

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 和质量亏损过滤技术的三叶青黄酮类化合物定性分析

孙梦佳¹, 王焕军¹, 丁富娟¹, 容 蓉¹, 刘江亭^{1,2,3}, 蒋海强^{2,3,4}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355;

2. 山东中医药大学, 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250355;

3. 山东中医药大学, 山东省中医药基础研究重点实验室, 山东 济南 250355)

4. 山东中医药大学实验中心, 山东 济南 250355;

摘要:采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/exactive Orbitrap mass spectrometry, UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)和质量亏损过滤技术(mass defect filter, MDF)对三叶青黄酮类化合物进行定性分析。通过查阅文献,确定三叶青黄酮类物质母核作为 MDF 模板,根据取代基的数目和种类确定 MDF 的质量范围、质量亏损范围,采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 采集—MDF-Orbitrap Traditional Chinese Medicine Library(OTCML)数据库检索—Mass Frontier 验证的鉴定策略,对三叶青乙醇冷浸液所含的黄酮类物质进行定性分析,共鉴定出 41 种黄酮类化合物,其中 19 个为首次发现。该方法对于准确识别三叶青黄酮类化合物,进而科学评价三叶青质量、促进三叶青合理开发具有一定的指导意义。

关键词:三叶青;超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS);质量亏损过滤技术(MDF)

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2020)04-0359-09

doi:10.7538/zpxb.2019.0064

Qualitative Analysis of Flavonoids in *Tetragymna Hemsleyana* Based on UPLC-Quadrupole/Exactive Orbitrap Mass Spectrometry and Mass Defect Filter Method

SUN Meng-jia¹, WANG Huan-jun¹, DING Fu-juan¹, RONG Rong¹,
LIU Jiang-ting^{1,2,3}, JIANG Hai-qiang^{2,3,4}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University
of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

收稿日期:2019-05-22;修回日期:2019-10-30

基金项目:山东省高等学校科技计划项目(J16LM12);山东省高等学校青创科技支持计划(2019KJM005)资助

作者简介:孙梦佳(1995—),女(汉族),山东泰安人,硕士研究生,从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究。

E-mail:1412310567@qq.com

通信作者:刘江亭(1980—),男(汉族),山东栖霞人,副教授,从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究。

E-mail:13105414185@163.com

蒋海强(1982—),男(汉族),山东青州人,副教授,从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究。

E-mail:jhq12723@163.com

2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;*
3. *Shandong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Basic Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;*
4. *Experience Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)*

Abstract: A comprehensive qualitative analysis of flavonoids in the *Tetragium hemsleyanum* was developed by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/exactive Orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) and mass defect filter technique (MDF). UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS is one of the powerful tools for analyzing complex systems of Traditional Chinese Medicine (TCM). The method has two main advantages, one is the higher resolving power relative to triplestage quadrupole mass spectrometers, the other is significantly reducing analysis time. MDF is a new data processing technique for high-resolution mass spectrometry data, which enables a majority of the interfering ions to be automatically filtered, allowing the original data to be analyzed more effectively, accurately, and rapidly. UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS was employed to generate high-resolution mass spectrometry data combined with mass data processing strategy, which could be used for rapid discovery and structural identification of complex compounds of TCM. After the identification of the compounds, verification of the structure is also critical. Mass Frontier is software for managing, evaluating and interpreting mass spectrometry and chromatographic data. With its advanced algorithms and rich inventory data, it is very simple to analyze the mass spectrum and verify the structure of compound. According to the literature of the chemical constituents of *Tetragium hemsleyanum*, the nucleus of flavonoids in the *Tetragium hemsleyanum* was determined as a template for MDF, and the mass range and mass loss range of MDF were obtained on the basis of the number and type of substituents. Subsequently, the UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS acquisition-MDF-Orbitrap Traditional Chinese Medicine Library (OTCML) database search-Mass Frontier verification identification process was employed to conduct a comprehensive qualitative analysis of the flavonoids contained in the ethanol extract of *Tetragium hemsleyanum*. 22 flavonoids were identified by applying the UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS-OTCML-Mass Frontier validation strategy, while 41 flavonoids were identified by applying UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS-MDF-OTCML-Mass Frontier validation strategy. The results showed that this combination technology could effectively eliminate more interfering ions and excavate more potential flavonoids. This research enriches the basic research of chemical substances and provides significant guidance for evaluating the quality of *Tetragium hemsleyanum*, which will be beneficial to the rational development of *Tetragium hemsleyanum*. Above all, the MDF screening method combined with UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS qualitative analysis demonstrates its feasibility and unique advantages on identification of the chemical constituent of TCM.

Key words: *Tetragium hemsleyanum*; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/exactive Orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS); mass defect filter (MDF)

中药的化学成分组成中药的药效物质基础,快速准确鉴定其中的化学成分是评价中药质量和安全性的前提。随着高分辨液-质联用技术的飞速发展,其在中药定性分析上的应用越来越广泛。高分辨液-质联用产生海量数据,如何在海量数据中获取中药成分的有效鉴定信息是中药定性分析的关键。近年来,许多质谱数据挖掘技术,如提取离子流技术、中性丢失过滤技术、产物离子过滤技术等,得到较大程度的开发和应用^[1]。其中,一种基于高分辨质谱数据的过滤技术——质量亏损过滤技术(mass defect filter, MDF),对母核结构相同而取代基不同的类似物,经羟基化、甲基化、甲氧基化、糖基取代或结合反应之后,与母体化合物的质量亏损差异不大。根据这一规律对采集的高分辨质谱数据进行处理和识别,通过一次或有限次进样可从复杂背景中发现和鉴定中药成分^[2]。MDF方法作为一种 Orbitrap、飞行时间质谱等高分辨质谱数据的新型数据处理技术,可用于中药成分的系统分析,且具有独特优势^[3-4]。Fu等^[5]利用MDF技术从中药复方二至丸中鉴定出146个成分。王广基等^[4]利用MDF技术鉴定了50个麦冬皂苷类和27个麦冬高异黄酮类化合物。张加余等^[6]利用逐级MDF技术总结了黄酮类化合物结构规律,设置质量亏损范围,分5段对柑橘中的多甲氧基黄酮进行鉴定,共鉴定出81个化学成分。潘慧勤^[7]构建多边MDF算法靶向过滤潜在的生物碱,同时结合母离子列表高选择性地触发多级质谱裂解,最终从华钩藤茎、叶、花3个部位中共鉴定了198个生物碱。王放等^[8]采用色谱-高分辨质谱联用技术结合MDF方法筛选鉴定了苦碟子注射液中30个多酚类化合物和血浆中18个黄酮代谢产物。

三叶青属于葡萄科崖爬藤属植物,该科植物中的黄酮类化合物种类丰富。在藤茶中分离得到二氢杨梅素、槲皮素、芦丁等20个黄酮类成分^[9-10]。崔传文等^[11]对乌藟莓的全草进行分离得到木犀草素及其苷类、芹菜素和圣草酚。史国茹^[12]从岩五加中分离得到9个芹菜素苷类化合物。曾婷^[13]对石猴子进行分离得到(+)—儿茶素,山奈酚7-O- α -L-鼠李吡喃糖苷。以上研究表明,葡萄科植物的共性成分主要有

槲皮素及其苷类、木犀草素、芹菜素等。

现代药理研究表明^[14-16],三叶青具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、保肝和调节免疫等功能,其主要活性成分是芦丁、槲皮素、木犀草素、山奈酚、异鼠李素等黄酮类化合物。何煜舟等^[17]研究发现山奈酚对缺血再灌注损伤大鼠有保护作用,其作用可能与抗氧化、抑制半胱氨酸蛋白酶-3、减少脑细胞凋亡有关。刘昕等^[18]发现木犀草素可通过减轻线粒体损伤及抑制线粒体途径的心肌细胞凋亡,对心肌损伤起到保护作用。CHUAN等^[19]研究表明,异鼠李素可能通过干扰磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K-Akt-mTOR)通路抑制结肠直肠癌(CRC)细胞增殖。因此,深入了解这些黄酮类活性物质有助于明确三叶青整体药效的物质基础。

本实验拟采用UPLC-Q-Exactive采集-MDF-OTCML数据库检索-Mass Frontier验证的鉴定策略,对三叶青黄酮类化学成分进行定性分析,希望为后续的质量控制奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱仪:美国赛默飞世尔科技公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及Xcalibur3.0数据处理系统;KQ-250E型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;MX-F涡旋混合器、MS-PB磁力搅拌器:武汉赛维尔生物科技有限公司产品;低温高速离心机:德国 Heraeus 公司产品;CP225D-万分之一电子天平:德国 Sartorius AG 公司产品;MTN-2800D氮吹仪:天津奥特赛恩斯仪器有限公司产品。

1.2 试剂与样品

对照品:山奈酚(Lot:S-014-151208)、异槲皮苷(Lot:Y-076-150722)、紫云英苷(Lot:Z-020-160519)、芦丁(Lot:L-001-160520);成都瑞芬思生物科技有限公司产品;异鼠李素(Lot:110860-200406)、儿茶素(Lot:110878-200103)、表儿茶素(Lot:110878-200102);由中国食品药品检定研究院提供;乙腈、甲酸:色谱纯,美国赛默飞世尔科技有限公司产品;实验用水为纯净水;广州屈臣氏食品饮料有限公司产品。

1.3 药材

三叶青:产地浙江,批号 1703170892,安徽省亳州市中药科技有限公司产品,经山东中医药大学药学院生药学徐凌川教授鉴定为葡萄科崖爬藤属植物三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 的根茎。

1.4 实验方法

1.4.1 供试品溶液的制备 取适量的三叶青药材,粉碎过 40 目筛,干燥至恒重(50 °C),精密称取 15 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 10 倍量的 75%乙醇,称定质量,回流提取 3 次,每次 1 h,减压浓缩,蒸发至干,用 50%乙腈溶解,加水稀释至乙腈含量为 15%(V:V),过 0.22 μm 微孔滤膜。

1.4.2 对照品溶液的制备 精密称取适量的山奈酚、槲皮苷、芦丁、紫云英苷等对照品,加乙腈超声溶解,定容至 10 mL,用水稀释至 5 mg/L,置于 4 °C 冰箱中保存,备用,过 0.22 μm 微孔滤膜。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 Halo-C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×2.7 μm);流动相:A 为 0.05%甲酸溶液,B 为 0.05%甲酸乙腈溶液;梯度洗脱:0~15 min(15%B),15~22 min(15%~40%B),22~50 min(40%~90%B),50~60 min(90%~15%B);流速 0.3 mL/min;柱温 30 °C;进样量 3 μL。

1.5.2 质谱条件 HESI 离子源,正、负离子监测模式;裂解电压 3.00 kV;辅助气流量 10 mL/min;离子传输管温度 320 °C;辅助气温度 350 °C;扫描模式:Full MS/dd-MS²,Full MS 分辨率 70 000,dd-MS² 分辨率 17 500;质量扫描范围 m/z 100~1 500。MS/MS 模式时,负离子模式下的碰撞能分别为 30、50、70 eV,正离子模式下的碰撞能分别为 10、30、50 eV。

1.6 化合物结构鉴定分析

1.6.1 UPLC-Q-Exactive 采集-MDF-OTCML 数据库检索-Mass Frontier 验证 将 OTCML 数据库导入 Compound Discoverer 2.1 软件,根据化合物不同加和离子的质荷比、同位素丰度、碎片离子等信息,对经过 MDF 过滤的数据进行数据库检索并综合打分,从而快速鉴定化合物的结构。同时使用 Mass Frontier 软件进行验证,操作如下:首先,利用 Mass Frontier 的 Chromatogram Processor 模块打开原始数据

文件(.raw),打开左侧的二级碎片,选择预测化合物母离子的二级碎片,选择其中一个扫描点,调出二级谱图,复制粘贴至 Database Manager;之后双击右侧空白处,弹出 Structure Editor 界面,导入预测化合物结构,进行 Fragments and Mechanisms;然后,在 Database Manager 界面出现匹配结果,红色棒代表匹配成功,同时可得到匹配的碎片离子及裂解机制,可通过对照品和参考文献进一步确证,确定最终化合物。

1.6.2 OTCML 数据库检索结果分析 本实验在进行 OTCML 数据库检索过程中发现,同一分子质量下含有多种物质,会导致实验结果的不准确性。针对这种情况,可以通过对照品比对二者的保留时间、二级质谱碎片离子等进行确认。若暂时无法获得对照品或标准品物质,可以通过解析已确定的黄酮类物质二级质谱或借助 Mass Frontier 软件推测黄酮类物质可能的裂解方式,总结这类物质的裂解规律,在此基础上,根据检测到的有关物质的二级碎片离子,推测其可能的化学结构,若碎片离子均能得到合理解释,则认为推测结果合理;也可根据碰撞能量下的碎片离子峰不同或相同碎片离子峰丰度的不同进行鉴定。

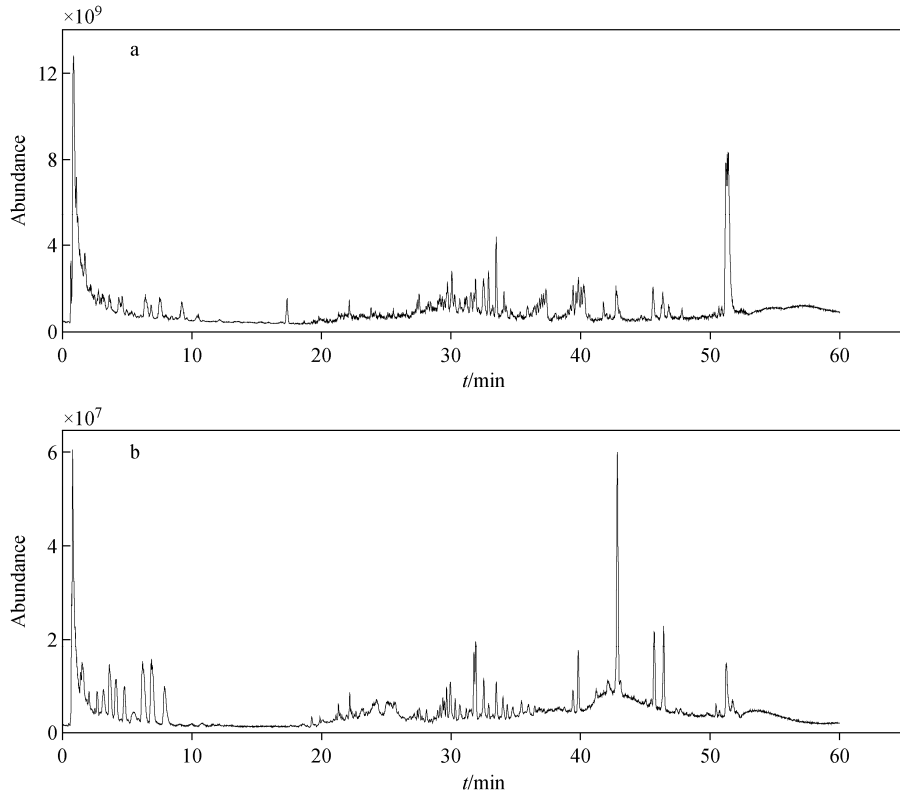
2 结果与讨论

2.1 UPLC-Q-Exactive 采集-OTCML 数据库检索-Mass Frontier 验证结果

三叶青的 UPLC-Q-Exactive/MS 总离子流图示于图 1。根据 1.6 节的分析方法,共得到 22 种黄酮类化学成分,结果列于附表 1(因篇幅所限,请登录“质谱学报”官方网站下载附表,网址: <http://www.jcmss.com.cn>)。

2.2 UPLC-Q-Exactive 采集-MDF-OTCML 数据库检索-Mass Frontier 验证结果

为尽量减少基质离子的潜在干扰,采用 MDF 策略鉴定特征性成分。依据 MDF 概念,根据母核或者亚结构确定质量亏损过滤模板。查阅相关文献,确定正负离子模式下黄酮苷元类母体模板为 5,7,4'-三羟基黄酮,黄酮苷类母体模板为 5,7,4'-三羟基黄酮加单取六碳糖。然后根据取代基的种类、数量确定 MDF 的各参数值,列于表 1。



注:a. 正离子模式;b. 负离子模式

图 1 三叶青样品 UPLC-Q-Exactive/MS 总离子流色谱图

Fig. 1 UPLC-Q-Exactive/MS total ion chromatogram of *T. hemsleyanum*

表 1 三叶青黄酮类化学成分 MDF 各参数值

Table 1 MDF values of flavonoids in *Tetragium hemsleyanum*

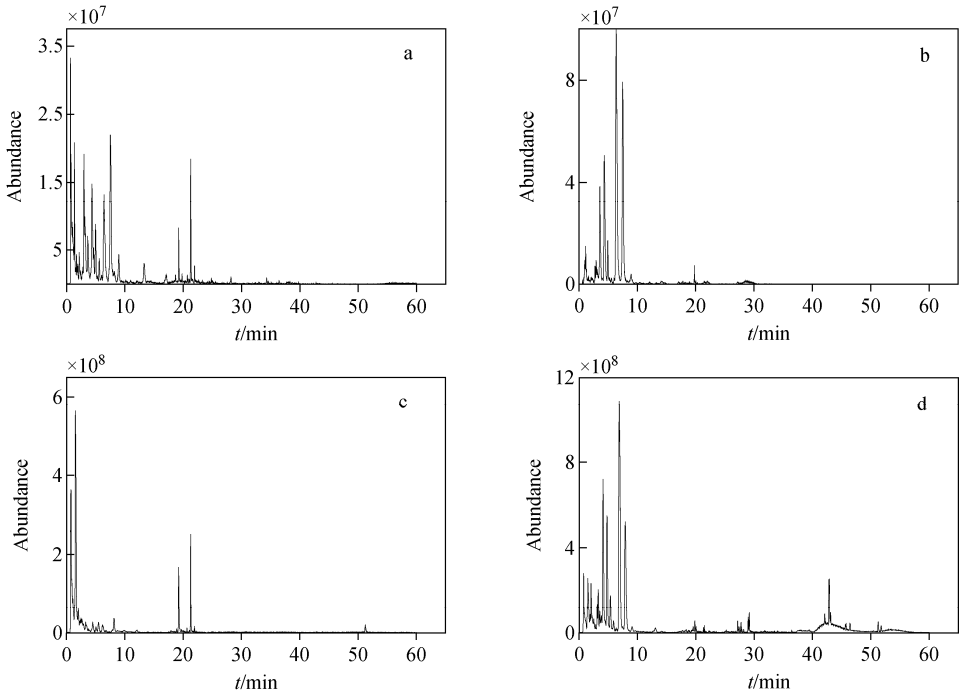
黄酮类成分 Flavonoids	离子 Ion	质量范围 Mass range/u	质量亏损范围 Mass loss range/mmu
黄酮苷元	正离子	271~391	28~93
	负离子	269~389	28~93
黄酮苷	正离子	432~770	79~180
	负离子	430~768	79~180

经 MDF 过滤后,在 1.5 节分析条件下,分别得到正负离子模式下三叶青样品的 UPLC-Q-Exactive/MS 离子流图,示于图 2。根据 1.6 节分析方法,共得到 41 种黄酮类化学成分,其中 17 种黄酮类化合物,24 种黄酮苷类化合物。与未经 MDF 过滤处理的策略相比,该方法多鉴定出 19 种黄酮类化学成分,详细结果列于附表 1。MDF 设定的关键在于模板的选择,一般有常用原药、核心基团、结合物及其他类型等模版^[20]。MDF 可以通过一次或有限次进样从复杂背景中发现和鉴定药物及其代谢产物,具有独特优势^[1]。本实验将高分辨质谱产生的海量数据通过 MDF 技术的过滤

获得更小、更精炼的数据集,从而挖掘出三叶青更多潜在的黄酮类化合物。结果表明,MDF 技术通过去除背景离子的干扰,在一定程度上可以排除假阳性的结果,提高筛选目标物的准确率。

2.3 代表性化合物结构解析与辅助验证

2.3.1 黄酮类化合物 通过 OTCML 数据库检索,初步推测化合物 1、30、36 分别为儿茶素、槲皮素、异鼠李素。利用 Mass Frontier 的谱图匹配功能验证推测结果的准确性,将匹配得到的各化合物二级碎片与文献^[21]进行对比验证,其中儿茶素、异鼠李素经对照品比对确认,与 Mass Frontier 验证结果一致。



注: a. 正离子模式非糖苷物质; b. 正离子模式糖苷物质; c. 负离子模式非糖苷物质; d. 负离子模式糖苷物质

图 2 经 MDF 过滤的三叶青样品 UPLC-Q-Exactive/MS 总离子色谱图

Fig. 2 UPLC-Q-Exactive/MS total ion chromatogram of *T. hemsleyanum* by MDF

经 OTCML 数据库检索,推测化合物 24 为柚皮素,其准分子离子峰为 m/z 271.061 00 $[M-H]^-$,在 Mass Frontier 中匹配的二级碎片包括 m/z 107 $[M-H-C_9H_8O_3]^-$ 、 m/z 151 $[M-H-C_8H_8O]^-$ 和 m/z 177 $[M-H-C_5H_2O_2]^-$ 。通过与文献[21]对比,确定该化合物为柚皮素,推测其母离子 m/z 271 的 C 环分别发生 1,3 和 0,4 键断裂,形成碎片离子 $[A^{1,3}]^-$ 、 $[A^{0,4}]^-$ 和 $[B^{0,4}]^-$,其可能的裂解途径示于图 3。

经 OTCML 数据库检索,推测化合物 32 为木犀草素,其准分子离子峰为 m/z 287.053 77 $[M+H]^+$,在 Mass Frontier 中匹配的二级碎片包括 m/z 271 $[M+H-O]^+$ 、 m/z 269 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 223 $[M+H-CO-2H_2O]^+$ 、 m/z 147 $[M+H-2O-C_6H_4O_2]^+$ 和 m/z 139 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$ 。通过与文献[21]对比,确定该化合物为木犀草素,推测其母离子 m/z 287 的裂解途径主要有 3 种:1) 母离子 m/z 287

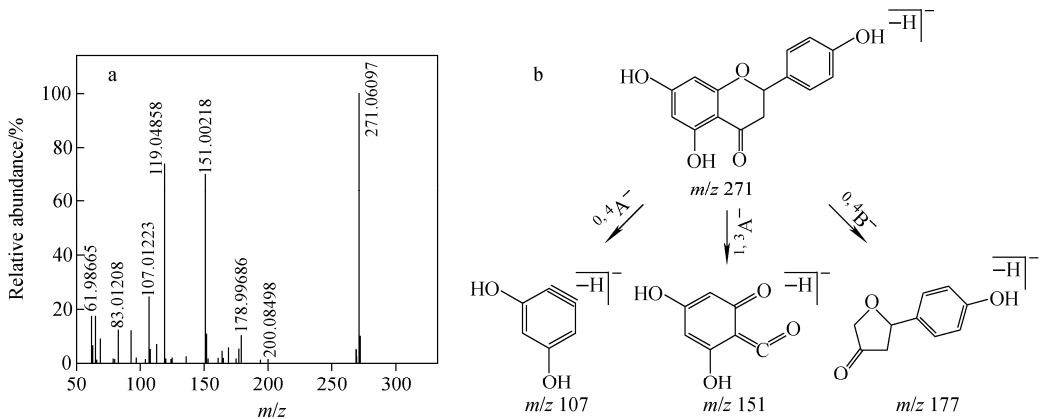


图 3 负离子模式下,峰 24 的质谱图(a)及其裂解途径(b)

Fig. 3 Mass spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of peak 24 at negative ion mode

失去 1 分子 H_2O 生成 m/z 269, 再丢失 1 分子 H_2O 生成 m/z 251, 继续丢失 1 分子 CO 生成 m/z 223; 2) 母离子 m/z 287 丢失 1 分子 O 生成 m/z 271, 再丢失 1 分子 O 生成 m/z 255, 继续丢失 1 分子 $C_6H_4O_2$ 生成 m/z 147; 3) 母离子 m/z 287 直接丢失 $C_9H_8O_2$ 生成 m/z 139。

2.3.2 黄酮苷类化合物 经 OTCML 数据库检索, 推测化合物 8、9、10 分别为金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素-3- β -D-葡萄糖苷, 它们的准分子离子峰均为 m/z 463 $[M-H]^-$, 且在 ESI-MS² 谱中均出现 m/z 301, 表明可能是以槲皮素或异槲皮素为苷元的黄酮醇糖苷。它们中性丢失的糖基团相对分子质量为 162, 表明三者可能是葡糖糖苷或半乳糖苷。同时, 三者均产生 m/z 179 和 m/z 151 的特征 RDA 碎片离子。各化合物的二级碎片与文献[21]一致, 与 Mass Frontier 验证一致, 并经对照品比对确认化合物 8、9、10 分别为金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素-3- β -

D-葡萄糖苷。

经 OTCML 数据库检索, 推测化合物 22 为紫云英苷, 其准分子离子峰为 m/z 447.093 81 $[M-H]^-$, 在 Mass Frontier 中匹配的二级碎片包括 m/z 285 $[M-H-Glu]^-$ 、 m/z 257 $[M-H-Glu-CO]^-$ 、 m/z 255 $[M-H-Glu-CH_2O]^-$ 、 m/z 229 $[M-H-Glu-2CO]^-$ 和 m/z 227 $[M-H-Glu-CH_2O-CO]^-$, 通过与文献[20]对比, 确定为紫云英苷, 二级碎片 m/z 285 是由 m/z 609 失去 1 分子葡萄糖形成的。之后二级碎片 m/z 285 发生 RDA 裂解, 生成 m/z 257 和 m/z 255。 m/z 255 丢失 1 分子 CO_2 生成 m/z 211; m/z 257 丢失 1 分子 CO 生成 m/z 229, 其裂解途径示于图 4。

经 OTCML 数据库检索, 推测化合物 23 为水仙苷, 其准分子离子峰为 m/z 623.160 83 $[M-H]^-$, 在 Mass Frontier 中匹配的二级碎片包括 m/z 315 $[M-H-Glu-Rha]^-$ 、 m/z 300

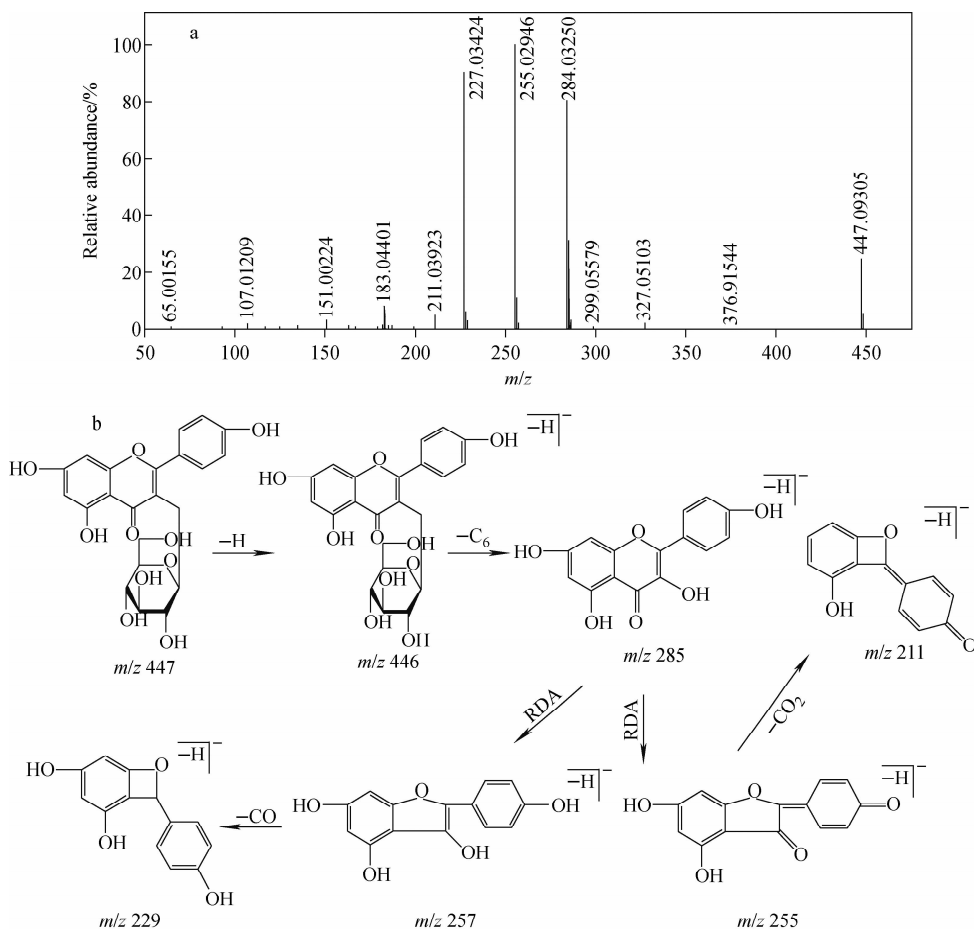


图 4 负离子模式下, 峰 22 的质谱图(a)及其裂解途径(b)

Fig. 4 Mass spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of peak 22 in negative ion mode

$[M-H-Glu-Rha-CH_3]^-$ 、 m/z 287 $[M-H-Glu-Rha-CO]^-$ 、 m/z 271 $[M-H-Glu-Rha-CO_2]^-$ 、 m/z 259 $[M-H-Glu-Rha-2CO]^-$ 、 m/z 243 $[M-H-Glu-Rha-CO-CO_2]^-$ 。通过与文献[22]对比,确定该化合物为水仙草甘,推测其母离子 m/z 623 裂解途径主要有 3 种:1) 母离子 m/z 623 失去 1 分子 Glu 和 Rha 生成 m/z 315,继续丢失 1 分子 CO_2 生成 m/z 271;2) 母离子 m/z 623 失去 1 分子 Glu 和 Rha 生成 m/z 315,再丢失 1 分子 CO 生成 m/z 287,继续丢失 1 分子 CO_2 生成 m/z 243;3) 母离子 m/z 623 失去 1 分子 Glu 和 Rha 生成 m/z 315,继续丢失 1 分子 CH_3 生成 m/z 300。

3 结论

本实验在对三叶青乙醇冷浸液进行 UPLC-Q-Exactive 获取分析数据的基础上,采用 MDF 筛选方法共鉴定出 41 个黄酮类化合物,其中 19 个为首次发现的黄酮类化合物。研究表明,基于 UPLC-Q-Exactive 分析的 MDF 筛选方法应用于中药化学成分的系统定性分析具有可行性和独特优势。本方法对于科学评价三叶青质量,促进三叶青合理开发具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 侯艳婷,王晓明,张家伟,潘桂湘. 高分辨质谱数据 MDF 技术的进展[J]. 天津中医药,2016,33(12):765-768.
HOU Yanting, WANG Xiaoming, ZHANG Jiawei, PAN Guixiang. Progress in MDF technology of high resolution mass spectrometry data[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 33(12):765-768(in Chinese).
- [2] 张丹,王彩虹,金滢,王喆,张金兰. 高效液相色谱-高分辨质谱法研究药物代谢产物的数据处理策略[J]. 质谱学报,2017,38(4):410-416.
ZHANG Dan, WANG Caihong, JIN Ying, WANG Zhe, ZHANG Jinlan. Study on data processing strategy of drug metabolites by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(4): 410-416(in Chinese).
- [3] YANG L, SUN H, SUN W J, ZHAO L, MENG X C, WANG X J. Rapid and global detection and characterization of aconitum alkaloids in Yin

Chen Si Ni Tang, a traditional Chinese medical formula, by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and automated data analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53(3): 421-431.

- [4] XIE T, LIANG Y, HAO H P, JIYE A, XIE L, GONG P, DAI C, LIU L S, KANG A, ZHENG X, WANG G J. Rapid identification of ophiopogonins and ophiopogonones in *Ophiopogon japonicus* extract with a practical technique of mass defect filtering based on high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1 227: 234-244.
- [5] FU L L, DING H, HAN L F, LI J, YANG W Z, ZHANG C X, HU Y, ZUO T T, GAO X M, GUO D A. Simultaneously targeted and untargeted multicomponent characterization of Erzhi Pill by offline two-dimensional liquid chromatography/quadrupole-Orbitrap mass spectrometry[J]. Chromatogr A, 2019, 1 584: 87-96.
- [6] ZHANG J Y, WANG F, ZHANG H, LU J Q, QIAO Y J. Rapid identification of polymethoxylated flavonoids in traditional chinese medicines with a practical strategy of stepwise mass defect filtering coupled to diagnostic product ions analysis based on a hybrid LTQ-Orbitrap mass spectrometer[J]. Phytochemical Analysis, 2014, 25(5): 405-414.
- [7] 潘惠勤. 基于液相-高分辨质谱的多基原钩藤生物碱系统表征研究[D]. 上海:中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所),2018.
- [8] 王放. 基于 LC-HR-MSⁿ 的苦碟子及血栓通注射剂化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [9] LI H, LI Y, ZHANG Y, SHI H, HU W, ZHANG Z. Comparison of refluxing, ultrasonic and microwave-assisted extraction of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*[J]. J AOAC Int, 2008, 91(6): 1 278-1 283.
- [10] ZHANG Y S, ZHANG Q Y, LI L Y, WANG B, ZHAO Y Y, GUO D A. Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin and myricetin in rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of *Ampelopsis grossedentata* decoction[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 860(1): 4-9.
- [11] 崔传文,孙翠玲,陈全成,邹秀红,黄学敏,陈海峰. 乌菖莓化学成分的初步探究[J]. 中国中药

- 杂志,2012,37(19):2 906-2 909.
- CUI Chuanwen, SUN Cuiling, CHEN Quancheng, ZOU Xiuhong, HUANG Xuemin, CHEN Haifeng. A preliminary study on the chemical constituents of black berry[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(19): 2 906-2 909 (in Chinese).
- [12] 史国茹. 岩五加生物活性化学成分研究[D]. 天津医科大学,2012.
- [13] 曾婷. 石猴子化学成分的研究[D]. 赣南师范学院,2013.
- [14] 冯正权,倪克锋,何煜,丁志山,朱峰,吴良村,沈敏鹤. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006(06):669-672.
- FENG Zhengquan, NI Kefeng, HE Yu, DING Zhi-shan, ZHU Feng, WU Liangcun, SHEN Minhe. Experimental study on apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells induced by Clover Flavonoids[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2006(06): 669-672(in Chinese).
- [15] 倪克锋,金波,蒋福升,黄挺,冯正权,林胜友,吴良村,黄伶. 三叶青黄酮对 H₂₂ 荷瘤小鼠 TIMP-2mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药科技,2009,16(03):195-196.
- NI Kefeng, JIN Bo, JIANG Fusheng, HUANG Ting, FENG Zhengquan, LIN Shengyou, WU Liangcun, HUANG Ling. Effects of flavonoids on the expression of TIMP-2 mRNA in H₂₂ tumor-bearing mice[J]. Chinese Traditional Chinese Medicine Science and Technology, 2009, 16(03): 195-196(in Chinese).
- [16] 余纳,吴晓尉,汪芳裕. 三叶青总黄酮抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国中西医结合消化杂志,2015,23(09):670-672.
- YU Na, WU Xiaoyu, WANG Fangyu. Research progress in anti-tumor effect of total flavonoids from *Trifolium repens* L[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2015, 23(09): 670-672(in Chinese).
- [17] 何煜舟,丁美萍,汪云开,徐纛,黄小民,张卓一,陈璐,寿旗扬. 山萘酚对缺血再灌注脑损伤大鼠的保护作用[J]. 中华中医药学刊,2009,27(08): 1 673-1 675.
- HE Yuzhou, DING Meiping, WANG Yunkai, XU Wei, HUANG Xiaomin, ZHANG Zhuoyi, CHEN Wei, SHOU Qiyang. Protective effects of Kaempferol on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2009, 27(08): 1 673-1 675(in Chinese).
- [18] 刘昕,林琳,倪雅娟,魏瑾,张超英. 木犀草素可减轻异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体的损伤[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2019,18(09):693-698.
- LIU Yu, LIN Lin, NI Yajuan, WEI Wei, ZHANG Chaoying. Luteolin can alleviate mitochondrial damage in myocardial cells of rats with heart failure induced by isoproterenol[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2019, 18(09): 693-698(in Chinese).
- [19] CHUAN L I, XI Y, CHENG C, CAI S X, HU J B. Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(3): 935-940.
- [20] 宋慧婷,李长印,万瑶瑶,丁选胜,谭喜莹,戴国梁,刘史佳,居文政. 应用基于 LC-TOF-MS 分析的质量亏损过滤方法筛选黄芪注射液中的皂苷类成分[J]. 中国中药杂志,2017,42(04):686-695.
- SONG Huiting, LI Changyin, WAN Yaoyao, DING Xuansheng, TAN Xiyang, DAI Guoliang, LIU Shijia, JU Wenzheng. Application of mass loss filtering method based on LC-TOF-MS analysis to screen saponins in Astragalus injection [J]. Chinese Journal of traditional Chinese Medicine, 2017, 42(04): 686-695(in Chinese).
- [21] 白海玉,刘宝忠,霍金海. 基于液质联用技术的野菊花中黄酮成分分析[J]. 中国中医药科技,2018,25(06):826-830.
- BAI Haiyu, LIU Baozhong, HUO Jinhai. Analysis of flavonoids in wild chrysanthemum based on liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2018, 25(06): 826-830(in Chinese).
- [22] 郑成凤,潘裕添,蔡文燕,苑小宁,高飞. HPLC-UV-MS/MS 法对金线莲中黄酮类组分的鉴定和测定[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(10): 1 381-1 386.
- ZHENG Chengfeng, PAN Yutian, CAI Wenyang, YUAN Xiaoning, GAO Fei. Identification and determination of flavonoids in *Anoectochilus chinensis* by HPLC-UV-MS/MS[J]. Natural Product Research and Development, 2013, 25(10): 1 381-1 386(in Chinese).

附表 1 三叶青黄酮类化学成分色谱及质谱数据

Schedule 1 Chromatography and mass data of each chemical constituent of T.hemsleyanum's Flavonoid

编号	t_R min	鉴定结果	分子式	M-H			M-H 二级碎片			M+H			M+H 二级碎片		
				检测值	理论值	偏差	检测值	理论值	偏差	检测值	理论值	偏差	检测值	理论值	偏差
1◇•	1.3	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.07166	289.26125	-0.18959	109.02799	121.02802	125.02299	291.08505	291.08631	-0.00126	119.04891	123.04377	139.03842
							137.02307	140.04240	150.03122				147.04374	161.05907	177.06963
							161.05966	179.03368	187.03914				207.06444	231.06465	249.07437
							203.07071	205.05005	227.07031				273.07495		
							245.08165	271.06100							
2◇•	1.3	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.07178	289.26125	-0.18947	109.02782	125.02280	150.03099	291.08453	291.08631	-0.00178	119.049	123.04379	139.03844
							161.05949	179.03369	187.03905				161.05908	165.05402	179.06946
							203.03045	205.04968	245.08127				207.06444	231.06465	249.07437
							271.06088						273.07495		
3◇•	2.00	夏佛塔昔	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄						565.15363	565.15518	-0.00155	325.06937	379.07980	397.09070	
4◇•	2.04	儿茶精	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.07169	289.07176	-0.00007	57.03287	81.03289	291.08631	291.08521	0.0011	123.04377	139.03482	165.05402	
												179.06963			
5•▲	3.67	槲皮素 -3-0-鼠李素糖	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆						611.15833	611.16066	-0.00233	303.04861	449.10687	466.10483	

6	◇•	3.68	-7-O-葡萄糖苷 山茶苷 β	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	725.19293	725.19345	-0.00052	227.03409	255.02934	284.03229	727.20577	727.208	-0.00223	287.05380	449.10675	581.14795
														595.16199		
7	◇•	4.18	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.14502	609.51118	-0.36616	211.03934	227.03409	229.01407	611.15814	611.16066	-0.00252	229.04774	285.03806	303.04861
								255.02937	256.03317	284.03244				466.10483		
								301.03467								
8	◇•	4.86	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08780	463.08820	-0.0004	151.00215	179.02928	255.02943	465.10101	465.10275	-0.00174	153.01759	229.04865	257.04309
								271.02469	301.03424					303.04852		
9	◇•	4.86	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08902	463.36974	-0.28072	151.00246	179.02962	255.02979	465.10199	465.10275	-0.00076	121.02827	153.01768	201.05414
								271.02502	300.02777	301.03461				229.04865	257.04343	285.03824
														303.0485	447.34503	
10	•▲	4.86	槲皮素 -3-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.08801	463.08820	-0.00019	151.08693	179.03807	243.02928						
								271.02469	301.03424							
11	•▲	5.04	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁							449.10632	449.10784	-0.00152	213.05453	287.05371	427.19876
12	◇•	5.15	二氢槲皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.05093	303.15103	-0.09937	125.02279	175.03876	199.03896						
13	◇•	5.46	山奈酚	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.13501	579.13554	-0.00053	227.03423	255.02948	284.03244	581.14795	581.1501	-0.00215			

28	▲	17.63	田基黄 苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.09299	447.09328	-0.00029	151.00220	178.99733	227.03467	449.10611	449.10784	-0.00173	287.05389	304.05197	449.10684
								255.02974	301.03506							
29	▲	17.06	阿福豆 苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$							433.11292	433.14422	-0.0313	213.05392	241.04785	288.05710
30	◇	19.27	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	301.03522	301.03428	0.00094	93.03287	107.01218	121.02785	303.04849	303.04993	-0.00144	89.02267	119.03337	137.02304
								149.02292	151.00220	178.99734				151.04437	185.05527	229.08194
								209.11930						257.23267	397.13409	415.15673
31	◇	19.27	桑黄素	$C_{15}H_{10}O_7$	301.03503	301.03538	-0.00035	151.00220	178.99734	273.04047	303.04852	303.04993	-0.00141	229.04857	257.04346	
32	▲	19.29	木犀草 素	$C_{15}H_{10}O_6$	285.03998	285.04046	-0.00048	175.03879	217.05332	241.05081	287.05377	287.05501	-0.00124	139.02391	147.03943	223.05064
								269.04379						255.03955	269.47590	
33	◇	20.63	柚皮苷 查尔酮	$C_{15}H_{12}O_5$	271.06107	271.0612	-0.00013	119.04862	151.00224	187.03883						
								227.07115								
34	▲	20.96	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	269.04532	269.04445	0.00087	101.85321	117.03296	158.04393	271.16776	271.06010	0.10766	182.09579	229.09082	243.11996
								179.05487	181.06482	183.04428						
								185.02444	197.05956	225.05490						
								213.05417	225.06078	227.03430						
								251.04973								
35	▲	21.4	山奈酚	$C_{15}H_{10}O_6$	285.04025	285.22948	-0.18923	133.02953	151.02831	185.04402	287.05306	287.05501	-0.00195	121.01772	183.02838	241.06477
								229.05060	255.02993	257.04554						
36	▲	21.64	异鼠李	$C_{16}H_{12}O_7$	315.05066	315.25551	-0.20485	63.02228	151.00226	163.00204	317.06403	317.06558	-0.00155	229.06482	257.04333	302.04086

37	◇	22.58	牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.23251	433.11292	0.11959	93.07002	121.10091	135.11632
	●							293.11319	317.24597	335.25653
								399.23444	415.222666	
38	●▲	22.8	天竺葵色素	$C_{15}H_{10}O_5$	271.07971	271.06010	0.01961	165.01733	183.02785	197.05875
39	●▲	22.8	黄芩苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447.09218	447.06010	0.03208	183.02785	197.05875	215.06958
								242.19658		
40	▲●	25.51	黄芩素	$C_{15}H_{10}O_5$	271.06010	271.07575	-0.01565	172.05051	203.17911	239.19954
								269.04337		
41	◇●	27.26	异牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.23309	433.11292	0.12017	67.05476	95.08564、	107.08553
								135.11626	279.23077	301.90817
								317.24625	335.25653	415.22266

注：◇为 MDF 过滤前发现的黄酮类化学成分；●为 MDF 过滤后发现的黄酮类化学成分；▲为 MDF 过滤新发现黄酮类化学成分