

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱定性分析油炸马钱子中化学成分

秦伟瀚, 阳勇*, 郭延垒, 王云红, 李卿, 冉继春(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 应用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对油炸马钱子提取物的主要化学成分进行定性研究。方法 采用 Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B) 溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.2 mL · min⁻¹, 柱温为 35 °C; 质谱分析采用信息关联模式(IDA) 正、负离子分别采集。结果 本实验共鉴定出油炸马钱子提取物中 31 个化学成分, 其中有 8 个为在马钱子中首次报道, 并在正、负离子模式下发现 4 个新化合物; 主要成分包括生物碱、有机酸、糖苷等。结论 该方法精确、可靠、高效, 适用于油炸马钱子成分的快速鉴定, 为马钱子炮制品的开发利用以及阐明其药效物质基础提供参考。

关键词: 马钱子; 油炸法; 四级杆-飞行时间质谱; 定性分析; 裂解规律

doi:10.11669/cpj.2019.02.009 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)02-0123-09

Qualitative Analysis of Fried Semen Strychni Seeds by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-combined with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry

QIN Wei-han, YANG Yong*, GUO Yan-lei, WANG Yun-hong, LI Qing, RAN Ji-chun(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To identify the main chemical constituents in the extract of deep fried strychnas by UPLC-Q-TOF-MS. **METHODS** Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column was used. Gradient elution was conducted with mobile phase consisting of 0.1% formic acid solution (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. The column temperature was maintained at 35 °C. MS analysis was based on information associated mode (IDA) that positive and negative ions were respectively collected. **RESULTS** A total of 31 compounds were identified in deep fried strychnas, of which eight had not been reported as Semen Strychni, and four new compounds were found in the positive and negative ion mode. The main chemical constituents included alkaloids, organic acids, glycosides, etc. **CONCLUSION** The method is accurate, reliable, and efficient, and is suitable for rapid identification of the ingredients in deep fried strychnas, which provides a reference for the development and utilization of processed products of Semen Strychni and clarification of its efficacy and material basis.

KEY WORDS: Semen Strychni; frying method; quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF-MS); qualitative analysis; cleavage law

马钱子(又名番木鳖)是常用中药材,为马钱科植物马钱(*Strychnos vomica* L.)及云南长籽马钱(*Strychnos wallichiana* Steupet DC.)的干燥成熟种子,主要分布于我国福建、广东、云南等省区^[1-2]。具有通络止痛、消肿散结之功效,临床主要用于治疗风湿顽痹、麻木瘫痪、跌打损伤等病症^[3]。马钱子炮制方法众多,包括:砂烫、油炸、醋炙、麻黄炙等,其中砂烫和油炸是主要常用炮制方法^[4-5]。明《鲁府秘方》中记载:“用牛油炸黄色,炒干。”是油炸马钱子的始源;清代《良朋汇集》中“用香油炸待浮起,取出,乘热去皮为末”是麻油炸马钱子的最早记载;清

代之后均使用麻油炮制^[6-7]。油炸炮制主要是通过高温,降低马钱子碱、土的宁的含量,从而降低马钱子的毒性,增大其临床应用范围^[8],据文献^[9-10]报道,油炸马钱的小鼠半数致死量(LD₅₀)要高于砂烫和生品,证明油炸炮制在降低毒性作用上更具优势,近年来对油炸马钱子化学成分报道较少^[11-13],物质基础尚不完全明确。

本实验以油炸马钱子为研究对象,采用 UPLC-Q-TOF-MS 对其化学成分进行快速定性鉴别;该研究结果为阐明马钱子炮制品物质基础提供科学参考,有利于马钱子的深入开发和利用。

基金项目: 重庆市科学技术委员会项目资助(estejxjl-jbky120009);重庆市卫生计生委中医药科技项目资助(ZY201702142)

作者简介: 秦伟瀚,男,副研究员 研究方向:中药新药开发及质量评价 * **通讯作者:** 阳勇,男,副研究员 研究方向:新药开发及代谢组学 Tel:(023)89029061 E-mail:yangychem@126.com

1 材料

LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本,岛津公司);二元高压泵、自动进样器、柱温箱;Triple TOF™ 4600 型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国,AB公司);Analyst 1.6 工作站、PeakView1.2.0.3 数据处理软件;JY92-II D 型超声波细胞粉碎机(中国,宁波新艺超声设备有限公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国,赛多利斯公司)。

乙腈、水、甲酸为色谱纯;甲醇为分析纯;芝麻油(重庆市巢宁麻油厂)。

马钱子样品购于重庆中药材市场(产地:云南省),经重庆市中药研究院生药研究所刘翔副研究员鉴定为马钱科植物云南马钱(*Strychnos wallichiana* Steup et DC.)的干燥成熟种子;马钱子碱对照品(批号:10284-201611,98%),土的宁对照品(批号:10408-201611,98%)(南昌贝塔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈溶液;梯度程序:0 ~ 2.0 min, 5% B; 2.0 ~ 10.0 min, 5% ~ 60% B; 10.0 ~ 16.0 min, 60% ~ 80% B; 16.0 ~ 20.0 min, 80% ~ 90% B; 20.0 ~ 22.0 min, 90% ~ 5% B; 22.0 ~ 25.0 min, 5% B;流速:0.2 mL · min⁻¹,柱温:35 °C,进样量:2 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正/负离子模式分别采集,喷雾电压(IS):+5 500 V、-4 500 V;雾化气压力(GS1):0.38 MPa;气帘气压力(CUR):0.14 MPa;辅助气压力(GS2):0.34 MPa;离子源温度(TEMP):600 °C;簇裂解电压(DP):65 V;碰撞能量(CE):45 V;碰撞能量滚动区间(CES):15 V;检测模式为 IDA(信息关联采集模式),多重质量亏损(MMDF)和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件,满足该条件优先进行二级扫描。

2.3 油炸马钱子制备

取市售麻油 200 mL,倒入铁锅中,用温程 400 °C 温度计测温,天然气炉上加热至 230 °C 时投入马钱子,炸至老黄色为度,取出沥尽油,晾冷即得。

2.4 样品溶液制备

将油炸马钱子粉碎后过 100 目筛,取粉末 0.2 g,精密称定,置 5 mL 试管中,精密加入体积分数

80% 甲醇 2 mL,称定重量,于超声波细胞破碎仪中超声处理(功率:600 W)40 min,取出,放冷,再次称定重量,用体积分数 80% 甲醇补足缺失重量,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.5 标准溶液制备

取适量马钱子碱、土的宁对照品于 10 mL 量瓶中,加入色谱甲醇溶解定容至刻度,制成质量浓度为 1.0 mg · mL⁻¹ 的标准溶液,备用。

3 结果

3.1 油炸马钱子化学成分定性分析

采用“2.1”、“2.2”项下色谱、质谱条件,获得正、负离子模式全扫描总离子流图(TIC)见图 1。将该数据导入 PeakView 软件,获得满足质量误差小于 10 ppm、同位素分布正确且含有二级碎片的目标化合物,结合 PeakView 软件 Formula Finder 等功能、在线数据库(Human Metabolome Database、Pub Chem、Chemical Book 等)及二级碎片裂解规律,从油炸马钱子醇提样品中共找到 4 类共 31 个化合物(表 1),其中 8 个成分为马钱子相关文献首次报道,并在正、负离子模式下找到 4 种新化合物。

3.1.1 生物碱类 马钱子中生物碱报道较多,是其主要的功效成分和毒性成分。表 1 结果表明,在正离子模式下,保留时间为 5.70 min,获得 m/z 353.183 87 $[M+H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 335.173 1 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 C₂₁H₂₄N₂O₃,推测该化合物为异伪番木鳖碱,二级碎片离子为 $[M+H-H_2O]^+$;保留时间为 5.73 min,获得 m/z 395.194 56 $[M+H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 379.163 8 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 C₂₃H₂₆N₂O₄,推测该化合物为马钱子碱,二级碎片离子为 $[M+H-CH_4]^+$;保留时间为 5.62 min,获得 m/z 335.173 68 $[M+H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 307.143 3 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 C₂₁H₂₂N₂O₂,推测该化合物为土的宁,二级碎片离子为 $[M+H-C_2H_4]^+$,该化合物的提取离子图、二级质谱图和裂解规律图分碱见图 2~4;保留时间为 5.87 min,获得 m/z 411.189 45 $[M+H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 394.186 5、379.163 2 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 C₂₃H₂₆N₂O₅,推测该化合物为马钱子碱 N-氧化物,二级碎片离子为 $[M+H-OH]^+$ 、 $[M+H-OH-CH_3]^+$;保留时间为 5.94 min,获得 m/z 351.168 65 $[M+H]^+$ 的质谱

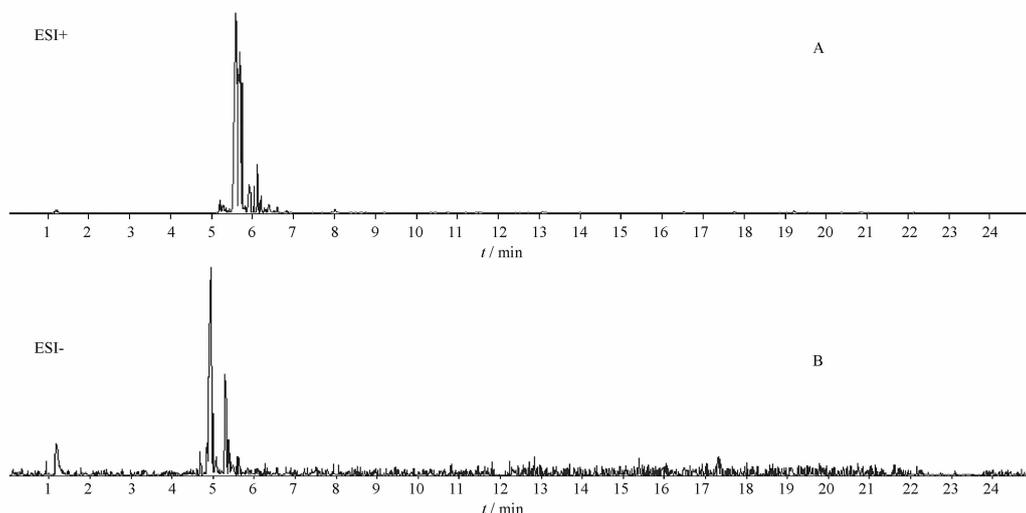


图1 油炸马钱子总离子流图

A - 正离子模式; B - 负离子模式

Fig. 1 UPLC-Q/TOF total ion chromatograms of deep fried strychnas

A - positive ion mode; B - negative ion mode

表1 油炸马钱子定性鉴定结果

Tab. 1 Analysis results for deep fried strychnas by UPLC-Q/TOF

t_R /min	Ion mode	Mass charge ratio(m/z)			Deviation	Formula	Identification results
		Measured mass	Calculated mass	MS/MS fragment ion			
1.20	[M - H] ⁻	549.166 19	549.167 24	503.162 0,341.107 5	-1.9	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₈	M4 ²⁾
1.20	[M - H] ⁻	387.112 83	387.114 41	341.109 0,179.056 0,161.045 2	-4.1	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	7-(α -D-Glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid ¹⁾
3.41	[M - H] ⁻	125.023 95	125.024 42	107.013 9	-3.7	C ₆ H ₆ O ₃	Matol
4.01	[M - H] ⁻	169.013 34	169.014 25	125.023 1	-5.3	C ₇ H ₆ O ₅	Gallic acid
4.70	[M + H] ⁺	268.103 76	268.104 03	136.060 7,119.034 8	-1	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	Adenosine
4.70	[M - H] ⁻	193.049 3	193.050 63	175.038 8	-6.9	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ferulic acid
4.83	[M - H] ⁻	375.127 19	375.129 67	213.076 2	-6.6	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	Loganic acid
4.95	[M - H] ⁻	315.070 7	315.072 16	153.019 3,109.030 3	-4.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	b-D-Glucopyranose,1-(2,5-dihydroxybenzoate) ¹⁾
5.05	[M - H] ⁻	299.111 79	299.113 63	137.05 7,119.034 1	-6.1	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	Salidroside
5.09	[M - H] ⁻	421.134 52	421.135 15	375.126 9,213.077 1,169.086 9	-1.5	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₂	M3 ²⁾
5.32	[M - H] ⁻	137.024 08	137.024 42	92.027	-2.4	C ₇ H ₆ O ₃	Hydroxybenzoic acid
5.41	[M - H] ⁻	109.029 47	109.029 5	91.019 5	-0.3	C ₆ H ₆ O ₂	Catechol
5.53	[M + H] ⁺	355.102 31	355.102 36	163.038 4,145.027 5	-0.2	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid
5.53	[M - H] ⁻	153.018 33	153.019 33	125.023 7	-6.6	C ₇ H ₆ O ₄	Protocatechuic acid
5.55	[M + H] ⁺	349.191 01	349.191 05	321.159 2,264.101 5,222.090 8	-0.1	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₂	Methyl strychnine ¹⁾
5.55	[M + H] ⁺	409.211 98	409.212 18	381.180 3,324.122 2,282.110 9	-0.5	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₄	M2 ²⁾
5.70	[M + H] ⁺	353.183 87	353.185 97	335.173 1	-5.9	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	Isopseudostrychnine
5.70	[M - H] ⁻	151.039 43	151.040 07	136.016 6,108.025 2	-4.2	C ₈ H ₈ O ₃	3',4'-Dihydroxyacetophenone ¹⁾
5.73	[M + H] ⁺	395.194 56	395.196 53	379.163 8	-5	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	Brucine
5.62	[M + H] ⁺	335.173 68	335.175 4	307.143 3	-5.1	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	Strychnine
5.74	[M + H] ⁺	425.204 86	425.207 1	368.147 3	-5.3	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	Novacine
5.87	[M + H] ⁺	411.189 45	411.191 45	394.186 5,379.163 2	-4.9	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	Brucine N-oxide
5.87	[M + H] ⁺	379.201 88	379.201 62	351.169 3,294.111 5,252.101 3	0.7	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	M1 ²⁾
5.94	[M + H] ⁺	351.168 65	351.170 32	334.166 4,333.158 4	-4.7	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	4-Hydroxystrychnine
5.96	[M + H] ⁺	365.184 08	365.185 97	308.126 5	-5.2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	Colubrine
6.16	[M + H] ⁺	381.179 28	381.180 88	364.175 9	-4.2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	2-Hydroxy-3-methoxystrychnine
6.23	[M - H] ⁻	167.033 9	167.034 98	151.002 6	-6.5	C ₈ H ₈ O ₄	Vanillic acid
6.32	[M - H] ⁻	207.064 86	207.066 28	189.053 6,162.030 7	-6.9	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	Ethyl caffeate
6.90	[M + H] ⁺	557.264 17	557.256 56	395.196 8	13.7	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O	Vomicine
7.03	[M + H] ⁺	405.142 08	405.139 14	387.136 4	7.2	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	Secoxyloganin
20.90	[M + H] ⁺	427.390 77	427.393 44	409.378 2	-6.3	C ₃₀ H ₅₀ O	Simiarenonol

注: ¹⁾ - 马钱子未曾报道成分; ²⁾ - 新化合物

Note: ¹⁾ - unreported constituents in semen strychni; ²⁾ - new compound

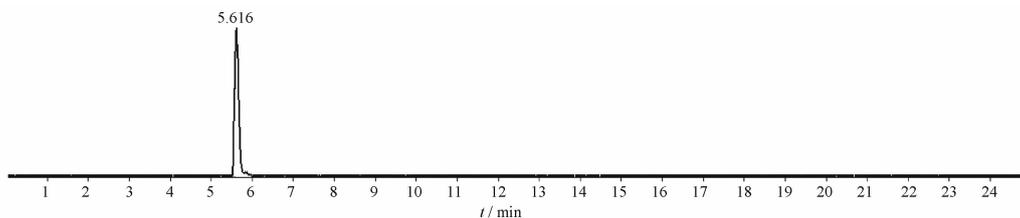


图2 士的宁提取离子流图

Fig. 2 Extraction ion and MS/MS spectrum of strychnine

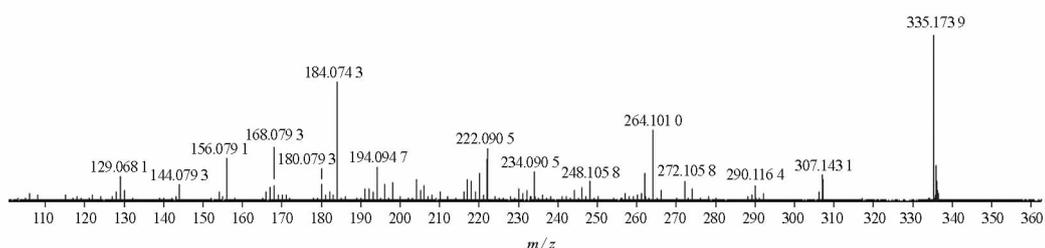


图3 士的宁二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrum of strychnine

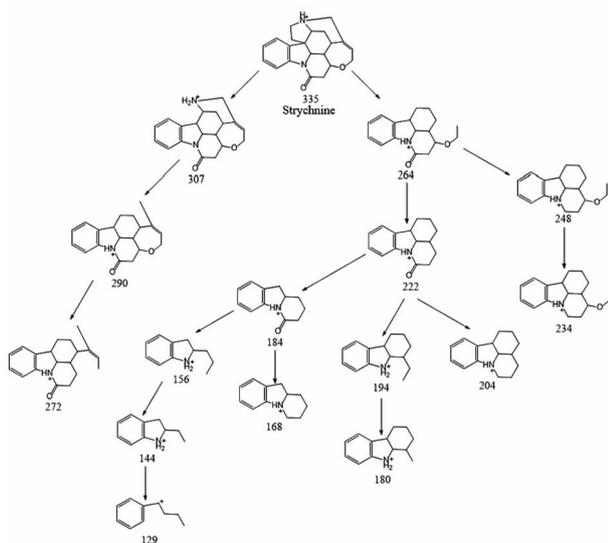


图4 士的宁裂解规律图

Fig. 4 The possible fragmentation pathway of strychnine

信号,二级质谱出现 334.166 4, 333.158 4 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{21}H_{22}N_2O_3$, 推测该化合物为 4-羟基番木鳖碱,二级碎片离子为 $[M + H - OH]^+$ 、 $[M + H - H_2O]^+$; 保留时间为 5.96 min, 获得 m/z 365.184 08 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 308.1265 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{22}H_{24}N_2O_3$, 推测该化合物为可鲁勃林,二级碎片离子为 $[M + H - C_3H_7N]^+$; 保留时间为 6.16 min, 获得 m/z 381.179 28 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 364.175 9 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为

$C_{22}H_{24}N_2O_4$, 推测该化合物为 2-羟基-3-甲氧基番木鳖碱,二级碎片离子为 $[M + H - OH]^+$; 保留时间为 6.90 min, 获得 m/z 557.264 17 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 395.196 8 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{21}H_{24}N_2O$, 推测该化合物为番木鳖次碱,二级碎片离子为 $[M + H - C_6H_{10}O_5]^+$; 保留时间为 5.74 min, 获得 m/z 425.204 86 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 368.147 3 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{24}H_{28}N_2O_5$, 推测该化合物为诺法生,二级碎片离子为 $[M + H - C_3H_7N]^+$; 保留时间为 4.70 min, 获得 m/z 268.103 76 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 136.060 7、119.034 8 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$, 推测该化合物为腺苷,二级碎片离子为 $[M + H - C_5H_8O_4]^+$ 、 $[M + H - C_5H_8O_4 - NH_3]^+$; 保留时间为 5.55 min, 获得 m/z 349.191 01 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 321.159 2、264.101 5、222.090 8 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{22}H_{24}N_2O_2$, 推测该化合物为甲基士的宁,二级碎片离子为 $[M + H - C_2H_4]^+$ 、 $[M + H - C_2H_4 - C_3H_7N]^+$ 、 $[M + H - C_2H_4 - C_3H_7N - C_2H_2O]^+$ 。

3.1.2 有机酸类 在正离子模式下,仅找到一种有机酸类化合物,保留时间为 5.53 min, 获得 m/z 355.102 31 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现 163.038 4、145.027 5 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 推测该化合物为绿原酸,二级碎

片离子为 $[M + H - C_7H_{12}O_6]^+$ 、 $[M + H - C_7H_{12}O_6 - H_2O]^+$ 。

在负离子模式下共找到5种有机酸类物质,保留时间为4.01 min 获得 m/z 169.013 34 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现125.023 1 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_7H_6O_5$,推测该化合物为没食子酸,二级碎片离子为 $[M - H - CO_2]^-$;保留时间为4.70 min 获得 m/z 193.049 3 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现175.038 8 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$,推测该化合物为阿魏酸,二级碎片离子为 $[M - H - H_2O]^-$;保留时间为5.32 min 获得 m/z 137.024 08 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现92.027 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_7H_6O_3$,推测该化合物为水杨酸,二级碎片离子为 $[M - H - COOH]^-$;保留时间为5.53 min 获得 m/z 153.018 33 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现125.023 7 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_7H_6O_4$,推测该化合物为原儿茶酸,二级碎片离子为 $[M - H - CO]^-$;保留时间为6.23 min 获得 m/z 167.033 9 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现151.002 6 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_8H_8O_4$,推测该化合物为香草酸,二级碎片离子为 $[M - H - CH_4]^-$ 。

3.1.3 糖苷类 糖苷类物质也是马钱子重要的功效成分。在正离子模式下,仅找到一种糖苷类化合物。保留时间为7.03 min,获得 m/z 405.142 08 $[M + H]^+$ 的质谱信号,二级质谱出现387.136 4 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$,推测该化合物为断氧化马钱子苷,二级碎片离子为 $[M + H - H_2O]^+$ 。

在负离子模式下,找到4种糖苷类成分。保留时间为1.20 min 获得 m/z 387.112 83 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现341.109 0、179.056 0、161.045 2 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{13}H_{24}O_{13}$,推测该化合物为7-(α -D-glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid,二级碎片离子为 $[M - H - HCOOH]^-$ 、 $[M - H - HCOOH - C_6H_{10}O_5]^-$ 、 $[M - H - HCOOH - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^-$;保留时间为4.83 min 获得 m/z 375.127 19 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现213.076 2 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{24}O_{10}$,推测该化合物为番木鳖苷酸,二级碎片离子为 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$;保留时间为4.95 min 获得 m/z 315.070 70 $[M - H]^-$ 的质

谱信号,二级质谱出现153.019 3、109.030 3 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{13}H_{16}O_9$,推测该化合物为b-D-glucopyranose, 1-(2,5-dihydroxybenzoate),二级碎片离子为 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$ 、 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - CO_2]^-$;保留时间为5.05 min 获得 m/z 299.111 79 $[M - H]^-$ 的质谱信号,二级质谱出现137.057 0、119.034 1 质谱峰,根据数据库匹配出分子式为 $C_{14}H_{20}O_7$,推测该化合物为毛柳苷,二级碎片离子为 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$ 、 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^-$ 。

3.1.4 其他 结合数据库、相关文献及二级碎片,本实验从油炸马钱子提取物中推测可能还含有5,6-羊齿烯醇、3',4'-dihydroxyacetophenone、咖啡酸乙酯、儿茶酚、麦芽酚。

3.2 新化合物结构推导及裂解规律分析

3.2.1 新化合物 M1、M2 结构推导过程 由349.190 2、379.201 1、409.211 3 3个母离子的二级质谱重叠图(图5)可知,所有母离子及子离子的相互差值均小于30.01,说明该3个离子具有相似的化学结构,由PeakView软件的Mass Calculators功能计算出 CH_2O 的精确质量为30.010 02,与脱去碎片(30.01)的差值均小于0.01,表明379.201 1、409.211 3离子均可能具有甲氧基结构;通过软件分析、在线谱库检索等方法未发现化合物能与379.201 1、409.211 3相匹配,表明该两个离子应为新化合物。

对 m/z 为349.190 2离子的裂解规律进行分析,由二级质谱图可知该离子连续脱去28.031 6、57.057 7、42.010 7、38.015 7、27.995 1生成321.159 0、264.101 2、222.090 5、184.074 6、156.079 7的碎片离子,经软件计算出 C_2H_4 、 C_3H_7N 、 C_2H_2O 、 C_3H_2 、CO的精确质量数分别为28.030 75、57.057 30、42.010 02、38.015 10、27.994 37,与上述脱去碎片的差值均小于0.01,通过在线数据库(ChemSpider、Metlin、HMDB)进行匹配,仅找到甲基土的宁($C_{22}H_{24}N_2O_2$)符合上述裂解规律,该化合物的裂解规律图见图6。

由重叠图(图5)可知,349.190 2离子的156碎片与另外两个母离子的186、216碎片均有30.01的差值,表明甲氧基最有可能是连在156碎片的苯环上,据此即可推测M1(379.201 1)、M2(409.211 3)的分子式分别为 $C_{23}H_{26}N_2O_3$ 及 $C_{24}H_{28}N_2O_4$,将分子式导入PeakView软件对离子进行提取,理论值与实际值的误差均小于0.1 ppm, M1、M2的裂解规律图

见图7、8。

3.2.2 新化合物 M3 结构推导过程 由二级质谱图(图9)可知, m/z 为421.1137的母离子连续脱掉46.0041、162.0525、43.9902的碎片生成375.1296、213.0771、169.0869的离子,由PeakView软件的Mass Calculators功能计算出HCOOH、C₆H₁₀O₅、CO₂

的精确分子质量为46.00493、162.05228、43.98928,与上述脱去碎片差值均小于0.01,表明M3可能含有羧基、葡萄糖基结构;通过软件对169.0869离子的分子组成元素进行计算,发现C₉H₁₃O₃(169.08592)与之最为接近,将各个碎片片段进行加和得到M3的分子式为C₁₇H₂₆O₁₂,通过在线数据

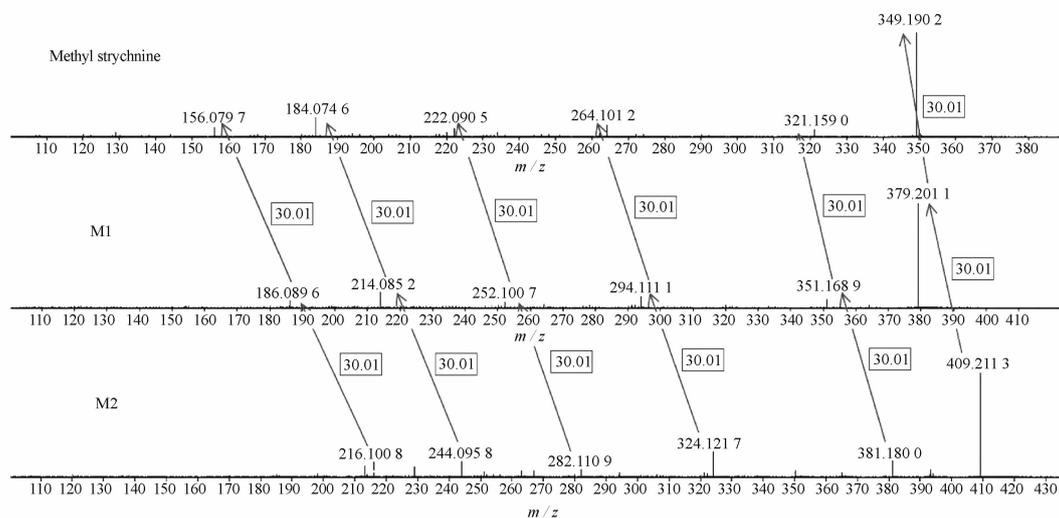


图5 新化合物 M1、M2 和甲基士的宁的二级质谱重叠图

Fig. 5 MS/MS spectra overlapped diagram of new compounds M1, M2 and methylstrychnine

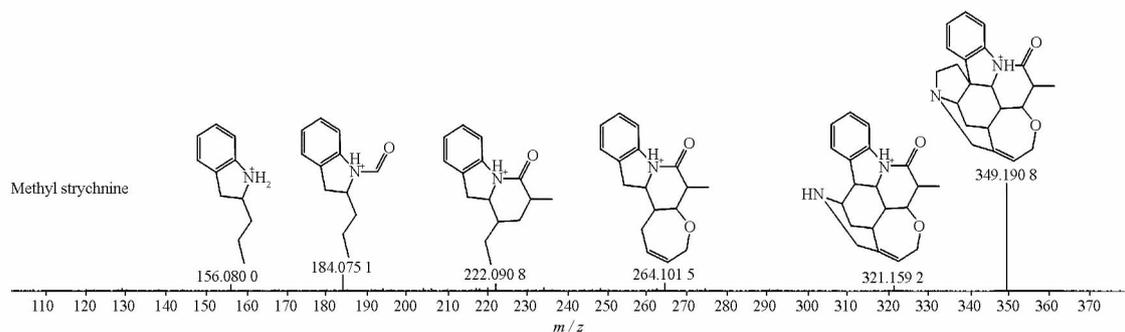


图6 甲基士的宁裂解规律图

Fig. 6 The possible fragmentation pathway of methyl strychnine

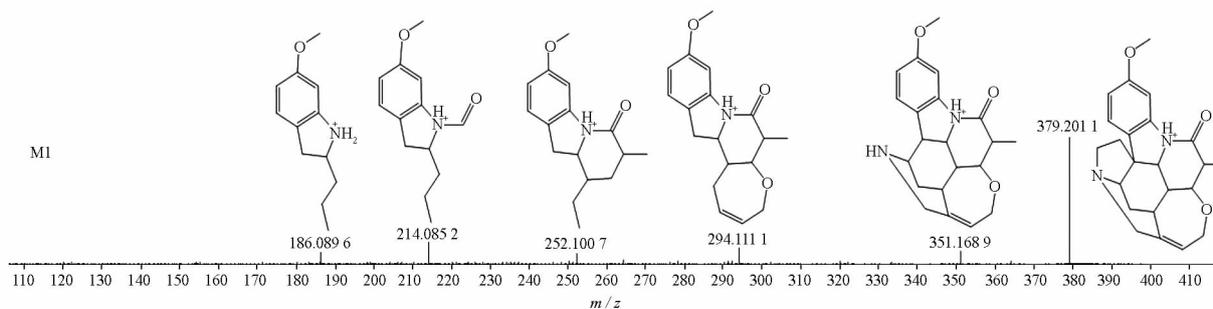


图7 M1 裂解规律图

Fig. 7 The possible fragmentation pathway of M1

库 (ChemSpider、Metlin、HMDB) 进行匹配, 仅找到野芝麻新苷 (lamiide) 的结构与之最为接近, 但野芝麻新苷含有甲酯结构, 而 M3 最先脱掉羧基, 所以推测甲基在分子环状结构上, M3 的裂解规律见图 10。

3.2.3 新化合物 M4 结构推导过程 由 387.114 5、549.167 5 两个母离子的二级质谱重叠图 (图 11) 可知, 质荷比小于等于 341.10 所有碎片离子的相应差值均小于 0.01, 表明两个化合物 341 碎片结构相似; 387.114 5 离子脱去 46.005 5 的碎片生成 341.109 0 的离子, 而 549.167 5 离子连续脱去 46.005 5、162.054 5 后生成 341.107 5 的离子, 采用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 HCOOH、C₆H₁₀O₅ 的精确质量分别为 46.004 93、162.052 28, 与脱去碎片的差值均小于 0.01, 表明化

合物 M4 脱氢后生成的 549 离子要比 387 离子多一个葡萄糖基结构; 通过软件分析、在线谱库检索等方法未发现能与 549.167 5 (M4) 相匹配的化合物, 表明该离子应为新化合物。

对 m/z 为 387.114 5 离子的裂解规律进行分析, 由二级质谱图可知该离子连续脱去 46.005 5、162.053 0、60.021 3、30.010 1 生成 341.109 0、179.056 0、119.034 7、89.024 6 的碎片离子, 经软件计算出 CH₂O₂、C₆H₁₀O₅、C₂H₄O₂、CH₂O 的精确质量数分别为 46.004 93、162.052 28、60.020 58、30.010 02, 与上述脱去碎片的差值均小于 0.01, 通过在线数据库 (ChemSpider、Metlin、HMDB) 进行匹配, 仅找到 7-(α -D-glucopyranosyloxy)-2, 3, 4, 5, 6-pentahydroxyheptanoic acid (C₁₃H₂₄O₁₃) 符合上述裂解规律, 该化合物的裂解规律图见图 12。

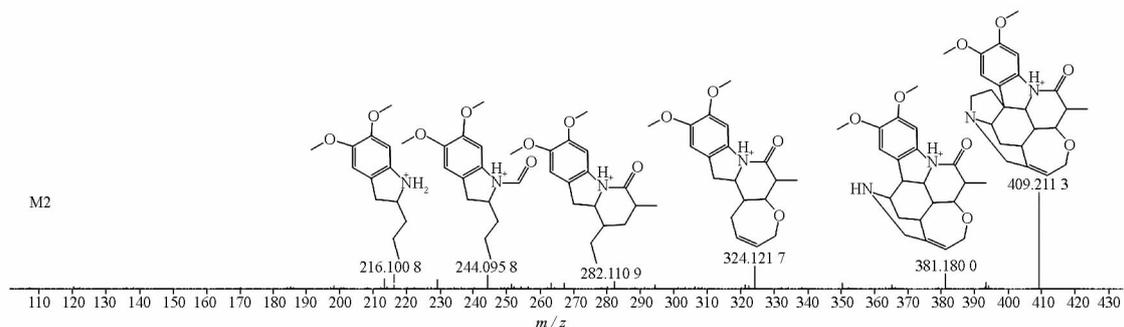


图 8 M2 裂解规律图

Fig. 8 The possible fragmentation pathway of M2

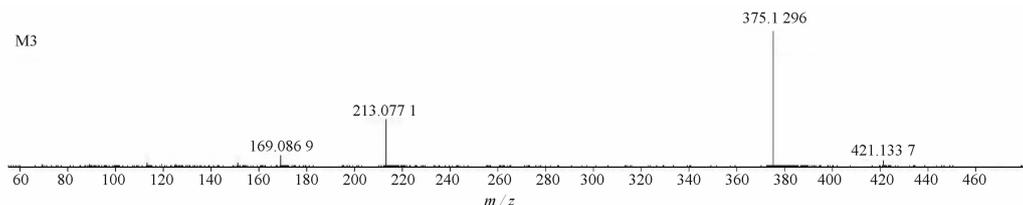


图 9 M3 二级质谱图

Fig. 9 MS/MS spectrum of M3

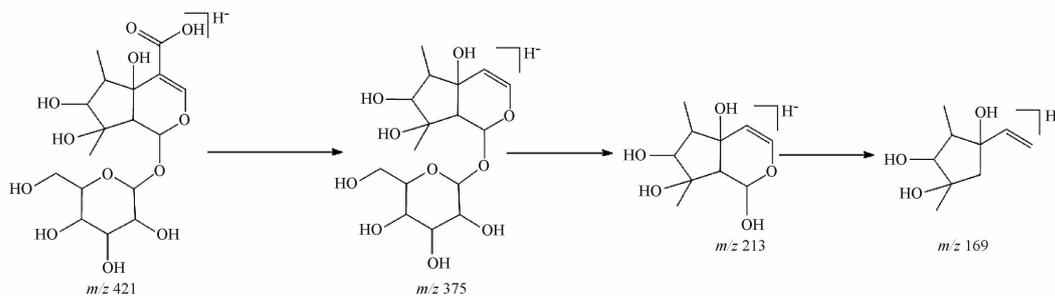


图 10 M3 裂解规律图

Fig. 10 The possible fragmentation pathway of M3

由重叠图 11 可知 549 离子仅比 387 离子多一个葡萄糖苷(162.05)结构,且 549 离子先后连续断开两个相同糖苷键,推测两个糖苷应该会连在一起,

经过计算 M4 的分子式应为 $C_{19}H_{34}O_{18}$,将分子式导入 PeakView 软件对离子进行提取,理论值与实际值的误差为 1.9 ppm,M4 的裂解规律图见图 13。

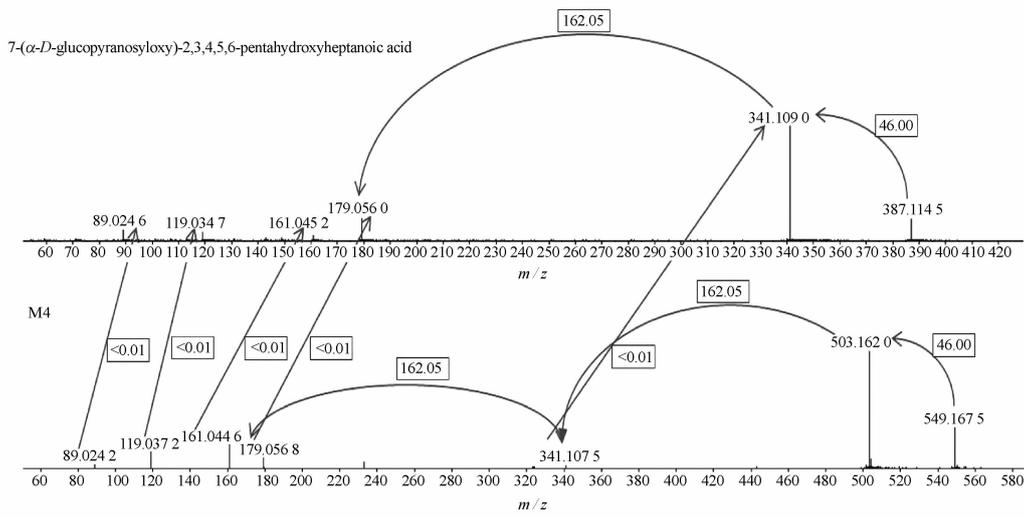


图 11 7-(α -D-Glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid 和 M4 的二级质谱重叠图

Fig. 11 MS/MS spectra overlapped diagram of new compounds M4 and 7-(α -D-glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid

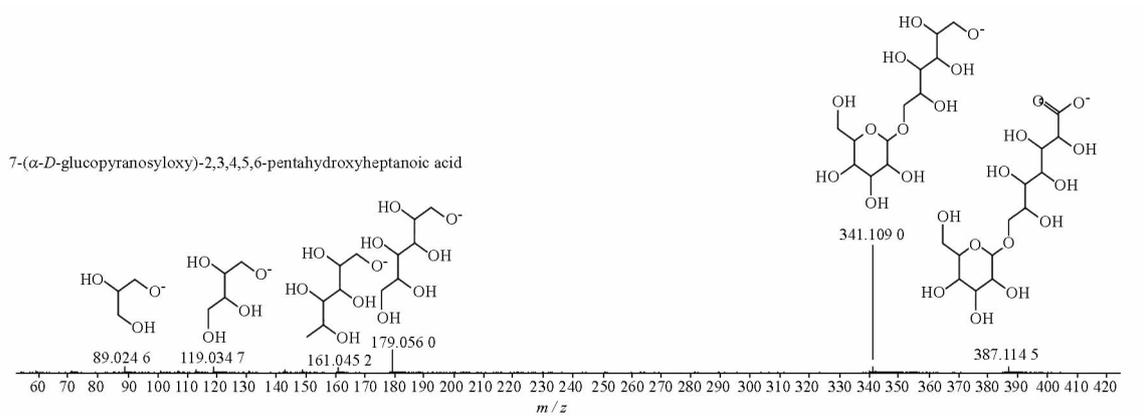


图 12 7-(α -D-Glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid 裂解规律图

Fig. 12 The possible fragmentation pathway of 7-(α -D-glucopyranosyloxy)-2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid

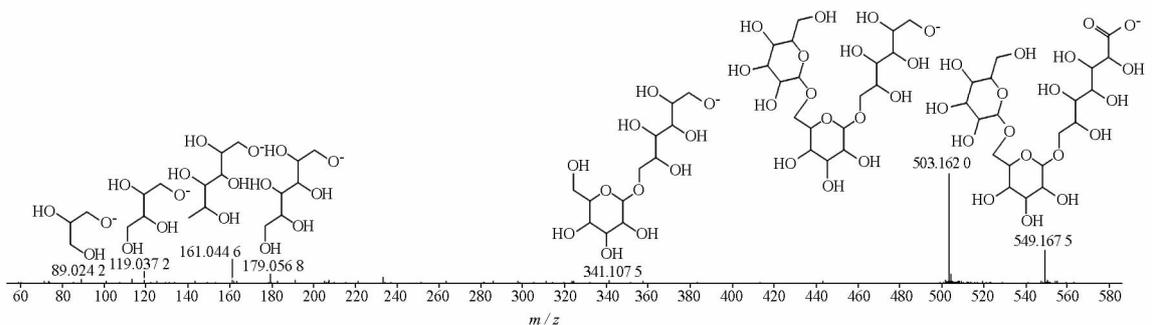


图 13 M4 裂解规律图

Fig. 13 The possible fragmentation pathway of M4

4 结 论

本实验采用信息关联模式(IDA)下的正、负离子分别采集,正离子模式下质谱响应及峰数明显要高于负离子,正、负离子分别采集在最大程度上提高了检测物质的灵敏度,有助于获得更多化合物信息^[14]。马钱子生品有大毒,生物碱既是其主要有效成分,也是毒性来源;其中马钱子碱、土的宁含量占总生物碱80%以上,但因其毒性较大,通常需经炮制减毒后才可用于临床。以往研究表明,马钱子碱较土的宁毒性更大且疗效更差,熔点比土的宁约低100℃,说明加热炮制可有效降低马钱子碱含量^[15-16]。此外,高温油炸过程中可除去马钱子表面绒毛,增强马钱子脆性,利于临床制剂。因此油炸法作为马钱子的经典炮制方法而被大量使用和报道,但有关油炸马钱子的物质基础尚未完全明确,从本实验中新找到7种成分即可佐证。本实验首次采用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)分析油炸马钱子主要化学成分,并通过PeakView软件的Formula Finder、Mass Calculators、Fragment Matching等功能结合在线数据库(ChemSpider、human metabolome database、Metlin)及二级碎片裂解规律共鉴定出31个化合物,其中生物碱成分就达11个,马钱子碱、土的宁、马钱子碱氮氧化物等作为已知成分在正离子模式下被找到,但土的宁氮氧化物却未被质谱检测出来,这可能与吲哚类生物碱的环状结构在ESI源中响应较小有关,本实验还新发现了2个糖苷和2个生物碱成分,并对其分子式及结构推导过程进行了详细描述。该实验结果为马钱子炮制减毒机制的阐明,及其炮制品的深入开发和利用提供科学依据。

REFERENCES

[1] SHI L, LI Y J, PEI L, *et al.* Herbal textual research on *Strychnos nux-vomica*[J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2017, 31(6): 6-10.

- [2] GUO Y Y, MA W B, XIAN H B, *et al.* Changes of toxic substance in different phase of compatibility decoction *Strychni Semen* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* based on UPLC-MS technique[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48(23): 4880-4884.
- [3] YANG S L, YANG Y. A study on the attenuation method for toxicity of *Maqianzi*[J]. *Clin Res Chin Med*(中医临床研究), 2017, 9(1): 43-44.
- [4] WANG M Z, QI W Q. Effect of processing techniques on strychnine content in *Nux Vomica* with different origins[J]. *J Tradit Chin Med*(中医学报), 2017, 32(7): 1236-1238.
- [5] WANG W. Study on the quality of the processing of *Semen Strychni*[J]. *Inner Mongol J Tradit Chin Med*(内蒙古中医药), 2017, 36(3): 98-99.
- [6] WU F, LIA R, GUO J W. Processing methods of historical development of *Semen Strychni*[J]. *Pharm Today*(今日药学), 2017, 27(5): 355-357.
- [7] LIU Y J, WU B Y, XUY, *et al.* Herbal textual research and processing history for *Maqianzi*[J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*(中药与临床), 2014, 5(2): 90-92.
- [8] WANG D D, LI J S, CAI B C. Content change research of strychnine N-oxide and brucine N-oxide in *maqianzi* processing drugs circa[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2009, 27(2): 435-436.
- [9] GONG Q F, ZHOU D G, ZHANG D F, *et al.* Experimental study on acute toxicity of *Semen Strychni* and its processed products[J]. *Coll Tradit Chin Med*(江西中医学院学报), 2007, 19(3): 47-48.
- [10] WU X J, MA F S, ZHEN G L, *et al.* Toxicity research progress on indole alkaloids of *Strychni Semen*[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2016, 32(6): 231-235.
- [11] SUN L R, YUAN C H, LI X W, *et al.* Alkaloid constituents from frying seeds of *Struchnosnux-vomica*[J]. *J Honghe Univ*(红河学院学报), 2011, 9(4): 5-8.
- [12] CHATTERJEE I, CHAKRAVARTY A K, GOMES A, *et al.* Antisnake venom activity of ethanolic seed extract of *Strychnos nux vomica* Linn[J]. *Indian J Exp Biol*, 2004, 42(5): 468-475.
- [13] JONVILLE M C, DIVE G, ANGENOT L, *et al.* Dimerichisindole alkaloids from the stem bark of *Strychnosnux-vomica* L[J]. *Phytochemistry*, 2013, 87(3): 157-163.
- [14] ZHAO H, YAN Y, ZHOU L S, *et al.* Identification of chemical constituents in *Magnoliae Officinalis Cortex* by UFLC-Triple TOF-MS/MS[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2017, 52(20): 1824-1831.
- [15] LIU J, ZHANG H Z. Research survey of attenuation synergy of *Nux Vomica*[J]. *J Pract Tradit Chin Int Med*(实用中医内科杂志), 2015, 29(6): 159-163.
- [16] LV S W, MA W B, XIAO H B, *et al.* Research progress on toxic mechanism of *Strychnus Strychni* and its combination with licorice in reducing toxicity[J]. *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol*(河北中医药学报), 2018, 33(2): 59-64.

(收稿日期:2018-07-15)