

• 专 论 •

LC-MS/MS 分子网络及其对中药研究的启发

程桃芳¹, 金慧子¹, 刘昌孝^{2*}, 张卫东^{1,3*}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 第二军医大学药学院, 上海 200433

摘 要: 近年来, LC-MS/MS 的分子网络技术已广泛应用于微生物、海洋生物、真菌及植物等来源的天然产物的研究, 关于分子网络在中药方面的研究应用却鲜有报道。以分子网络为主题, 首先对分子网络进行简要介绍, 并对分子网络方面的文献进行了调研; 随后, 对分子网络策略在化学成分定性表征、化学成分定量表征及质量控制、指导活性化合物的分离、提取工艺的优化以及疾病诊断和个性化治疗 5 个方面的应用进行综述; 最后, 对分子网络在中药研究方面的应用进行了展望, 旨在为中药研究提供新的思路和方法, 以期促进中医药的现代化发展。

关键词: LC-MS/MS; 分子网络; 全球天然产物社会分子网络; 中药; 中医药

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)02-0265-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.001

LC-MS/MS-based molecular networking producing enlighten study of Chinese materia medica

CHENG Tao-fang¹, JIN Hui-zi¹, LIU Chang-xiao², ZHANG Wei-dong^{1,3}

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Recently, LC-MS/MS-based molecular networking has been widely used in the field of natural products from microorganisms, marine organisms, fungi, plants, and so on, while there are few reports on the research and application of LC-MS/MS-based molecular networking in the field of Chinese materia medica (CMM). Covering molecular networking topic, what is molecular networking was firstly introduced and the literatures related to molecular networking was retrieved. Then the application of molecular networking on five aspects were reviewed, including qualitative characterization of components, quantitative characterization of components and quality control, guiding the active compounds separation, optimizing the extraction process and disease diagnosis as well as personalized treatment. In the end, this study forecasted the prospects of molecular networking in the field of CMM, aiming to provide new thought and methodology for the research of CMM and expect to expedite the development of traditional Chinese medicine.

Key words: LC-MS/MS; molecular networking; Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS); Chinese materia medica; traditional Chinese medicine

健康是人类追求的永恒主题, 中药在人类的繁衍生息过程中发挥了巨大的作用。传统中药一般是在中医理论指导下按照“君、臣、佐、使”的配伍原则通过多成分、多靶点、多途径的特点发挥治疗

或调理作用^[1-2]。中药的这些治疗或调理作用归根结底都是由其药效物质基础来实现的。中药药效物质基础是指中药中含有的能够表达药物临床疗效的化学成分的总称^[3]。要想搞清楚中药药效物质基础,

收稿日期: 2017-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81230090, 81520108030, 21472238)

*通信作者 刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liuchangxiao@163.com

张卫东 Tel: (021)81871244 Fax: (021)81871245 E-mail: wdzhangy@hotmail.com

就必须首先明确中药化学成分的组成。单味中药的化学成分本身就极为复杂,几味甚至十几味药组成的中药复方其化学成分的复杂程度可想而知。近年来,质谱技术广泛用于中药化学成分研究和代谢组学小分子化合物的研究,在阐明中药药效物质基础和作用机制方面发挥了巨大作用^[4-6]。然而,当前这些化合物的解析工作仍存在以下几方面的不足:(1)研究人员需要预先查阅文献获取目标复方中单味药材的化学成分,建立该复方特有的化学成分库,将采集得到的 MS/MS 质谱数据与库里的化学成分进行人工指认或者导入 UNIFI 软件^[7]进行成分匹配。这一过程需要预先知道复方中的化学成分,建立数据库的这个过程耗时费力;尽管应用 UNIFI 软件指认化学成分的效率比人工指认提高了很多倍,但是 UNIFI 软件需要购买且仅限于 Waters 质谱采集的数据,对于其他质谱仪器(如 Agilent 等)采集的数据却不兼容,该方法不利于大面积的推广。(2)当前能够指认的中药化学成分仍然是冰山一角,很多未知成分或者新颖结构的化学成分仍然被埋没,阻碍了中药化学成分的全面揭示。(3)目前代谢组学的方法已广泛用于中药研究,该方法有利于中药物质基础和作用机制的阐明,然而该方法将会产生百万级的质谱数据,数据分析和挖掘有用信息的艰难程度可想而知。

因此,本课题组提出了能克服以上中药化学成分研究不足的新策略:基于 MS/MS 质谱的分子网络(molecular networking, MN)。本文将对分子网络进行简要介绍并对分子网络方面的文献进行调研,从分子网络的应用进展及分子网络对中药研究的启发等方面进行论述,并对 MN 的应用进行展望,以期 MN 能更好地应用于中药研究,加速创新中药研发的进程。

1 分子网络的建立和可视化

2012 年 Watrous 等^[8]率先将 MN 应用到微生物天然产物的研究中。目前, MN 已成功用于新颖天然产物的鉴定、药物代谢、药物研发等方面的研究^[9]。MN 是一种可视化计算策略(computational strategy),可以直观地看到一针完整 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的作用^[10]。MN 是根据化合物在进入高分辨质谱 LC-MS/MS 后形成的二级质谱碎片,相似结构的化合物在同一条件下产生相似的 MS/MS

离子碎片,通过计算机算法计算这些质谱数据的相似度(以余弦值 0~1 的值表示,相似度越大,余弦值越大,即 2 个 MS/MS 质谱图完全不相关,余弦值为 0; 2 个质谱图 MS/MS 质谱图完全一致,余弦值为 1),然后根据相似度的大小将这些质谱图整合成一张可视化的网络图谱(图 1-a)。在这个分子网络图中,每一个节点表示一个化合物的 MS/MS 质谱图,其中节点的颜色可以表示化合物的来源,不同的颜色表示不同的来源;节点与节点间的连线则表示 2 个化合物 MS/MS 图谱之间的相关性,相关性的大小可以用连线的粗细来表示^[11]。

MN 具有以下 3 个显著的优点:(1)因为 MS/MS 的 MN 依赖于相似结构的分子具有相似的二级质谱碎片,所以同一类化合物分子会在一个分子网络中聚集成簇。这些分子网络能够同时对单个或者多个数据集以及各种不同来源样品质谱数据中的化合物及其类似物或者化合物家族进行可视化定性分析;(2)可以在不知道样品化学物质组成的前提下探索成千上万(甚至亿)的 MS/MS 质谱图,非常适于大数据分析;(3)MN 对于任何质谱离子化平台都是兼容的,只要产生的 MS/MS 碎片采用极化模式(正、负离子模式)、碰撞能量以及碎片裂解方式等相似的方法。采用 MN 成功鉴定样品中的化学成分需要具备以下 2 个条件:(1)粗提物样品的 MS/MS 质谱数据;(2)对照品、合成化合物或者真实可靠且 MS/MS 质谱数据被充分鉴定的样品数据库。

2014 年,全球天然产物社会分子网络(Global Natural Products Social Molecular Networking, GNPS)数据库(<http://gnps.ucsd.edu>)正式开放使用,为广大科研团体提供了开放性的知识平台,可以免费共享原始的、处理后的以及鉴定的 MS/MS 质谱数据,能够加速促进未知化合物的指认。目前,GNPS 已经收录了 22 644 个化合物和 235 850 个谱图,这些化合物和谱图的来源主要有 3 个:(1)第 3 方数据库 MassBank、HMDB、ReSpec、NIST (2014);(2) Dorrestein 实验室和 Sirenas MD 单位采集的化合物和谱图;(3)全球多个科研群体提供的化合物和谱图。GNPS 质谱数据库不仅具有鉴定已知化合物(dereplication)、类似物(variable dereplication)和自动分析 MN 中化合物的功能,还具有对多来源的 MS/MS 数据进行存储管理及更新数据的功能。作为算法和数据库, MN 和 GNPS 类似于在 DNA 和 RNA 研究领域具有重要影响的

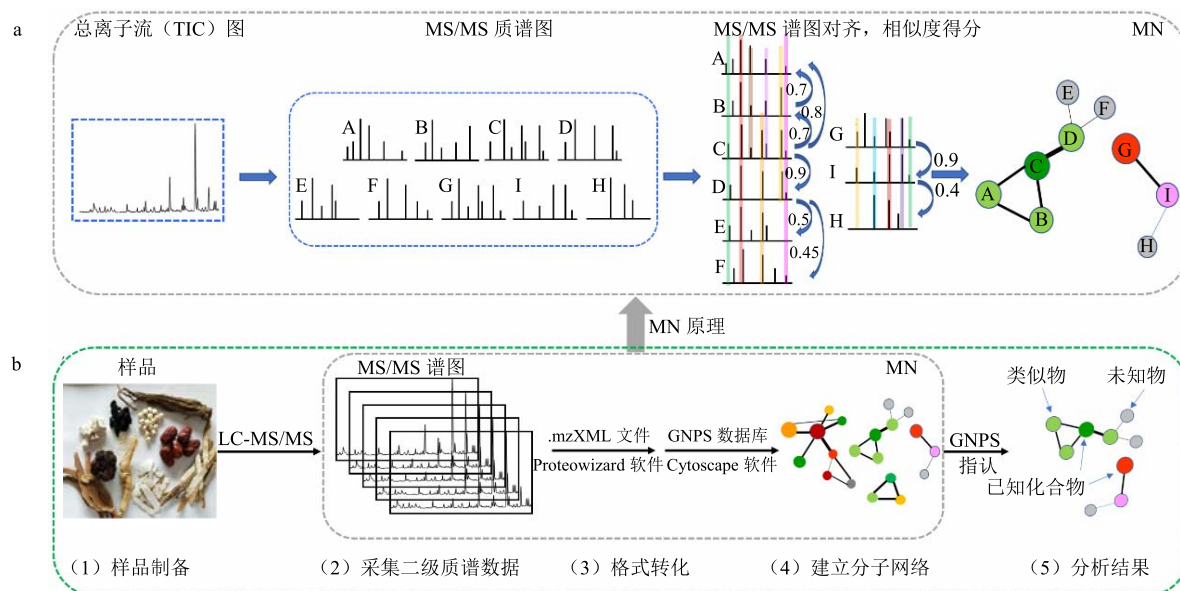


图 1 MN 的原理 (a) 和建立 MN 的流程 (b)

Fig. 1 Principle of MN (a) and flow chart of generating MN (b)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 和 GenBank^[12]。

MN 既可通过 GNPS 平台得到, 也可离线通过软件 Cytoscape 得到。建立 MN 一般有以下几个步骤^[13]: (1) 样品的制备; (2) 采用 LC-MS/MS 法采集样品的二级质谱数据; (3) 采用 ProteoWizard 软件 (<http://proteowizard.sourceforge.net/>) 将原始的 LC-MS/MS 质谱数据文件转化成 .mzXML 格式的数据文件; (4) 在 GNPS (使用说明请参照 <https://bix-lab.ucsd.edu/display/Public/Molecular+Networking+Documentation+for+optimal+parameters>) 上建立 MN, 并运用 Cytoscape 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 使其可视化; (5) 借助 GNPS 数据平台分析 MN, 得出已知化合物; 再根据 MN 中节点与节点之间的相关性, 比较相关节点间质谱数据的异同, 得出已知化合物的类似物或者其他未知物 (图 1-b)。

2 关于 MN 的文献调研

在 Web of Science 上以 “molecular networking” and “natural products” and “mass spectrometry” 为主题词检索了 2012—2017 年以来发表的文献 (共 115 篇), 并排除 MN 与药物研究领域研究不相关的文献 (如基因、蛋白相关的文献), 最终得到与药物研究密切相关的文献 49 篇。根据这些文献, 对每年论文的发表数量, 论文的引用数量, 研究国家和地区以及论文发表的期刊 4 个方面进行统计分析。

首先, 对 2012—2017 年文献的发表数量和引用数量进行了统计分析, 发现关于 MN 方法的文献数量和引用数量呈逐年增长的趋势 (图 2、3)。2012 年, MN 方法首次被美国加利福尼亚大学 Dorrestein 实验室用于活体微生物代谢产物的研究^[8-9]。随后, MN 方法不断被用于微生物^[14-21]、海洋生物^[22-28]、真菌^[29-30]、植物^[31]等领域的研究。然后, 调研了 MN 方法在各个国家的应用情况并对论文发表数量排名前 10 位的国家进行了文献数量的统计分析, 结果表明这 10 个国家应用 MN 方法进行药物研究的情况存在巨大的差异, 其中以第 1 作者和第 1 单位发表文章数量居于首位的国家为美国^[8-11,13-14,19-20,23,29,32-37], 而中国应用 MN 进行药物研究的文献报道甚少^[38] (图 4), 尤其在中药方面的研究基本未涉及。最后, 对这些文章发表的期刊情况进行了统计分析 (图 5), 结果表明, *J Nat Prod* 居第 1 位 (10%), 其次是 *Anal Chem* (8%)、*Nat Prod Rep* (8%) 及 *P Natl Acad Sci USA* (6%)。而在所有已发表的期刊中, Wang 等^[12]在 *Nat Biotechnol* 上发表的论文 “Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking” 的影响因子最高 (IF=43.113)。

3 MN 对中药研究的启发

经过 MN 文献调研, MN 已广泛应用于微生物、海洋生物、真菌及植物等来源的天然产物 (natural

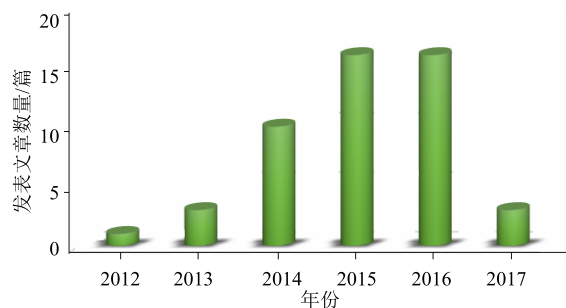


图 2 2012—2017 年以分子网络为主题的文章发表数量

Fig. 2 Number of publications covering molecular networking topic from 2012 to 2017

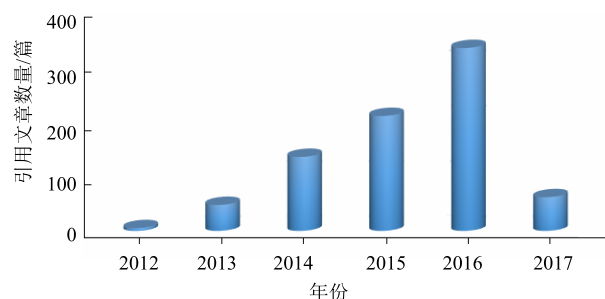


图 3 2012—2017 年以分子网络为主题的文章引用数量

Fig. 3 Number of citations covering molecular networking topic from 2012 to 2017

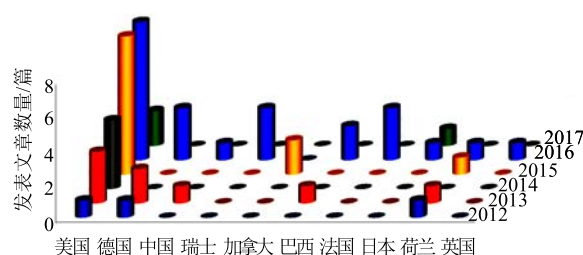


图 4 2012—2017 年各国以分子网络为研究主题的文章发表数量分析

Fig. 4 Analysis of selected country reporting molecular networking topics from 2012 to 2017

products) 的研究, 关于 MN 在中药方面的应用研究却鲜有报道。本文试图将 MN 方法用于中药研究进行展望, 以期创新中药提供新的思路和方法, 推动现代中医药的发展。

3.1 中药化学成分定性表征

3.1.1 鉴定已知化合物、类似物及新化合物 MN 是根据 MS/MS 质谱碎片的相似性而建立起来的可视化分子网络图, 可在不知道样品成分组成的情况下直观地获取各成分之间的关系和化学分类, 然后

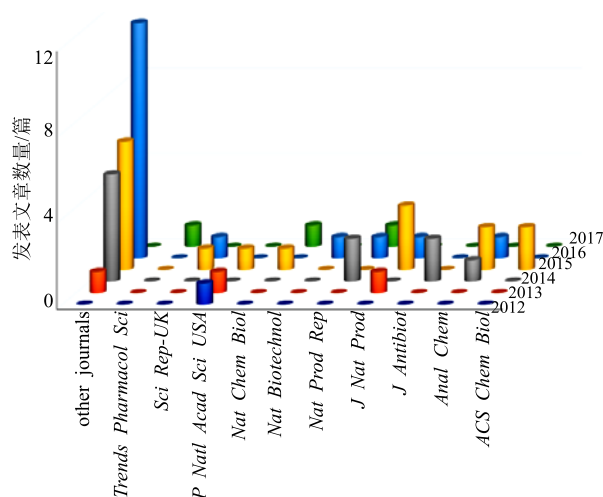


图 5 2012—2017 年期刊以分子网络为主题的文章发表数量分析

Fig. 5 Analysis of selected journals covering molecular networking topics from 2012 to 2017

根据已知成分质谱图对其他相关成分进行快速解析, 从而发现类似物或新化合物。因此, MN 可在样品化学成分定性分析方面发挥独特的作用。

Yang 等^[10]将 MN 策略应用于多种海洋生物和陆地微生物样品分析中, 鉴定化合物及其类似物共 58 个。de Oliveira 等^[39]采用 LC-CID-MS/MS 技术从 *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* (Wawra) L. G. Lohmann 萃取物中采集得到化学成分的质谱数据, 并采用 MN 共鉴定了 63 个化合物 (主要为黄酮苷类)。该方法不仅鉴定了已知的黄酮类化合物 (含同分异构体), 还首次从该植物中鉴定得到含异戊二烯基的黄酮衍生物。Watrous 等^[8,40]建立了各种细菌的 MN, 并在这些网络中鉴定得到了多种已知化合物及其类似物。应用 MN 可以发现新的天然产物^[41], 又为新药发现奠定了良好的基础。

3.1.2 鉴定药物代谢产物 MN 方法还可用于药物代谢方面的研究。药物代谢能够显著影响药物治疗疾病的作用, 因为轻微的化学基团的改变就能对人体生理产生深远的影响。药物可通过酶 (如肝微粒体酶) 和与人相关的肠道细菌的作用而代谢。质谱技术现已广泛用于药物代谢的研究^[42]。2016 年, MN 开始被用于药物代谢研究, 通过非靶向质谱分析方法获得相关联的分子, 并且能够在复杂生物样本中直观地看到药物的代谢物^[9,15]。

囊性纤维化是一种遗传病, 可导致黏液在肺里聚集并且容易造成慢性细菌性、真菌性和病毒性感

染^[43]。囊性纤维化病人通常会服用无数药物,包括抗生素、抗炎药和抗抑郁药。MN 不仅能够分析肺囊性纤维痰液中宿主、微生物和外源性药物的复杂化学成分,还能够观察到这些外源性药物的代谢产物,包括脱硫代谢产物、甲基化代谢产物、羟基化代谢产物、乙酰化代谢产物和脱糖化代谢产物等。这些小分子药物可通过搜索 GNPS 数据库自动进行化合物的指认,并根据已指认的化合物对与其相关的代谢物进行进一步地指认,鉴定出未知生物转化类似物。

近年来,液质联用技术(如 UPLC-QTOF/MS)在分析中药多种化学成分(皂苷类、黄酮类、生物碱类、三萜类、香豆素类等)中发挥着重要作用,且基于 LC-MS/MS 的 MN 策略对于所有类型的样品的分析都是兼容的,这些样品可以是动物、微生物、植物,也可以是活体组织、粪便、尿液、血浆、血液甚至皮肤。因此, MN 适用于中药体内外成分研究和中药代谢研究,可更好地阐释中药药效物质基础和中药成分代谢的全过程并发现未知化学成分和

代谢产物,有利于阐明中药活性成分的协同作用及其发挥药效的作用机制。

3.2 化学成分定量表征及质量控制

非靶向 LC-MS 可用于快速分析不同来源样品粗提物中的化学成分,然而快速地定量分析这些不同来源的化学成分成为了一种难题。可以采用 MN 策略对目标化合物进行定量表征^[24]。

MN 定量步骤如图 6 所示:(1)先用 TOrTE (Tandem-MS Origin Tracing Engine) 将每个节点的原始数据转化成“cluster_info.txt”文件;(2)将这些文件转化成“.mzXML”格式的文件;(3)用 ProteoWizard 软件提取每个节点的色谱峰,然后计算每个峰的峰面积;(4)合并峰面积,并用 Cytoscape 软件制作成饼状图。每个节点代表一种化学成分,节点中不同颜色表示某一化学成分的不同来源,颜色在每个节点中占面积的大小表示某一化学成分在不同来源样品中量的多少,即面积越大,量越大;面积越小,量越小。

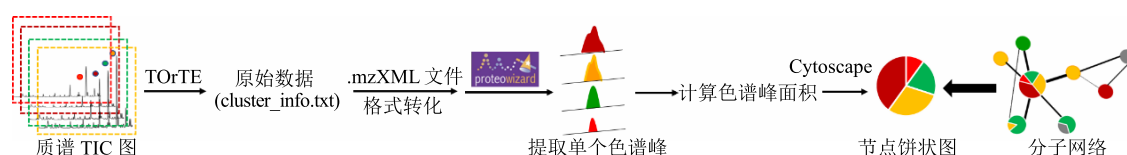


图 6 分子网络定量流程

Fig. 6 Flow chart of quantitative analysis using molecular networking

Winnikoff 等^[24]采集了 20 种来源于海洋蓝细菌粗提物的质谱数据,采用可视化 MN 将它们合并在一个网络图谱中,并采用基于 TOrTE 的 MN 方法对来源于 PAB10FEB10-01 且量最丰富的鞘丝藻酰胺 C 进行了定量。结果表明,鞘丝藻酰胺 C 占海洋蓝细菌 PAB10FEB10-01 干质量的 2.4%。基于 TOrTE 的 MN 方法在定量分析中具有以下优点:(1)对不同样品不同化学成分的量实现可视化;(2)可以直观地获取不同来源样品化学成分(种类及量)的差异化信息。

中药质量反映了中药有效性和安全性,也是中医临床用药和中药有效性控制的重要依据。中药质量往往受到品种、栽培种植及产地生态条件、采收加工、炮制加工、运输处藏、提取纯化过程、药物传输途径和复方及各成分之间相互作用等因素的影响。可以将 MN 定性定量这一特点应用到中药品种优化和指导采收加工、炮制等过程,有利于中药质量控制。

3.3 活性成分的分离与制备

近年来,基于 MS/MS 的 MN 整合化学信息生物

活性的筛选策略已应用于天然产物分离与制备方面的研究。该方法能够靶向分离具有理想生物活性的新颖结构的天然产物。Naman 等^[44]采用上述策略从样品 *Symploca* spp. 中靶向分离一种结构新颖且具有生物活性的十环肽 samoamide A。Nothias-Scaglia 等^[45]采用 MN 对大戟属 *Euphorbia* L. 植物中能够抗 HIV 的化学成分进行了系统研究。Cabral 等^[46]基于 MN 方法定位分析了醉鱼豆属植物 *Conchocarpus fontanesianus* (A. St. -Hil.) Kallunki & Pirani 中吡啶唑啉生物碱成分。将 MN 用于植物化学成分的研究不仅提高了化合物分离的效率,而且成功避免了已知化合物的再分离,节约了分离时间,减少了有机试剂的浪费并有利于环境保护。

3.4 培养方法和提取工艺的优化

MN 可用于指导样品培养方法和提取工艺的优化。许多抗体、抗菌剂、驱虫剂、抗癌试剂和铁载体等都来自于放射菌 *Actinomycetes* 菌株所产生的天然产物。Traxler 等^[47]采用 MN 的方法研究了单独

培养和共同培养不同放射菌株产生化学成分的多样性。结果发现共培养放射菌株可发生种内互作用并刺激产生多种新化学成分, 这些成分是单独培养时没有的。因此, 从共培养放射菌株寻找新天然产物是一种很有前景的策略。Crüsemann 等^[48]采用不同培养方法和提取方法对 146 种海洋盐孢菌属 *Salinispora* 和链霉菌属 *Streptomyces* 菌株进行了研究, 得到 603 个样品, 经 LC-MS/MS 分析共产生 1.8×10^6 个质谱图并通过建立复杂 MN, 鉴定了 15 种不同类型的天然产物及其类似物。MN 在比较生长和提取条件时对于分析菌株代谢产物多样性具有强大的统计学优势。这一方法可以快速获取最佳的培养和提取菌株的方法。

该方法对于研究中药的组方配伍和提取工艺具有一定的启发意义。

3.5 疾病诊断和个性化治疗

小分子代谢物与各种生理过程相关, 并在控制和调节细胞功能和疾病方面发挥着重要作用。为了理解这些小分子在细胞功能和疾病发生发展中的关系, 系统性鉴定、定量表征这些代谢产物显得尤为重要。这属于代谢组学的范畴^[49]。代谢组学主要通过 LC-MS/MS 非靶向分析机体(细胞、组织或生物体液)受外部影响所产生的所有代谢物变化及随时间的变化, 来推测机体的生理病理机制。基于代谢组学方法在寻找差异性标志物, 在疾病诊断方面具有很大的应用潜力^[50]。然而在一次 LC-MS/MS 实验中会产生几千个分子特征, 许多小分子质谱特征仍然未知, 阻碍了疾病的诊断。基于 LC-MS/MS 的 MN 方法具有非靶向分析的特点, 通过可视化临床样本中所有分子特征; 通过 GNPS 平台 MN 可以在数小时内完成样品收集、MS/MS 数据采集和分析等步骤; 快速解析复杂临床样本中的代谢物并能很容易地指出可能与疾病状态相关的未知分子特征。因此, 基于 MN 代谢组学的方法对于挖掘大数据信息、帮助寻找标志物、诊断疾病和推断药物的作用机制具有重要的意义^[43]。

传统中医诊疗的最大特点之一就是个性化诊疗, 与目前美国提倡的精准医学(precision medicine)有异曲同工之妙。MN 对小分子代谢物可视化且能鉴定个体疾病状态或特定病原体相关的小分子; MN 可视化的特点尤其适用于个性化的方式检测代谢物特征的改变, 因为在一个病人发病或病情恶化期间通过每个单元数据的贡献很容易鉴定分子的变化特点

使节点特征凸显; 通过观察 MN 节点特征的改变, MN 也有助于长期研究病人的健康状态。因此, MN 在个性化诊疗方面具有巨大的潜力。

囊性纤维是一种基因性疾病, 可导致肺部慢性感染。Quinn 等^[43]采用基于 MN 代谢组学的方法对肺囊性纤维恶化病人的痰液进行了研究。MN 可视化功能能直观发现痰液具有个性化特征, 即痰液样品在同一病人的不同临床状态(病情恶化、病情稳定、治疗、预后)的化学成分比多个病人在同一临床状态下的化学成分更相似。研究人员以一个随访 4.2 年的病人作为研究对象, 用代谢组学的方法检测个性化的生物标志物。结果发现, 血小板激活因子(PAF)和相关的脂类水平在这个病人肺急性加重期(CFPE)显著升高, 而神经酰胺在这个病人 CFPE 治疗阶段显著升高。因此, PAF 和炎症脂类是 CFPE 的潜在标志物。尤为重要的是, 囊性纤维痰液代谢是病人所特有的, 支持 CFPE 发病期的个性化治疗。

4 结语与展望

MN 策略可用于化学成分的定性表征包括已知化合物及其类似物、新化合物^[41]以及代谢产物的鉴定, 化学成分定量表征及质量控制, 指导活性化合物的分离, 提取工艺的优化及疾病诊断和个性化治疗。

根据 MN 的这些功能, 展望 MN 方法可能在中药研究中的 3 个重要应用: (1) MN 可作为化学成分定性定量表征的工具, 如果将 MN 与刘昌孝院士提出的“质量标志物(Q-markers)”^[51-54]的研究思路整合应用到中药质量控制研究中, 更加有利于实现中药全程质量控制。(2) 组分中药是在传承基础上的创新, 其特征是药效物质基础和作用机制相对清楚, 具有“安全、有效、稳定、可控”的药物特征, 并具有复方、配伍、多途径、多靶点、多效应整合调控作用模式等中医药特点^[55]。由于 MN 具有将相同类型的化学成分聚集成簇的特点, 利用 MN 的这一特点, 可将 MN 应用到组分中药方面的研究, 有利于直观地明确组分中药的物质基础。(3) MN 可能有助于阐释中药“君、臣、佐、使”的组方理论。

尽管 MN 在药物研究方面具有很多优点, 但是 MN 也有其自身的不足和局限性, 主要有以下 2 个方面: (1) 质谱技术固有的局限性也正是 MN 方法的局限性, 仍然不能区分立体异构和位置异构。(2) 目前 GNPS 数据库收录了很多来自于微生物和海洋生物的天然产物, 为天然产物的发现提供了很好的

分析平台,但中药化学成分的收录相对较少,在一定程度上阻碍了 MN 在中药研究方面的应用。为了加快中药化学成分的全面揭示,需要做到以下 3 个方面:(1)为了更好地应用 MN 并使其在中药研究领域发挥更大作用,建立类似于 GNPS 的中药全成分质谱数据库。从质谱数据的来源上讲,很多单味中药或中药复方中的化学成分已经研究得相当透彻,但是很多有用的 MS/MS 质谱数据信息仍然零散地分布在私人实验室的数据库中和已发表的文章中,因此数据库的建立需要广泛收集已经研究得比较透彻并能够被精确指认的中药化学成分的质谱数据、鼓励单位和个人分享上传与中药化学成分相关的质谱数据和收录第 3 方数据库(如 ReSpect、Massbank 等)。从质谱数据的质量上讲,应组织精通质谱及数据解析的专家对所建立的质谱数据库中的数据进行质量把关,并对数据质量分为优、良、中、差 4 个等级,保证数据的可靠性和实用性。从数据库的容量上来讲,数据库需要不断地更新和扩大,满足复杂中药成分分析的需求。中药全成分质谱数据库可用于 MS/MS 数据的存储、分析和下载,对于减少低水平重复性劳动并快速指认中药及中药复方中的化学成分具有非常现实的意义。(2)在中药成分解析的过程中,常常会遇到同分异构体的问题,对于异构体的区分可以采用以下 2 种方法:1) LC-MS/MS 与离子淌度联用,可以更好地区分同分异构体;2)可以根据异构体产生的质谱峰的丰度差异辨别同分异构体。(3)目前能够鉴定得到的中药化学成分还只是冰山一角,收集每一味中药中的所有成分的质谱图是不可能的。如果将 MN 与多种计算机算法(如 CFM^[56]、ISDB-MN^[57]、MetFrag^[58]、CSI: FingerID^[59]等)整合运用,那么更多的已知化合物及其类似物甚至新的物质将会被鉴定,这将为中药现代化的研究带来新的希望。

LC-MS/MS 对于分析热不稳定、难挥发的化合物时是非常合适的。LC-MS/MS 在确定化合物分子式和根据二级质谱碎片推测分子结构上具有重要的作用,可用于快速分析已知化合物及其类似物。但是,LC-MS/MS 对于分析结构新颖且尚未报道过的化学成分却是无能为力,仍需要结合 NMR 技术或 X 光散射技术最终确定化合物的精确结构。

参考文献

[1] 路广义,黄齐霞. 中药创新药物的研发探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 232-234.

- [2] 刘昌孝. 对中药现代化及中药国际化发展的思考 [J]. 中国药房, 2016, 27(11): 1441-1444.
- [3] 王喜军. 中药药效物质基础研究的系统方法学——中医方证代谢组学 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 13-17.
- [4] Xian F, Hendrickson C L, Marshall A G. High resolution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(2): 708-719.
- [5] 夏忠庭, 鲍丽颖, 何毅, 等. 基于 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 方法分析郁舒片中脂溶性成分 [J]. 药学学报, 2015, 50(5): 587-593.
- [6] 杨岱琳, 佟玲, 李晓稳, 等. UPLC-Q-TOF/MSE 方法分析养血清脑颗粒的化学成分 [J]. 药学学报, 2016, 51(5): 797-805.
- [7] 王镇方, 赵阳, 范自全, 等. 基于中药成分数据库的四物汤化学成分快速定性分析 [J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1309-1317.
- [8] Watrous J, Roach P, Alexandrov T, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(26): E1743-E1752.
- [9] Quinn R A, Nothias L F, Vining O, et al. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(2): 143-154.
- [10] Yang J Y, Sanchez L M, Rath C M, et al. Molecular networking as a dereplication strategy [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(9): 1686-1699.
- [11] Nguyen D D, Wu C H, Moree W J, et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(28): E2611-E2620.
- [12] Wang M X, 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): 828-837.
- [13] Allard P M, Peresse T, Bisson J, et al. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(6): 3317-3323.
- [14] Covington B C, McLean J A, Bachmann B O. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(1): 6-24.
- [15] Quinn R A, Phelan V V, Whiteson K L, et al. Microbial, host and xenobiotic diversity in the cystic fibrosis sputum metabolome [J]. *ISME J*, 2016, 10(6): 1483-1498.
- [16] Purves K, Macintyre L, Brennan D, et al. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting [J]. *Metabolites*, 2016, 6(1): 2-20.

- [17] Fisch K M, Schaeberle T F. Toolbox for antibiotics discovery from microorganisms [J]. *Arch Pharm*, 2016, 349(9): 683-691.
- [18] Amoutzias G D, Chaliotis A, Mossialos D. Discovery strategies of bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases derived from marine microbiomes [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(4): 80-100.
- [19] Luzzatto-Knaan T, Melnik A V, Dorrestein P C. Mass spectrometry tools and workflows for revealing microbial chemistry [J]. *Analyst*, 2015, 140(15): 4949-4966.
- [20] Derewacz D K, Covington B C, McLean J A, *et al.* Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery [J]. *Acs Chem Biol*, 2015, 10(9): 1998-2006.
- [21] Krug D, Muller R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(6): 768-783.
- [22] Karthikeyan M, Nimje D, Pahujani R, *et al.* Chemoinformatics approach for building molecular networks from marine organisms [J]. *Comb Chem High T Scr*, 2015, 18(7): 673-684.
- [23] Boudreau P D, Monroe E A, Mehrotra S, *et al.* Expanding the described metabolome of the marine cyanobacterium *moorea producens* JHB through orthogonal natural products workflows [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133297.
- [24] Winnikoff J R, Glukhov E, Watrous J, *et al.* Quantitative molecular networking to profile marine cyanobacterial metabolomes [J]. *J Antibiot*, 2014, 67(1): 105-112.
- [25] Su J H, Chang C, Xiang Q, *et al.* Xyloketal B, a marine compound, acts on a network of molecular proteins and regulates the activity and expression of rat cytochrome P450 3a: A bioinformatic and animal study [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2014, 8: 2555-2602.
- [26] Miller B, Friedman A J, Choi H, *et al.* The marine cyanobacterial metabolite gallinamide A is a potent and selective inhibitor of human cathepsin L [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(1): 92-99.
- [27] Kildgaard S, Mansson M, Dosen I, *et al.* Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS Library [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(6): 3681-3705.
- [28] Bolton J J, Davies-Coleman M T, Coyne V E. Innovative processes and products involving marine organisms in South Africa [J]. *AFR J Mar Sci*, 2013, 35(3): 449-464.
- [29] Yao L, Zhu L P, Xu X Y, *et al.* Discovery of novel xylosides in co-culture of basidiomycetes *Trametes versicolor* and *Ganoderma applanatum* by integrated metabolomics and bioinformatics [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep33237.
- [30] Allard P M, Perisic M, Mehl F, *et al.* Exploring the hidden biosynthetic potential of fungi-evaluation of epigenetic modifications through metabolomics [J]. *Planta Med*, 2014, 80(16): 1356-1356.
- [31] Sedio B E. Recent breakthroughs in metabolomics promise to reveal the cryptic chemical traits that mediate plant community composition, character evolution and lineage diversification [J]. *New Phytol*, 2017, 214(3): 952-958.
- [32] Bouslimani A, Sanchez L M, Garg N, *et al.* Mass spectrometry of natural products: Current, emerging and future technologies [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(6): 718-729.
- [33] Liu W T, Lamsa A, Wong W R, *et al.* MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus* [J]. *J Antibiot*, 2014, 67(1): 99-104.
- [34] Duncan K R, Crusemann M, Lechner A, *et al.* Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species [J]. *Chem Biol*, 2015, 22(4): 460-471.
- [35] Kurita K L, Glassey E, Linington R G. Integration of high-content screening and untargeted metabolomics for comprehensive functional annotation of natural product libraries [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(39): 11999-12004.
- [36] Sica V P, Raja H A, El-Elimat T, *et al.* Dereplicating and spatial mapping of secondary metabolites from fungal cultures in situ [J]. *Nat Prod*, 2015, 78(8): 1926-1936.
- [37] Mohimani H, Gurevich A, Mikheenko A, *et al.* Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 30-37.
- [38] Zhang B, Fu Y, Huang C, *et al.* New strategy for drug discovery by large-scale association analysis of molecular networks of different species [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep21872.
- [39] de Oliveira G G, Neto F C, Demarque D P, *et al.* Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *adenocalymma imperatoris-maximilianii* by untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking [J]. *Planta Med*, 2017, 83(7): 636-646.
- [40] Mohimani H, Pevzner P A. Dereplication, sequencing and

- identification of peptidic natural products: from genome mining to peptidogenomics to spectral networks [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(1): 73-86.
- [41] Liaw C C, Chen P C, Shih C J, *et al.* Vitroprocines, new antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, discovered from marine aibrio sp. QWI-06 using mass-spectrometry-based metabolomics approach [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep12856 .
- [42] 王璐, 皮子凤, 刘舒, 等. 现代质谱技术在中药代谢及药代动力学研究中的应用 [J]. *药学学报*, 2016, 51(8): 1217-1226.
- [43] Quinn R A, Lim Y W, Mak T D, *et al.* Metabolomics of pulmonary exacerbations reveals the personalized nature of cystic fibrosis disease [J]. *Peer J*, 2016, doi: 10.7717/peerj.2174 .
- [44] Naman C B, Rattan R, Nikoulina S E, *et al.* Integrating molecular networking and biological assays to target the isolation of a cytotoxic cyclic octapeptide, samoamide A, from an American samoan marine *Cyanobacterium* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(3): 625-633.
- [45] Nothias-Scaglia L F, Esposito M, Cachet X, *et al.* Molecular networking, an innovative tool for natural products research: Application to the phytochemical studies of *Euphorbia* species [A] // 2ème Symposium International AFERP [C]. Lyon: AFERP, 2015.
- [46] Cabral R S A, Allard P M, Marcourt L, *et al.* Targeted isolation of indolopyridoquinazoline alkaloids from *Conchocarpus fontanesianus* based on molecular networks [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(9): 2270-2278.
- [47] Traxler M F, Watrous J D, Alexandrov T, *et al.* Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome [J]. *MBio*, 2013, doi: 10.1128/mBio.00459-13.
- [48] Crüsemann M, O'Neill E C, Larson C B, *et al.* Prioritizing natural product diversity in a collection of 146 bacterial strains based on growth and extraction protocols [J]. *J Nat Prod*, 2016, 80(3): 588-597.
- [49] Sud M, Fahy E, Cotter D, *et al.* Metabolomics workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 44(D1): D463-D470.
- [50] Fan Y, Li Y, Chen Y, *et al.* Comprehensive metabolomic characterization of coronary artery diseases [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(12): 1281-1293.
- [51] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [52] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [53] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [54] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 3149-3154.
- [55] 刘丽梅, 张俊华, 岳广欣, 等. 组分中药产生背景回顾及未来展望 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(5): 1-5.
- [56] Allen F, Pon A, Wilson M, *et al.* CFM-ID: A web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W94-W99.
- [57] Allard P M, Genta-Jouve G, Wolfender J L. Deep metabolome annotation in natural products research: Towards a virtuous cycle in metabolite identification [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 36: 40-49.
- [58] Ruttkies C, Schymanski E L, Wolf S, *et al.* MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation [J]. *J Cheminform*, 2016, doi: 10.1186/s13321-016-0115-9.
- [59] Shen H, Zamboni N, Heinonen M, *et al.* Metabolite identification through machine learning-tackling casmi challenge using FingerID [J]. *Metabolites*, 2013, 3(2): 484-505.