

在线能量分辨质谱结合量子化学 计算解析牛膝中甾酮类同分异构体

刘双晶¹, 刘文静¹, 刘晓宁¹, 苗潞潞¹, 朱跃通¹, 冯卫生^{1,2}, 王彦志^{1,2}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046;

2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046)

摘要: 甾酮是牛膝的活性成分之一, 其同分异构体的难以区分给牛膝化学成分的精准确定带来了巨大挑战。在线能量分辨质谱(online energy-resolved mass spectrometry, Online ER-MS)被证明是一种区分同分异构体的有效方法。本研究首先采用超高效液相色谱-四极杆-串联飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)技术初步鉴定牛膝中的甾酮类化合物, 为了进一步区分甾酮类同分异构体, 利用超高效液相色谱-四极杆线性离子阱-串联质谱(UHPLC-Q-trap-MS/MS)的多反应监测模式采集各化合物拟离子对(pseudo-ion transitions, PITs)的碰撞能量(collision energy, CE)及相对离子强度, 通过逐级改变CE绘制裂解曲线, 定义裂解曲线顶点为最佳碰撞能(optimal collision energy, OCE), 分别计算各化合物不同离子对的OCE。同时, 结合量子化学计算各候选分子化学结构断裂的键能, 建立化学结构与OCE的关系。结果表明, 从牛膝中共鉴定到包括3组同分异构体的12个甾酮类化合物, 并通过与标准品对比验证了该方法的可行性。在线能量分辨质谱与量子化学的结合能够实现同分异构体的高效区分, 为中药中同分异构体的精准确定提供了新思路。

关键词: 甾酮; 在线能量分辨质谱(Online ER-MS); 裂解曲线; 量子化学计算

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2023)05-0635-08

doi: 10.7538/zpxb.2023.0031

Analysis of Sterones Isomers in *Achyranthis Bidentatae Radix* by Online Energy-Resolved Mass Spectrometry Combined with Quantum Structural Calculation

LIU Shuang-jing¹, LIU Wen-jing¹, LIU Xiao-ning¹, MIAO Jing-jing¹,

ZHU Yue-tong¹, FENG Wei-sheng^{1,2}, WANG Yan-zhi^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-construction
by Henan province & Education Ministry of P. R. China, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Sterones are one of the active components of *Achyranthes bidentata*, and the difficulty in distinguishing sterone isomers poses a great challenge to the accurate identification of the chemical components of *Achyranthes bidentata*, while online energy-

resolved mass spectrometry (Online ER-MS) has been proved to be an effective method for distinguishing the isomers due to its ability to provide rich MS/MS fragment information. In this study, mass spectra of sterones were collected by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS), and then the structures of the compounds were matched with MS/MS fragment ions to initially identify the sterone compounds in *Achyranthes bidentata*. In order to further distinguish the sterones isomers, the fragment ions with higher abundance detected in UHPLC-Q-TOF-MS/MS were selected to construct pseudo-ion transitions (PITs), and the collision energy (CE) and relative ion intensity of PITs were collected by using the multi-reaction monitoring mode of ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole linear ion trap mass/mass spectrometry (UHPLC-Q-trap-MS/MS). Further, the relative ion intensity of each PIT under different CE was recorded, and the dataset was imported into GraphPad Prism software to draw the fragmentation curve for each ion transition via Gaussian fitting. The vertex of the fragmentation curve was defined as the optimal collision energy (OCE), and the OCE of different ion transitions of each compound was calculated respectively. At the same time, combined with quantum structural calculation, the thermal enthalpies of precursor ions and product ions in each candidate structure were calculated using Gaussian program based on density functional theory, and the bond energy required to break the corresponding chemical bond was calculated according to the difference between the precursor ion and the two product ions. The OCE and bond energies of each group of isomers were analyzed to establish the relationship between the chemical structure and OCE. The results showed that the energy required to break the same chemical bond was not the same due to the different substituent positions of isomers, which made the OCE of different ion transitions of isomers also differ. Finally, 12 sterones including three groups of the isomers were identified from *Achyranthes bidentata*, and the feasibility of the method was verified by comparing with the standards. Therefore, the combination of online energy-resolved mass spectrometry and quantum structural calculation can achieve efficient differentiation of isomers, providing a new solution for accurate identification of isomers in traditional Chinese medicines.

Key words: sterones; online energy-resolved mass spectrometry (Online ER-MS); fragmentation curve; quantum structural calculation

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,性平,味苦、甘、酸,具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨等功效。甾酮作为牛膝的活性成分之一,具有抗氧化、抗骨质疏松、镇痛抗炎等作用^[1-4]。研究发现,虽然同分异构体的化学结构较相似,但往往会产生不同的药理活性,明确化合物的结构极为重要^[5-6]。牛膝中含有较多甾酮类成分的同分异构体,由于其对照品不易获取,故难以区分,因此亟需寻找一种高效准确表征甾酮类同分异构体的技术。

液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术具有高效、快速、灵敏的特性,已被广泛用于中药化学成分的特征,但仅根据 LC-MS 提供的化合物碎片丰度信息推导出的质量裂解规律及特征产物离子片段不能完全满足同分异构体的鉴定要求^[7-9]。随着串联质谱的发展,利用在线能量分辨质谱(online energy-resolved mass spectrometry, Online ER-MS)法区分同分异构体的报道越来越多,最佳碰撞能(optimal collision energy, OCE)已被证明可有效鉴定位置异构体^[10-12]。随着碰

撞能量(collision energy, CE)的改变,碎片离子相对强度会因异构体的结构而变化,通过分析同分异构体在不同碰撞能量下的裂解曲线计算 OCE,而 OCE 与相应化学键的键能呈正相关,将化合物结构与质谱特征结合可提高位置异构体鉴定的准确度^[13-14]。

本研究利用超高效液相色谱-四极杆-串联飞行时间质谱(ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS)技术采集甾酮类成分的高分辨质谱数据,并分析其质谱裂解行为,然后利用超高效液相色谱-四极杆线性离子阱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole linear ion trap mass/mass spectrometry, UHPLC-Q-trap-MS/MS)构建在线能量分辨质谱,计算各化合物拟离子对(pseudo-ion transitions, PITs)的 OCE,同时结合量子化学计算各候选异构体化学结构断裂的键能,将化合物结构与其质谱行为结合,以期实现甾酮类成分的高效准确鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

ExionLC AD 型超高效液相色谱仪、6600 Q-TOF 型高分辨质谱仪、5500 Q-Trap 型低分辨质谱仪;美国 AB Sciex 公司产品;5424 R 型高速低温离心机;德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 材料与试剂

β -蜕皮甾酮(PS0109-0020)、25-R-牛膝甾酮(PS00094)、25-S-牛膝甾酮(PS180709-17):纯度 $\geq 95\%$,成都普思生物科技股份有限公司产品;牛膝:2021 年 12 月采自河南省焦作市,由河南中医药大学陈随清教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根;甲醇、乙腈:色谱纯,默克股份两合公司产品;甲酸:色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司产品;超纯水:广州屈臣氏食品饮料有限公司产品。

1.3 供试品溶液的制备

取适量的牛膝样品,粉碎,置于具塞锥形瓶中,加入 15 mL 70%甲醇,浸泡过夜,室温下超声提取 1 h,提取液以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液稀释,即得供试品溶液。

1.4 对照品溶液的制备

分别精密称取 1 mg 各对照品于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,备用。

1.5 实验条件

1.5.1 液相色谱条件 色谱柱:Kinetex[®] C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 2.6 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈溶液(B);梯度洗脱程序为 0~2 min(10%B),2~15 min(10%~35%B),15~17 min(35%~10%B),17~20 min(10%B);柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.3 mL/min;进样量 2 μL 。

1.5.2 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 条件 电喷雾离子源负离子模式(ESI^-),喷雾气(Gas 1)压强 379.22 kPa,辅助加热气(Gas 2)压强 413.70 kPa,离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$,碰撞能量(CE) 40 V,一级质谱扫描范围 m/z 100~1 500,二级质谱扫描范围 m/z 50~1 500,每 2 h 自动调谐 1 次。

1.5.3 UHPLC-Q-trap-MS/MS 条件 ESI^- 模式,多反应监测(MRM)模式,通过优化去簇电压(DP)和入口电压(EP)建立合适的 MRM 离子通道,母离子(Q_1)和二级碎片离子(Q_3)均为单位分辨率(0.6~0.8 u),列于表 1。

1.6 Online ER-MS 的构建

选取 1.5.2 节高分辨二级质谱数据中响应较高的碎片离子构建各化合物的 PITs,以碰撞能量 1 V 递增的方式构建各个 PITs 的 ER-MS (10~100 V),每个 PITs 的驻留时间(dwelling time)为 100 ms。将响应值最大的 PITs 定义为 100%,计算其他 PITs 的相对响应值,将碰撞能量和相对响应值的数据导入 GraphPad Prism 8.0.2 软件,利用高斯曲线拟合绘制裂解曲线并计算 OCE 值。

1.7 化学结构计算

采用 Gaussian 16 计算键能,键能 ΔH 为母离子与子离子及相应碎片离子热焓的差值^[15],即 $\Delta H = H_1 - (H_2 + H_3)$, H_1 为母离子的热焓, H_2 、 H_3 为子离子及相应碎片离子的热焓。利用 SYBYL-X 2.0 软件包,采用随机搜索法,结合 MMFF94s 力场进行初步构象分析,通过对每个原子应用 6-31+G(d,p)基进一步优化构象,势能面用 B3LYP 混合函数描述。

表 1 3 组同分异构体的 MRM 优化条件

Table 1 MRM optimization conditions of three groups of isomers

分子式 Formula	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	去簇电压 Declustering potential/V	入口电压 Entrance potential/V
C ₂₇ H ₄₄ O ₇	478.9	319.3	−225.13	−8.10
	478.9	301.4	−243.91	−8.78
	478.9	159.2	−221.64	−13.40
C ₂₇ H ₄₄ O ₈	495.0	335.2	−256.48	−8.35
	495.0	175.2	−73.28	−5.11
	495.0	319.3	−233.95	−5.09
	495.0	301.2	−190.21	−5.05
	495.0	158.9	−71.12	−8.36
C ₂₇ H ₄₂ O ₆	461.1	319.1	−270.98	−6.14
	461.1	301.2	−35.86	−10.08
	461.1	159.3	−251.03	−5.67
	461.1	141.1	−229.96	−7.30

2 结果与讨论

2.1 高分辨串联质谱行为

甾酮类成分多为四环三萜类,C-17 侧链主要是含有 8~10 个碳原子的多元醇,个别为酮基、乙基及其衍生物或内酯^[16]。通过分析高分辨质谱行为,利用 SCIEX OS 软件的特定分子提取功能对化合物进行提取,并借助 SCIEX OS 的 Formula Finder 及 Framents Pane 功能鉴定采集到的数据,同时与标准品、参考文献^[16-18]及 MassBank 的二级数据比对,共鉴定到 3 组同分异构体。以 β -蜕皮甾酮为例,在

MS 谱图中,产生准分子离子峰 m/z 479.303 4 ($[M-H]^-$);在 MS² 谱图中,主要产生 m/z 319.19、301.18、159.10、83.05 等碎片离子,示于图 1。结合文献^[19]中提出的 β -蜕皮甾酮质谱裂解途径,初步归属各主要碎片离子的来源,示于图 2。

2.2 在线能量分辨质谱

为了准确表征 3 组同分异构体,分别建立各化合物的 ER-MS 并计算其相应的键能,化合物的提取离子流图示于图 3,鉴定结果列于表 2。化合物 3、5、6 的 $[M-H]^-$ 均为 m/z

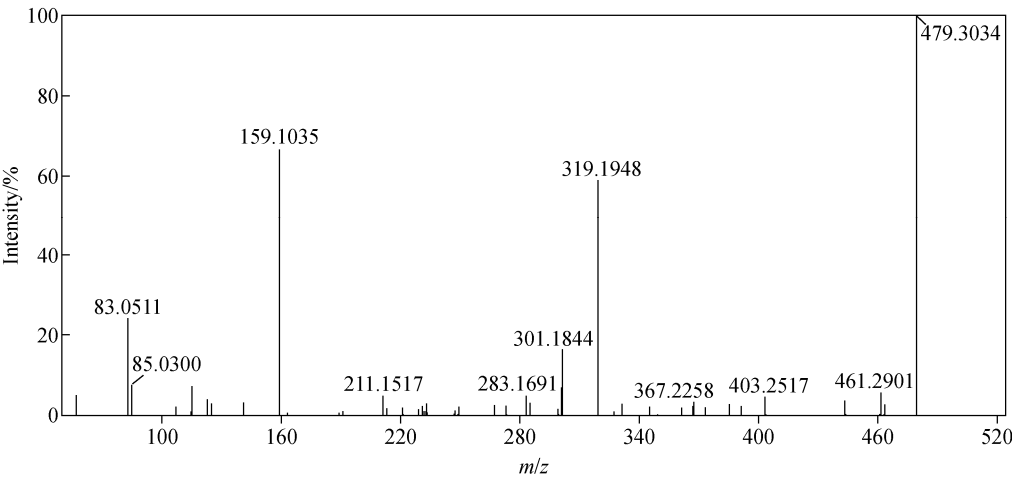


图 1 负离子模式下, β -蜕皮甾酮的 MS² 谱图

Fig.1 MS² spectra of β -ecdysterone in negative ion mode

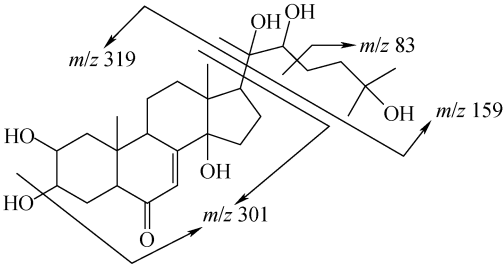


图 2 β -蜕皮甾酮的主要碎片裂解途径归属
Fig. 2 Classification of main fragmentation pathways of β -ecdysterone

479.30,均产生了 m/z 319、301、159 碎片离子,分别构建拟离子对 m/z 479>319、 m/z 479>301 和 m/z 479>159,记录碰撞能量在 10~100 V 范围内(以 1 V 递增)各 PITs 的相对强度,并对每个 PITs 的相对强度进行归一化处理,利用高斯曲线拟合获得裂解曲线,示于图 4。就 m/z 479>159 而言,化合物 3、5、6 的 OCE 值分别为 55.80、58.78 和 59.02 V,而候选结构 β -蜕皮甾酮、25-*R*-牛膝甾酮、25-*S*-牛膝甾酮的热焓分别为-4 152 061.289 9、-4 151 995.389 9、-4 151 995.915 kJ/mol,其断裂碎片离子 m/z 159 的键能分别为-3 185.57、-3 263.69、-3 263.56 kJ/mol。根据 OCE 与键能呈正比(仅考虑键能的绝对值),鉴定化合物 3 为 β -蜕皮甾酮,而由于化合物 5 和 6 的裂解曲线近乎

完全重合且键能计算结果一致,因此无法准确区分。通过与对照品比对,化合物 3、5、6 分别被鉴定为 β -蜕皮甾酮、25-*R*-牛膝甾酮和 25-*S*-牛膝甾酮,表明 ER-MS 可用于区分位置异构体而不适用于对映异构体的鉴别,这与文献^[20]的结果一致。

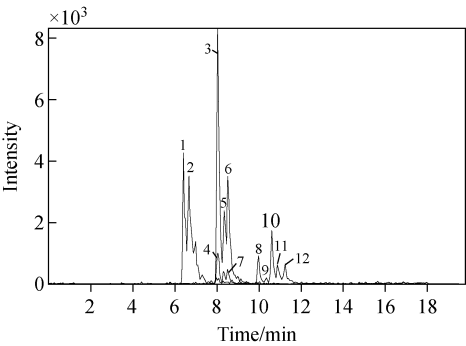
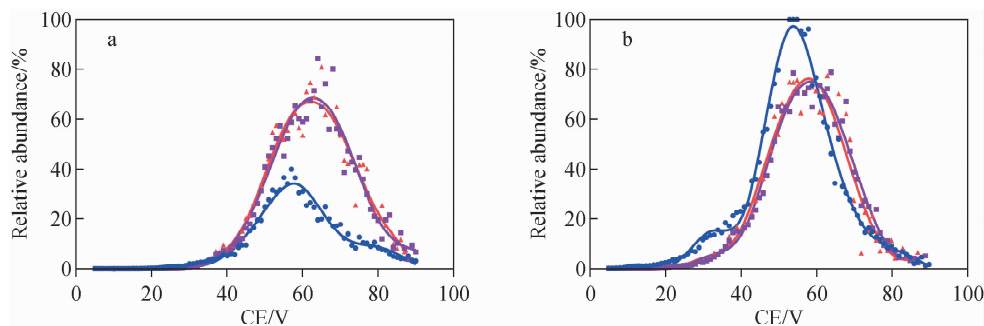


图 3 负离子模式下,
牛膝的 UHPLC-Q-trap-MS 提取离子流图
Fig. 3 Extracted ion chromatogram of *Achyranthes bidentata* by UHPLC-Q-trap-MS in negative ion mode

利用 SCIEX OS 软件的特定分子提取功能分析高分辨质谱数据,分别于保留时间 6.12、6.35、7.95、8.44 min 处提取到分子式为 $C_{27}H_{44}O_8$ 的化合物,准分子离子峰均为 m/z 495.30[M-H]⁻,根据是否产生特征产物离子

表 2 各化合物的 ER-MS² 信息

Table 2 ER-MS ² information of each compound						
序号 No.	分子式 Formula	保留时间 <i>t</i> _R /min	加合方式 [M-H] ⁻	误差 Error/×10 ⁻⁶	碎片离子(最佳碰撞能) Fragment ion (<i>m/z</i>) (OCE/V)	鉴定化合物 Identification
1	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	6.12	495.2963	-2.0	319.19(53.12)、175.10(41.29)、301.18(62.91)	罗汉松甾酮 C
2	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	6.35	495.2963	-0.5	319.19(44.08)、175.10(40.90)、301.18(61.45)	牛膝甾酮 A
3	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	7.94	479.3014	-0.9	319.19(55.06)、159.10(55.80)、301.18(57.78)	β -蜕皮甾酮
4	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	7.95	495.2963	-3.2	335.20(49.89)、159.10(54.13)	土克甾酮
5	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	8.25	479.3014	0.7	319.19(58.03)、159.10(58.78)、301.18(62.74)	25- <i>R</i> -牛膝甾酮
6	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	8.43	479.3014	-0.9	319.19(58.28)、159.10(59.02)、301.18(62.24)	25- <i>S</i> -牛膝甾酮
7	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	8.44	495.2963	-1.1	335.20(50.93)、159.10(55.12)	水龙骨科甾酮 B
8	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	9.93	461.2909	-2.6	301.18(43.72)、141.09(50.79)、159.10(40.88)	罗汉松甾酮 B
9	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	10.22	461.2909	-2.9	301.18(42.67)、319.19(44.98)、141.09(48.39)	旌节花甾酮 C
10	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	10.58	461.2909	-3.4	301.18(34.02)、141.09(46.40)、159.10(33.05)	牛膝甾酮 B
11	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	10.87	461.2909	0	301.18(34.46)、141.09(46.70)、159.10(35.44)	旌节花甾酮 A
12	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	11.2	461.2909	-1.5	301.18(33.80)、319.19(44.02)、141.09(44.95)	旌节花甾酮 D



注: a. m/z 479 > 301; b. m/z 479 > 159; 蓝线: 化合物 3; 红线: 化合物 5; 紫线: 化合物 6

图 4 负离子模式下, 化合物 3、5、6 的裂解曲线

Fig. 4 Breakdown graphs of compounds 3, 5 and 6 in negative ion mode

m/z 319、335 被划分为 2 组。对于化合物 1 和 2, 就 m/z 495 > 319 而言, 其 OCE 分别为 53.12、44.08 V, 而候选结构牛膝甾酮 A 和罗汉松甾酮 C 的热焓分别为 -4 349 502.654 2 和 -4 349 528.898 8 kJ/mol, 其碎片离子 m/z 319 的热焓分别为 -2 734 390.753 4、-2 734 402.376 5 kJ/mol, 而断裂碎片离子 m/z 319 所需的键能分别为 -3 238.75、-3 251.60 kJ/mol, 由于 $OCE_1 > OCE_2$, 因此化合物 1 和 2 分别被鉴定为罗汉松甾酮 C 和牛膝甾酮 A。在化合物 4 和 7 中, 就 m/z 495 > 335 而言, $OCE_4 < OCE_7$, 而候选结构水龙骨甾酮 B 和土克甾酮断裂 m/z 335 碎片所需的键能分别为 -3 269.08、-3 242.06 kJ/mol, 因此化合物 4 和 7 分别被鉴定为土克甾酮和水龙骨甾酮 B。

化合物 8、9、10、11、12 的 $[M-H]^-$ 离子均为 m/z 461.29, 分子式为 $C_{27}H_{42}O_6$, 根据是否产生特征碎片离子 m/z 319、159 被划分为 2 组。在化合物 8、10、11 中, 拟离子对 m/z 461 > 301 的 OCE 分别为 43.72、34.02、34.46 V, 即 $OCE_8 > OCE_{11} > OCE_{10}$, 而候选结构罗汉松甾酮 B、旌节花甾酮 A 和牛膝甾酮 B 的热焓分别为 -3 951 301.024 2、-3 951 342.696 9、-3 951 321.316 6 kJ/mol, 其碎片离子 m/z 301 的热焓分别为 -2 533 714.085 6、-2 533 744.016 3、-2 533 744.016 3 kJ/mol, 断裂碎片离子 m/z 301 所需的键能分别为 -3 248.75、-3 236.99、-3 125.36 kJ/mol, 因此化合物 8、10、11 分别被鉴定为罗汉松甾酮 B、牛膝甾酮 B 和旌节花甾酮 A。在化合物 9 和 12 中, 就 m/z 461 > 319 而言, $OCE_9 > OCE_{12}$, 而

候选结构旌节花甾酮 C 和旌节花甾酮 D 的碎片离子 m/z 319 的热焓分别为 -2 734 402.376 5、-2 734 403.130 1 kJ/mol, 断裂碎片离子 m/z 319 所需的能量分别为 -3 244.23、-3 211.39 kJ/mol, 因此化合物 9 和 12 分别被鉴定为旌节花甾酮 C 和旌节花甾酮 D。

LC-MS/MS 技术因高效、灵敏等特点已广泛用于中药化学成分的定性分析, 但由于同分异构体的 MS^1 和 MS^2 质谱行为较相似, 因此对同分异构体的表征存在限制。研究表明, 离子强度分布可用于化合物的结构注释, 虽然同分异构体能产生相同的碎片离子种类, 但对于同一碎片离子而言, 其在 OCE 下得到最大响应, 而 OCE 是化合物固有的参数, 不受仪器状态影响, 且同分异构体的 OCE 常存在差异^[21-23]。OCE 与键能呈正相关, 利用 ER-MS 测定相关碎片离子的 OCE, 通过关联键能与 OCE 数据可区分同分异构体。

3 结论

本研究利用 UHPLC-Q-TOF-MS 和 UHPLC-Q-trap-MS 技术, 并结合在线能量分辨质谱和量子化学计算, 表征牛膝中甾酮类同分异构体。利用在线能量分辨质谱获得不同碎片离子的 OCE, 由于同分异构体取代基位置的不同, 其断裂相应化学键的能量也不相同, 通过将 OCE 与化学结构相关联, 成功表征了 3 组同分异构体共 12 个化合物。因此, 在线能量分辨质谱与量子化学的结合可提高 LC-MS/MS 对同分异构体鉴定的准确性。

参考文献:

- [1] 罗懿钊, 欧阳文, 唐代凤, 程思佳, 唐纯玉, 张云坤, 王雄龙, 周华荣, 李顺祥. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2 122-2 136.
- LUO Yifan, OUYANG Wen, TANG Daifeng, CHENG Sijia, TANG Chunyu, ZHANG Yunkun, WANG Xionglong, ZHOU Huarong, LI Shunxiang. Research progress of material basis and pharmacological effects of saponins and sterones in *Achyranthes*[J]. China Modern Chinese Medicine, 2020, 22(12): 2 122-2 136 (in Chinese).
- [2] 常爱冰, 刘妍如, 王梅, 唐志书, 宋忠兴, 史鑫波, 刘峰, 陈彦斌. 基于“甾酮类化学成分-抗氧化生物活性”关联分析评价牛膝药材商品等级[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1 737-1 746.
- CHANG Aibing, LIU Yanru, WANG Mei, TANG Zhishu, SONG Zhongxing, SHI Xinbo, LIU Feng, CHEN Yanbin. Commercial grade evaluation of *Achyranthes bidentata* based on “phytoecdysones components-antioxidant biological activity” correlation[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(10): 1 737-1 746(in Chinese).
- [3] 姜涛, 凌翠敏, 黄永青, 陈庆真, 杨冰璇, 邵敏. 牛膝甾酮对小鼠 MC3T3-E1 细胞成骨分化和增殖的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(9): 1 082-1 087.
- JIANG Tao, LING Cuimin, HUANG Yongqing, CHEN Qingzhen, YANG Bingxuan, SHAO Min. Effects of inokosterone on osteogenic differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2020, 40(9): 1 082-1 087(in Chinese).
- [4] LI Y, AILING H, JIAN P. Ecdysterone accelerates healing of radiation-induced oral mucositis in rats by increasing matrix cell proliferation[J]. Radiat Res, 2019, 191(3): 237-244.
- [5] ZHANG G, LI Y, CHEN T, GAO Y, SUN J, YANG W, SONG L, SU P, MA M, ZHANG Z, ZHANG H, YANG Y, LI H, YE Z, HOU H. Comparative study of the efficacy and pharmacokinetics of reduning injection and atomization inhalation[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109 226.
- [6] JU Y, LIANG H, DU K, GUO Z, MENG D. Isolation of triterpenoids and phytosterones from *Achyranthes bidentata* Bl. to treat breast cancer based on network pharmacology[J]. Nat Prod Res, 2021, 35(24): 5 939-5 942.
- [7] BECCARIA M, CABOOTER D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1 129-1 157.
- [8] 谢彤, 徐建亚, 沈存思, 狄留庆, 汪受传, 单进军. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 的黄芩中黄酮碳苷的结构表征及同分异构体的区分[J]. 中草药, 2015, 46(22): 3 318-3 325.
- XIE Tong, XU Jianya, SHEN Cunsu, DI Liuting, WANG Shouchuan, SHAN Jinjun. Structural characterization of C-glycosyl flavonoids in *Scutellaria baicalensis* and differentiation of isomers by UPLC/LTQ-Orbitrap-MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(22): 3 318-3 325(in Chinese).
- [9] ZHANG K, LI T, GONG X C, CAO L B, LI J, TU P F, SONG Q Q, SONG Y L. Online energy-resolved MS boosts the potential of LC-MS towards metabolite characterization of salidroside and tyrosol[J]. Anal Methods, 2020, 12(42): 5 120-5 127.
- [10] GUAN P W, LIU W J, CAO Y, TANG H T, HUO H X, WAN J B, QIAO X, TU P F, LI J, SONG Y L. Full collision energy ramp-MS² spectrum in structural analysis relying on MS/MS[J]. Anal Chem, 2021, 93(46): 15 381-15 389.
- [11] XU X, LI W, LI T, ZHANG K, SONG Q Q, LIU L, TU P F, WANG Y T, SONG Y L, LI J. Direct infusion-three-dimensional-mass spectrometry enables rapid chemome comparison among herbal medicines[J]. Anal Chem, 2020, 92(11): 7 646-7 656.
- [12] 许霞, 李婷, 贾金茹, 汤慧婷, 李军, 赵云芳, 宋月林. 非手性-手性色谱-预测多反应监测法分析中药毛前胡的化学成分[J]. 色谱, 2021, 39(6): 642-651.
- XU Xia, LI Ting, JIA Jinru, TANG Huiting, LI Jun, ZHAO Yunfang, SONG Yuelin. Analysis of chemical components of Chinese medicine Ligustici Radix by achiral-chiral liquid chromatography-predictive multiple reaction monitoring [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021,

- 39(6): 642-651(in Chinese).
- [13] SONG Q, LI J, HUO H, CAO Y, WANG Y, SONG Y, TU P. Retention time and optimal collision energy advance structural annotation relied on LC-MS/MS: an application in metabolite identification of an antidementia agent namely echinacoside[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(23): 15 040-15 048.
- [14] 管朋维, 宋青青, 张珂, 李婷, 李玮, 屠鹏飞, 李军, 宋月林. 在线能量分辨质谱结合量子化学计算分析山奈素的多级质谱行为[J]. *分析化学*, 2020, 48(10): 1 428-1 433.
- GUAN Pengwei, SONG Qingqing, ZHANG Ke, LI Ting, LI Wei, TU Pengfei, LI Jun, SONG Yuelin. Investigation of tandem mass spectrometric behavior of kaempferide by online collision energy-resolved mass spectrometry-structural calculation[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(10): 1 428-1 433(in Chinese).
- [15] BACH R D, SCHLEGEL H B. Bond dissociation energy of peroxides revisited[J]. *J Phys Chem A*, 2020, 124(23): 4 742-4 751.
- [16] HE X, WANG X, FANG J, CHANG Y, NING N, GUO H, HUANG L, HUANG X. The genus *Achyranthes*: a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 260-278.
- [17] YANG L, HOU A J, YAN M L, XING X D, GUO X Y, JIANG H, YANG B Y, CHAN K, WANG Q H, KUANG H X. Investigation of radix *Achyranthes bidentatae* phytochemistry and pharmacology[J]. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 5(1): 50-60.
- [18] 陶益, 杜映姗, 黄苏润, 李伟东, 蔡宝昌. 牛膝不同炮制品中化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12): 1-5.
- TAO Yi, DU Yingshan, HUANG Surun, LI Weidong, CAI Baochang. Analysis of chemical constituents in different processed products of *Achyranthes Bidentatae* radix by UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2017, 23(12): 1-5(in Chinese).
- [19] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 赵鸿鹏, 赵宇, 张洪兵, 许浚, 张铁军, 王磊, 刘昌孝. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究[J]. *中草药*, 2021, 52(18): 5 496-5 513.
- LIU Jianting, ZHANG Yu, BU Ruizhen, ZHAO Hongpeng, ZHAO Yu, ZHANG Hongbing, XU Jun, ZHANG Tiejun, WANG Lei, LIU Changxiao. Identification of chemical components and blood components of Biqi capsules by UPLC-Q/TOF-MS[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(18): 5 496-5 513(in Chinese).
- [20] LIU W, LI W, ZHANG P, GONG X, TU P, TANG L, LI J, SONG Y. Quality structural annotation for the metabolites of chlorogenic acid in rat[J]. *Food Chem*, 2022, 379: 132 134.
- [21] ABLAJAN K, TUOHETI A. Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol *O*-rhamnosides using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(3): 451-460.
- [22] ABLAJAN K. A study of characteristic fragmentation of isoflavonoids by using negative ion ESI-MS⁻[J]. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(1): 77-84.
- [23] CAO Y, CHAI C, CHANG A, XU X, SONG Q, LIU W, LI J, SONG Y, TU P. Optimal collision energy is an eligible molecular descriptor to boost structural annotation: an application for chlorogenic acid derivatives-focused chemical profiling[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1 609: 460 515.

(收稿日期:2023-03-20;修回日期:2023-05-09)