

MS-DAIL 联合 MS-FINDER 鉴定 中药黄酮类化合物*

陶嘉磊¹, 单进军², 袁斌^{1**}

(1. 江苏省中医院 南京 210029; 2. 南京中医药大学中医儿科学研究所 南京 210023)

摘要:目的 分析判断 MS-DAIL 与 MS-FINDER 联合运用以鉴定中药黄酮类化合物的可行性。方法 采用 UPLC-MS/MS 技术检测含有 20 种黄酮类化合物的混合对照品溶液, 利用 MS-DAIL 联合 MS-FINDER 对特征峰进行提取、数据库比对与物质鉴定。结果 MS-DAIL 与 MS-FINDER 联合运用可以快速获取黄酮类化合物 MS/MS 特征谱, 与数据库中图谱进行匹配, 根据得分共准确鉴定出黄酮类化合物 15 种, 鉴定错误 5 种, 准确率为 75%, 其中 1 种无谱图信息, 有 4 种存在 MS/MS 谱相似的异构体。结论 MS-DAIL 与 MS-FINDER 的联合使用以鉴别中药黄酮类成分高效简便, 是初步鉴定黄酮类化合物的可选方式。

关键词: 黄酮 化学成分 鉴定方法 UPLC-MS/MS MS-FINDER

doi: 10.11842/wst.20201221005 中图分类号: R284 文献标识码: A

中药作为重要的疾病防治资源已有几千年历史。与化学结构明确, 药物靶点清晰, 代谢机制相对清楚的西药相比, 中药具有物质成分复杂, 代谢与作用途径多样等特点, 不利于中药防治疾病作用机制的阐明, 一定程度上制约了中医药的发展。黄酮类化合物主要指两个芳环通过中间三碳原子(C6-C3-C6)相连的一系列化合物, 在世界各地植被中广泛存在, 能够调控植物的生长、发育以及抗菌防病能力。类黄酮作为一类重要的中药成分, 具有广泛的生物活性, 包括提升认知^[1], 抗炎抗氧化^[2], 抑制肿瘤细胞^[3], 改善心血管功能^[4], 抗病原微生物^[5], 调控肠道菌群结构^[6]等。同时, 纳米技术和化学修饰技术的应用在很大程度上克服了某些类黄酮生物利用度低的问题, 让类黄酮成为医学研究中最受关注的天然药物化学成分^[7]。迄今为止, 植被中已知的类黄酮超过 5000 种, 主要存在于唇形科、伞形科, 以及菊科、芸香科和豆科等植物中, 且不断有新的类黄酮成分被提纯鉴定出。基于类黄酮的广泛生物学活性, 有必要对中药中类黄酮成分进行

大范围的定性和定量分析, 从而为中药的质量控制或药效学研究提供依据。

当下, 常用的类黄酮定性方法存在操作繁琐、分析不准确、检索信息不完整、成本高等缺点。如何低成本而高效的尽可能多的鉴定出各种类黄酮是值得探索的问题。MS-FINDER 是由日本理化研究所可持续资源科学中心和美国西海岸代谢组学中心联合开发的代谢小分子分析平台^[8], 除了包含 NIST、MassBank 等 14 种库中的 MS/MS 谱图信息外, 该数据库还收录了 3000 多种自己构建的黄酮类化合物 MS/MS 谱图数据。结合光谱反卷积 MS-DAIL 软件进行高分辨率色谱-质谱分析, 可以更好地鉴定多种黄酮类化合物^[8,9]。本研究采用 UPLC-MS/MS 技术检测了黄酮类化合物的混合对照品(含 20 种类黄酮), 通过 MS-DAIL 和 MS-FINDER 相结合的方法对其进行了鉴定, 从而对该方法的可行性和准确度进行分析、评价, 为课题组定性分析经聚酰胺树脂分离纯化的清肺口服液类黄酮组分提供依据与参照^[10], 同时也为中药药效基础相关研

收稿日期: 2020-12-21

修回日期: 2021-09-19

* 国家自然科学基金委员会面上项目(81873340): I 型干扰素通路介导的清肺口服液类黄酮组分抗 RSV 的机制研究, 负责人: 袁斌。

** 通讯作者: 袁斌, 教授、主任中医师, 主要研究方向: 小儿肺系、肾系疾病研究。

究提供参照。

1 材料

1.1 主要仪器

LTQ Orbitrap XL 串联质谱仪与 UltiMate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔公司); Allegra 64R 离心机(美国贝克曼库尔特公司); CPA225D 电子天平(德国萨多利斯公司)。

1.2 主要试剂

对照品牡荆素(vitexin, 批号 lw18041706)、儿茶素(catechin, 批号 lw18013103)、当药黄素(swertisin, 批号 lw18041607)、木犀草苷(luteoloside, 批号 lw18032905)、橙皮苷(hesperidin, 批号 lw180619-038)、芹菜素(apigenin, 批号 lw18010301)、异槲皮苷(isoquercitrin, 批号 lw18022308)、表儿茶素(epicatechin, 批号 lw18011603)、羌花素(genkwanin, 批号 lw18041612)、槲皮苷(quercitrin, 批号 lw18041101)、桑辛素(morusin, 批号 lw180729069)、木犀草素(luteolin, 批号 lw18040208)从南京良纬生物科技有限公司购买; 樱黄素(prunetin, 批号 JBZ-1561)、山奈酚 7-O-鼠李糖苷(kaempferol 7-O-rhamnoside, 批号 JBZ-1747)、大波斯菊苷(cosmosiin, 批号 JBZ-0947)、山奈酚(kaempferol, 批号 JBZ-1079)、柚皮素查尔酮(naringenin chalcone, 批号 JBZ-1437)从南京金益柏生物科技有限公司购入; 异鼠李素(isorhamnetin, 批号 BCY-00856)、槲皮素(quercetin, 批号 BCY-00863)、野鸢尾黄素(irigenin, 批号 BCY-01185)购自江西佰草源, 上述黄酮类化合物对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。乙腈(Merk, 德国), 甲醇(Merk, 德国), 甲酸(ROE, 美国), 二甲基亚砜(Sigma, 美国)均为色谱纯。

2 方法

2.1 混合对照品的制备

分别取适量的异鼠李素、山奈酚 7-O-鼠李糖苷、柚皮素查尔酮、异槲皮苷等 20 种类黄酮对照品, 用二甲基亚砜制备母液(作为细胞或其他实验的储存液), 用甲醇稀释至 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具体摩尔浓度见表 1。在 $17000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 取上清进样。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC[®] CSH C¹⁸ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),

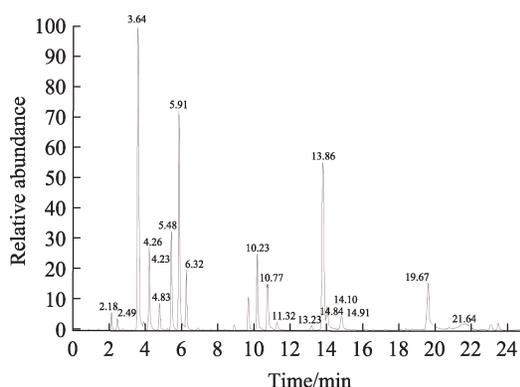


图1 20种类黄酮混合溶液 LC-MS 总离子流图

洗脱的梯度为: 0-23 min, 80%-42% A; 23-24 min, 42%-10% A; 24-25 min, 10%-80% A。样品温度 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 体积流量 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $3 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 质谱条件

质谱主要参数为: 蒸发器温度 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 毛细管温度 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 辅助气流速: 10 arb, 鞘气流速: 45 arb, 管状透镜电压 100 V, 电喷雾电压 3.5 kV, 毛细管电压 35 V, 源电流 $100 \mu\text{A}$ 。全扫描(Full Scan, m/z 250-900), 采集时间为 0-25 min, 以二级质谱扫描方式(dd-MS2, Top N = 3)。上述黄酮类化合物在负离子模式下响应性较好, 因此本实验选择负离子模式进行检测。

2.3 数据处理

采用 MS-DIAL 对收集到的 Raw 类型数据文件进行预处理, 得到混合对照溶液中 20 种类黄酮类化合物的质谱信息。把数据导入至 MS-FINDER 分析平台中, 通过设置化合物的组成元素、候选物质的个数和数据库的搜索范围等参数来匹配 MS/MS 数据并搜索结构。通过平台内部设定的算法得到可能匹配上的化合物以及平台库中候选物质的得分, 根据分值高低和 MS/MS 图谱的拟合度对物质进行识别。

3 结果

3.1 类黄酮化合物混合对照品总离子流图

如图 1 示, CSH C¹⁸ 色谱柱能将混合液中的类黄酮成分较好地分离开, 各黄酮类化合物峰型优良, 出峰时间在 2-22 min 范围内, 于 2-15 min 时间段内集中。通过 MS/MS 比对结合单标准品色谱峰时间, 测定这 20 种类黄酮类化合物的保留时间(图 1、表 1)。在这 20 种类黄酮类化合物中, 儿茶素极性最大, 水溶性最好, 最先出峰, 保留时间为 2.18 min, 与儿茶素为同分异构体的表儿茶素随后出峰(2.49 min), 且能够与儿茶素谱峰

表1 UPLC-MS/MS检测的20种黄酮类化合物以及MS-FINDER平台鉴别结果

名称	类型	t_R /min	分子式	[M-H] ⁻	进样浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MS-FINDER 鉴别结果
儿茶素	黄烷类	2.18	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	289.0722	50	正确
表儿茶素*	黄烷类	2.49	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	289.0722	30	儿茶素
牡荆素	黄酮类	3.64	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.0991	400	正确
木犀草苷*	黄酮类	4.23	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0955	15	木犀草素-4'-O-葡萄糖苷
当药黄素	黄酮类	4.26	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	445.1160	50	正确
异槲皮苷	黄酮醇类	4.83	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.0902	20	正确
橙皮苷	二氢黄酮类	5.48	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	609.1832	100	正确
大波斯菊苷	黄酮类	5.91	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.0991	150	正确
槲皮苷	黄酮醇类	6.32	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0955	30	正确
山柰酚-7-O-鼠李糖苷	黄酮醇类	10.23	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.0991	50	正确
木犀草素	黄酮类	10.77	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.0404	50	正确
槲皮素	黄酮醇类	11.32	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	301.0362	20	正确
柚皮素查尔酮	查尔酮类	13.23	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	271.0605	10	正确
芹菜素	黄酮类	13.86	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.0466	400	正确
野鸢尾黄素#	异黄酮类	14.10	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.0759	30	-
异鼠李素	黄酮醇类	14.84	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	315.0519	10	正确
山柰酚	黄酮醇类	14.91	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.0404	30	正确
樱黄素*	异黄酮类	19.67	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.0614	100	刺槐黄素
芫花素*	黄酮类	19.67	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.0614	10	刺槐黄素
桑辛素	黄酮类	21.64	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$	419.1508	10	正确

注：“#”表示未准确鉴定出，数据库中无可比对的图谱信息；“*”表示未准确鉴定出，存在MS/MS相似异构体。

良好分离；山柰酚-7-O-鼠李糖苷、大波斯菊苷以及牡荆素三个化合物虽为同分异构体，但三者之间极性相差较大，保留时间有明显差异，分别为10.23 min, 5.91 min, 3.64 min；木犀草苷与当药黄素的保留时间接近，分别为4.23 min、4.26 min，异鼠李素与山柰酚的出峰时间同样接近，分别为14.84 min、14.91 min；樱黄素与芫花素极性相近，属于同分异构体，色谱柱不能将其良好分离，出峰时间为19.67 min；在20种黄酮类化合物中，桑辛素极性最小，出峰时间最晚，为21.64 min。

3.2 MS-FINDER 鉴定黄酮类化合物

虽然不同对照品的摩尔浓度不同(区间范围： $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ – $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，但通过MS-DAIL软件可以迅捷、有效的取得混合溶液中20种类黄酮成分的MS/MS数据，为接下来的分析提供数据基础。利用MS-FINDER平台的检索和分析，根据拟合、匹配得分，15种黄酮类化合物被准确鉴定出(表1)，如图2A示，蓝色所代表的儿茶素MS/MS碎片离子主要有205.0329、245.1177、289.1079，能够与数据库中参照图谱相匹配，其他低丰度的碎片离子也呈现出良好的匹配状态，此外，参照图谱有额外的MS/MS碎片离子，可

能是不同质谱仪碰撞能量与采集模式差异或基质效应干扰导致的；图2B所展示的是串联质谱仪LTQ Orbitrap XL获取的槲皮素MS/MS碎片离子与数据库中参照图谱的比对图，由图可见，实验捕获的MS/MS碎片离子(150.9036、178.9847、273.1136、301.082等)能够与数据库中参照图谱高度拟合，一定程度上体现出MS-DAIL联合MS-FINDER鉴定中药类黄酮成分的便捷和高效性。同时，5种黄酮类化合物被错误鉴定。芫花素、樱黄素、以及木犀草苷和表儿茶素存在二级谱相近的异构体，例如，数据库中获取的木犀草素-4'-O-葡萄糖苷(图2D)和UPLC-MS/MS检测到的木犀草苷(图2C)MS/MS非常相似，糖基在苷元上取代位置的不同是两种异构体之间的主要区别(图2E)，使得基于LC-MS/MS技术的MS-DAIL联合MS-FINDER无法准确鉴别这类物质；由于数据库中缺乏可供比较的谱图信息，无法鉴定野鸢尾黄素(图2F)。

这里以槲皮素为例展示MS-FINDER定性分析类黄酮的具体过程(图3)。在负离子模式下，于11.32 min检测到质核比为301.082的化合物，实验捕获的MS/MS碎片离子能够与MS-FINDER平台数据库中的化

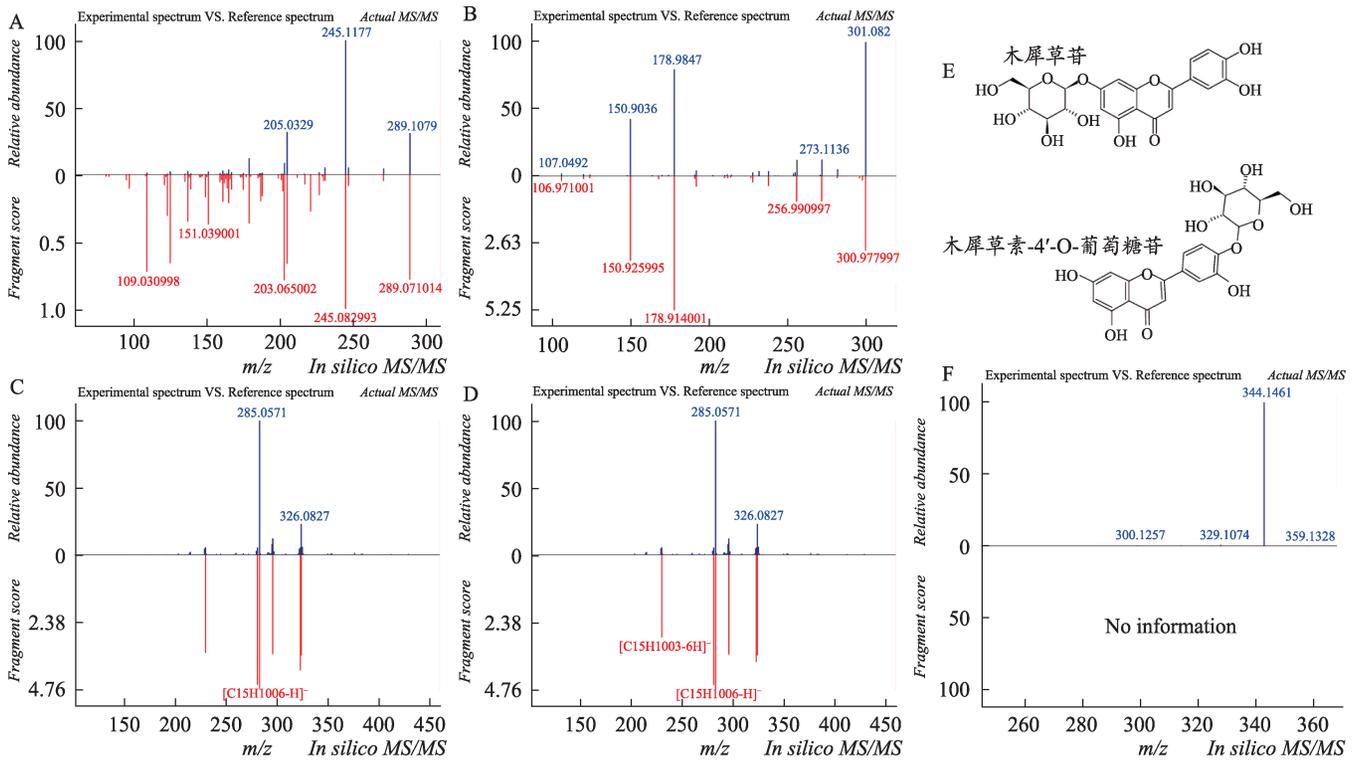


图2 部分类黄酮MS-FINDER中的二级匹配图谱信息

注:蓝色代表UPLC-MS/MS获取的样品中各化合物碎片离子峰谱,红色代表MS-FINDER平台数据库中匹配的化合物碎片离子峰谱。A:儿茶素;B:槲皮素;C:木犀草苷;D:木犀草苷(蓝色碎片离子峰谱)与木犀草素-4'-O-葡萄糖苷(红色碎片离子峰谱);E:木犀草苷与木犀草素-4'-O-葡萄糖苷化学结构图;F:野鸢尾黄素。

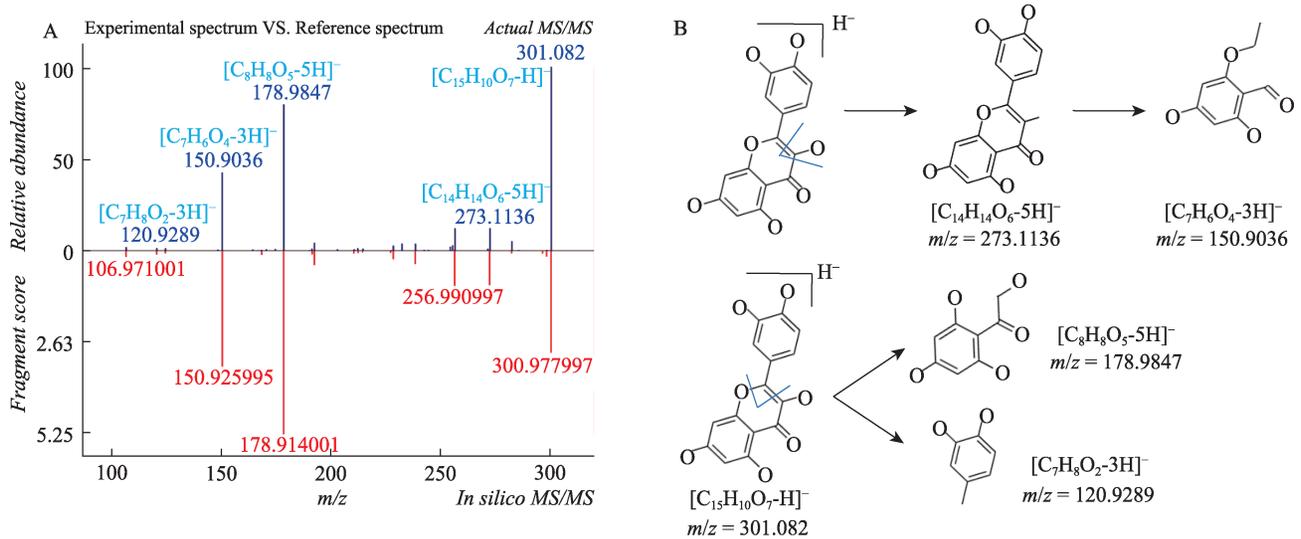


图3 MS-FINDER定性分析槲皮素示例图

注:A:蓝色代表UPLC-MS/MS获取的槲皮素碎片离子峰谱,红色代表MS-FINDER平台数据库中匹配的槲皮素碎片离子峰谱。B:槲皮素受高能量撞击裂解过程中响应的碎片离子。

合物槲皮素相匹配(图3A),响应的碎片离子m/z分别有273.1136、178.9847、150.9036、120.9289,对应的结

构式为[C₁₄H₉O₆]⁻、[C₈H₃O₅]⁻、[C₇H₃O₄]⁻以及[C₇H₃O₂]⁻,由槲皮素裂解后所得(图3B)。

表2 20种类黄酮物质归属及相关生物学效应

名称	CAS号	归属	生物学效应(抗炎、抗氧化以外)
儿茶素	154-23-4	骨碎补、桂枝、虎杖、鸡血藤、麻黄、拳参等	抗肿瘤,抗病毒、抑菌,改善认知 ^[16]
表儿茶素	490-46-0	白果、骨碎补、麻黄根、枇杷叶、土茯苓、葱白等	功用与儿茶素相近 ^[17]
牡荆素	3681-93-4	山楂、甘草、蔓荆子、麻黄、青蒿、山豆根等	保护心肌,抗肿瘤,抗病毒,解痉,神经保护 ^[15]
木犀草苷	5373-11-5	金银花、薄荷、丹参、车前草、虎杖、菊花等	抗病毒、抑菌,神经保护,改善心血管功能,抗肿瘤 ^[18]
当药黄素	6991-10-2	酸枣仁、射干、蔓荆子、大花卫矛、淡竹叶、小槐花等	抗病毒,改善认知,降糖、降血脂 ^[19]
异槲皮苷	482-35-9	白鲜皮、败酱草、北沙参、柴胡、车前子、虎杖等	抗病毒、抑菌,抗肿瘤,改善认知,调节代谢 ^[20]
橙皮苷	520-26-3	陈皮、防己、荆芥、前胡、麻黄、青皮等	抗肿瘤,神经保护,降糖、降血脂,改善心血管功能 ^[21]
大波斯菊苷	578-74-5	菊花、黄芩、荆芥、金银花、麻黄、墨旱莲等	抗肿瘤,改善认知 ^[22]
槲皮苷	522-12-3	篇蓄、侧柏叶、钩藤、菊花、桑寄生、鱼腥草等	功用与异槲皮苷相近 ^[23]
山柰酚7-O-鼠李糖苷	20196-89-8	老鹳草、柴胡、瓦松、山肉桂、沙棘	抗肿瘤,降糖 ^[24]
木犀草素	491-70-3	白鲜皮、败酱草、篇蓄、丹参、金银花、连翘等	功用与木犀草苷相近 ^[25]
槲皮素	117-39-5	白花蛇舌草、白鲜皮、北沙参、地榆、鬼箭羽、款冬花等	抗肿瘤,抗病毒、抑菌,降糖、降血脂,神经保护,调节骨代谢,改善心血管功能 ^[26]
柚皮素查尔酮	73692-50-9	枳实、石斛、陈皮、独一味	抗肿瘤,降糖、降血脂 ^[27]
芹菜素	520-36-5	板蓝根、半边莲、丹参、党参、黄芩、络石藤等	抗肿瘤,神经保护,降糖、降血脂 ^[28]
野鸢尾黄素	548-76-5	射干、川射干	抗肿瘤 ^[29]
异鼠李素	480-19-3	沙棘、蒺藜、白头翁、葶苈子、柴胡、吴茱萸等	抗肿瘤,降糖,抗病毒,改善心血管功能 ^[30]
山柰酚	520-18-3	菟丝子、乌梅、贯众、桑叶、一枝黄花、红花等	抗肿瘤,抗病毒、抑菌,降糖、降血脂,神经保护,调节骨代谢,改善心血管功能 ^[31]
樱黄素	552-59-0	甘草、鸡血藤、降香、木蝴蝶、玫瑰花、红车轴草等	抗肿瘤,调节骨代谢 ^[32]
芫花素	437-64-9	薄荷、广藿香、茵陈、银杏叶、芫花、麻黄等	抗肿瘤,抗病毒 ^[33]
桑辛素	62596-29-6	桑白皮、败酱草、大风子、甘草、山茱萸、桑叶等	抗肿瘤,抑菌 ^[34]

4 讨论

成分鉴定一直是中医药研究的难点,也是其基础研究的核心问题。中药成分复杂多样,不同地区生产甚至不同时间点采收的中药成分也不同,对于中药复方,不同成分之间可能的相互作用使得对复方组成成分的研究更加复杂。怎么尽可能多的得到中药或复方中多种组分信息,离不开对物质成分的提取、纯化以及鉴别等冗长的的工作。尽管随着科技的不断进步和高精尖仪器的不断更替,中药中新化合物不断被发现,但在物质成分鉴定过程中有很多重复性的工作,浪费了大量的物力、财力。因此,迫切需要建立一套统一的标准方法来提取和分析各种中药成分,由此建成一个种类齐全、稳定性与可靠性高的中药物成分信息库。在上述工作完成的前提下,再利用液相色谱-质谱等高通量物质成分分析技术,创建高效、准确的各种化合物分析平台,为中药多成分的分析提供范式与可能,这也将是未来中医药走向世界的必由之路。

类黄酮是诸多中药中重要而常见的活性成分,具

有种类繁多,结构、作用相似但又有所不同的基本特点,如黄芩苷主要是从常用中药黄芩中提取分离出来的一种类黄酮,其除了有类黄酮普遍存在的抗炎和抗氧化作用外,对基孔肯雅病毒^[12]、马立克氏病病毒^[13]以及柯萨奇病毒 B3^[14]等多种病毒都具有直接的干扰、阻断作用;牡荆素是山楂、蔓荆子所含成分中具有代表性的类黄酮,分子式是 $C_{21}H_{20}O_{10}$,也存在于甘草、麻黄、青蒿、山豆根、火麻仁、淡竹叶等常见的天然药物中,能够抗炎、抗氧化、抗肿瘤、解除痉挛,还具有潜在的治疗阿尔兹海默症,保护神经的作用,可能是通过拮抗缺氧诱导因子 1α ,激活 γ -氨基丁酸A型受体的部分位点,调控胆碱类、氨基酸类、阿片肽类等神经递质的传递及其相关受体,以及降低活性氧、活性氮等自由基水平,增加抑凋亡基因B淋巴细胞瘤-2的表达从而减少神经细胞凋亡,抑制炎症因子、炎症介质相关通路实现^[15],本研究择取的20种类黄酮的归属及生物学效应等相关信息见表2。

不同黄酮类化合物的分析鉴定有利于阐释中医药防治各种临床疾病的作用机制。目前大多通过MS/

MS、NMR分析以及衍射结构分析,或采用对照品的峰时比较、比较数据库或出版的文献信息、MS/MS结合裂解规律等方法对物质成分进行鉴定^[35],通常有识别不准确,成本高、识别效率低、物质成分丢失等问题,对于中药里的复杂化合物如类黄酮成分的鉴定就更加困难。针对目前国内缺乏有效可行的多种类黄酮成分的分析鉴别方法,本研究主要采用UPLC-MS/MS技术,通过MS-DAIL以及MS-FINDER对20种黄酮类化合物进行鉴别。MS-DAIL和MS-FINDER是代谢组学研究中常用的数据分析、处理平台,主要在小分子物质的峰提取和物质鉴定中发挥作用,可运用于不同来源的样品。MS-FINDER不仅包含了MassBank、KNAPSAcK等公共库中各种小分子物质信息,还包含了上千个相对完整的黄酮类化合物MS/MS数据谱。当然,也存在一些问题,如背景谱对物质鉴定的干扰、一些黄酮类化合物信息的缺失、图谱相似物质的重新分析和鉴定等。

在此次MS-FINDER与MS-DAIL评价试验中,我们选取了有一定代表性的20种类黄酮物质,它们分子量在250-650之间,集中于270-450,这一范围内的黄酮类化合物相对常见、种类较多;其极性差异明显,桑辛素极性弱,而儿茶素极性较强,随着色谱柱流动相

变化,质谱扫描所呈现的总离子流图中可以看出所纳入的20种类黄酮的极性差异。结果表明,MS-DAIL与MS-FINDER相结合的方法简单有效,在含有5组黄酮类化合物同分异构体情况下,获取的准确率达到75%,而没有准确鉴定的4种黄酮类化合物具有极其相似的二级谱异构体(所有高分辨质谱定性检测中的局限之一)。虽然评价的黄酮类化合物相对常见,有些化合物没有得到准确鉴定,但随着算法的进一步优化、数据库的进一步完善以及辅助其他方法,MS-DAIL与MS-FINDER联合运用于小分子化合物定性这一领域的效能将会越来越高。需要注意的是,该方法是基于高分辨质谱,在色谱柱对各组分进行良好分离得到一级、二级信息后进行定性的,当应用于中药成分鉴定时,复杂的基质一般不会影响成分的定性结果。但凡化合物摩尔浓度高于质谱仪检测下限,化合物的质谱信息能够获得,定性分析就可以进行,不能通过色谱柱分离又是同分异构体的物质相对较少,尚可通过联合其他方法解决。目前,MS-DAIL、MS-FINDER的联用可作为分析中药黄酮类化合物的推荐方法,也是课题组接下来鉴定中药复方清肺口服液中复杂类黄酮组分的首选方法。

参考文献

- 1 Ayaz M, Sadiq A, Junaid M, *et al.* Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic propensity in aging associated neurological disorders. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 155.
- 2 Ebrahimpour S, Zakeri M, Esmaeili A. Crosstalk between obesity, diabetes, and alzheimer's disease: Introducing quercetin as an effective triple herbal medicine. *Ageing Res Rev*, 2020, 62: 101095.
- 3 Gao F, Huang G, Xiao J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. *Med Res Rev*, 2020, 40(5): 2049-2084.
- 4 Chung M, Zhao N, Wang D, *et al.* Dose-response relation between tea consumption and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Adv Nutr*, 2020, 11(4): 790-814.
- 5 Min N, Leong P T, Lee R, *et al.* A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication. *Antiviral Res*, 2018, 150: 60-68.
- 6 Oteiza P I, Fraga C G, Mills D A, *et al.* Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Mol Aspects Med*, 2018, 61: 41-49.
- 7 Lopez J G. Flavonoids in health and disease. *Curr Med Chem*, 2019, 26(39): 6972-6975.
- 8 Tsugawa H, Kind T, Nakabayashi R, *et al.* Hydrogen rearrangement rules: computational ms/ms fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. *Anal Chem*, 2016, 88(16): 7946-7958.
- 9 Lai Z, Tsugawa H, Wohlgenuth G, *et al.* Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods*, 2018, 15(1): 53-56.
- 10 陶嘉磊,孙亚磊,郑海涛,等.清肺口服液总黄酮纯化的工艺研究. *时珍国医国药*, 2020, 31(2): 340-342.
- 11 查钦,周茂娣,黄晓旭,等.基于AHP与灰色关联度法综合评价不同半夏种质资源的差异性. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5): 108-116.
- 12 Oo A, Rausalu K, Merits A, *et al.* Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral Res*, 2018, 150: 101-111.
- 13 Yang F, Feng C, Yao Y, *et al.* Antiviral effect of baicalin on Marek's disease virus in CEF cells. *BMC Vet Res*, 2020, 16(1): 371.
- 14 Wang M J, Yang C H, Jin Y, *et al.* Baicalin inhibits coxsackievirus B3

- replication by reducing cellular lipid synthesis. *Am J Chin Med*, 2020, 48(1): 143–160.
- 15 毛丽娜, 朱清, 李俊旭. 牡荆素的神经保护作用及机制研究进展. *中国药理学通报*, 2016, 32(10): 1353–1356.
 - 16 Ide K, Matsuoka N, Yamada H, *et al.* Effects of tea catechins on alzheimer's disease: recent updates and perspectives. *Molecules*, 2018, 23(9): 2357.
 - 17 Qu Z, Liu A, Li P, *et al.* Advances in physiological functions and mechanisms of (–)-epicatechin. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(2): 211–233.
 - 18 Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, *et al.* Autophagy regulation using luteolin: new insight into its anti-tumor activity. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 537.
 - 19 Srivastava A, Dadheech N, Vakani M, *et al.* Swertisin ameliorates diabetes by triggering pancreatic progenitors for islet neogenesis in Streptozotocin treated BALB/c mice. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 221–225.
 - 20 Jiang H, Yoshioka Y, Yuan S, *et al.* Enzymatically modified isoquercitrin promotes energy metabolism through activating AMPK α in male C57BL/6 mice. *Food Funct*, 2019, 10(8): 5188–5202.
 - 21 Li C, Schluesener H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(3): 613–631.
 - 22 Min Z, Tang Y, Hu X T, *et al.* Cosmosiin increases ADAM10 expression via mechanisms involving 5'UTR and PI3K signaling. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 198.
 - 23 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展. *亚太传统医药*, 2015, 11(6): 61–63.
 - 24 Chen H, Ouyang K, Jiang Y, *et al.* Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on α -glucosidase activity. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 829–836.
 - 25 Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, *et al.* Autophagy regulation using luteolin: new insight into its anti-tumor activity. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 537.
 - 26 Khursheed R, Singh S K, Wadhwa S, *et al.* Enhancing the potential preclinical and clinical benefits of quercetin through novel drug delivery systems. *Drug Discov Today*, 2020, 25(1): 209–222.
 - 27 Horiba T, Nishimura I, Nakai Y, *et al.* Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 323(2): 208–214.
 - 28 Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, *et al.* The therapeutic potential of apigenin. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1305.
 - 29 Amin A, Chikan N A, Mokhdomi T A, *et al.* Iridigenin, a novel lead from Western Himalayan chemome inhibits Fibronectin-Extra Domain A induced metastasis in Lung cancer cells. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 37151.
 - 30 滕丹, 栾新尧. 异鼠李素的药效学研究进展. *中医药临床杂志*, 2016, 28(4): 593–596.
 - 31 Ren J, Lu Y, Qian Y, *et al.* Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 2759–2776.
 - 32 Khan K, Pal S, Yadav M, *et al.* Prunetin signals via G-protein-coupled receptor, GPR30(GPER1): Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated activation of MAPK signaling induces Runx2 expression in osteoblasts to promote bone regeneration. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1491–1501.
 - 33 Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, *et al.* Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin. *Antiviral Res*, 2019, 167: 78–82.
 - 34 Aelenei P, Rimbu C M, Horhoge C E, *et al.* Prenylated phenolics as promising candidates for combination antibacterial therapy: Morusin and kuwanon G. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(10): 1172–1181.
 - 35 刘彦玲, 刘传鑫, 田悦, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS的渴络胶胶囊化学成分研究. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 622–629.

MS-DAIL Combined with MS-FINDER for the Identification of Flavonoids in Chinese Herb

Tao Jialei¹, Shan Jinjun², Yuan Bin¹

(1. Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: Objective To analyze the feasibility of MS-DAIL combined with MS-FINDER for the identification of flavonoids in Chinese herb. Methods UPLC-MS/MS was used for detecting the mixed reference solution containing 20 kinds of flavonoids. The characteristic peaks, comparison with database and substance identification were extracted by MS-DAIL combined with MS-FINDER. Results MS-DAIL combined with MS-FINDER could quickly extract and analyze the MS/MS spectrum of flavonoids. According to the score and database map, 15 flavonoids could be accurately identified, and 5 were identified incorrectly, with an accuracy rate of 75%. One of them had no spectral information, and four had isomers with similar MS/MS spectra. Conclusion The combined use of MS-DAIL and MS-FINDER to identify

the flavonoids in Chinese herb is efficient and simple, and it is an optional method for preliminary identification of flavonoids.

Keywords: Flavonoids, Chemical composition, Identification method, UPLC-MS/MS, MS-FINDER

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)