

基于植物代谢组学方法的马钱子油炸炮制前后化学差异研究

秦伟瀚, 阳 勇*, 李 卿, 王云红, 花 雷, 郭延奎

重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要:为对马钱子油炸炮制前后提取物的差异进行定性、定量研究, 实验采用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)采集数据, 结合 PeakView 软件、在线数据库等进行化学成分定性分析, 并采用 Analyst 工作站进行主要化学成分的含量测定, 将炮制前后离子数据导入 SIMCA-P 软件, 建立 OPLS-DA 数学模型, 进行差异性次生代谢产物分析。结果显示马钱子的成分类别主要包括生物碱、糖苷、脂肪酸酯和醇类, 其中检测到已知成分共 29 个, 未曾报道的化合物达 13 个; OPLS-DA 分析中最显著的化合物是土的宁、麦芽糖、Dattelic acid 和油酸; 定量分析结果表明油炸炮制后马钱子碱和土的宁的含量有所降低, 且土的宁的下降幅度略大于马钱子碱, 均能达到《中国药典》2015 年版马钱子项下要求。本研究通过多种手段探讨了油炸炮制前后马钱子化学成分变化情况, 结果表明炮制方法、减毒效果及化学成分间存在相关性, 为马钱子炮制机理解释及药效物质基础阐明提供新的思路和数据参考。

关键词:马钱子; 油炸炮制; 四级杆-飞行时间质谱; 化学差异

中图分类号: R917; R283

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0240-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.2.010

Study on the chemical difference between raw semen strychni and frying semen strychni based on plant metabolomics

QIN Wei-han, YANG Yong*, LI Qin, WANG Yun-hong, HUA Lei, GUO Yan-lei

Institute of medicinal chemistry of Chinese Medicine, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Qualitatively and quantitatively research the extracts of semen strychni before and after frying processing. Data acquisition by UPLC-Q-TOF-MS, and we made qualitative analysis of chemical composition in combination with PeakView software, online database, etc., used analyst workstation to determine the content of main chemical components, then the ion data before and after processing were imported into SIMCA-P software to establish the OPLS-DA mathematical model to carry out differential secondary metabolite analysis. The results showed that the constituents of semen strychni included alkaloids, glycosides, fatty acids and alcohols, 29 of the components were already known, while 13 compounds have not been reported. 12 differential biomarkers were identified by OPLS-DA analysis, the most prominent compounds are strychnine, maltose, dattelic acid and oleic acid. Quantitative analysis showed that the content of brucine and strychnine decreased after frying processing, and the reduction of strychnine is slightly larger than brucine, but it still meets the requirements of Pharmacopoeia. We explored the changes in the chemical compositions of semen strychni before and after the frying processing by various means in the study, the results showed that there was a correlation among processing methods, detoxification effect and chemical composition, and provide new ideas and data references for the explanation of the mechanization of semen strychni and the clarification of the pharmacodynamics.

Key words: semen strychni; frying processing; quadrupole time-of-flight mass spectrometry; chemical difference

马钱子为马钱科植物马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)或云南马钱(*Strychnos wallichiana* Steud Ex

DC.)的干燥成熟种子^[1-3]。具有散结消肿, 通络止痛之功效。中医临床常用于治疗跌打损伤, 痈疽肿痛, 风湿顽痹, 麻木瘫痪等证^[4]。油炸马钱始源于明代《鲁府秘方》, 清代《良朋汇集》中“用香油炸待浮起, 取出, 乘热去皮为末”是香油制马钱子的最早记载^[5,6]。由于马钱子的剧烈毒性, 极大的限制了

收稿日期: 2018-10-22 接受日期: 2018-12-18

基金项目: 国家重大新药创制项目(2017ZX09101002-002-004); 重庆市科技计划(cstc2018jxjl-jbky130005, cstc2017jxjl-jbky1300 02, cstc2018jsex-msybx0234)

* 通信作者 Tel: 86-23-89029061; E-mail: yangychem@126.com

其临床应用,马钱子通常要经过高温或加热炮制,历代医药文献记载的马钱子多使用炮制品,包括砂烫、油炸、醋制、阳江九制等十多种炮制方法,而今常用的仅砂烫和油炸两种^[7,8]。已往研究表明,马钱子受热后,其主要的毒成分土的宁、马钱子碱含量会有所降低,同时生成毒性更低、治疗效果更好的氮氧化物,增强了使用的安全性和有效性^[9,10]。目前报道的化学成分研究多以砂烫马钱子和生品为主^[11-13],油炸后马钱子化学成分研究鲜见报道,本研究结合定性、定量分析、OPLS-DA 分析,共同探讨马钱子油炸前后的化学变化,为马钱子炮制机理阐释及深入开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

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;AB4000 三重四级杆串联质谱;Triple TOFTM 4600 型四级杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国,AB 公司);Analyst 1.6 工作站、PeakView 1.2.0.3 数据处理软件;BJ-100 型超高速中药粉碎机(中国,德清拜杰电器有限公司);PBM-20 型球磨仪(中国,长沙中晶化工机械有限公司);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)。

马钱子碱(批号:10284-201611),土的宁(批号:10408-201611);均由南昌贝塔生物科技有限公司提供。乙腈、水(色谱纯级,德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯级,美国 ACS 公司);甲醇(分析纯,重庆川东化工公司);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:广西省),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马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)的干燥成熟种子。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱为 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,柱温:30 °C,进样量:2 μL。

1.2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(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):55 Psi;气帘气压力(CUR):20 Psi;辅助气压力(GS2):50 Psi;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。

1.2.3 样品溶液制备

取市售麻油 400 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^[5,14]。并将上述炮制前后马钱子粉碎后过 100 目筛,取粉末 0.2 g,精密称定,置 5 mL 试管中,精密加入 75% 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 80% 甲醇补足减失重量,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

1.2.4 对照品溶液制备

取适量马钱子碱、土的宁标准品于 10 mL 容量瓶中,加入色谱甲醇溶解定容至刻度,制成浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液,备用。

1.2.5 定性分析数据处理方法

查阅马钱子化学相关文献^[15,16],将化合物信息输入 PeakView 软件,建立马钱子已知成分筛查数据库;采用“样品溶液制备”方法对油炸及生品马钱子样品进行提取,并采用已建立的色谱、质谱条件对该样品数据进行采集。采集完成后,将上述数据导入 PeakView 软件,利用已建立的筛查数据库将满足质量误差小于 5 ppm、同位素分布正确且含有二级碎片的离子作为分析目标化合物,结合软件 Formula Finder、Mass Calculators 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,对马钱子炮制前后样品进行快速的定性鉴别分析。

1.2.6 OPLS-DA 分析数据处理方法

按照上述炮制方法制备油炸马钱子样品,并采用已建立的色谱质谱条件进行数据采集;将高分辨质谱采集到的数据导入 Notepad 软件,该软件会自动将离子精确质荷比、保留时间、强度等信息提取出来,并对每个离子进行编号;再将 Notepad 软件提取

的数据代入 SIMCA-P 14.1 软件进行 OPLS-DA 拟合,得到 Scatter 得分图及 S-plot 图,最终将分析结果代入 PeakView 软件对炮制前后差异性生物标志物进行定性分析鉴定。

1.2.7 Q-TOF 定量处理方法

马钱子碱母离子提取范围 395.18 ~ 395.20,定量离子提取范围 324.12 ~ 324.13,定性离子提取范围 244.09 ~ 244.10;土的宁母离子提取范围 335.16 ~ 335.18,定量离子提取范围 184.07 ~ 184.08,定性离子提取范围 264.10 ~ 264.11。

2 结果与讨论

2.1 油炸及生品马钱子定性分析

查阅文献,建立马钱子已知化学成分筛查数据库,对油炸及生品马钱子样品进行提取,Q-TOF 质谱进行数据采集(TIC 重叠图见图 1)。采用 PeakView

软件结合在线数据库、二级碎片裂解规律进行定性分析。据文献统计,马钱子已报道成分超过 60 个,本实验从油炸及生品马钱子的醇提样品中共找到 30 个化合物(表 1),检出率为 50%,并发现一个新成分,主要包括生物碱类、糖苷类、脂肪酸酯类、醇类等;检出个数最多的化合物种类为生物碱类,共 12 个;以往研究认为生物碱是马钱子的主要功效成分,亦是毒性成分,油炸法是通过高温降低马钱子碱和土的宁的含量,从而降低了毒性;同时马钱子碱和土的宁会转化为氮氧化物,而氮氧化物的毒性远低于两种原型,治疗效果却比原型要高,本实验仅检测出了马钱子碱氮氧化物。番木鳖次碱和马钱素仅在生品中检测到,而仅在油炸品中找到的成分为阿魏酸和羽扇豆醇,可能与高温炮制过程等因素相关。

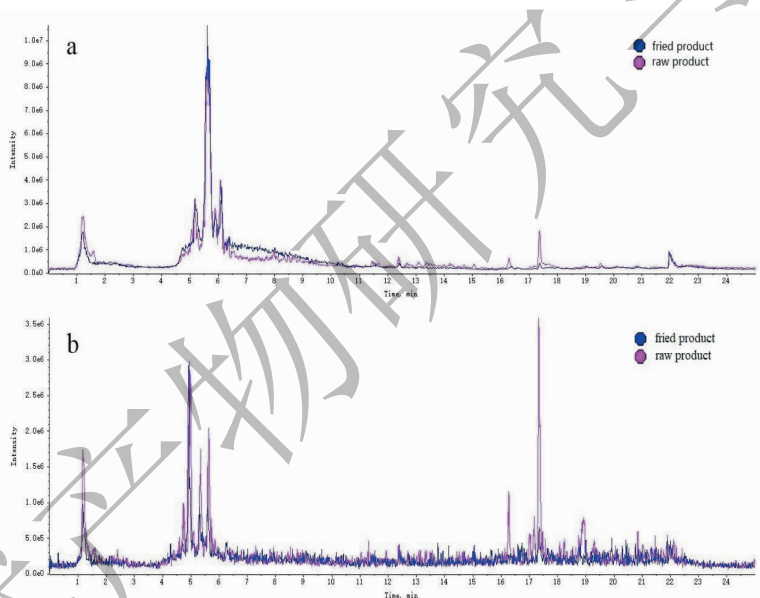


图 1 油炸品与生品总离子流重叠图

Fig.1 Overlapping chart of total ions chromatogram of fried product and raw product

注:(a)正离子模式下油炸品和生品的总离子流重叠图、(b)负离子模式下油炸品和生品的总离子流重叠图。

Note:(a)Tic overlap map in positive ion mode,(b)tic overlap map in negative ion mode.

表 1 油炸品及生品定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis results of fried product and raw product

保留时间 t_R (min)	离子峰归属 Ion mode	质荷比 Mass charge ratio (m/z)			偏差 Deviation (ppm)	分子式 Formula	鉴定结果 Identification results
		实测值 Measured mass	理论值 Calculated mass	二级碎片离子 MS/MS fragment ion			
3.41	[M-H] ⁻	125.024 0	125.024 4	107.013 9	-3.7	C ₆ H ₆ O ₃	麦芽酚 Matol
4.01	[M-H] ⁻	169.013 9	169.014 3	125.023 1	-2.3	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 Gallic acid

续表 1 (Continued Tab. 1)

保留时间 t_R (min)	离子峰归属 Ion mode	质荷比 Mass charge ratio (m/z)			偏差 Deviation (ppm)	分子式 Formula	鉴定结果 Identification results
		实测值 Measured mass	理论值 Calculated mass	二级碎片离子 MS/MS fragment ion			
4.70	[M+H] ⁺	268.103 8	268.104 0	136.060 7, 119.034 8	-1.0	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷 Adenosine
4.70	[M-H] ⁻	193.049 9	193.050 6	175.038 8	-3.6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸● Ferulic acid
4.83	[M-H] ⁻	375.129 2	375.129 7	213.076 2	-1.3	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	番木鳖苷酸 Loganic acid
5.05	[M-H] ⁻	299.112 8	299.113 6	137.057 0, 119.034 1	-2.6	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	毛柳苷 Salidroside
5.32	[M-H] ⁻	137.024 1	137.024 4	92.027 0	-2.4	C ₇ H ₆ O ₃	水杨酸 Hydroxybenzoic acid
5.41	[M-H] ⁻	109.029 5	109.029 5	91.019 5	-0.3	C ₆ H ₆ O ₂	儿茶酚 Catechol
5.53	[M+H] ⁺	355.102 3	355.102 4	163.038 4, 145.027 5	-0.2	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 Chlorogenic acid
5.53	[M-H] ⁻	153.018 8	153.019 3	125.023 7	-3.2	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸 Protocatechuic acid
5.70	[M+H] ⁺	353.185 5	353.186 0	335.173 1	-1.4	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	异伪番木鳖碱 Isopseudostrychnine
5.70	[M-H] ⁻	151.039 6	151.040 1	136.016 3	-3.3	C ₈ H ₈ O ₃	对羟基苯乙酸 Hydroxyphenylacetic acid
5.64	[M+H] ⁺	335.174 7	335.175 4	307.143 3	-2.0	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	土的宁 Strychnine
5.73	[M+H] ⁺	395.195 6	395.196 5	379.163 8	-2.2	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	马钱子碱 Brucine
5.74	[M+H] ⁺	425.205 9	425.207 1	368.147 3	-2.8	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	诺法生 Novacine
5.77	[M+H] ⁺	391.159 7	391.159 8	229.108 0	-0.3	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	马钱素▲ Loganin
5.87	[M+H] ⁺	411.189 9	411.191 5	394.186 5, 379.163 2	-3.8	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	马钱子碱 N-氧化物 Brucine N-oxide
5.94	[M+H] ⁺	351.168 7	351.170 3	334.166 4, 333.158 4	-4.7	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	4-羟基番木鳖碱 4-Hydroxystrychnine
5.96	[M+H] ⁺	365.185 1	365.186 0	308.126 5	-2.4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	可鲁勃林 Colubrine
6.16	[M+H] ⁺	381.179 3	381.180 9	364.175 9	-4.2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	2-羟基-3-甲氧基番木鳖碱 2-Hydroxy-3-methoxystrychnine
6.23	[M-H] ⁻	167.034 9	167.035 0	151.002 6	-0.6	C ₈ H ₈ O ₄	香草酸 Vanillic acid
6.32	[M-H] ⁻	207.065 9	207.066 3	189.053 6, 162.030 7	-1.9	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate
6.90	[M+H] ⁺	557.258 2	557.256 6	395.196 8	2.8	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O	番木鳖次碱▲ Vomicine
7.03	[M+H] ⁺	405.140 1	405.139 1	387.136 4	2.4	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	断氧化马钱子苷 Secoxyloganin
7.41	[M+H] ⁺	365.149 2	365.149 6	347.137 2	-1.0	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₄	18-O-伪马钱子碱 5-Oxopseudostrychnine
8.24	[M+H] ⁺	409.176 0	409.175 8	381.143 6	0.5	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₅	8-O-马钱子碱 5-Oxobrucine
15.96	[M+H] ⁺	457.367 9	457.367 6	411.366 9	0.8	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸 Ursolic acid
19.26	[M-H] ⁻	425.363 2	425.363 6	407.354 4, 363.360 4	-1.1	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	22-[(2-Methyl-2-propanyl)oxy]- 22-oxodocosanoic acid★
20.80	[M+H] ⁺	425.377 4	425.377 8	407.361 8	-1.0	C ₃₀ H ₄₈ O	5,6-羊齿烯醇 Simiarenol
20.90	[M+H] ⁺	427.391 8	427.393 4	409.378 2	-3.7	C ₃₀ H ₅₀ O	羽扇豆醇● Lupeol

注:●仅油炸中含有,▲仅生品中含有,★未报道成分。

Note:●Only fried product contain,▲only raw product contain,★new chemical constituents.

2.2 OPLS-DA 分析

将高分辨质谱检测的数据结果导入 SIMCA-P 软件(版本号:14.1),建立正交偏最小二乘数学模型;通过 OPLS-DA 分析共找到 17 个差异性生物标志物,包括生物碱类(7 个)、糖苷类(4 个)、有机酸类(5 个),其中 12 个成分为马钱子文献首次报道;

分析结果(表 2)显示在正离子模式下找到 7 个生物碱和 1 个二糖,在负离子模式下找到 3 个糖苷和 5 个有机酸;由得分图(图 2)可知,油炸品和生品数据点区分明显,表明马钱子经过油炸炮制后,化学成分有了显著变化。土的宁、麦芽糖、Dattelic acid 和油酸分别位于正、负离子下 S-plot 图的两端,说明经过

油炸炮制后这四种化合物变化是最为显著;有报道称土的宁的毒性是马钱子碱的 20 倍,而在 S-plot 图(图 3)中土的宁数据点明显比马钱子碱离轴更远,可以间接证实油炸炮制的减毒效果。生物碱是马钱子药理、毒理研究的重点和热点,在正离子模式下,炮制品与生品共找到 7 个生物碱类差异性标志物,

证明油炸炮制能有效降低生物碱含量,从而降低毒性。负离子模式下,找到 5 个有机酸类化合物,其中油酸广泛存在于动植物体内,被 OPLS-DA 识别出来,可能与该类化合物的高温分解有关;应该是造成其油炸炮制前后显著差异的原因。生物标志物的二级及裂解规律图见图 4。

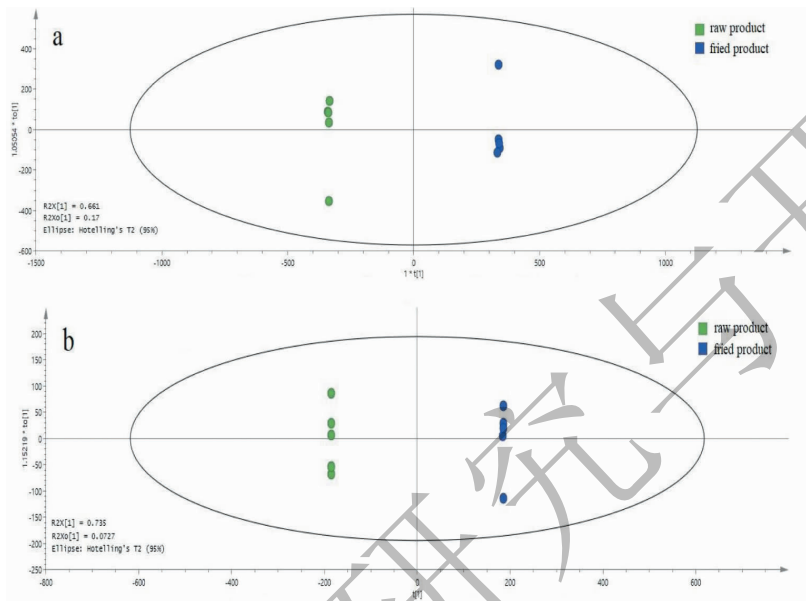


图 2 油炸品与生品 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 Score scatter plot of fried product and raw product

注:(a)正离子模式下得分图、(b)负离子模式下得分图。

Note:(a) Score scatter plot in positive ion mode,(b) Score scatter plot in negative ion mode.

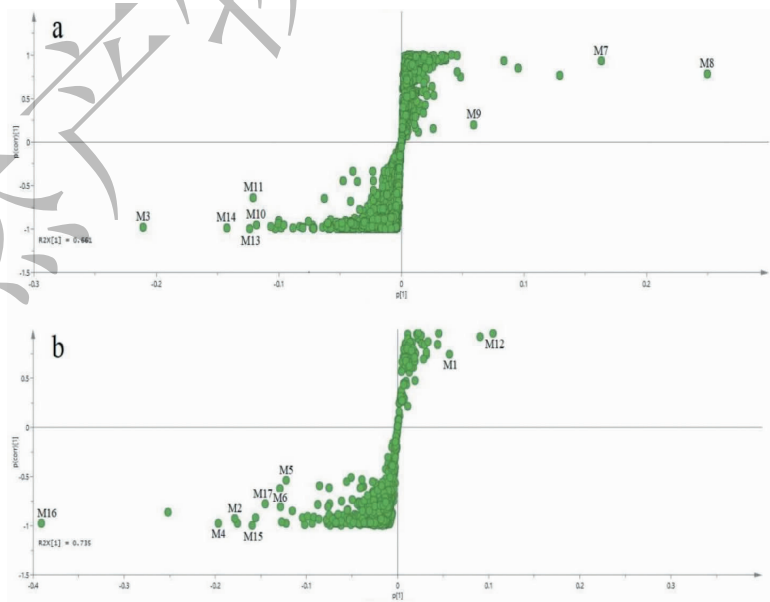


图 3 油炸品与生品的 S-plot 图

Fig. 3 S-plot chart of fried product and raw product

注:(a)正离子模式下 S-plot 图、(b)负离子模式下 S-plot 图。

Note:(a) S-plot in positive ion mode,(b) S-plot in negative ion mode.

表 2 生物标志物分析结果

Table 2 Analysis results of discrimination markers

ID 号 No.	保留时间 t_R (min)	离子归属 Ion mode	质荷比 Mass charge ratio (m/z)		误差 Deviation (ppm)	分子式 Formula	鉴定结果 Identification results	油炸品 平均强度 Intensity of fried product (psi)	生品平 均强度 Intensity of raw product (psi)
			实测值 Measured mass	理论值 Calculated mass					
			M1	1.19					
M2	1.19	[M-H] ⁻	387.111 2	387.111 3	-0.3	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	7-(α -D-Glucopyranosyloxy)- 2,3,4,5,6-pentahydroxyheptanoic acid★	13 997	147 369
M3	1.22	[M + Na] ⁺	365.104 8	365.105 1	-0.8	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	麦芽糖★ Maltose	64 574	248 589
M4	4.70	[M-H] ⁻	315.069 5	315.069 7	-0.5	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	b-D-Glucopyranose, 1-(2, 5-dihydroxybenzoate)★	48 441	289 948
M5	4.93	[M-H] ⁻	375.127 0	375.126 5	1.3	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	番木鳖苷酸 Loganic acid	391 668	739 924
M6	5.30	[2M-H] ⁻	707.179 9	707.179 9	-0.1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isobiflorin★	63 026	183 285
M7	5.55	[M + H] ⁺	349.190 3	349.190 2	0.2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₂	甲基土的宁★ Methyl strychnine	1 076 893	411 424
M8	5.61	[M + H] ⁺	335.174 8	335.174 7	0.3	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	土的宁 Strychnine	4 127 428	3 096 904
M9	5.70	[M + H] ⁺	395.195 6	395.195 7	-0.4	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	马钱子碱 Brucine	2 820 659	2 286 980
M10	5.86	[M + H] ⁺	411.190 6	411.191 6	-2.5	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	马钱子碱 N-氧化物 Brucine N-oxide	124 531	227 983
M11	6.13	[M + H] ⁺	381.180 5	381.180 7	-0.6	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	2-羟基-3-甲氧基番木鳖碱 2-Hydroxy-3-methoxystrychnine	389 579	1 446 089
M12	6.26	[M-H] ⁻	335.074 4	335.074 5	-0.4	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Dattelic acid★	67 546	2 754
M13	6.28	[M + H] ⁺	503.216 9	503.217 0	-0.1	C ₂₉ H ₃₀ N ₂ O ₆	Methyl-4-((2E)-3-(3, 4-diethoxyphenyl)-2- [(2-methylbenzoyl) amino]-2- propenoyl } amino) benzoate★	31 956	313 045
M14	6.37	[M + H] ⁺	443.196 0	443.196 2	-0.4	C ₂₇ H ₂₆ N ₂ O ₄	1-(4-Biphenylcarbonyl)-N-(2,3-dihydro- 1,4-benzodioxin-6-yl) 4- piperidinecarboxamide★	145 304	521 859
M15	16.27	[M-H] ⁻	279.230 6	279.230 8	-0.6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Dihomolinoleic acid★	12 815	282 776
M16	17.35	[M-H] ⁻	281.246 4	281.246 7	-1.0	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	油酸★ Oleic acid	147 250	1 769 543
M17	18.91	[M-H] ⁻	383.350 6	383.350 4	0.5	C ₂₄ H ₄₈ O ₃	2-羟基二十四烷酸★ Cerebronic acid	1 947	89 797

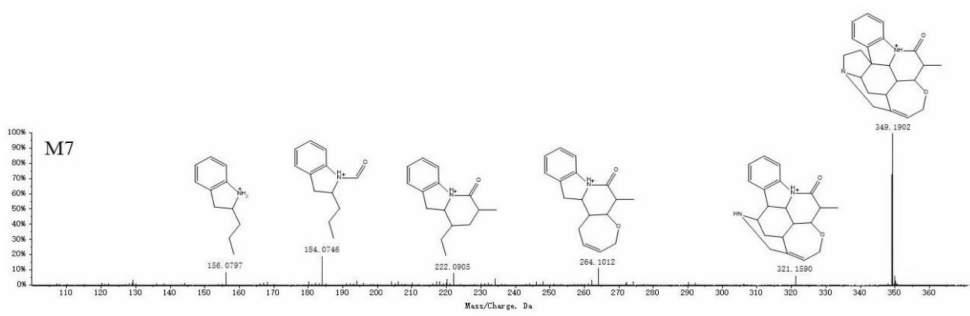
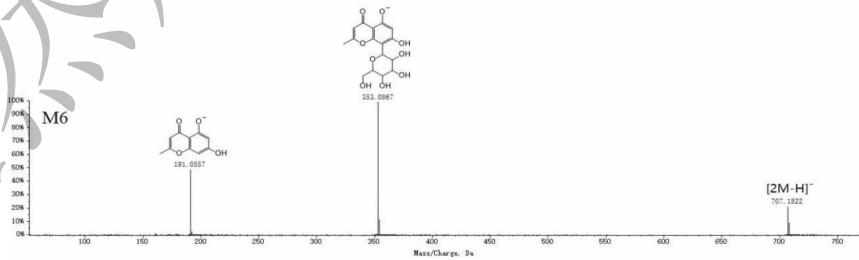
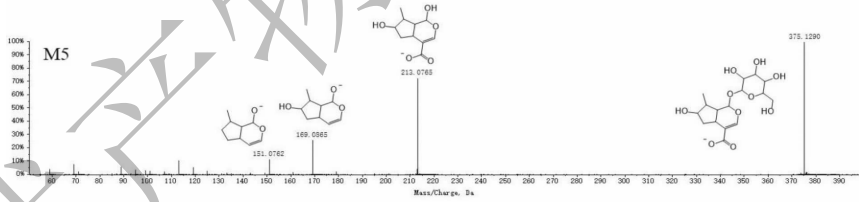
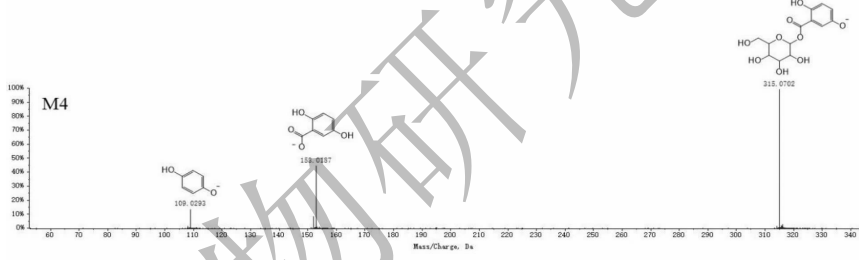
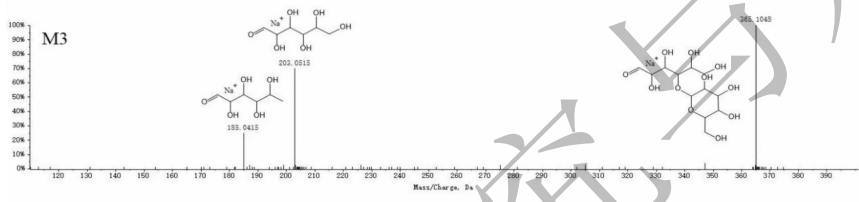
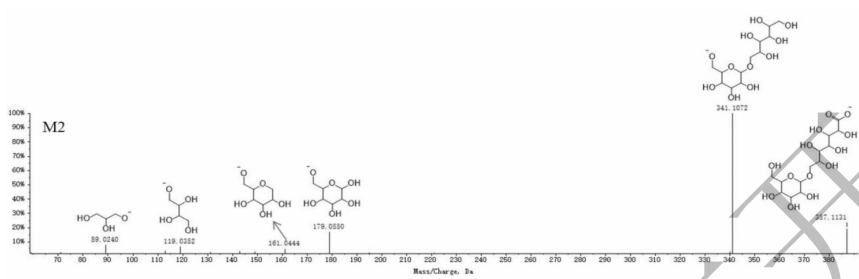
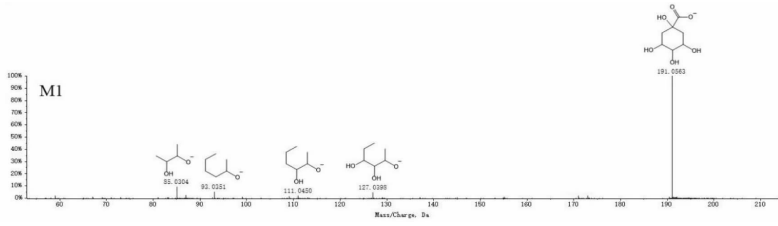
注:★未报道成分。

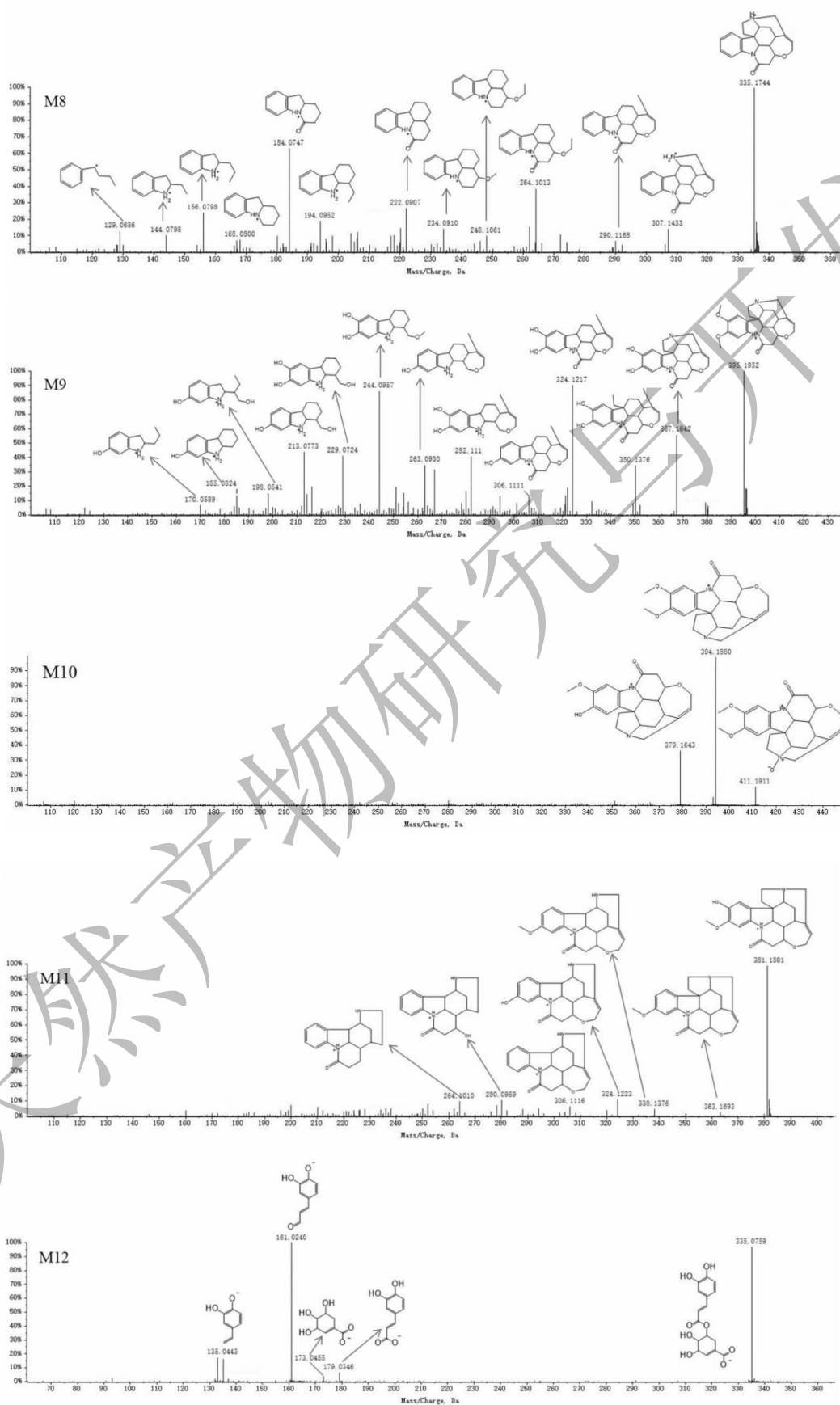
Note:★New chemical constituents.

2.3 主要化学成分含量分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS 对油炸品、生品马钱子中马钱子碱、土的宁含量进行检测,马钱子碱进样浓度在 0.099 ~ 990 ng/mL 范围与峰面积线性关系良好,线性回归方程为 $Y = 393.143 47X + 5 044.336 72$, $r = 0.999 4$;土的宁进样浓度在 0.11 ~ 1 100 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好,线性回归方程为 $Y = 360.336 74X + 6 145.348 92$, $r = 0.999 5$;马钱子碱在油炸、生品中平均含量分别为 1.14%、1.22%,土的宁在油炸、生品中平均含量分别为 1.29%、

1.55%。生物碱是马钱子研究的重点和热点,土的宁和马钱子碱占总碱的 80% 以上,一般认为马钱子碱和土的宁既是主要毒性成分又是主要的药效成分,由于两种物质的治疗窗口和毒性窗口十分接近,所以在用药之前大多会采取炮制以降低其毒性。通过相关专家及实验结果鉴定本研究采用的马钱子为《中国药典》规定品种,通过比较相关检测文献,其土的宁、马钱子碱的含量与实验结果接近,证明药材鉴定结果准确、可靠。本研究采用的炮制方法为油炸法,是马钱子的主要炮制方法。由定量检测结果





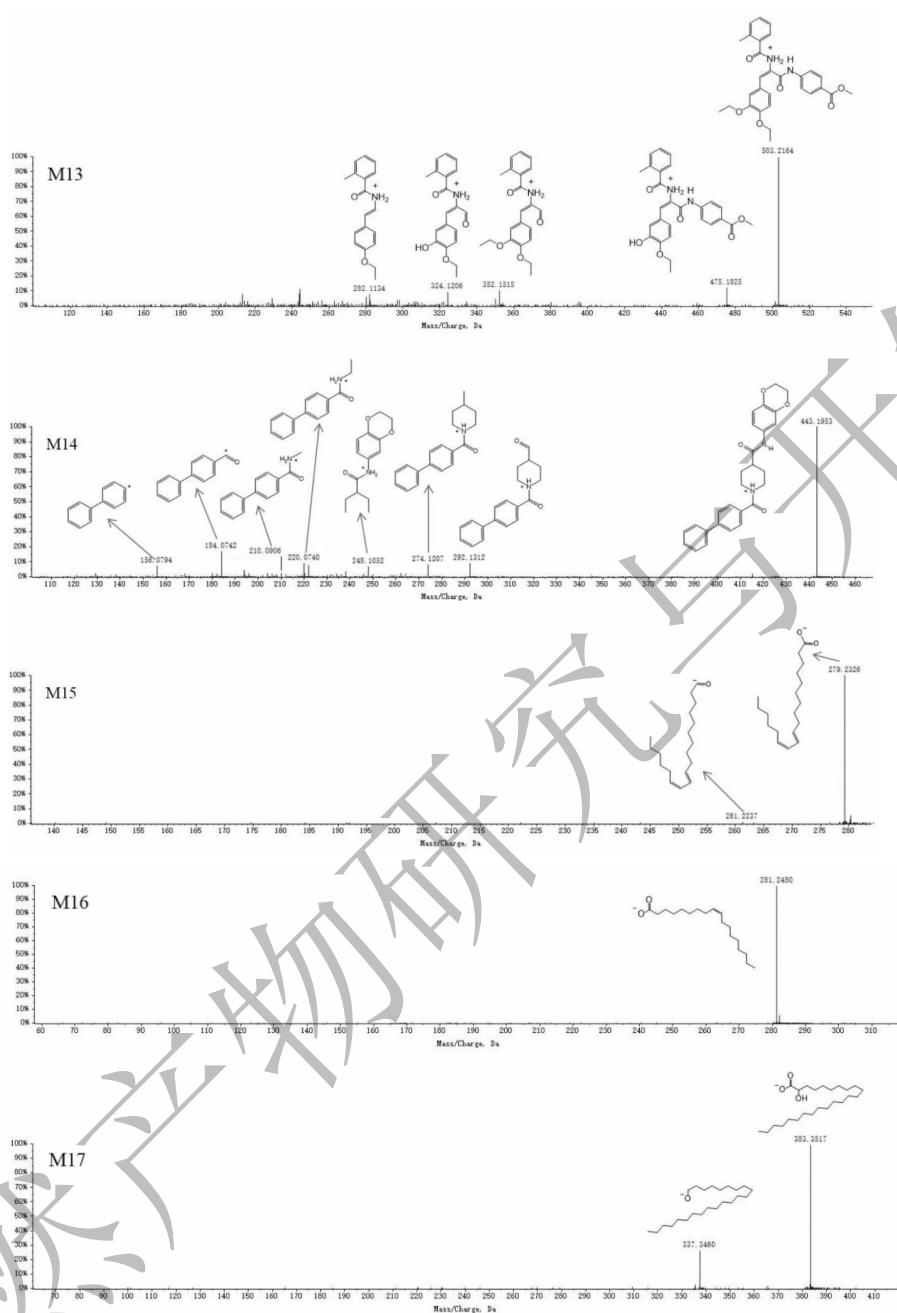


图4 差异性化合物的裂解规律图

Fig. 4 The possible fragmentation pathway of differential compounds

可以看出经过油炸炮制后土的宁和马钱子碱含量都有不同程度降低,但仍符合标准(土的宁应为1.20%~2.20%,马钱子碱不得少于0.80%)的要求,上述结论与OPLS-DA分析探讨结果一致。经文献证实,土的宁毒性是马钱子碱的20倍,定量结果显示,经油炸炮制之后,土的宁含量下降程度要高于马钱子碱,证明油炸炮制减毒效果尚佳。

3 结论

马钱子化学成分复杂,据报道该药材生物碱占

总成分的2%~5%,是研究的重点和热点,其中土的宁和马钱子碱占总碱的80%以上,是主要的毒性成分和功效成分^[17,18];油炸法早在明代就被《鲁府秘方》所记载,是至今为止马钱子沿用最为广泛的炮制方法。以上研究结果表明炮制前后差异最显著的成分是生物碱类(7个)和有机酸类(5个),可能与这两类化合物在高温下容易被氧化分解相关;结合定性、定量分析结果可知,马钱子碱和土的宁是差异显著成分之一,在炮制前后含量有不同程度降低,

但仍能达到药典规定。说明在油炸炮制过程中不仅降低了毒性,同时还保留了一定药效。本研究结果对马钱子炮制机理阐释具有重要意义,同时也为该药材的药效物质基础阐明提供科学依据。

参考文献

- Zhao YL, He YN, Yang JY, et al. Research progress on pharmacokinetics of strychnos nux-vomica and its preparation [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 1710-1714.
- Li YJ, Zhang XY, Guan QX, et al. Brucine progress and prospects [J]. Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报), 2011, 39: 104-106.
- Guo WS, Ding C, Wan TX, et al. Study of new method of selective separation of brucine in maqianzi [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2004, 16: 97-100.
- Dong JJ, Xi SJ, Zhang GF. Clinical application of semen strychni [J]. Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用), 2016, 10: 277-279.
- Shun LR, Yuan CH, Li XW, et al. Alkaloid constituents from frying seeds of struchnos nux-vomica [J]. J Honghe Univ (红河学院学报), 2011, 9(4): 5-8.
- Ji WP. Determination of strychnine in semen strychni before and after frying [J]. J Nanjing Coll Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 1996, 12(1): 47.
- Liu YJ, Wu BY, Xu Y, 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.
- Ling CZ. Overview of ancient and modern processing methods of strychni [J]. Chin J Ehenomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2011, 20(17): 31.
- Ren JJ, Zhang XS, Ze ZJ. Research of decreasing toxicity and increasing efficacy on semen strychni [J]. J Liaoning Univ TCM (辽宁中医药大学学报), 2016, 18: 221-224.
- Xu ZL. Study on processing and toxicity of strychnine [J]. Guide Chia Med (中国医药指南), 2013, 11: 682-683.
- Lee SM, Kwon JI, Choi YH, et al. Induction of G2/M arrest and apoptosis by water extract of strychni semen in human gastric carcinoma AGS cells [J]. Phytother Res, 2010, 22: 752-758.
- Duan XY. Optimal extraction technology of semen strychni by orthogonal design [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2007, 24: 375-377.
- Zou JG, Xu XL, Liu YY, et al. Ultrasonic-assisted extraction of alkaloids from semen strychni by response surface analysis [J]. Food Sci, 2009, 30: 111-114.
- Liu YW. Study on processing technology and HPLC fingerprint of semen strychni [D]. Beijing: Capital Normal University (首都师范大学), 2008.
- Xie BX, Tang WZ, Wang LH, et al. Study on chemical constituents of strychnos nux-vomica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中药材), 2016, 39(1): 86-89.
- Liu XM, Wang XM, Zhao JL, et al. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of strychnos nux vomica [J]. Inner Mongol J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2013, 32(14): 52-53.
- Xie BX, Tang WZ, Wang XJ. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of strychnos nux-vomica [J]. J Pharm Res (药学研究), 2014, 33: 603-606.
- Zu LT, Gong QF, Yi BX, et al. Research development of semen strychni on processing and chemical composition, pharmacology and toxicology [J]. Jiangxi College Tradit China Med (江西中医学院学报), 2012, 24(3): 98-100.
- Luo L, Dong JL, Zhu WX, et al. Purification of peroxidase from *Lonicera japonica* Thunb. by three phase partitioning and enzymatic properties [J]. Food Sci (食品科学), 2017, 38: 20-27.
- Deng B, Deng FM. Studies on purification and poperties of peroxidase in lotus sprout [J]. Food Mac (食品与机械), 2016, 32: 20-23.
- Du HX. Study on the oxidative degradation of bisphenol-A by horseradish peroxidase [D]. Shandong: Shandong University (山东农业大学), 2009.
- Duarte-Va'zquez MA, Ortega-Tovar MA, Garci'a-Almendarez BE, et al. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase [J]. J Chem Technol Biot, 2003, 78: 42-47.
- Klibanov AM, Tu TM, Scott KP. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters [J]. Science, 1983, 221: 259-261.

(上接第 344 页)

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- Hong J, Xiao Q, Zhao GH, et al. Purification and properties of peroxidase from the leaves of *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils and its function of removing bisphenol A [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 388-394.
- Song SS, Liu F, Liu W, et al. Comparison on enzymatic property of POD from *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl and *Chaenomeles spiciosa* (sweet) Nakai [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2014, 40: 137-142.
- Zhang C. Purification and thermostability of peroxidase from *Ginkgo biloba* L. leaves [D]. Hebei: Hebei University (河北大学), 2006.
- Xu ZY, Yan Q, Qiang Y, et al. Purification and enzymology property investigation on soybean peroxidase [J]. J Chinese Cereal Oil Assoc (中国粮油学报), 2006, 21: 82-85.