

高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱的 源内裂解-多级质谱法解析干燥恰特草中 卡西酮类生物碱成分

史洪飞¹, 徐伯芃¹, 权养科², 徐成鑫¹, 周修齐¹

(1. 南京警察学院刑事科学技术学院, 江苏 南京 210023;

2. 公安部鉴定中心, 北京 100038)

摘要:本研究基于高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF MS)的源内裂解-多级质谱法, 发现并解析了恰特草中未知卡西酮类生物碱成分。将恰特草粉碎后, 采用 0.05 mol/L HCl 水溶液提取, 二氯甲烷、NaOH 水溶液净化, ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱 (3.0 mm × 100 mm × 1.8 μm) 以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱。在一级质谱全扫描模式下, 通过卡西酮类生物碱的源内裂解特征实现未知卡西酮类生物碱成分的筛查; 在目标离子采集模式下, 基于未知卡西酮类生物碱成分的多级质谱裂解规律推测其分子结构。结果表明, 该方法可实现恰特草中未知生物碱成分的筛查和解析, 共识别出甲卡西酮、乙卡西酮和 2-氨基-1-苯基-1-丁酮等 3 种卡西酮类生物碱成分, 并采用标准物质对甲卡西酮和乙卡西酮进行确证, 但由于缺乏相应的标准物质, 2-氨基-1-苯基-1-丁酮有待进一步确证。本工作为恰特草中精神活性成分的进一步研究提供指引, 为其他领域未知化合物的解析提供参考。

关键词: 高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF MS); 源内裂解-多级质谱法; 恰特草; 卡西酮类生物碱; 未知物解析

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)02-0301-14

doi: 10.7538/zpxb.2023.0065

Analysis of Cathinone Alkaloids in Khat by HPLC-Q-TOF In-source Fragmentation Multistage Mass Spectrometry

SHI Hong-fei¹, XU Bo-peng¹, QUAN Yang-ke², XU Cheng-xin¹, ZHOU Xiu-qi¹

(1. College of Criminal Science and Technology, Nanjing Forest Police College, Nanjing 210023, China;

2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract: Khat is a kind of common drug plant. Many experiments have shown that the content of cathinone norpseudoephedrine and norephedrine in some varieties of Khat are similar. However, some studies showed that there are differences in the intensity of psychoactivity between these varieties. Therefore, it is speculated that other substances in Khat may affect the psychoactive strength of Khat. But currently there are some

difficulties in non-targeted screening of unknown compounds without mass spectrometry database information and standard solutions. In this paper, the unknown cathinone alkaloids in Khat were discovered and resolved by HPLC-Q-TOF MS in-source fragmentation multistage mass spectrometry. The separation was carried out on a ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl column (3.0 mm×100 mm×1.8 μm) with a gradient elution using 0.1% formic acid in water (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase. The mobile phase flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 30 °C. The screening of unknown cathinone alkaloid components was realized by the in-source cleavage characteristics of cathinone alkaloids in single-stage mass spectrometry under full-scan mode using an ESI ion source, and then the molecular structures of the unknown cathinone alkaloid components were deduced from the multi-stage MS cleavage patterns of the unknown cathinone alkaloid components in the target ion acquisition mode. The results showed that this method can effectively realize the screening and resolution of the unknown alkaloid components in Khat. A total of three cathinone alkaloid components, including methcathinone, ethcathinone and 2-amino-1-phenyl-1-butanone, were identified in Khat. Methcathinone and ethcathinone were corroborated using standard substances, and 2-amino-1-phenyl-1-butanone needs to be further corroborated due to the lack of corresponding standard substances. The work provides a guideline for the further study of the psychoactive components in Khat, and a reference for the analysis of unknown compounds in other fields.

Key words: high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF MS); in-source fragmentation multistage mass spectrometry; Khat; cathinone alkaloids; analysis of unknown compounds

恰特草 (*Catha edulis*, Khat) 又名阿拉伯茶、巧茶, 是无患子目、卫矛科、巧茶属常绿开花灌木, 主要生长在非洲东部、阿拉伯半岛海拔 1 500~2 500 m 的地区^[1-2]。埃塞俄比亚、也门等国家和地区的吸食人数较多^[3-4], 国内常出现在海关走私案件中。长期服用恰特草会造成抑郁症、口腔粘膜黑棘皮病^[5], 并对心脏、神经等组织器官造成严重损伤^[6]。2013 年, 国家食品药品监管总局、公安部、卫生计生委联合发布的《精神药品品种目录(2013 年版)》中明确规定, 将恰特草及其主要精神活性成分卡西酮(cathinone)列为第一类精神药品进行管制; 去甲伪麻黄碱(norpseudoephedrine)列为第二类精神药品进行管制^[7]; 去甲麻黄碱(norephedrine)的精神活性较弱, 未被列入管制目录。

由于实验材料获取困难, 国内开展恰特草理化检验的研究较少, 对于干燥恰特草中是否含有可检测含量的卡西酮成分一直存在争议。国外对恰特草中卡西酮、去甲伪麻黄碱、去甲麻

黄碱的研究较为全面, 植物体内不同部位^[9-14]、不同品种和产地恰特草间^[10,13,15-17]的 3 种生物碱成分含量的差异情况、含量随干燥和储存过程的变化情况^[11,18-23]、在植物和人体内的代谢途径^[10,13,24-29]、毒理学性质^[1,30-31]及提取检测方法等均有报道。目前, 对于不同品种恰特草中生物碱成分含量仍存在一定争议; 埃塞俄比亚人根据颜色对恰特草进行分类, 普遍认为相比于绿色恰特草, 红色恰特草中卡西酮含量更高, 精神活性作用更强^[16]; 但 Krizevski 等^[10]研究表明, 两者卡西酮含量相近, 且绿色品种中去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱含量更高。由此推测, 恰特草中可能存在其他物质直接或间接地增强了红色品种的精神活性作用。

相较于低分辨质谱法, 四极杆-飞行时间质谱法对前端色谱分离的依赖性较低, 拥有更高的检测通量^[32-33]; 当与高效液相色谱联用时, 其对同分异构体和结构类似物有更强的分辨能力^[34], 能够通过母离子和子离子的精确质量

数与质谱数据库或标准物质进行对照,实现已知^[35]和未知^[36-37]化合物的筛查确证,目前已广泛应用于未知化合物的筛查。但该方法在解析无质谱数据库信息的未知化合物结构时存在一定困难,需借助 Compound Discoverer、Molecular Structure Correlator 等软件解析化合物结构。源内裂解-多级质谱法通过提高离子传输电压,促使化合物发生源内裂解,选取碎片离子为目标离子进行多级质谱分析。Skibiński 等^[38]基于高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF MS),采用源内裂解-多级质谱法解析了帕利哌酮光降解产物的裂解路径,并推测了光降解产物的分子结构。

本研究将基于高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱的源内裂解-多级质谱法,发现并解析恰特草中甲卡西酮、乙卡西酮和 2-氨基-1-苯基-1-丁酮等 3 种生物碱,旨在恰特草中精神活性成分的进一步研究,并为合成药物结构解析、中药未知组分推测、法医毒物毒品分析等领域中结构相似化合物的研究提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 1290-6545 高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱仪:美国 Agilent 公司产品;ME104E 电子天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司产品;Lab Dancer 涡旋振荡仪:德国 IKA 公司产品;Pico17 微量高速离心机:美国 Thermo Fisher 公司产品;Milli-Q 纯水仪:美国 Millipore 公司产品。

恰特草:由国家林业局森林公安司法鉴定中心提供;卡西酮标准溶液(1 000 mg/L,纯度>99%):美国 Cerilliant 公司产品;甲卡西酮、乙卡西酮标准溶液(100 mg/L,纯度>99%):天津阿尔塔科技有限公司产品;浓盐酸、氢氧化钠、二氯甲烷、氯化钠:均为分析纯,南京化学试剂股份有限公司产品;甲醇、乙腈:均为色谱级,美国 Thermo Fisher 公司产品。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 混合标准储备溶液 精密移取 0.1 mL 卡西酮标准溶液和 1 mL 甲卡西酮、乙卡西酮标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,混匀,制成 10 mg/L 卡西酮、甲卡西酮、

乙卡西酮混合标准中间液。

1.2.2 混合标准工作溶液 用 0.1%甲酸水溶液将混合标准中间液稀释成 100 μg/L 卡西酮、甲卡西酮、乙卡西酮混合标准工作溶液。

1.3 实验条件

1.3.1 样品前处理条件 取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)粉碎后的干燥恰特草于 2 mL 聚丙烯离心管中,加入 1 mL 0.05 mol/L 盐酸水溶液,涡旋振荡提取 3 min,以 10 000 r/min 离心 3 min;取 600 μL 上层清液于 2 mL 离心管中,加入 1 mL 二氯甲烷,涡旋振荡 1 min,再以 10 000 r/min 离心 3 min;取 300 μL 上层清液于 2 mL 离心管中,加入 80 μL 1 mol/L 氢氧化钠水溶液,涡旋振荡 1 min,再加入 1 mL 乙腈,涡旋振荡 2 min,然后加入 0.4 g(精确至 0.000 1 g) NaCl 固体,涡旋振荡 1 min,以 10 000 r/min 离心 3 min;取 600 μL 上层清液,用 0.1%甲酸水溶液稀释 5 倍后进样分析。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl(3.0 mm×100 mm×1.8 μm);柱温 30 ℃;流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈;进样量 5 μL;流速 0.3 mL/min;梯度洗脱程序:0~3.0 min(5%B),3.0~7.0 min(5%~40%B),7.0~8.0 min(40%~60%B),8.0~10.0 min(60%B),10.0~10.5 min(60%~5%B),10.5~12.0 min(5%B)。

1.3.3 质谱条件 Dual AJS 电喷雾离子源(ESI),正离子模式;毛细管电压 4 000 V;鞘气温度 350 ℃,鞘气流速 11 mL/min;干燥气温度 320 ℃,干燥气流速 8 mL/min;狭窄同位素扫描范围(Iso. Width: Narrow~1.3 m/z);数据采集时采用参比离子($C_5H_4N_4$,嘌呤,准分子离子精确质量数为 121.050 9; $C_{18}H_{18}O_6$, HP-0921,准分子离子精确质量数为 922.009 8)实时校准质量。

1.3.4 源内裂解-多级质谱法 采用单级质谱全扫描模式(MS),全扫描范围 m/z 50~1 000,采集速率 5 spectra/s,设置毛细管出口区域的碎裂电压为 140、185 V,对目标成分进行一级质谱分析;然后采用目标离子采集模式(Target MS/MS),一级质谱扫描范围 m/z 100~1 000(采集速率 1 spectra/s),二级质谱扫描范围 m/z 50~500(采集速率 2 spectra/s),设置

碎裂电压为 140 V,碰撞能为 10、20、30、40 eV,对目标成分进行二级质谱分析,确定目标成分的源内裂解特征和二级质谱特征;最后在 Target MS/MS 采集模式下,设置碎裂电压为 185 V,碰撞能为 10、20、30、40 eV,对目标成分的源内裂解碎片进行二级质谱分析,实现目标成分的多级质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 恰特草中卡西酮的质谱裂解特征分析

2.1.1 卡西酮一级质谱及源内裂解特征分析

卡西酮的准分子离子为 $[M+H]^+$,精确质量数为 150.091 3。本团队^[39]通过优化碎裂电压为 140 V,使卡西酮的母离子响应达到最强。因此,本研究设置碎裂电压为 140 V,有效提高方法的灵敏度,有利于母离子的二级质谱分析,示于图 1a。当增强碎裂电压时,存在较强的源内裂解现象,卡西酮丢失 1 分子 H_2O 产生响应较强的 m/z 132.080 8 碎片离子,这是卡西酮类生物碱成分的特征碎片类型^[40]。当设置碎裂电压为 185 V 时,大部分母离子发生源内裂解,但仍存在部分母离子,示于图 1b,该条件既有利于源内裂解碎片的多级质谱分析,也可通过筛选在同一时间出现的离子 $[M+H]^+$ 和 $[M+H-18]^+$,即源内裂解特征为 $\{[M+H]^+ \rightarrow [M+H]^+ - H_2O\}$ 的组分,结合精确质量数计算该化合物分子式的双键等效数(double bound equivalent, DBE),实现恰特草中卡西酮类生物碱成分的筛查。

2.1.2 卡西酮多级质谱裂解路径分析 当碰撞能为 10 eV 时,基峰离子为 m/z 132.080 8

$[C_9H_{10}N]^+$,示于图 2a;碰撞能为 20、30 eV 时,基峰离子为 m/z 117.057 3 $[C_8H_7N]^+$,分别示于图 2b、2c;碰撞能为 40 eV 时,基峰离子为 m/z 77.038 6 $[C_6H_5]^+$,示于图 2d;其他主要碎片离子有 m/z 51.022 9、63.022 9、79.054 2、89.038 6、90.046 4、103.054 2、105.069 9、130.065 1,分子式分别为 $[C_4H_3]^+$ 、 $[C_5H_3]^+$ 、 $[C_6H_7]^+$ 、 $[C_7H_5]^+$ 、 $[C_7H_6]^+$ 、 $[C_8H_7]^+$ 、 $[C_8H_9]^+$ 、 $[C_9H_8N]^+$ 。卡西酮的质谱裂解路径示于图 3。

主要裂解路径 1:对碎片离子 m/z 132.080 8 进行二级质谱分析,首先丢失 1 分子 $\cdot CH_3$ 产生碎片离子 m/z 117.057 3,然后丢失 1 分子 HCN 产生碎片离子 m/z 90.046 4,再丢失 1 分子 $\cdot H$ 产生碎片离子 m/z 89.038 6,继续丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 63.022 9。

主要裂解路径 2:碎片离子 m/z 132.080 8 丢失 1 分子 HCN 产生碎片离子 m/z 105.069 9;对碎片离子 m/z 105.069 9 进行多级质谱分析,首先丢失 1 分子 H_2 产生碎片离子 m/z 103.054 2 或丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 79.054 2,其中,碎片离子 m/z 79.054 2 丢失 1 分子 H_2 产生碎片离子 m/z 77.038 6,其继续丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 51.022 9;对碎片离子 m/z 103.054 2 进行多级质谱分析,首先丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 77.038 6,再继续丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 51.022 9。

主要裂解路径 3:碎片离子 m/z 132.080 8 丢失 1 分子 H_2 产生碎片离子 m/z 130.065 1,对其进行多级质谱分析,首先丢失 1 分子 HCN 产生碎片离子 m/z 103.054 2,再陆续丢失 2 分

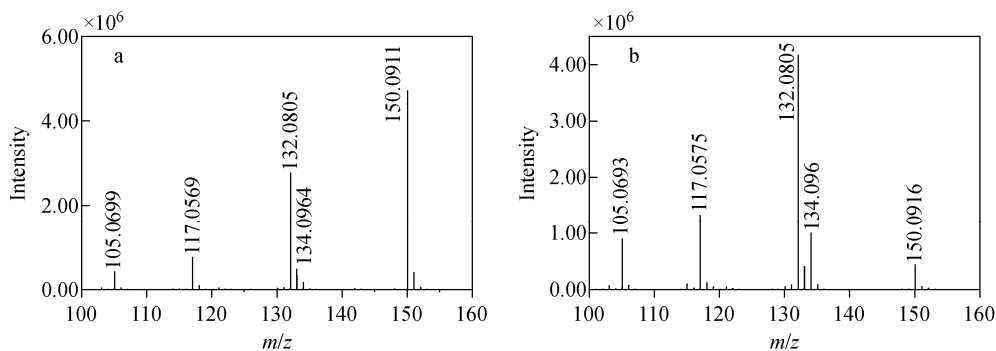


图 1 碎裂电压为 140 V(a)、185 V(b)时,卡西酮的一级质谱图

Fig. 1 Mass spectra of cathinone under fragmentation voltage of 140 V (a), 185 V (b)

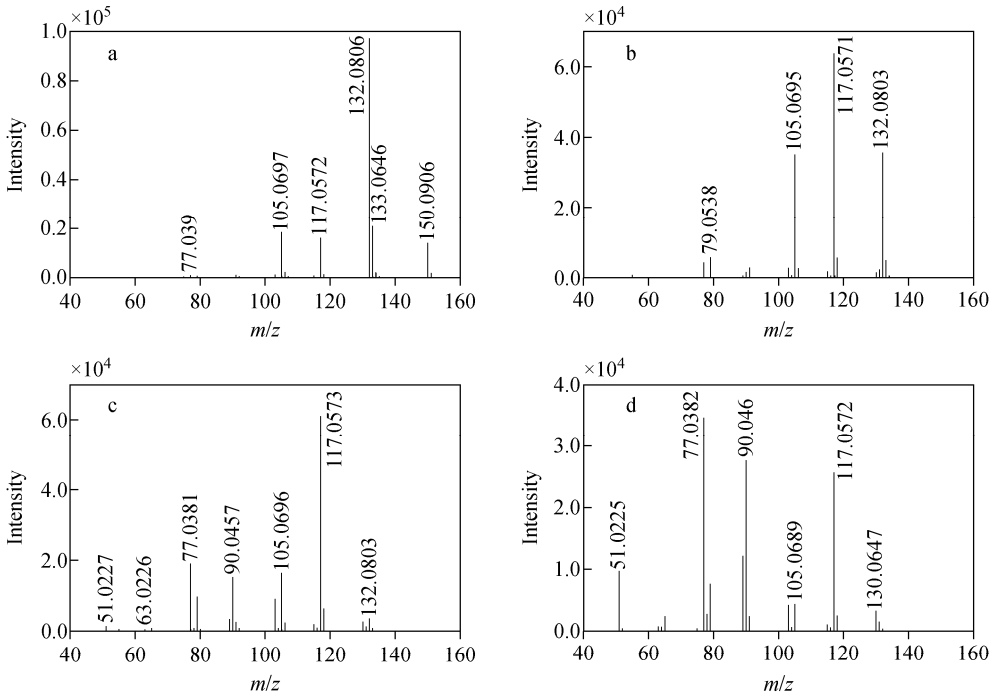


图 2 在 10(a)、20(b)、30(c)、40(d)eV 碰撞能下,恰特草样品中卡西酮成分的二级质谱图

Fig. 2 MS² spectra of the cathinone component in Khat under the collision energy of 10 (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d) eV

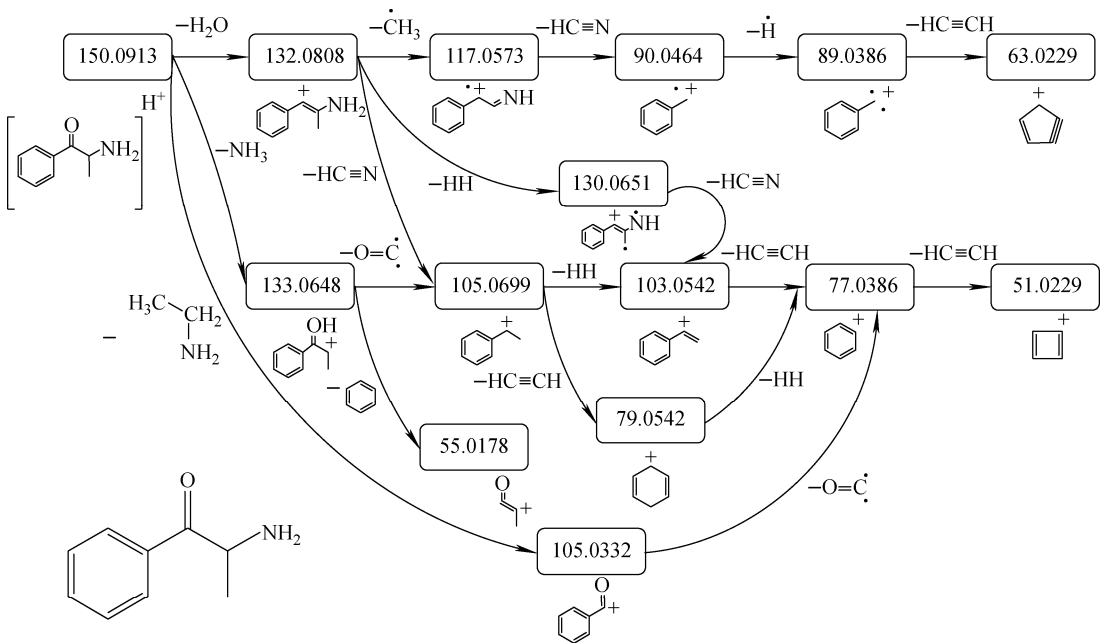


图 3 卡西酮的多级质谱裂解途径

Fig. 3 Multistage mass spectrometry fragmentation pathways of cathinone

子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 51.0229。

除主要的碎片离子外,对比准分子离子 m/z 150.0913 和碎片离子 m/z 132.0808 的

二级质谱数据发现, m/z 150.0913 可直接产生少量的 m/z 105.0335 $[C_7H_5O]^+$ 、133.0648 $[C_9H_9O]^+$ 碎片离子。

其他裂解路径 1: 碎片离子 m/z 133.064 8 的分子式中含有 O 原子, 为准分子离子 m/z 150.091 3 中性丢失 1 分子 NH_3 产生。对 m/z 133.064 8 进行多级质谱分析, 首先丢失 1 分子 $\cdot\text{C}_6\text{H}_5$ 产生碎片离子 m/z 55.017 8 或丢失 1 分子 $\text{C}=\text{O}$ 产生碎片离子 m/z 105.069 9, 然后 m/z 105.069 9 按照主要裂解路线 1 发生裂解。

其他裂解路径 2: 碎片离子 m/z 105.033 5 的分子式中含有 O 原子, 为准分子离子 m/z 150.091 3 中性丢失 1 分子 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ 产生。对碎片离子 m/z 105.033 5 进行多级质谱分析, 首先丢失 1 分子 $\text{C}=\text{O}$ 产生碎片离子 m/z 77.038 6, 然后再丢失 1 分子 C_2H_2 产生碎片离子 m/z 51.022 9。

2.1.3 卡西酮类生物碱的多级质谱特征 卡西酮类生物碱的结构通式示于图 4, 其准分子离子除丢失 1 分子 H_2O 的主要裂解路径外, 还

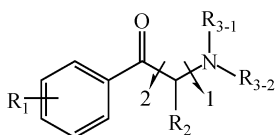


图 4 卡西酮类生物碱成分的结构通式

Fig. 4 Structural general formula of cathinone alkaloids

表 1 筛选出的 4 种化合物的保留时间、准分子离子、分子式、双键等效数

Table 1 Retention time, precursor ions, molecular formulas, double bound equivalent of the 4 selected compounds

编号 No.	保留时间 Retention time/min	准分子离子 Precursor ion (m/z)	分子式 Molecular formula	双键等效数 Double bound equivalent
1	5.84	150.0913	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$	5
2	6.32	164.1070	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$	5
3	6.70	178.1226	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}$	5
4	6.73	164.1070	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$	5

2.3 3 种未知生物碱成分的质谱裂解路径分析及化合物结构推断

参照 1.3.4 节条件对 3 种未知生物碱进行多级质谱分析, 解析质谱裂解路径, 推断化合物分子结构。

2.3.1 2 号化合物 准分子离子 m/z 164.107 0 在 10 eV 碰撞能下的基峰离子为 m/z 146.096 4 $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}]^+$, 示于图 6a; 在 20 eV 碰撞能下的

存在 2 条丢失含氮基团的其他裂解路径 1, 即在 1 号位发生断裂, 据此可判断 N 原子上 R_{3-1} 和 R_{3-2} 位点的取代情况; 以及其他裂解路径 2, 即在 2 号位发生断裂, 据此判断 R_2 位点的取代情况。综合以上 2 种碎片离子, 可判断 R_1 位点的取代情况。

2.2 恰特草中卡西酮类生物碱成分的提取与筛查

2.2.1 提取检测 卡西酮类生物碱多为水溶性生物碱, 在酸性条件下为离子状态, 易溶于水, 不溶于非极性有机溶剂; 在碱性条件下为分子状态, 易溶于极性有机溶剂。通过优化提取溶剂种类、提取方法和净化条件, 采用溶剂萃取法实现恰特草中生物碱成分的提取。按照 1.3 节方法提取 100 mg 粉碎后的干燥恰特草中生物碱成分, 采用 MS 采集模式, 设置碎裂电压为 140 V 进行检测。

2.2.2 筛查 使用 Qualitative Analysis B.07.00 软件提取化合物, 筛选在同一时间出现离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ 的化合物, 根据精确质量数计算化合物分子式, 进而计算双键等效数 (DBE), 筛选 DBE 为 5 (即分子结构中可能存在 1 个苯环和 1 个双键的化合物), 确定包括卡西酮在内的 4 种组分, 结果列于表 1, 4 种化合物的提取离子色谱图示于图 5。

基峰离子为 m/z 131.073 0 $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}]^+$, 示于图 6b; 在 30、40 eV 碰撞能下的基峰离子为 m/z 130.065 1 $[\text{C}_9\text{H}_8\text{N}]^+$, 分别示于图 6c、6d; 其他主要碎片离子为 m/z 51.022 9、63.022 9、65.038 6、77.038 6、79.054 2、89.038 6、91.054 2、103.054 2、105.069 9、119.085 5, 经计算, 分子式分别为 $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$ 、 $[\text{C}_5\text{H}_3]^+$ 、 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$ 、 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ 、 $[\text{C}_6\text{H}_7]^+$ 、 $[\text{C}_7\text{H}_5]^+$ 、 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ 、 $[\text{C}_8\text{H}_7]^+$ 、

$[\text{C}_8\text{H}_9]^+$ 、 $[\text{C}_9\text{H}_{11}]^+$ 。对2号化合物进行多级质谱分析,裂解途径示于图7。

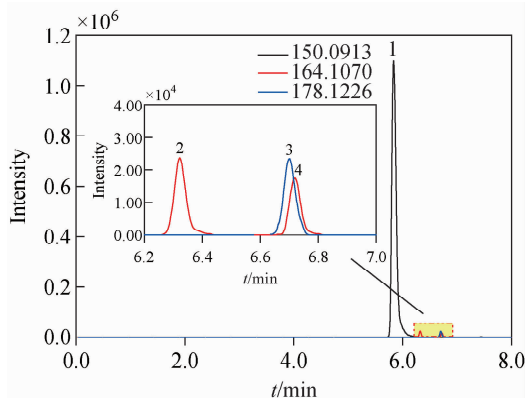


图5 筛选出的4种化合物提取离子色谱图

Fig. 5 Extraction ion chromatograms of the 4 selected compounds

对比准分子离子 m/z 164.1070和碎片离子 m/z 146.0964的二级质谱数据,2号化合物的准分子离子 m/z 164.1070可丢失1分子 NH_2CH_3

产生碎片离子 m/z 133.0648,推断在 R_3 位存在1个甲基;还可丢失1分子 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 产生碎片离子 m/z 105.0335;二者的多级质谱裂解途径与2.1.2节的其他裂解路径1、2相同,可推断2号化合物在 R_2 位存在1个甲基或在羰基与仲胺基间存在2个亚甲基,该化合物可能为甲卡西酮或3-甲基-1-苯基-1-丙酮。

在碎片离子 m/z 146.0964的质谱裂解过程中,多数碎片离子丢失1分子 $\cdot\text{CH}_3$ 产生碎片离子 m/z 131.0730,对其进行多级质谱分析,部分丢失1分子 $\cdot\text{CH}_3$ 产生碎片离子 m/z 116.0495,可推断该化合物的结构中存在2个甲基,为甲卡西酮成分。

2.3.2 3号化合物 准分子离子峰 m/z 178.1226在10 eV碰撞能下的基峰离子为 m/z 160.1121 $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}]^+$,示于图8a;在20 eV碰撞能下的基峰离子为 m/z 131.0730 $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}]^+$,示于图8b;在30、40 eV碰撞能下的基峰离子为 m/z 130.0651 $[\text{C}_9\text{H}_8\text{N}]^+$,分别示于图8c、8d;

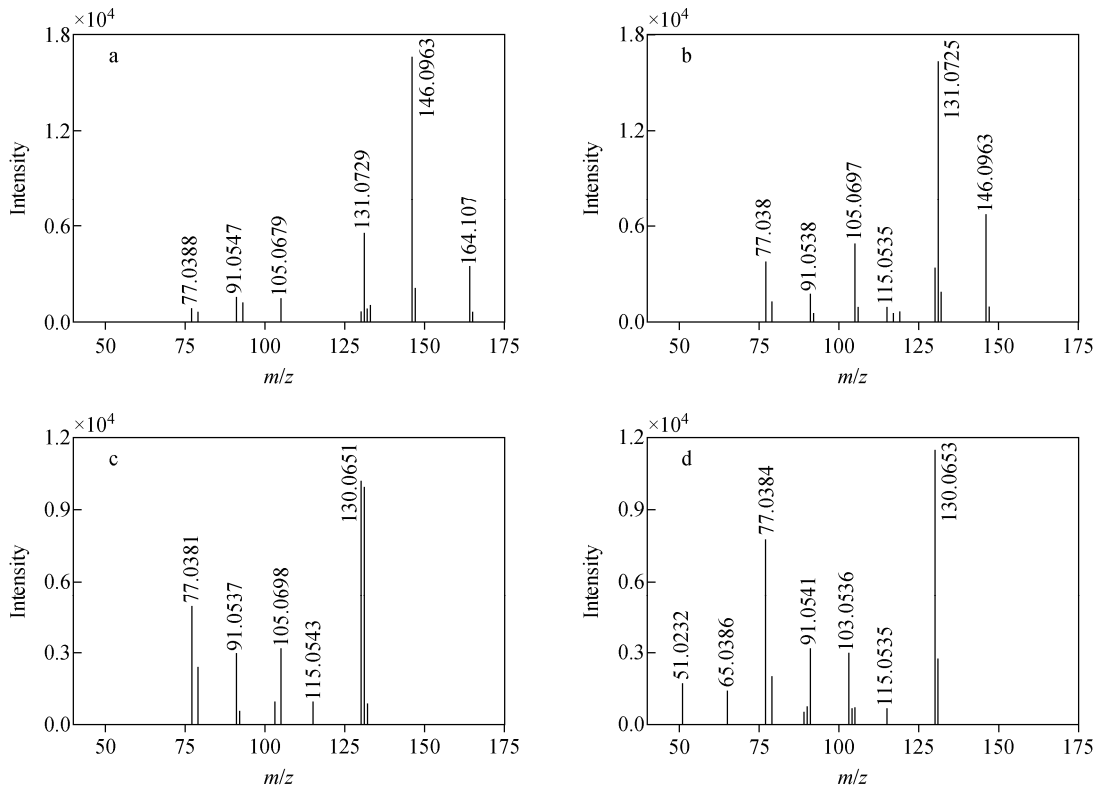


图6 在10(a)、20(b)、30(c)、40(d) eV碰撞能下,恰特草样品中2号化合物的二级质谱图

Fig. 6 MS^2 spectra of the compound No. 2 in Khat under the collision energy of 10 (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d) eV

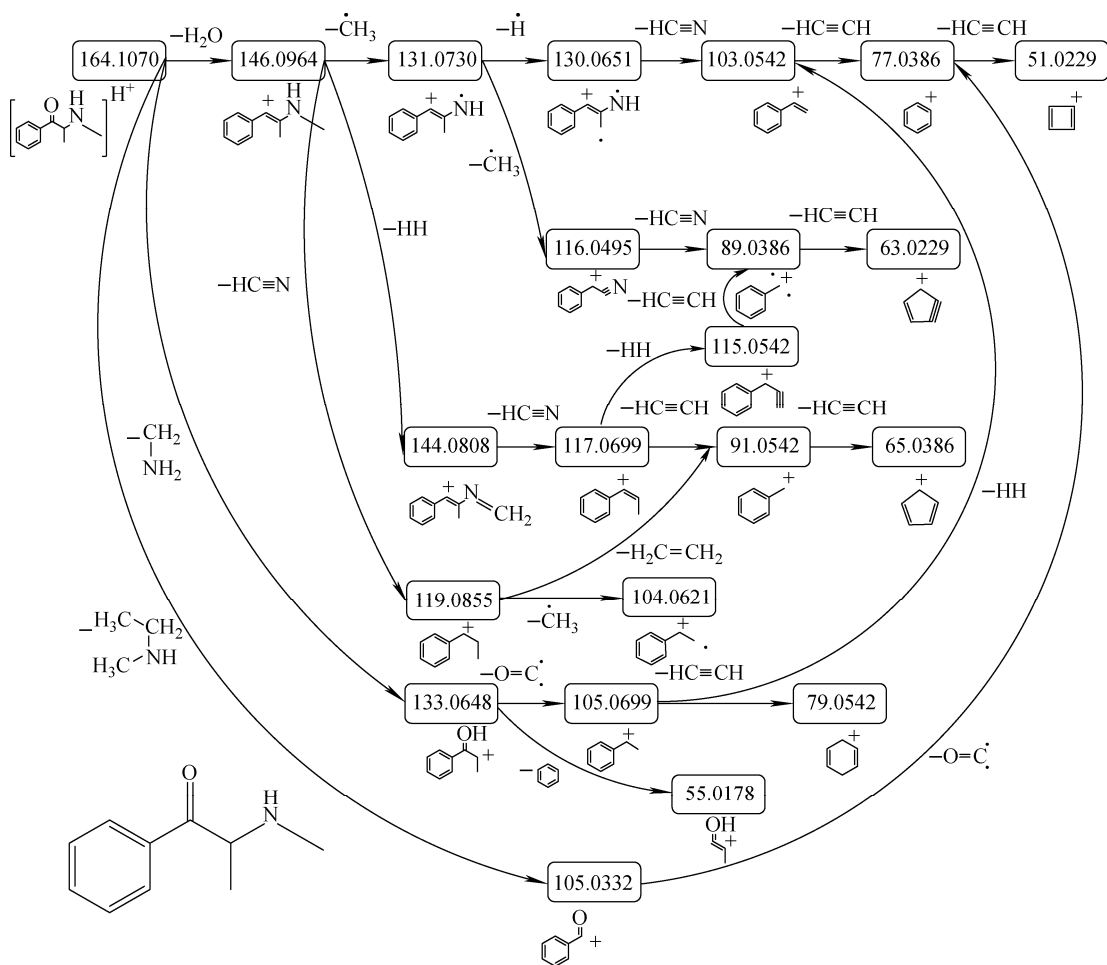


图 7 2号化合物的多级质谱裂解途径

Fig. 7 Multistage mass spectrometry fragmentation pathways of compound No. 2

其他主要碎片离子为 m/z 51.022 9、63.022 9、65.038 6、77.038 6、79.054 2、89.038 6、90.046 4、91.054 2、103.054 2、105.069 9、117.057 3、132.080 8、133.065 0、145.088 6, 经计算, 分子式分别为 $[C_4H_3]^+$ 、 $[C_5H_3]^+$ 、 $[C_5H_5]^+$ 、 $[C_6H_5]^+$ 、 $[C_6H_7]^+$ 、 $[C_7H_5]^+$ 、 $[C_7H_6]^+$ 、 $[C_7H_7]^+$ 、 $[C_8H_7]^+$ 、 $[C_8H_9]^+$ 、 $[C_8H_7N]^+$ 、 $[C_9H_{10}N]^+$ 、 $[C_9H_9O]^+$ 、 $[C_{10}H_{11}N]^+$ 。对3号化合物进行多级质谱分析, 裂解途径示于图9。

对比准分子离子 m/z 178.122 6和碎片离子 m/z 160.112 1的二级质谱数据, 3号化合物的准分子离子 m/z 178.122 6可丢失1分子 $NH_2C_2H_5$ 产生碎片离子 m/z 133.065 0, 判断在 R_3 位存在1个乙基或2个甲基; 还可丢失1分子 $C_2H_5NHC_2H_5$ 产生碎片离子 m/z 105.033 2, 推断在 R_2 位存在1个甲基, 该化合物可能为乙

卡西酮或甲胺苯丙酮。

在碎片离子 m/z 160.112 1的裂解过程中, 多数碎片离子丢失1分子 $\cdot CH_2CH_3$ 产生碎片离子 m/z 131.073 0, 因此, 在 R_3 位存在1分子 $\cdot CH_2CH_3$, 该化合物为乙卡西酮。

2.3.3 4号化合物 准分子离子 m/z 164.107 0在10 eV碰撞能下的基峰离子为 m/z 146.096 4 $[C_{10}H_{12}N]^+$, 示于图10a; 在20、30、40 eV碰撞能下的基峰离子为 m/z 91.054 2 $[C_7H_7]^+$, 分别示于图10b、10c、10d; 其他主要碎片离子为 m/z 51.022 9、63.022 9、65.038 6、69.033 5、77.038 6、89.038 6、103.054 2、117.057 3、118.065 1、130.065 1, 经计算, 分子式分别为 $[C_4H_3]^+$ 、 $[C_5H_3]^+$ 、 $[C_5H_5]^+$ 、 $[C_4H_5O]^+$ 、 $[C_6H_5]^+$ 、 $[C_7H_5]^+$ 、 $[C_8H_7]^+$ 、 $[C_8H_7N]^+$ 、 $[C_8H_8N]^+$ 、 $[C_9H_8N]^+$ 。对4号化合物进行多级质谱分析, 裂解途径示于图11。

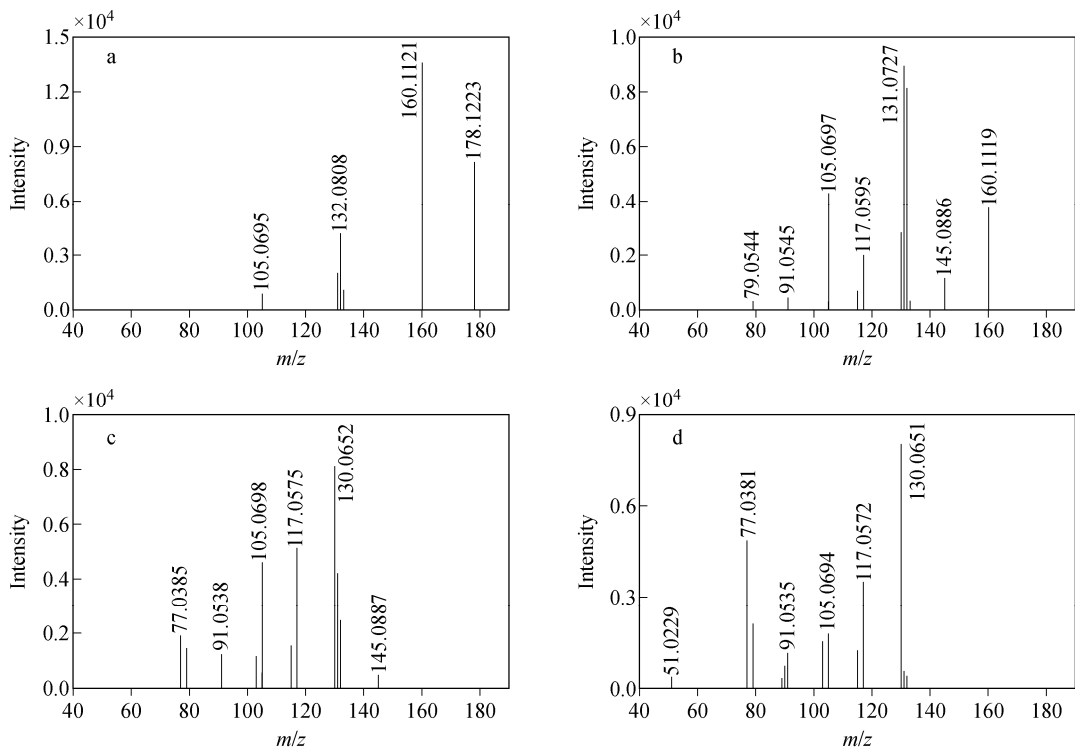


图 8 在 10(a)、20(b)、30(c)、40(d) eV 碰撞能下,恰特草样品中 3 号化合物的二级质谱图

Fig. 8 MS² spectra of the compound No. 3 in Khat under the collision energy of 10 (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d) eV

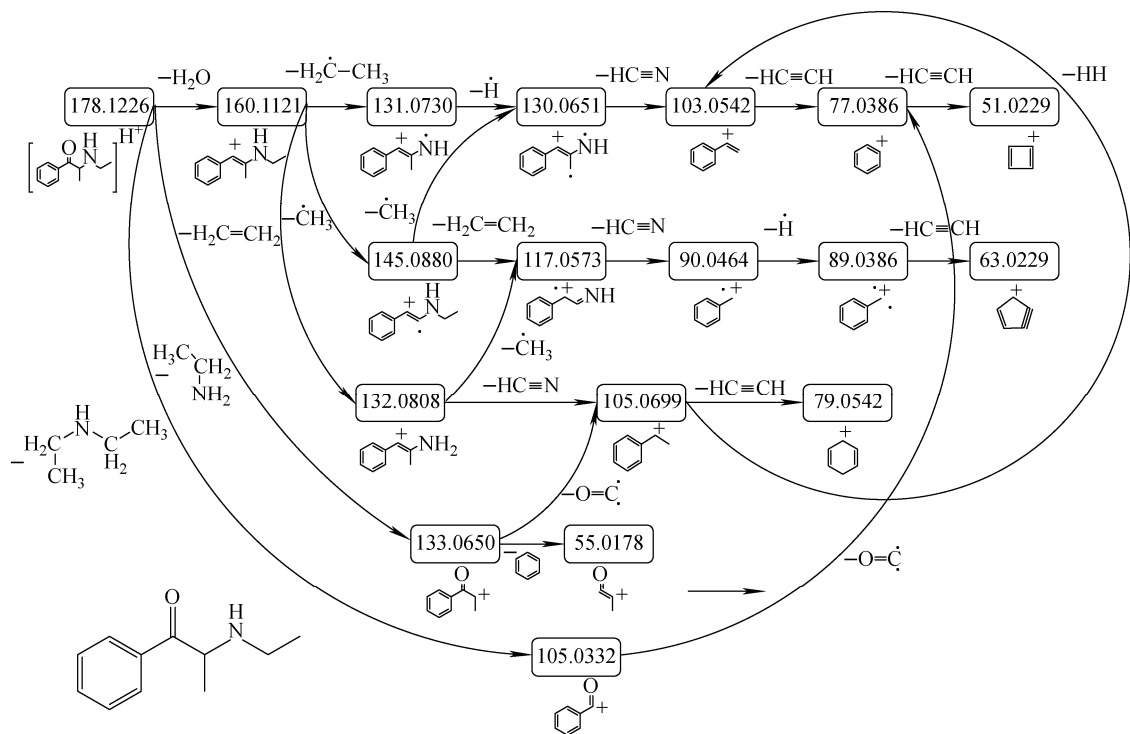


图 9 3 号化合物的多级质谱裂解途径

Fig. 9 Multistage mass spectrometry fragmentation pathways of compound No. 3

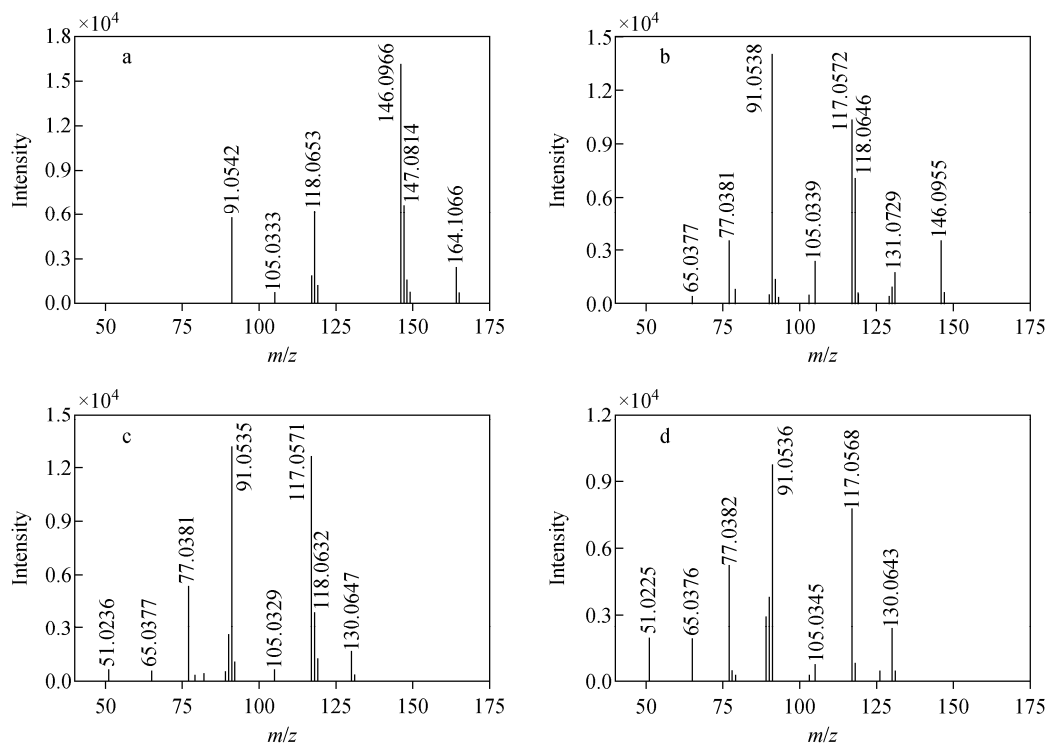


图 10 在 10 (a)、20 (b)、30 (c)、40 (d) eV 碰撞能下, 恰特草样品中 4 号化合物的二级质谱图

Fig. 10 MS² spectra of the compound No. 4 in Khat under the collision energy of 10 (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d) eV

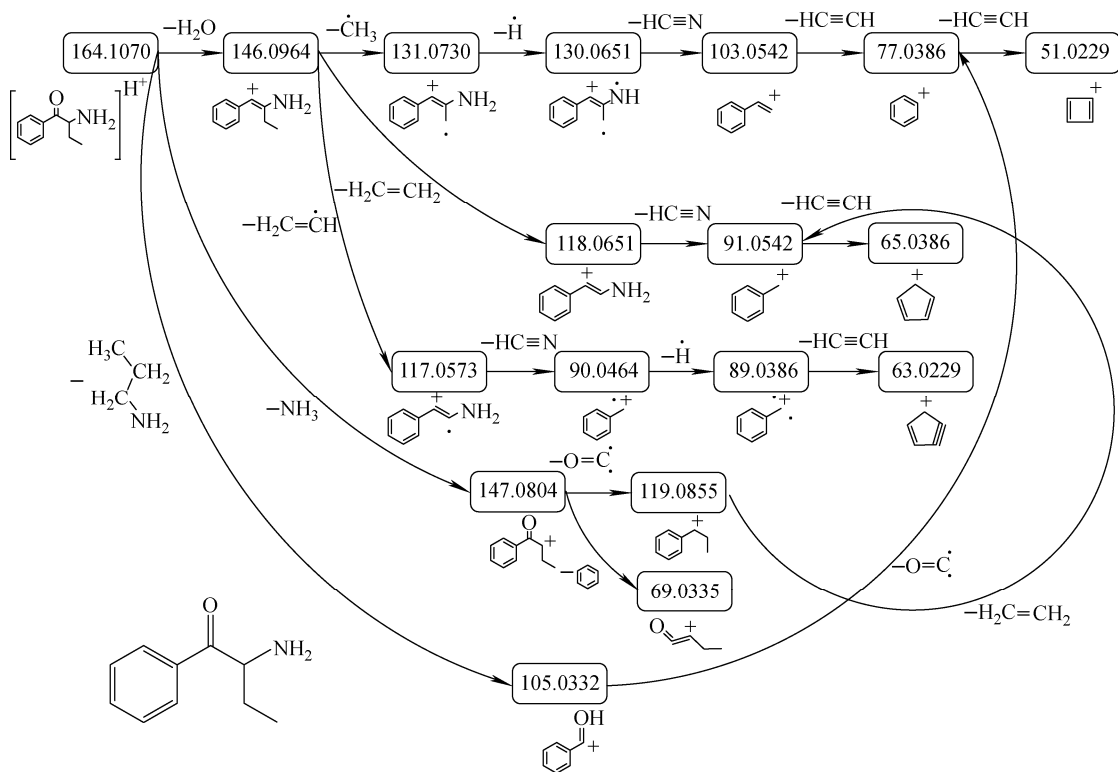


图 11 4 号化合物的多级质谱裂解途径

Fig. 11 Multistage mass spectrometry fragmentation pathways of compound No. 4

对比准分子离子 m/z 164.107 0 和碎片离子 m/z 146.096 4 的二级质谱数据,4 号化合物的准分子离子 m/z 164.107 0 可直接产生碎片离子 m/z 147.080 4、105.033 2。 m/z 147.080 4 的分子式为 $[C_{10}H_{11}O]^+$, 其裂解途径与其他裂解路径 1 相似,即丢失 1 分子 $\cdot C_6H_5$ 产生碎片离子 m/z 69.033 5 或丢失 1 分子 $C=O$ 产生碎片离子 m/z 119.085 5; m/z 105.033 5 的多级质谱裂解途径与 2.1.2 节中其他裂解路径 2 相同。准分子离子 m/z 164.107 0 可丢失 1 分子 NH_3 产生碎片离子 m/z 147.080 4, 推断 4 号化合物在 R_3 位点无取代基还可丢失 1 分子 $CH_3CH_2CH_2NH_2$ 产生碎片离子 m/z 105.033 2。因此,该化合物可能在 R_2 位点存在 1 个乙基,在羰基与伯胺基间存在 2 个亚甲基和 1 个甲基,在羰基与伯胺基间存在 3 个亚甲基这 3 种类型的结构,推测可能为 2-氨基-1-苯基-1-丁酮、3-氨基-2-甲基-1-苯基-1-丙酮、3-氨基-1-苯基-1-丁酮或 4-氨基-1-苯基-1-丁酮。

在碎片离子 m/z 146.096 4 的质谱裂解过程中,部分碎片离子丢失 1 分子 $\cdot CH_2CH_3$ 产生碎片离子 m/z 117.057 3。因此,4 号化合物在 R_2 位存在 1 个乙基,为 2-氨基-1-苯基-1-丁酮。

2.4 未知生物碱成分的确证分析

按照 1.3 节方法,对国家林业局森林公安司法鉴定中心受理的 15 份干燥恰特草检材进行检测,利用甲卡西酮和乙卡西酮标准物质进行确证,参照《法庭科学 生物检材中中毒毒品定性定量检验方法通用要求》标准中的化合物定性条件,发现保留时间和 20、30、40 eV 碰撞能下的基峰离子质荷比偏差均能够满足要求,各碎片离子的丰度比相似,结果列于表 2。15 份干燥恰特草检材中均检出甲卡西酮、乙卡西酮成分,以及疑似 2-氨基-1-苯基-1-丁酮的 4 号化合物。但由于 2-氨基-1-苯基-1-丁酮较少见,未购得该成分的标准物质,其具体结构有待进一步确证。

表 2 甲卡西酮、乙卡西酮化合物的确证分析

Table 2 Confirmatory analysis of the methcathinone and ethcathinone

化合物 Compound	标准样品保留时间 Retention time of standard sample/min	实测样品保留时间 Retention time of measured sample/min	保留时间 相对标准偏差 RSD of retention time/%	理论质荷比 Theoretical value (m/z)	实测样品 质荷比 Measured value (m/z)	质量偏差 Mass value deviation/ $\times 10^{-6}$
甲卡西酮	6.409	6.401	0.12	164.107 0	164.106 7	1.83
				146.096 4	146.095 8	4.11
				131.073 0	131.072 1	6.87
				130.065 1	130.065 0	0.77
乙卡西酮	6.749	6.737	0.18	178.122 6	178.121 9	3.93
				160.112 1	160.111 3	4.99
				131.073 0	131.072 1	6.87
				130.065 1	130.064 2	6.92

3 结论

本研究基于高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱,采用源内裂解-多级质谱法,分析了卡西酮的源内裂解特征和质谱裂解规律,并解析了干燥恰特草中类似卡西酮结构的化合物,利用标准物质进行确证,发现干燥恰特草中存在甲卡西酮和乙卡西酮。由于缺少相应的标准物质,其中是否存在 2-氨基-1-苯基-1-丁酮有待进

一步研究。本研究为恰特草中精神活性成分的进一步研究提供指引,为合成药物结构解析、中药未知组分推断、法医毒物毒品分析等领域中结构相似化合物的发现和解析提供参考。

参考文献:

- [1] ENGIDAWORK E. Pharmacological and toxicological effects of *Catha edulis* F. (Khat)[J].

- Phytotherapy Research, 2017, 31(Suppl): 1 019-1 028.
- [2] 滕姣, 赵丹, 陈学国. 恰特草成分及毒理作用研究进展[J]. 山东化工, 2018, 47(18): 50-51, 56. TENG Jiao, ZHAO Dan, CHEN Xueguo. Research progress of constituents and toxicology of Khat[J]. Shandong Chemical Industry, 2018, 47(18): 50-51, 56(in Chinese).
- [3] HIRPA S, FOGARTY A W, ADDISSIE A, BAULD L, FRESE T, UNVERZAGT S, KANTELHARDT E J, GETACHEW S, DERESSA W. Prevalence and risk factors for tobacco, Khat, and alcohol consumption among high school students in Ethiopia[J]. BMC Public Health, 2023, 23(1): 226-235.
- [4] SILVA B, SOARES J, ROCHA-PEREIRA C, MLADĚNKA P, REMIÃO F. Khat, a cultural chewing drug: a toxicokinetic and toxicodynamic summary[J]. Toxins, 2022, 14(2): 71-83.
- [5] HAMAD A, ASHWAG A, RANA A, ABDULAZIZ A, SHAHAD A, FATIMAH A, GHADEER A, RANA A. Habitual Khat chewing and oral melanoacanthoma: a case report [J]. World Journal of Clinical Cases, 2023, 11(2): 449-455.
- [6] KASSAW E A, ABOYE G T, YILMA D, DHABA S, SIMEGN G L. The impact of Khat chewing on heart activity and rehabilitation therapy from Khat addiction in healthy Khat chewers [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 220 083-220 093.
- [7] 陈云霞. 新型毒品原植物恰特草走私犯罪特点与防控对策研究[J]. 森林公安, 2019(4): 13-15. CHEN Yunxia. Study on the characteristics and countermeasures of smuggling[J]. Forest Public Security Bureau, 2019(4): 13-15(in Chinese).
- [8] 申钰柯, 刘陈业, 周旦, 陈鹏生, 陈云霞. DNA 条形码在新型毒品原植物恰特草种属鉴定中的应用研究[J]. 森林公安, 2017(3): 29-31. SHEN Yuke, LIU Chenye, ZHOU Dan, CHEN Pengsheng, CHEN Yunxia. Application of DNA barcoding in identification of new drug species [J]. Forest Public Security Bureau, 2017(3): 29-31(in Chinese).
- [9] TEMBROCK L R, BROECKLING C D, HEUBERGER A L, SIMMONS M P, STERMITZ F R, UVAROV J M. Employing two-stage derivatisation and GC-MS to assay for cathine and related stimulant alkaloids across the celastraceous [J]. Phytochemical Analysis, 2017, 28(4): 257-266.
- [10] KRIZEVSKI R, DUDAI N, BAR E, LEWIN-SOHN E. Developmental patterns of phenylpropylamino alkaloids accumulation in Khat (*Catha edulis*, Forsk.) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 114(3): 432-438.
- [11] LAUSSMANN T, MEIER-GIEBING S. Forensic analysis of hallucinogenic mushrooms and Khat (*Catha edulis* Forsk) using cation-exchange liquid chromatography [J]. Forensic Science International, 2010, 195(1/2/3): 160-164.
- [12] GAMBARO V, ARNOLDI S, COLOMBO M L, ACQUA L D, GUERRINI K, RODA G. Determination of the active principles of *Catha edulis*: quali-quantitative analysis of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine [J]. Forensic Science International, 2012, 217(1/2/3): 87-92.
- [13] MATHYS K, BRENNEISEN R. HPLC and TLC profiles of phenylalkylamines of Khat (*Catha edulis* Forsk.) confiscated in Switzerland [J]. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1993, 68(2): 121-128.
- [14] Dhabbah A M. Determination of chiral cathinone in fresh samples of *Catha edulis* [J]. Forensic Science International, 2020, 307(1): 110 115-110 134.
- [15] AL-THOBHANI M, SURESH N S. First comparative genotypic study on Khat (*Catha edulis* Forsk.) genotypes from Yemen [J]. Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology, 2008, 2(1): 1-8.
- [16] GEISSHUSLER S, BRENNEISEN R. The content of psychoactive phenylpropyl and phenylpentenyl khatamines in *Catha edulis* Forsk. of different origin [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1987, 19(3): 269-277.
- [17] ATLABACHEW M, TORTO N, CHANDRAVANSI B S, REDI M. Matrix solid-phase dispersion for the HPLC-DAD determination of psychoactive phenylpropylamino alkaloids from Khat (*Catha edulis* Forsk) chewing leaves [J]. Chromatographia, 2013, 76(7/8): 401-408.
- [18] KRIZEVSKI R, DUDAI N, BAR E, DESSOW I, RAVID U, LEWINSOHN E. Quantitative

- stereoisomeric determination of phenylpropylamino alkaloids in Khat (*Catha edulis* Forsk.) using chiral GC-MS[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2008, 56(3): 207-213.
- [19] ATILAW Y, DAGNE E, ADUGNA Y, KEBEDE E. Determination of levels of cathine in Khat (*Catha edulis*) leaves and its detection in urine of Khat chewers; a preliminary report[J]. Ethiopian E Journal for Research & Innovation Foresight, 2010(1): 7-22.
- [20] SZENDREI K. The chemistry of Khat[J]. Bulletin on Narcotics, 1980, 32(3): 5-35.
- [21] ATLABACHEW M, CHANDRAVANSI B S, REDI-ABSHIRO M, CHIGOME S, TORTO N, PULE B O. Evaluation of the effect of various drying techniques on the composition of the psychoactive phenylpropylamino alkaloids of Khat (*Catha edulis* Forsk) chewing leaves[J]. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 2013, 27(3): 347-358.
- [22] LEE M M. The identification of cathinone in Khat (*Catha edulis*): a time study[J]. Journal of Forensic Sciences, 1995, 40(1): 116-121.
- [23] CHAPPELL J S, LEE M M. Cathinone preservation in Khat evidence via drying[J]. Forensic Science International, 2010, 195(1/2/3): 108-120.
- [24] BERRANG B D, LEWIN A H, CARROLL F I. Enantiomeric alpha-aminopropiophenones (cathinone): preparation and investigation[J]. J Org Chem, 1982, 47(13): 2 643-2 647.
- [25] REIST M, CHRISTIANSEN L H, CHRISTOFFERSEN P, CARRUPT P A, TESTA B. Low configurational stability of amfepramone and cathinone; mechanism and kinetics of chiral inversion[J]. Chirality, 1995, 7: 469-473.
- [26] KRIZEVSKI R, BAR E, SHALIT O, SITRIT Y, BEN-SHABAT S, LEWINSOHN E. Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf[J]. Phytochemistry, 2010, 71(8/9): 895-903.
- [27] KRIZEVSKI R, BAR E, DUDAI N, ASAF L, EFIAIM L, YARON S, SHIMON B S. Naturally occurring norephedrine oxazolidine derivatives in Khat (*Catha edulis*)[J]. Planta Medica, 2012, 78(8): 838-842.
- [28] BRENNEISEN R, GEISSHÜSLER S, SCHORNO X. Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1986, 38(4): 298-300.
- [29] SPORKERT F, PRAGST F, BACHUS R, MASUHR F, HARMS L. Determination of cathinone, cathine and norephedrine in hair of Yemenite Khat chewers[J]. Forensic Science International, 2003, 133(1/2): 39-46.
- [30] Peter K. *Catha edulis*, a plant that has amphetamine effects[J]. Pharmacy World & Science, 1996, 18: 69-73.
- [31] AL-MOTARREBA A, AL-HABORIB M, BROADLEY K J. Khat chewing, cardiovascular diseases and other internal medical problems; the current situation and directions for future research[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(3): 540-548.
- [32] 董亚蕾, 乔亚森, 牛水蛟, 王海燕, 孙磊, 路勇. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法筛查植物类防脱化妆品中 203 种农药残留[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(1): 34-43.
- DONG Yalei, QIAO Yasen, NIU Shuijiao, WANG Haiyan, SUN Lei, LU Yong. Screening of 203 pesticide residues in hair loss prevention cosmetic containing plant extracts by UHPLC-Q-TOF-MS[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2023, 59(1): 34-43(in Chinese).
- [33] LI X Y, ZHANG C L, WU E H, HAN L, DENG X L, SHI Z F. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics approach reveals osthole intervention in breast cancer 4T1 cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1 168-1 185.
- [34] 覃翔, 廖强. 静电场轨道阱高分辨质谱技术在中药分析中的应用进展[J]. 中国药师, 2022, 25(7): 1 240-1 245.
- QIN Xiang, LIAO Qiang. Application progress in electrostatic field Orbitrap high resolution mass spectrometry in traditional Chinese medicine analysis[J]. China Pharmacist, 2022, 25(7): 1 240-1 245(in Chinese).
- [35] 邵伍军, 陈延安, 袁红露, 金美春, 周雪飞, 覃玉梅, 杨荷友, 何燕玲. 二维超高效液相色谱-四极杆/飞行时间质谱法解析替考拉宁杂质[J]. 色谱, 2023, 41(2): 195-204.

- SHAO Wujun, CHEN Yan'an, YUAN Honglu, JIN Meichun, ZHOU Xuefei, QIN Yumei, YANG Heyou, HE Yanling. Analysis of teicoplanin impurities by two-dimensional ultra performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(2): 195-204(in Chinese).
- [36] TAKEHITO T, HIDEAKI U, NAOKI A, TAKESHI Y. Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/Q-TOF MS[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 83(3): 1 001-1 007.
- [37] 张佳妮, 都青钰, 汪兴财, 刘嘉楠, 马梦晗, 马兴玲, 赵娟娟, 郭晓萌, 张阳, 于永杰. 基于 UPLC-Q-TOF MS 技术结合化学计量学数据自动化解析的不同花期沙枣花成分分析[J]. 分析测试学报, 2022, 41(8): 1 178-1 184.
- ZHANG Jiani, DU Qingyu, WANG Xingcai, LIU Jianan, MA Menghan, MA Xingling, ZHAO Juanjuan, GUO Xiaomeng, ZHANG Yang, YU Yongjie. Component analysis of *Elaeagnus angustifolia* L. flowers on different flowering stages based on UPLC-Q-TOF MS technology combined with chemometric data analysis strategy[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(8): 1 178-1 184(in Chinese).
- [38] SKIBIŃSKI R, KOMSTA L, INGLÓT T. Characterization of paliperidone photodegradation products by LC-Q-TOF multistage mass spectrometry[J]. Biomedical Chromatography, 2016, 30(6): 894-901.
- [39] 史洪飞, 徐伯芄, 徐成鑫, 周修齐, 许宏福. 溶剂萃取-高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速提取检测干燥恰特草中 5 种生物碱成分[J]. 色谱, 2023, 41(9): 771-780.
- SHI Hongfei, XU Bopeng, XU Chengxin, ZHOU Xiuqi, XU Hongfu. Rapid extraction and determination of five alkaloids in Khat Chater by solvent extraction-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(9): 771-780(in Chinese).
- [40] 李雅文, 连茹, 王跨陡, 夏攀, 卜杰洵, 邱秉林, 张玉荣. 原位电离便携式质谱研究卡西酮类毒品的裂解规律和分析策略[J]. 质谱学报, 2021, 42(4): 427-438.
- LI Yawen, LIAN Ru, WANG Kuadou, XIA Pan, BU Jiexun, QIU Binglin, ZHANG Yurong. Study the fragmentation characteristics and analysis strategy of cathinones by ambient ionization portable mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(4): 427-438(in Chinese).

(收稿日期: 2023-06-01; 修回日期: 2023-07-15)