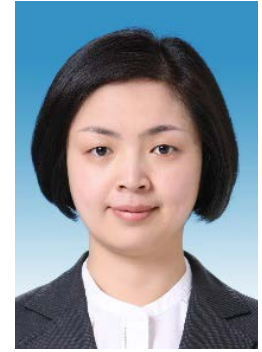


· 综 述 ·

张丽娜 中国农业科学院作物科学研究所副研究员，中国仪器仪表学会科学仪器设备验证评价中心（生命科学站）主任，中国仪器仪表学会分析仪器分会副秘书长，长期从事大型仪器设备使用维护和共享平台建设，获软件著作权20项，授权发明专利2项，参与出版专著2本。



植物代谢组学中几种重要的次生代谢物液质分析技术研究进展

仪莹[#]，孙莹璐[#]，王道平，李晓曼，巫祥云，潘映红，张丽娜

中国农业科学院作物科学研究所 重大平台中心，北京 100081

仪莹，孙莹璐，王道平，李晓曼，巫祥云，潘映红，张丽娜. 植物代谢组学中几种重要的次生代谢物液质分析技术研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3674-3681.

YI Y, SUN YL, WANG DP, LI XM, WU XY, PAN YH, ZHANG LN. Advances in liquid chromatography-mass spectrometry analysis of several important secondary metabolites in plant metabolomics. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3674-3681.

摘 要：代谢组学 (metabolomics) 主要是研究生物体、组织、细胞的代谢物组分及检测其动态变化过程，是继基因组和蛋白组学后新兴的一门组学技术。代谢物是细胞调节过程中的最终产物，其水平被视为生物系统对遗传或环境变化的最终反映。通过合适的分析平台，准确性、定量在复杂的生物中具有化学多样性的次生代谢物是代谢组学的一项重要工作。液相色谱-串联质谱技术 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 是代谢物质检测平台最常用的方法，也为植物次生代谢物的广泛应用研究提供了基础。本文主要从植物激素类、叶酸类、黄酮类等次生代谢物方面进行阐述，结合液质联用技术，简要论述不同次生代谢物检测技术的研究进展。

关键词：植物次生代谢物；植物代谢组学；液相色谱-串联质谱

Received: June 22, 2022; **Accepted:** September 30, 2022

[#]These authors contributed equally to this work

Corresponding author: ZHANG Lina. E-mail: zhanglina@caas.cn

Advances in liquid chromatography-mass spectrometry analysis of several important secondary metabolites in plant metabolomics

YI Ying[#], SUN Yinglu[#], WANG Daoping, LI Xiaoman, WU Xiangyun, PAN Yinghong, ZHANG Lina

Major Platform Center, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Metabolomics, which mainly studies the metabolite components of organisms, tissues, cells and their dynamic changes, is an emerging omics technology following genomics and proteomics. Metabolites are the final products of cellular regulation, and the concentration of metabolites is considered to be the ultimate response of a biological system to genetic or environmental changes. Secondary metabolites with chemical diversity are widely present in living organisms, thus accurate quantification of secondary metabolites through appropriate analytical platforms is an important task of metabolomics. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most commonly used method for the detection of metabolites, providing a basis for the wide application of plant secondary metabolites. This review summarizes the advances of using LC-MS/MS techniques for the detection of phytohormone, folic acid, flavonoids and other secondary metabolites.

Keywords: plant secondary metabolites; plant metabolomics; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

代谢组学 (metabolomics) 是研究生物体内源代谢物的种类、数量及其在内外因素作用下的变化规律, 是系统生物学的重要组成部分, 也是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后迅速发展起来的新兴学科。代谢组学是对某一生物、组织或细胞中所有低分子量 (通常指分子量 < 1 000) 代谢产物进行定性和定量分析的一门学科。由于代谢组学是从整体上检测代谢产物的变化, 因此被越来越广泛地应用于植物生物学及相关领域的研究中^[1-2]。

代谢组学特别是植物代谢组学要分析的对象种类繁多、理化性质各异、浓度范围分布极广, 依靠单一的分析手段难以对全部植物代谢物进行检测。目前, 代谢组学研究中

的主流检测技术包括气相色谱质谱联用 (gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)、核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、毛细管电泳质谱联用 (capillary electrophoresis-mass spectrometer, CE-MS)、液相色谱质谱联用 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) 等^[3]。GC-MS 具有高分辨能力、高灵敏度、大量数据库等特点, 有利于化合物结构鉴定, 但由于质谱库中代谢物数量有限, 很多化合物无法确定结构。样品在进行前处理分析时, 需要衍生化增加其挥发性, 但衍生化过程可能会引起样品的变化及引入干扰物质^[4]。NMR 检测时样品制备简单、分析通量高, 可实现代谢物的结构鉴定; 但是 NMR 检测灵敏度较低、动

态范围较窄,无法实现痕量物质的检测。CE-MS 可实现离子型化合物的分析,样品不需要进行衍生化处理,有机溶剂和样品消耗量少,但较少用于植物研究。LC-MS 具有较高的分辨能力、较快的分析速度、高灵敏度等特点,与 GC-MS 相比更适合于高沸点、热不稳定性及高分子量化合物的检测;与 NMR 相比,检测灵敏度高、动态范围宽。LC-MS 是植物次级代谢产物的重要分离手段^[5]。

植物代谢物大体可分为初生代谢物和次生代谢物两大类。初生代谢物为维持植物生命活动和生长发育所必须,次生代谢物则更多地参与植物抗病、抗逆等环境应答^[6-8]。次生代谢是在初生代谢基础之上进化而来,并在植物生命活动的许多方面起着重要作用。根据其化合物结构性质,植物次生代谢物主要分为萜类、生物碱类、苯丙烷类等^[9-11]。因此,本文将重点围绕这几种代谢类型中的植物激素类、叶酸类、黄酮类等次生代谢物的分析技术进行阐述。

1 植物次生代谢物

1.1 植物激素类

植物在生长发育过程中,除了必要的有机物和无机物外,还需要有植物激素的参与来调控生长发育过程。植物激素是植物体内合成的,能从产生部位运输到作用部位,在低浓度时能对生长发育具有显著生理作用的微量有机物,其含量甚微。植物激素作为一种痕量化合物存在于植物体中,在植物不同的器官中其浓度存在一定的波动^[12-13]。液相色谱-质谱联用技术具有分离快速、鉴定准确等优势,在有机物定性、定量检测中应用广泛,已成为目前植物激素高灵敏度分析、交叉作用研究的最主流方法。

植物样品大多为固态,需要通过浸提将分析物转移到溶液中。浸提的过程比较单一,对

于弱酸弱碱类植物激素,通常采用甲醇、异丙醇或乙腈与水的混合溶液进行浸提^[14]。为了防止分析物的分解或氧化,通常在 4 °C 甚至更低温度下进行^[15],且浸提液中需加入少量的酸类化合物。Liu 等^[16]采用异丙醇:水:浓盐酸(2:1:0.002, V/V/V) 溶液对水稻叶进行浸提,再用液液萃取除去杂质。另外还有报道通过旋蒸除去有机相,再进行冻溶来除去大部分的脂溶性色素或蛋白质。由于植物基质的复杂性,在进行色谱分析前,通常都需要对浸提液进行纯化或富集。纯化富集的方法通常有固相萃取、固相微萃取、液相萃取和液相微萃取等^[17]。

植物激素种类丰富、结构多样,含有羟基、氨基、羧基、苯环等作用位点,并带有一定的极性和酸碱性^[18-20]。碳基材料^[20]、有机骨架化合物^[21]、分子印迹聚合物^[22]等材料具有物化性能优异、比表面积大、易于结构改性等特点,常用于激素的富集纯化。2020 年 Ding 等^[21]基于氧化碳氮材料(oxygenated carbon nitride, OCN)合成了一种鱼鳞状磁性纳米复合材料(Co@Co₃O₄/OCN)。通过在 OCN 纳米片上原位掺杂氮,增加材料的吸附位点。该材料用作固相萃取剂结合 HPLC-MS/MS 实现了 3 种生长素类(auxin, Aux)的含量检测。2020 年, Li 等^[22]以 Fe₃O₄ 纳米颗粒为磁芯,1,3,5-三甲酰基间苯三酚(1,3,5-triformylphloroglucinol, Tp)和 2,6-二氨基蒽醌(diaminoanthraquinone, DA)发生席夫碱缩合反应。合成 Fe₃O₄@COF(TpDA) 材料的壳层厚度约 75 nm,比表面积高达 180.2 m²/g。结合 MSPE-HPLC-MS 方法,首次用于果蔬样品中 7 种 Aux 检测,检出限介于 4.68–7.51 ng/mL。Wang 等^[23]选择甲基丙烯酸(methacrylic acid, MAA)和 β-环状糊精(β-cyclodextrin, β-CD)功能单体,合成了 β-CD/

MAA 分子印迹聚合物 (β -CD/MAA molecular imprinted polymers, β -CD/MAA-MIPs), 对 Aux 的选择性吸附效果优于常规的 β -CD 分子印迹聚合物 (β -CD molecular imprinting polymers, β -CD-MIPs) 及 MAA 分子印迹聚合物 (MAA molecular imprinting polymers, MAA-MIPs) 等材料, 印证双功能单体能提供更多吸附位点, 有利于增强特异性识别能力, 利用 HPLC-MS/MS 检测证明 β -CD/MAA-MIPs 作为富集材料, 大大增加了 Aux 的吸附容量。

1.2 叶酸类

叶酸由蝶啶酸、对氨基苯甲酸与谷氨酸结合而成的物质, 是一种广泛地存在于动植物、食品中的一种 B 族维生素^[24]。叶酸在食物中通常以多聚蝶酰谷氨酸的形式存在, 当其进入体内后, 经过胆汁及小肠中的酶水解为蝶酰单谷氨酸和二谷氨酸, 主要在近端空肠部位被吸收, 本身无生理功能^[25]。叶酸与人类的健康以及许多重大疾病有着密切关系, 因此建立准确、高效的叶酸及其代谢产物测定方法具有重要的意义。经过几十年的研究, 开发出多种检测叶酸的方法, 例如比色法、薄层层析法、毛细管电泳法、微生物检测法、同位素放射免疫分析法、气相色谱-串联质谱法以及高效液相色谱-串联质谱法等^[26]。

一般情况下, 测定原料中的叶酸、纯的叶酸制品或者药品制剂中的叶酸含量时常使用比色法。比色法操作简单、成本低、分析速度快, 但对样品纯度要求高、干扰性较强、灵敏度低, 且不能检测样品中各类叶酸水平^[27]。微生物检测法是非常经典的检测生物体内叶酸含量的方法。微生物法的优点是成本较低, 操作性比较强, 但也有其局限性, 不能区分叶酸的各种形式, 检测结果缺乏重复性等^[28]。色谱法由于检测时间短, 检出限低的优势被用来检测叶酸,

由于生物基质各种成分比较复杂, 单纯使用色谱法无法实现叶酸及相关代谢产物准确的定性定量分析, 引入质谱分析技术可以很好地解决这个问题^[29-30]。

叶酸对化学和物理条件敏感, 只有经过正确的样品前处理才能最大程度地将叶酸及其衍生物提取出来, 一般采用化学法来提取叶酸。化学法主要利用叶酸易溶于中性或碱性溶液的特性进行提取, 如热沸偏磷酸提取法^[31], 常用的浸提液有磷酸缓冲液^[32]、HCl 和三氯乙酸溶液^[33]、NaOH 溶液^[34]、乙酸铵缓冲液^[35]等。该方法常与加热、超声波等相结合, 不仅有助于细胞溶解, 还会使蛋白质变性, 释放结合态叶酸。在叶酸提取过程中, 为减少氧的影响, 需添加抗氧化剂, 保护叶酸免受氧化并减少叶酸衍生物之间的相互转化^[36]。抗坏血酸盐作为一种抗氧化剂, 常在中性或碱性条件下使用, 且与巯基乙醇或二硫苏糖醇配合使用^[37]。

叶酸及其衍生物在生物体中含量一般较低, 利用高效液相色谱-串联质谱技术 (HPLC-MS/MS), 可实现不同类型叶酸及其衍生物含量的初步分析。Chandra-Hioe 等^[38]用 UPLC-MS/MS 技术测定了大米种子叶酸的含量, 检出限和定量限达到 0.6 ng/mL 和 1.2 ng/mL, 该方法采用专属性强的质谱检测器, 灵敏度高, 并联用色谱分离方法, 可以进行具有较复杂基质、叶酸含量低食品中叶酸的检测。Pawlosky 等^[39]比较了 LC-MS 法和微生物法之间的差异, 认为 LC-MS 法的准确度、重复性均高于微生物法, 且能测定不同形式的叶酸, 同时高效液相色谱-质谱联用法的灵敏度更高。Li 等^[40]采用超高效液相四极杆串联飞行时间质谱联用仪技术的代谢组学方法, 分析正常孕妇、胚胎停育孕妇的尿液和血清的代谢组学

差异。通过液质联用的分析代谢视窗来发现一些与出生缺陷相关的弱极性和大分子代谢物如叶酸、VB₆、VB₁₂等，它们在胚胎停育孕妇血中明显低于正常孕妇，在液质联用分析的差异代谢物基础之上，为出生缺陷的发病机制和早期预防提供了科学依据。

1.3 黄酮类

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物，是植物在长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物。它广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等中，是以 2-苯基色原酮为基本母核结构而衍生的一类黄色色素^[41]。分光光度法、薄层层析、毛细管电泳、液相色谱-质谱联用等方法都常用于黄酮类化合物的测定分析。分光光度法对不同的样品适应性不同、专属性差^[42]。毛细管电泳法由于其检测器灵敏度不高，制约了它的应用范围^[43]。液相色谱-质谱联用技术目前更为广泛地应用于黄酮类化合物的定性、定量分析。

黄酮类物质一般需要经过溶剂提取、分离、纯化等前处理后才能进行黄酮类化合物的检测，目前已有固相萃取、闪式提取、超临界流体萃取等技术。固相萃取技术利用介孔分子筛 SBA-15 等为固相吸附剂，SBA-15 由于其晶体空腔内强烈的极性和库仑力，对于非饱和的黄烷酮极性化合物具有高效的选择萃取能力^[44]。闪式提取法是一种用水、乙醇、甲醇、丙酮等有机溶剂快速提取黄酮的方法，能最大限度地避免植物有效成分受热破坏^[45]。超临界流体萃取是控制超临界流体 (CO₂) 在高于临界温度 (31 °C) 和临界压力 (7.4 MPa) 的条件下，从样品中提取有效成分。CO₂ 是非极性溶剂，在提取极性较大的物质时，需加入夹带剂，如甲醇、乙醇和水等^[46]。

色谱质谱联用技术由于具有高通量、高选

择性和高灵敏度的特点，也逐渐应用到黄酮类化合物的鉴定检测研究中。袁杰等^[47]采用 HPLC/ESI-MS 联用的方法对朝鲜淫羊藿的黄酮成分进行分析，以 ESI-MS 获得的准分子离子峰确定化合物的分子量，根据多级质谱所得的碎片峰，结合紫外光谱、HPLC 的保留时间等信息鉴定了 9 个黄酮苷类化合物。LC-MS 应用于黄酮类化合物的定量分析，史颖珠等^[48]通过 50% 甲醇溶液超声提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法检测，建立了山银花中槲皮素、芦丁、木犀草素等 14 种黄酮类化合物含量测定的方法，方法总体回收率为 69.2%–116%，相对标准偏差 3.3%–12.0%，实现了山银花中多种主要黄酮类化合物含量的同时测定。LC-MS 应用于黄酮类化合物的体内药动学研究，车庆明等^[49]首次对黄芩苷在人体内的药物代谢进行了研究，探讨黄芩苷的作用机制。研究者对口服黄芩苷后人的尿液进行检测，发现了其代谢产物，并通过 D-101 大孔树脂和葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱与 LC-MS 相结合的方法对其中 3 个主要代谢产物进行了结构鉴定。根据研究结果推断出黄芩苷的体内代谢途径为口服后的黄芩苷经肠内微生物水解，产生其苷元黄芩素，黄芩素在吸收过程中及入血后形成其各种代谢产物。

2 总结与展望

植物次级代谢物数量丰富，具有多样性，这些次级代谢产物在不同的领域起着至关重要的作用，利用代谢组学技术对生物体内的代谢物进行定量分析，结合相应的数据分析和处理方法以及不同的数据处理平台，整体上对次生代谢产物进行分析，以阐明次生代谢途径和代谢网络调控机制。同时也有很多因素制约了代谢组学在植物次生代谢方面的应用，植物代谢

组学由于发展时间较短,存在着样品分析结果不稳定、仪器分析范围有局限等问题;生物基质的复杂性即使 LC/MS 技术有较高的检测灵敏度,痕量物质的归属和精确定量也还存在不少困难;数据库不完善等原因,导致仅有部分的代谢产物能够被识别,未识别的代谢产物仍占比巨大,而且可供搜索用于确定化合物结构的数据库有限,不能满足复杂多样的代谢物研究的需要。所以,优化样品前处理技术(开发性能更好的新方法和新材料)以降低基质效应的干扰,使样品分析向更高灵敏度、更高通量等方向发展;扩大代谢组学数据库覆盖范围,建立更加详细、完整的数据库是必要的;代谢组学与基因组学、蛋白质组学等组学技术相结合继续开发次生代谢产物在生物、农业、医疗等方面的价值。

REFERENCES

- [1] Sherin K, Shahidi Latham, Sucharita M, et al. Evaluation of an accurate mass approach for the simultaneous detection of drug and metabolite distributions via whole-body mass spectrometric imaging. *Anal Chem*, 2012, 84(16): 7158-7165.
- [2] Palandra J, Weller D, Hudson G, et al. Flexible automated approach for quantitative liquid handling of complex biological samples. *Anal Chem*, 2007, 79(21): 8010-8015.
- [3] 许晓辉, 邱国玉, 景武堂, 等. 液质联用技术在新药研发中的应用. *转化医学电子杂志*, 2018, 5(11): 90-94.
Xu XH, Qiu GY, Jing WT, et al. The application of liquid chromatography-mass spectrometry technology in the research and development of new drug. *E J Transl Med*, 2018, 5(11): 90-94 (in Chinese).
- [4] 滑静, 王建立, 张淑萍. 动物性食品中四环素类药物残留的检测方法. *动物科学与动物医学*, 2004(7): 26-27, 33.
Hua J, Wang JL, Zhang SP. The methods of determination of residual tetracyclines in animal food. *Animal Sci Vet Med*, 2004(7): 26-27, 33 (in Chinese).
- [5] 常玉玮, 王国栋. LC-MS 在植物代谢组学分析中的应用. *生命科学*, 2015(8): 978-985.
Chang YW, Wang GD. Application of LC-MS in plant metabolomics. *Chin Bull Life Sci*, 2015(8): 978-985 (in Chinese).
- [6] Hauvermale AL, Steber CM. GA signaling is essential for the embryo-to-seedling transition during *Arabidopsis* seed germination, a ghost story. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(1): 1705028.
- [7] Han YQ, Shi Y, Gao YM, et al. Treatment of *Glycine max* seeds with gibberellins alters root morphology, anatomy, and transcriptional networks. *Biol Plant*, 2020, 64: 32-42.
- [8] Lorrai R, Boccaccini A, Ruta V, et al. Abscisic acid inhibits hypocotyl elongation acting on gibberellins, DELLA proteins and auxin. *AoB Plants*, 2018, 10(5): ply061.
- [9] Qi TC, Huang H, Wu DW, et al. *Arabidopsis* DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *Plant Cell*, 2014, 26(3): 1118-1133.
- [10] Huang H, Gong YL, Liu B, et al. The DELLA proteins interact with MYB21 and MYB24 to regulate filament elongation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 64.
- [11] Alosekh S, Perez de Souza L, Benina M, et al. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 2020, 174: 112347.
- [12] Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H, et al. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(7): 1201-1214.
- [13] Bari R, Jones JDG. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(4): 473-488.
- [14] Du FY, Ruan GH, Liu HW. Erratum to: analytical methods for tracing plant hormones. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(5): 1615.
- [15] Yi XH, Hua Q, Lu YT. Determination of organophosphorus pesticide residues in the roots of *Platycodon grandiflorum* by solid-phase extraction and gas chromatography with flame photometric detection. *J Assoc Off Anal Chem*, 2006, 89(1): 225-229.
- [16] Liu H, Li T, Shao J. Determination of plant growth regulator residues in fruits by quick extraction and

- high performance liquid chromatography. *J Anal Sci*, 2014, 30(4): 500-506.
- [17] Zhou F, Lin QB, Zhu LH, et al. D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*, 2013, 504(7480):406-420.
- [18] Xin PY, Li BB, Yan JJ, et al. Pursuing extreme sensitivity for determination of endogenous brassinosteroids through direct fishing from plant matrices and eliminating most interferences with boronate affinity magnetic nanoparticles. *Anal and Bioanal Chem*, 2018, 410(4): 1363-1374.
- [19] Xu X, Hou X, Han M, et al. Simultaneous determination of multiclass plant growth regulators in fruits using the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2020, 43(4): 788-798.
- [20] Xin PY, Guo QH, Li BB, et al. A tailored high-efficiency sample pretreatment method for simultaneous quantification of 10 classes of known endogenous phytohormones. *Plant Commun*, 2020, 1(3): 1-10.
- [21] Ding QQ, Chen H, Huang CH, et al. A fish scale-like magnetic nanomaterial as a highly efficient sorbent for monitoring the changes in auxin levels under cadmium stress. *Analyst*, 2020, 145(8): 5925-5932.
- [22] Li N, Wu D, Li XT. Effective enrichment and detection of plant growth regulators in fruits and vegetables using a novel magnetic covalent organic framework material as the adsorbents. *Food Chem*, 2020, 306(15): 125446-125455.
- [23] Wang CJ, Ding CY, Wu QW, et al. Molecularly imprinted polymers with dual template and bifunctional monomers for selective and simultaneous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of four plant growth regulators in plant-derived tissues and foods. *Food Anal Methods*, 2019, 12(4): 1160-1169.
- [24] 中华人民共和国卫生部. 食品中泛酸的测定: GB/T 5009.210—2008. 北京: 中国标准出版社, 2009. Ministry of Health of the People's Republic of China. Determination of pantothenic acid in foods: GB/T 5009.210—2008. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [25] Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, et al. Biomarkers of nutrition for development-folate review. *J Nutr*, 2015, 145(7): 1636S-1680S.
- [26] Beaudin AE, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Res C Embryo Today Rev*, 2007, 81(3): 183-203.
- [27] Hueston WJ. Folic acid for the prevention of neural tube defects. *Am Fam Physician*, 1993, 47(5): 1058-1060.
- [28] 张艳, 霍胜楠, 胡明燕, 等. 婴幼儿乳粉中泛酸测定的不确定度研究. *食品研究与开发*, 2014, 35(9): 92-95. Zhang Y, Huo SN, Hu MY, et al. Uncertainty evaluation for pantothenic acid determination in infant formula. *Food Res Dev*, 2014, 35(9): 92-95 (in Chinese).
- [29] 王海霞, 齐飞, 李涛, 等. 高效液相色谱法测水溶性维生素综述. *药物分析杂志*, 2015, 49(19): 15-19. Wang HX, Qi F, Li T, et al. Review on determination of water-soluble vitamins by high performance liquid chromatography. *J Pharm Anal*. 2015, 49(19): 15-19 (in Chinese).
- [30] Szpylka J, De Vries J, Cheney A, et al. Determination of total folates in infant formula and adult nutritionals by trienzyme extraction and UPLC-MS/MS quantitation: first action 2011.06. *J AOAC Int*, 2019, 95(6): 1547-1554.
- [31] 邵丽华, 王莉, 白文文, 等. 山西谷子资源叶酸含量分析及评价. *中国农业科学*, 2014, 47(7): 1265-1272. Shao LH, Wang L, Bai WW, et al. Evaluation and analysis of folic acid content in millet from different ecological regions in Shanxi province. *Sci Agric Sin*, 2014, 47(7): 1265-1272.
- [32] 李富兰, 颜杰, 郭金全, 等. 蚕沙中叶酸的提取与分析检测. *食品科技*, 2009, 34(10): 211-213. Li FL, Yan J, Guo JQ, et al. Extraction and analysis of silkworm folic acid. *Food Sci Technol*, 2009, 34(10): 211-213 (in Chinese).
- [33] Wang C, Riedl KM, Schwartz SJ. A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables. *J Chromatogr B*, 2010, 878(29): 2949-2958.
- [34] 王竹. 样品前处理对食物中叶酸测定的影响. *卫生研究*, 2000, 29(6): 404-406. Wang Z. Effect of pretreatment on the measurement of folate in foods. *J Hyg Res*, 2000, 29(6): 404-406 (in Chinese).
- [35] Ye X, Kang W, Li Q, et al. Determination of folic acid

- in fruits by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its stability. *Food Ind*, 2020, 41(1): 311-315.
- [36] 黄进丽, 杨祖伟, 陈叶兰, 等. 微生物法检测叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 接种液制备方法的优化. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1): 99-105.
Huang JL, Yang ZW, Chen YL, et al. Optimization of preparation method of inoculating solution for microbial detection of folic acid, biotin and vitamin B₁₂. *J Food Saf & Qual*, 2020, 11(1): 99-105 (in Chinese).
- [37] 郭丽琼, 曹秋旭, 吴厚玖. 果蔬中叶酸分析方法研究的进展. *食品工业科技*, 2012, 33(10): 402-406, 411.
Guo LQ, Cao QX, Wu HJ. Research progress of folic acid analysis in fruit and vegetable. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(10): 402-406, 411 (in Chinese).
- [38] Chandra-Hioe MV, Bucknall MP, Arcot J. Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(3): 1035-1042.
- [39] Pawlosky RJ, Hertrampf E, Flanagan VP, et al. Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile. *J Food Compos Anal*, 2003, 16(3): 281-286.
- [40] Li X, Yang SB, Qiu YP, et al. Urinary metabolomics as a potentially novel diagnostic and stratification tool for knee osteoarthritis. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 109-118.
- [41] 赵淑军, 董姣姣, 刘洁, 等. 黄芪中黄酮类化合物的超临界流体色谱分离方法研究. *分析测试学报*, 2021, 40(9): 1311-1317.
Zhao SJ, Dong JJ, Liu J, et al. Study on separation of flavonoids in *Astragalus membranaceus* by supercritical fluid chromatography. *J Instrum Anal*, 2021, 40(9): 1311-1317 (in Chinese).
- [42] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 张兰珍. 关于 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨. *药物分析杂志*, 2002, 22(2): 97-99.
Guo YJ, Fan L, Wang XQ, et al. Discussion about NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetry for determination of total flavonoids. *Chin J Pharm Anal*, 2002, 22(2): 97-99 (in Chinese).
- [43] 王海燕, 李玉琴, 郑晓园. 毛细管电泳法测定金银花中芦丁、绿原酸、槲皮素和咖啡酸的含量. *西北药学杂志*, 2012, 27(6): 521-523.
Wang HY, Li YQ, Zheng XY. Simultaneous determination of rutin, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid in *Lonicera japonica* Thunb. by capillary electrophoresis. *Northwest Pharm J*, 2012, 27(6): 521-523 (in Chinese).
- [44] Cao W, Ye LH, Cao J, et al. Quantitative analysis of flavanones from *Citrus* fruits by using mesoporous molecular sieve-based miniaturized solid phase extraction coupled to ultrahigh-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2015, 1406: 68-77.
- [45] 李珍柱, 苏学素, 焦必宁, 等. 柑橘中类黄酮的前处理及检测技术研究进展. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 329-336.
Li ZZ, Su XS, Jiao BN, et al. Advances on pretreatment and determination technologies for flavonoids in *Citrus*. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(4): 329-336 (in Chinese).
- [46] Lee YH, Charles AL, Kung HF, et al. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Ind Crops Prod*, 2010, 31(1): 59-64.
- [47] 袁杰, 龚又明, 鞠鹏, 孔令义. HPLC-MS~2 法分析朝鲜淫羊藿中的化学成分. *中草药*, 2004, 35(4): 371-374.
Yuan J, Gong YM, Ju P, et al. HPLC-MS~2 analysis of chemical constituents in *Epimedium koreanum*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2004, 35(4): 371-374 (in Chinese).
- [48] 史颖珠, 侯建波, 谢文, 等. 液相色谱-串联质谱法测定山银花中有机酸和黄酮类化合物的含量. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 275-285.
Shi YZ, Hou JB, Xie W, et al. Simultaneous determination of organic acids and flavonoids in *Lonicerae Flos* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(3): 275-285 (in Chinese).
- [49] 车庆明, 黄新立, 李艳梅, 张坤, 赤尾光昭, 服部征雄. 黄芩苷的药物代谢产物研究. *中国中药杂志*, 2001, 26(11): 768-769.
Che QM, Huang XL, Li YM, et al. Studies on metabolites of baicalin in human urine. *China J Chin Mater Med*, 2001, 26(11): 768-769 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)