

基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MSⁿ 和分子网络技术快速鉴定吴茱萸汤中化学成分

权建野¹, 范斌¹, 刘安², 孙健¹, 陈鹏¹, 王春国³, 赵永烈⁴, 张村²,
邓欣祺², 荆志伟^{5*}

(1. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029; 4. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;
5. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

[摘要] 《伤寒论》名方吴茱萸汤是首批《古代经典名方目录》收载品种, 全方由吴茱萸、人参、生姜、大枣 4 味药组成, 具有温中补虚、散寒降逆之功, 临床应用广泛, 疗效显著。经典名方化学组成是其物质基准和量值传递的重要前提, 该研究旨在建立高分辨质谱(HR-MS) 和分子网络整合的快速分析经典名方吴茱萸汤中化学成分的方法。采用 AQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱。分别在正、负离子模式下, 采集 Q-Exactive Orbitrap MS 数据, 根据 MS/MS 碎片模式的相似性创建 GNPS 分子网络, 运用 Cytoscape 3.6.1 软件筛选结构相似的分子簇, 最后根据对照品比对, 并结合保留时间信息、高分辨质谱精确相对分子质量和 MS/MS 碎片信息对吴茱萸汤中化学成分进行快速准确鉴定。在吴茱萸汤中共鉴定出 105 种化学成分。该研究可为经典名方吴茱萸汤进一步的质量控制、基准物质研究以及药效物质研究等提供参考数据, 同时也为中药化学成分的快速定性分析提供借鉴。

[关键词] 吴茱萸汤; UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS; 分子网络; 多级碎片

Rapid identification of components in Wuzhuyu Decoction using UHPLC Q-Exactive Orbitrap MSⁿ and molecular network technology

QUAN Jian-ye¹, FAN Bin¹, LIU An², SUN Jian¹, CHEN Peng¹, WANG Chun-guo³, ZHAO Yong-lie⁴, ZHANG Cun²,
DENG Xin-qi², JING Zhi-wei^{5*}

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 5. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Wuzhuyu Decoction, the classical formula recorded in the *Treatise on Febrile Diseases (Shang Han Lun)*, has been included in the *Catalogue of Ancient Classic Prescriptions (the First Batch)*. Consisting of *Euodiae Fructus*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and *Jujubae Fructus*, it is effective in warming the middle, tonifying deficiency, dispelling cold, and descending adverse Qi, and is widely applied clinically with remarkable efficacies. For a classical formula, the chemical composition is the material basis and an important premise for quantity value transfer. This study aimed to establish a rapid identification method of

[收稿日期] 2022-05-31

[基金项目] 中国中医科学院中央级公益性科研院所自主选题项目(ZZ2019010); 中华中医药学会医院药学专业委员会分会专项(HX2019014); 全国中医药创新骨干人才培训项目(国中医药人教函[2019]128 号); 中国中医科学院中央级公益性科研院所基金培育项目(JJ2022009)

[通信作者] * 荆志伟, 博士, 研究员, 主要从事中医临床药理学研究, Tel: (010) 64093179, E-mail: drjzw@163.com

[作者简介] 权建野, 博士, 助理研究员, E-mail: bjccjy@126.com

chemical components in Wuzhuyu Decoction by high-resolution mass spectrometry (HR-MS) and molecular network. AQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used for sample separation, and acetonitrile-0.1% formic acid in water was used as mobile phases for gradient elution. Q-Exactive Orbitrap MS data were collected in positive and negative ion modes, and GNPS molecular network was plotted according to the similarity of MS/MS fragmentation modes. Cytoscape 3.6.1 was used to screen molecular clusters with similar structures. Finally, the chemical components of Wuzhuyu Decoction were rapidly identified according to the controls, as well as the information of retention time, accurate relative molecular weight of HR-MS, and MS/MS multistage fragments. A total of 105 chemical components were identified in Wuzhuyu Decoction. This study can provide data for the follow-up quality control, standard substance research, and pharmacodynamic material research on Wuzhuyu Decoction, as well as references for the rapid qualitative analysis of the chemical components of Chinese medicine.

[Key words] Wuzhuyu Decoction; UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS; molecular network; multistage fragments

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20220705.305

吴茱萸汤出自《伤寒论》^[1], 全方由吴茱萸、人参、生姜、大枣 4 味药组成, 具有温中补虚、散寒降逆之功, 主治阳明、少阴、厥阴三经的虚寒证^[2]。该方于 2018 年 4 月被《古代经典名方目录(第一批)》收录。吴茱萸汤应用历史悠久, 临床疗效显著^[3], 现代已被广泛用于治疗消化系统、妇科系统、心脑血管系统等多个系统疾病^[4-7]。

吴茱萸汤化学成分复杂, 成分类型多样, 如方中吴茱萸主要含有吴茱萸碱等吲哚喹啉类生物碱^[8]和绿原酸等酚酸类成分^[9], 生姜中主要含有姜辣素等挥发性和萜类成分^[10], 人参中主要含有皂苷类和多糖类成分^[11-12], 而大枣中富含丰富的糖类和维生素类成分^[13]。目前关于吴茱萸汤的实验研究多集中于药理、药效研究和作用机制分析^[14-17], 而物质基础和成分分析方面仅在于部分成分的含量测定和特征图谱分析^[18-19], 缺乏对复方中全成分的系统分析和表征, 制约了经典名方吴茱萸汤的质量控制、物质基准和量值传递等的深入研究。本研究基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap 超高分辨质谱平台并整合全球天然产物社会分子网络(global natural products social molecular networking, GNPS), 对吴茱萸汤中化学成分进行全面表征研究, 以期鉴别吴茱萸汤中不同类型化合物, 为经典名方吴茱萸汤的物质基础研究、质量控制、基准物质研究等提供参考数据, 也为中药复方化合物的快速鉴定提供方法参考。

1 材料

1.1 仪器 Q-Exactive Orbitrap 四极杆-静电场轨道阱质谱仪: 配有热喷雾离子源(HESI)、Xcalibur 4.2 化学工作站(美国 Thermo Scientific 公司); Vanquish 超高效液相色谱系统: 含二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器(美国 Thermo Scientific 公司)。

Millipore Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore 公司); 十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); 超声波清洗器(北京中晟名科技有限公司, 100 W); 0.22 μm 微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.2 药材与试剂 吴茱萸(批号 20110104)、人参(批号 20200427)、大枣(批号 21012001)均购自北京同仁堂东四十条药店有限公司, 生姜购于农贸市场, 上述药材经中国中医科学院医学实验中心范斌研究员鉴定分别为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。

吴茱萸碱(批号 110802-201710 纯度 99.6%)、吴茱萸次碱(批号 110801-202109 纯度 99.7%)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-202034 纯度 93.4%)、人参皂苷 Re(批号 110754-202129 纯度 93.9%)、人参皂苷 Rb₂(批号 111715-202104 纯度 95.0%)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-202129 纯度 93.1%)、绿原酸(批号 110753-202119 纯度 96.3%)等对照品均购自中国食品药品检定研究院; 隐绿原酸(批号 B21587 纯度 ≥ 98%)购自上海源叶生物科技有限公司; 甲酸、甲醇、乙腈等试剂均为质谱纯(美国 Fisher 公司)。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件 色谱: AQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈溶液(B) 梯度洗脱 (0~3 min, 5% B; 3~45 min 5%~75% B; 45~45.1 min 75%~5% B; 45.1~50 min 5% B); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 3 μL; 柱温 35 °C。

质谱正离子检出模式: HESI-II 离子源, 离子源温度 350 °C, 喷雾电压 3.5 kV, S-Lens RF 电压 60 V, 毛细管温度 300 °C, 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (纯度>99.99%), 鞘气流速 40 arb, 辅助气流速 20 arb; 质谱负离子检出模式: HESI-II 离子源, 离子源温度 350 °C, 电离源电压 3.2 kV, S-Lens RF 电压 60 V, 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (纯度>99.99%), 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb。一级全扫描 (m/z 100~2 000) 与数据依赖性二级质谱扫描 (data-dependent acquisition, ddMS²); 分辨率 70 000 (Full Scan)、17 500 (MS/MS); 碰撞模式: 高能量碰撞解离 (HCD); 碰撞能量: NEC30 Stepped NEC50%。

2.2 对照品溶液制备 精密称取吴茱萸碱、吴茱萸次碱、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁、绿原酸和隐绿原酸等对照品适量, 配成质量浓度为 20 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 样品溶液制备 通过剂量考证确定处方中各饮片所用剂量, 称取吴茱萸 9 g、人参 9 g、生姜 18 g、大枣 12 g, 于陶瓷锅中, 1 400 mL 水浸泡 30 min, 先武火加热至沸, 后文火保持微沸至约 800 mL, 尼龙滤布过滤, 60 °C 减压浓缩至一定体积, 冷冻干燥, 粉碎, 得吴茱萸汤基准样品。精密称取上述粉 2 g 于塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 超声处理 30 min, 取上清, 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤得到吴茱萸汤供试品溶液。

2.4 分子网络构建方法 使用 MsConvert 软件将原始的 LC-MS/MS 数据转换为 mzXML 格式, 并上传至 GNPS 生成分子网络, 余弦分数阈值设置为 0.7, 最小匹配碎片离子为 6, topK 设置为 10, 母离子之间的最大质量偏差为 0.02, 最后运用 Cytoscape 3.6.1 软件可视化分析结果。分子网络图中可直观显示提取液中所有未知化合物与标准化合物之间的结构相似度, 其中每一个节点表示一个化合物, 结构类似的化合物分子会在一个分子网络中聚集成簇; 节点的颜色表示不同的来源; 节点与节点之间的连线表示化合物之间的相关性。

2.5 质谱分析 质谱数据通过 Thermo Xcalibur 4.2 软件处理分析, 对于有对照品的化合物, 与对照品图谱中各已知成分的相对保留时间、准分子离子等比对, 再依据各对照品二级碎片离子信息进一步确认。对于无对照品的化合物, 初步进行推测, 再结合文献报道、数据库中相同或类似成分的 MS² 碎片

离子进行对比分析, 保证对于无对照品成分的准确鉴定。

3 结果与讨论

3.1 吴茱萸汤中优势化学成分筛选分析 采用 UPLC BEH C₁₈ 柱对吴茱萸汤提取物进行分离, 经高分辨质谱数据采集、色谱峰提取、峰强度拟合、去噪 ($\geq 1 \times 10^7$) 等处理后, 共获得 673 个有效离子峰。根据化合物的峰强度进行排序, 在负离子模式下 Top 200 的化合物占有所有检测化合物 (673) 峰强度之和的 86.37%, 故本研究仅对 Top 200 的化合物进行鉴定研究。通过对照品比对, 并结合保留时间信息、高分辨质谱精确相对分子质量和 MS/MS 碎片信息确证等, 在负离子模式下在吴茱萸汤中共鉴定化合物 59 种, 见图 1A、表 1。

同理, 在正离子模式下 Top 200 强的化合物占有所有检测化合物 (1 577) 峰强度之和的 76.3%, 本研究仅对 Top 200 的化合物进行鉴定研究。通过对照品比对、以及数据库中相同或类似成分的 MS² 碎片离子分析等, 在正离子模式下在吴茱萸汤中共鉴定化合物 46 种, 见图 1B、表 1。

3.2 基于 MS/MS 关联的分子网络分析 吴茱萸汤中生物碱类成分 GNPS 是基于化合物的 MS/MS 碎片模式相似性创建分子网络的公共平台, 通过计算每个化合物 MS² 碎片的相似性关系来创建一个可视化的网络图, 以反映串联质谱实验中捕获分子的聚类关系和多样性。本研究分别对所采集的高分辨质谱的正离子和负离子数据构建 GNPS 分子网络, 根据 GNPS 的聚类信息用于筛选和快速解析结构相似化学成分。

在正离子模式下, 吴茱萸碱和吴茱萸次碱为色胺吲哚类生物碱, 其裂解主要围绕母核中的酰胺键碎裂, 如吴茱萸碱 MS/MS 碎裂后主要形成互补离子对 m/z 134 和 m/z 171 的碎片离子, 见图 2。进一步运用 MS/MS 关联构建分子网络, 以对照品吴茱萸碱和吴茱萸次碱等化合物作为“种子”节点, 被标记为绿色。结果显示, 与“种子”节点吴茱萸碱和吴茱萸次碱具有 MS/MS 关联的化合物, 其准分子离子的 m/z 多为偶数, 见图 2, 根据有机质谱数据分析的氮规则原则, 推测该分子网络是一类生物碱类化合物。根据该分子网络中的各化合物节点与“种子”节点吴茱萸碱和吴茱萸次碱相比后的质量偏移 (mass shift), 并结合各化合物的 MS/MS 碎片信息, 在吴茱

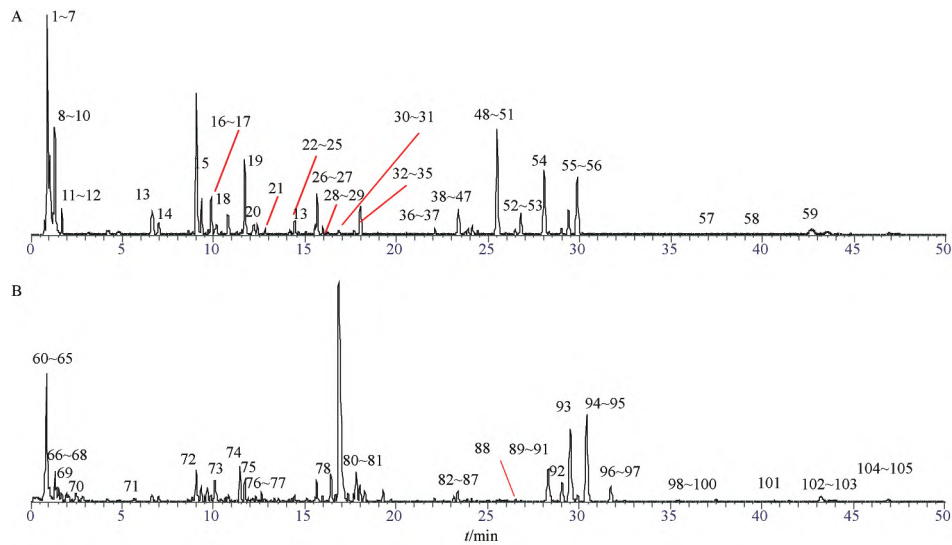


图 1 吴茱萸汤提取物在负离子(A)和正离子(B)模式下的基峰图

Fig.1 Base peak chromatograms of Wuzhuyu Decoction in negative ion mode(A) and positive ion mode (B)

表 1 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS 鉴别吴茱萸汤中化学成分

Table 1 Identification of compounds in Wuzhuyu Decoction based on UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS

No.	电离模式	t_R /min	分子式	理论相对 分子质量	实测相对 分子质量	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子信息	鉴定化合物
1	-	0.878	$C_6H_{12}O_7$	196.058 13	196.058 3	-0.87	129.019 5 , 87.008 9 , 75.008 8	gluconic acid
2	-	0.891	$C_6H_{10}O_8$	210.037 52	210.037 6	-0.38	191.019 9 , 85.029 6	D-saccharic acid
3	-	0.892	$C_6H_{12}O_6$	180.063 22	180.063 4	-1.00	161.045 7 , 89.024 6 , 71.013 9	D-(+)-mannose
4	-	0.898	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.116 01	342.116 2	-0.56	119.035 0 , 101.024 5 , 89.024 5	maltose
5	-	0.915	$C_6H_{10}O_6$	178.047 60	178.047 7	-0.56	129.019 5 , 99.008 9	δ -gluconic acid δ -lactone
6	-	0.962	$C_5H_{10}O_5$	150.052 67	150.052 8	-0.87	131.035 0 , 89.024 5	D-xylose
7	-	0.973	$C_4H_6O_5$	134.021 44	134.021 5	-0.45	115.003 8 , 71.013 9	L-(-)-malic acid
8	-	1.026	$C_6H_8O_7$	192.026 94	192.027 0	-0.31	173.009 4 , 111.008 9	citric acid
9	-	1.086	$C_5H_7NO_3$	129.042 52	129.042 6	-0.62	128.035 5	4-oxoproline
10	-	1.348	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.069 40	244.069 5	-0.41	200.055 7 , 152.035 5 , 110.024 9	(S)-6-gingerol
11	-	1.537	$C_6H_{13}NO_2$	131.094 57	131.094 6	-0.23	130.087 5 , 88.040 5	DL- β -leucine
12	-	1.539	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.091 75	283.091 7	0.18	150.042 2	guanosine
13	-	6.637	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 32	354.095 1	0.62	191.056 4 , 179.035 2 , 135.045 2	neochlorogenic acid(3-CQA)
14 ¹⁾	-	9.363	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 11	354.095 1	0.03	191.056 4	chlorogenic acid(5-CQA)
15 ¹⁾	-	9.863	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 11	354.095 1	0.03	191.056 3 , 179.035 1 , 173.045 6	cryptochlorogenic acid(4-CQA)
16	-	10.144	$C_8H_8O_2$	136.052 44	136.052 4	0.29	135.045 3	2-methylbenzoic acid
17	-	10.145	$C_9H_8O_4$	180.042 23	180.042 3	-0.39	161.045 8 , 135.045 3	caffeic acid
18	-	10.962	$C_{19}H_{30}O_8$	432.199 78	432.199 7	0.16	363.070 6 , 345.059 7 , 227.032 9 , 195.051 2 , 163.040 1	euodionoside A
19	-	11.783	$C_{16}H_{16}O_8$	336.084 94	336.084 5	1.31	179.035 2 , 161.045 3 , 135.045 3	5-O-caffeoylshikimic acid
20	-	12.177	$C_{17}H_{20}O_9$	368.110 85	368.110 7	0.41	193.050 7 , 173.045 6	(3R , 5R)-1 , 3 , 5-trihydroxy-4-[((2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propeno-yl)oxy] cyclohexanecarboxylic acid
21	-	13.869	$C_{27}H_{32}O_{15}$	596.175 43	596.174 1	2.23	459.113 6 , 287.056 5 , 151.003 8 , 135.045 3	eriocitrin
22	-	14.153	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.154 37	610.153 4	1.59	300.028 0 , 178.998 6 , 151.003 7	rutin
23	-	14.242	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.159 50	594.158 5	1.68	447.093 7 , 285.040 8 , 133.029 8	meloside A
24	-	14.426	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.095 90	464.095 5	0.86	343.046 0 , 300.028 0 , 151.003 7	quercetin-3 β -D-glucoside
25	-	14.684	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.154 37	610.153 4	1.59	315.060 7 , 301.035 7 , 151.003 8	panasenoside
26	-	15.404	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 11	354.095 1	0.03	193.050 8 , 175.040 2	1-CQA

续表1

No.	电离模式	<i>t_R</i> /min	分子式	理论相对分子质量	实测相对分子质量	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子信息	鉴定化合物
27	-	15.59	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 68	138.031 7	-0.14	93.034 6	[7]-gingerol
28	-	15.954	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100 84	448.100 6	0.54	285.039 5 , 255.030 2	trifolin
29	-	15.95	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅	862.492 50	862.493 1	-0.70	491.374 7 , 391.285 9 , 161.045 7 , 119.035 1	floralginsenoside F/floralginsenoside E
30	-	16.777	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	372.142 38	372.142 0	1.02	195.051 2	syringin
31	-	17.35	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	978.539 90	978.541 3	-1.43	637.434 3 , 475.380 1 , 391.284 9 , 161.045 6 , 113.024 6	ginsenoside R ₁
32 ¹⁾	-	17.997	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	846.498 67	846.498 6	0.04	637.434 2 , 475.378 9 , 161.045 3	ginsenoside R _{g1} /Rf
33 ¹⁾	-	18.02	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946.549 57	946.550 0	-0.45	783.494 0 , 637.433 3 , 475.380 0 , 161.045 6	ginsenoside Re
34	-	18.05	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅	862.492 50	862.493 1	-0.70	491.374 7 , 391.285 9 , 161.045 7 , 119.035 1	floralginsenoside F/floralginsenoside E
35	-	18.06	C ₂₅ H ₄₀ O ₁₂	532.249 59	532.252 0	-4.53	369.098 3 , 219.066 6	zizyvoside I
36	-	22.09	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1 286.650 60	1 286.651 3	-0.54	1 239.634 3 , 1 107.604 6 , 945.546 7 , 783.495 1 , 621.432 5 , 459.386 5 , 353.109 5	ginsenoside Ra ₃ /notoginsenoside R ₄
37	-	22.78	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	816.487 07	816.487 2	-0.16	637.432 9 , 475.380 0 , 457.364 8 , 161.045 5 , 113.024 6	ginsenoside F ₃
38	-	23.08	C ₃₈ H ₄₂ O ₉	642.282 33	642.282 39	-0.09	475.382 3	ginsenoside Rs ₇
39	-	23.18	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1 256.640 07	1 256.640 13	-0.05	1 077.581 7 , 945.545 3 , 783.494 4 , 621.438 3 , 459.384 9 , 323.275 0	ginsenoside Ra ₁ /ginsenoside Ra ₂ /malonylginsenoside Rc
40	-	23.37	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 108.602 39	1 108.603 31	-0.83	945.543 9 , 783.490 8 , 621.437 6 , 221.066 8	ginsenoside Rb ₁
41	-	23.43	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1 286.650 60	1 286.650 1	0.39	1 239.634 3 , 1 107.604 6 , 945.546 7 , 783.495 1 , 621.432 5 , 459.386 5 , 353.109 5	ginsenoside Ra ₃ /notoginsenoside R ₄
42	-	23.86	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1 194.603 30	1 194.603 8	-0.42	945.546 6 , 621.437 6 , 459.382 7 , 221.066 7 , 161.045 5	malonylginsenoside Rb ₁
43	-	23.95	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	1 196.618 90	1 196.619 3	-0.33	459.380 9 , 179.056 4	quinquenoside R ₁
44	-	23.98	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1 256.640 07	1 256.640 13	-0.05	1 077.581 7 , 945.545 3 , 783.494 4 , 621.438 3 , 459.384 9 , 323.275 0	ginsenoside Ra ₁ /ginsenoside Ra ₂ /malonylginsenoside Rc
45	-	24.56	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1 194.603 30	1 194.603 8	-0.42	945.546 6 , 621.437 6 , 459.382 7 , 221.066 7 , 161.045 5	malonylginsenoside Rb ₁
46	-	24.86	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1 256.640 07	1 256.640 13	-0.05	1 077.581 7 , 945.545 3 , 783.494 4 , 621.438 3 , 459.384 9 , 323.275 0	ginsenoside Ra ₁ /ginsenoside Ra ₂
47	-	25.03	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	1 196.618 90	1 196.619 3	-0.33	459.380 9 , 179.056 4	quinquenoside R ₁
48	-	25.822	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.109 95	208.109 9	0.24	179.107 8 , 161.045 6 , 73.029 5	[1]-paradol
49 ¹⁾	-	26.04	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1 032.550 40	1 032.550 9	-0.48	459.380 9	ginsenoside Rb ₂
50	-	26.06	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	1 150.613 40	1 150.613 9	-0.43	459.380 9	quinquenoside R ₁
51	-	26.064	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.094 30	194.094 5	-1.03	193.087 1 , 161.045 9	4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone
52	-	26.774	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	210.161 99	210.162 0	-0.05	209.155 50 , 159.860 4 , 121.029 6	geranyl propionate
53	-	27.03	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1 032.550 40	1 032.550 9	-0.48	459.380 6	ginsenoside Rb ₃ /ginsenoside Rc/malonylginsenoside Rd
54	-	27.151	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	308.199 05	308.198 8	0.81	266.985 6 , 235.134 5 , 185.118 6 , 121.066 0	zizyvoside I
55	-	27.873	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	350.245 16	350.244 9	0.065	349.238 2	10-gingerol
56	-	29.853	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	486.189 10	486.189 0	0.21	339.160 2 , 305.103 9 , 259.097 5 , 161.060 9	rutaevin
57	-	35.976	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	812.493 85	812.493 81	0.05	765.477 4 , 161.045 4 , 113.024 6	(20E)-ginsenoside F ₄
58	-	39.27	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	322.213 86	322.213 81	0.15	174.957 3 , 101.060 9	8-gingerol
59	-	42.67	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340.240 19	340.240 2	-0.03	339.233 4 , 163.113 0	2,2'-methylenbis(4-methyl-6-tert-butyl-phenol)
60	+	0.827	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.111 50	174.111 7	-1.15	130.086 2 , 116.070 7 , 112.075 9 , 70.065 7	DL-arginine
61	+	0.895	C ₇ H ₇ NO ₂	137.047 60	137.047 7	-0.73	138.054 8 , 110.060 4 , 78.034 1	trigonelline
62	+	0.899	C ₆ H ₁₃ NO ₅	179.079 30	179.079 4	-0.56	180.101 6 , 163.075 1 , 145.064 6	D-glucosamine
63	+	0.949	C ₅ H ₅ N ₅	135.054 50	135.054 4	0.74	136.061 6 , 108.044 4 , 70.184 9	adenine
64	+	0.959	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.079 10	129.079 0	0.77	130.086 2 , 84.081 2 , 70.065 8	cycloleucine
65	+	0.971	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 20	123.032 0	1.63	124.039 3 , 96.044 7 , 82.065 6	vitamin B ₃
66	+	1.334	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.094 50	179.094 6	-0.56	180.101 6 , 163.075 1 , 145.064 6	salsolinol

续表 I

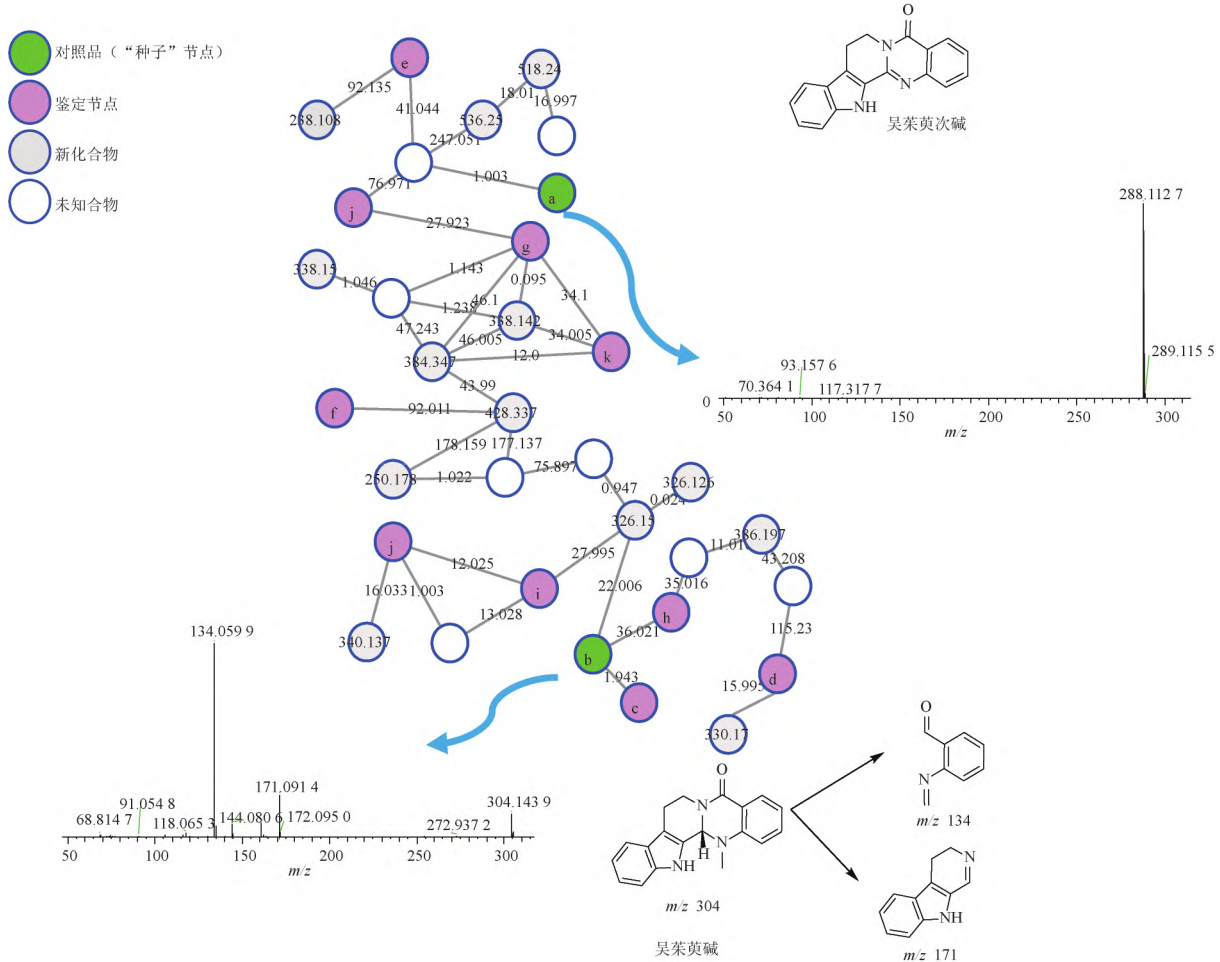
No.	电离模式	t_R /min	分子式	理论相对 分子质量	实测相对 分子质量	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子信息	鉴定化合物
67	+	1.391	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.096 60	267.096 8	-0.75	136.061 6	adenosine
68	+	1.462	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	251.100 20	251.101 3	-4.38	136.061 6	2'-deoxyadenosine
69	+	2.498	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	190.110 60	190.110 4	1.05	191.117 4 , 160.075 5 , 148.075 5	5-methoxytryptamine
70	+	3.953	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.063 50	175.063 3	1.14	176.070 2 , 130.086 1	indoleacetic acid
71	+	6.464	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.090 00	204.089 9	0.49	188.070 3 , 146.059 8	DL-tryptophan
72	+	9.265	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	192.078 70	192.078 6	0.52	165.090 7 , 121.101 2 , 105.070 0	dehydrozingerone
73	+	10.005	C ₁₀ H ₁₆ O	152.120 10	152.120 5	-2.63	135.116 7 , 107.085 7 , 93.070 2	citral
74	+	11.564	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 80	270.052 5	1.11	243.064 7 , 215.069 9 , 149.023 2	galangin
75	+	11.708	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 80	194.057 9	-0.52	177.054 4 , 145.028 2	ferulic acid
76	+	13.329	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 30	302.042 7	-1.32	303.049 3 , 257.042 6	robinetin
77	+	14.445	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 30	302.042 7	-1.32	303.049 3	quercetin
78	+	15.905	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.174 40	608.174 1	0.49	301.069 9	zivilgarin
79	+	16.87	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	301.120 93	301.121 51	-1.94	302.128 1 , 287.104 5 , 263.564 5	去氢吴茱萸碱
80	+	18.008	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	232.120 90	232.121 2	-1.29	174.091 1	melatonin
81	+	18.04	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784.496 74	784.497 3	-0.71	785.503 2	ginsenoside Rg ₂
82	+	21.07	C ₂₃ H ₃₃ NO ₃	371.246 00	371.246 0	-0.15	354.241 9 , 336.231 3	双羟基吴茱萸卡品碱
83	+	23.35	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.380 50	442.381 1	-1.36	425.376 6 , 221.189 5 , 207.173 9	betulin
84	+	23.351	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784.496 74	784.497 3	-0.71	785.503 2	20(R)-ginsenoside Rg ₃
85	+	24.117	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.359 80	456.360 4	-1.31	411.361 4 , 203.179 3	oleanolic acid
86	+	24.12	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	956.498 10	956.498 7	-0.62	957.504 5	chikusetsusaponin V
87	+	24.18	C ₁₂ H ₉ NO ₂	199.063 30	199.063 6	-1.51	200.070 3	dictamine
88	+	26.81	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	470.193 52	470.193 49	0.063	425.194 9 , 161.059 5 , 95.013 1	limonin
89	+	27.07	C ₂₁ H ₃₁ NO ₂	329.235 34	329.235 48	-0.43	312.231 5 , 246.148 3 , 228.137 4	1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1H)- 喹诺酮
90	+	28.873	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294.183 42	294.183 1	1.09	277.178 3 , 137.059 5	6-gingerol
91	+	28.434	C ₁₅ H ₁₇ NO ₂	243.125 70	243.125 9	-0.82	244.132 7 , 188.070 3	atanine
92	+	29.263	C ₁₇ H ₂₃ NO	257.177 90	257.178 0	-0.39	258.184 9 , 132.023 5	dextrorphan
93 ¹⁾	+	29.513	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	303.136 70	303.137 2	-1.65	304.144 0 , 134.059 9	吴茱萸碱
94 ¹⁾	+	30.46	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	287.105 31	287.105 71	-1.39	288.112 6 , 117.317 7 , 93.157 6	吴茱萸次碱
95	+	30.56	C ₂₃ H ₃₁ NO	337.240 22	337.240 56	-1.02	282.205 4 , 264.195 7 , 242.154 3	1-甲基-2-[[4Z, 7Z]-4, 7-十三二烯 基]-4(1H)-喹诺酮
96	+	31.58	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂	353.235 40	353.235 48	-0.23	336.233 8 , 174.054 7 , 132.044 3	1-甲基-2-[7-羰基-(E)-9-三烯基]-4 (1H)-喹诺酮
97	+	31.71	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O	305.152 51	305.152 81	-0.98	144.080 6 , 134.059 9	吴茱萸酰胺 I
98	+	35.108	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276.172 50	276.172 8	-1.09	277.215 3 , 137.059 5	[6]-shogaol
99	+	35.595	C ₁₅ H ₂₂ O	218.167 00	218.167 1	-0.46	219.174 0 , 135.116 9	(E)-nuciferol
100	+	37.64	C ₂₃ H ₂₉ NO	335.224 78	335.224 91	-0.4	212.106 9 , 186.090 8 , 173.083 3	1-甲基-2-[[4Z, 7Z, 10E]-4, 7, 10-十三 三烯基]-4(1H)-喹诺酮
101	+	41.48	C ₂₁ H ₃₁ NO	313.240 28	313.240 56	-0.9	314.247 2 , 212.543 2 , 186.090 8	1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮
102	+	43.18	C ₂₃ H ₃₃ NO	339.256 00	339.256 21	-0.64	340.262 9 , 271.877 3	吴茱萸卡品碱
103	+	43.201	C ₂₃ H ₃₃ NO	339.256 00	339.256 2	-0.59	340.262 8 , 186.092 4	evocarpine
104	+	45.053	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	402.225 10	402.225 4	-0.75	185.080 6 , 129.018 1	citroflex A-4
105	+	45.170	C ₂₅ H ₃₅ NO	365.271 75	365.271 86	-0.33	308.294 7 , 183.078 1 , 139.987 9	1-甲基-2-[[6Z, 9Z]-6, 9-十五二烯 基]-4(1H)-喹诺酮

注: ¹⁾ 对照品比对鉴定。

莼汤共鉴定出吴茱萸次碱、吴茱萸碱、吴茱萸酰胺 I、1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮、1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1H)-喹诺酮、1-甲基-2-[[4Z, 7Z, 10E]-4, 7, 10-十三三烯基]-4(1H)-喹诺酮、1-甲基-2-[[4Z, 7Z]-4, 7-十三二烯基]-4(1H)-喹诺酮、吴茱萸卡品碱、1-甲基-2-[7-羰基-(E)-9-三烯基]-4(1H)-喹诺酮、1-甲基-2-[[6Z, 9Z]-6, 9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮和双羟基吴茱萸卡品碱等生物碱(图 2 中标记

为粉红色)。同时,还有 13 个新的生物碱(图 2 中标记为灰色)被分子网络筛选到。这 13 种潜在生物碱新成分均获得了高质量的一级和二级质谱信息,且与

“种子”节点吴茱萸碱和吴茱萸次碱具有相似碎片,但是本研究未对这些新化合物进行分离和鉴定,故尚无法确定这些化合物的精确结构。



a. 吴茱萸次碱; b. 吴茱萸碱; c. 吴茱萸酰胺 I; d. 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮; e. 1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1H)-喹诺酮; f. 1-甲基-2-[[4Z; 7Z; 10E]-4; 7; 10-十三三烯基]-4(1H)-喹诺酮; g. 1-甲基-2-[[4Z; 7Z]-4; 7-十三三烯基]-4(1H)-喹诺酮; h. 吴茱萸卡品碱; i. 1-甲基-2-[7-羰基-(E)-9-三烯基]-4(1H)-喹诺酮; j. 1-甲基-2-[[6Z; 9Z]-6; 9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮; k. 双羟基吴茱萸卡品碱。

图 2 正离子模式下吴茱萸汤提取物 MS/MS 关联的分子网络

Fig.2 Molecular network of MS/MS correlation of Wuzhuyu Decoction extract in positive ion mode

3.3 基于 MS/MS 关联的分子网络分析吴茱萸汤中 PPT 型和 PPD 型皂苷类成分 同理,在负离子模式下,运用 MS/MS 关联构建分子网络,以对照品人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁ 等化合物作为“种子”节点,被标记为绿色。结果显示,含有人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁ 等“种子”节点的分子网络被自然聚为 2 簇,见图 3。其中一簇是以人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 等原人参三醇型(protopanaxatriol, PPT)为

代表的分子网络;另外一簇是以人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₁ 等原人参二醇(protopanaxadiol, PPD)型为代表的分子网络。由此推测该分子网络是一类皂苷类化合物,且被聚类为 PPT 型和 PPD 型,为化合物的进一步结构解析提供了突破口。

本研究对主要“种子”节点的质谱裂解行为进行了研究,如人参皂苷 Rg₁ 显示准分子离子峰为 m/z 845.4922 [M+COOH]⁻,误差为 -1.12×10⁻⁶,选择母离子进行碎裂,在二级质谱图中出现碎片离子

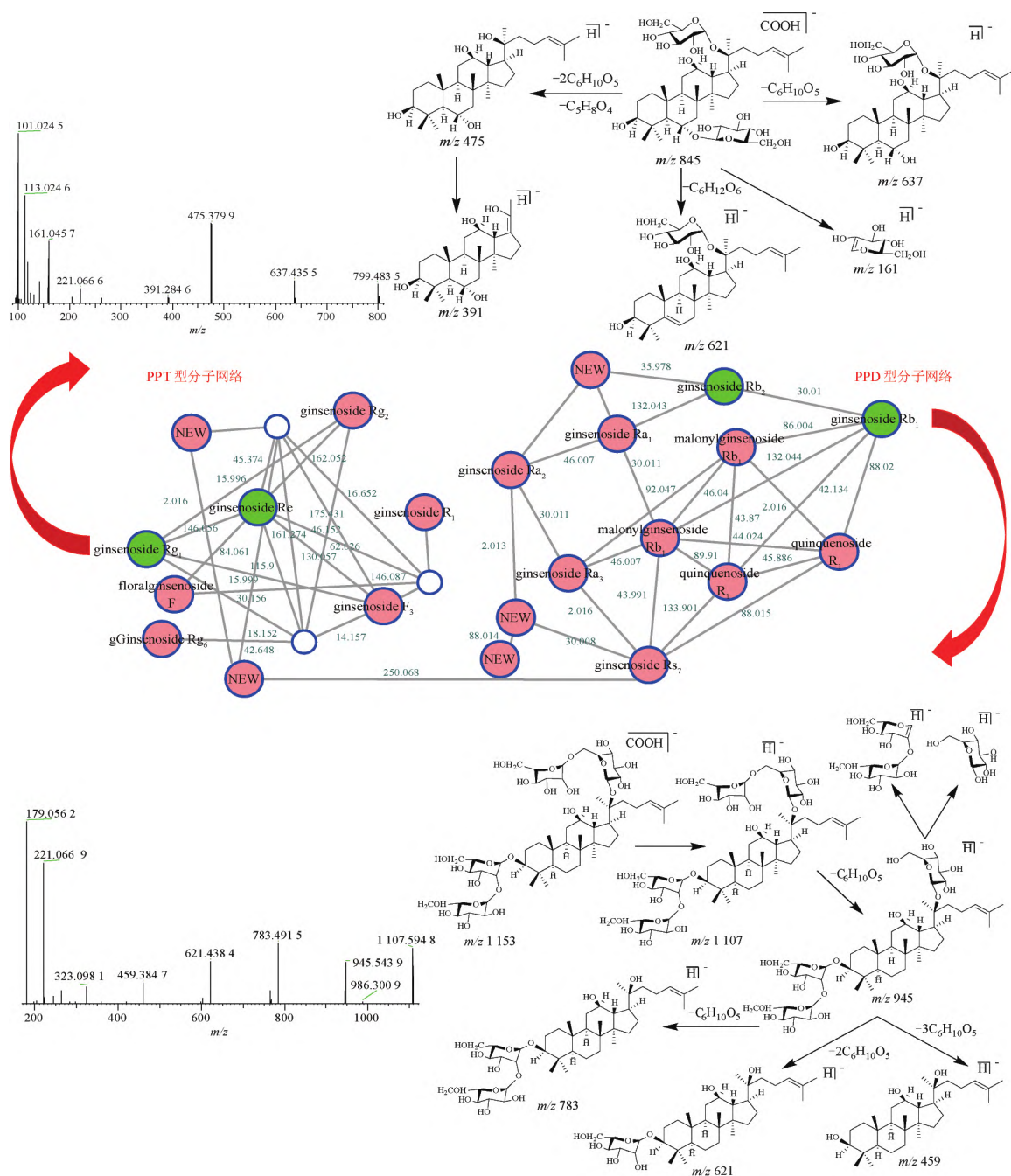


图 3 吴茱萸汤提取物 MS/MS 关联的鉴定皂苷类化合物分子网络

Fig.3 Saponin components identified in molecular network of MS/MS correlation of Wuzhuyu Decoction extract

m/z 799、637、475、391 等特征碎片离子,见图 3。其中碎片离子 m/z 475 是 PPT 型的重要诊断离子, PPT 型 C-6 位及 C-20 位的单糖或多糖丢失,形成碎片离子 m/z 475 后,进一步丢失 C-17 位的异戊烯基形成碎片离子 m/z 391,其 MS/MS 图和质谱裂解行为见图 3。

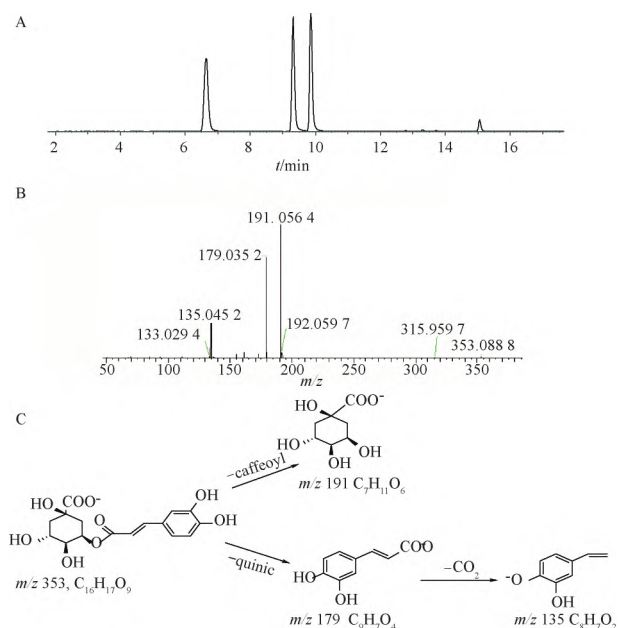
本研究进一步通过 MS/MS 碎片及与“种子节

点”的质量差异进行注释,将鉴定到成分进一步作为“种子”进行其他未知成分鉴定和推测,最终在吴茱萸汤中共鉴定到 PPT 型皂苷类化合物 9 种, PPD 型皂苷类化合物 13 种,此外还有 5 种新皂苷被筛选到。上述与“种子”节点相关且被成功鉴定的成分被标记为粉红色,见图 3。

3.4 吴茱萸汤中酚酸类成分鉴定 本研究通过

UHPLC-Orbitrap MS 在吴茱萸汤中共检测到绿原酸等多种酚酸类成分, 现解析如下: 绿原酸(5-CQA)、新绿原酸(3-CQA)、隐绿原酸(4-CQA) 等均为 1 分子咖啡酸(caffeic acid) 和 1 分子奎宁酸(quinic acid) 形成的单咖啡酰酯类化合物。对其质谱裂解行为研究发现, 在 HCD 碰撞裂解下, 2 个化合物由于酯键的不同碎裂方式均会形成 m/z 191 [M-cafeoyl]⁻ 和 m/z 179 [caffeic acid-H]⁻ 2 个特征碎片离子, 其中 m/z 191 进一步碎裂形成 m/z 173 [M-cafeoyl-H₂O-H]⁻ 的碎片离子。

根据高分辨质谱精确相对分子质量(质量误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$) 的提取离子色谱(extracted ion chromatography, XIC) 发现, 与绿原酸元素组成($C_{16}H_{18}O_9$) 一致的化合物共有 4 个(图 1A 中 13、14、15、26), 上述 4 个化合物的 MS/MS 中, 其碎片离子均出现 m/z 191、179 和 173 等咖啡酰和奎宁酸的碎片特征, 由此推断上述 4 个化合物均为单咖啡酰-奎宁酸类化合物, 见图 4。其中峰 1~3 根据对照品绿原酸以及文献保留时间和 MS/MS 碎片分别鉴定结构为新绿原酸(3-CQA)、绿原酸(5-CQA) 和隐绿原酸(4-CQA), 而峰 4 为该复方中首次鉴定。新绿原酸(3-CQA) 的质谱图和质谱裂解行为见图 4B、C。



A. 负离子模式下 m/z 353.0878 的 XIC 图; B. m/z 353.0878 的 MS/MS 碎片图; C. m/z 353.0878 的质谱裂解行为。

图 4 吴茱萸汤中 4 个绿原酸类成分的结构解析

Fig.4 Structural analysis of four chlorogenic acid analogues in Wuzhuyu Decoction

3.5 吴茱萸汤中其他类成分鉴定 本研究在吴茱萸汤中鉴定到多种柠檬苦素类成分如柠檬苦素(limonin) 和吴茱萸苦素(rutaevin) 等。其中柠檬苦素的结构特点为 C-3、C-7、C-16 位有含氧官能团, C-14、C-15 位上有氧桥环, C-17 位有一个呋喃环形成的高度氧化的四环三萜类化合物。在 ESI 质谱中, C-14、C-15 位上有氧桥环及 C-18 位的叔甲基均属于不稳定基团, 容易丢失, 使 C-13 和 C-14 位形成双键, 进一步发生电子重排裂解形成 m/z 161 的基峰离子, 见图 5A。

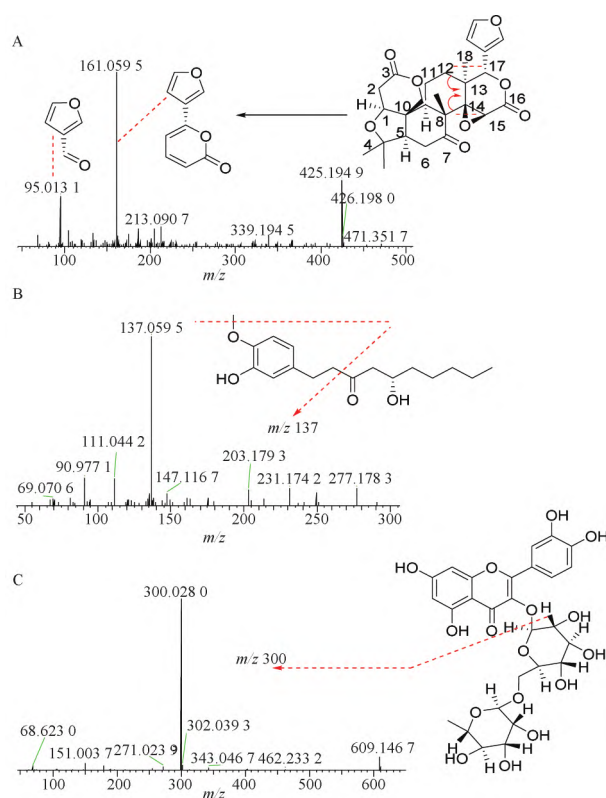


图 5 吴茱萸汤中柠檬苦素类(A)、姜辣素类(B) 和黄酮类(C) 代表性成分的 MS/MS 图

Fig.5 MS/MS diagram of representative components limonins (A), gingerols (B) and flavonoids (C) in Wuzhuyu Decoction

本研究在吴茱萸汤中鉴定到了多种姜辣素类成分, 姜辣素是生姜的辣味成分, 为一类含有 3-甲氧基-4-羟基苯基官能团的一类化合物。以 6-姜酚(6-gingerol) 为例阐释其鉴定过程, 受脂肪链上羰基吸电子效应影响, 该化合物的 MS/MS 碎裂主要围绕羰基碳进行碎裂, 进一步丢失 C-3 位甲基后, 形成 m/z 137 的基峰离子, 见图 5B。

此外,本研究还鉴定到多种黄酮类成分,推测这些成分可能来源于大枣。以芦丁为例阐释其鉴定过程,该化合物在 MS/MS 碎裂过程中,主要是丢失 1 分子芸香糖残基,形成以槲皮素为苷原的碎片离子,见图 5C。

4 结论

近年来,液质联用技术(LC-MS/MS)在中药及其复方制剂的化学成分定性、定量分析中发挥着重要作用,但是海量质谱数据的解析和注释仍然是当前研究面临的重要瓶颈问题^[20]。相似结构的分子具有相似的二级质谱碎片,所以基于 MS/MS 中特征碎片离子或诊断离子,实现结构相似的同系组分快速鉴定是当前质谱解析小分子结构的重要研究策略^[21],但是传统上对 MS/MS 数据分析,需要人工抽提碎片离子,费事、费力。WANG M 等^[22]创新性将 MS/MS 碎片相似的分子可视化为分子网络,并创建了 GNPS 公共平台。GNPS 是一种交互式在线的小分子串联质谱(MS^2)数据管理和分析平台,该平台项下的分子网络技术能够可视化的实现 LC-MS/MS 实验中检测到的所有分子离子以及这些分子离子之间的化学关系,对于化合物的快速而大规模地鉴定及新颖化合物发现具有重要作用,这一定程度弥补了液质联用技术在海量成分定性分析中的不足^[22-25]。

本研究基于高分辨的 MS/MS 数据,在吴茱萸汤中构建了多个结构相似的分子网络用于化合物的快速鉴定研究,实现了吴茱萸汤中 105 种化合物的结构鉴定,同时发现 18 种未见吴茱萸汤相关研究文献报道的新的化合物。其中在生物碱类分子网络,本研究实现了 11 种生物碱成分的准确鉴定,值得注意的是本研究还筛选到 13 种新的生物碱成分,这些新成分与“种子”节点吴茱萸碱和吴茱萸次碱具有相似碎片,并获得了高质量的一级和二级质谱信息,后续进一步鉴定对吴茱萸汤中新化合物研究具有重要指导价值。同理,在皂苷类分子网络中,本研究实现了 13 种三萜皂苷类成分的准确鉴定和 5 种新皂苷成分的筛选。

吴茱萸汤自 2018 年被列入《古代经典名方目录(第一批)》,是经典名方创新药物研发的热点,但是基于传统煎剂下的吴茱萸汤中的化学组成并不清楚。当前吴茱萸汤基准样品的研究仅能对吴茱萸碱、吴茱萸次碱、人参皂苷 Rb_1 等少数指标性成分进

行指认和含量测定^[18-19],而对该复方中所含化学成分的种类和数量缺少充分认识,阻碍了经典名方吴茱萸汤整体质量控制的开发和创新药物的研发。基于 LC-MS/MS 鉴别经典名方化学成分是当前主流方法,但是鲜见吴茱萸汤的液质联用分析的报道,本研究采用简单的前处理同时结合超高效液相色谱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱和分子网络技术,对吴茱萸汤化学成分进行全面解析。由于吴茱萸汤中所含化学成分复杂,含量范围跨度大,全成分解析难度大,但是中药活性成分发挥药理作用,通常应具备一定含量,在体内具备足够的暴露量,故本研究对吴茱萸汤提取物进行去噪处理,仅选取峰强度 Top 200 且峰强度 $\geq 1 \times 10^7$ 的候选化合物进行结构解析,简化了分析难度。本研究所鉴定到的 105 种化合物均为吴茱萸汤高峰化合物,这些成分对吴茱萸汤基准样品和质量评价具有重要参考价值。

综上,本研究通过超高效液相色谱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱和分子网络技术,建立了一种快速筛查和鉴定中药复方中化学成分的分析方法,形成一套较为完整的成分表征策略。本研究不仅为经典名方吴茱萸汤的进一步研究和安全使用提供了数据参考,也为复方中药化学成分的快速定性分析提供借鉴。

[参考文献]

- [1] 张仲景. 伤寒论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 68.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [3] 莫夏敏, 陈仁寿. 东汉至民国时期文献的经典名方吴茱萸汤考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(8): 33.
- [4] 蒋珊, 李云, 郭杰, 等. 基于现代临床文献的经典名方吴茱萸汤主治病症及用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 181.
- [5] 孙欢欢, 徐京育. 吴茱萸汤实验及临床应用概况[J]. 河南中医, 2021, 41(4): 532.
- [6] 许永松, 仇峰, 吴莎, 等. UPLC-MS/MS 测定吴茱萸汤活性组分在硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆和脑组织的药代动力学[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 645.
- [7] 李红霞. 吴茱萸汤在妇科临床的应用[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(7): 83.
- [8] 樊小瑞, 刘梓晗, 冯伟红, 等. 基于 UPLC 技术的吴茱萸定性定量一体化研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20): 3945.
- [9] 张万明, 甄攀, 白雪梅, 等. RP-HPLC 测定吴茱萸中绿原酸的含量[J]. 中成药, 2006, 28(1): 130.
- [10] 刘琳琪, 刘玉环, 赵晨曦, 等. 不同产地生姜主要活性成分的比较分析[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(6): 1016.

- [11] 王红 崔议方 姜慧祯 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析不同干燥方法对人参皂苷类成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5246.
- [12] 高笑一 鲍建才 黄建军. 人参多糖化学的国内研究新进展[J]. 人参研究, 2018, 30(4): 44.
- [13] 张采 李佳 张永清. 大枣化学成分研究概况[J]. 中国现代中药, 2011, 13(11): 49.
- [14] 杜力军 孙虹 李敏 等. 精制吴茱萸胶囊对偏头痛小鼠的作用[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3): 4.
- [15] 林晶晶 王静 沈涛. 吴茱萸生物碱类对心血管的药理作用研究进展[J]. 中国临床研究, 2015, 28(10): 1392.
- [16] 胡静娜 马卫成 徐锦龙. 吴茱萸汤对小鼠行为绝望模型和利血平模型的影响[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1718.
- [17] 刘珍洪 高蔚 郭蓉 等. 吴茱萸汤通过热敏通道瞬时电位锚蛋白-1 抑制福尔马林内脏痛模型小鼠的疼痛研究[J]. 环球中医药, 2019, 12(8): 1167.
- [18] 蔡梦如 尹东阁 彭胡麟玥 等. 经典名方吴茱萸汤基准样品特征图谱及含量测定研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4015.
- [19] 吴燕川 许永崧 贺蕊 等. 吴茱萸汤各成分在正常和偏头痛模型大鼠肠吸收差异的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1682.
- [20] CAO L, GULER M, TAGIRDZHANOV A, et al. MolDiscovery: learning mass spectrometry fragmentation of small molecules[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1.
- [21] WANG C, ZHENG Z, DENG X, et al. Flexible and powerful strategy for qualitative and quantitative analysis of valepotriates in *Valeriana jatamansi* Jones using high-performance liquid chromatography with linear ion trap Orbitrap mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2017, 40(9): 1906.
- [22] WANG M, CARVER J J, PHELAN V V, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(8): 828.
- [23] RODRIGUES T, REKER D, SCHNEIDER P, et al. Counting on natural products for drug design[J]. Nat Chem, 2016, 8(6): 531.
- [24] 阮振靛 邓欣祺 陈倩 等. 基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS/MS 和分子网络技术快速鉴定五味子中联苯环辛二烯型木脂素类化学成分[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 499.
- [25] 张雨婷 王春国 邓欣祺 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ 和分子网络技术快速鉴定灯盏细辛注射液的化学成分[J]. 质谱学报, 2022, 43(3): 287.

[责任编辑 孔晶晶]