

UPLC-Q-TOF/MS^E分析鉴定肝豆扶木汤化学成分

黄蕾¹, 王倪¹, 董婷^{2*}, 曹仕健², 蒋羽鸽^{3,4}, 吴欢^{3,4}, 周安^{1,3,4*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 3. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230012; 4. 食药菌功能活性与资源利用安徽省联合共建学科重点实验室, 安徽 六安 237399)

摘要: 通过超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱技术 (UPLC-Q-TOF/MS^E) 对肝豆扶木汤的化学成分进行分析鉴定; 采用 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。质谱分析采用电喷雾电离源 (ESI) 的方式, 在正、负离子模式下, 通过 UPLC-Q-TOF/MS^E 分析鉴定肝豆扶木汤的化学成分。共鉴定出 102 种化合物, 其中黄酮类成分 26 个, 萜类成分 22 个, 皂苷类成分 19 个, 苯丙素类成分 10 个和其他类成分 25 个。本研究所建立的定性分析方法能快速、高效地对肝豆扶木汤的化学成分进行分析鉴定, 为肝豆扶木汤的质量评价和临床应用提供了科学依据。

关键词: 肝豆扶木汤; UPLC-Q-TOF/MS^E; 化学成分; 定性分析; 裂解规律

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0771-13

Identification of chemical components in Gandoufumu Decoction by UPLC-Q-TOF/MS^E

HUANG Lei¹, WANG Ni¹, DONG Ting^{2*}, CAO Shi-jian², JIANG Yu-ge^{3,4}, WU Huan^{3,4}, ZHOU An^{1,3,4*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 3. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230012, China; 4. Functional Activity and Resource Utilization on Edible and Medicinal Fungi Joint Laboratory of Anhui Province, Lu'an 237399, China)

Abstract: The main chemical components of Gandoufumu Decoction (GDFMD) were analyzed and identified using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS^E). We utilized a ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid in water and acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹ and a column temperature of 35 °C. The mass spectrometry was analyzed using an electrospray ionization source (ESI) in positive and negative ion modes. The UPLC-Q-TOF/MS^E was used to detect and analyze the complex mass spectra and the chemical composition of the GDFMD. The results show that 102 compounds were identified in GDFMD, 26 flavonoids, 22 terpenoids, 19 saponins, 10 phenylpropanoids, and 25 other components. The established qualitative method can rapidly and efficiently identify the chemical components of GDFMD, providing a scientific basis for the quality evaluation and clinical application of GDFMD.

Key words: Gandoufumu Decoction; UPLC-Q-TOF/MS^E; chemical composition; qualitative analysis; fragmentation pattern

收稿日期: 2024-09-19; 修回日期: 2024-12-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81872976); 安徽省卫生与健康研究 (AHWJ2022b062); 安徽省红十字会中医药传承创新与发展研究项目 (2022ZYD06); 安徽省临床医学研究转化专项 (202204295107020043).

*通讯作者 Tel: 86-551-65169752, E-mail: anzhou@ahcm.edu.cn; dongting2002@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0917

威尔逊病 (Wilson's disease, WD), 又称肝豆状核变性, 是一种由铜代谢障碍引起的遗传性疾病^[1]。该病发病机制为患者体内 ATP7B 基因突变致使铜蓝蛋白合成障碍无法排出体内的铜, 进而引起铜在多个器官沉积, 造成大脑和肝脏为主的器官质性损害^[2,3]。WD 的临床药物治疗主要以青霉胺为代表的重金属螯合剂, 金属螯合剂药物可通过络合铜离子发挥促进铜体内排泄作用, 然而该类药物不良反应较多, 药物安全性较差, 约 20%~30% 接受青霉胺治疗的患者出现了神经系统症状恶化, 临床应用受到了很大限制^[4]。

肝豆扶木汤 (Gandoufumu Decoction, GDFMD) 是安徽中医药大学第一附属医院杨文明教授经多年的临床实践拟定方剂, 临床实践证实该方可通过促进体内铜排泄从而显著改善 WD 患者的肝纤维化症状, 临床效果显著^[5]。GDFMD 联合常规保肝排铜药 (二巯丙磺钠、还原型谷胱甘肽) 治疗, 能有效地改善患者肝纤维化相关指标, 对于逆转 WD 肝纤维化进程起到有效的临床干预作用^[6]。动物和细胞实验表明, GDFMD 可通过调控 TGF- β 1/Smad、SLC7A11/GPX4 等信号通路相关因子的蛋白及基因表达, 抑制肝细胞铁死亡, 有效防治 WD 肝损伤的发生^[7,8]。

尽管 GDFMD 治疗 WD 疗效显著, 但关于系统分析鉴定 GDFMD 中化学成分的研究相对较少, 对该汤剂中化合物成分质谱裂解规律总结分析尚未见报道, 限制了对物质基础及作用机制的深入研究。已有文献^[9]报道采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法对 GDFMD 中的化学成分进行鉴定, 共鉴别出了 82 个化合物, 包括酚类、生物碱、皂苷、倍半萜、游离酚和有机酸, 但其缺少主要类别化合物的裂解途径、研究范围主要为酚类和皂苷类, 不能全面反映 GDFMD 的整体化学成分。超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS^E) 具有高分离性能、高分辨率和高灵敏度等特点, 可以快速简便地分析鉴定中药化合物信息, 对复杂中药成分进行全面筛选分析, 广泛应用于中药成分分析^[10,11]。

本研究以 GDFMD 为研究对象, 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 对其成分进行快速分析鉴定并对化合物进行归类 and 归属, 为 GDFMD 的药效物质基础与临床应用提供理论依据和数据支持。

材料与方法

仪器 Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱系统和 Waters Xevo G2QTOF 高分辨率飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); RE-2000A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); ALPHA1-2LD 真空冷冻干燥机 (德国

CHRIST 公司), Milli-Q 超纯水净化系统 (美国 Milli-Q 公司)。

饮片 白芍为毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 的干燥根, 产地安徽, 批号: 2308067; 枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 的干燥成熟果实, 产地宁夏, 批号: 220902; 土茯苓为百合科植物光叶菝葜 (*Smilax glabra* Roxb.) 的干燥根茎, 产地广西, 批号: 221001; 三七为五加科植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥根和根茎, 产地云文山, 批号: 210702; 柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 的干燥根, 产地甘肃, 批号: 231203; 郁金为姜科植物温郁金 (*Curcuma rchenyujin* Y, H. Chen et C. Ling) 的干燥块根, 产地广西, 批号: 2209027, 均购于合肥市同仁堂大药房, 由安徽中医药大学药学院生药系俞年军教授鉴定。

试剂 儿茶素 (批号: S01HB191501)、落新妇苷 (批号: D26GB172582)、芍药苷 (批号: M28GB143089)、姜黄素 (批号: M13GB148382) 均购于上海源叶生物科技有限公司; 芍药内酯苷 (批号: 39011900) 购于上海同田生物技术股份有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$ 。甲酸 (LC-MS 级) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇 (HPLC 级) 和乙腈 (LC-MS 级) 购自德国 Merck 公司; 超纯水由 Milli-Q 超纯水净化系统 (美国 Milli-Q 公司) 制得。GDFMD 样品为实验室制备得到。

GDFMD 提取物与标准品溶液制备

GDFMD 提取物制备 取白芍 15 g、枸杞 12 g、土茯苓 12 g、三七 3 g、柴胡 10 g、郁金 10 g, 合计 62 g, 加超纯水 10 倍 (620 mL), 浸泡 1 h 后, 煮沸, 再以文火煎煮两次, 每次 30 min, 过滤, 合并两次滤液。旋转浓缩至一定体积, 放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行冷冻处理, 真空冷冻干燥制备得到 GDFMD 冻干粉, 得率为 31.65%, 低温避光保存; 取 1.0 g 冻干粉 (相当于 3.1 g 生药材), 加 30 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 并加甲醇补足重量, 进样前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤作为供试品溶液备用。取复方同比例单味药材, 按上述方法制备各单味药材供试品供质谱分析使用。

对照品混合溶液的制备 分别精密称取儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、落新妇苷和姜黄素约 1.0 mg, 加甲醇配制成浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 精密吸取各储备液混合, 并稀释成各对照品浓度约 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 流动相: 0.1% 甲酸水 (A) 和乙腈 (B), 洗脱梯度: 0~5 min, 95%~87% A; 5~10 min, 87% A; 10~20 min, 87%~86% A; 20~35 min, 86%~

85% A; 35~40 min, 85%~49% A; 40~50 min, 49%~40% A; 50~52 min, 40%~5% A; 52~54 min, 5% A; 54~56 min, 5%~95% A。流速: 0.2 mL·min⁻¹, 进样体积: 2 μL, 柱温: 35 °C。

质谱条件 质谱扫描范围 m/z 50~1 200, 毛细电压 3.0 kV (ESI⁺) 或 2.5 kV (ESI⁻), 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 °C, 去溶剂化温度 350 °C, 溶剂气流量 600 L·h⁻¹。MS^E低碰撞能量设置为 6 V, 高碰撞能量设置为 20~80 V。在进样分析前, 利用调谐液校正 QTOF-MS/MS 质量轴, 数据采集过程中使用亮氨酸脑啡肽进行实时校准。在 ESI⁺ 模式下选择 [(M+H)⁺ = 556.277 1], ESI⁻ 模式下选择 [(M-H)⁻ = 554.261 5] 分别对质谱进行校正, 校正通过后采集数据。

GDFMD 化学成分数据库的建立 对 PubMed、Chemspider、SciFinder、CNKI 等数据库进行系统性的检索, 收集 GDFMD 中 6 味药材 (即白芍、枸杞、三七、

土茯苓、柴胡和郁金) 的化学成分信息, 共收集 352 种化合物的信息, 包括化合物的名称、结构、化学式、精确分子量等信息, 将其制成 Excel 电子表格, 同时用 ChemDraw 绘制结构式并保存 .mol 文件即得 GDFMD 化学成分自建数据库。

结果

1 GDFMD 化学成分分析

按上述色谱质谱条件进样供试品和对照品, Mass-Lynx 4.1 软件 (Waters) 质谱工作站采用化学成分数据信息, 得到各色谱峰的保留时间、精确分子量、碎片峰信息。在 GDFMD 中共鉴定出 102 种化合物, 含黄酮类成分 26 个, 萜类成分 22 个, 皂苷类成分 19 个, 苯丙素类成分 10 个和其他类成分 25 个。正、负离子模式下获取样品总离子流图, 详见图 1, 最终筛查到的化学成分和药材归属, 见表 1。

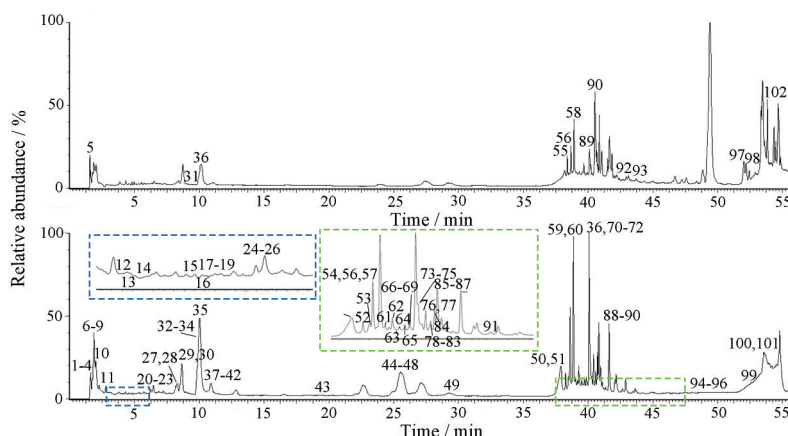


Figure 1 The total ion chromatogram (TIC) of Gandoufumu Decoction (GDFMD). A: Positive scan; B: Negative scan

Table 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS qualitative analysis results of GDFMD. *Indicates control product information. B: *Paeoniae Radix Alba*; G: *Lycium barbarum* L.; T: Tufuling; S: *Panax notoginseng*; C: *Bupleuri Radix*; Y: *Curcuma wenyujin*; U: Unknown

No.	t_R /min	Compound	Formula	Precursor ion (m/z)	Error / $\times 10^{-6}$	Adducts	MS/MS (m/z)	Origin plant
1	1.540	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.109 2	2.3	[M-H] ⁻	323.235 7, 266.930 6, 179.056 2, 161.046 7, 119.035 8	B, S
2	1.592	Albiflorin*	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.180 7	-0.4	[M+HCOO] ⁻	357.126 8, 121.034 4	B
3	1.592	Desbenzoylpaconiflorin	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.130 2	2.9	[M-H] ⁻	345.118 5, 195.060 2, 165.054 0	B
4	1.592	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.055 1	-2.6	[M-H] ⁻	173.038 5, 127.045 3, 111.006 6, 93.034 2	G
5	1.643	<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	165.054 9	-1.8	[M+H] ⁺	147.082 8, 119.070 3	G
6	1.712	Tufulingoside	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339.071 8	0.6	[M-H] ⁻	268.960 0, 193.014 1, 164.012 2, 136.016 2, 121.026 1, 108.020 1	T
7	1.780	Proanthocyanidin B23'-gallate	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.143 7	-2.6	[M-H] ⁻	515.132 0, 169.006 7	B
8	1.849	11- <i>O</i> -Galloylbergenin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.080 7	-4.0	[M-H] ⁻	327.079 7, 151.005 2	B
9	1.900	1,3,6- <i>O</i> -Trigalloylglucose	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.090 9	3.9	[M-H] ⁻	331.065 5, 313.058 8, 169.012 0, 125.026 5	B
10	2.324	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 3	0.5	[M-H] ⁻	173.008 9, 165.054 0, 129.019 9, 111.006 6	B
11	2.546	Dihydroisofेरulic acid	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195.065 9	1.0	[M-H] ⁻	136.053 3, 121.030 3	G

Continued

No.	t_R /min	Compound	Formula	Precursor ion (m/z)	Error / $\times 10^{-6}$	Adducts	MS/MS (m/z)	Origin plant
12	3.124	6- <i>O</i> -Galloyl arbutin	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₁	423.092 5	-0.5	[M-H] ⁻	169.017 3	S
13	3.227	(-)-Epicatechin gallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.082 6	0.9	[M-H] ⁻	332.160 8, 271.064 4, 169.017 3	G
14	3.535	3-Galloylquinic acid	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.065 4	-3.2	[M-H] ⁻	301.234 6, 169.017 3, 123.046 5	G
15	4.473	Woodorien	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329.088 2	2.7	[M-H] ⁻	167.036 4, 152.009 9, 123.044 3, 108.020 1	T
16	4.919	<i>N</i> ₁ -Caffeoyl, <i>N</i> ₃ - dihydrocaffeoyl	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₆	472.245 0	0.4	[M-H] ⁻	287.053 5, 153.015 4	G
17	5.188	Ethyl gallate	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 3	1.5	[M-H] ⁻	182.022 2, 169.017 3, 168.863 1, 166.999 4, 153.020 5, 125.024 2	G
18	5.222	(+)-Catechin-5- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	451.124 5	1.1	[M-H] ⁻	331.087 9, 289.070 9, 245.079 5	G
19	5.359	Protocatechuic acid-3- glucoside	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.071 0	-1.9	[M-H] ⁻	153.020 5, 123.046 5, 109.030 3	G
20	6.074	6- <i>O</i> - <i>trans</i> -Feruloyl-2- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucopyranosyl- α - <i>D</i> - glucopyranoside	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	517.153 7	-3.9	[M-H] ⁻	271.061 0, 193.048 2, 175.038 4	G
21	6.194	Paeoniflorin	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	461.143 2	-3.5	[M-H] ⁻	447.129 1	B
22	6.262	Oxypaeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496.156 4	-3.4	[M-H] ⁻	465.136 4, 345.110 9, 333.093 6, 137.025 0	B
23	6.279	3,4-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	515.141 2	2.1	[M-H] ⁻	353.076 7, 323.066 6, 164.043 6	G
24	6.468	Mudanpioside H	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₄	615.173 4	3.3	[M-H] ⁻	281.078 1, 191.032 5	B
25	6.502	<i>p</i> -Coumaric acid-glycosides isomer	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.092 2	-0.3	[M-H] ⁻	651.163 6, 163.039 0, 119.049 2	G
26	6.588	Catechin*	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.070 9	-1.0	[M-H] ⁻	289.070 9, 179.034 3, 151.040 3	G
27	7.989	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 3	-0.6	[M-H] ⁻	135.042 1	G
28	8.103	Silymarin	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀	481.113 2	-0.6	[M-H] ⁻	407.077 9, 297.041 7, 283.022 7, 269.047 2, 256.034 1, 243.030 8, 180.010 2, 152.012 4	T
29	8.429	(3 β ,20 α)-3-Hydroxy-11- oxoolean-12-en-29-oic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.333 1	2.8	[M-H] ⁻	311.164 9	B
30	8.437	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 2	2.5	[M-H] ⁻	353.088 2, 191.060 7, 179.034 3, 161.041 5, 135.044 5	G
31	9.040	Eugenin-3-glucoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	509.130 9	2.7	[M+H] ⁺	345.064 4, 327.055 8	G
32	9.418	Gambirinin A ₁ or A ₆	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561.141 9	3.9	[M-H] ⁻	407.073 8, 289.070 9, 273.075 6, 245.079 5, 203.069 7, 188.049 8, 179.034 3, 165.017 2, 151.040 3, 137.025 0, 125.021 9, 109.030 3	T
33	9.924	Paeoniflorin*	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.152 2	2.9	[M-H] ⁻	479.152 2, 449.140 9, 357.120 7, 327.105 6, 121.102 8	B
34	9.692	3,5-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	515.141 2	2.1	[M-H] ⁻	353.084 4, 191.066 4, 179.031 6	G
35	10.012	Paeoniflorin R ₁	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.156 7	2.9	[M-H] ⁻	283.091 6, 121.028 3	B
36	10.458	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.179 2	3.7	[M+H] ⁺	317.059 9	G
	40.195			623.159 7	-2.4	[M-H] ⁻	315.060 1	
37	10.630	(+)-Procyanidin B ₂ or B ₁	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.132 4	-3.8	[M-H] ⁻	407.086 2, 339.086 9, 289.070 9, 245.079 5, 205.048 2, 175.035 7, 161.026 0, 137.022 6, 125.021 9	T
38	10.733	Taxifolin-3-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	465.104 6	2.8	[M-H] ⁻	335.079 2, 293.018 2, 269.007 0, 256.997 4, 234.988 1, 216.981 9, 196.976 4, 161.023 4	T
39	10.767	Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 0	-1.5	[M-H] ⁻	301.032 3	G
40	10.870	Anthocyanin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.149 2	-2.4	[M-H] ⁻	264.073 8, 263.070 8	G
41	11.053	3- <i>O</i> -Caffeoylshikimic acid	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.075 4	-3.9	[M-H] ⁻	203.069 7, 187.038 3, 161.026 0, 135.044 5, 133.028 9, 123.042 0	T
42	11.430	Mudanpioside E	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	525.158 7	-4.0	[M-H] ⁻	495.154 4, 193.053 9	B
43	19.359	Galloylpaeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.168 3	3.2	[M-H] ⁻	613.150 5, 491.120 1, 313.058 8, 169.014 7, 165.059 2	B
44	25.499	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.039 7	-0.7	[M-H] ⁻	268.038 1, 267.030 9	B, S
45	25.516	Nicotiflorin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 4	-0.7	[M-H] ⁻	285.039 7, 269.040 5, 257.043 3, 241.048 0, 177.022 6, 151.002 6	G

								Continued
No.	t_R /min	Compound	Formula	Precursor ion (m/z)	Error / $\times 10^{-6}$	Adducts	MS/MS (m/z)	Origin plant
46	25.550	Neoastilbin*	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.109 9	3.3	[M-H] ⁻	303.051 8, 285.039 7, 267.030 9, 241.051 1, 175.041 1, 150.031 3, 133.028 9, 123.044 3	T
47	25.584	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 4	-0.7	[M-H] ⁻	284.035 5, 191.066 4	G
48	25.601	Hydroxybenzoyl- <i>O</i> -benzoin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 4	-0.7	[M-H] ⁻	249.037 9, 207.030 4, 192.012 1	S
49	29.197	Mudanpioside D	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	509.164 1	-3.5	[M-H] ⁻	121.028 3	B
50	37.795	Smilaside L	C ₄₂ H ₄₆ O ₂₀	869.247 9	-2.9	[M-H] ⁻	804.449 7, 513.141 9, 499.145 7, 193.053 9, 175.041 1, 146.038 8	T
51	38.012	Engletin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.114 3	1.8	[M-H] ⁻	289.070 9, 269.043 9, 259.061 2, 215.072 5, 180.007 4, 152.009 9	T
52	38.201	Bis (galloyl)- <i>O</i> -cryptoxanthin	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₇	631.092 4	-1.7	[M-H] ⁻	461.077 3, 169.012 0	U
53	38.449	Notoginsenoside R ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931.522 6	2.4	[M-H] ⁻	931.522 6, 799.484 7, 637.433 7, 475.380 0	S
54	38.801	Iristectorin A	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.120 1	2.2	[M-H] ⁻	285.039 7, 180.004 7, 151.002 6	T
55	38.818	Diacetyl-saikosaponin A or D	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₅	863.479 2	-0.1	[M+H] ⁺	821.488 2, 779.475 3	C
56	38.835	Ginsenoside Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799.484 7	0.4	[M-H] ⁻	799.484 7, 637.428 6, 475.380 0	S
	38.920			823.484 4	2.9	[M+Na] ⁺	643.418 0, 203.057 7	
57	38.835	Quinic acid	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.102 8	-0.2	[M-H] ⁻	281.047 2, 217.012 0, 203.034 7, 189.018 9, 177.019 8, 161.026 0, 151.040 3, 147.044 3, 133.028 9, 123.044 3, 109.028 2	T
58	38.886	Ar-Curcumene	C ₁₅ H ₂₂	203.180 2	1.0	[M+H] ⁺	201.166 7, 159.117 7, 121.102 0, 95.084 8	Y
59	38.887	Ginsenoside Rh ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637.429 9	-2.7	[M-H] ⁻	637.428 6, 475.380 0	S
60	38.967	Astilbin sulfate	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ S	529.066 6	2.6	[M-H] ⁻	383.004 8, 364.996 4, 285.039 7, 230.966 1, 228.980 6, 216.987 9, 181.052 0, 167.036 4, 151.005 2	T
61	39.001	Astilbin sulfate isomer	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ S	529.066 6	2.6	[M-H] ⁻	383.004 8, 365.004 2, 285.039 7, 228.974 4, 212.986 4, 201.992 5, 177.017 1, 167.036 4, 151.002 6	T
62	39.293	Saikosaponin X	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	809.430 2	-2.6	[M-H] ⁻	809.430 2, 780.423 7, 779.418 2, 617.362 3	C
63	39.413	(<i>Z</i>)-(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- β -pinen-10-yl β -vicianoside	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₀	445.208 4	-2.2	[M-H] ⁻	293.088 3, 233.066 4, 191.055 1	B
64	39.636	Smilaside B	C ₃₄ H ₄₀ O ₁₈	735.216 4	3.8	[M-H] ⁻	500.074 0, 418.060 5, 375.043 0, 337.093 2, 301.074 9, 265.072 1, 193.048 2, 175.038 4	T
65	39.721	Mururin A	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.070 8	-1.8	[M-H] ⁻	323.022 5, 295.021 3, 282.018 6, 267.027 6, 251.040 4, 240.045 3, 223.038 6, 211.038 2, 195.045 9	T
66	39.841	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.232 4	0.0	[M-H] ⁻	125.092 8, 71.014 9	S
67	39.893	Benzoyloxypeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	599.178 3	3.0	[M-H] ⁻	447.222 2, 313.066 1, 293.088 3, 165.054 0, 137.025 0, 121.028 3	S
68	39.910	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 9	3.7	[M-H] ⁻	301.035 9, 283.022 7, 255.026 8, 178.998 7, 151.002 6, 107.012 5	G, S
69	39.973	Caffeoyl- <i>O</i> -benzoin	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	489.104 6	2.7	[M-H] ⁻	249.037 9, 207.030 4, 192.009 2	S
70	40.042	Smilaside A	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₉	777.226 5	3.0	[M-H] ⁻	735.205 3, 717.205 3, 625.082 3, 559.166 4, 513.141 9, 499.145 7, 193.048 2, 175.038 4, 160.015 1	T
71	40.093	Benzoylpaeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	583.181 6	0.0	[M-H] ⁻	553.164 5, 461.121 2, 431.132 5, 327.083 4	B
72	40.162	Mudanpioside C	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	599.178 3	3.0	[M-H] ⁻	581.157 7, 477.130 2, 447.122 7, 137.015 4, 121.028 3	B
73	40.247	Ginsenoside Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 3	0.7	[M-H] ⁻	1 077.585 3, 945.536 5, 783.484 4, 621.430 5, 459.387 5	S
74	40.299	Mudanpioside B	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	629.186 0	-1.6	[M-H] ⁻	583.181 6, 341.128 1, 121.028 3	B
75	40.325	Ginsenoside Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.589 0	0.6	[M-H] ⁻	1 107.589 0, 945.542 8, 783.484 4, 621.435 5, 459.387 5	S

Continued

No.	t_R /min	Compound	Formula	Precursor ion (m/z)	Error / $\times 10^{-6}$	Adducts	MS/MS (m/z)	Origin plant
76	40.419	Notoginsenoside R ₂	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.472 0	-2.3	[M-H] ⁻	769.472 0, 637.433 7, 475.375 6, 391.284 8, 101.022 7	S
77	40.470	Smilaside C	C ₄₁ H ₄₄ O ₁₉	839.238 5	-1.7	[M-H] ⁻	693.209 4, 663.184 0, 645.189 5, 517.158 4, 499.141 1, 483.137 1, 337.089 5, 193.048 2, 175.038 4	T
78	40.590	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061 0	1.5	[M-H] ⁻	270.061 0	G
79	40.590	3'-O-Acetylsaikosaponin A	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	821.468 2	-0.6	[M-H] ⁻	821.468 2, 779.452 5, 761.446 0, 617.403 0	C
80	40.607	<i>trans</i> -N-(4-Dihydroxy-3-methoxyphenethyl)feruloyloctopamine	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	343.139 8	1.5	[M-H] ⁻	283.129 5	G
81	40.676	Ginsenoside Ro	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.489 4	-0.9	[M-H] ⁻	955.489 4, 793.445 4, 569.381 4	S
82	40.676	Ginsenoside Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 1	0.8	[M-H] ⁻	783.490 1, 637.423 4, 475.380 0, 391.284 8	S
83	40.693	Saikosaponin C	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	925.513 1	-3.2	[M-H] ⁻	925.513 1, 779.452 5, 771.499 4	C
84	40.830	Ginsenoside Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.542 8	0.5	[M-H] ⁻	945.542 8, 783.484 4, 637.423 4, 475.380 0	S
85	40.916	6-O-Galloylglucose	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.065 5	-3.0	[M-H] ⁻	331.065 5, 271.054 3, 211.026 3, 169.014 7	B
86	40.945	Ginsenoside Rh ₂	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	621.435 5	-1.8	[M-H] ⁻	621.430 5, 459.387 5	S
87	40.962	Phenylpropanoid glycosides	C ₃₈ H ₄₄ O ₂₀	819.232 2	-3.2	[M-H] ⁻	777.237 9, 760.232 7, 584.170 0, 559.166 4, 193.048 2, 175.038 4	T
88	41.048	Acetyl-saikosaponin A or D	C ₅₀ H ₈₂ O ₁₈	969.541 7	-0.6	[M-H] ⁻	807.469 8, 499.305 7	C
89	41.476	Curculolide A	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	249.150 1	4.0	[M+H] ⁺	81.070 6	Y
90	41.631	Saikosaponin A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	779.458 2	0.0	[M-H] ⁻	779.458 2, 617.403 0, 439.322 8	C
	41.819			781.483 6	-2.0	[M+H] ⁺	781.483 6, 619.431 2, 473.369 5	
91	42.671	Saikosaponin E	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	763.462 7	-0.8	[M-H] ⁻	763.462 7, 601.413 9, 161.046 7	C
92	42.914	Curcumin*	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	369.133 0	-2.2	[M+H] ⁺	159.084 2, 114.092 6	Y
93	43.128	Curzerene	C ₁₅ H ₂₀ O	217.160 0	3.7	[M+H] ⁺	147.085 3, 119.088 2, 95.086 8, 79.058 3	Y
94	48.056	Ginsenoside Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.476 4	-3.3	[M-H] ⁻	603.422 4	S
95	48.159	Saikosaponin B ₄	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	811.486 1	2.1	[M-H] ⁻	811.486 1	C
96	49.268	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	277.144 1	0.4	[M-H] ⁻	285.219 4, 148.055 7	B
97	52.303	Bisdemethoxycurcumin	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	309.112 3	-1.3	[M+H] ⁺	177.051 1	Y
98	52.783	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	149.059 9	-2.7	[M+H] ⁺	130.067 1	G
99	52.801	23-Hydroxybetulinic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 4	0.0	[M-H] ⁻	363.231 9, 241.219 5, 195.143 1, 171.111 7	B
100	53.258	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.232 7	1.2	[M-H] ⁻	241.219 5	B
101	53.653	Saikosaponin F	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	927.530 7	-1.1	[M-H] ⁻	927.530 7	C
102	53.738	Xanthohumol glucoside	C ₁₇ H ₁₆ O ₉	365.086 7	-1.6	[M+H] ⁺	305.092 3	U

2 黄酮类化合物鉴定

GDFMD 中检出数量占比最高的化合物为黄酮类化合物, 这是一类具有 C₆-C₃-C₆ 结构的化合物^[12,13], 常见的取代基有酚羟基、甲氧基、甲基、异戊烯基等^[14], 此类化合物往往具有较强的抗氧化活性, 如山柰酚、槲皮素等^[15]。在碎裂 MS/MS 谱图中, 黄酮类除了常见的小分子中性丢失外, 特征反应包括 C 环发生的逆狄尔斯-阿尔德反应 (RDA) 裂解和氢重排^[16], 即 C₁ 与 C₂ 位和 C₃ 与 C₄ 位断裂, 生成 A 环和 B 环两个碎片离子。此外, 黄酮苷类化合物在二级质谱中通常表现为脱去糖基形成苷元离子^[17]。根据以上裂解特征结合对照品质谱信息共鉴定出 GDFMD 中 26 种黄酮类化合物, 包括化

物 6、12、13、15、18、19、26、28、32、36、37、38、39、40、44、45、46、47、51、54、60、61、65、68、78、102, 含黄烷醇类 1 种。

以化合物 68 为例, 在负离子模式下, 准分子离子 [M-H]⁻ 的 m/z 为 301.035 9, 推测其化学式为 C₁₅H₁₀O₇。该化合物的 C 环的 ^{1,4}B 键、^{1,3}A 键和 ^{1,3}B 键发生 RDA 裂解形成 178.998 7 [M-H-C₇H₆O₂]⁻、151.002 6 [M-H-C₈H₆O₃]⁻, 该碎片离子继续中性丢失 CO₂ 产生特征碎片离子 m/z 107.012 5。化合物中性丢失一分子 H₂O 产生 m/z 283.022 7 碎片离子, 该碎片继续中性丢失 CO 产生特征碎片离子 m/z 255.026 8。基于上述裂解特征判定该化合物为槲皮素, 其二级质谱及裂解途径^[18]见图 2A。

黄烷醇类生源上是由二氢黄酮醇类还原而来,可看成是脱去C₄位羰基氧原子后的二氢黄酮醇类,又称为儿茶素类^[19]。儿茶素类化合物是一类含有两个或两个以上的芳香环和多个羟基的化合物,具有清除自由基、抗氧化,调节血糖血脂,抗炎抗肿瘤等生物活性^[19]。以特征性化合物**26**为例,其准分子离子[M-H]⁻的*m/z*为289.070 9,推测其化学式为C₁₅H₁₄O₆。在质谱的高碰撞能作用下碎片离子主要发生了C环的逆狄尔斯-阿尔德裂解和B环丢失分别产生特征碎片离子125.026 5 [M-H-C₇H₄O₄-C₉H₈O₄]⁻和179.034 3 [M-H-

C₇H₄O₄-C₅H₂O₄]⁻,特征碎片离子中性丢失一分子CO可产生碎片离子*m/z* 151.040 3。综合以上裂解规律,结合对照品信息判定该化合物为儿茶素,如图2B。

3 萜类化合物鉴定

从GDFMD复方中分离得到22个萜类化学成分,分别为化合物**2**、**3**、**21**、**22**、**24**、**29**、**31**、**33**、**35**、**42**、**43**、**49**、**58**、**63**、**67**、**71**、**72**、**74**、**79**、**89**、**93**、**99**,这些化合物分为单萜类、倍半萜类和三萜类。单萜类化合物在质谱裂解中常丢失H₂O和CH₂O分子,或失去糖基分子,在该过程中常伴随着分子重排裂解,尤其以麦氏重排多

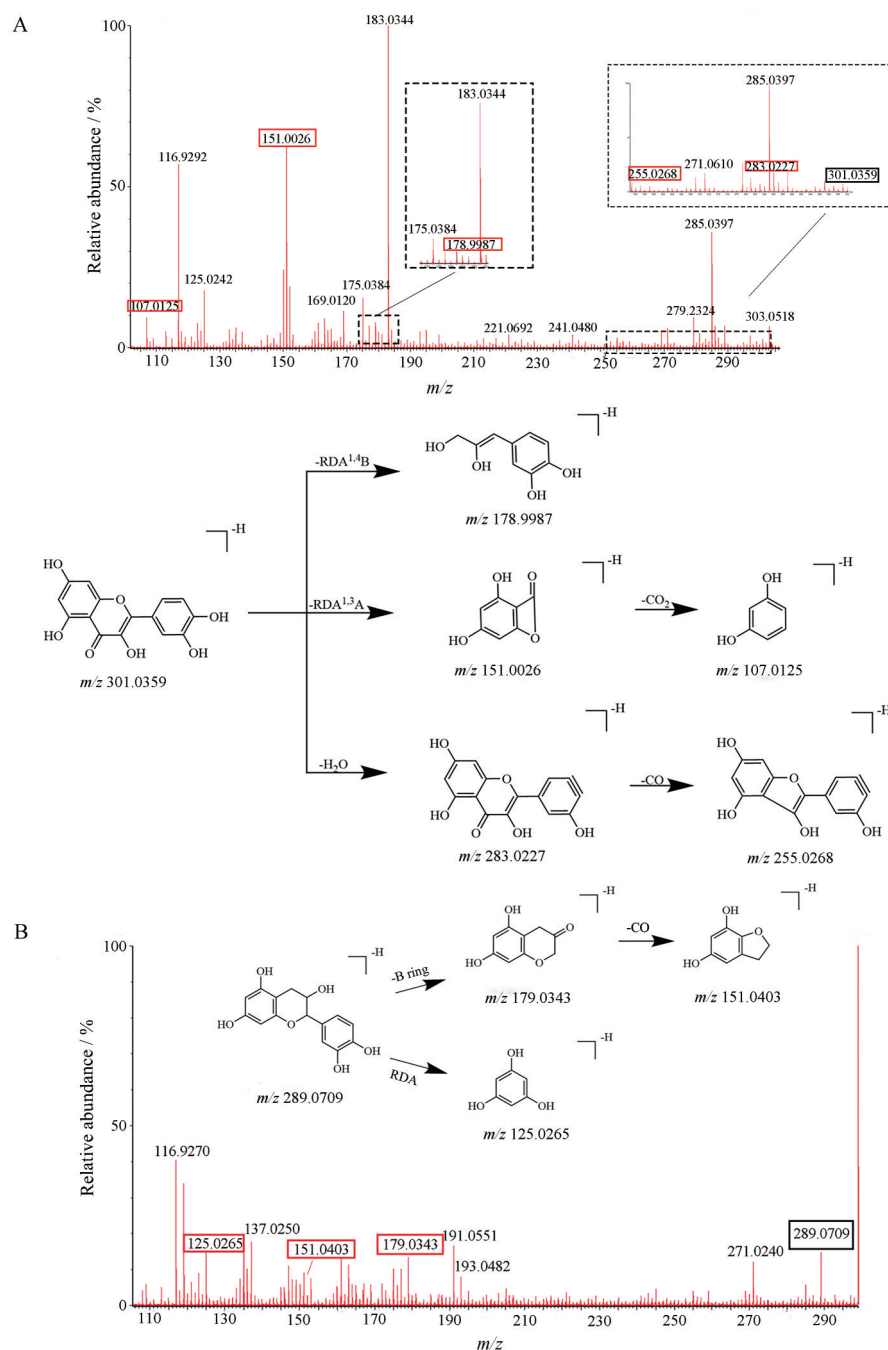


Figure 2 MS² spectrum, fragmentation pathways of quercetin (A) and MS² spectrum, fragmentation pathways of catechin (B) in ESI⁻ mode

见^[20,21],常出现失去苯甲酸的离子碎片的情况;倍半萜类化合物和三萜类化合物常以游离形式或以糖结合成苷或酯的形式存在,其质谱裂解规律以糖苷键的断裂为主,裂解过程中可能会丢失1个或多个 H_2O ^[16,22]。

以化合物**33**为例,准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的 m/z 为479.152 2,推测其化学式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ 。在负离子模式下,由一、二级质谱数据可知 m/z 479.152 2为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 峰,二级质谱有 m/z 449.140 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^-$ 、 m/z 357.120 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^-$ 、 m/z 327.105 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{HCHO}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^-$ 、 m/z 121.102 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9]^+$ 等碎片离子。对照文献^[23-25]及对照品质谱信息,鉴定化合物**33**为芍药苷,如图3。

4 皂苷类化合物鉴定

GDFMD中鉴定的皂苷类化合物有19个,包括化合物**53**、**55**、**56**、**59**、**62**、**73**、**75**、**76**、**81**、**82**、**83**、**84**、**86**、**88**、**90**、**91**、**94**、**95**、**101**。皂苷类化合物在质谱分析过程中会经历一系列复杂的化学反应和断裂过程,主要包括糖丢失的过程及苷元的进一步裂解。

4.1 I型皂苷 人参皂苷 Rc 、 Rb_1 、 Rh_2 、 Rk_1 (化合物**73**、**75**、**86**、**94**)这四种物质均为I型皂苷,即原人参二醇型皂苷。它们的特点是糖链部分通常连接苷元C-3位和C-20位,而C-6位未被取代,在一级质谱中产生强

度较高的 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 和 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子峰。据报道^[26],在多数的人参皂苷裂解规律研究中仅发现皂苷上糖的断裂,而未发现负离子模式下苷元的进一步裂解,主要可能是因为四环三萜皂苷具有较稳定的、难以破坏的皂苷元结构。

以化合物**75**为例,准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的 m/z 为1 107.589 0,推测其化学式为 $\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$ 。该分子离子峰相继失去四分子葡萄糖,得到 m/z 945.542 8、783.484 4、621.435 5、459.387 5这些主要碎片离子, m/z 459.387 5为其苷元。与文献^[27]报道的人参皂苷 Rb_1 相近,推测**75**为人参皂苷 Rb_1 ,如图4所示。

4.2 II型皂苷 三七皂苷 R_1 、 R_2 ,人参皂苷 Rg_1 、 Rh_1 、 Rg_2 、 Re (化合物**53**、**76**、**56**、**59**、**82**、**84**)均为II型人参皂苷,即原人参三醇型三萜皂苷。与I型皂苷结构母核不同的是,II型人参皂苷C-6位有羟基且由糖链取代,而C-3无取代^[28]。尽管二者结构上的差别不大,但在裂解碎片离子上的差别较大。II型皂苷特征碎片离子为 m/z 475.37和 m/z 391.28。其中,苷元碎片离子 m/z 475.37同I型皂苷相同,四环上的烷基取代C-17支链容易失去,从而得到去掉C-17支链丰度较大的 m/z 391.28碎片离子。

以化合物**53**为例,准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的 m/z 为

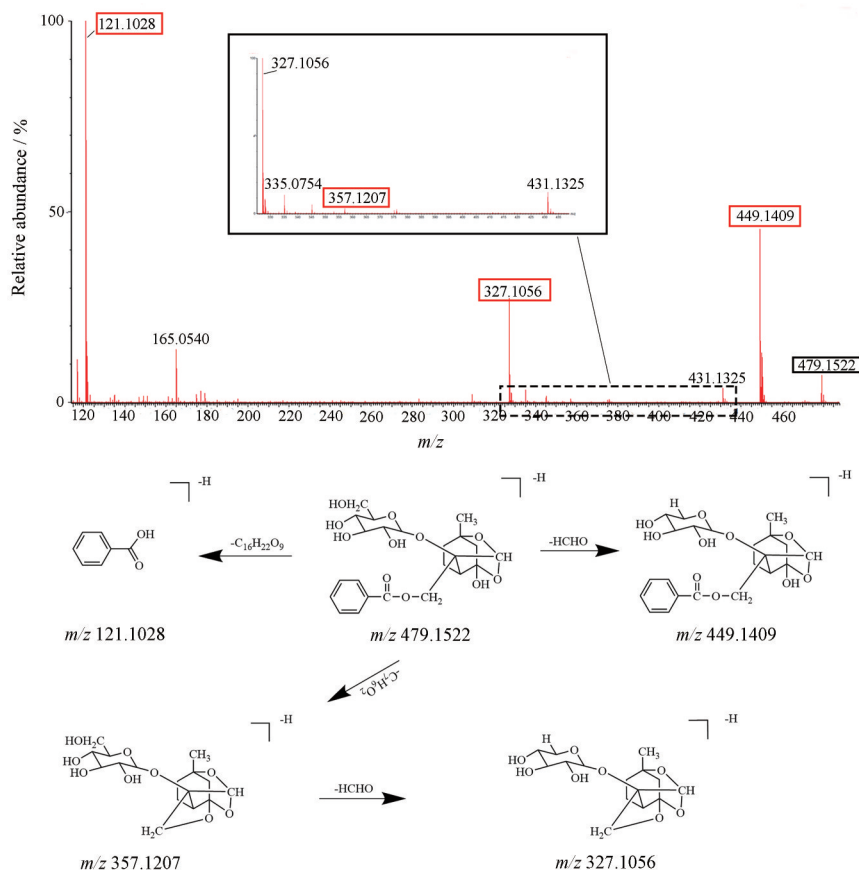


Figure 3 MS² spectrum, fragmentation pathways of paeoniflorin in ESI⁻ mode

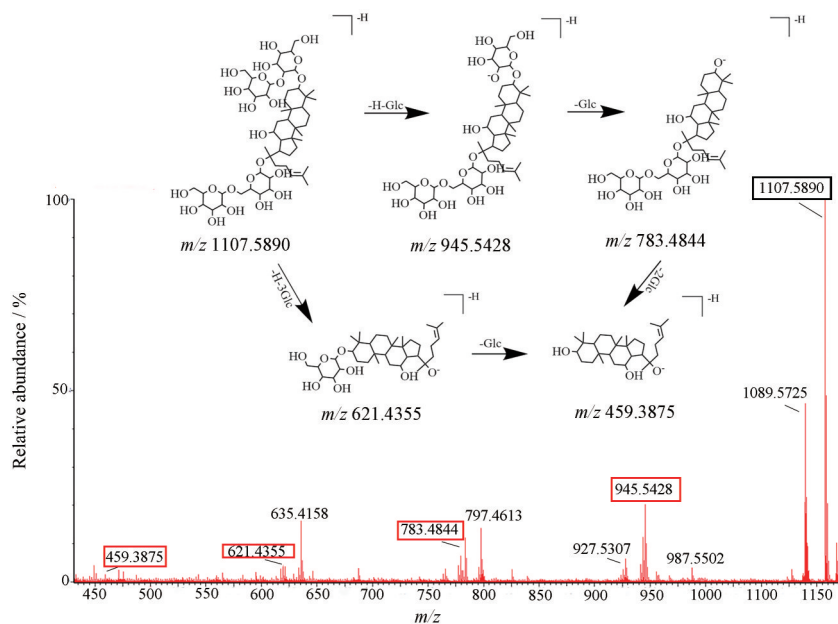


Figure 4 MS² spectrum, fragmentation pathways of ginsenoside Rb₁ in ESI⁻ mode

931.5226, 推测其化学式为C₄₇H₈₀O₁₈。其C-6位羟基和C-20位羟基分别有2个糖链,C-6位R₁为二糖,由葡萄糖和木糖通过2→1键连接的,而C-20位为一分子葡萄糖。在一级质谱中,基峰为[M-H]⁻的m/z 931.5226。在二级质谱中,m/z 799.4847、637.4337和475.3800分别为[M-H-xyl]⁻、[M-H-xyl-glc]⁻、[M-H-xyl-glc-glc]⁻苷元。与文献^[27]报道的三七皂苷R₁相近,推测53

为三七皂苷R₁,如图5所示。

4.3 三萜皂苷类 柴胡皂苷在结构上属于五环三萜类化合物,同时也是齐墩果烷型衍生物^[28]。包括化合物55、62、81、83、88、90、91、95、101。通过对化合物90进行质谱分析,确定了其正离子m/z 781.4836 [M+H]⁺和负离子m/z 779.4582 [M-H]⁻,由此得到该化合物的相对分子质量为780.4660,分子式为C₄₂H₆₈O₁₃。正离

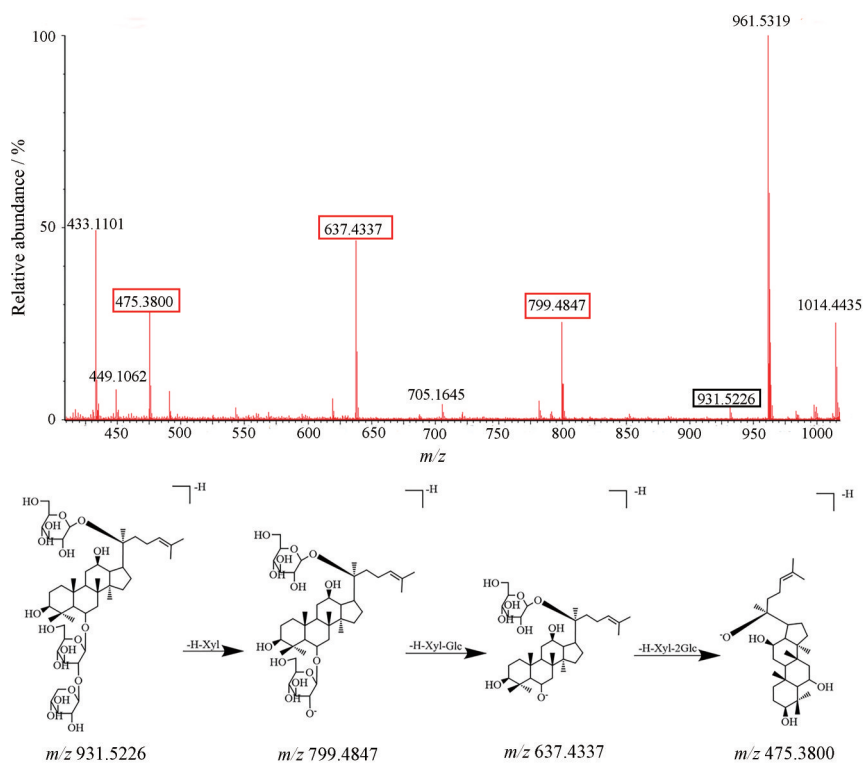


Figure 5 MS² spectrum, fragmentation pathways of notoginsenoside R₁ in ESI⁻ mode

子模式下,在二级质谱图中可以观察到准分子离子峰 781.483 6 [M+H]⁺ 丢失 1 分子葡萄糖基形成 619.431 2 [M+H-Glc]⁺ 碎片离子;丢失 1 分子葡萄糖基和一分子岩藻糖基形成 473.369 5 [M+H-Glc-Fuc]⁺ 碎片离

子(图 6A)。在负离子模式下,准分子离子峰为 *m/z* 779.458 2 [M-H]⁻,进一步分析二级碎片信息发现,该分子离子先丢失一分子六碳糖形成 *m/z* 617.403 0,再丢失一分子脱氧六碳糖和一分子 CH₃OH 形成 *m/z*

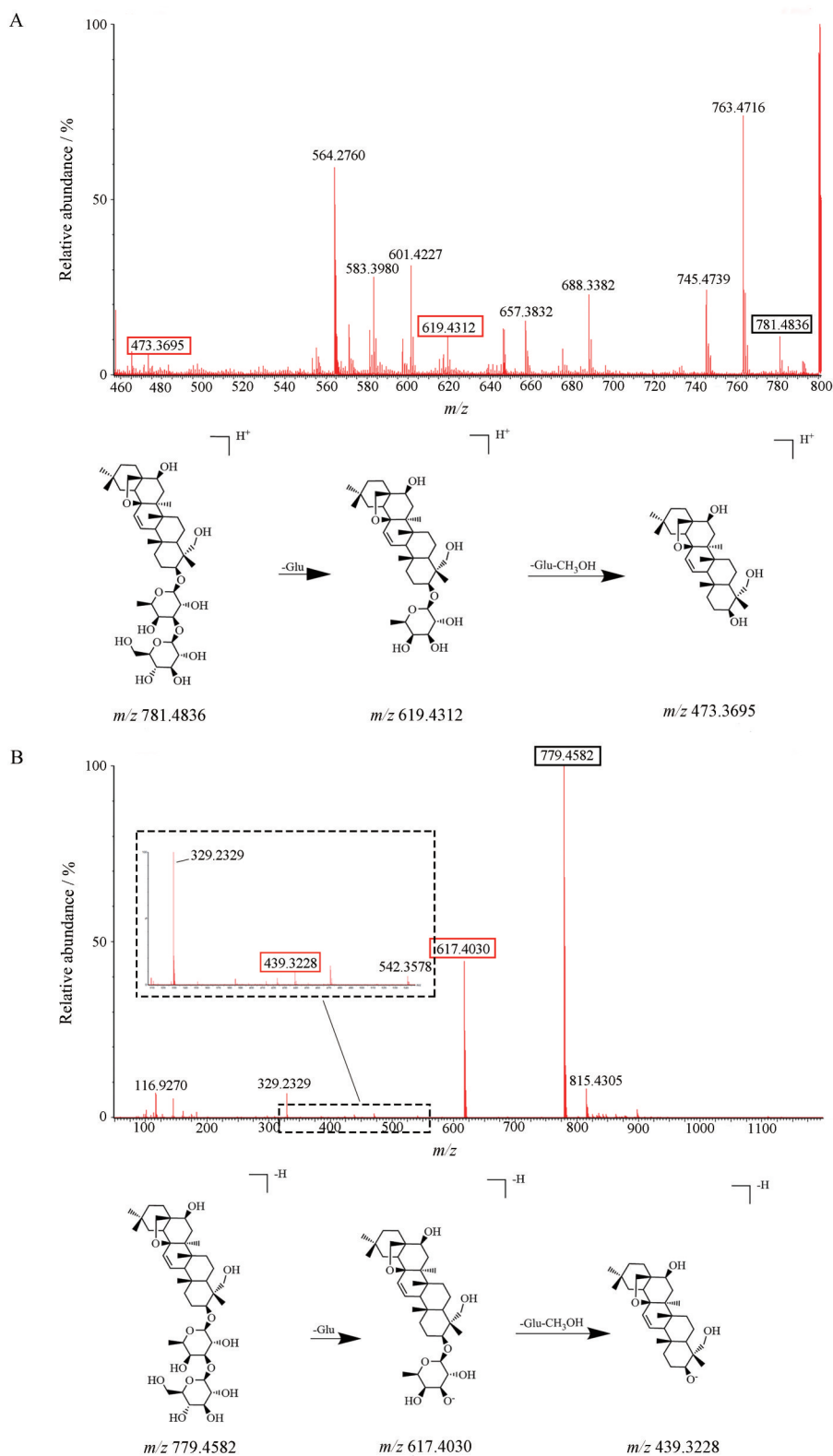


Figure 6 MS² spectrum, fragmentation pathways of saikosaponin A in ESI⁺ (A) and ESI⁻ (B) mode

439.322 8 (图6B), 与文献^[29,30]中柴胡皂苷A二级碎片基本吻合, 因此确定90号峰为柴胡皂苷A。

5 苯丙素类化合物鉴定

苯丙素类化合物广泛分布于药用植物中, 是一类苯环与3个直链碳连接(C6-C3基团)构成的化合物^[31]。共鉴定出10个苯丙素类, 包括化合物5、25、30、50、64、70、77、80、87、98。以化合物30为例, 其准分子离子峰[M-H]⁻为353.088 2, 分子式为C₁₆H₁₈O₉。由于C₉H₆O₃和C₇H₁₀O₅的损失, 产生了 m/z 191.060 7 [M-H-C₉H₆O₃]⁻的奎宁碎片和179.034 3 [M-H-C₇H₁₀O₅]⁻的咖啡酸碎片。此外, 产物离子161.041 5 [M-H-C₇H₁₀O₅-H₂O]⁻、135.044 5 [M-H-C₇H₁₀O₅-CO₂]⁻是由 m/z 179.034 3通过咖啡碎片继续丢失1分子H₂O或CO₂而得到的。根据上述信息与文献^[32]信息, 推测化合物30为绿原酸, 其MS²图和碎片裂解途径如图7所示。

6 其他类化合物鉴定

其他类别化合物共25种, 包括姜黄素类、酯类、鞣质类、酚酸类等。举例来说, 以化合物4为例, 其在负离子模式下形成一个准分子离子, 该离子的质量数为191.055 1, 推测其分子式为C₇H₁₂O₆; 进一步分析其二级质谱可发现, 一系列的碎片离子连续丢失包括H₂O、HCOOH、O、H₂O₂得碎片离子 m/z 173.038 5 [M-H-H₂O]⁻, m/z 127.045 3 [M-H-H₂O-HCOOH]⁻, m/z 111.006 6 [M-H-H₂O-HCOOH-O]⁻, m/z 93.034 2 [M-H-H₂O-HCOOH-O-H₂O]⁻。根据上述信息与文献^[33]信息, 推测化合物4为奎宁酸。

讨论

本研究通过UPLC-Q-TOF/MS^E对GDFMD中主要化学成分进行了全面的分析与鉴定。从GDFMD中鉴

定出102种化合物, 正离子模式下检测到化合物13个, 负离子模式下的化合物有90个, 主要原因是该方中化合物在正离子模式下质谱响应信号较低, 在裂解规律分析中, 二级质谱信号较弱, 共有13个化合物能进行较好匹配。在负离子模式下, 大部分化合物响应较好, 能较准确地确定二级离子。本研究选择了儿茶素、落新妇苷、芍药苷、芍药内酯苷和姜黄素这五种成分, 其中儿茶素、落新妇苷属于黄酮类化合物, 芍药苷和芍药内酯苷属于萜类化合物, 姜黄素属于其他类, 包含了该方主要的三种类型化合物, 可进一步验证化学数据库及鉴定结果的准确性。在鉴定到的化合物中, 26种黄酮类成分、10种苯丙素类成分主要来源于枸杞和土茯苓; 22种萜类成分主要来源于白芍和土茯苓; 19种皂苷类成分主要来源于柴胡和三七; 25种其他类成分主要来源于白芍、枸杞和三七。药理学研究表明, 黄酮类化合物中的儿茶素能调节心肌细胞增殖、降低炎症反应, 对神经系统和肝肾组织起保护作用^[34]; 萜类化合物中的芍药苷和芍药内酯苷, 研究表明具有保护神经抗抑郁、保肝、保护胃肠黏膜、调节胃肠功能等作用^[35]; 皂苷类化合物中的柴胡皂苷A、人参皂苷Rg₁、三七皂苷R₁均具有抗炎、保护肝脏、抗菌、抗肿瘤等作用^[36,37]; 苯丙素类成分具有抗菌、预防和治疗癌症等功效^[33]。以上研究表明, GDFMD中的各种药物活性成分可协同或互补发挥作用, 实现抗肝纤维化和抗炎等临床疗效。与之前研究者应用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法对GDFMD中的多类别化合物进行化学成分鉴定相比, 较全面完整地分析鉴定了该方剂中化学成分, 同时对方剂中的化学成分质谱裂解规律进行了系统分析总结。为进一步深入探究其药效物质基础、作用机制和临床应用奠定了坚实的理论基础。

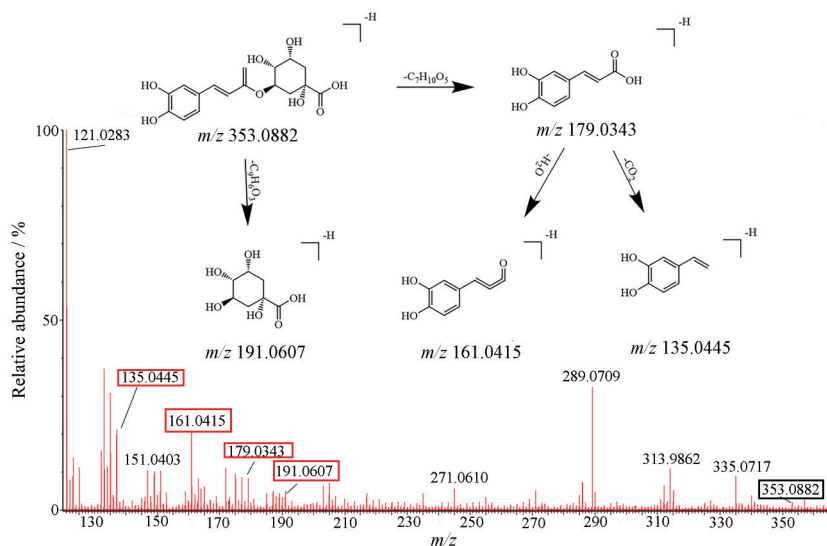


Figure 7 MS² spectrum, fragmentation pathways of chlorogenic acid in ESI mode

作者贡献: 黄蕾负责数据库构建、样品测试及文章撰写; 王倪负责样品制备及文献查询; 曹仕健、蒋羽鹤、吴欢负责结构解析; 董婷、周安负责课题监管、文章撰写、文章审阅及技术指导。

利益冲突: 本文中所有作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Wang N, Cheng M, Zhang X, et al. Gandou decoction decreases copper levels and alleviates hepatic injury in Copper-Laden hepatocellular degeneration model rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582390.
- [2] Fang S, Hedera P, Borchert J, et al. Epidemiology of Wilson disease in Germany-real-world insights from a claims data study [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2024, 19: 335.
- [3] Fan SP, Chen YF, Li CH, et al. Topographical metal burden correlates with brain atrophy and clinical severity in Wilson's disease [J]. *Neuroimage*, 2024, 299: 120829.
- [4] Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 21.
- [5] Hao WJ, Yang WM, Wei TH, et al. Bioinformatics- and cell-based experiments to explore the role of Gan-Dou-Fu-Mu-Tang in regulating iron death in the treatment of hepatomegaly nuclear degeneration [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2023, 45: 3461-3468.
- [6] Zhang YY, Wang MX, Yang WM, et al. Study on the clinical effect of Gandou Fumu decoction on hepatic fibrosis in Wilson's disease by liver fibro touch technique combined with serum noninvasive liver fibrosis model [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2023, 38: 1868-1873.
- [7] Wei T, Hao W, Tang L, et al. Comprehensive RNA-Seq analysis of potential therapeutic targets of Gan-Dou-Fu-Mu decoction for treatment of Wilson disease using a toxic milk mouse model [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 622268.
- [8] Tang L, Zhao C, Zhang J, et al. Discussion on the mechanism of Gandoufumu decoction attenuates liver damage of Wilson's disease by inhibiting autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 3236911.
- [9] Yang YL, Yang WM, Wei TH, et al. Analysis of chemical constituents in Gandou Fumu decoction by UHPLC-Q-orbitrap-MS technology [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2024, 39: 2001-2009.
- [10] Wang Y, Hu WD, Hong LL, et al. Characterization and identification of chemical components from *Euodiae Fructus* based on UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2024, 49: 2953-2964.
- [11] Zhang M, Chen M, Hu KR, et al. Identification of Zg02 metabolites in rats by UPLC-Q-TOF/MS^E [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2305-2312.
- [12] Hou M, John Martin JJ, Song Y, et al. Dynamics of flavonoid metabolites in coconut water based on metabolomics perspective [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1468858.
- [13] Tian YF, Xue L, Liu X, et al. Rapid identification of chemical constituents in Xuezhikang Capsule by UPLC-Q-TOF/MS^E combined with the establishment of UNIFI MS database [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2862-2874.
- [14] Zhang XY, Liu Y, Wu H. Identification of major bioactive components and metabolites of Gandou decoction in rat urine by an integrative approach based on UPLC-Q-TOF-MSE coupled with xenometabolomics analytical platform [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 971-978.
- [15] Yuan CY, Hu JJ, Li J, et al. Chemical composition, HPLC fingerprinting, chemical pattern recognition and content determination of Shugan Hewei decoction based on UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 2183-2196.
- [16] Xu C, Fang MY, Wang K, et al. Discovery and development of inflammatory inhibitors from 2-phenylchromonone (flavone) scaffolds [J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20: 2578-2598.
- [17] Sidhu D, Vasundhara M, Dey P. Chemical characterization, pathway enrichments and bioactive potentials of catechin-producing endophytic fungi isolated from tea leaves [J]. *RSC Adv*, 2024, 14: 33034-33047.
- [18] Xin Y, Yu Y, Wang HJ, et al. Quality control of Qinbai Qingfei concentrated pills based on UHPLC/Q-exactive orbitrap MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 6889-6901.
- [19] Andrade EDS, Santos RA, Guillermo LVC, et al. Immuno-modulatory effects of green tea catechins and their ring fission metabolites in a tumor microenvironment perspective [J]. *Molecules*, 2024, 29: 4575.
- [20] Xu RL, Fan JT, Dong HM, et al. UPLC-Q-TOF-MS analysis on chemical constituents of classical prescription Huangqi Guizhi Wuwu Tang standard decoction [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 5614-5630.
- [21] Chauhan K, Bhalla P, Bhadoriya K, et al. Untargeted metabolomic profiling of *Prinsepia utilis* Royle leaves by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2024, 59: e5075.
- [22] Hong LL, Wang HD, Xu XY, et al. Systematic characterization and identification of the chemical constituents of the *Schisandra chinensis* decoction based on a hybrid scanning technique of UHPLC/IM-QTOF-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 678-692.
- [23] Li X, Xie J, Li Y, et al. A comprehensive strategy of lipidomics and pharmacokinetics based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of Shaoyao Gancao decoction [J]. *J Sep Sci*, 2024, 47: e2400421.
- [24] Su Y, Shen L, Zhu P, et al. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS based metabolomics investigation on chemical constituent consistency of Zhenwu decoction before and after compatibility [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 246: 116222.

- [25] Huang L, Liu Q, Zhang W, et al. Comprehensive quality evaluation of Danggui-Jianzhong decoction by fingerprint analysis, multi-component quantitation and UPLC-Q-TOF-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2024, 62: 635-648.
- [26] Zhang SR, Zhao HS, Tong MR, et al. Chemical constituents, pharmacological effects of Moutan Cortex and predictive analysis on its quality marker (Q-Marker) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 5215-5224.
- [27] Li G, Wang X, Luo L, et al. Identification of chemical constituents of Qingjin Yiqi granules and comparative study on pharmacokinetics of 23 main bioactive components in normal and Lung-Qi deficiency rats by UPLC-MS/MS method [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2023, 1226: 123802.
- [28] Wang Z, Zhao H, Tian L, et al. Quantitative analysis and differential evaluation of Radix Bupleuri cultivated in different regions based on HPLC-MS and GC-MS combined with multivariate statistical analysis [J]. *Molecules*, 2022, 27: 4830.
- [29] Zhao YQ, Wang YW, Yang Y, et al. Simultaneous determination of saikosaponin a, saikosaponin d, saikosaponin b₁, saikosaponin b₂ and saikosaponin k in Ruhe Neixiao liquids by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2023, 43: 1702-1708.
- [30] Li X, Chen S, Zeng J, et al. Database-aided UHPLC-Q-orbitrap MS/MS strategy putatively identifies 52 compounds from Wushicha granule to propose anti-counterfeiting quality-markers for pharmacopoeia [J]. *Chin Med*, 2023, 18: 116.
- [31] Yang L, Fang Y, Liu R, et al. Phytochemical analysis, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Dendropanax dentiger* roots [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5084057.
- [32] Gigl M, Frank O, Irmer L, et al. Identification and quantitation of reaction products from chlorogenic acid, caffeic acid, and their thermal degradation products with odor-active thiols in coffee beverages [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 5427-5437.
- [33] Zhang Y, Deng Q, Wei M, et al. Identification of chemical constituents in *Coptis chinensis* inflorescence by UPLC-Q-orbitrap HRMS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2021, 27: 91-99.
- [34] Jiang XL, Jiang GC, Xu YN, et al. Exploration of the ameliorative effect and mechanism of catechins on cardiac dysfunction in rats with coronary heart disease based on LKB1/AMPK signaling pathway [J]. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)*, 2024, 44: 2961-2965.
- [35] Ren S, Wang Y, Zhang Y, et al. Paeoniflorin alleviates AngII-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells by regulating oxidative stress and Nrf2 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115253.
- [36] Li M, Li T, Han XX, et al. Determination of adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in *Bupleurum* by UPLC-QqQ-MS [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2024, 44: 999-1008.
- [37] Xu Y, Zhu M, Feng Y, et al. Panax notoginseng-microbiota interactions: from plant cultivation to medicinal application [J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154978.