95–20.72 mg · g⁻¹, salicylic acid 0–3.25 mg · g⁻¹, and cinnamic acid 0–0.27 mg · g⁻¹. Each component had a good linear relationship within the test range, and the average sample recovery rate was between 98.0% and 101.7%. The quantitative limits of the 14 components were between 0.01 and 0.4 ng. **Conclusion:** This method is applicable for the determination of phenolic acids in common pine needles, in which 9 compounds, including *p*-hydroxybenzyl alcohol, chlorogenic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, benzoic acid, salicylic acid, are determined for the first time in pine needles, which can provide reference for the determination of various phenolic acids in pine needles.

Keywords: *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don; *Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.; *Pinus tabuliformis* Carrière; *Pinus sylvestris* var. *mongholica* Litv.; *Pinus armandii* Franch.; *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen.; phenolic acid; UPLC-QQQ MS/MS; simultaneously determination

松针是松属植物的针状叶,在历史上被视为重要的药食同源天然产品。中医理论认为松针具有“祛风湿,调节内脏阴阳,轻身不饥,延年益寿”的作用^[1]。现代药理研究表明,松针具有抗癌抗真菌抗关节炎降血糖降血脂抗氧化防治动物疾病等作用^[2-3]。酚酸类化合物是在包括松属在内的植物中含有的天然活性物质,是主要的次生代谢产物^[4]。它广泛存在于植物的各个部位,具有显著的抗氧化^[5],抗炎^[6]和抗微生物^[7]活性。对于松针化学成分研究的报道颇多^[8-10],然而对于松针中酚酸类成分的研究相对较少,关于松针抗氧化和抑菌活性的物质基础研究较多以“总酚酸”的形式呈现,其酚酸类单体成分研究不够丰富^[11]。超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-QQQ MS/MS)技术具有高

通量,重复性好,适合定量分析等特点,目前用于定性、定量分析已较为普及,是含量测定研究的常用技术^[12-13],适合用于解决酚酸类成分在松针中含量差异大且易产生干扰等分析困难。本文在前期对松针酚酸类成分单体分离、鉴定的基础上,参考了相关文献^[14-16],运用UPLC-QQQ MS/MS法,进行酚酸类成分的含量表征方法的研究,为该类药物进一步精准研究和开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CPA225D 十万分之一电子分析天平(赛多利斯科技有限公司),安捷伦 1290 液相色谱系统-安捷伦 6460-triple quad LC/MS 三重四极杆质谱分析系统(安捷伦科技有限公司),HK3310LHC 型超声波清

洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试验材料

对照品没食子酸(批号 C17D10C105977, 含量 $\geq 98\%$),由上海源叶生物科技有限公司提供;苯甲酸(批号 106419-202003, 含量 $\geq 99.90\%$),由中国食品药品检定研究院提供;对羟基苯甲醇(批号 MUST-22111517, 含量 $\geq 99.88\%$)、原儿茶酸(批号 MUST-23083012, 含量 $\geq 99.99\%$)、对羟基苯甲酸(批号 MUST-23070408, 含量 $\geq 99.97\%$)、绿原酸(批号 MUST-22111711, 含量 $\geq 99.82\%$)、香草酸(批号 MUST-23012113, 含量 $\geq 99.62\%$)、咖啡酸(批号 MUST-23061118, 含量 $\geq 99.82\%$)、丁香酸(批号 MUST-23033115, 含量 $\geq 99.81\%$)、对香豆酸(批号 MUST-23033113, 含量 $\geq 99.99\%$)、芥子酸(批号 MUST-22110218, 含量 $\geq 99.94\%$)、苯乙酸(批号 MUST-23092508, 含量 $\geq 98.56\%$)、水杨酸

(批号 MUST-23040202, 含量 $\geq 99.91\%$)和肉桂酸(批号 MUST-23071910, 含量 $\geq 99.99\%$),均由武汉曼斯特生物科技有限公司提供。试验中所用松针均采自甘肃省兰州市和天水市,其品种由甘肃省医学科学院药物研究所石晓峰研究员鉴定,分别为雪松(*Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don)、白皮松(*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.)、油松(*Pinus tabulaeformis* Carrière)、樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongholica* Litv.)、华山松(*Pinus armandii* Franch.)和落叶松(*Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen.)的针叶(表1)。乙腈(批号 Lichrosolv. JA087530, 默克公司)、甲醇(批号 Supelco. L1084107 021, 默克公司)、甲酸(批号 YRJGH-WS F0513, TCI 上海化成工业发展有限公司),均为色谱纯;实验用水为自制超纯水(Milipore, 默克公司);0.22 μm 微孔滤膜(批号 20230629 上海兴亚净化材料厂)。

表1 样品来源及编号

Tab. 1 Sample information

样品编号 (sample No.)	样品名称 (sample name)	采集地点 (collection site)	样品编号 (sample No.)	样品名称 (sample name)	采集地点 (collection site)
S1	兰州落叶松 (<i>Larix gmelinii</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)	S7	兰州樟子松 (<i>Pinus sylvestris</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)
S2	天水落叶松 (<i>Larix gmelinii</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)	S8	天水樟子松 (<i>Pinus sylvestris</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)
S3	兰州油松 (<i>Pinus tabulaeformis</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)	S9	兰州华山松 (<i>Pinus armandii</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)
S4	天水油松 (<i>Pinus tabulaeformis</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)	S10	天水华山松 (<i>Pinus armandii</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)
S5	兰州白皮松 (<i>Pinus bungeana</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)	S11	兰州雪松 (<i>Cedrus deodara</i> from Lanzhou)	兰州市植物园 (Lanzhou Botanical Park)
S6	天水白皮松 (<i>Pinus bungeana</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)	S12	天水雪松 (<i>Cedrus deodara</i> from Tianshui)	天水市小陇山 (Xiaolong Mountain in Tianshui)

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,以 0.1% 的甲酸-乙腈(A)及 0.1% 的甲酸-水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0.00 ~ 8.00 min, 95% B \rightarrow 87% B; 8.00 ~ 12.00 min, 87% B \rightarrow 77% B; 12.00 ~ 21.00 min, 77% B \rightarrow 65% B; 21.00 ~ 26.00 min, 65% B \rightarrow 0% B; 26.01 min, 95% B), 流速 0.2 mL \cdot min $^{-1}$, 进样量 2 μL 。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(AJS ESI),

正、负离子扫描模式,多反应监测模式(MRM);离子化电压 5 500、-4 500 V;离子源温度 450 $^{\circ}\text{C}$,喷雾气为氮气,压力 0.38 MPa;辅助加热气为 N_2 , 压力 0.38 MPa;气帘气为氮气,压力 0.21 MPa。质谱分析条件见表 2,MRM 提取的离子流图见图 1-B。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品储备液 精密称取肉桂酸对照品 17.7 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇水 30 mL 溶解并定容至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 0.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,精密加入对照品没食子酸 2.12 mg、对羟基苯甲醇

表 2 质谱分析的条件
Tab. 2 Parameter setting for mass analysis

成分 (component)	保留时间 (retention time)/ min	母离子 (parent ion) m/z	去簇电压 (fragmentor)/ V	子离子 (daughter ion) m/z	碰撞能量 (collision energy)/eV	扫描模式 (scan mode)
没食子酸(gallic acid)	2.548	169.00	90	* 125.0[-C ₆ H ₅ O ₃] ⁻ 79.1[-C ₅ H ₃ O] ⁻	15 25	负离子模式 (negative ion mode)
对羟基苯甲醇(<i>p</i> -hydroxybenzyl alcohol)	3.365	122.9	80	* 105.1[-C ₇ H ₅ O] ⁺ 77.2[-C ₆ H ₅] ⁺	10 15	正离子模式 (positive ion mode)
原儿茶酸(proto catechuic acid)	4.489	153.00	90	* 109.1[-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ 91.1[-C ₆ H ₃ O] ⁻	15 25	负离子模式 (negative ion mode)
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	7.496	137.00	80	* 93.1[-C ₆ H ₅ O] ⁻ 65.2[-C ₅ H ₅] ⁻	15 30	负离子模式 (negative ion mode)
绿原酸(chlorogenic acid)	8.217	353.15	140	* 190.9[-C ₇ H ₁₀ O ₆] ⁻ 85.2[-C ₄ H ₅ O ₂] ⁻	15 46	负离子模式 (negative ion mode)
香草酸(vanillic acid)	9.043	166.90	80	* 151.8[-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ 108.2[-C ₆ H ₄ O ₂] ⁻	10 16	负离子模式 (negative ion mode)
咖啡酸(caffeic acid)	9.496	179.0	80	* 135.1[-C ₈ H ₆ O ₂] ⁻ 89.2[-C ₄ H ₉ O ₂] ⁻	15 35	负离子模式 (negative ion mode)
丁香酸(syringic acid)	9.800	197.0	80	* 122.9[-C ₇ H ₇ O ₂] ⁻ 167.0[-C ₈ H ₇ O ₄] ⁻	22 18	负离子模式 (negative ion mode)
对香豆酸(<i>p</i> -coumaric acid)	12.713	163.0	80	* 119.2[-C ₈ H ₆ O] ⁻ 93.2[-C ₆ H ₅ O] ⁻	24 38	负离子模式 (negative ion mode)
芥子酸(sinapic acid)	14.226	223.0	80	* 208.1[-C ₁₀ H ₉ O ₅] ⁻ 193.0[-C ₁₀ H ₉ O ₄] ⁻	15 22	负离子模式 (negative ion mode)
苯甲酸(benzoic acid)	15.426	122.12	65	* 82.0[-C ₅ H ₆ O] ⁻ 77.2[-C ₆ H ₅] ⁻	15 26	负离子模式 (negative ion mode)
苯乙酸(phenylacetic acid)	16.652	135.0	80	* 91.3[-C ₇ H ₇] ⁺ 65.3[-C ₅ H ₅] ⁺	15 40	正离子模式 (positive ion mode)
水杨酸(salicylic acid)	17.491	137.0	80	* 93.1[-C ₆ H ₅ O] ⁻ 65.2[-C ₅ H ₅] ⁻	14 30	负离子模式 (negative ion mode)
肉桂酸(cinnamic acid)	21.261	147.0	80	* 103.2[-C ₈ H ₇] ⁻ 77.2[-C ₆ H ₅] ⁻	10 20	负离子模式 (negative ion mode)

注(note): *. 定量离子碎片(quantitative ion fragments)

5.37 mg、原儿茶酸 3.02 mg、对羟基苯甲酸 11.48 mg、绿原酸 10.60 mg、香草酸 3.43 mg、咖啡酸 3.49 mg、丁香酸 3.16 mg、对香豆酸 5.30 mg、芥子酸 11.15 mg、苯甲酸 10.12 mg、苯乙酸 10.90 mg、水杨酸 1.88 mg, 加入 50% 甲醇水 40 mL, 超声 5 min 使充分溶解, 取出, 静置至室温, 加入 50% 甲醇水定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为混合对照品储备液。

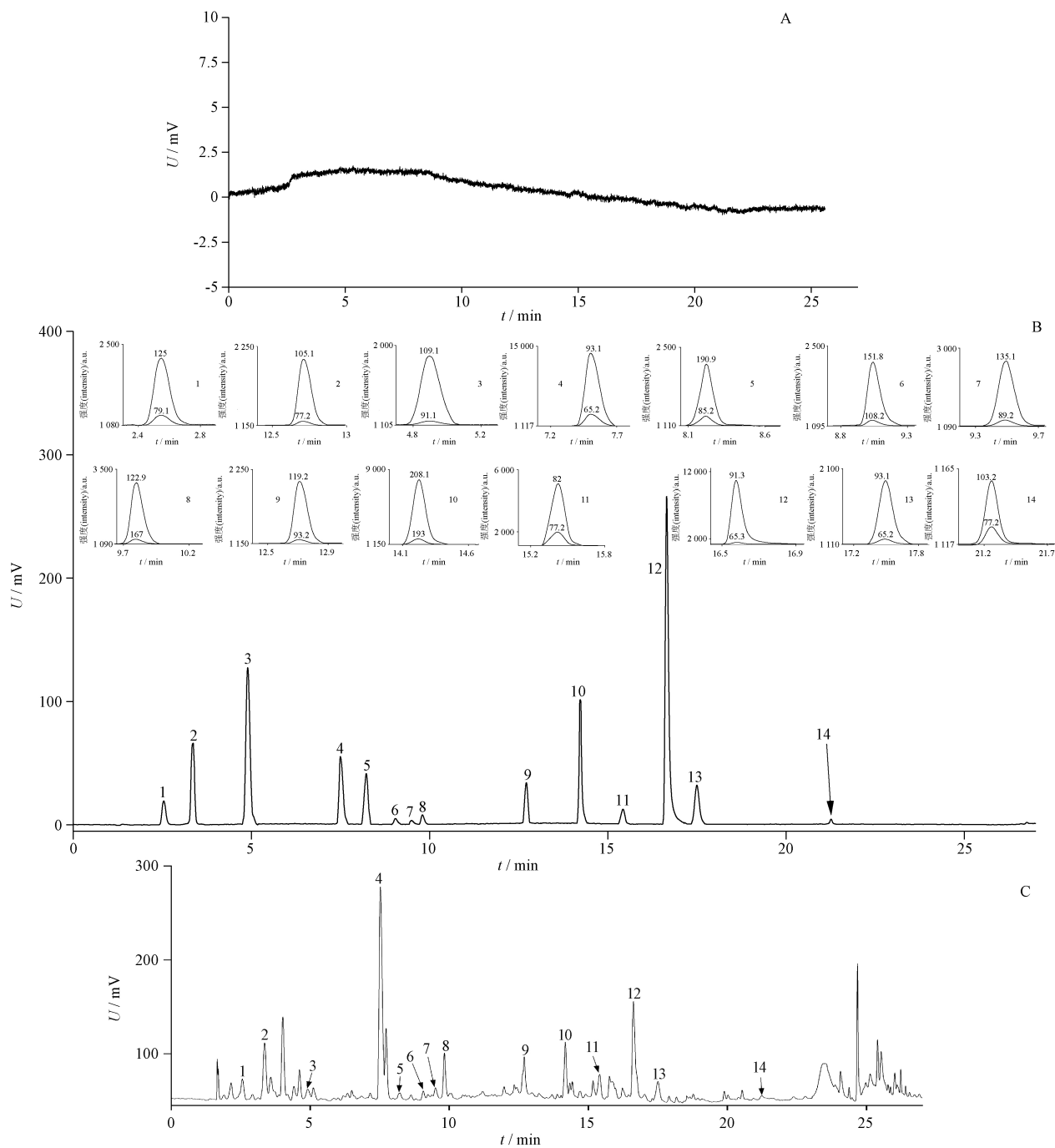
2.2.2 供试品溶液 称取松针样品 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶内, 加入 50% 甲醇水 50 mL, 精密称量, 超声(40 kHz, 160 W, 不加热) 提取 15 min, 取出后静置至室温, 再称量, 用 50% 甲醇水补足减失的量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇水定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

精密吸取混合对照品

储备液 5 μL, 置于 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2 μL, 注入 UPLC-QQQ MS/MS 仪进行测定; 并以上述稀释后的溶液浓度为最低值, 采用逐渐增加混合对照品储备液吸取体积的方式配制浓度递增的混合对照品溶液进行测定, 记录各成分定量限, 结果显示含量测定和方法学验证中所测定浓度的各物质信噪比均 > 10:1, 系统灵敏度良好。在“2.1”项色谱-质谱条件下, 按进样量 2 μL 计算, 没食子酸、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸、肉桂酸的定量限依次约为 0.1、0.2、0.03、0.2、0.05、0.1、0.4、0.3、0.1、0.3、0.2、0.2、0.06 和 0.01 ng; 另吸取 50% 甲醇水作为空白溶液进行分析, 发现空白溶液对以上 14 个成分的测定无干扰(图 1)。



1. 没食子酸(gallic acid) 2. 对羟基苯甲醇(*p*-hydroxybenzyl alcohol) 3. 原儿茶酸(protocatechuic acid) 4. 对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)
 5. 绿原酸(chlorogenic acid) 6. 香草酸(vanillic acid) 7. 咖啡酸(caffeic acid) 8. 丁香酸(syringic acid) 9. 对香豆酸(*p*-coumaric acid) 10. 芥子酸(sinapic acid) 11. 苯甲酸(benzoic acid) 12. 苯乙酸(phenylacetic acid) 13. 水杨酸(salicylic acid) 14. 肉桂酸(*trans*-cinnamic acid)
 A. 空白溶剂(matrix) B. 混合对照品(mixed reference substances) C. 样品 S1(sample S1)

图 1 离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatograms

2.3.2 线性与范围 精密吸取混合对照品储备液 20.0、10.0、5.0、2.5 和 1.0 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 静

置, 即得系列混合对照品稀释液。取混合对照品储备液及系列混合对照品稀释液, 分别按“2.1”项下色谱-质谱条件进行分析, 以对照品进样量

为横坐标,响应面积为纵坐标,绘制标准曲线并计算回归方程,见表3。

表3 14个成分的线性范围、回归方程以及相关系数

Tab. 3 Linear range, regression equation and correlation coefficient of 14 components

成分(component)	线性范围(linear range)/ng	回归方程(regression equation)	相关系数(correlation coefficient)
没食子酸(gallic acid)	84.80~0.85	$Y = 5\ 866X + 10.309\ 6$	0.999 8
对羟基苯甲醇(<i>p</i> -hydroxybenzyl alcohol)	214.80~2.15	$Y = 73\ 435X - 32.999$	0.999 9
原儿茶酸(protocatechuic acid)	120.64~1.21	$Y = 19\ 782X + 1.510\ 4$	0.999 8
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	459.20~4.59	$Y = 38\ 329X - 249.23$	0.999 7
绿原酸(chlorogenic acid)	424.0~4.24	$Y = 139\ 250X - 211.82$	0.999 9
香草酸(vanillic acid)	137.20~1.37	$Y = 41\ 022X - 205.815$	0.999 9
咖啡酸(caffeic acid)	139.48~1.39	$Y = 45\ 265X - 388.24$	0.999 7
丁香酸(syringic acid)	126.40~1.26	$Y = 24\ 056X + 34.514$	0.999 8
对香豆酸(<i>p</i> -coumaric acid)	212.16~2.12	$Y = 54\ 634X - 264.51$	0.999 7
芥子酸(sinapic acid)	446.0~4.46	$Y = 158\ 448X - 1\ 001.9$	0.999 8
苯甲酸(benzoic acid)	404.8~4.05	$Y = 120\ 417X + 476.7$	0.999 9
苯乙酸(phenylacetic acid)	435.84~4.36	$Y = 118\ 439X + 69.867$	0.999 9
水杨酸(salicylic acid)	75.20~0.75	$Y = 25\ 161X - 118.4$	0.999 8
肉桂酸(cinnamic acid)	7.07~0.07	$Y = 4\ 205.3X + 17.022$	0.999 7

2.3.3 稳定性实验 取“2.2.2”项下供试品溶液,于室温静置,分别于0、1、2、4、8、16、24 h精密吸取2 μL ,按“2.1”色谱-质谱条件进行测定,测得不同时间点没食子酸、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸、肉桂酸峰面积的RSD分别为0.63%、0.25%、0.44%、0.41%、0.29%、0.13%、0.75%、0.36%、0.60%、0.37%、0.84%、0.22%、0.58%、0.39%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 分别精密称取松针样品(S1)0.50 g,共6份,分别置于具塞锥形瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下条件进样测定,结果没食子酸、对羟基苯甲醇、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸、肉桂酸平均含量分别为3.42、6.82、2.13、16.15、3.39、1.13、0.17、0.53、0.85、3.26、5.87、6.45、2.70、0.06 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为0.58%、2.0%、1.3%、0.25%、2.1%、1.5%、1.6%、1.0%、1.4%、1.5%、2.1%、0.59%、1.8%和1.4%,表明本方法重复性良好。

2.3.5 精密度试验 精密吸取对照品储备液5 mL,加入50 mL量瓶中,用50%甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱-质谱条件连续测定6次,结

果14个成分响应面积的RSD分别为没食子酸0.79%、对羟基苯甲醇1.4%、原儿茶酸1.6%、对羟基苯甲酸2.1%、绿原酸1.5%、香草酸1.2%、咖啡酸2.3%、丁香酸1.3%、对香豆酸0.43%、芥子酸1.3%、苯甲酸0.87%、苯乙酸1.0%、水杨酸1.5%和肉桂酸2.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 加样回收率试验 分别精密称取样品(S1)9份,每份0.2 g。每组3份,分别加入低、中、高3种浓度的对照品溶液,使加入量分别为样品中各成分含有量的0.8、1.0、1.2倍,按照“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱-质谱条件进行测定。计算加样回收率,结果见表4。

2.4 含量测定

精密吸取对照品储备液5 mL,加入50 mL容量瓶中,用50%甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液2 μL ,按“2.1”项下色谱-质谱条件进行分析,采用正/负离子扫描模式,以定量离子的响应面积代入回归方程计算,得到各松针中对应成分的含量,见表5。

3 结论与讨论

本研究考查了纯水、纯甲醇、30%甲醇溶液、50%甲醇溶液、70%甲醇溶液以及纯乙醇、50%乙醇溶液的提取效果,发现纯水不能完全提取出所测成分,特别是苯乙酸、水杨酸等成分影响较大;纯水、

表 4 加样回收率测定结果

Tab. 4 Determination results of recovery rate

成分 (component)	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
没食子酸(gallic acid)	0.684	0.442	1.114	97.3	2.7
	0.684	0.680	1.376	101.8	
	0.684	0.830	1.490	97.1	
对羟基苯甲醇(<i>p</i> -hydroxybenzyl alcohol)	1.364	1.070	2.462	102.6	2.7
	1.364	1.380	2.772	102.1	
	1.364	1.636	2.962	97.7	
原儿茶酸(protocatechuic acid)	0.428	0.342	0.776	101.9	1.9
	0.428	0.428	0.866	102.5	
	0.428	0.514	0.936	98.9	
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	3.252	2.644	5.816	96.9	2.8
	3.252	3.260	6.522	100.3	
	3.252	4.164	7.516	102.4	
绿原酸(chlorogenic acid)	0.678	0.516	1.182	97.7	3.0
	0.678	0.708	1.412	103.6	
	0.678	0.838	1.524	101.0	
香草酸(vanillic acid)	0.227	0.182	0.404	97.4	2.6
	0.227	0.220	0.452	102.4	
	0.227	0.252	0.482	101.3	
咖啡酸(caffeic acid)	0.034	0.026	0.059	96.3	2.8
	0.034	0.034	0.066	96.6	
	0.034	0.040	0.074	101.1	
丁香酸(syringic acid)	0.106	0.088	0.194	99.9	1.7
	0.106	0.120	0.228	101.9	
	0.106	0.130	0.240	103.3	
对香豆酸(<i>p</i> -coumaric acid)	0.175	0.144	0.320	100.8	2.3
	0.175	0.174	0.344	97.2	
	0.175	0.210	0.378	96.8	
芥子酸(sinapic acid)	0.652	0.530	1.190	101.5	2.7
	0.652	0.662	1.294	97.0	
	0.652	0.790	1.456	101.8	
苯甲酸(benzoic acid)	1.176	0.918	2.096	100.2	0.85
	1.176	1.088	2.250	98.7	
	1.176	1.412	2.590	100.2	
苯乙酸(phenylacetic acid)	1.293	1.034	2.310	98.4	0.56
	1.293	1.292	2.574	99.2	
	1.293	1.574	2.858	99.5	
水杨酸(salicylic acid)	0.543	0.412	0.950	98.9	1.9
	0.543	0.558	1.104	100.6	
	0.543	0.664	1.186	96.9	
肉桂酸(cinnamic acid)	0.012	0.010	0.022	102.3	2.6
	0.012	0.012	0.024	98.6	
	0.012	0.014	0.026	97.4	

表 5 不同品种松针含量测定结果

Tab. 5 Results of determination of different kinds of pine needles

成分 (component)	含量(content)/(mg·g ⁻¹)											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
没食子酸(gallic acid)	3.42	0.34	0.92	1.01	0.77	0.66	0.86	0.63	1.43	1.19	1.20	1.52
对羟基苯甲醇(<i>p</i> -hydroxybenzyl alcohol)	6.82	2.14	2.63	4.60	4.79	4.34	2.04	1.32	4.46	9.76	2.99	3.40
原儿茶酸(protocatechuic acid)	2.14	1.23	1.98	-	1.11	1.15	0.27	0.97	0.59	0.65	5.41	6.32
对羟基苯甲酸(<i>p</i> -hydroxybenzoic acid)	16.26	8.92	-	1.22	0.27	0.35	4.86	0.45	14.17	19.06	-	2.01
绿原酸(chlorogenic acid)	3.39	9.81	18.78	12.53	9.45	9.91	1.10	4.85	-	0.06	3.97	1.11
香草酸(vanillic acid)	1.13	3.81	3.61	2.01	1.43	1.61	2.15	1.04	0.35	0.16	0.14	1.34
咖啡酸(caffeic acid)	0.17	1.17	6.68	3.69	0.90	0.59	0.48	0.56	2.19	1.29	-	-
丁香酸(syringic acid)	0.53	4.64	1.60	3.37	0.09	1.45	1.12	2.78	0.77	0.47	0.55	0.68
对香豆酸(<i>p</i> -coumaric acid)	0.87	1.52	0.87	1.11	0.20	0.10	3.22	3.78	7.94	9.90	2.64	3.44
芥子酸(sinapic acid)	3.26	3.97	3.94	19.01	2.14	0.98	6.23	4.35	16.48	9.88	16.34	9.95
苯甲酸(benzoic acid)	5.88	11.93	2.25	1.28	3.37	2.73	18.21	17.92	2.57	4.29	2.15	4.94
苯乙酸(phenylacetic acid)	6.46	2.24	1.03	2.92	1.38	0.95	2.61	3.96	2.43	4.67	10.42	20.72
水杨酸(salicylic acid)	2.71	2.29	-	0.37	0.07	0.44	3.25	0.70	-	1.16	0.51	2.03
肉桂酸(cinnamic acid)	0.06	0.10	-	-	-	-	0.10	0.27	-	0.06	-	0.06

注(note): - 在对对应样品中未检测到对应成分(the component is not detected in the sample)

纯甲醇、30% 甲醇中多糖等水溶性杂质较高,影响待测成分的分离,除杂效果不佳;70% 甲醇溶液以及纯乙醇、50% 乙醇溶液提取液中杂质较高,可能与树脂含量增高有关,这造成基线在后半段分析时间内漂移较大;综合考虑,发现 50% 甲醇作为溶剂超声提取液所测的图谱分离度较好,基线平稳,能够较好的满足分析需要,故采用 50% 甲醇作为提取溶剂。另外,实验中考查了 Waters ACQUITY UPLC HSS C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 和 Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱对样品的分离表现,发现 Agilent Eclipse Plus C₁₈ RRHD (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 柱测得的酚酸色谱峰对称性不佳,拖尾明显,Waters ACQUITY UPLC HSS C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 柱所测的各成分保留时间不稳定,受流动相中甲酸含量影响较明显,相对而言,Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱对所测成分的分离效果理想、对称性好,适合较多酚酸成分的同时测定需要,故采用 Waters ACQUITY UPLC BEN HILIC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱进行分析。

通过提取、分离、纯化、结构鉴定等工作,首先在雪松松针中得到了文中所述的 14 个单体化合物,后

续研究发现,这些成分普遍存在于各种松针中。其中对羟基苯甲醇、绿原酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、芥子酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸等 9 个物质是在松针中首次分离、和测定。这些成分以酚酸类成分为主,可能是松针发挥抗氧化和抑菌活性的部分物质基础,同时可能也是松针化感作用和胃肠道刺激作用的主要来源。因此本研究对于未来松针精准、科学的应用具有一定的参考价值。

松针作为能够抑菌和抗氧化的天然产物,在医疗保健以及食品保鲜方面广泛应用,这与其所含的酚酸类成分密切相关,所测定的松针中各酚酸类成分含量差异较为明显,6 种松针中,白皮松测得的总酚酸含量最低 (< 26 mg·g⁻¹),而华山松中测得的总酚酸含量最高 (> 43 mg·g⁻¹);与其他品种的松针相比,落叶松以水杨酸含量最高,咖啡酸含量较低为特征;油松松针以绿原酸、咖啡酸含量最高为特征;樟子松松针以苯甲酸含量最高为特征;华山松松针以对香豆酸含量最高为特征,雪松松针以苯乙酸含量最高、咖啡酸含量最低为特征;以上特征与松针的来源有关,同品种的松针因产地不同,在成分上亦产生较大差别,说明生长环境对植物的次生代谢产物含量影响同样重要;另外,对雪松、白皮松、华山松不同生长年限次生代谢产生的酚酸类成分含量与其

抑菌活性的关系进行考察,发现松针抑菌活性与酚酸的含量有关,但同时受其他因素影响,考虑到这不是本文重点讨论的内容,因此另作讨论。目前虽不能将植物种酚酸类成分的差异与生物学活性之间的联系完全阐明,然而,本文对不同松针酚酸类成分化学轮廓的描述以及未来谱效关系的建立仍具有参考价值。

作者曾用 HPLC 法对文中所述的 14 个成分进行测定,除检测波长需要按照不同成分最大吸收波长进行切换外,还需要对所测成分进一步富集,所建立的色谱条件基本与文中所述的色谱方法相同,同样能测定松针中的以上成分;然而,由于个别成分在松针中含量不高,一些酚酸峰面积相差几百倍,加之各成分检测波长相差较大,导致色谱图中这些峰的识别不够直观,含量很低的成分积分误差较为明显,检测限的建立相对困难;若采用测波长切换技术则限制了多数品牌 HPLC 之间的通用性,且较为烦琐;故使用液质联用技术对这些成分进一步分析研究,这样可以较好地解决前述问题。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1917
LI SZ. Bencao Gangmu[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 1917
- [2] BISHT A, JAIN S, MISRA A, et al. *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G. Don: a review of traditional use, phytochemical composition and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 11(28): 1
- [3] 陈子聿, 乔小涵, 陈金鹏, 等. 松针化学成分、药理作用及其临床应用研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(24): 7941
CHEN ZY, QIAO XH, CHEN JP, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of pine needles[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(24): 7941
- [4] MERSAMUURONEN S, SIREN H. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce[J]. *Phytochem Rev*, 2019, 18(3): 623
- [5] ESMEETA A, ADHIKARY S, DHARSHNAA V, et al. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: an updated review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 1
- [6] CHIU HF, WANG HM, SHEN YC, et al. Anti-inflammatory properties of fermented pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(11): e12994
- [7] LIU JJ, FEMANDES H, ZAMANY A, et al. *In-vitro* anti-fungal assay and association analysis reveal a role for the *Pinus monticola* PR10 gene (PmPR10-3.1) in quantitative disease resistance to white pine blister rust[J]. *Genome*, 2021, 64(7): 693
- [8] 彭华清, 周扬涛, 倪晓婷, 等. 南山不老松的考证及其松针化学成分和活性研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(1): 326
PENG HQ, ZHOU YT, NI XT, et al. Textual criticism on evergreen pine of Nanshan and research progress on chemical constituents and pharmacological activities of the pine needles[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(1): 326
- [9] DONALDSON L, WILLIAMS N. Imaging and spectroscopy of natural fluorophores in pine needles[J]. *Plants (Basel)*, 2018, 7(1): 10
- [10] LEE JG, LEE CG, KWAG JJ, et al. Determination of optimum conditions for the analysis of volatile components in pine needles by double-shot pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*. 2005, 1089(1-2): 227
- [11] DUARTE H, GOMES V, ALIANO MJ, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from maritime pine residues with deep eutectic solvents[J]. *Foods*, 2022, 11(23): 3754
- [12] 林颖毓, 潘静茹, 宋敏, 等. LC-Q TOF/MS 技术鉴定二十碳五烯酸乙酯软胶囊的有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(10): 1774
LIN YY, PAN JR, SONG M, et al. Identification of the related substances of eicosapentaenoic acid ethylester soft capsules by LC-Q TOF/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(10): 1774
- [13] 宋玉晨, 宫晓, 易欢, 等. 人血浆中阿托伐他汀和 5 个代谢产物 LC-MS/MS 分析方法的建立及在药代动力学研究中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(1): 58
SONG YC, GONG X, YI H, et al. Establishment of an LC-MS/MS method for the determination of atorvastatin and five metabolites in human plasma and its application in pharmacokinetics[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2024, 44(1): 58
- [14] 赵继荣, 杨文通, 李硕, 等. UPLC-MS/MS 同法测定麝香酮、腰痛酊中 9 个有效成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(6): 952
ZHAO JR, YANG WT, LI S, et al. Simultaneous determination of 9 active ingredients in Tongfu Jingyaotong tincture by UPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2024, 44(6): 952
- [15] 蒋芦荻, 王晓燕, 刘亚楠, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定更年期宁中 11 个成分[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(5): 827
JIANG LD, WANG XY, LIU YN, et al. Simultaneous determination of 11 components in Gengyaning by HPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2024, 44(5): 827
- [16] 孙帅, 王相, 高乐, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定红五参胶囊中 11 个成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(4): 567
SUN S, WANG X, GAO L, et al. Simultaneous determination of 11 components in Hongwushen capsules by UPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2024, 44(4): 567

(本文于 2024 年 4 月 11 日收到)