

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS及GNPS技术的 炮附片二萜类生物碱成分*

范倩, 陈雪冰, 汪玉梅, 荣莉, 张翠仙

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 炮附片(PAC)是一种具有强心、抗炎和抗风湿性关节炎等药理活性的中药,二萜类生物碱成分为PAC的主要活性成分。为全面分析PAC的二萜类生物碱成分并挖掘其潜在的新成分,采用超高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)结合GNPS(global natural products social molecular networking)策略,对PAC的成分进行快速表征,并根据GNPS分子网络中每个簇的特征发现未知或痕量的天然产物,挖掘其新成分。结果共鉴定了123个化合物,双酯型二萜类生物碱(DDAs)21个,长链脂型二萜类生物碱(Lipo-As)11个,单酯型二萜类生物碱(MDAs)43个,无酯型二萜类生物碱(ADAs)47个,多酯型二萜类生物碱(PDAs)1个,其中包含34个潜在的新生物碱。该研究采用了一种基于GNPS分子网络的筛选方法,显著提高了发现和鉴定痕量新型天然产物的效率,扩展了对PAC的化学物质基础的理解。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS/MS; 炮附片; GNPS分子网络; 二萜类生物碱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2021) 03-0030-15

Diterpenoid alkaloids of the processed products of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and GNPS

FAN Qian, CHENG Xuebing, WANG Yumei, RONG Li, ZHANG Cuixian

School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: The processed product of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (PAC) is a traditional Chinese medicine with cardiac, anti-inflammatory, and rheumatoid arthritis activities. The diterpenoid alkaloids are the main active ingredients of PAC. In order to comprehensively analyze the composition of diterpenoid alkaloids in PAC and explore its potential and new compounds, this study used ultra-high-performance liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) coupled with a GNPS (global natural products social molecular networking) strategy to quickly characterize the compositions of PAC. And the GNPS excavated new molecular weight to discover the unknown or trace natural products based on the characteristics of each cluster. A total of 123 compounds were characterized, including 21 diester diterpenoid alkaloids (DDAs), 11 lipo alkaloids (Lipo-As), 43 monoester diterpenoid alkaloids (MDAs), 47 aminoalcohol-diterpenoid alkaloids (ADAs), 1 polyester diterpenoid alkaloid (PDAs). 34 of them were discovered for the first time. This study utilized a

* 收稿日期: 2020-01-20

录用日期: 2020-03-31

网络首发日期: 2020-07-10

基金项目: 广州中医药大学“高水平大学建设”项目(81); 广州中医药大学“薪火计划”项目(XH20170110)

作者简介: 范倩(1995年生),女;研究方向: 中药及复方药效物质基础研究; E-mail: 1157795201@qq.com

通信作者: 张翠仙(1975年生),女;研究方向: 中药及其复方和海洋生物的药效物质基础和质量控制;

E-mail: zhangcuixian@aliyun.com

GNPS-based screening approach with a significant increase of efficiency for the discovery and identification of trace novel natural products. The results have expanded our understanding of the chemical material of PAC.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; the processed products of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; global natural products social molecular networking (GNPS); diterpenoid alkaloids

附子 (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*) 为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 子根的加工品, 具有回阳救逆、补火助阳, 散寒除湿之功效等^[1]。临床用于治疗阴盛格阳, 大汗亡阳, 风寒湿痹等疾病。文献研究表明^[2-4] 附子的化学成分主要为生物碱、有机酸类、脂肪酸酯和微量元素等, 其中生物碱为主要活性成分, 具有强心、抗炎和抗风湿性关节炎等药理作用。附子生物碱主要包括双酯型二萜类生物碱、长链脂型二萜类生物碱、单酯型二萜类生物碱、无酯型二萜类生物碱和其他类型生物碱。其中双酯型和单酯型二萜类生物碱也为其毒性成分。由于附子属于大毒药材, 临床常用其炮制品, 炮制过程中双酯型生物碱水解成单酯型生物碱, 毒性显著降低等^[5]。近年来, 将液相色谱的高效分离能力和高分辨质谱鉴定能力相结合, 广泛用于中药材成分分析与鉴定^[6]。GNPS (global natural products social molecular networking) 是一种可视化计算策略, 可以直观地观察到样品 LC-MS/MS 实验中检测到的所有分子离子以及这些分子离子之间的化学关系, 对于化合物的快速而大规模地鉴定及新颖化合物发现具有重要的作用^[7]。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 及 GNPS 技术对炮附片在线分离分析, 快速鉴定其二萜类生物碱成分, 为其药效物质基础及质量控制研究奠定基础。

1 仪器与材料

Triple-TOFTM 5600⁺型三重四级杆飞行时间质谱 (美国 AB SCIEX 公司)。超高效液相系统: LC-30AD 高效液相色谱仪、SIL-30AC 自动进样器 (日本 Shimadzu 公司); 煎煮锅 (广州文新电器有限公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 卢湘仪 DD-5M 低速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Sartorius 赛多利斯十万分之一天平 (季尔国际贸易有限公司)。

炮附片药材 (批号 YPA7H0001) 购自广州采芝林药业有限公司。炮附片, 经广州中医药大学

黄海波教授鉴定为乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根的加工品。对照品乌头碱 (aconitine, 批号 RP170421)、中乌头碱 (mesaconitine, 批号 RP170320)、次乌头碱 (hypaconitine, 批号 RP170520)、3-脱氧乌头碱 (3-deoxyaconitine, 批号 RP161108)、苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine, 批号 RP170615)、苯甲酰中乌头原碱 (benzoylmesaconine, 批号 RP170605)、苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypaconine, 批号 RP170513)、乌头原碱 (aconine, 批号 RP170517)、新乌头原碱 (mesaconine, 批号 RP170320)、次乌头原碱 (hypaconine, 批号 RP170518)、尼奥林 (neoline, 批号 RP170423)、多根乌头碱 (karacolone, 批号 RP161225)、宋果灵 (songorine, 批号 RP170402), 均购自成都麦德生科技有限公司, 13种对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司), 甲酸 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), $\varphi=95\%$ 乙醇 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACE C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 3 μm , 广州菲罗门科学仪器有限公司), 体积流量 0.4 mL/min, PDA 全波长扫描, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL 。以乙腈为流动相 A, $\varphi=0.1\%$ 甲酸水为流动相 B, 梯度洗脱: 0~5 min, 5% A; 5~65 min, 5%~25% A; 65~95 min, 25%~65% A; 95~100 min, 65%~95% A; 100~105 min, 95% A。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源 (ESI), 正离子扫描模式, 扫描范围 m/z 100~1 500, 用亮氨酸脑啡肽作校正液, 进行实时校正。正离子模式离子喷雾电压 (ISVE): +5 500 V; 涡轮喷雾温度 (TEM): 550 $^{\circ}\text{C}$; 气帘气压力 (GUR): 35 psi; 雾化气 (Gas1): 55 psi; 辅助气 (Gas2): 55 psi; 解簇电位 (DP): 100 V; 碰撞能散布 (CES): 15 eV; 离子释放延迟 (IRD): 67 V; 离子释放宽度 (IRW): 25 V 一级质谱母离子扫描范围 100~

1 500 ; IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围: 100~1 500。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品储备液的溶液 用十万分之一天平精密称取 13 种附子对照品各约 1.0 mg, 用 $\varphi=80\%$ 的甲醇溶解, 定容至 1 mL 容量瓶中, 分别精密吸取 13 种附子对照品各 0.1 mL, 定容至 50 mL 容量瓶中, 配制成质量浓度约为 0.02 mg/mL 的附子混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的配制 取炮附片药材 30.0 g, 精密称定, 加入 1 L 纯净水浸泡 30 min, 水煮 2 h 制成水煎液, 趁热用四层纱布过滤, 药渣采用此方法再煎煮一次后合并两次滤液, 离心 (4 000 r/min, 15 min), 上清滤液浓缩至约 300 mL 后加 3 倍 $\varphi=95\%$ 的乙醇沉糖, 于 4 °C 冰箱静置 24 h, 离心 (4 000 r/min, 15 min), 上清液在 50 °C 减压浓缩至粘稠状态, 氮气吹干仪吹干部分溶剂, 得稠浸膏。取浸膏适量, 用 $\varphi=80\%$ 甲醇水配制成质量浓度约为 50 mg/mL 的样品溶液, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 数据分析

2.3.1 化学数据库分析 使用 Peak View™ 软件 (版本 1.2, AB Sciex) 对炮附片中复杂的化合物进行定性鉴别。首先, 通过检索相关文献和化学数据库网站 (CNKI, Chemspider, Web of Science, PubMed, SciFinder 等), 建立了一个属于附子的化合物数据库, 包括名称、分子式和化学结构文件。然后, 将数据库导入到 Peak View™ 软件的 XIC Manager 模块对目标化合物进行峰提取和匹配。提取的参数设置如下: XIC intensity > 50 counts, S/N > 10, isotope ratio% difference < 20, mass error < 10×10^{-6} 。经计算筛选后, 软件将各化合物的实测数据与软件理论的数据进行匹配, 将匹配度大于 75% 且质谱碎片裂解过程合理的结果作为炮附片中最终鉴定出来的化合物。

2.3.2 GNPS 网络的建立 按照“2.1”项下优化的色谱及质谱条件进样, 获得正离子模式下炮附片样品及混合对照品溶液的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 二级质谱文件, 通过 MS Convert 软件转换后利用 FileZilla FTP Client 连接器导入 GNPS 平台 (<http://gnps.ucsd.edu>), 分别建立 GNPS 网络, 并与混合对照品和谱库中的数据进行匹配; 数据分析在 Cytoscape 3.6.1 软件中进行。

3 讨论

3.1 UPLC-Q-TOF-MS/MS 条件优化及参数设置

中药炮附片的提取物成分复杂多样。通过与样品的正负离子响应度比较, 发现正离子比负离子具有更好的响应。为了有足够的碎片信息用于结构鉴定分析, 以 13 种生物碱溶液的对照品为参考, 选择 20、30、40 和 50 eV 的碰撞能量 (CE) 进行优化以获得合适的产物离子, 最后选择 40 eV 作为最佳 CE。

本实验采用了四极杆飞行时间串联质谱 (Q-TOF-MS/MS), 无论是在 MS 或 MS/MS 模式下均具有高分辨能力, 在实现 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析时其主要优点是应用质谱的高分辨精确质量数进行化合物的定性分析, 加上 MS/MS 数据以推测分子结构, 对于高分辨率质谱通常要求仪器的质量测量准确度小于 10×10^{-6} [8-10], 才能满足定性分析的需要; 利用 Peak View™ 软件里的 XIC Manager 模块对化学数据库里化合物进行峰提取和匹配的参数的筛选标准限值, 该匹配度仅作为一个化合物定性分析的初步筛选标准, 提取并突出显示初步符合数据库要求的化合物; 同时, 我们也参考了相关的文献 (如: 复方白术芍药散成分分析) [8] 里该匹配度值的设置情况。故本实验选用了 mass error < 10×10^{-6} 作为质量测量准确度的标准, 匹配度大于 75% 作为炮附片的定性分析的初步标准。此外, 化合物的定性分析需要同时满足质量测量准确度 (mass error) 小于 10×10^{-6} 和匹配度大于 75%, 并需结合各化合物的特征二级碎片离子等, 最终才能鉴定化合物的结构。

3.2 炮附片的成分鉴定

按照“2.1”项下优化的色谱及质谱条件进样, 获得 UPLC-Q-TOF-MS/MS 正离子模式下炮附片样品和混合对照品溶液的 TIC 图 (见图 1)。按照“2.3”项下数据分析方法确定化学成分的结构, 对炮附片主要成分进行快速表征, 共鉴定了 123 个化合物 (见表 1、表 2), 其中包括双酯型生物碱 21 个, 脂型生物碱 11 个, 单酯型生物碱 43 个, 无酯型生物碱 47 个, 多酯型生物碱 1 个, 其中包括 34 个潜在的新化合物。

3.2.1 通过数据库和 Peakview 对二萜类生物碱的成分鉴定

1) 双酯型二萜类生物碱。

双酯型二萜类生物碱 (DDAs) 是附子的主要生物活性成分, 通过建立的 LC-MS 方法, 在炮附

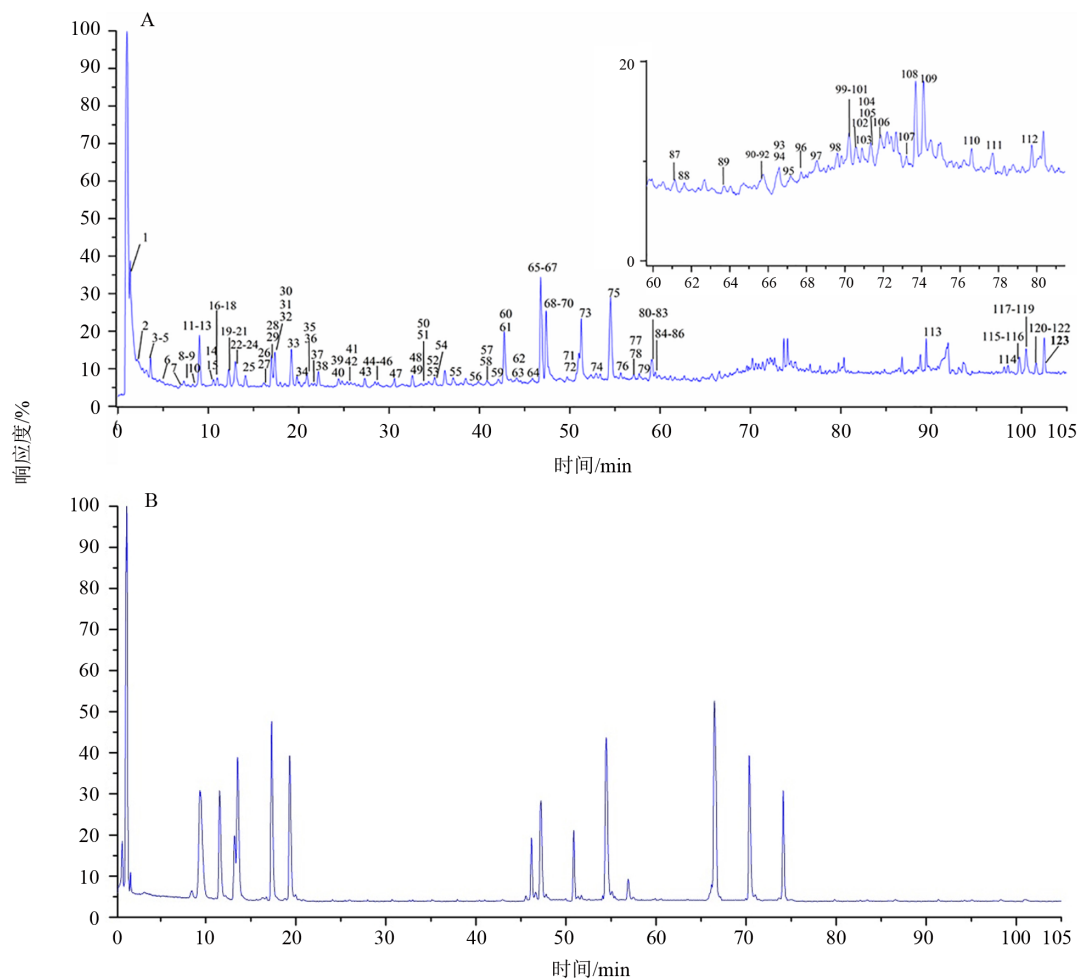


图1 炮附片(A)和混合对照品溶液(B)的UPLC-Q-TOF-MS/MS总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms of PAC and mixed reference solution by UPLC-Q-TOF-MS/MS

片的水煎液中一共鉴别了17种双酯型二萜类生物碱, 该类化合物的主要裂解特征为容易脱去取代基, 如羟基、甲氧基、乙酰基、苯甲酰基等, 而丢失CO、H₂O、CH₃OH、AcOH、BzOH等中性分子。化合物77、94、103和109通过对照品无偏差的鉴别为aconitine、mesaconitine、hypaconitine和3-deoxyaconitine。为帮助鉴定和证实其他双酯型二萜类生物碱, 我们首先对mesaconitine对照品的碎片裂解途径进行分析, 在正离子模式检测下, 化合物94(mesaconitine)给出了明显的m/z 632.3054 [M+H]⁺的分子离子峰, 二级质谱图(图2A)可观察到碎片离子m/z 582.2691 [M+H-CH₃OH-H₂O]⁺、572.2809 [M+H-AcOH]⁺、540.2562 [M+H-AcOH-CH₃OH]⁺、512.2619 [M+H-AcOH-CH₃OH-CO]⁺、508.2318 [M+H-AcOH-2CH₃OH]⁺、480.2369 [M+H-AcOH-2CH₃OH-CO]⁺、480.2369 [M+H-AcOH-2CH₃OH-CO]⁺、390.2280 [M+H-AcOH-CH₃OH-CO-BzOH]⁺、354.1690 [M+H-

AcOH-CH₃OH-CO-BzOH-2H₂O]⁺; 其裂解规律如图3所示。其他双酯型生物碱(化合物72、81、84和108)均有类似的质谱裂解规律, 根据质谱数据结合文献报道^[11], 分别鉴定为17-dihydranapelline、3*、10-hydroxymesaconitine、chasmaconitine。研究发现化合物74和化合物94(mesaconitine)具有相同的分子式C₃₃H₄₅NO₁₁, 其为mesaconitine的同分异构体。其二级质谱中形成的m/z 572.2809 [M+H-AcOH]⁺主要碎片离子, 同时观察到其碎片离子m/z 540.2580 [M+H-AcOH-CH₃OH]⁺、508.2659 [M+H-AcOH-2CH₃OH]⁺。但因未发现[M+H-H₂O]⁺和[M+H-CH₃OH-H₂O]⁺等与脱去H₂O相关的碎片离子, 说明其C₃位未有羟基取代, 根据文献[12]比对, 推测化合物74其可能为10-OH-hypaconitine。类似地, 其他双酯型二萜类生物碱化合物, 根据质谱数据, 结合文献报道及ClogP值^[8, 10-11], 79、82、91、95、96、102和110~112逐一被鉴定(表1)。

表 1 炮附片中已知二萜类生物碱离子结构信息¹⁾

Table 1 Characterization of known diterpenoid alkaloids of PAC by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R/min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10^{-6}	分子式	二级质谱数据	名称	Ref.	结构类型
1	1.715	392.2428	0.87	$C_{22}H_{33}NO_5$	374.2328, 356.2215, 344.2215, 338.2138, 316.1905, 298.1796	Hukbusine B or its isomer	[11]	C_{19} -MDAs
2	2.740	394.2585	-0.73	$C_{22}H_{33}NO_5$	376.2478, 358.2384, 340.2267, 326.2117, 308.1992, 282.2187	Chuanfumine	[11]	C_{19} -ADAs
4	3.615	394.2589	0.17	$C_{22}H_{33}NO_5$	376.2499, 358.2392, 322.2283, 268.2064	Chuanfumine or its isomer	[11]	C_{19} -ADAs
6	4.130	424.2692	-0.37	$C_{23}H_{37}NO_6$	406.2595, 392.2437, 388.2491, 374.2335, 356.2232, 344.2220, 312.1971	Senbusime A or its isomer	[11]	C_{19} -ADAs
7	6.590	378.2639	0.09	$C_{22}H_{33}NO_4$	360.2526, 342.2429, 324.2228	Aconicarchamine A	[12]	C_{19} -ADAs
8	7.170	356.2222	0.21	$C_{22}H_{29}NO_3$	338.2356, 310.1777, 296.1628, 268.1326, 258.1484, 240.1063, 212.1442	Isomer of songora- mine	[13]	C_{20} -ADAs
9	7.301	424.2693	-0.07	$C_{23}H_{37}NO_6$	406.2577, 388.2474, 370.2360, 356.2207, 346.1990, 338.2111, 324.1930, 312.1957,	Senbusime A or its isomer	[11]	C_{19} -ADAs
12	9.021	486.2697	-0.18	$C_{24}H_{39}NO_9$	468.2599, 454.2443, 436.2337, 422.2179, 404.2077, 390.1917, 378.1919, 354.1700	Mesaconine ²⁾	[11]	C_{19} -ADAs
13	9.226	472.2540	-0.29	$C_{23}H_{37}NO_9$	454.2482, 440.2230, 422.2203, 408.2029, 390.1903, 376.1723, 358.1682, 340.1551	N-deethylaconine	[14]	C_{19} -ADAs
14	10.090	358.2379	0.31	$C_{22}H_{31}NO_3$	340.2290, 322.2166, 314.2125, 294.1853, 280.1744, 242.1546	Isomer of Songorine	[15]	C_{20} -ADAs
15	10.591	378.2642	0.96	$C_{22}H_{33}NO_4$	360.2540, 342.2429, 328.2271, 310.2166, 300.2314	Karakoline ²⁾	[12]	C_{19} -ADAs
17	10.997	408.2746	0.31	$C_{23}H_{37}NO_5$	390.2639, 372.2535, 358.2375, 340.2265, 326.2118	Isotalatizidine	[11]	C_{19} -ADAs
18	11.334	376.2484	0.42	$C_{22}H_{33}NO_4$	358.2369, 340.2275, 326.2117, 308.2010, 294.1886	Karakanine or its iso- mer	[13]	C_{19} -ADAs
20	12.247	358.2379	0.57	$C_{22}H_{31}NO_3$	340.2280, 322.2166, 214.1578, 200.1430	Songorine ²⁾	[15]	C_{20} -ADAs
22	12.831	360.2537	0.93	$C_{22}H_{33}NO_5$	342.2432, 324.2319, 306.2193, 296.2009	12-epi-napelline	[15]	C_{20} -ADAs
23	12.975	500.2853	-0.30	$C_{25}H_{41}NO_9$	482.2749, 468.2596, 450.2491, 436.2334, 418.2226, 404.2070, 392.2071, 368.1857	Aconine ²⁾	[11]	C_{19} -DDAs
24	13.067	468.2592	0.06	$C_{24}H_{37}NO_8$	436.2337, 418.2227, 386.1965, 354.1711	1*	[12]	C_{19} -MDAs
25	14.147	330.2067	0.85	$C_{20}H_{27}NO_3$	312.1961, 302.2111, 294.1865, 284.1994, 268.1692, 266.1899	Hetisine	[11]	C_{20} -ADAs
26	15.784	480.2590	-0.40	$C_{25}H_{37}NO_8$	448.2313, 374.1977, 330.1766, 210.1510	2*	[12]	C_{19} -MDAs
28	16.987	470.2747	-0.38	$C_{24}H_{39}NO_8$	438.2484, 420.2376, 406.2228, 388.2121, 378.1913, 356.1862, 342.1604	Hypaconine ²⁾	[16]	C_{19} -ADAs
29	17.256	422.2537	0.00	$C_{23}H_{35}NO_6$	404.2427, 372.2188, 344.1882, 282.1850	Gadesine	[12]	C_{19} -ADAs
31	18.410	454.2800	0.16	$C_{24}H_{39}NO_7$	436.2686, 418.2609, 404.2429, 386.2321, 372.2170, 354.2051, 328.1895, 304.1700	Fuziline	[11]	C_{19} -ADAs
33	19.186	438.2854	0.85	$C_{24}H_{39}NO_6$	420.2747, 402.2641, 388.2486, 370.2379, 356.2222, 338.2115, 324.1961	Neoline ²⁾	[12]	C_{19} -ADAs

续表

峰号	t_R/min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10 ⁻⁶	分子式	二级质谱数据	名称	Ref.	结构类型
35	20.833	420.2747	0.51	C ₂₄ H ₃₇ NO ₅	402.2639, 384.2541, 370.2376, 360.2520, 342.2428, 324.2335, 310.2189, 292.2073	N-ethylhokbusine B	[11]	C ₁₉ -ADAs
36	21.080	438.2853	0.63	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	420.2765, 406.2594, 388.2495, 370.2388, 356.2233, 338.2126, 324.1971, 306.1850	Foresticine	[11]	C ₁₉ -ADAs
37	21.408	450.2854	0.94	C ₂₅ H ₃₉ NO ₆	432.2759, 414.2647, 400.2483, 386.2341, 372.2553, 354.2442, 340.2310, 322.2169	Ignavined	[12]	C ₂₀ -MDAs
39	23.895	436.2693	-0.19	C ₂₄ H ₃₇ NO ₆	404.2436, 372.2194, 275.1350, 228.1357	1-Dehydroneoline or its isomer	[12]	C ₁₉ -ADAs
40	24.419	422.2904	0.70	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	390.2641, 372.2535, 358.2377, 340.2270, 326.2107	Talatisamine	[11]	C ₁₉ -ADAs
46	28.784	452.3008	0.22	C ₂₅ H ₄₁ NO ₆	420.2744, 402.2620, 388.2481, 370.2362, 356.2224, 338.2118, 324.1941, 306.1872	Chasmanine	[15]	C ₁₉ -ADAs
47	30.975	510.3062	0.18	C ₂₇ H ₄₃ NO ₈	492.2968, 478.2801, 460.2679, 446.2624, 428.2493, 404.2433, 396.2062	14-O-acetylneoline	[11]	C ₁₉ -MDAs
48	32.295	356.2223	0.65	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃	314.2095, 296.1998, 278.1895	Songoramine	[13]	C ₂₀ -ADAs
53	34.390	464.3008	0.35	C ₂₆ H ₄₁ NO ₆	432.2741, 414.2646, 400.2473, 382.2381, 372.2528, 354.2446, 340.2259	Monoacetylaltatiza- mine	[11]	C ₁₉ -MDAs
54	35.043	606.2905	-0.59	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₁	574.2647, 556.2545, 524.2272, 506.2174	14-Benzoyl-10-OH- mesaconine	[12]	C ₁₉ -MDAs
56	40.427	450.2279	0.82	C ₂₇ H ₃₁ NO ₅	432.2202, 328.1915, 310.1812, 300.1984, 292.1798, 282.1871, 264.1754	Codelphine	[11]	C ₁₉ -MDAs
57	40.852	620.3066	0.15	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₁	602.2937, 588.2787, 570.2691, 556.2552, 538.2417, 520.2292, 506.2127, 480.1986	Isomer of 14-Benzo- yl-10-OH-aconine	[12]	C ₁₉ -MDAs
62	43.780	604.3143	4.46	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	572.2877, 554.2775, 522.2511, 490.2242, 464.2079, 458.1989, 414.1732, 368.1866, 336.1594	Hukbusine A	[12]	C ₁₉ -MDAs
65	46.490	528.2958	0.44	C ₃₀ H ₄₁ NO ₇	510.2851, 492.2726, 478.2643, 460.2464, 388.2464, 324.1917	6-demethoxy-benzo- ylneoline	[17]	C ₁₉ -MDAs
67	46.794	590.2964	0.77	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	572.2865, 558.2708, 540.2599, 526.2451, 508.2346, 494.2184, 476.2084, 414.1724	Benzoylmesaconi- tine ²⁾	[11]	C ₁₉ -MDAs
69	48.050	558.3066	0.94	C ₃₁ H ₄₃ NO ₈	526.2791, 508.2689, 480.2480, 463.2386, 386.2331	Isodelphinine or its isomer	[11]	C ₁₉ -MDAs
71	50.470	558.3066	0.89	C ₃₁ H ₄₃ NO ₈	526.2827, 508.2721, 494.2579, 444.2186, 404.2474, 386.2365, 354.2076	Isodelphinine or its isomer	[11]	C ₁₉ -MDAs
72	50.739	540.2960	0.81	C ₃₁ H ₄₁ NO ₇	522.2853, 504.2752, 486.2542, 462.2652, 444.2518, 418.2582, 400.2458, 340.2266	17-dihydranapelline	[18]	C ₁₉ -DDAs
73	51.011	604.3120	0.60	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	586.3008, 572.2856, 554.2752, 540.2593, 522.2489, 508.2336, 496.2328, 478.2228, 428.1866, 368.1873	Benzoylaconine ²⁾	[12]	C ₁₉ -MDAs
74	53.193	632.3067	0.29	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	600.2768, 572.2809, 540.2583, 508.2310, 490.2159, 476.2089	10-OH-hypaconitine or its isomer	[12]	C ₁₉ -DDAs
75	54.544	574.3014	0.51	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	542.2732, 524.2636, 510.2476, 492.2366, 478.2212, 460.2113, 388.2104	Benzoylhypaconine ²⁾	[11]	C ₁₉ -MDAs
76	55.516	634.3219	-0.44	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₁	616.3070, 602.2947, 584.2845, 552.2659, 538.2393	8-O-Me-beiwutinine	[11]	C ₁₉ -MDAs
77	56.977	646.3225	0.46	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	614.2996, 586.3010, 554.2759, 522.2505, 472.2147, 368.1784	Aconitine ²⁾	[12]	C ₁₉ -DDAs

续表

峰号	t_R/min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10^{-6}	分子式	二级质谱数据	名称	Ref.	结构类型
78	56.980	558.3064	0.39	$C_{31}H_{43}NO_8$	526.2820, 494.2567, 462.2298, 430.2034, 404.2465, 372.2201, 340.1926, 322.1815	Demethoxy-3-deoxy- 14-benzoylaconine or its isomer	[12]	C_{19} -MDAs
79	58.320	616.3119	0.42	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	584.2857, 566.2744, 534.2487, 502.2198, 459.1786, 436.2370, 386.1976, 342.1691	Isomer of hypaconi- tine	[11]	C_{19} -DDAs
80	59.018	588.3172	0.91	$C_{32}H_{45}NO_9$	556.2908, 538.2835, 524.2635, 506.2520, 492.2360, 478.2210, 464.2105, 402.2254	14-benzoyldeoxyaco- nine	[11]	C_{19} -MDAs
81	59.157	550.2441	0.92	$C_{31}H_{35}NO_8$	532.2325, 490.2248, 428.2073, 384.1994, 368.1865, 350.1827, 326.1767, 308.1663	3*	[17]	C_{20} -PDAs
82	59.350	616.3119	0.40	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	584.2886, 566.2752, 552.2580, 534.2552, 540.2642	15-deoxymesaconi- tine or its isomer	[11]	C_{19} -DDAs
83	59.878	558.3066	0.84	$C_{31}H_{43}NO_8$	540.2964, 526.2819, 508.2699, 494.2572, 476.2430, 466.2257, 448.2104, 404.2456	Isodelphinine or its isomer	[11]	C_{19} -MDAs
84	60.049	648.3019	0.64	$C_{33}H_{45}NO_{12}$	630.2907, 616.2696, 598.2645, 588.2809, 556.2456, 538.2433, 506.2145	10-Hydroxymesacon- itine	[15]	C_{19} -DDAs
85	60.460	542.3115	0.53	$C_{31}H_{43}NO_7$	510.2884, 492.2775, 474.2661, 460.2516, 428.2242, 388.2519, 370.2389, 338.2146	Isomer of 14-benzoyl- neoline	[17]	C_{19} -MDAs
86	60.570	572.3222	0.77	$C_{32}H_{45}NO_8$	540.2988, 522.2534, 508.2720, 490.2621, 476.2472, 444.2191, 418.2613, 400.2613, 386.2354	14- <i>O</i> -anisoylneoline or its isomer	[13]	C_{19} -MDAs
87	61.450	542.3113	0.10	$C_{31}H_{43}NO_7$	524.3031, 506.2391, 492.2763, 474.2667, 460.2512, 428.2252, 370.2395, 338.2122	14-benzoylneoline	[12]	C_{19} -MDAs
88	61.857	630.2929	3.15	$C_{33}H_{43}NO_{11}$	598.2662, 570.2577, 538.2410, 510.2484, 506.2125, 388.2107, 356.1803	Falaconitine	[11]	C_{19} -MDAs
90	65.704	600.3168	0.22	$C_{33}H_{45}NO_9$	568.2925, 536.2600, 518.2525	13-Deoxyhypaconi- tine or its isomer	[12]	C_{19} -MDAs
91	65.720	662.3175	0.53	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	630.2959, 602.2976, 584.3055, 570.2657, 542.2789, 524.2703, 510.2529, 434.2152	Beiwutinine	[14]	C_{19} -DDAs
93	66.557	556.2910	0.83	$C_{31}H_{41}NO_8$	524.2651, 492.2380, 460.2112, 105.0343	Dehydrated benzoyl- hypaconine	[12]	C_{19} -MDAs
94	66.741	632.3061	-1.74	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	600.2824, 582.2706, 572.2855, 540.2609, 512.2654, 508.2340, 490.2232, 462.2272, 390.2274, 354.1701	Mesaconitine ²⁾	[11]	C_{19} -DDAs
95	67.030	646.3213	-1.32	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	628.2891, 596.2933, 586.3036, 568.2848, 554.2751, 536.2688, 522.2492, 504.2425	10-OH-deoxyaconi- tine	[13]	C_{19} -DDAs
96	67.678	662.3174	0.48	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	602.2950, 570.2117, 552.2540, 542.2753	Isomer of beiwutinine	[14]	C_{19} -DDAs
98	69.480	584.3220	0.37	$C_{33}H_{45}NO_8$	566.3103, 552.2955, 534.2854, 502.2531, 484.2485, 418.2660, 386.2351, 358.2015	Patentine or its isomer	[12]	C_{19} -MDAs
99	70.090	586.3370	-0.81	$C_{33}H_{47}NO_8$	568.3251, 536.2975, 518.2925, 490.2474, 358.2028	4*	[17]	C_{19} -MDAs
100	70.160	568.3273	0.67	$C_{33}H_{45}NO_7$	536.3026, 518.2910, 486.2634, 454.2338, 404.2458, 388.2507, 356.2195, 338.2103	Isomer of 8- <i>O</i> -cin- namoylneoline	[19]	C_{19} -MDAs
101	70.209	572.3222	0.73	$C_{32}H_{45}NO_8$	540.2956, 522.2849, 508.2706, 476.2441, 462.2277, 448.2095, 386.2324	Isomer of 14- <i>O</i> -an- isoylneoline	[18]	C_{19} -MDAs
102	70.480	646.3225	-0.04	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	614.3014, 586.3060, 554.2772, 526.2822, 522.2456, 494.2626, 432.2357, 414.2320	5*	[11]	C_{19} -DDAs
103	70.885	616.3119	0.40	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	584.2857, 556.2971, 524.2649, 496.2694, 492.2400, 464.2445, 432.2185, 338.1750	Hypaconitine ²⁾	[11]	C_{19} -DDAs

续表

峰号	t_R/min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10^{-6}	分子式	二级质谱数据	名称	Ref.	结构类型
104	71.200	602.3324	0.14	C ₃₃ H ₄₇ NO ₉	570.3040, 538.2817, 506.2541, 474.2350, 449.1993, 384.2203, 352.1955	14-O-veratrolylneoline	[19]	C ₁₉ -MDAs
105	71.360	572.3224	0.99	C ₃₂ H ₄₅ NO ₈	484.2718, 456.2769, 424.2507, 400.2137, 382.2039, 340.1922, 322.1818, 294.1865	14-O-anisoylneoline	[18]	C ₁₉ -MDAs
106	71.877	568.3272	0.53	C ₃₃ H ₄₅ NO ₇	550.3164, 518.2889, 492.2763, 486.2628, 458.2315, 454.2374, 370.2379, 352.2284	8-O-cinnamoylneoline	[19]	C ₁₉ -MDAs
107	73.385	602.3325	0.27	C ₃₃ H ₄₇ NO ₉	570.3040, 524.2668, 492.2374, 460.2138, 416.2428, 370.2054, 338.1762, 318.1762	Neojiangyouaconitine	[17]	C ₁₉ -MDAs
108	73.870	614.3328	0.77	C ₃₄ H ₄₇ NO ₉	596.3196, 554.3050, 526.2848, 508.2695, 476.2401	Chasmaconitine	[17]	C ₁₉ -DDAs
109	74.204	630.3277	0.65	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	598.3039, 570.3063, 538.2791, 510.2872, 506.2544, 478.2615, 474.2308, 388.2480	3-deoxyaconitine ²⁾	[11]	C ₁₉ -DDAs
110	76.300	628.3478	-0.28	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	610.3319, 526.2840, 508.2745	Bulleyaconitine A	[19]	C ₁₉ -DDAs
111	77.769	628.3484	0.64	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	596.3217, 564.2962, 540.2969, 508.2701	Foresaconitine	[19]	C ₁₉ -DDAs
112	79.771	630.2915	0.97	C ₃₃ H ₄₃ NO ₁₁	570.2680, 528.2370, 510.3249, 478.2200, 446.1976, 416.2105	3-deoxyaconitine	[11]	C ₁₉ -DDAs
113	91.020	840.5684	7.59	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₀	808.5404, 556.2921, 524.2667, 492.2379, 464.2454, 402.2208, 342.2078, 338.1762	8-str-benzoylhypaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
114	99.832	834.5179	3.36	C ₄₀ H ₇₁ NO ₁₀	802.4909, 770.4639, 556.2903, 524.2642, 496.2690, 492.2387, 464.2432, 370.2014	8-linolen-benzoylhypaconine	[18]	C ₁₉ -Lipo-As
115	100.119	848.5319	1.40	C ₅₀ H ₇₃ NO ₁₀	570.3075, 538.2784, 510.2971	8-linolen-benzoyldeoxyaconine	[18]	C ₁₉ -Lipo-As
116	100.255	852.5260	0.41	C ₄₀ H ₇₃ NO ₁₁	572.2874, 444.8573, 354.1758, 318.9011	8-lino-benzoylme-saconine	[18]	C ₁₉ -Lipo-As
117	100.533	866.5410	-0.34	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₁	586.3015, 526.2817, 368.1900	8-lino-benzoylaco-nine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
118	100.676	836.5320	1.52	C ₄₀ H ₇₃ NO ₁₀	804.5063, 556.2907, 524.2655, 496.2693, 338.1766	8-lino-benzoylhypaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
119	100.948	850.5469	0.67	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₀	818.5182, 570.3067, 538.2812, 510.2839	8-lino-benzoyldeoxyaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
120	101.431	834.5517	0.29	C ₅₀ H ₇₅ NO ₉	554.3176, 522.2868, 334.0712	8-lino-benzoyl-3,13-deoxyaconine	[18]	C ₁₉ -Lipo-As
121	102.005	838.5468	0.48	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₀	806.5147, 556.2915, 524.2660, 338.1787	8-ole-benzoylhypaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
122	102.052	812.5312	0.60	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₀	556.2892, 524.2626, 496.2695, 338.1725	8-pal-benzoylhypaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As
123	102.464	826.5468	0.56	C ₄₈ H ₇₅ NO ₁₀	570.3083, 538.2819, 478.2572, 352.1927	8-pal-benzoyldeoxyaconine	[12]	C ₁₉ -Lipo-As

1) **1***: 1, 7, 8-Trihydroxy-20-(hydroxymethyl)-16-methoxy-4-(methoxymethyl)aconitan-14-yl acetate or its isomer; **2***: (1*R*, 2*S*, 3*S*, 4*S*, 5*S*, 6*S*, 8*R*, 12*R*, 13*R*, 16*R*, 19*S*, 20*R*, 21*S*)-14-Ethyl-2, 4-dihydroxy-6, 19-dimethoxy-9, 11-dioxo-14-azaheptacyclo [10.7.2.12, 5.01, 13.03, 8.08, 12.016, 20] docos-21-yl acetate or its isomer; **3***: (+) - (13*R*, 19*S*)-1*β*, 11*α*-diacetoxy-2*α*-benzoyloxy-13, 19-dihydroxyhetisan); **4***: (-) - (A-b)-14*α*-benzoyloxy-8*β*-ethoxy-N-ethyl-6*α*, 15*α*-dihydroxy-1*α*, 16*β*, 18-trimethoxyaconitane; **5***: (-) - (A-b)-8*β*-acetoxy-14*α*-benzoyloxy-N-ethyl-3*α*, 10*β*, 13*β*-trihydroxy-1*α*, 6*α*, 16*β*, 18-tetramethoxyaconitane; 2) 对照品

表 2 炮附片中新二萜类生物碱离子结构信息¹⁾

Table 2 Characterization of new diterpenoid alkaloids of PAC by Molecular Networking

峰号	t_R / min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10 ⁻⁶	分子式	二级质谱数据	名称	分子笼	结构类型
3	3.611	502.264 4	-0.62	C ₂₄ H ₃₉ NO ₁₀	470.237 5, 466.243 1, 434.217 7, 420.201 1, 402.191 0, 388.175 3, 326.138 8	PAC-1 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
5	3.620	396.236 3	-4.47	C ₂₁ H ₃₃ NO ₆	378.254 5, 360.244 2, 342.234 7, 324.223 6, 268.203 9	PAC-2 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
10	8.301	516.280 1	-0.35	C ₂₅ H ₄₁ NO ₁₀	470.237 5, 452.227 6, 420.201 1, 402.191 0	PAC-3 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
11	8.801	364.248 5	0.76	C ₂₁ H ₃₃ NO ₄	346.237 6, 328.226 9, 318.206 7, 318.206 7, 310.214 8	PAC-4 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
16	10.886	484.254 1	-0.03	C ₂₄ H ₃₇ NO ₉	452.227 9, 434.217 2, 402.191 6, 370.164 8, 352.153 1	PAC-5 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
19	11.620	350.232 7	0.31	C ₂₀ H ₃₁ NO ₄	332.221 3, 314.211 0, 300.196 4, 282.185 4	PAC-6 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
21	12.750	348.253 4	0.31	C ₂₁ H ₃₃ NO ₃	330.242 4, 312.233 2, 302.212 0	PAC-7 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
27	16.255	406.258 7	-0.15	C ₂₃ H ₃₅ NO ₅	388.247 0, 370.240 1, 328.227 6, 310.216 3, 282.222 7	PAC-8 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
30	18.354	390.264 0	0.35	C ₂₃ H ₃₅ NO ₄	372.252 0, 358.237 3, 340.224 5, 326.210 3	PAC-9 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
32	18.551	498.269 7	-0.06	C ₂₅ H ₃₉ NO ₉	466.244 5, 448.322 7, 416.208 2, 384.179 5	PAC-10 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
34	20.559	406.259 1	0.77	C ₂₃ H ₃₅ NO ₅	388.247 4, 356.223 3, 338.215 5, 324.195 2, 310.176 1, 234.149 8, 202.078 6	Isomer of PAC-8 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
38	22.530	446.254 0	0.59	C ₂₅ H ₃₅ NO ₆	358.201 1, 330.205 8, 312.194 1, 254.154 0	PAC-11 [#]	IV	C ₁₉ -ADAs
41	25.114	390.264 1	0.57	C ₂₃ H ₃₅ NO ₄	358.237 8, 340.227 2, 326.211 5	Isomer of PAC-9 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
42	26.237	466.280 2	0.55	C ₂₅ H ₃₉ NO ₇	434.253 6, 402.227 2, 374.196 3, 370.201 3	PAC-12 [#]	I	C ₁₉ -MDAs
43	27.051	390.264 1	0.56	C ₂₃ H ₃₅ NO ₄	372.253 8, 354.241 8, 344.223 2, 312.231 8, 294.221 5	Isomer of PAC-9 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
44	28.149	432.238 2	0.39	C ₂₄ H ₃₃ NO ₆	414.226 4, 344.186 4, 326.174 9, 308.164 8	PAC-13 [#]	I/IV	C ₁₉ -MDAs
45	28.387	420.238 3	0.51	C ₂₃ H ₃₃ NO ₆	402.226 7, 374.199 8, 370.200 5, 360.152 0, 342.170 2, 338.173 9	PAC-14 [#]	II	C ₁₉ -MDAs
49	32.470	576.280 2	-0.14	C ₃₀ H ₄₁ NO ₁₀	558.270 3, 544.256 3, 512.229 1, 494.218 3, 476.209 0, 468.202 6, 464.219 1	PAC-15 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
50	33.481	434.290 5	0.88	C ₂₅ H ₃₉ NO ₅	402.255 3, 384.249 5, 342.243 2, 324.233 2, 292.204 6	PAC-16 [#]	I	C ₁₉ -MDAs
51	33.605	576.280 5	0.39	C ₃₀ H ₄₁ NO ₁₀	558.270 2, 544.247 5, 526.244 7, 508.233 6, 494.221 5, 482.222 0, 468.200 7, 452.195 7	Isomer of PAC-15 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
52	34.054	498.285 4	0.68	C ₂₉ H ₃₉ NO ₆	480.274 9, 462.262 6, 444.252 8, 434.268 0, 358.237 5, 340.227 4, 322.217 5	PAC-17 [#]	I	C ₁₉ -ADAs
55	37.301	446.253 8	0.14	C ₂₅ H ₃₅ NO ₆	428.242 2, 344.181 4, 326.174 1, 308.167 5, 262.159 2	Isomer of PAC-11 [#]	IV	C ₁₉ -ADAs
58	41.065	444.274 3	0.76	C ₂₆ H ₃₇ NO ₅	426.263 4, 398.269 0, 342.205 9, 324.195 5, 296.200 7	PAC-18 [#]	IV	C ₁₉ -DDAs
59	42.011	576.280 2	-0.26	C ₃₀ H ₄₁ NO ₁₀	540.255 5, 526.245 1, 508.235 3, 482.212 5, 444.192 0	Isomer of PAC-15 [#]	II	C ₁₉ -ADAs

续表

峰号	t_R / min	测定值 (m/z [M+H] ⁺)	误差/ 10 ⁻⁶	分子式	二级质谱数据	名称	分子笼	结构类型
60	43.016	576.2803	-0.12	C ₃₀ H ₄₁ NO ₁₀	558.2632, 544.2562, 526.2435, 512.2287, 494.2187, 468.1991, 448.1724	Isomer of PAC-15 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
61	43.078	442.2592	0.80	C ₂₆ H ₃₅ NO ₃	358.2062, 340.1918, 312.1936	PAC-19 [#]	IV	C ₁₉ -DDAs
63	45.366	514.2795	-0.74	C ₂₉ H ₃₉ NO ₇	482.2534, 464.2472, 436.2102, 360.2185, 310.1744	PAC-20 [#]	I	C ₁₉ -MDAs
64	45.751	544.2904	-0.15	C ₃₀ H ₄₁ NO ₈	512.2650, 494.2545, 462.2289, 390.2316, 340.1884, 312.1993	PAC-21 [#]	IV	C ₁₉ -MDAs
66	46.674	576.2807	0.73	C ₃₀ H ₄₁ NO ₁₀	558.2675, 526.2421, 494.2163, 476.2019, 444.2019, 358.1592	Isomer of PAC-15 [#]	II	C ₁₉ -ADAs
68	47.166	426.2640	0.24	C ₂₆ H ₃₅ NO ₄	342.2159, 324.1965, 306.1845	PAC-22 [#]	IV	C ₁₉ -MDAs
70	48.388	512.2642	-0.22	C ₂₉ H ₃₇ NO ₇	494.2539, 476.2436, 416.2258, 354.2062, 294.1839	PAC-23 [#]	I	C ₁₉ -MDAs
89	63.676	618.2912	0.56	C ₃₂ H ₄₃ NO ₁₁	600.2773, 558.2712, 508.2334, 476.2032, 444.1792, 354.1683	PAC-24 [#]	III	C ₁₉ -DDAs
92	65.762	586.3015	0.73	C ₃₂ H ₄₃ NO ₉	568.3904, 554.2757, 536.2643, 504.2379, 490.2238, 370.1690	PAC-25 [#]	II	C ₁₉ -DDAs
97	68.411	514.3168	0.91	C ₂₉ H ₃₉ NO ₇	426.2620, 398.2698, 342.2177, 324.1952, 296.1993	PAC-26 [#]	IV	C ₁₉ -MDAs

1) “#”代表可能潜在的新化合物。

2) 长链脂型二萜类生物碱。

长链脂型二萜类生物碱 (Lipo-As) 是附子中特有的一类生物活性成分, 该类化合物的主要质谱裂解特征为首先脱去 C-8 为对应的长链脂肪酸 (-lipo) 后, 再与其相对应的双酯型二萜类生物碱 [M+H-AcOH]⁺ 的骨架的二级质谱裂解规律是一致的^[15]。基于此裂解规律, 从炮附片中一共鉴定到了 11 个长链脂型生物碱。例如, 化合物 122 的准分子离子峰为 m/z 812.5312 [M+H]⁺, 分子式为 C₄₇H₇₃NO₁₀。二级质谱图如图 2 B 可观察到碎片离子 m/z 556.2892 [M+H-lipo]⁺、524.2626 [M+H-lipo-CH₃OH]⁺、496.2695 [M+H-lipo-CH₃OH-CO]⁺、338.1725 [M+H-lipo-3CH₃OH-BzOH]⁺。其二级质谱和 benzoylhypaconine 二级质谱一致, 因此, 该化合物的骨架初步鉴定为 benzoylhypaconine, 其长链脂肪酸的分子式为 C₁₆H₃₂O₂, 推测长链脂肪酸初步为 palmitic acid (pal)。根据其质谱数据结合文献报道^[11], 化合物 122 鉴定为 8-pal-benzoylhypaconine。此外, 其他长链脂型二萜类生物碱化合物也有类似的裂解规律, 根据其质谱数据结合文献报道^[12-13], 化合物 113~117、119~123 逐一被鉴定表征 (表 1)。

3) 单酯型二萜类生物碱。

单酯型二萜类生物碱 (MDAs) 是炮附子中主要的低毒活性成分, 通过建立的 LC-MS 方法在炮附片的水煎液中一共鉴别了 34 种单酯型二萜类生物碱, 其裂解规律为容易失去 AcOH、CH₃OH、H₂O、CO 等中性分子。化合物 67、73 和 75 通过对照品无偏差的鉴别为 benzoylmesaconitine, benzoylaconine 和 benzoylhypaconine。为鉴定和证实其它单酯型二萜类生物碱, 首先对 benzoylaconine 对照品的碎片裂解途径进行分析, 在正离子模式检测下, 化合物 73 (benzoylaconine) 给出了明显的 m/z 604.3120 [M+H]⁺ 的分子离子峰, 二级质谱图 (图 2C) 可观察到碎片离子 m/z 586.3008 [M+H-H₂O]⁺、572.2856 [M+H-CH₃OH]⁺、554.2752 [M+H-H₂O-CH₃OH]⁺、540.2593 [M+H-2CH₃OH]⁺、522.2489 [M+H-2CH₃OH-H₂O]⁺、508.2336 [M+H-3CH₃OH]⁺、490.2224 [M+H-3CH₃OH-H₂O]⁺、428.1866 [M+H-BzOH-3H₂O]⁺; 此外, 其他单酯型二萜类生物碱均有类似的质谱裂解规律, 根据质谱数据结合文献报道^[11-12, 14-16], 化合物 1、24、26、37、47、53、54、56、57、65、76、80、88、90、93、98 和 99 逐一分别被鉴定。在正离子模式

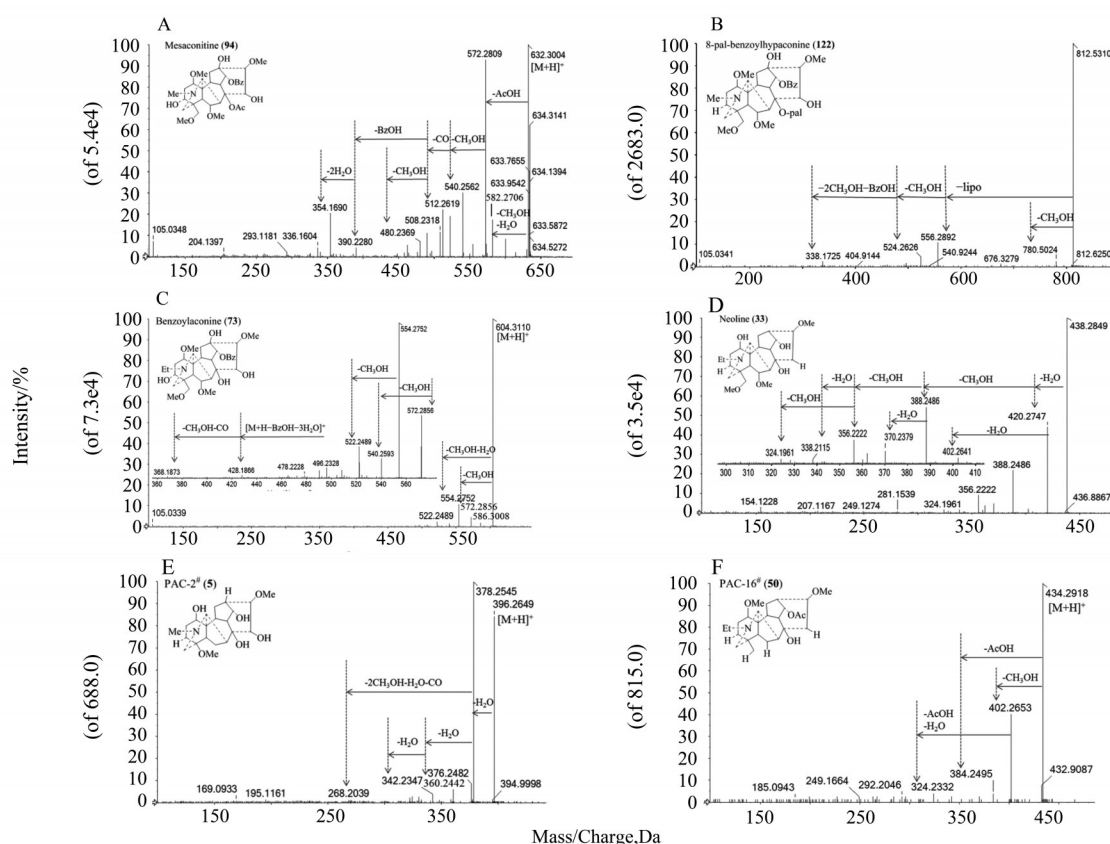


图 2 MESAONITINE(A)、8-pal-benzoylhyapaconine(B)、benzoylaaconine(C)、neoline(D)、PAC-2#(E)和 PAC-16#(F)的二级质谱图

Fig. 2 The MS² spectra of mesaconitine(A), 8-pal-benzoylhyapaconine(B), benzoylaaconine(C), neoline(D), PAC-2#(E) and PAC-16#(F)

下, 化合物 62 出现 m/z 604.3122 [M+H]⁺ 的准分子离子峰, 它的二级质谱数据与 benzoylaaconine 相类似, 二级质谱图同样可观察到 m/z 572.2877、554.2775 和 522.2511 等碎片离子, 对比之下化合物 62 还具有 m/z 458.1989 [M+H-4CH₃OH-H₂O]⁺、336.1594 [M+H-4CH₃OH-BzOH-H₂O]⁺ 特征的碎片离子, 暗示其比 benzoylaaconine 多一个 -OCH₃, 根据质谱数据结合文献报道^[12], 推测其结构为 hukbusine A。其他单酯型二萜类生物碱化合物均有类似的质谱裂解规律, 根据其质谱数据结合文献报道及 ClogP 值^[11, 17-19], 化合物 69、71、78、83、85~87、100、101 和 104~107 逐一被鉴定(表 1)。

4) 无酯型二萜类生物碱。无酯型二萜类生物碱(ADAs)是炮附子中主要的无毒活性成分, 通过建立的 LC-MS 方法, 在炮附片的水煎液中一共鉴别了 25 种无酯型二萜类生物碱, 化合物 12、15、20、23、28 和 33 通过对照品无偏差的鉴别为 mesaconine、karakoline、songorine、aconine、hypaconine 和 neoline; 以化合物 33 为例, 说明无酯型

二萜类生物碱的裂解规律。化合物 33 二级质谱图如图 2D 可观察 m/z 420.2747 [M+H-H₂O]⁺、402.2641 [M+H-2H₂O]⁺、388.2486 [M+H-H₂O-CH₃OH]⁺、370.2379 [M+H-2H₂O-CH₃OH]⁺、356.2222 [M+H-H₂O-2CH₃OH]⁺ 等碎片离子, 根据对照品的质谱信息和参考文献报道^[12], 化合物 33 初步鉴定为 neoline。而化合物 36 的裂解方式和化合物 33 的相似, 它的二级质谱数据与 neoline 相类似, 二级质谱图同样可观察到 m/z 420.2740、388.2486、360.2175 等碎片离子, 对比之下, 化合物 36 还形成 m/z 406.2594 的主要的特征二级碎片离子, 是在 m/z 438.2853 的母离子脱去 C₁ 位的 -CH₃OH 产生的, 表明其 C₁ 是甲氧基取代。根据质谱数据并结合参考文献^[11], 因此推测其结构为 foresticine。其他无酯型二萜类生物碱化合物类似的质谱裂解规律, 根据其质谱数据结合文献报道及 ClogP 值^[11-13, 15-16], 化合物 2、4、6~9、14、29、40 和 48 逐一被鉴定(表 1)。

3.2.2 通过 GNPS 网络对二萜类生物碱的成分鉴

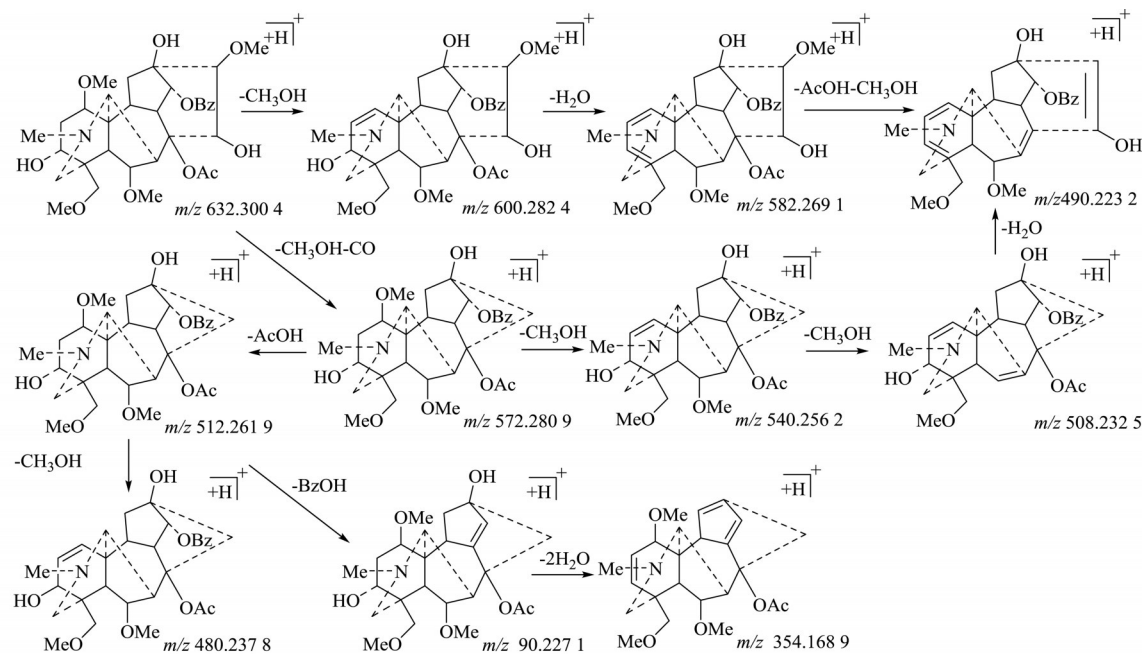


图3 Meseaconitine的质谱裂解规律图

Fig. 3 The proposed fragmentation pathways of mesaconitine

定 基于MS/MS光谱的相似性, 炮附片水煎煮液的可视化的分子笼网络被建立 (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7c62374c03854e01ad1ad354134c7616>)。在4个明显的二萜类生物碱分子笼中, 通过GNPS网络和已知化合物的去重复分析, 共初步鉴定了65个生物碱, 其中包括34个潜在的新生物碱(表2和图4)。

在正离子模式下, 分子笼I共包含了36个节点, 相对分子质量范围在 m/z 320.114~588.280之间, 结构涉及单酯型和无酯型生物碱(图5A)。特别地, 通过对比对照品(表1), 节点 m/z 378.264 $[M+H]^+$ 被鉴定为已知化合物karakanine(18)。此外, 通过文献报道和数据库分析^[11], 节点 m/z 420.275(35)和392.280(1) $[M+H]^+$ 分别被鉴定为N-ethylhokbusine B(35)和hokbusine B或它的同分异构体(1)。与此同时, 如图分子笼I所示, 未知离子 m/z 396.264与已知离子 m/z 378.264相关, 表明它们在结构上类似。节点 m/z 396.264产生的准分子离子峰为396.2363 $[M+H]^+$, 其二级碎片为 m/z 378.2545 $[M+H-H_2O]^+$ 、360.2442 $[M+H-2H_2O]^+$ 、342.2347 $[M+H-3H_2O]^+$ 、324.2236 $[M+H-4H_2O]^+$ 、268.2039 $[M+H-2CH_3OH-H_2O-CO]^+$, 二级质谱显示有多个中性水分子的丢失, 推测结构中存在多个羟基, 基于质谱数据分析, 节点 m/z 396.26被鉴定为karakoline的衍生物(PAC-2[#]

(5), 表2和图4)。此外未知离子 m/z 434.290比已知离子 m/z 420.275高出14, 节点 m/z 434.290的准分子离子峰为396.2363 $[M+H]^+$, 其二级碎片为402.2553 $[M+H-H_2O]^+$ 、384.2495 $[M+H-2H_2O]^+$ 、342.2432 $[M+H-AcOH]^+$ 、324.2332 $[M+H-AcOH-H_2O]^+$ 、292.2046 $[M+H-AcOH-H_2O-CH_3OH]^+$, 二级质谱显示有中性乙酸分子的丢失, 推测结构中存在1个乙酰基, 基于文献报道^[11]结合质谱数据, 节点 m/z 434.290被鉴定为N-ethylhokbusine B的衍生物(PAC-16[#](50), 表2和图4)。通过GNPS网络分析, 在分子笼I中, 我们共鉴定了26个生物碱, 其中包含15个新的生物碱。此外, 在分子笼II中共鉴定21个生物碱, 其中包含11个新的生物碱; 在分子笼III中共鉴定7个生物碱, 其中包含1个新的生物碱; 在分子笼IV中共鉴定11个生物碱, 其中包含7个新的生物碱(表2和3, 图5C~D)。最后将通过GNPS分子网络推导的所有潜在的新化合物结构分别输入Sci Finder数据库搜索验证, 发现其34个潜在的化合物均未见相关文献报道, 故推测此34个潜在的化合物均为炮附片中潜在的新化合物。

4 结论

为全面分析炮附片的二萜类生物碱成分并挖掘其潜在的新成分, 本研究采用了GNPS分子网络

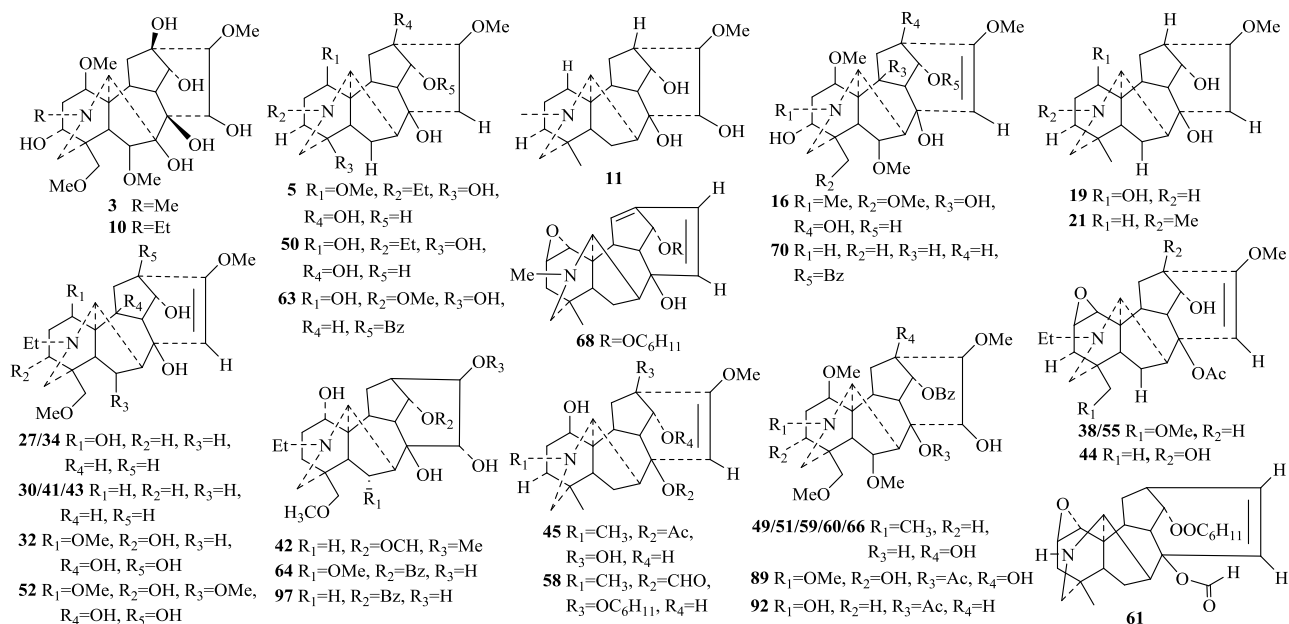


图 4 炮附片中新二萜类生物碱成分

Fig. 4 The structures of the new diterpenoid alkaloids compounds identified from PAC

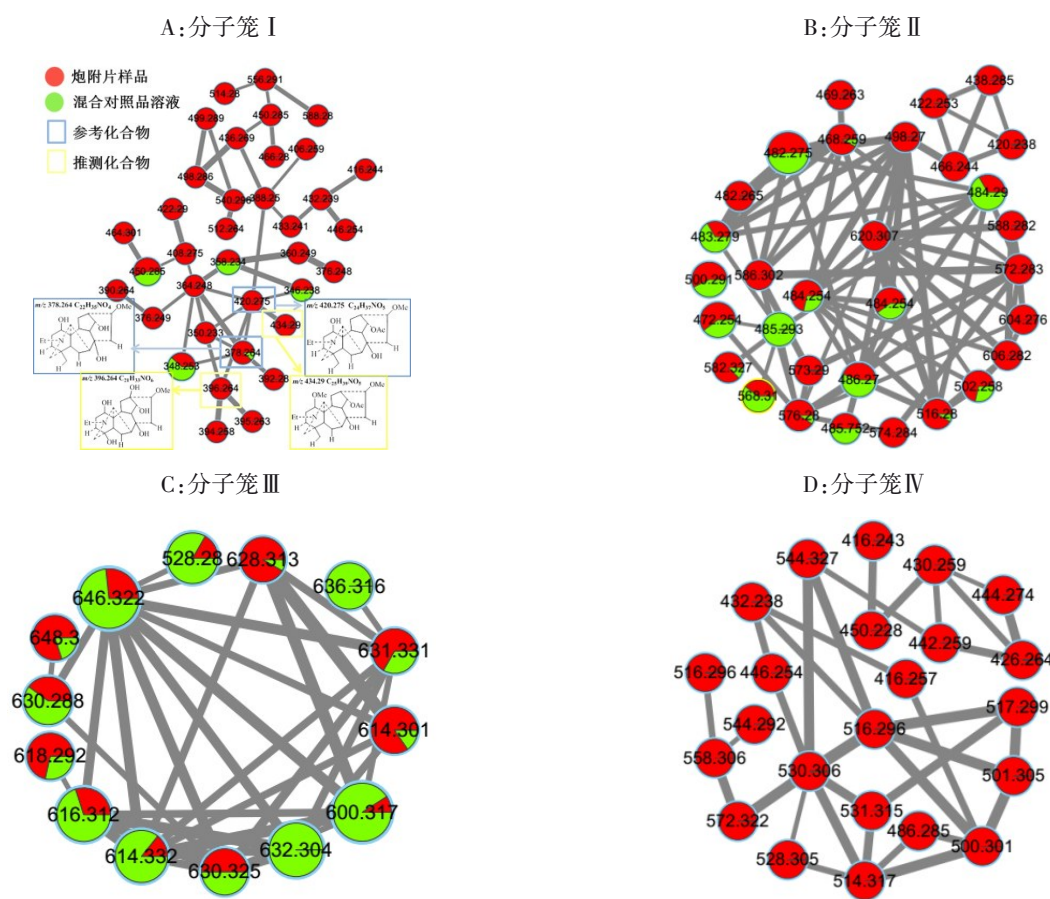


图 5 炮附片中 4 个二萜类生物碱分子笼

Fig. 5 The 4 clusters of the diterpenoid alkaloids from PAC

结合UPLC-Q-TOF-MS/MS策略,对PAC的成分进行快速表征。并根据化合物之间的MS/MS相似性,PAC提取物的GNPS分子网络被建立,通过GNPS分子网络去重复分析,成功地鉴定了与二萜类生物碱相关的4个分子笼。利用上述方法在PAC提取

物中共鉴定了123个二萜类生物碱,其中包括34个新二萜类生物碱。这些发现极大地扩展了我们对炮附片的化学物质基础的认识,有助于为进一步全面了解其药理活性,药效物质基础及质量控制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 191.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia (Part 1) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 191.
- [2] 陈思, 李武宏, 陈啸飞, 等. 附子生物碱化学成分和质量控制的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1709-1717.
CHENG S, LI W H, CHENG X F, et al. Research progress of components and quality control analysis of alkaloids in Fuzi [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(10): 1709-1717.
- [3] 袁雯. 附子的药理研究[J]. 中医临床研究, 2018, 10(4): 145-147.
YU W. A research on the pharmacological action of Fuzi [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2018, 10(4): 145-147.
- [4] TONG P, WU C, WANG X, et al. Development and assessment of a complete-detoxication strategy for Fuzi (lateral root of *Aconitum Carmichaeli*) and its application in rheumatoid arthritis therapy [J]. Journal of Ethno Pharmacology, 2013, 146(2): 562-571.
- [5] 郭志勇, 吕永磊, 许晓嘉, 等. 炮制对乌头各部位水煎液中生物碱的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1867-1870.
GUO Z Y, LU Y L, XU X J, et al. Study on influence of processing on contents of alkaloids in water decoction of each part of *Aconitum Carmichaelii* [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2014, 32(8): 1867-1870.
- [6] 曾璇, 苏薇薇, 白杨, 等. 同时测定人血浆中柚皮苷、柚皮素质量浓度的HPLC-MS/MS方法学[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2017, 56(1): 125-130.
ZENG X, SU W W, BAI Y, et al. HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of naringin and naringenin in human plasma [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2017, 56(1): 125-130.
- [7] YANG J Y, SANCHEZ L M, RATH C M, et al. Molecular networking as a dereplication strategy [J]. Journal of Nature Product, 2013, 76(9): 1686-1699.
- [8] XU Y, CAI H, CAO G, et al. Profiling and analysis of multiple constituents in Baizhu Shaoyao San before and after processing by stir-frying using UHPLC/Q-TOF-MS/MS coupled with multivariate statistical analysis [J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1083: 110-123.
- [9] TAN T, LUO Y, ZHONG C C, et al. Comprehensive profiling and characterization of coumarins from roots, stems, leaves, branches, and seeds of *Chimonanthus nitens*, Oliv. using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with modified mass defect filter [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2017, 141: 140-148.
- [10] WANG Y, FAN Q, XIANG J, et al. Structural characterization and discrimination of the *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by a molecular networking strategy coupled with ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2020, doi: 10.1002/rcm.8760.
- [11] YAN G, SUN H, SUN W, et al. Rapid and global detection and characterization of aconitum alkaloids in Yin Chen Si Ni Tang, a traditional Chinese medical formula, by ultra-performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry and automated data analysis [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical

- Analysis, 2010, 53(3): 421-431.
- [12] YUE H, PI Z, SONG F, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSⁿ [J]. Talanta, 2009, 77 (5): 1800-1807.
- [13] YING L, JIAN L W, ELAINE L, et al. Identification of oxygenated fatty acid as a side chain of Lipo-alkaloids in *Aconitum carmichaelii* by UHPLC-Q-TOF-MS and a database [J]. Molecules, 2016, 21 (4) : 437-441.
- [14] LIU X X, JIAN X X, CAI X F, et al. Cardioactive C₁₉-diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaeli* "Fu Zi" [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 60(1): 144-149.
- [15] SUN H, NI B, ZHANG A H, et al. Metabolomics study on Fuzi and its processed products using ultra-performance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition analysis [J]. Analyst, 2012, 137(1): 170-185.
- [16] LIU X X, TANG M H, WANG L, et al. Fragmentation study of aminoalcohol-diterpenoid alkaloids by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30(1): 161-169.
- [17] JIANG B Y, LI S, ZHU C G, et al. Diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaelai* [J]. Journal of Natural Products, 2012, 75(6): 1145-1159.
- [18] JAISWAL Y, LIANG Z, HO A, et al. Distribution of toxic alkaloids in tissues from three herbal medicine *Aconitum* species using laser micro-dissection, UHPLC - Q TOF MS and LC - MS/MS techniques [J]. Phytochemistry, 2014, 107: 155-174.
- [19] LIU Y, TAN P, LI F, et al. Study on the aconitine-type alkaloids of Radix Aconiti lateralis and its processed products using HPLC-ESI-MSⁿ [J]. Drug Testing Analysis, 2013, 5(6): 480-484.

(责任编辑 张 冰)