

基于UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS的太白茶化学成分研究

李莎莎¹, 狄志彪¹, 胡静¹, 李雅娟², 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, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 应用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS)对太白茶醇提取物进行快速定性研究。方法 采用Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 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℃;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。根据高分辨质谱数据分析,参考文献及对照品确认,对太白茶中的化学成分进行快速、全面的定性分析。结果 从太白茶共鉴定出了39种成分,包括多取代单苯环类化合物9种,缩酚酸类11种,缩酚酸环醚类5种,二苯并吡喃类2种,脂肪酸类10种及其他2种。结论 该方法可快速、全面鉴定太白茶中的化学成分,其中3种成分(苔色酸、松萝酸、黑茶渍素)与对照品比对后准确鉴定,19种成分首次在太白茶中发现,可为太白茶药效物质研究及质量评价提供重要依据。

关键词: 太白茶;液质联用;化学成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)01-0071-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223535

引用本文: 李莎莎,狄志彪,胡静,等.基于UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS的太白茶化学成分研究[J].中国现代应用药学,2024,41(1):71-79.

Study on Chemical Constituents in *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb. by UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS

LI Shasha¹, DI Zhibiao¹, HU Jing¹, LI Yajuan², MAO A'juan¹, LI Fan¹, LI Fang¹, ZHANG Hong¹, WANG Weifeng^{1*}(1.Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 2.Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To conduct a rapid qualitative study on the chemical constituents of the methanol extract in *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb. by UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS. **METHODS** The chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 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, and the detection range was m/z 80~1 200. The chemical constituents in *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb. were identified rapidly and comprehensively based on the accurate relative molecular and combined with literature data and reference substances. **RESULTS** A total of 39 chemical constituents were speculatively identified, including 9 mono-substituted phenyl rings, 11 depsides, 5 depsidones, 2 dibenzofuran, 10 lipids, and 2 others. **CONCLUSION** The chemical constituents in the *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb. can be identified accurately and rapidly by this method. Among them, 3 compounds(β -resorcylic acid, usnic acid, atranorin) are unambiguously identified by comparing with reference standards, 19 compounds are found from *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb. for the first time. This paper can provide the important basis for study on pharmacodynamic material and substitute development of *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb..

KEYWORDS: *Thamnoia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb.; UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS; chemical constituents

太白茶,别名雪茶、地茶,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,主要生长在高寒地带,如陕西、云南、西藏等地,其味甘、微苦,性凉,归心、肺、肝经,具有清

热解毒、安神养心、清心明目的功效。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^[1-3]。近年来,太白茶抗菌、调节免疫、

基金项目: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)

作者简介:李莎莎,女,硕士,助理研究员 E-mail: lisha988118@163.com *通信作者:王卫锋,男,硕士,主任药师 E-mail: 554974456@qq.com

抗衰老、抗肿瘤等功效逐渐被报道^[4-6]，并被用于辅助治疗阿尔茨海默病、高血压、肥胖和神经衰弱等症^[7-9]。作为地方药材品种，太白茶仅被载入2015年版《陕西省药材标准》^[10]和2010年版《四川省中药材标准》^[11]，二者均制定了以对照药材为参考的薄层鉴别方法。在含量测定方面，《四川省中药材标准》以甘氨酸为对照，对太白茶中的总氨基酸进行了测定，而《陕西省药材标准》太白茶项下并无含量测定方法。因此，建立一种灵敏、快速、简便的数据分析方法，对太白茶中化学成分的全面分析和鉴定、科学阐述其药效物质基础及质量控制具有重要意义。

中国民间传统上使用的地衣类中药“雪茶”实际上是地茶属雪地茶 *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb.或地茶 *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach.ex Schaer.这2个种的混合物^[12]。本实验采用UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS技术对雪地茶中的主要化学成分进行定性分析，以期为该药材的合理开发利用提供依据。

1 材料

UltiMate 3000型超高效液相色谱仪、UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS型质谱仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；Peak View数据处理软件、BT25S型电子分析天平、BS210S型电子分析天平均购自北京赛多利斯科学仪器有限公司；KQ-5200E台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

太白茶购自陕西省宝鸡市太白县，经陕西省中医药研究院杨智峰主任鉴定为植物雪地茶 *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb.的干燥枝状体，符合2015年版《陕西省药材标准》中太白茶项下规定。对照品苔色酸(批号：CHB210121)、松萝酸(批号：VHB201214)均购自成都克洛玛生物科技有限公司，纯度均 $\geq 98\%$ ；黑茶渍素(北京沃凯生物科技有限公司，批号：20191213；纯度 $\geq 98\%$)；甲醇、甲酸为色谱级；水为屈臣氏蒸馏水；其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取苔色酸、松萝酸、黑茶渍素对照品适量，置10 mL量瓶中，适量氯仿溶解，加甲醇定容至刻度，分别配置成质量浓度为0.2, 0.5, 0.2 mg·mL⁻¹的对照品储备液，备用。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取太白茶样品粉末约0.5 g，置100 mL具塞三角瓶中，加入甲醇25 mL，称重，超声提取30 min，放至室温，甲醇补重，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm)，流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)，梯度洗脱(0~8 min, 10% \rightarrow 45%A; 8~15 min, 45% \rightarrow 60%A; 15~20 min, 60% \rightarrow 95%A; 20~22 min, 95%A)，流速0.3 mL·min⁻¹，柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量1 μL 。

2.4 质谱条件

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 $^{\circ}\text{C}$ ，雾化温度320 $^{\circ}\text{C}$ 。扫描模式Full MS/dd-MS²，Full MS分辨率70 000，dd-MS²分辨率17 500，扫描范围 m/z 80~1 200；碰撞能量设定为15 eV。数据分析采用Xcalibur 4.0软件。

2.5 化学成分数据库的建立

借助中国知网、PubMed等数据库检索太白茶相关文献，全面收集并整理太白茶所含化合物的名称、分子式、相对分子质量等相关信息，建立太白茶化学成分信息数据库。借助ChemicalBook或ChemSpider等网络数据库信息，计算负离子模式([M-H]⁻)下的质荷比值。

2.6 数据处理

取太白茶样品溶液，按“2.3”和“2.4”项下液质联用分析条件操作，进样后根据一级质谱精确相对分子质量信息，采用Xcalibur 4.0软件，以实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量二者偏差 <5 的原则对预测的化学成分进行筛选和初步鉴定，结合建立的太白茶化学成分数据库对目标化合物进行匹配，对色谱峰进行解析，将化合物的二级碎片离子与对照品及参考文献报道的裂解碎片进行比对，进一步推导化合物的裂解路径。对于化合物中一些同分异构体的鉴别，可通过与对照品比对或裂解路径的不同进行区分；而对于裂解规律一致的同分异构体，主要采用ChemDraw软件给出的有机化合物疏水常数(ClogP)对极性进行判断，同时结合化合物的保留时间进行推测。一般情况下，ClogP值越大，它在反相色谱中的保留时间越长^[13]。

3 结果

在“2.3”和“2.4”项色谱、质谱条件下获得的负离子模式全扫描总离子流图 (total ion chromatogram, TIC) 见图 1。按照“2.6”项下数据处理方法对太白茶中的化学成分进行结构推测和确证。最终从太白茶中共鉴定出 39 种化合物, 包括多取代单苯环类化合物 9 种, 缩酚酸类 11 种, 缩酚酸环醚类 5 种, 二苯并呋喃类 2 种, 脂肪酸类 10 种及其他 2 种, 其中 3 种成分经与对照品比对后准确鉴定。化合物保留时间、分子式、分子量、一级质谱及二级质谱碎片离子见表 1。

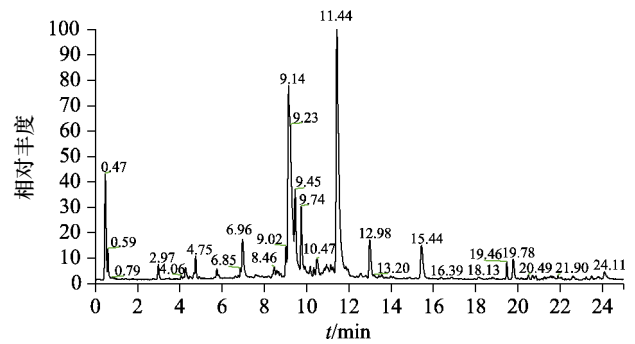


图 1 太白茶总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of *Thamnia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb.

表 1 太白茶中各化学成分的鉴定分析

Tab. 1 Identification analysis of each chemical constituent in *Thamnia subuliformis* (Ehrh.) W.Culb.

序号	t_R / min	化合物	分子式	测定值	理论值	误差/ $\times 10^{-6}$	峰面积	二级质谱	参考文献
1	2.97	1-(2,3-dihydroxy-5-methoxyphenyl)ethanone	$C_9H_{10}O_4$	181.051 1	181.050 6	2.76	48 993 511	181.050 9, 137.061 1, 122.037 6	[7]
2	4.19	苔色酸	$C_8H_8O_4$	167.035 3	167.035 0	1.80	60 960 302	167.035 0, 149.024 6, 123.045 4, 105.034 8	[14-15]
3	4.35	methyl-haemtommate	$C_{10}H_{10}O_5$	209.046 0	209.045 5	2.39	167 449 728	209.046 1, 177.019 6, 149.024 6, 133.029 8, 121.029 7, 105.034 8	[16]
4	4.75	4-羟基-2-甲氧基-6-甲基苯甲酸	$C_9H_{10}O_4$	181.051 0	181.050 6	2.21	1 892 819 673	181.051 1, 163.040 3, 137.061 1, 119.050 5	[7]
5	5.65	3-hydroxy-2-methoxy-4-(methoxycarbonyl)-5-methylbenzoic acid	$C_{11}H_{12}O_6$	239.056 6	239.056 1	2.09	64 068 001	239.056 4, 195.066 7, 180.043 2, 149.024 7, 122.037 6, 105.034 8	[17]
6	5.74	3, 4-二羟基苯乙酮	$C_8H_8O_3$	151.040 4	151.040 1	1.99	635 429 166	151.040 5, 123.045 4, 105.034 9, 81.034 7	[18]
7	5.75	2-hydroxy-4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-6-methylbenzoic acid	$C_{11}H_{12}O_6$	239.056 6	239.056 1	2.09	325 452 618	239.055 2, 195.066 7, 180.043 0, 148.016 8, 122.037 7, 105.034 8	[17]
8	6.94	雪茶酸	$C_{19}H_{16}O_{11}$	419.062 7	419.062 0	1.67	840 255 400	419.063 1, 375.072 7, 211.025 2, 167.035 2, 123.045 4	[16, 19]
9	7.58	维任烯酸	$C_{18}H_{14}O_8$	357.062 4	357.061 6	2.24	21 159 322	357.063 0, 313.072 9, 225.057 0, 121.030 0	[20]
10	7.59	cetraric acid	$C_{20}H_{18}O_9$	401.088 6	401.087 8	2.00	22 020 282	401.089 5, 357.063 1, 313.073 2, 269.084 3, 225.056 8, 121.030 0	[14]
11	7.61	conhypoprotocetraric acid	$C_{18}H_{16}O_8$	359.078 7	359.077 2	4.18	3 590 429	359.078 5, 341.067 7, 315.088 7, 297.077 9, 271.098 7, 253.087 8, 227.108 6	[16]
12	7.90	tetrahydroxyeicosanoic acid	$C_{20}H_{40}O_6$	375.276 1	375.275 2	2.40	59 975 327	375.275 9, 357.265 7, 339.256 4, 245.140 6, 187.097 8	[16, 21]
13	8.37	hypoconstictic acid	$C_{19}H_{16}O_9$	387.073 0	387.072 2	2.07	207 591 242	387.073 2, 299.093 4, 179.035 3	[16]
14	8.45	haemathamnolic acid	$C_{19}H_{16}O_{10}$	403.067 8	403.067 1	1.74	611 968 415	403.067 9, 359.078 9, 211.025 3, 167.035 3, 149.024 7, 123.045 4	[15]
15	8.48	tetrahydroxyheneicosanoic	$C_{21}H_{42}O_6$	389.291 7	389.290 9	2.06	109 692 992	389.291 7, 371.281 1, 353.271 7, 201.113 8	[21]
16	9.02	pentahydroxytetraicosanoic acid	$C_{24}H_{48}O_7$	447.333 5	447.332 7	1.79	2 215 548 343	447.333 8, 429.323 5, 399.313 6	[21]
17	9.05	雪茶素	$C_{18}H_{16}O_9$	375.072 8	375.072 2	1.60	101 320 608	375.073 0, 211.025 3, 167.035 2, 149.024 6, 123.045 5	[14, 22]
18	9.10	cryptostictic acid	$C_{19}H_{16}O_9$	387.073 0	387.072 2	2.07	86 441 751	387.073 9, 343.083 7, 311.057 5, 299.093 9, 267.067 4, 229.051 6	[16]
19	9.11	tetrahydroxydocosanoic acid	$C_{22}H_{44}O_6$	403.307 2	403.306 5	1.74	413 948 330	403.307 4, 385.296 4, 215.128 9, 179.035 2	[16]
20	9.14	鳞片衣酸	$C_{19}H_{18}O_9$	389.088 6	389.087 8	2.06	36 550 363 947	389.087 0, 345.098 6, 327.088 6, 225.040 9, 181.051 0, 163.040 4, 137.061 1	[16]

续表 1

序号	t_R / min	化合物	分子式	测定值	理论值	误差/ $\times 10^{-6}$	峰面积	二级质谱	参考文献
21	9.18	2-hydroxy-6-methoxy-4-methylbenzoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.050 4	181.050 6	-1.10	199 235 879	181.051 1, 163.040 2, 137.061 0, 122.037 9	[7]
22	9.23	3 β -羟基-5 α ,8 α -桥二氧麦角甾-6,9,22-三烯	C ₂₈ H ₄₂ O ₃	425.304 7	425.306 1	-3.29	75 044 961	425.304 8, 383.055 3, 219.007 9, 181.051 4, 163.040 7	[23]
23	9.45	placodiolic acid	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	375.109 1	375.108 5	1.60	4 258 576 675	375.109 3, 181.051 1, 163.040 5, 137.061 1, 119.050 4	[16]
24	9.62	thamnoliadepsides A	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	329.104 0	329.103 1	2.73	9 228 321	329.104 5, 191.035 8, 179.035 7, 147.046 1, 137.061 4	[24]
25	9.74	tetrahydroxytricosanoic acid	C ₂₃ H ₄₆ O ₆	417.322 8	417.322 2	1.44	4 097 692 350	417.323 9, 399.311 7, 259.191 9, 229.145 0	[21]
26	10.06	pentahydroxytricosanoic acid	C ₂₃ H ₄₆ O ₇	433.318 0	433.317 1	2.08	192 730 954	433.319 0, 388.315 4, 387.312 6, 199.134 3	[21]
27	10.17	hemathamol	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.078 2	359.077 2	2.78	28 781 159	359.077 3, 167.035 7, 149.025 0, 123.045 7	[14]
28	10.47	6-ethy-6- <i>n</i> -pentylpentadecan-4,5,7,8,15,-pentol-15-acetate	C ₂₄ H ₄₈ O ₆	431.338 6	431.337 8	1.85	1 246 245 609	431.338 6, 413.327 5, 395.320 4, 243.160 1	[16]
29	11.14	19-acetoxyprotolichesterinic acid	C ₂₁ H ₃₄ O ₆	381.227 0	381.228 3	-3.41	31 650 425	381.227 4, 335.222 4, 313.240 3, 223.096 4, 201.114 3	[15]
30	11.44	evermic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.050 5	181.050 6	-0.55	1 701 378 362	181.051 3, 163.040 5, 137.061 2, 119.050 6	[14]
31	11.44	羊角衣酸	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.093 8	373.092 9	2.41	33 718 232 574	373.093 2, 181.051 1, 163.040 5, 137.061 2, 119.050 5	[22]
32	12.57	chloroatranorin	C ₁₉ H ₁₇ O ₈ Cl	407.055 2	407.053 9	3.19	15 849 976	407.055 9, 215.012 9, 197.002 1, 171.022 7	[16]
33	12.66	10,12-羟甲基-8,14-羟基-4,4,18,18-四甲基-1,21-二甲酸甲酯	C ₂₉ H ₅₆ O ₈	531.392 0	531.390 2	3.39	35 233 151	531.391 7, 489.383 1, 471.371 6, 59.014 2	[23]
34	12.98	thamnoliadepsides B	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	345.098 9	345.098 0	2.61	4 717 052 497	345.098 9, 181.051 2, 163.040 6, 137.061 2, 119.050 7	[24]
35	14.41	protolichesterinic acid	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	323.223 9	323.222 8	3.40	5 948 241	323.223 6, 305.212 9, 279.233 6, 261.222 8	[15]
36	15.44	坝巴酸	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	359.114 7	359.113 6	3.07	4 030 670 985	359.114 9, 181.051 2, 163.040 5, 137.061 2, 119.050 6	[16,22]
37	15.98	松萝酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.083 5	343.082 3	3.50	41 052 323	343.083 3, 328.060 0, 313.036 8, 299.093 6, 259.061 9, 231.067 0, 83.014 1	[14,22]
38	16.59	黑茶渍素	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.094 3	373.092 9	3.75	13 485 309	373.094 9, 195.066 8, 181.051 0, 177.019 8, 163.040 8, 133.029 9, 119.050 5, 105.035 0	[15-16, 19]
39	19.80	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.233 9	279.233 0	3.22	156 972 132	279.233 8, 258.473 5	[23]

3.1 多取代单苯环类化合物

从太白茶中共鉴定出 9 种多取代单苯环类化合物, 分别为化合物 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 21, 30, 其中化合物 3 首次在太白茶中发现, 化合物 2 经与对照品对比后鉴定为苔色酸。这一类化合物在负离子模式下发生裂解时, 母核易出现连续丢失 CO₂、H₂O 等小分子。表 1 表明, 化合物 2 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 167.035 3[M-H]⁻, 根据数据库匹配出分子式为 C₈H₈O₄, 二级质谱中失去 1 分子水, 产生碎片离子 149.024 6 为 [M-H-H₂O]⁻、或直接失去 1 个 CO₂, 获得碎片离子 123.045 4[M-H-CO₂]⁻, 再失去 1 分子水, 得到碎片离子 105.034 8 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, 结合参考文

献^[14], 并与对照品的保留时间及质谱碎片相比较, 鉴定该化合物为苔色酸, 二级质谱及其裂解途径见图 2~3。

化合物 5 和 7 互为同分异构体, 化合物 5 在负离子模式下的准分子离子峰为 239.056 6[M-H]⁻, 推测化学式为 C₁₁H₁₂O₆, 结合其化学结构, 化合物 5 的极性小于化合物 7 的, 二级质谱图上 m/z 195.066 7 为 [M-H-CO₂]⁻、 m/z 180.043 2 为 [M-H-CO₂-CH₃]⁻、 m/z 149.024 7 为 [M-H-CO₂-OCH₃-CH₃]⁻、 m/z 122.037 6 为 [M-H-CO₂-OCH₃-CH₃-CO]⁻, 根据色谱保留行为及参考文献^[25] 及 ClogP 值大小, 推测化合物 5 和 7 分别为 3-hydroxy-2-methoxy-4-(methoxycarbonyl)-5-methylbenzoic acid、2-hydroxy-

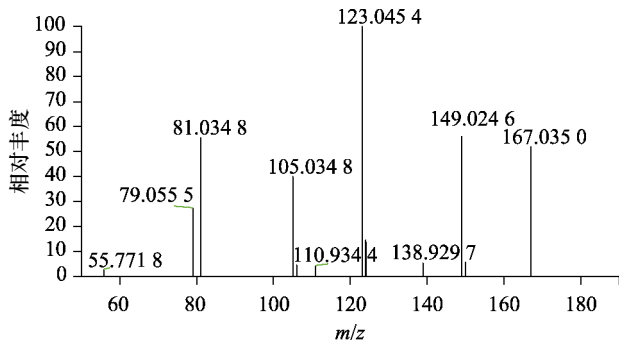


图2 苔色酸的二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectrum of β -resorcylic acid

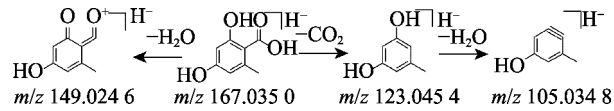


图3 苔色酸的裂解规律图

Fig. 3 Mass spectrometric fragmentation pattern of β -resorcylic acid

4-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-6-methylbenzoic acid.

化合物 1, 4, 21, 30 互为同分异构体, 化合物 30 的准分子离子峰均为 $181.0505[M-H]^-$, 推测化学式为 $C_9H_{10}O_4$, 二级碎片离子峰 m/z 163.0405 为母核失去一分子 H_2O 得到, 再失去 1 个 CO_2 , 获得碎片离子 119.0506 为 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$; 或者失去 1 个 CO_2 , 得到碎片离子 137.0612 $[M-H-CO_2]^-$, 根据色谱保留行为及参考文献^[14-15]及 $ClogP$ 值大小, 推断其分别为 1-(2,3-dihydroxy-5-methoxyphenyl) ethanone、4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoic acid、2-hydroxy-6-methoxy-4-methylbenzoic acid、扁枝衣酸。以扁枝衣酸为例, 二级质谱及其裂解途径见图 4~5。

3.2 缩酚酸类

这一类化合物大多含有水杨酸苯基取代, 发生裂解时, 在负离子模式下一方面母核易出现 CO 、 CO_2 、 CH_3 等中性分子的连续丢失或者组合丢失, 另一方面则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, 使其断裂为 A、B 两部分, 再由 A 或者 B 部分连续丢失 CO 、 CO_2 、 CH_3 或组合丢失^[16]。太白茶中共鉴定出 11 种此类化合物, 典型的代表为化合物 38, 其保留时间为 16.59 min, 一级质谱中准分子离子峰为 m/z 373.0943 $[M-H]^-$, 根据数据库匹配得出分子式为 $C_{19}H_{18}O_8$, m/z 195.0673 是其相应酯键断裂的 B 部分, m/z 181.0510、 m/z 163.0408 和

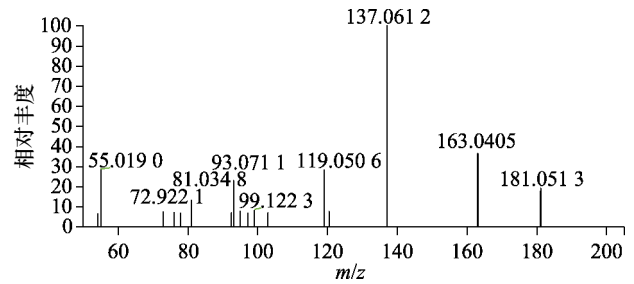


图4 扁枝衣酸的二级质谱图

Fig. 4 Secondary mass spectrum of evernic acid

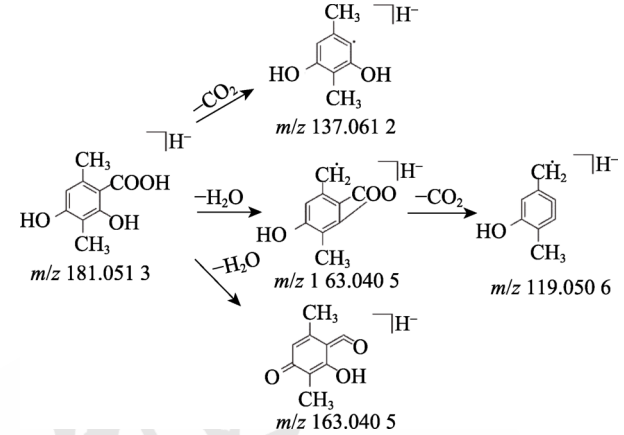


图5 扁枝衣酸的裂解规律图

Fig. 5 Mass spectrometric fragmentation pattern of evernic acid

m/z 119.0505 则分别是由 B 部分失去 CH_3 、 H_2O 和 CO_2 所形成的离子片段; 而 m/z 177.0198、 m/z 133.0299 和 m/z 105.0350 则分别是由相应酯键断裂的 A 部分连续失去 H_2O 、 CO_2 和 CHO 所形成的离子片段, 与对照品比对及参考相关文献^[15-16, 19], 鉴定其为黑茶渍素, 二级质谱及其裂解途径见图 6~7。

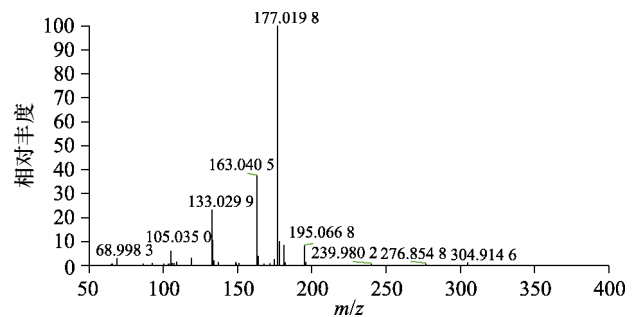


图6 黑茶渍素的二级质谱图

Fig. 6 Secondary mass spectrum of atranorin

另一个典型的代表是化合物 20, 保留时间为 9.14 min, 准分子离子峰为 m/z 389.0886 $[M-H]^-$, 根据数据库匹配得出分子式为 $C_{19}H_{20}O_7$, 它的裂解方式是一方面通过中性分子 CO_2 和 H_2O 连续丢

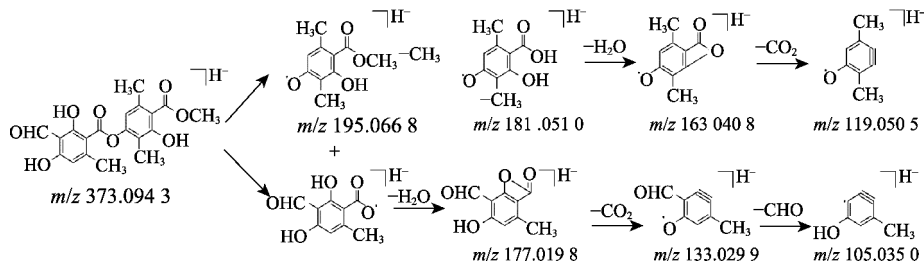


图7 黑茶渍素的裂解规律图

Fig. 7 Mass spectrometric fragmentation pattern of atranorin

失，分别在 m/z 345.098 6 和 m/z 327.088 6 处产生相对应的产物离子；一方面通过破坏酯键得到 m/z 225.040 9 和 m/z 181.051 0 处的片段离子，验证了上述总结的片段化规律，同时参考其色谱行为及相关文献^[16]，推测其为鳞片衣酸，二级质谱及其裂解途径见图 8~9。

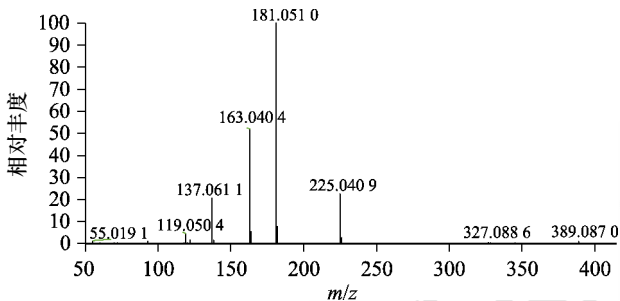


图8 鳞片衣酸的二级质谱图

Fig. 8 Secondary mass spectrogram of squamatic acid

同样在负离子模式下，化合物 8, 14, 17, 24, 27, 31, 32, 34 与 36 的化学结构属于同一类，故 AB 两部分发生裂解后，它们的裂解规律基本一致。同样基于质谱信息、数据库搜索及文献参考，初步对化合物 8, 14, 17, 24, 27, 31, 32, 34 与 36 进行了表征，结合质谱数据和前期文献^[14,16,19,22,24]，初步确定化合物其分别为雪茶酸、haemathamnolic acid、雪茶素、thamnoliadepsides A、hemathamnol、羊角衣酸、chloroatranorin、thamnoliadepsides B 和坝巴酸，其中化合物 14,

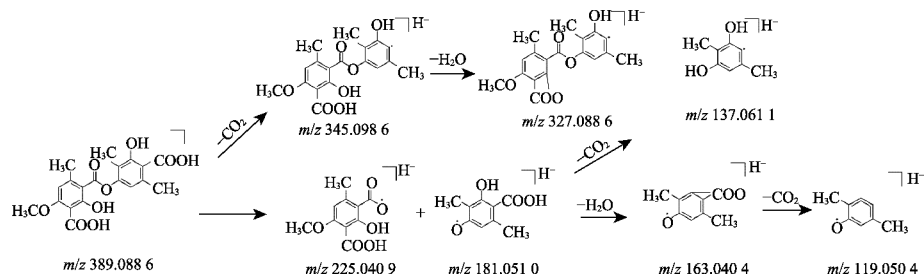


图9 鳞片衣酸的裂解规律图

Fig. 9 Mass spectrometric fragmentation pattern of squamatic acid

27, 32 为首次发现。

3.3 缩酚酸环醚类

该类化合物是由 2 个苔黑素单体通过酯键和醚键连接而成的聚酮类化合物，其结构与缩酚酸类相似。发生裂解时，B 环具有水杨酸结构时容易发生脱羧或脱水反应，母核易出现 H_2O 、 CO 、 CO_2 和 CH_3 等中性分子的连续丢失或者组合丢失，另一方面二苯醚键发生重排脱羧后连续丢失 CO 、 CO_2 、 CH_3 或组合丢失。太白茶中共鉴定出 5 种此类化合物，以化合物 11 为例，其保留时间为 7.61 min，准分子离子峰为 m/z 359.078 7 $[M-H]^-$ ，根据数据库匹配得出分子式为 $C_{18}H_{16}O_8$ ，二级碎片离子峰 m/z 341.067 7 为母核失去一分子 H_2O 得到，再失去 1 个 CO_2 ，获得碎片离子 297.077 9 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ ，再失去 1 个 CO_2 ，获得碎片离子 253.087 8 $[M-H-H_2O-2CO_2]^-$ ；或者失去 1 个 CO_2 ，得到碎片离子 315.088 7 $[M-H-CO_2]^-$ ，再失去 1 个 CO_2 ，获得碎片离子 m/z 271.098 7 $[M-H-2CO_2]^-$ ，再失去 1 个 CO_2 ，获得碎片离子 m/z 227.108 6 $[M-H-3CO_2]^-$ ；或者离子 315.088 7 $[M-H-CO_2]^-$ ，再失去 1 个 H_2O ，得到碎片离子 m/z 297.077 9 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ ，参考相关文献^[16]，推测其为 conhyppoprotocetraric acid，二级质谱及其裂解途径见图 10~11。

同样在负离子模式下，化合物 9, 10, 13, 18 与 11 的化学结构属于同一类，故它们的裂解规

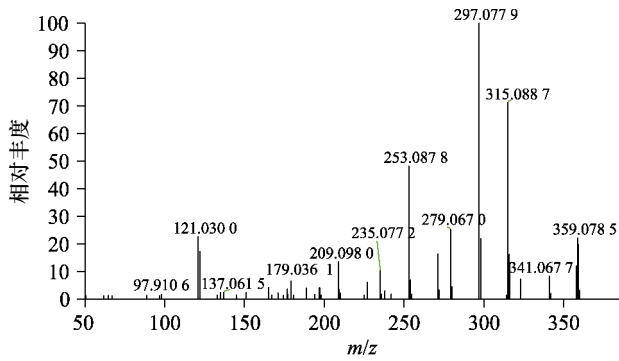


图 10 Conhypoprotocetraric acid 的二级质谱图
Fig. 10 Secondary mass spectrogram of conhypoprotocetraric acid

律基本一致。基于质谱信息、数据库搜索及文献参考，初步对化合物 **9**, **10**, **13** 与 **18** 进行了表征，结合质谱数据和参考文献^[14,16,26]，初步确定化合物其分别为 virensic acid、cetraric acid、hypoconstictic acid 和 cryptostictic acid，其中化合物 **9**, **10**, **13** 与 **18** 均为在此药材中首次发现。

3.4 二苯并呋喃类

该类化合物在负离子模式下发生裂解时，一方面母核连续脱去 CH_3 、 CO 等中性小分子，另一方面该类化合物在高温高热环境中 C_{1-12} 和 C_{2-3} 易发生逆 Diels-Alder(RDA) 重排，多形成 m/z 84 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$) 和 m/z 112 ($\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3$) 特征片段^[14,16]。

从药材中共检测出 2 个二苯并呋喃类化合物，即化合物 **23** 和 **37**。以化合物 **37** 为例，其在

负离子模式下准分子离子峰为 m/z 343.083 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 二级碎片离子有 m/z 328.060 0, 313.036 8, 299.093 6, 259.061 9, 231.067 0，根据数据库匹配得出分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ，其裂解规律为一方面在二级质谱中失去 1 个甲基得到 m/z 328.060 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ 再失去 CH_3 、 CH_2 得到 m/z 313.036 8 $[\text{M}-\text{H}-2\text{CH}_3]^-$ 、 m/z 299.093 6 $[\text{M}-\text{H}-2\text{CH}_3-\text{CH}_2]^-$ ；另一方面在负离子模式下发生 RDA 重排得到 m/z 259.061 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2]^-$ 片段和 m/z 231.067 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3]^-$ ，根据结构和对照品二级碎片离子鉴定其为松萝酸^[14]，松萝酸二级质谱及其裂解途径见图 12~13。化合物 **23** 为首次在太白茶中检测出，同理推测其为 placodiolic acid。

3.5 类脂类

该药材醇提取物中共检测出 10 个脂肪酸类成分，即化合物 **12**, **15**, **16**, **19**, **25**, **26**, **28**, **29**, **35**, **39**，结合质谱数据和参考文献^[15-16, 21, 23]，初步确定化合物其分别为 tetrahydroyeicosanoic acid、tetrahydroyheneicosanoic、pentahydroxytracosanoic acid、tetrahydrodocosanoic acid、tetrahydroxytricosanoic acid、pentahydroxytricosanoic acid、6-ethy-6-*n*-pentylpentadecan-4,5,7,8,15,-pentol-15-acetate、19-acetoxyprotolichesterinic acid、protolichesterinic acid 和亚油酸。除了化合物 **39**，其余均为首次在该药材中检测到。

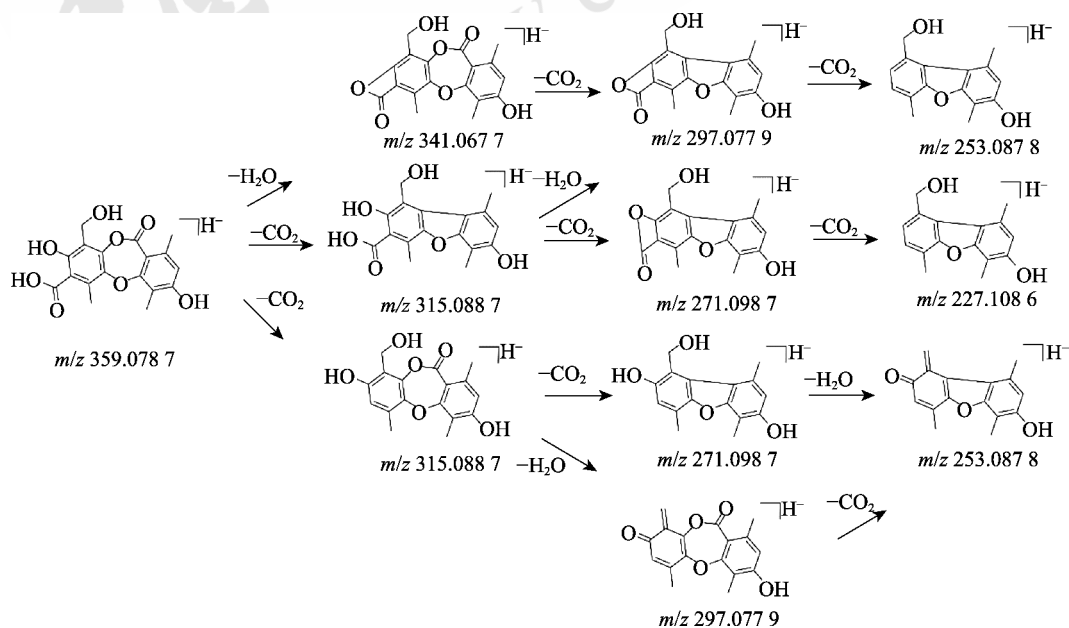


图 11 Conhypoprotocetraric acid 的裂解规律图
Fig. 11 Mass spectrometric fragmentation pattern of conhypoprotocetraric acid

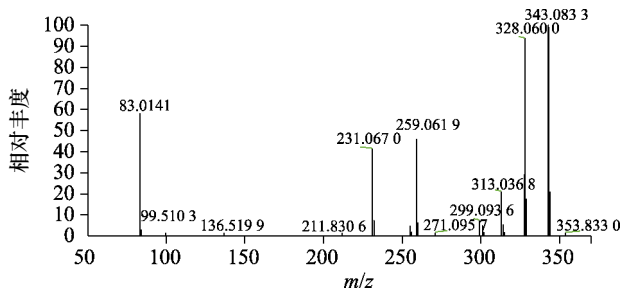


图 12 松萝酸的二级质谱图

Fig. 12 Secondary mass spectrogram of usnic acid

3.6 其他

太白茶醇提物中共检测出 2 种其他类成分, 即化合物 **33** 和 **22**。化合物 **33** 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 531.392 0[M-H]⁻, 根据数据库匹配得出分子式为 C₂₉H₅₆O₈, 失去 1 分子 CH₂O(m/z 42) 得到碎片离子峰 m/z 489.383 1, 失去 1 分子 H₂O, 得到碎片离子峰 m/z 471.371 6, 参考文献^[23] 推测为 10,12-羟甲基-8,14-羟基-4,4,18,18-四甲基-1,21-二甲酸甲酯或同分异构体。化合物 **22** 在负离子模式下准分子离子峰分别为 m/z 425.304 7[M-H]⁻, 根据数据库匹配出分子式分别为 C₁₈H₁₆O₇, 参考文献^[25] 推测其为 3β-羟基-5α,8α-桥二氧麦角甾-6,9,22-三烯。

4 讨论

本实验在相关文献的基础上, 对比了超声法和回流法对太白茶中地衣酸类成分的提取效果, 发现回流法的提取效率明显高于超声法; 对不同提取溶剂(甲醇、乙醇、三氯甲烷)进行考察, 发现使用甲醇作为提取溶剂时, 提取效果最优; 同时考察了不同比例(50%, 60%, 70%, 80%, 100%)甲醇提取液, 结果显示, 以纯甲醇为提取溶剂时, 仪器响应较高, 图谱基线较为平稳, 得

到峰数较多, 故选择纯甲醇作为提取溶剂。

为了提高分离效率, 本实验前期比较了不同规格色谱柱的分离效果。结果显示, Acquity UPLC[®] C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱对大部分化合物的出峰效果明显, 分离度好且对称性好, 适用于本实验成分体系的测定; 也考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-水和乙腈-0.1% 甲酸水溶液等不同流动相系统。结果发现, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时, 各成分的色谱峰型较好。各化合物均在负离子模式下响应较高, 这可能与太白茶中的主要化学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。

本研究在太白茶药材已经报道的化学成分中鉴定了 39 种地衣酸类化学成分, 但某些已知成分在此次分析中未曾检测到相关碎片, 这可能与供试品的处理方法以及该化合物在 ESI 源中的离子化效率有关, 后续有待进一步验证。此外, 在分析样品总离子流图发现, 一些响应较强的色谱峰并未在已有数据库中找到对应的化合物, 提示太白茶还有一些未知的化合物需后续研究开发。

研究表明^[26-28], 地衣酸类化合物具有抗菌消炎、抗氧化、抗肿瘤等活性, 太白茶醇提取物对 7 种肠道寄生虫均具有良好的抑菌效果, 通过色谱峰确定其主要活性物质有黑茶渍素、松萝酸、维壬烯酸及雪茶素等^[20]。雪茶素可通过降低过氧化氢诱导成纤维细胞内活性氧的含量, 抑制基质金属蛋白激酶 I 的生成, 达到抗皱的作用^[6]。羊角衣酸和鳞片衣酸具有抗炎和抗肿瘤活性, thamnoliadepsides A 和 thamnoliadepsides B 对前列腺癌细胞的生长具有抑制作用, 且比羊角衣酸和鳞片衣酸的抑制作用更强^[24]。这些成分的确定可

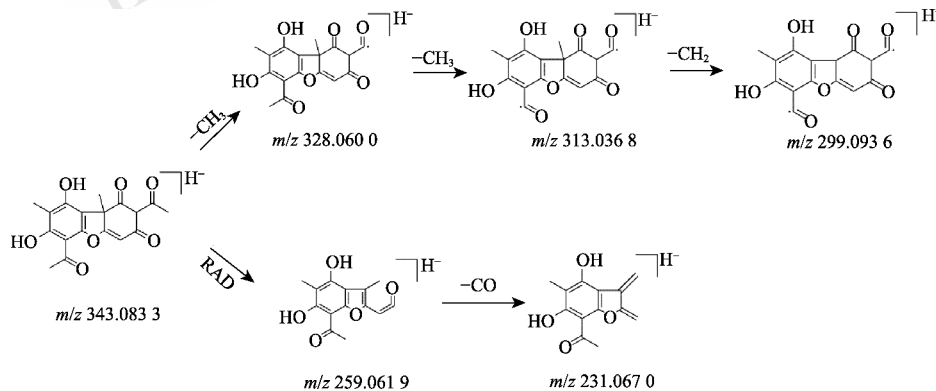


图 13 松萝酸的裂解规律图

Fig. 13 Mass spectrometric fragmentation pattern of usnic acid

为深入研究太白茶药材的药效物质基础及质量控制提供理论依据。

综上所述, 本实验在负电离模式下运用UHPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS对太白茶中化学成分进行了快速分析鉴别, 所建方法快速、准确, 可用于鉴别太白茶中的化学成分, 为进一步研究其药效物质基础及质量控制提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] ONUȚ-BRÄNNSTRÖM I, BENJAMIN M, SCOFIELD D G, et al. Sharing of photobionts in sympatric populations of *Thamnolia* and *Cetraria* lichens: Evidence from high-throughput sequencing[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4406.
- [2] GUO M, HE Q L. Analysis on the resource status of Taibai tea in Taibai Mountain[J]. *J Green Sci Technol(绿色科技)*, 2017(15): 203-206.
- [3] HAN X H. 12 kinds of medicinal teas produced in Shaanxi and their efficacy[J]. *Northwest Hortic(西北园艺: 综合)*, 2017(3): 32-34.
- [4] REN G Y, GUO Q X, WANG J, et al. Antibacterial activity and stability of methanol extract from *Thamnolia subuliformis* in vitro[J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2022, 43(1): 147-154.
- [5] DENG Y X, ZHAO S Y, BIAN Y G, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide isolated from *Thamnolia subuliformis*[J]. *J Donghua Univ Engl Ed(东华大学学报 英文版)*, 2017, 34(5): 641-645.
- [6] HAIYUAN Y U, SHEN X Q, LIU D, et al. The protective effects of β -sitosterol and vermicularin from *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging in vitro[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2019, 91(4): e20181088.
- [7] YU X B, CAI Y S, ZHAO X, et al. Investigation of the chemical structure of anti-amyloidogenic constituents extracted from *Thamnolia vermicularis*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022(289): 115059.
- [8] LI C, GUO X D, LEI M, et al. *Thamnolia 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): 9-28.
- [9] CHOI R Y, HAM J R, YEO J, et al. Anti-obesity property of lichen *Thamnolia vermicularis* extract in 3T3-L1 cells and diet-induced obese mice[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22(4): 285-292.
- [10] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省药材标准 (2015年版) [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2016: 130.
- [11] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准 (2010年版) [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2011: 247-249.
- [12] YANG M X, WANG L S, WANG X Y. Taxonomic and geographic study on the lichen genus *Thamnolia* from China[J]. *Plant Sci J(植物科学学报)*, 2015, 33(2): 133-140.
- [13] LUO S N, PENG Z C, FAN Q, et al. Analysis on chemical constituents in Xiao Chengqitang by UPLC-Q-orbitrap-MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27(23): 1-10.
- [14] JIN Y R, MA Y H, XIE W 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): 15487-15500.
- [15] KUMAR K, SIVA B, SARMA V U M, 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): 45-57.
- [16] 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.
- [17] LI S S, ZHANG H, LI Y J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Qinling characteristic medicinal materials Taibai tea[J]. *Special Wild Econ Animal Plant Res(特产研究)*, 2022, 44(6): 141-148.
- [18] WANG Q, CHENG Z, YAN B. Chemical constituents from *Thamnolia vermicularis* in Lijiang[J]. *Guihaia(广西植物)*, 2017, 37(12): 1586-1591.
- [19] LE POGAM P, LE LAMER A C, 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): 354-363.
- [20] DANG Y F, TIAN J, SHANG J, et al. The Antimicrobial activity of four medicinal lichens from Taibai Mountain[J]. *J Northwest Univ Nat Sci Ed(西北大学学报: 自然科学版)*, 2014, 44(3): 433-438.
- [21] CORNEJO A, SALGADO F, CABALLERO J, et al. Secondary metabolites in *Ramalina terebrata* detected by UHPLC/ESI/MS/MS and identification of parietin as tau protein inhibitor[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1303.
- [22] WEI A H, ZHOU D N, RUAN J L, et al. Characterisation of phenols and antioxidant and hypolipidaemic activities of *Lethariella cladonioides*[J]. *J Sci Food Agric*, 2012, 92(2): 373-379.
- [23] CHENG Z. Study on chemical constituents of *Thamnolia vermicularis* grown in Yunnan[D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2015.
- [24] GUO J, LI Z L, WANG A L, et al. Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnolia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells[J]. *Planta Med*, 2011, 77(18): 2042-2046.
- [25] DENG Y X, SHAO Z Y, ZHANG S Y, et al. Chemical constituents of *Thamnolia subuliformis*[J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2017, 40(5): 1109-1111.
- [26] TRIPATHI A H, NEGI N, GAHTORI R, et al. A review of anti-cancer and related properties of lichen-extracts and metabolites[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(1): 115-142.
- [27] FURMANEK Ł, CZARNOTA P, SEAWARD M R D. Antifungal activity of lichen compounds against dermatophytes: A review[J]. *J Appl Microbiol*, 2019, 127(2): 308-325.
- [28] ELEČKO J, VILKOVÁ M, FRENÁK R, et al. A comparative study of isolated secondary metabolites from lichens and their antioxidative properties[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(8): 1077.

收稿日期: 2022-10-14

(本文责编: 沈倩)