

酸枣仁微量生物碱成分的筛查方法研究

胡彦周, 丁 轲*, 韩 涛, 陈湘宁

北京农学院食品科学与工程学院 食品质量与安全北京实验室

农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室, 北京 102206

摘要: 为了准确、迅速地筛查并确定酸枣仁中微量生物碱成分, 运用含氮有机物(生物碱)分析包中的色谱柱建立酸枣仁生物碱成分的高效液相色谱在线分离方法, 然后利用 MassWorks 分子识别软件和 LC-ESI-MS/MS 对在线分离的生物碱成分进行确认, 共筛查到 3 种阿朴芬类生物碱: 酸枣仁碱 K ($C_{17}H_{19}NO_3$)、山矾碱 ($C_{17}H_{17}NO_2$) 和 N-甲基巴婆碱 ($C_{18}H_{19}NO_2$); 2 种环肽类生物碱: 酸枣仁碱 F ($C_{31}H_{42}N_4O_5$) 和酸枣仁碱 A ($C_{31}H_{42}N_4O_4$); 还有一对同分异构体阿朴芬生物碱: 木兰花碱和酸李碱 ($C_{20}H_{24}NO_4$) 有待进一步确定。

关键词: 酸枣仁; 生物碱; MassWorks; LC-ESI-MS/MS

中图分类号: O657.63; R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.015

Screening Methods of Trace Alkaloids Components from *Semen Zizyphi spinosae*

HU Yan-zhou, DING Ke*, HAN Tao, CHEN Xiang-ning

College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing Food Quality and Safety Laboratory; Microbiological and Safety Inspection and Control

of Pesticide Residues in Agricultural Products Harmful Beijing Key Laboratory, Beijing 102206, China

Abstract: To accurately and quickly screen and identify trace alkaloids components from *Semen Zizyphi spinosae*, a HPLC online separation method of alkaloids components was developed using the columns which belong to the nitrogen-containing organic compounds (alkaloids) analysis kit. Then the alkaloids components separated on line were identified with the help of MassWorks molecular recognition software and LC-ESI-MS/MS. Three compounds: sanjoinine K ($C_{17}H_{19}NO_3$), caaverine ($C_{17}H_{17}NO_2$) and N-methylasimilobine ($C_{18}H_{19}NO_2$), belong to aporphine alkaloids and two compounds: sanjoinine F ($C_{31}H_{42}N_4O_5$) and sanjoinine A ($C_{31}H_{42}N_4O_4$), belong to cyclopeptide alkaloids were screened and identified. In addition, there was a pair of isomeric compounds: magnoflorine and zizyphusine ($C_{20}H_{24}NO_4$), which belong to aporphine alkaloids to be further identified. A rapid and efficient screening method for alkaloids from Chinese medicine was established in this study.

Key words: *Semen Zizyphi spinosae*; alkaloid; MassWorks; LC-ESI-MS/MS

酸枣仁 (*Semen Zizyphi Spinosae*) 为鼠李科植物酸枣的种子, 具有改善睡眠等^[1,2] 功能。有研究表明酸枣仁皂苷和黄酮具有改善睡眠的功能, 并进一步确定了改善睡眠的具体成分为酸枣仁皂苷 A、B^[3] 和黄酮斯皮诺素、阿魏酰斯皮诺素^[4,5]。然而, 酸枣仁中还有一大类成分——生物碱, 有学者发现

酸枣仁生物碱也具有改善睡眠的功能^[6], 但具体功能成分还有待进一步确定。由于市场上没有酸枣仁生物碱的标准品, 要对酸枣仁生物碱改善睡眠具体成分进行确定, 首先要筛查、分离得到生物碱的具体成分。

本实验首先用含氮有机物分析包中的 C_{18} 柱和 C_{18} 、IEX 混合色谱柱建立酸枣仁生物碱的液相分离方法, 然后通过 MassWorks 分子识别软件与三重四级杆质谱的结合使用对分离后的酸枣仁生物碱进行筛查、识别。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

中药材酸枣仁 (*Semen Zizyphi Spinosae*), 购于河

收稿日期: 2016-11-21 接受日期: 2017-04-12

基金项目: 北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划 (CIT&T CD20154045); 北京农学院青年基金——实验技术体系研发基金项目 (SXST201604); 北京市自然科学基金委员会——北京市教育委员会联合资助项目 (KZ201710020014); 2016 年北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目 (2016YJS051)

* 通信作者 E-mail: dingk@tom.com

北安国中药材市场。

石油醚、甲醇、乙醚、浓盐酸、氨水、三氯甲烷(分析纯):北京化工厂;乙腈(色谱纯):韩国 DUK-SAN 药品工业;甲酸、甲酸铵(色谱纯):上海阿拉丁试剂有限公司;荷叶碱标准品($C_{19}H_{21}NO_2$, HPLC $\geq 98\%$)、木兰花碱标准品($C_{20}H_{24}NO_4$, HPLC $\geq 98\%$):上海顺勃生物工程技术有限公司。

1.2 仪器与设备

日本 SHIMADZU 公司 LC-20AD 型高效液相色谱仪,具体配置为:LC-20AD 型高压双泵;SIL-20A 自动进样器;CTO-20A 柱温箱;SPD-M20A 二极管阵列检测器;SCL-10A 岛津液相系统控制器;CLASS-VP 色谱数据工作站。北京泰克美高新技术有限公司含氮有机物(生物碱)分析专用工具包:分析柱 1(极低金属不纯物的 C_{18} 柱, TechMate C_{18} -ST, 4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$);分析柱 2(填料经特殊工艺处理的键合 C_{18} 和 IEX 的硅胶柱, TechMate CR(1:5)-ST, 2.0×150 mm, $5 \mu\text{m}$)。美国 Agilent 公司 1200-6410B 液相色谱-三重四级杆质谱联用仪,具体配置为:Agilent 1200 系列真空脱气机;Agilent 1200 系列 SL 型二元泵;Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器;Agilent 1200 系列柱温箱;带电喷雾离子源(Electrospray Ionization, ESI)的 Agilent 6410B 三重串联四级杆系统;Agilent MassHunter 工作站软件。

2 实验方法

2.1 酸枣仁生物碱的提取

酸枣仁生物碱的提取流程如图 1 所示^[7]。

2.2 酸枣仁生物碱成分的分析分离

本实验应用生物碱分析包对酸枣仁提取物中的生物碱成分进行分离,该方法主要基于以下原理:生物碱在酸性环境下会成盐,分子极性增大,在反相色谱体系中不保留或保留时间较短,先通过 C_{18} 柱对提取物进行初步分离,收集其中不保留或者保留较差的成分。再将这些成分通过 C_{18} 和 IEX 的混合色谱柱分离,因为静电力的存在生物碱有较好的保留,可以通过改变洗脱剂的盐浓度和 pH 值对生物碱进行进一步的分离。

2.2.1 反相色谱柱分析条件

反相色谱柱 TechMate C_{18} -ST(4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$)的流动相 A 相选用 0.1% 的甲酸水溶液, B 相选用乙腈,总流速为 1 mL/min,采用梯度洗脱,洗脱梯度:0 ~ 5 min, 30% B; 5 ~ 25 min, 30% ~ 60% B; 25 ~ 27 min, 60% ~ 100% B; 27 ~ 45 min, 100% B。柱温选用 40 °C,进样量 20 μL ,检测器采用二极管阵列检测器,波长 254 nm。

2.2.2 混合色谱柱分析条件

由于混合色谱柱对生物碱的分离和生物碱成分的筛查是同时进行的,所以混合色谱柱分析条件同 2.3.1 的色谱条件。

2.3 酸枣仁生物碱成分的筛查

2.3.1 色谱条件

色谱柱选用 C_{18} 和 IEX 的混合色谱 TechMate CR(1:5)-ST(2.0×150 mm, $5 \mu\text{m}$)。A 流动相选用甲酸水溶液(pH = 3)和乙腈,比例 70:30; B 流动相选用 50 mmol/L 甲酸铵水溶液(甲酸调 pH = 3)和乙腈,比例 70:30。总流速 0.2 mL/min,柱温 40 °C,进样量 5 μL 。经反相色谱柱收集的第一部分(0 ~ 5 min 部分)的洗脱梯度:0 ~ 5 min, 0% B; 5 ~ 30 min, 0% ~ 100% B; 30 ~ 60 min, 100% B。第二部分(5 ~ 25 min 部分)的洗脱梯度:0 ~ 10 min, 0% B; 10 ~ 50 min, 0% ~ 100% B; 50 ~ 80 min, 100% B。

2.3.2 质谱条件

质谱选择 MS2 Scan 模式,步长(Step size)0.1 amu,在 profile 模式下采集化合物信息,离子源为 ESI,质量扫描范围 m/z 100 ~ 800 amu,碎裂电压为 135 V,正离子模式。雾化气压力为 20 psig,干燥气

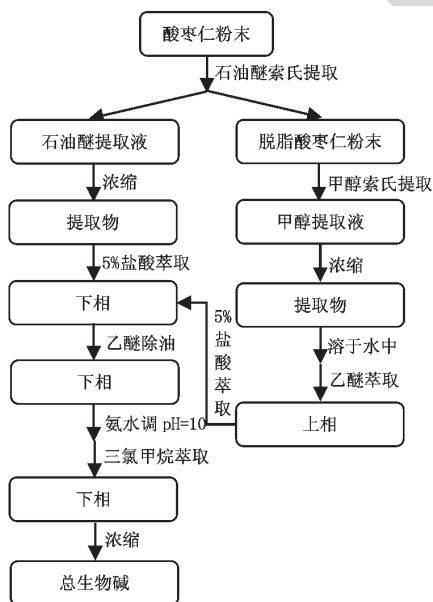


图 1 酸枣仁生物碱提取流程

Fig. 1 Extraction process of alkaloids from *Semen Zizyphi Spinosae*

流速为 10 L/min,干燥气温度 350 °C, Vcap 毛细管电压 4000 V。

2.3.3 校正函数的建立

为了能通过 MassWorks 分子识别软件在低分辨质谱上获得精确的质量数,需要一个包含有质量漂移和峰形失真的校正函数^[8-11],所以,首先要利用已知标样建立一个校正函数,当相对质量误差的绝对值小于 2 ppm,且 Spectral Accuracy 值大于 98% 时,校正函数可用^[12,13]。本实验选用荷叶碱(C₁₉H₂₁NO₂)和木兰花碱(C₂₀H₂₄NO₄)建立校正函数。

2.3.4 生物碱成分的筛查

先将提取得到的总生物碱在液相上经过反相色谱柱(分析柱 1)进行初步分离,分别收集 0~5 min、5~25 min 洗出液,多次收集,在旋转蒸发器上浓缩,然后在液质上通过混合色谱柱(分析柱 2)进一步分离,同时在 2.3.2 的质谱条件下进行检测。

在 MassWorks 分子识别软件上,用建立好的校正函数对总离子流图中特定峰对应的质谱图进行质量漂移以及峰形失真的校正,从而在低分辨质谱上获得精确质量数^[14]。利用 MassWorks 的同位素峰形校正检索功能(Calibrated Lineshape Isotope Profile Search, CLIPS)^[15]对质谱图中的准分子离子峰的化学式进行检索,根据检索结果确定总离子流图中特定峰对应的物质,再根据质谱图中的碎片离子信息以及已知的化合物信息(包括分子式、结构式)进行验证。

3 结果与分析

3.1 阿朴芬类生物碱的筛查结果

酸枣仁碱 K,也即右旋衡州乌药碱(sanjoinine K 或 coclaurine, C₁₇H₁₉NO₃),在酸枣仁生物碱提取物经过分析柱 1 后收集的第一部分(0~5 min 部分)通过分析柱 2 时洗脱到第 30.6 min 时出现(见图 2,峰 1),质谱图见图 3。 m/z 286.1427 的峰为准分子离子峰。对准分子离子进行同位素峰形校正检索,在给定的质量误差范围(± 0.01 Da)内得到的结果根据谱图准确度排名前三位见表 1,排在第一位的即为该准分子离子的化学式 C₁₇H₂₀NO₃[M+H]⁺,相应的分子式为 C₁₇H₁₉NO₃,推测为酸枣仁碱 K。它的质谱图中含有 m/z 269.1246 的碎片离子峰,比准分子离子的质荷比小了 17,是由准分子离子失去一个羟基(-OH)或氨基(-NH₃)得到,酸枣仁碱 K 的结构式如图 4 所示^[16],含有羟基,符合条件。

山矾碱(caaverine, C₁₇H₁₇NO₂)在生物碱提取物经过分析柱 1 后收集的第一部分(0~5 min 部分)通过分析柱 2 时洗脱到第 43.0 min 时出现(见图 2,峰 3),质谱图见图 3。 m/z 268.1344 的峰为准分子离子峰。对此准分子离子的化学式在 ± 0.01 Da 的质量误差范围内进行检索,得到的结果中根据谱图准确度排名前三位见表 1,排在第一位的为该准分子离子的化学式 C₁₇H₁₈NO₂[M+H]⁺,相应的分子式为 C₁₇H₁₇NO₂,推测为山矾碱。它的质谱图中存在 m/z 251.1051 的碎片离子峰,是由准分子离子失去一个羟基(-OH)或氨基(-NH₃)得到,酸枣仁碱 K 的结构式如图 4 所示^[16],含有羟基,符合条件。

N-甲基巴婆碱(N-methylasimilobine, C₁₈H₁₉NO₂)在生物碱提取物经过分析柱 1 后收集的第一部分(0~5 min 部分)通过分析柱 2 时洗脱到第 53.5 min 时出现(见图 2,峰 4),质谱图见图 3。 m/z 282.1489 的峰为准分子离子峰,对此峰进行检索,结果前三位见表 1,准分子离子的化学式为 C₁₈H₂₀NO₂[M+H]⁺,相应的分子式为 C₁₈H₁₉NO₂,推测为 N-甲基巴婆碱或酸枣仁碱 Ia(去甲荷叶碱),两者为同分异构体,结构式如图 4 所示^[16]。从它的质谱图可以看到 m/z 265.1197 和 251.0985 的离子碎片,比准分子离子的质荷比分别小了 17 和 31,所以 m/z 265.1197 的碎片离子是由准分子离子失去一个羟基(-OH)或氨基(-NH₃)得到, m/z 251.0985 的碎片离子是由准分子离子失去一个甲氧基(-OCH₃)或羟甲基(-CH₂OH)得到。从 N-甲基巴婆碱和酸枣仁碱 Ia 结构式可以看到,N-甲基巴婆碱同时含有羟基和甲氧基,而酸枣仁碱 Ia 只含有羟甲基,没有羟基或氨基,所以目标物推测为 N-甲基巴婆碱。进一步分析,目标物是否同时存在两种同分异构体,若存在酸枣仁碱 Ia,就会出现同时失去两个甲氧基的碎片离子 m/z 220,显然,质谱图中不存在 m/z 220 的碎片离子,所以不含有酸枣仁碱 Ia。质谱图中 m/z 234.0780 的碎片离子是由准分子离子同时失去一个羟基和一个甲氧基后得到, m/z 219.0826 的碎片离子是由准分子离子同时失去一个羟基、一个甲氧基和一个甲基后得到。

木兰花碱(magnoflorine, C₂₀H₂₄NO₄)、酸李碱(zizyphusine, C₂₀H₂₄NO₄)在第一部分(0~5 min 部分)通过分析柱 2 时洗脱到第 35.4 min 时出现(见图 2,峰 2),质谱图见图 3。对 m/z 342.1690 的准分子离子进行检索,检索结果根据谱图准确度排名前

三位见表 1,排在第一位的化学式为 $C_{20}H_{24}NO_4$ 。木兰花碱和酸李碱属于同分异构体,结构式如图 4 所示^[16],由于它们以离子形式存在,本身带一个单位的正电荷,所以质谱图中的离子为 M^+ ($C_{20}H_{24}NO_4^+$) 而不是 $[M+H]^+$,推测相应的成分是木兰花碱或酸李碱。用木兰花碱和酸李碱标准品试验发现它们通过色谱柱的保留时间相同,通过 ESI-LC-MS/MS 得到的质谱图中均没有明显的碎片离子,并且它们的母离子和子离子均相同,所以无法通过 Mass-Works 和 LC-ESI-MS/MS 对其进行区分,要想进一

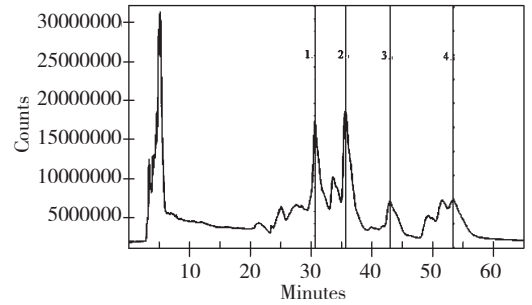


图 2 第一部分总离子流图

Fig. 2 Total ions chromatogram of part one

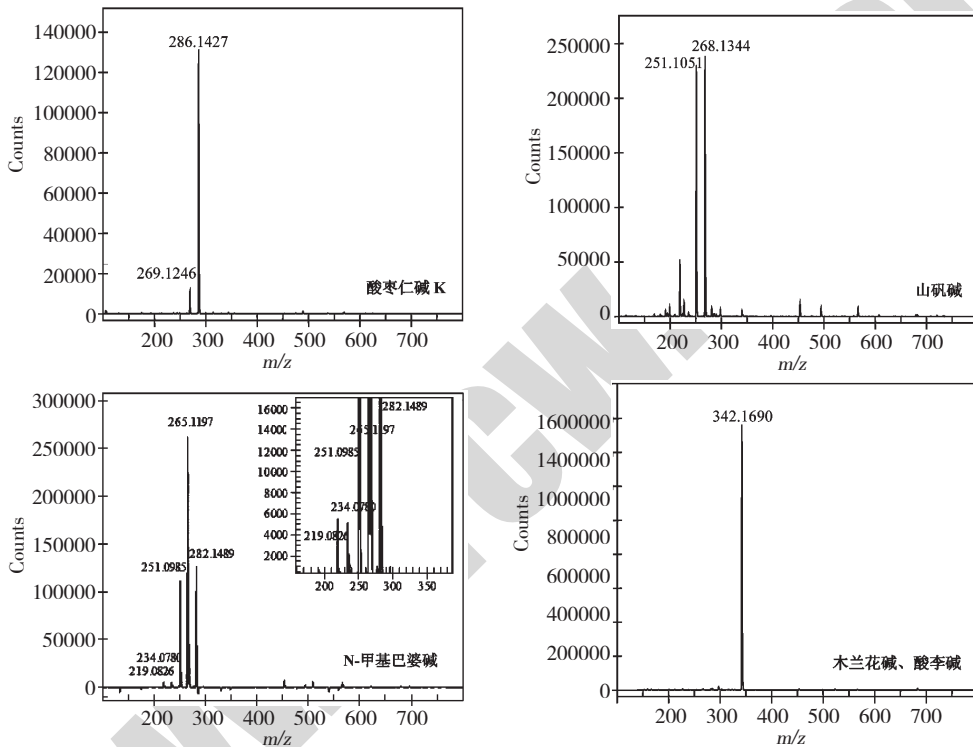


图 3 阿朴芬类生物碱质谱图

Fig. 3 Mass spectra of aporphine alkaloids

表 1 阿朴芬类生物检索结果

Table 1 CLIPS search results of aporphine alkaloids

名称 Name	排序 Order	化学式 Formula	理论质量 Theoretical mass	绝对质量误差 Absolute error (mDa)	相对质量误差 Relative error (ppm)	谱图准确度 Accuracy (%)	环加双键数 Unsaturation degree
酸枣仁碱 K KSanzoimine K	1	$C_{17}H_{20}O_3N$	286.1438	-1.0699	-3.7392	98.5330	8.5
	2	$C_{13}H_{16}ON_7$	286.1411	1.6154	5.6455	98.4629	9.5
	3	$C_{12}H_{16}N_9$	286.1523	-9.6180	-33.6125	98.4165	9.5
山矾碱 Caaverine	1	$C_{17}H_{18}O_2N$	268.1332	1.1948	4.4558	98.1075	9.5
	2	$C_{13}H_{14}N_7$	268.1305	3.8801	14.4707	97.9755	10.5
N-甲基巴婆碱 N-Methylasimilobine	3	$C_{12}H_{18}O_4N_3$	268.1292	5.2175	19.4585	97.5049	5.5
	1	$C_{18}H_{20}O_2N$	282.1489	0.0447	0.1584	98.4007	9.5

名称 Name	排序 Order	化学式 Formula	理论质量 Theoretical mass	绝对质量误差 Absolute error (mDa)	相对质量误差 Relative error (ppm)	谱图准确度 Accuracy (%)	环双键数 Unsaturation degree
木兰花碱、酸李碱 Magnoflorine and Zizyphusine	2	$C_{14}H_{16}N_7$	282.1462	2.7300	9.6758	98.3709	10.5
	3	$C_{13}H_{20}O_4N_3$	282.1448	4.0674	14.4159	97.9040	5.5
	1	$C_{20}H_{24}O_4N$	342.1700	-0.9847	-2.8778	98.9620	9.5
	2	$C_{16}H_{20}O_2N_7$	342.1673	1.7007	4.9702	98.6823	10.5
	3	$C_{15}H_{20}ON_9$	342.1785	-9.5327	-27.8597	98.5707	10.5



图4 阿朴芬类生物碱结构式

Fig. 4 Chemical structure of aporphine alkaloids

步鉴定,需要借助红外光谱(IR)、核磁共振谱(NMR)^[17-18]等其他手段。

3.2 环肽类生物碱的筛查结果

酸枣仁碱 F (sanjoinine F, $C_{31}H_{42}N_4O_5$), 在经过分析柱 1 后收集的第二部分 (5 ~ 25 min 部分) 通过分析柱 2 时洗脱到第 45.8 min 出现 (见图 5, 峰 1), 相应的质谱图见图 6, m/z 551.3190 的峰为准分子离子峰, 对此峰进行检索, 根据谱图准确度排名前三位见表 2, $C_{31}H_{43}N_4O_5 [M + H]^+$ 为准分子离子的化学式, 相应的分子式为 $C_{31}H_{42}N_4O_5$, 推测为酸枣仁碱 F。

酸枣仁碱 A, 也即欧鼠李叶碱 (sanjoinine A 或 frangufoline, $C_{31}H_{42}N_4O_4$), 在经过分析柱 1 后收集的第二部分 (5 ~ 25 min 部分) 通过分析柱 2 时洗脱到第 58.0 min 出现 (见图 5, 峰 2), 它的质谱图见图 6, m/z 535.3211 的峰为准分子离子峰, 对此峰进行检索, 根据谱图准确度排名前三位见表 2, $C_{31}H_{43}N_4O_4$

为该准分子离子的化学式, 相应的分子式为 $C_{31}H_{42}N_4O_4$, 推测为酸枣仁碱 A。

4 结论

实验结果表明含氮有机物分析包中的 C_{18} 色谱柱和 C_{18} 、IEX 混合硅胶柱结合使用对生物碱的分离

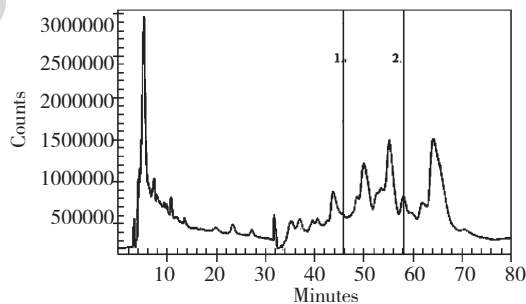


图5 第二部分总离子流图

Fig. 5 Total ions chromatogram of part two

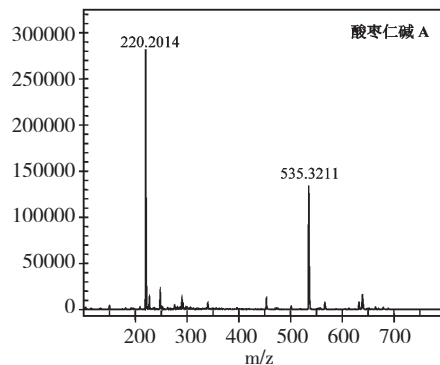
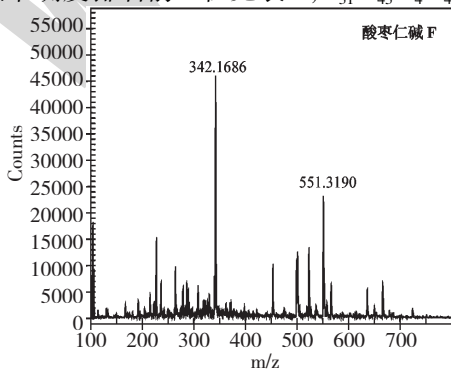


图6 环肽类生物碱质谱图

Fig. 6 Mass spectra of cyclopeptide alkaloids

表 2 环肽类生物碱检索结果

Table 2 CLIPS search results of cyclopeptide alkaloids

名称 Name	排序 Order	化学式 Formula	理论质量 Theoretical mass	绝对质量误差 Absolute error (mDa)	相对质量误差 Relative error (ppm)	谱图准确度 Accuracy (%)	环加双键数 Unsaturation degree
酸枣仁碱 FSanjoinine F	1	C ₃₁ H ₄₃ O ₅ N ₄	551.3228	-3.7969	-6.8870	98.9025	12.5
	2	C ₃₂ H ₄₃ O ₆ N ₂	551.3116	7.4365	13.4885	98.8459	12.5
	3	C ₃₀ H ₄₇ O ₉	551.3215	-2.4595	-4.4612	98.7754	7.5
酸枣仁碱 ASanjoinine A	1	C ₃₁ H ₄₃ O ₄ N ₄	535.3279	-6.7823	-12.6696	98.8227	12.5
	2	C ₃₂ H ₄₃ O ₅ N ₂	535.3166	4.4511	8.3148	98.7594	12.5
	3	C ₂₈ H ₃₉ O ₃ N ₈	535.3140	7.1364	13.3311	98.7344	12.5

具有较好的效果,对生物碱的筛查具有一定帮助。MassWorks 分子识别软件结合低分辨质谱使用对已发现并报道但没有标准品的中药活性成分的快速筛查具有重要意义,可对中药中已发现的微量活性成分进行快速筛查、识别,找到目标成分,为后续的分离纯化、活性研究提供指导。

参考文献

- Zhao LH (赵连红), Qiao W (乔卫), Xu L (许岚). Experimental study on anti-convulsion effect of alkaloids from *semen zizyphi spinosae*. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2007, 19(4):4-5.
- Zhu TL (朱铁梁), Hu ZS (胡占嵩), Li L (李璐), et al. Study on the antidepressant effect of active fraction from *Semen Zizyphi Spinosae*. *Acta Coll Med. CPAF* (武警医学院学报), 2009, 18:420-425.
- Cao JX, Zhang QY, Cui SY, et al. Hypnotic effect of jujubosides from *Semen Zizyphi Spinosae*. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130:163-166.
- Niu CY, Wu CS, Sheng YX, et al. Identification and characterization of flavonoids from *Semen Zizyphi Spinosae* by high performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12:300-312.
- Wang LE, Bai YJ, Shi XR, et al. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from *Semen Zizyphi Spinosae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the sero-tonergic system. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90:399-403.
- Han BH, Park MH. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosus*. *Arch. Pharmacol Res*, 1987, 10:203-207.
- Han BH, Park MH, Han YN. Cyclic peptide and peptide alkaloids from seeds of *Zizyphus vulgaris*. *Phytochemistry*, 1990, 29:3315-3319.
- Wang YD, Prest H. Accurate mass measurement on real chromatographic time scale with a single quadrupole mass spec-

trometer. *Chromatography*, 2006, 27:135-140.

- Gu M, Wang YD, Zhao XG, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20:764-770.
- Wang YN (王亚男), Wang CH (汪聪慧), Li WJ (李卫建). A new technology for accurate identify pesticide residues—Massworks. *J Agric Sci Tech China* (中国农业科技导报), 2009, 11(S1):39-42.
- Ho HP, Lee RJ, Chen CY, et al. Identification of new minor metabolites of penicillin G in human serum by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(1):25-32.
- Liu K, Ma B, Wang YD, et al. A new software method for accurate mass measurements of drugs on unit mass resolution mass spectrometer. *Acta Pharm Sin*, 2007, 42:1112-1114.
- Wang YD, Gu M. The concept of spectral accuracy for MS. *Anal Chem*, 2010, 82:7055-7062.
- Li WJ (李卫建), Yuan YR (袁有荣), Ouyang WM (欧阳伟民), et al. Application of MassWorks™ molecular recognition technology in mass spectrometry. *Mod Instrum* (现代仪器), 2010, 16(5):11-19.
- Zhou W, Zhang YH, Xu HL, et al. Determination of elemental composition of volatile organic compounds from Chinese rose oil by spretral accuracy and mass accuracy. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25:3097-3102.
- Han BH, Park MH, Park JH. Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants. *Pure Appl Chem*, 1989, 61:443-448.
- Kind T, Fiehn O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions; Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *Bmc Bioinform*, 2006, 7(6):1-10.
- Erve JC, Gu M, Wang YD, et al. Spectral accuracy of molecular ions in an LTQ/Orbitrap mass spectrometer and implications for elemental composition determination. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009, 20:2058-2069.