

UPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI信息学平台快速检测与鉴别九味镇心颗粒中的化学成分

袁付丽, 刘传鑫, 王 强, 姚柯男, 宋 扬, 何 涛, 王文鑫, 黄建梅*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 建立UPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI用于九味镇心颗粒化学成分的快速检测与鉴别方法。方法 采用UPLC-Q-TOF/MS^E技术对九味镇心颗粒中的化合物进行分析, 使用Waters Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B)洗脱(0~14 min, 2%B; 14.0~16.5 min, 60%B; 16.5~20.0 min, 98%B), 体积流量设为0.3 mL/min, 柱温为40 °C, 进样量5 μL。质谱分析采用电喷雾离子源, 正、负离子模式下依赖MS^E方式采集数据, 采集范围为 m/z 50~1 200, 基于UNIFI在线软件结合MassLynx软件及人工审核进行化学成分鉴定与匹配。**结果** 实现了九味镇心颗粒中89种化学成分的快速鉴别, 其中有29个来源于君药(人参、酸枣仁), 47个来源于臣药(茯苓、五味子、延胡索、远志), 12个来源于佐药(地黄、天冬), 1个来源于使药(肉桂)。**结论** 建立的基于UPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI方法首次对九味镇心颗粒的化学成分进行快速的筛选, 为发现中药大复方中的非靶向分析和成分鉴定提供了新的视角, 也可以为其物质基础、质量控制的研究提供依据。

关键词: UPLC-Q-TOF/MS^E; UNIFI; 九味镇心颗粒; 定性鉴别; 快速分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)10-1997-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.012

Rapid detection and identification of compounds in Jiuwei Zhenxin Granules based on UPLC-Q-TOF/MS^E and UNIFI software

YUAN Fuli, LIU Chuanxin, WANG Qiang, YAO Kenan, SONG Yang, HE Tao, WANG Wenxin, HUANG Jianmei

School of Traditional Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To evaluate a method for rapid detection and identification of compounds in Traditional Chinese Medicine preparation based on UPLC-Q-TOF/MS^E and UNIFI software. **Method** UPLC-Q-TOF/MS^E was used to rapidly analyze chemical constituents of Jiuwei Zhenxin Granules, chromatographic separation was performed on an Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) for gradient elution with the mobile phase of 0.1% formic acid solution (A) and 0.1% formate acetonitrile solution (B) for gradient elution (0 — 14 min, 2%B; 14.0 — 16.5 min, 60%B; 16.5 — 18.0 min, 98%B; 18 — 20 min, 98%B), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40 °C, the injection volume was 5 μL. The mass spectrographic analysis was used with electrospray ionization (ESI), sample MS data was acquired by time-dependent MS^E in both positive and negative ion mode, the collection range was m/z 50 - 1 200. Chemical composition identification and matching based on UNIFI online software, Masslynx software and manual verification. **Result** Totally 89 chemical components in Jiuwei Zhenxin Granules was successfully identified, including 29 from principle drug (*Ginseng* and *Semen Zizyphi spinosae*), 47 from minister drug (*Poria cocos*, *Chinese Magnoliavine fruit*, *Corydalis tuber*, and *Polygala tenuifolia*), 12 from assistant drug (*Rehmannia root* and *Asparagi radix*), and 1 from envoy drug (*Cinnamon*). **Conclusion** The rapid method based on UPLC-Q-TOF/MS^E and UNIFI was achieved for screene of chemical components in Jiuwei Zhenxin granules for the first time. The study indicated that it is a practical method for non-targeted analysis and identification of compounds in Traditional Chinese Medicine preparation, and also give evidences for pharmacodynamic material and quality control of Traditional Chinese Medicine preparation.

Key words: UPLC-Q-TOF/MS^E; UNIFI; Jiuwei Zhenxin Granules; qualitative identification; rapid analysis

收稿日期: 2020-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173541)

第一作者: 袁付丽(1995—),女,河北保定人,硕士研究生,从事焦虑症潜在机制与中药干预研究。E-mail:m17812003015@163.com

*通信作者: 黄建梅,女,博士,教授,研究方向为中药成分分析和体内药物分析。E-mail:huangjm@bucm.edu.cn

焦虑症^[1]是一种以焦虑情绪为主的神经系统疾病,以持续性的焦虑、紧张、惊恐不安等焦虑情绪为表现,并且伴有自主神经紊乱、肌肉紧张及运动不安等症状。中药和中成药治疗焦虑症有较好的效果,而且具有副作用小的特点。九味镇心颗粒是第一个国家食品药品监督管理局(SFDA)批准治疗焦虑症的中成药,原方参照宋代官修大型方书《太平惠民和剂局方》中的“平补镇心丹”,并依据现代医学理论对古方进行增减,具有养心补脾、益气安神的功效,主治中医心脾两虚证的广泛性焦虑症。药效学研究表明,该中成药具有不同程度的抗焦虑、催眠、抗惊厥、抑制自主运动、调节植物神经功能方面的作用^[2]。武君芳等^[3]通过对比实验证明,使用九味镇心颗粒联合盐酸舍曲林治疗广泛性焦虑效果优于单独使用盐酸舍曲林,且安全性良好。张宏耕等^[4]发现,单独使用九味镇心颗粒及联用小剂量帕罗西汀治疗广泛性焦虑症疗效确切,副反应发生率低,耐受性较好。王颢等^[5]研究发现,九味镇心颗粒在治疗精神分裂症伴发焦虑症状时疗效确切,与帕罗西汀疗效相当,不良反应发生率低,依从性高,还同时存在协同治疗精神病性症状的疗效。然而,中药及中成药的化学成分复杂,药效物质基础研究是制约其发展的瓶颈。因此开发中药和中成药制剂的全成分分析方法,实现复杂成分的定性定量分析,已经成为科研工作者的努力目标。

液质联用技术将应用范围极广的分离方法液相色谱法与灵敏、专属、能提供分子量和结构信息的质谱法结合起来,促进了中药化合物的分离与鉴定的覆盖范围,提高效率和准确性,成为了一种重要的现代分离分析方法,在化合物定性方法中具有重要作用^[6]。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)是最常用的液质联用技术^[7],具有扫描速度快、灵敏度高、重复性好等优点,它可以提供前体离子和碎片离子的精确质量数及可能的元素组成,已经被广泛应用于中药成分分析中。UNIFI传统医学数据库信息学平台是由 Waters 公司研发,集数据采集、数据挖掘、图书馆搜索和报告生成于一身,包含 600 多种草药和 6 000 多种化合物的详细信息,可通过软件自动进行峰提取和确认等数据处理过程,与数据库中的化合物信息进行匹配,最终通过预设的方法给出所鉴定化合物的详细信息。UNIFI 数据分析平台天然产物分析方案技术在中药

物质基础的快速筛选鉴定中被广泛应用^[8]。

本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 结合 UNIFI 对大复方九味镇心颗粒的化学成分进行系统、快速的表征和分析,为建立复方中化学成分的快速分析奠定基石。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

九味镇心颗粒(北京北陆药业有限公司,6 g/袋,批号 08191016);质谱级甲醇、乙腈、甲酸(批号分别为 190379、192552、179246,赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 主要仪器

Acquity UPLC I-CLASS 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);SYNAPT G2-Si Q-TOF 质谱仪(美国 Waters 公司);JA2003B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);0.22 μm 有机微孔滤膜(津腾实验设备有限公司);数据处理软件 MassLynx V 4.1(美国 Waters 公司);UNIFI V 1.8(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的配制

取九味镇心颗粒 0.252 g 加 50% 甲醇至 10 mL 后超声提取,8 层纱布滤过,合并滤液。4 °C、12 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液,稀释 5 倍后过 0.22 μm 微孔滤膜,进行 UPLC-Q-TOF/MS^E 分析。

2.2 色谱及质谱条件

2.2.1 色谱条件 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 技术对九味镇心颗粒中的化合物进行分析,使用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),洗脱方式为梯度洗脱(0~14 min, 2%B; 14.0~16.5 min, 60%B; 16.5~20.0 min, 98%B),体积流量为 0.3 mL/min,柱温为 40 °C,进样量 5 μL。

2.2.2 质谱条件 SYNAPT G2-Si Q-TOF/MS 高分辨离子阱质谱仪采用电喷雾电离源(ESI),在正、负离子模式下分别进行质谱检测分析。使用高纯 N₂ 作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体。干燥气体积流量为 10 mL/min;N₂ 温度为 120 °C;雾化气气压为 310 kPa;脱溶剂 N₂ 体积流量 900 L/h;锥孔反吹 N₂ 50 L/h;毛细管电离电压 500 V;锥孔电压 40 V;碰撞能量为 40~65 eV;四极杆扫描范围为 m/z 50~1 200。

2.3 数据分析

使用MassLynx V4.1和以中药数据库为基础的UNIFI V1.8软件进行数据采集与分析。基于目前已有文献和TCMSP数据库(<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)建立九味镇心颗粒中9味中药的化学成分数据库,随后登录Chemspider官方网站(<http://www.chemspider.com/>),下载各化合物的mol文件。基于UNIFI在线软件进行化学成分鉴定与匹配,具体参数设置如下:分析类型设置为MS^E数据的精确质量数筛查;高能量强度阈值40.0;低能量强度阈值300.0;碎片离子匹配容差 1×10^7 ;保留时间容差0.1 min;Lockmass校正质量数:ESI⁺为556.276 6,ESI⁻为

554.262 0。Fliter设置为 $<1 \times 10^{-5}$,峰强度 10^3 。通过人工校验和核实各化合物的精确分子量及MS/MS,确定九味镇心颗粒的化学成分。

3 结果

3.1 色谱轮廓分析

采用UPLC-Q-TOF/MS^E分析技术对九味镇心颗粒的提取液进行数据采集,UNIFI V1.8软件进行数据分析,通过文献报道及碎片信息结合MassLynx软件进行人工确认,共鉴定得到89种化学成分。图1为正、负离子模式下九味镇心颗粒的BPI图,表1、2分别为正、负离子模式下鉴定出的化合物。

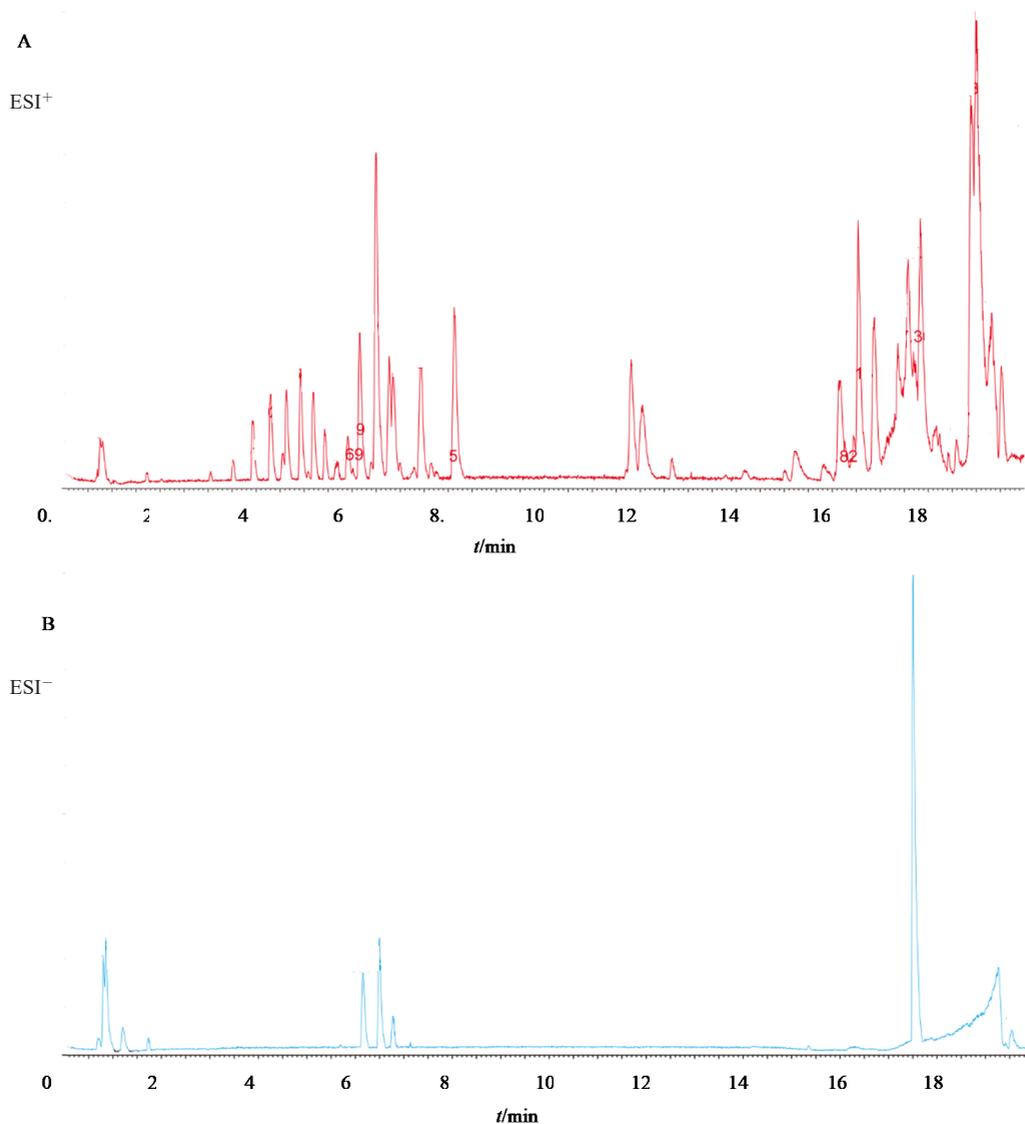


图1 UPLC-Q-TOF/MS^E的BPI色谱图

Fig. 1 BPI chromatogram of UPLC-Q-TOF/MS^E

表1 九味镇心颗粒正离子模式化合物鉴定

Table 1 Identification of compounds in Jiuwei Zhenxin Granules in positive ion model

编号	t/min	离子模式	实测 m/z	Mr(中性碎片)	MS/MS	化学成分	来源
1	0.77	[M+H] ⁺	295.148 3	294.138 7	180.093 3, 198.116 9, 242.106 8	ginsenoside B	人参
2	0.81	[M+K] ⁺	543.129 0	504.169 0	109.028 4, 127.038 9, 145.049 5, 163.060 1, 204.099 2, 289.091 7	棉子糖	地黄
3	0.85	[M+H] ⁺	163.059 6	162.052 8	91.038 9, 116.010 4, 145.049 5, 146.020 9	L-苹果酸二甲酯	茯苓
4	1.13	[M+K] ⁺	839.233 6	800.273 9	109.028 4, 145.049 5, 163.060 0, 289.091 7, 335.076 1, 709.197 4	肉苁蓉苷 A	地黄
5	1.22	[M+Na] ⁺	215.015 7	192.027 0	85.029 5, 87.008 7, 111.008 7, 129.019 3, 154.998 6	L-erythro-isocitric acid	人参
6	4.25	[M+H] ⁺	286.143 7	285.136 5	107.049 1, 117.033 4, 145.015 8, 162.091 3	乌药碱	酸枣仁 ^[9]
7	4.57	[M+H] ⁺	342.168 8	341.162 7	265.085 9, 282.088 6, 297.112 1, 311.127 7	N-甲基六驳碱	延胡索
8	4.60	[M+H] ⁺	342.172 5	342.170 5	297.115 2, 265.089, 237.018, 222.073 9	酸李碱	酸枣仁 ^[9]
9	5.01	M ⁺	314.172 8	314.175 6	209.170 2, 174.877 1, 151.071 5	木兰箭毒碱	酸枣仁 ^[9]
10	5.12	[M+H] ⁺	328.153 7	327.147 1	265.110 3, 165.053 9	降异紫堇定碱	酸枣仁 ^[9]
11	5.14	[M+H] ⁺	328.152 3	327.147 1	107.049 1, 178.086 2	clarkeanidine	延胡索
12	5.07	[M+H] ⁺	453.334 2	452.329 0	227.177 7, 339.279 3, 435.334 1	neokadsuranic acid B	五味子 ^[10]
13	5.09	M ⁺	314.172 8	314.175 6	237.148 9, 209.170 2, 136.093 2	莲心季铵碱	酸枣仁 ^[9]
14	5.27	[M+H] ⁺	607.179 1	608.174 1	447.155 2, 393.122 7, 327.086 9, 297.070 1	异斯皮诺素	酸枣仁 ^[9]
15	5.92	[M+H] ⁺	342.167 4	341.162 7	119.049 1, 162.054 9, 163.062 7, 165.091 0, 178.086 2, 310.143 7	紫堇单酚碱	延胡索
16	6.24	[M+H] ⁺	356.182 7	355.178 4	148.075 6, 177.078 4, 192.101 9, 308.128 1, 340.154 3	异紫堇球碱	延胡索
17	6.26	[M+Na] ⁺	369.115 3	346.126 4	91.054 2, 119.049 1, 147.044 0, 175.038 9, 192.099 2, 280.094 1	桃叶珊瑚苷	地黄
18	6.41	[M+H] ⁺	354.131 5	353.126 3	135.044 0, 149.059 7, 188.070 6, 336.123 0	原阿片碱	延胡索 ^[11]
19	6.61	[M+H] ⁺	356.184 7	355.178 4	151.075 3, 163.062 7, 178.086 2, 147.044 0, 147.044 0	延胡索乙素	延胡索
20	6.711	M ⁺	338.138 3	338.139 2	323.103 8, 307.078 4, 289.095 2, 279.087 7, 265.074 7	非洲防己碱	延胡索 ^[12]
21	6.72	[M+H] ⁺	338.137 7	337.131 4	280.096 8, 322.107 3	去氢南天宁碱	延胡索
22	6.81	[M+H] ⁺	370.163 9	369.157 6	151.075 3, 159.067 8, 188.070 6, 206.081 1, 295.096 4, 342.169 9	隐品碱	延胡索
23	6.87	[M+H] ⁺	356.185 0	355.178 4	174.054 9, 267.101 5, 282.125 0, 292.096 8, 310.119 9, 340.154 3, 325.139 5, 279.109 6	海罂粟碱	延胡索 ^[11]
24	6.89	[M+H] ⁺	324.122 4	323.115 8	151.075 3, 165.091 0, 174.054 9, 292.096 8, 309.112 1, 310.119 9, 176.070 6	金罂粟碱	延胡索 ^[13]
25	7.15	[M+H] ⁺	587.427 6	586.423 3	81.069 8, 109.101 1, 119.085 5, 135.116 8, 161.132 4, 535.399 3	殷金醇棕榈酸酯	人参
26	7.26	[M+H] ⁺	340.155 4	339.147 1	119.049 1, 147.044 0, 149.060 6, 292.096 8, 293.104 6, 176.074 2, 192.887 1	四氢小檗碱	人参 ^[11, 14]
27	7.29	[M+H] ⁺	337.130 6	336.123 6	149.059 7, 176.074 2, 290.081 1, 292.097 7, 306.076 6, 321.099 5, 278.810 6	小檗碱	延胡索 ^[15]
28	7.41	[M+H] ⁺	354.170 0	353.162 7	149.059 7, 159.067 8, 176.070 6, 190.086 2, 192.101 9, 206.117 5	卡文定碱	延胡索
29	7.44	[M+H] ⁺	370.202 6	369.194 0	159.067 8, 176.070 6, 190.086 2, 192.101 9, 206.117 5, 338.151 2, 165.091 0, 192.101 9, 151.075 3	紫堇碱	延胡索 ^[15]
30	8.00	[M+H] ⁺	417.338 1	416.329 0	145.101 1, 147.116 8, 173.132 4, 227.179 4, 255.210 7, 273.221 2	异菝葜皂苷元	天冬
31	8.14	[M+H] ⁺	350.139 0	349.131 4	290.081 1, 292.096 8, 304.096 8, 306.112 4, 320.091 7, 334.107 3	二氢白屈菜红碱	延胡索
32	8.314	[M+H] ⁺	366.169 1	365.162 7	350.140 9, 334.112 2, 336.118 3, 292.094 5, 308.127 4, 306.115 2	去氢紫堇碱	延胡索 ^[12-13]
33	9.31	[M+H] ⁺	1109.61281	108.6029	85.028 4, 443.388 3, 789.478 3, 879.458 4, 880.445 1, 1023.537 0	人参皂苷 Rb ₁	人参 ^[16]
34	9.67	[M+H] ⁺	1165.61051	1164.5928	95.085 5, 147.116 8, 159.116 8, 189.163 7, 227.179 4, 831.510 0	丙二酰基人参皂苷 Rc	人参
35	10.28	[M+H] ⁺	347.112 2	346.105 3	218.057 3, 289.070 6, 317.073 7, 332.089 0	3-methyl betuletol	五味子
36	11.82	[M+Na] ⁺	455.204 6	432.214 8	415.212 8, 400.190 9, 384.191 3, 369.166 0, 353.161 9	五味子素	五味子 ^[10, 17]
37	11.83	[M+Na] ⁺	455.2026	432.214 8	161.059 7, 245.080 8, 273.075 7, 322.156 3, 342.146 1, 344.125 4	malkangunin	人参

续表1

编号	t/min	离子模式	实测 m/z	Mr(中性碎片)	MS/MS	化学成分	来源
38	12.58	[M+H] ⁺	389.193 9	388.188 6	287.097 0,319.106 0,357.061 6,374.697 9	戈米辛J	五味子 ^[10]
39	12.74	[M+Na] ⁺	439.177 6	416.183 5	337.151 6,353.137 3,368.160 1,399.188 1	五味子醇乙	五味子 ^[11]
40	13.82	[M+Na] ⁺	523.233 0	500.241 0	359.234 6,383.128 3,401.188 2,483.194 2	当归酰五味子脂素H	五味子 ^[11]
41	14.34	[M+K] ⁺	575.165 9	536.204 6	325.107 0,340.130 5,351.122 7,371.148 9,383.148 9,415.175 1	戈米辛G	五味子 ^[11]
42	15.02	[M+Na] ⁺	371.149 3	348.157 3	184.073 0	chamissonin diacetate	五味子
43	15.02	[M+H] ⁺	537.210 8	536.204 6	284.067 9,340.130 5,371.148 9,382.141 0,385.164 5,415.175 1	苯甲酰五味子脂素P	五味子
44	15.03	[M+H] ⁺	537.216 7	536.204 6	299.082 6,325.115 9,340.132 3,371.156 8,415.816 1	五味子酯甲	五味子 ^[10]
45	15.37	[M+H] ⁺	403.213 3	402.204 2	371.148 9,388.188 0	戈米辛T	五味子 ^[17]
46	15.65	[M+H] ⁺	515.231 8	514.220 3	340.130 5,371.148 9,382.141 0,385.164 5,415.175 1,437.159 4	戈米辛E	五味子
47	15.66	[M+H] ⁺	515.224 6	514.220 3	401.293 1,415.230 6,496.314 8,395.029 4,385.173 4	五味子酯乙	五味子 ^[10,17]
48	15.97	[M+H] ⁺	219.174 1	218.167 1	203.143 0	α-cuparenol	五味子
49	16.26	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	417.225 8 439.205 6	416.219 9	402.194 5,345.142 8,370.181 8,316.125 9,301.139 9,285.115 3	五味子甲素	五味子 ^[10]
50	16.50	[M+Na] ⁺	467.202 2	444.214 8	219.101 5,307.117 6,319.117 6,330.109 7,354.146 1,358.141 0	五味子酚酯	五味子
51	16.55	[M+H] ⁺	285.073 8	284.068 5	137.059 7,267.065 1,269.080 8	大黄素甲醚	延胡索
52	16.65	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	401.196 9 423.177 2	400.188 6	386.168 0,370.181 8,354.155 4,355.076 2,300.102 8,269.077	五味子乙素	五味子 ^[10]
53	16.70	[M+H] ⁺	385.164 9	384.157 3	355.068 0,341.026 6,325.147 4,285.074 8	五味子丙素	五味子 ^[10]
54	16.79	[M+Na] ⁺	521.209 9	498.217 3	147.065 1,299.087 3,322.113 2,323.121 0,357.141 8,425.2129 7	精氨酸双糖苷	人参
55	17.05	[M+Na] ⁺	485.106 0	462.116 2	404.111 2,115.003 6,125.024 4,129.019 3,143.034 9,323.019 7,353.066 6,161.045 5,101.024 4	6-甲氧基木犀草素 7α-L-鼠李糖苷	人参
56	17.17	[M+Na] ⁺	495.346 9	472.355 3	201.163 7,217.195 0	常春藤皂苷元	茯苓
57	17.38	[M+K] ⁺	469.311 5	430.344 7	109.101 1,159.116 8,161.132 4,185.132 4,209.117 2,233.153 6	酒酵母甾醇	茯苓
58	17.50	[M+Na] ⁺	245.224 8	222.234 8	95.085 5,97.101 1,109.101 1,111.116 8,123.116 8,151.148 1	1-十六碳炔	人参
59	17.54	[M+H] ⁺	135.116 9	134.109 6	79.054 2,91.054 2,93.069 8,107.085 5,121.101 1	聚伞花素	肉桂
60	18.26	[M+K] ⁺	721.179 5	682.210 9	147.065 1,205.013 1,237.075 7,297.081 6,355.065 9,371.097 2	远志寡糖酯A	远志
61	19.38	[M+H] ⁺	577.376 3	576.366 2	91.054 2,147.065 1,159.116 8,163.148 1,167.143 0,184.073 0	延龄草苷	天冬

表2 九味镇心颗粒负离子模式化合物鉴定

Table 2 Identification of compounds in Jiuwei Zhenxin Granules in negative ion model

编号	t/min	离子模式	实测 m/z	Mr(中性碎片)	MS/MS	化学成分	来源
1	0.78	[M-H] ⁻	497.208 5	498.217 3	132.030 2,145.098 2,173.104,204.051 3,213.135,235.082 3	精氨酸双糖苷	人参
2	0.82	[M+Cl] ⁻	539.137 7	504.169 0	95.013 8,119.034 9,125.024 4,129.019 3,135.029 9,143.034 9	棉子糖	地黄
3	0.83	[M+Cl] ⁻	381.092 4	346.126 4	95.013 8,119.034 9,125.024 4,129.019 3,179.056 1,235.082 3	桃叶珊瑚苷	地黄
4	0.84	[M-H] ⁻	161.045 2	162.052 8	91.038 9,116.010 4,145.049 5,146.020 9	L-苹果酸二甲酯	茯苓
5	0.85	[M+HCOO] ⁻	845.276 3	800.273 9	95.013 8,119.034 9,125.024 4,129.019 3,179.056 1,235.082 3	肉苁蓉苷A	地黄
6	0.86	[M+CH ₃ COO] ⁻	683.222 5	624.208 7	383.118 9,377.084 9,545.170 7,503.160 7,179.056 0,161.045 5	毛蕊花糖苷	地黄 ^[18]
7	0.87	[M-H] ⁻	191.055 9	624.205 4	87.008 7,95.013 8,101.024 4,119.034 9,129.019 3,149.045 5	奎宁酸	五味子

续表2

编号	t/min	离子模式	实测 m/z	Mr(中性碎片)	MS/MS	化学成分	来源
8	0.89	[M+CH ₃ COO] ⁻	521.131 5	610.189 8	95.013 8、115.003 6、125.024 4、129.019 3、143.034 9、323.019 7	6-甲氧基木犀草素 7 α -人参 L-鼠李糖苷	
9	3.81	[M-H] ⁻	517.158 6	518.163 6	175.042 7、193.051 4、160.014 6	sibiricoses A5	远志 ^[19]
10	4.57	[M-H] ⁻	340.157 4	341.162 7	252.042 8、282.113 5、310.108 4、325.131 9	紫堇啡碱	延胡索
11	4.94	[M-H] ⁻	405.082 2	406.090 0	285.052 8、258.870 5、315.047 7	lancerin	远志 ^[20]
12	5.12	[M-H] ⁻	567.138 5	568.142 8	272.032 2、315.055 5、345.061 3、436.083 9	远志山酮 III	远志 ^[20]
13	5.25	[M-H] ⁻	667.190 4	668.195 2	461.114 4、205.052 4、190.027 9、137.028 3	远志蔗糖酯 B2	远志 ^[20]
14	5.30	[M-H] ⁻	607.163 8	608.174 1	324.871 7、427.097 6、337.080 9	斯皮诺素	酸枣仁 ^[21]
15	5.54	[M+CH ₃ COO] ⁻	667.185 8	608.174 1	175.003 6、190.027 1、445.114 0、461.130 0、165.075 7	酸枣黄素	酸枣仁 ^[21-22]
16	6.25	[M+CH ₃ COO] ⁻	547.167 1	488.153	164.047 8、221.081 9、223.061 2、295.082 3、307.067 0、367.103 4	肉苁蓉苷 F	地黄
17	6.42	[M-H] ⁻	609.181 8	610.189 8	95.013 8、119.034 9、125.024 4、129.019 3、143.034 9	橙皮苷	酸枣仁
18	6.98	[M-H] ⁻	681.201 5	682.210 9	443.119 5、137.028 3、179.036 7、239.060 4、281.070 1	tenuifolside A	远志 ^[23]
19	7.16	[M+HCOO] ⁻	845.488 1	800.492 2	112.988 0、475.379 2、619.421 5、637.432 1、765.479 4、781.474 3	人参皂苷 Rf	人参 ^[16]
20	7.40	[M+Cl] ⁻	1097.537 4	1062.561 1	375.166 0、457.171 5、919.490 8、925.443 8、983.449 3	甲基原薯蓣皂苷	天冬
21	7.49	[M+HCOO] ⁻	1111.549 9	1066.556 0	475.379 2、619.421 5、781.474 3、841.495 4、909.485 3、983.449 3	asparaside A	天冬
22	7.64	[M-H] ⁻	767.246 6	768.247 7	205.052 4、223.062 9、236.863 1、529.161 1	tenuifolside C	远志 ^[20]
23	9.11	[M+HCOO] ⁻	845.487 9	800.492 2	287.150 0、391.285 3、475.379 2、637.432 1	人参皂苷 R _{g1}	人参 ^[16]
24	9.32	[M+HCOO] ⁻	1153.595 4	1108.602 9	323.098 3、459.384 3、621.437 1、783.502 1、945.543 5、1049.504 8、1059.574 5	人参皂苷 R _{b1}	人参 ^[16]
25	9.39	[M+HCOO] ⁻	815.476 0	770.481 6	221.066 6、225.149 6、264.157 8、475.379 2、574.299 4、637.432 1	三七皂苷 R ₂	人参
26	9.67	[M+HCOO] ⁻	829.492 6	784.497 3	425.306 1、455.316 6、475.379 2、621.437 1、637.432 1、765.479 4	人参皂苷 R _{g3}	人参 ^[16]
27	9.75	[M-H] ⁻	955.486 3	956.498 1	311.134 7、523.379 2、551.374 2、569.384 7、835.448 5、836.419 9、613.338 2	人参皂苷 R _o	人参 ^[16]
28	10.16	[M+HCOO] ⁻	311.093 3	266.094 3	147.045 1	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	天冬
29	10.24	[M-H] ⁻	1163.579 4	1164.592 8	604.310 0、621.437 1、783.490 0、897.521 7、1029.563 9、1105.580 0	丙二酰人参皂苷 R _c	人参 ^[16]
30	10.56	[M+CH ₃ COO] ⁻	1089.546 3	1030.534 9	554.258、749.448 1、911.500 9、973.537 7	伪原薯蓣皂苷	天冬
31	10.84	[M-H] ⁻	1031.539 4	1032.550 5	621.437 1、765.479 4、879.495 8、889.371 0、927.532 2、973.537 7、987.553 4	丙二酰基人参皂苷 R _d	人参 ^[16]
32	10.85	[M+HCOO] ⁻	991.545 4	946.550 1	112.988 0、475.379 2、619.421 5、765.479 4、781.474 3、913.480 2、637.432 1、783.490 0	人参皂苷 R _e	人参 ^[16]
33	16.46	[M+HCOO] ⁻	529.303 5	268.240 2	149.097 1、233.154 7、249.149 6、295.227 8	吡喃葡萄糖苷	人参
34	17.41	[M+HCOO] ⁻	621.435 7	324.302 8	291.160 1、205.159 8	西托糖苷	地黄
35	17.50	[M+HCOO] ⁻	369.302 2	280.240 2	141.092 1、253.217 3、275.238 0、279.232 9	顺-11-二十烯酸甲酯	人参
36	19.26	[M+Cl] ⁻	226.996 7	192.027 0	85.029 5、87.008 7、111.008 7、129.019 3、154.998 6	3-carboxy-3,4-dideoxy-D-erythro-pentanic acid	人参

3.2 质谱裂解规律

3.2.1 皂苷类化合物 皂苷类成分在一级质谱中可产生较强的[M-H]⁺、[M+HCOOH]⁺，多容易失去糖部分(m/z 162、324)，所以二级质谱中可见到失去

单糖或双糖的碎片离子，同时出现与其相应的系列碎片离子。本研究鉴定得到人参皂苷 R_f、R_{b1}、R_{g1}、R_o 等三萜皂苷类成分。以人参皂苷 R_{b1} 为例：在负离子模式下，保留时间为 9.32 min 的化合物，初步推

断为人参皂苷 Rb_1 ，属于人参二醇型皂苷， m/z 459.384 3 为其丢失所有糖配基而形成的母核离子， m/z 945.543 5、783.502 1、621.437 2 分别为其分别丢失 1、2、3 个分子葡萄糖基而形成的。裂解方式见图 2。

3.2.2 苯丙素类化合物 九味镇心颗粒中的苯丙素类化合物以联苯环辛烯型木脂素为主，均来源于五味子，包括戈米辛 J、戈米辛 G、戈米辛 T、戈米辛 E、苯甲酰五味子脂素 P、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子脂乙、五味子醇乙等。木脂素类化合物的苯环上的含氧基取代容易丢失，如五味

子乙素；联苯环辛烯环上如有羟基取代，易失水生成离子强度很强的离子，如五味子醇乙失水生成 m/z 399.188 1 的离子碎片；另外联苯环辛烯环易断裂，丢失 C_3H_{10} 碎片，以五味子乙素为例说明，正离子模式下，保留时间为 16.65 min 的化合物，一级碎片为 m/z 401.196 9，二级碎片有 m/z 386.168 0、370.181 8、354.155 4、355.076 2、300.102 8、269.077 0、331.126 3 等，通过与贺锐锐等^[24]得到的五味子乙素的标准碎片比对后，猜测其可能为五味子乙素。贺锐锐等通过 Discovery Studio 软件计算，并结合碎片离子，其可能的裂解形式见图 3。

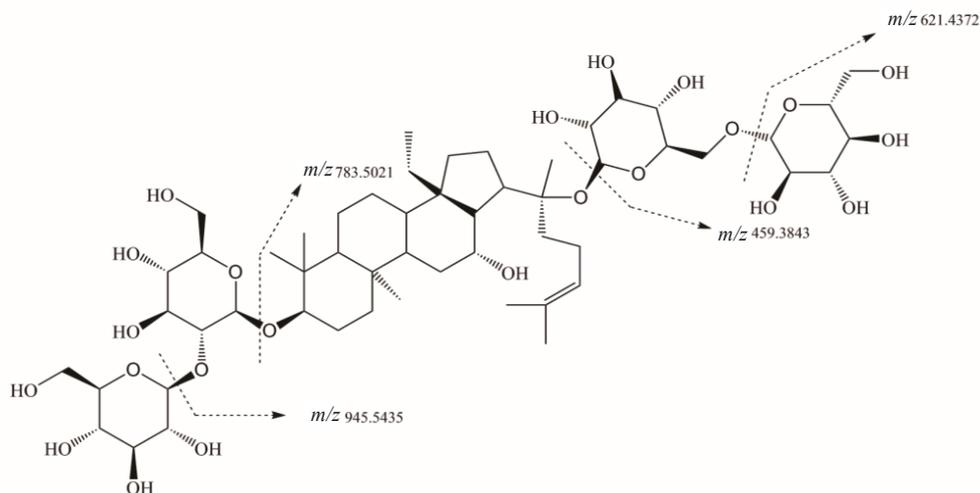


图 2 人参皂苷 Rb_1 的质谱裂解方式

Fig. 2 Fragmentation mode of ginsenoside Rb_1 by mass spectrometry

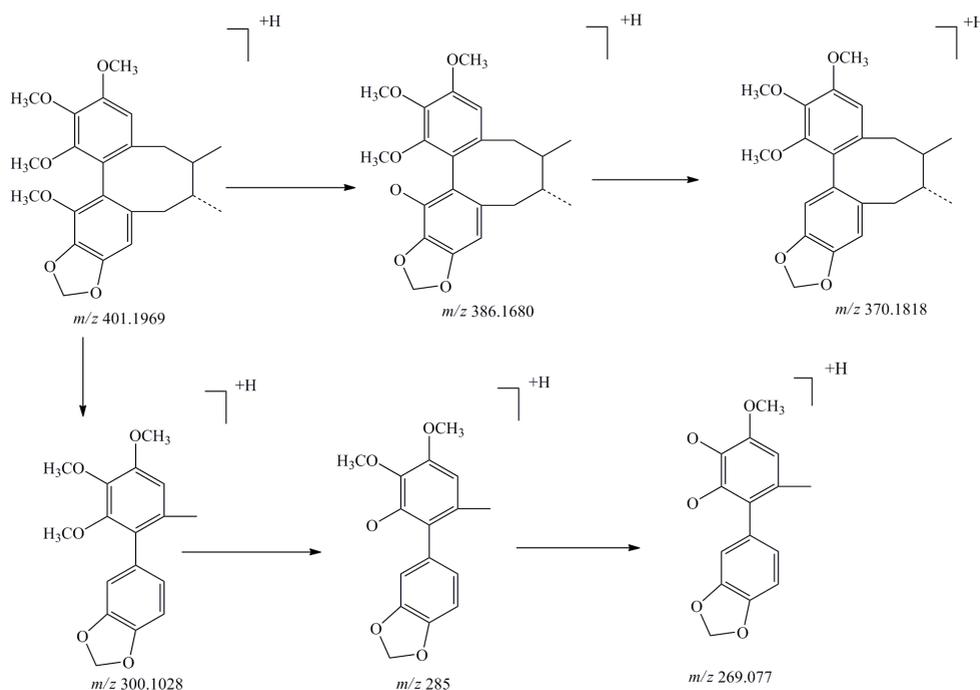


图 3 五味子乙素的质谱裂解方式

Fig. 3 Fragmentation mode of schisandrin B by mass spectrometry

3.2.3 生物碱类化合物 九味镇心颗粒中鉴定得到约20种生物碱类成分,以小檗碱和(四氢)原小檗碱类为主,包括紫堇碱、去氢紫堇碱、小檗碱、四氢小檗碱、金罂粟碱、延胡索乙素等,还存在去氢南天宁碱、乌药碱、二氢白屈菜红碱等苜蓿基异喹啉类生物碱。原小檗碱类生物碱母核一般不会发生裂解,仅有小分子取代基的裂解与丢失,如 m/z 334、321.099 5、320、306.076 6、292.097 7、278.810 6 为小檗碱取代基的丢失所形成的特征碎片离子峰, m/z 321.099 5 处的离子为小檗碱损失 C_9 或 C_{10} 上的中性自由基 CH_3 产生,小檗碱可失去1个 CH_4 , 形成羰基,通过分子重排在D环的 C_9 或 C_{10} 位置形成 m/z 320.105 1 的碎片离子,紧接着失去 CO 产生

m/z 292.097 7 处的离子。小檗碱也可损失两个中性自由基 CH_3 产生 m/z 306.076 6 的碎片离子,紧接着失去 CO 产生 m/z 278.810 6 的碎片离子。小檗碱的质谱裂解方式见图4。除了小分子取代基的丢失,四氢原小檗碱类还可发生 RDA 裂解,即从 C 环发生裂解,产生保留 A、B、D 环的一对互补离子,不但可以证实该生物碱的类型,还可以由相应的碎片峰 m/z 值推断 A 和 D 环上的取代基类型与数目,以四氢小檗碱为例说明,当 C 环发生 RDA 裂解时,产生 a 碎片 m/z 149.060 6、b 碎片 m/z 192.887 1,当 B 环发生 RDA 裂解时,产生 c 碎片 m/z 176.074 2 与 d 碎片 m/z 165。四氢小檗碱的裂解方式见图5。

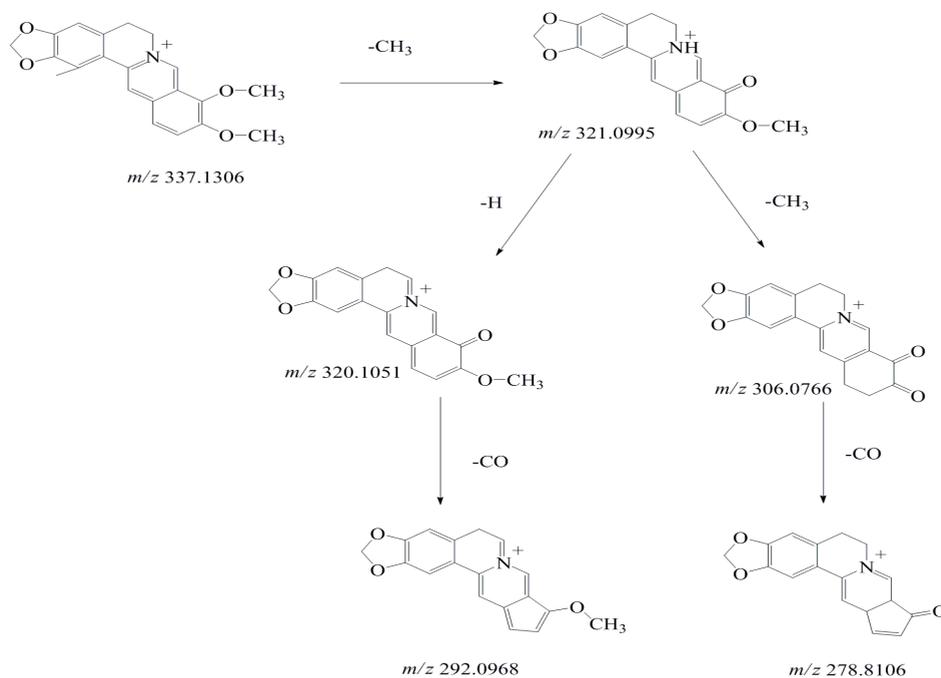


图4 小檗碱的质谱裂解方式

Fig. 4 Fragmentation mode of berberine by mass spectrometry

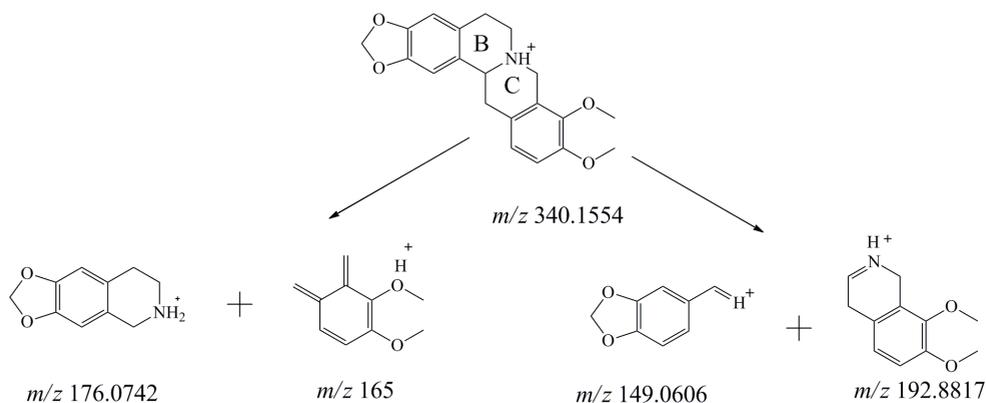


图5 四氢小檗碱的质谱裂解方式

Fig. 5 Fragmentation mode of canadine by mass spectrometry

3.2.4 黄酮类化合物 游离的黄酮类化合物除分子离子峰之外,在高质量区可见到[M-H]⁺、[M-CH₃]⁺、[M-CO]⁺等碎片离子出现,对于鉴定黄酮类化合物最有用的离子是含有完整A和B环的碎片离子,特别是碎片离子A⁺和相应的碎片B⁺的质荷比之和等于分子离子的质荷比。另外黄酮类化合物容易发生RDA裂解。根据黄酮类化合物的裂解规律和文献分析,鉴定到的黄酮类化合物有化合物35、55(正离子模式下),化合物8、15、17(负离子模式下)等。以3-methyl betuletol为例,正离子模式下,保留时间为10.28 min的化合物,鉴定为3-methyl betuletol,在6或8位含有甲氧基的黄酮类,在裂解中可失去甲基,m/z 332.089 0为失去6位甲基得到,

m/z 317.0737可能为失去6位甲基和3位(或4'位)甲基得到,产生强[M+H-C₂H₆]⁺的峰,接着可再失去CO,产生[M+H-C₃H₆O]⁺的峰,即m/z 289.0706,其裂解方式见图6。

3.2.5 其他 在负离子状态下,保留时间为6.98 min的化合物,通过与文献^[23, 25]中已知化合物标准品碎片对比后发现,其符合远志寡糖酯A的裂解规律,断定此化合物为远志寡糖酯A,碎片离子解释如下:m/z 443.119 5(三甲氧基桂基和羟基的丢失)、m/z 281.070 1(三甲氧基桂基和果糖的丢失)、m/z 239.0604(三甲氧基桂基和羟基的丢失后剩余部分)和m/z 137.028 3(对羟基苯甲酸)。图7为其化学结构图。

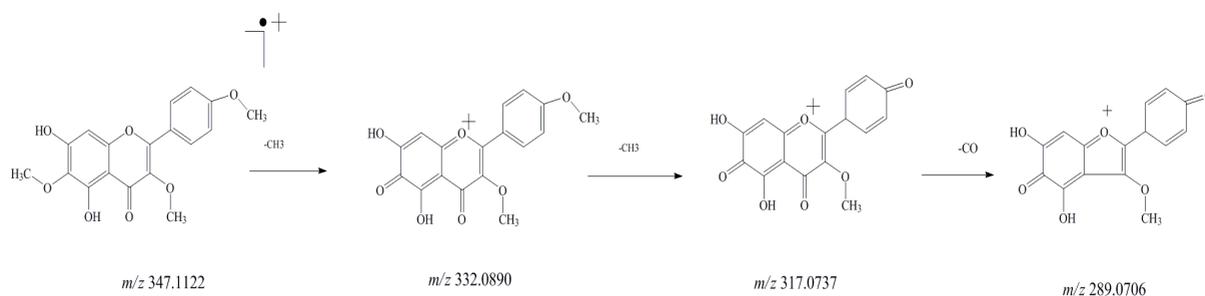


图6 3-methyl betuletol的裂解图

Fig. 6 Fragmentation mode of 3-methyl betuletol by mass spectrometry

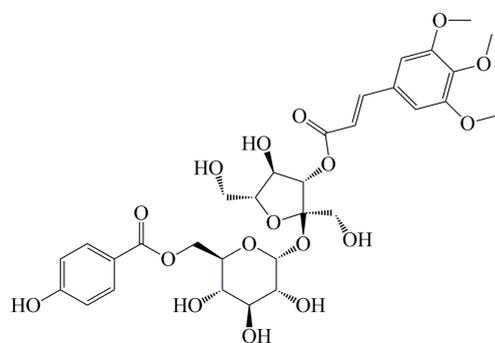


图7 远志寡糖酯A化学结构图

Fig. 7 Chemical structure of tenuifolside A

4 讨论

九味镇心颗粒在临床上主要用于治疗广泛性焦虑症心脾两虚证,可与其他药联用治疗焦虑与抑郁^[26]。本研究表明,九味镇心颗粒中存在大量人参皂苷、生物碱类成分,这些物质大多来源于人参、五味子、延胡索,国内外学者已对人参、五味子等中药的药效物质基础进行了大量研究,结合文献分析后发现,这些物质可能是九味镇心颗粒发挥抗焦虑作用、镇静安神、抗抑郁的药效物质基础。如Carr等^[27]利用高架十字迷宫实验筛选人参根中的抗焦

虑成分,表明人参皂苷Rb₁是人参根的抗焦虑活性成分之一。Kim等^[28]使用高价十字迷宫研究了红参中的抗焦虑作用成分,发现Rg₃和Rh₂的抗焦虑样活性被氟马西尼拮抗,即成分Rg₃和Rh₂可能通过拮抗γ-氨基丁酸(GABA)/苯并二氮杂类而发挥抗焦虑作用。另外Lee等^[29]研究发现,人参皂苷Re也是治疗焦虑的有效成分之一。Cha等^[30]采用高架十字迷宫的实验方法,比较了人参水提物及人参总皂苷的抗焦虑作用,发现只有给予人参总皂苷可以增加小鼠在开放臂的时间与次数,说明人参总皂苷在抗焦虑作用中发挥重要作用。

Lee等^[31]观察了ip小檗碱的大鼠相关焦虑行为,发现ip小檗碱增加了大鼠在开放臂的时间与次数,并且恢复了海马和纹状体的神经化学异常和氧化应激诱导的多巴胺组织水平下降,小檗碱治疗过程中DA浓度升高可能部分归因于海马酪氨酸羟化酶和多巴胺转运体mRNA的表达。邢志恒等^[32]综述了生物碱类化合物对神经系统的研究进展,并展望了生物碱对阿尔茨海默病、焦虑、抑郁的临床治疗的发展前景。

李国樑等^[33]研究发现,五味子甲素能明显改善

慢性不可预见性温和应激(CUMS)引起的大鼠抑郁样行为,其作用机制可能与缓解海马氧化应激水平和炎症反应相关。蔡萧君等^[34]研究五味子乙素对抑郁模型大鼠海马神经递质含量、炎症及氧化应激程度的影响,发现五味子乙素能够改善抑郁模型大鼠的抑郁行为并增加单胺类神经递质分泌、抑制炎症及氧化应激反应。

九味镇心颗粒中的人参皂苷、生物碱类成分可能是其药效物质基础,但经口服给药后,多经过胃肠道的消化^[35-36],不排除代谢物发挥作用,因此应采取其他技术手段如网络药理学^[37]及血清药物化学^[38]等进一步分析筛选组方中的潜在药效物质基础,如赖先荣等^[39]分别采用体外抗内毒素活性实验和前脂肪细胞3T3-L1胰岛素抵抗模型试验,以及高效液相色谱(HPLC)法血清指纹图谱等血清药物化学研究方法,研究了三黄方抗内毒素及黄连炮制品改善胰岛素抵抗的药效物质基础。张宁等^[40]利用中药血清药物化学的方法,初步确定逍遥散治疗黄褐斑的药效物质基础及其作用机制。张铁军^[41]通过结合整体动物、网络药理学及基因组学等方法明确了疏风解毒胶囊的药效物质基础,初步阐释疏风解毒胶囊的作用机制。柯志鹏等^[42]采用网络药理学方法结合分子相似性比较探索了芪桂痛风片治疗痛风的药效物质基础和分子作用机制。

中药复方是一个化学成分非常复杂的体系,它的药效物质基础是指方剂中发挥治疗作用的化学成分的和^[43],从方剂作用的整体观出发,对其复杂的化学物质体系实现快速的分离分析是进行方剂现代化研究的关键,色谱质谱联用技术在一定程度上解决了这一难题^[10]。如Zhou等^[44]通过UPLC-Q-TOF-MS法同时测定龙柴汤中的8种指标性成分,并进行了中药配伍前后化学成分的变化分析。李玲云等^[45]采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对栀子金花丸整方的化学成分进行定性分析,推测鉴定出65个化学成分。杨岱琳等^[46]采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间/全信息串联质谱(UPLC-ESI-Q-TOF/MS^E)技术系统阐明复方中药养血清脑颗粒的化学组成,共鉴定出142种成分。然而,化合物的组成极其复杂,加之对检测到的质谱数据的理解不足,使数据处理变得困难和耗时,因此开发一种快速、精准的复方成分鉴定分析方法,对提高临床应用和质量控制具有重要意义。UNIFI是一个高效和广泛的数据分析集中识别化合物方法的平台。

它整合从质谱中提取到的碎片信息和化合物内在结构之间的相关性。因此本研究基于UPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI的分析策略,针对复方中繁杂、冗余的化学成分鉴定的科研挑战,以九味镇心颗粒为例,进行了系统的分析方法的开发。结果表明,该策略对于中药复杂复方的样本分析快速、省时,且具有较好的准确性,这为发现中药或中成药中的非靶向成分提供了新的视角,也为后期的潜在药效成分的开发和分子药理学实验提供奠定基础。

本方法也存在一定局限性,首先,由此方法鉴定到的化合物无对照品进行比对,所以可能存在假阳性的情况;其次,利用UPLC-Q-TOF/MS^E技术尚不能区分取代基位置异构体,需进一步通过核磁共振(NMR)进行确定^[47];再次,本实验使用的C₁₈柱对极性化合物保留较小,因此有些极性化合物的分离鉴定还需进一步研究,药物中的化学组分可能有较大的含量跨度,因此,应该有更灵敏的方法开发用于含量较低的物质;然后,九味镇心颗粒中没有鉴定得到九味中药中的部分质控成分,这可能与使用药材的品种、部位、提取方法及液质条件有关,也可能与中药组方的炮制有关,中药炮制后的药性、化学成分均可能发生变化^[48]。最后,由于质谱本身灵敏度的局限性,本方法鉴定得到的化合物并不代表九味镇心颗粒中的全部成分。由于九味镇心颗粒色谱峰多而复杂,在离子流图中有一些响应较好的峰尚未定性,因此溶剂、色谱、质谱条件的仍待进一步优化,化学成分有待进一步研究。

本研究提出一种基于UPLC-Q-TOF/MS^E结合UNIFI鉴定中药复方中化合物的方法,并以九味镇心颗粒为例,成功鉴定出其中89种化合物,该方法对研究化学成分复杂的中药和中药复方具有广泛的实用性,为中药质量控制研究和基于药效物质的机制研究提供了有效手段。

参考文献

- [1] 孔秋玲,邹江冰,蒋琳兰. 焦虑症的生化病理机制研究进展[J]. 广东医学, 2011, 32(21): 2869-2871.
- [2] 黄淑贞,芦 苓,翟屹民,等. 九味虑平颗粒治疗广泛性焦虑症的临床疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2005, 5(2): 113-115.
- [3] 武君芳. 九味镇心颗粒合并盐酸舍曲林治疗广泛性焦虑的临床疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(3): 442-443.
- [4] 张宏耕,张雪花,程 明,等. 九味镇心颗粒和帕罗西汀治疗广泛性焦虑症的临床疗效观察[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(12): 37-40.

- [5] 王 颢, 刘树宁, 占翠芹, 等. 九味镇心颗粒和帕罗西汀治疗精神分裂症伴发焦虑的临床观察 [J]. 神经损伤与功能重建, 2014, 9(3): 236-238.
- [6] 马亚娟, 王宝春, 殷海霞, 等. 液质联用技术在中药成分研究中的应用 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(56): 11076-11077.
- [7] 黄琳娜. 超高效液相色谱—质谱联用技术在药物分析中的应用研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2010.
- [8] Deng L, Shi A, Liu H, et al. Identification of chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform [J]. J Mass Spectrom, 2016, 51(12): 1157-1167.
- [9] Zhang F, Li M, Qiao L, et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 59-80.
- [10] Huang X, Song F, Liu Z, et al. Studies on lignan constituents from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(9): 1148-1161.
- [11] 赵玲玲, 袁 将, 王加利, 等. HPLC-MSⁿ法分析延胡索饮片中生物碱成分 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(3): 58-60, 64.
- [12] 程星焯, 石 钺. 延胡索抗心肌缺血活性部位指纹图谱中化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 79-81.
- [13] Ding B, Zhou T, Fan G, et al. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(2): 219-226.
- [14] 杨 鹏, 卿志星, 左 姿, 等. HPLC-Q-TOF/MS 鉴定白屈菜中异喹啉类生物碱 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(2): 174-182.
- [15] 程星焯, 石 钺, 孙 虹, 等. 延胡索活性部位入血成分的 LC-MS/MS 研究 [J]. 药学报, 2009, 44(2): 167-174.
- [16] Xie Y, Luo D, Cheng Y, et al. Steaming-induced chemical transformations and holistic quality assessment of *Red Ginseng* derived from *Panax ginseng* by means of HPLC-ESI-MS/MSn-Based multicomponent quantification fingerprint [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(33): 8213-8224.
- [17] 李 伟, 宋永贵, 刘匡一, 等. UHPLC-QTOF/MS 与代谢组学技术对北五味子炮制前后化学成分迁移研究 [J]. 药学报, 2016, 51(9): 1445-1450.
- [18] 陶 益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 地黄炮制前后化学成分的 UHPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 102-106.
- [19] 许晓双, 张艳花, 王丹丹, 等. 基于 UPLC/Q-TOF MS 代谢组学技术分析影响远志商品药材质量的关键因素 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(3): 65-73.
- [20] 薛 英, 李晓伟, 李震宇, 等. 采用 UPLC/Q-TOF MS 与 NMR 代谢组学技术研究生长年限对远志药材质量的影响 [J]. 药学报, 2015, 50(3): 340-347.
- [21] 王卫记, 罗建光, 孔令义. HPLC-ESI-MSⁿ 分析酸枣仁有效部位的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2768-2773.
- [22] 郭胜民, 范晓雯, 赵 强. 酸枣仁中黄酮类成分的研究 [J]. 中药材, 1997(10): 516-517.
- [23] 柴士伟, 杨 帆, 于卉娟, 等. UPLC/ESI-Q-TOF/MS 法分析远志中的化学成分 [J]. 天津中医药, 2018, 35(1): 60-64.
- [24] 贺锐锐, 谭 鹏, 韩 静, 等. 基于 Discovery Studio 软件解析五味子乙素的电喷雾/质谱裂解途径 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2013, 15(3): 527-530.
- [25] Wu D. Quality analysis of *Polygala tenuifolia* root by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Drug Anal, 2015, 1(23): 144-151.
- [26] 王海岭, 王传升. 文拉法辛联合九味镇心颗粒治疗围绝经期焦虑抑郁症的临床研究 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(2): 86-88.
- [27] Carr M N, Bekku N, Yoshimura H. Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 531(1-3): 160-165.
- [28] Kim T, Choi H, Kim N, et al. Anxiolytic-like effects of ginsenosides Rg₃ and Rh₂ from *Red Ginseng* in the elevated plus-maze model [J]. Plant Med, 2009, 75(8): 836-839.
- [29] Lee B, Shim I, Lee H, et al. Effect of ginsenoside re on depression- and anxiety-like behaviors and cognition memory deficit induced by repeated immobilization in rats [J]. J Microbiol Biotechm, 2012, 22(5): 708.
- [30] Cha H Y, Seo J J, Park J H, et al. Anxiolytic effects of total saponin fraction from *Ginseng Radix Rubra* on the elevated plus-maze model in mice [J]. J Ginseng Res, 2004, 28(3): 132-135.
- [31] Lee B, Shim I, Lee H, et al. Berberine alleviates symptoms of anxiety by enhancing dopamine expression in rats with post-traumatic stress disorder [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2018, 22(2): 183.
- [32] 邢志恒, 何忠梅, 祝洪艳, 等. 生物碱类化合物对中枢神经系统影响的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52

- (6): 95-98.
- [33] 李国樑, 曾丽海, 郑杰蔚. 五味子甲素对慢性不可预知温和刺激大鼠抑郁行为的影响及其机制 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(15): 1273-1279.
- [34] 蔡萧君, 颀彦鹏, 陆振华. 五味子乙素对抑郁模型大鼠海马神经递质含量、炎症及氧化应激程度的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019(15): 1125-1129.
- [35] 毕肖林, 杜秋, 狄留庆. 肠道转运蛋白和代谢酶在中药有效成分胃肠处置中的作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3): 143-146.
- [36] 曹伟宇. 基于人肠道菌群代谢系统从九节龙皂苷-1代谢物中筛选抗肿瘤活性物质的研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [37] 袁彩英, 刘本涛, 黄嘉咏, 等. 网络药理学在中药药效物质筛选和作用机制中的应用 [J]. 广州化工, 2019, 47(20): 20-22.
- [38] 魏元锋, 张宁, 冯怡, 等. 中药血清药物化学在中药药效物质基础研究中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 152-155.
- [39] 赖先荣, 张艺, 郑海杰, 等. 三黄方及其单味药药效物质基础的血清药物化学研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2010, 12(4): 666-670.
- [40] 张宁, 李会娟, 祁永华, 等. 基于中药血清药物化学方法的逍遥散治疗黄褐斑的药效物质基础研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2010, 12(4): 643-646.
- [41] 张铁军. 疏风解毒胶囊药效物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2019-2026.
- [42] 柯志鹏, 张新庄, 丁玥, 等. 利用网络药理学方法研究芪桂痛风片的药效物质基础与分子作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2837-2842.
- [43] 蒋海强, 李运伦, 周洪雷, 等. 从"谱-组关系"探索方剂药效物质基础与作用靶点的研究思路 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(3): 5-7.
- [44] Zhou Y Z, Liu X H, Chen F, et al. Simultaneous quantitative determination of eight index constituents and compatibility changes in Longchai Decoction by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Acta Pharm Sin B, 2013, 3(4): 281-287.
- [45] 李玲云, 王云, 刘梦娇, 等. 栀子金花丸化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS快速鉴定与分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 1-11.
- [46] 杨岱琳, 佟玲, 李晓稳, 等. UPLC-Q-TOF/MS^E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.
- [47] Okada Y, Matsuda K, Koizumi K, et al. Isolation and structural analyses of positional isomers of 6(1), 6m-di-*O*-alpha-*D*-mannopyranosyl-cyclomaltooctaose (m=2-5) and 6-*O*-alpha-(*n*-*O*-alpha-*D*-mannopyranosyl)-alpha-*D*-mannopyranosyl-cyclomaltooctaose (*n* = 2, 3, 4, and 6) [J]. Carbohydr Res, 1998, 310(4): 229-238.
- [48] 贾天柱. 中药炮制药性变化论 [J]. 中成药, 2019, 41(2): 232-233.