

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910067479.X

[51] Int. Cl.

G01N 27/64 (2006.01)
A61K 36/714 (2006.01)
A61K 36/718 (2006.01)
A61K 36/756 (2006.01)
A61K 36/56 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101644694A

[22] 申请日 2009.9.2

[21] 申请号 200910067479.X

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 刘志强 鲁林 宋凤瑞 刘淑莹

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法

[57] 摘要

本发明提供了基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法，直接检测的中药材为含有乌头碱类、小檗碱类、马钱子碱类生物碱的中药材，中药材包括含有乌头碱类生物碱的川乌，草乌，附子中药材；含有小檗碱类生物碱的黄连，黄柏中药材；含有马钱子生物碱类的马钱子中药材。本发明提供的方法省去了生物碱提取分离的过程，既节省了生物碱成分提取的时间，同时也避免了在提取过程中高温、溶剂萃取对生物碱成分造成的影响。通过比较本发明提供的方法和传统方法检测到生物碱的质谱图，生物碱的种类及其峰强度完全一致。该方法完全可以替代传统方法作为生物碱成分快速检出的有效方法。

1、基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法，其特征在于步骤和条件如下：

(1) 配制浓度为 60mg/mL 的 2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB) 基质溶液,溶剂为体积比 1: 1 的水和乙腈；

(2) 把待检中药材粉碎后过 200 目筛；

(3) 按待检中药材粉的质量mg: 基质溶液的体积 μ L为1: 10把两者混合，震荡后得到悬混液，取1 μ L悬混液点到100孔不锈钢靶上，干燥后，将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测，得到待检中药材的生物碱质谱图；

所述的中药材包括含有乌头碱类生物碱的川乌、草乌和附子中药材；含有小檗碱类生物碱的黄连和黄柏中药材；含有马钱子和土的宁生物碱类的马钱子中药材。

基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法

技术领域

本发明涉及基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法。

技术背景

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 是二十世纪八十年代由Tanaka和Hillenkamp发明的一种新的软电离技术, 由于其具备灵敏度高、分析速度快、制样简单等特点被广泛应用于生物及高聚物大分子以及药物小分子分析。

中药材中的有效化合物成分复杂, 其分析过程繁冗复杂。传统方法采用先提取分离出有效化合物, 再利用色谱、质谱仪器检测的方法分析, 其过程中不可避免引入溶剂, 高温等不利因素, 使药材中所含的不稳定成分发生分解, 并且, 分离过程耗时耗力, 急需一种快速、灵敏检测中药材中化学成分的方法, 用于中药材的真伪鉴别、品种鉴定、产地区分、加工方法确认等质量控制方面。MALDI-TOF 质谱固体进样的分析手段使得这种问题得到很好解决。MALDI-TOF 质谱在1998 年作为分子成像技术已被运用于原位检测动物或者植物组织中的小分子成分, 但通常采用切片的方法。常规的中药材使用, 多采用粉末形式入药, 因此直接分析药物粉末更适合中药材的常规检测。(参考文献: Wu W, Liang ZT, Zhao ZZ, Cai ZW. Direct analysis of alkaloid

profiling in plant tissue by using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 2007; 42: 58-69.)

发明内容

为了解决已有技术存在的溶剂、加热等不利因素的影响问题，本发明提供了基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法。

利用 MALDI-TOF 质谱直接检测中药材粉末中的生物碱成分。将药材粉末直接和基质混合后点样，省去了小分子化合物提取分离的时间，样品分析速度快。讨论了常用的基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、2, 4, 6-三羟基苯乙酮 (THAP)、2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB) 检测的结果，考察在激光照射样品过程中，中药材中热不稳定性小分子的解离以及各种基质的灵敏度，另外中药材的粒度最终确定为过 200 目筛为最佳。最终确定 DHB 为 MALDI-TOF 质谱检测中药材中生物碱成分的最佳基质。

本发明提供的基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法的步骤和条件如下：

- (1) 配制浓度为 60mg/mL 的 2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB) 基质溶液,溶剂为体积比 1: 1 的水和乙腈;
- (2) 把待检中药材粉碎后过 200 目筛;
- (3) 按待检中药材粉的质量mg: 基质溶液的体积 μ L为1: 10把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取1 μ L悬混液点到100孔不锈钢靶上,

干燥后，将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测，得到待检中药材的生物碱质谱图：

所述的中药材包括含有乌头碱类生物碱的川乌、草乌和附子中药材；含有小檗碱类生物碱的黄连和黄柏中药材；含有马钱子和土的宁生物碱类的马钱子中药材。

有益效果：本发明提供的基质辅助激光解析电离质谱直接检测中药材中生物碱的方法，省去了生物碱提取分离的过程，既省去了生物碱成分提取的时间，同时也避免了在提取过程中高温、溶剂萃取对生物碱成分造成的影响。通过比较本方法和传统方法检测到生物碱的质谱图，生物碱的种类及其峰强度完全一致，本方法完全可以替代传统方法做为生物碱成分快速检出的有效方法。

附图说明

图 1 为利用 MALDI-TOF 检测生品附子粉末得出的生物碱质谱图。

图 2 为利用 MALDI-TOF 检测炮制附子粉末得出的生物碱质谱图。

图 3 为利用 MALDI-TOF 检测黄连粉末得到的生物碱质谱图。

图 4 为利用 MALDI-TOF 质谱检测马钱子粉末得到的生物碱质谱图。

具体实施方式

实施例 1： 采用体积比 1：1 的水和乙腈作为溶剂，配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材生品附子粉的质量 mg：

基质溶液的体积 μL 为 1: 10 把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取 1 μL 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上, 干燥后, 将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测, 得到待检中药材的生物碱质谱图。

图 1 为利用 MALDI-TOF 检测生品附子粉末得出的生物碱质谱图。图中, m/z 422, 438, 454, 556, 572, 574, 586, 590, 604, 616, 632, 646, 662, 828, 852 分别代表查斯曼宁, 尼奥宁, 附子宁, 去乙酸次乌头碱, 去乙酸中乌头碱, 去乙酸乌头碱, 苯甲酰次乌头原碱, 去乙酸乌头碱, 苯甲酰中乌头原碱, 苯甲酰乌头原碱, 次乌头碱, 中乌头碱, 10-OH-乌头碱, 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱, 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱。

图 1 的谱图显示, 生品附子粉中所含的生物碱成分得到很好的检测, 包括附子灵、尼奥灵等乌头胺类化合物, 苯甲酰次乌头碱、苯甲酰中乌头碱等单酯型生物碱, 次乌头碱、中乌头碱、乌头碱等双酯型生物碱, 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱等长链脂肪酸类生物碱。

实施例 2: 采用体积比 1: 1 的水和乙腈作为溶剂, 配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材炮制附子粉的质量 mg: 基质溶液的体积 μL 为 1: 10 把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取 1 μL 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上, 干燥后, 将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测, 得到待检中药材的生物碱质谱图。

图 2 为利用 MALDI-TOF 检测炮制附子粉末得出的生物碱质谱图。图中, m/z 422, 438, 454, 556, 572, 574, 586, 590, 604,

616, 632, 646, 812, 828, 852 分别代表查斯曼宁, 尼奥宁, 附子宁, 去乙酸次乌头碱, 去乙酸中乌头碱, 去乙酸乌头碱, 苯甲酰次乌头原碱, 去乙酸乌头碱, 苯甲酰中乌头原碱, 苯甲酰乌头原碱, 次乌头碱, 中乌头碱, 8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱, 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱, 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱。

图 2 的谱图显示, 炮制附子粉中主要生物碱成分, 包括苯甲酰次乌头碱、苯甲酰中乌头碱等单酯型生物碱得到很好检测, 且由于炮制的作用, 有毒的双酯型生物碱含量降低, 如: 次乌头碱、中乌头碱、乌头碱, 从图上可以看出双酯型生物碱的峰度降低。通过比较附子和炮制附子的谱图, 可以清晰的观察到炮制前后附子中不同生物碱的变化。炮制后, 有毒的双酯型生物碱含量降低, 转化成低毒的单酯型生物碱和长链脂肪类生物碱。通过本法能够快速区别、鉴别附子的生品和炮制品。

实施例 3: 采用体积比 1: 1 的水和乙腈作为溶剂, 配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材川乌粉的质量 mg: 基质溶液的体积 μL 为 1: 10 把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取 1 μL 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上, 干燥后, 将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测, 得到待检中药材的生物碱质谱图。

得到的谱图显示, 川乌粉中所含的生物碱成分得到很好的检测, 包括附子灵、尼奥灵等乌头胺类化合物, 苯甲酰次乌头碱、苯甲酰中乌头碱等单酯型生物碱, 次乌头碱、中乌头碱、乌头碱等双酯型生物碱, 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱等长

链脂肪酸类生物碱。

实施例 4: 采用体积比 1: 1 的水和乙腈作为溶剂, 配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材草乌粉的质量 mg: 基质溶液的体积 μL 为 1: 10 把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取 $1\mu\text{L}$ 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上, 干燥后, 将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测, 得到待检中药材的生物碱质谱图。

得到的谱图显示, 草乌粉中所含的生物碱成分得到很好的检测, 包括附子灵、尼奥灵等乌头胺类化合物, 苯甲酰次乌头碱、苯甲酰中乌头碱等单酯型生物碱, 次乌头碱、中乌头碱、乌头碱等双酯型生物碱, 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱等长链脂肪酸类生物碱。

实施例 5: 采用体积比 1: 1 的水和乙腈作为溶剂, 配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材黄连粉的质量 mg: 基质溶液的体积 μL 为 1: 10 把两者混合, 震荡后得到悬混液, 取 $1\mu\text{L}$ 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上, 干燥后, 将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测, 得到待检中药材的生物碱质谱图。

图 3 为利用 MALDI-TOF 检测黄连粉末得到的生物碱质谱图。图中, m/z 320、336、338、352 分别代表黄连碱、小檗碱、药根碱、巴马汀。

图 3 的谱图显示, 黄连中的生物碱成分得到很好检测, 包括小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱。

实施例 6: 采用 1: 1 (体积比) 水和乙腈作为溶剂, 配制浓度为

60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材黄柏粉的质量（单位为 mg）：基质溶液的体积（单位为 μL ）为 1：10 把两者混合，震荡后得到悬混液，取 1 μL 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上，干燥后，将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测，得到待检中药材的生物碱质谱图。

得到谱图显示，黄柏中的生物碱成分得到很好检测，包括小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱。

实施例 7：采用体积比 1：1 的水和乙腈作为溶剂，配制浓度为 60mg/mL 的 DHB 基质溶液。按待检中药材马钱子粉的质量 mg：基质溶液的体积 μL 为 1：10 把两者混合，震荡后得到悬混液，取 1 μL 悬混液点到 100 孔不锈钢靶上，干燥后，将该不锈钢待检中药材样品靶送入离子源中检测，得到待检中药材的生物碱质谱图。

图 4 为利用 MALDI-TOF 质谱检测马钱子粉末得到的生物碱质谱图。图中， m/z 335、351、365、395 分别代表土的宁、N-氧化土的宁、 β -克鲁伯宁、马钱子碱。

图 4 的谱图显示，马钱子中的生物碱成分得到很好检测，包括土的宁、 β -克鲁伯宁、马钱子碱。

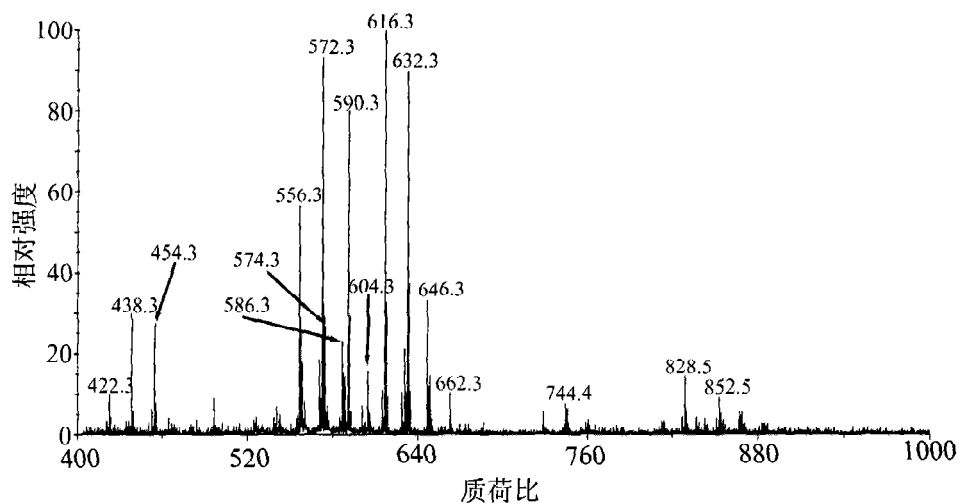


图 1

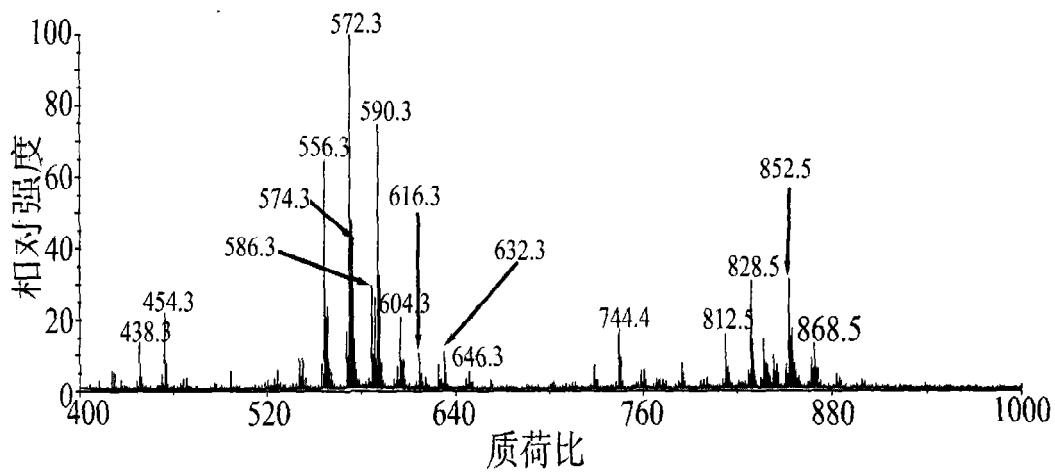


图 2

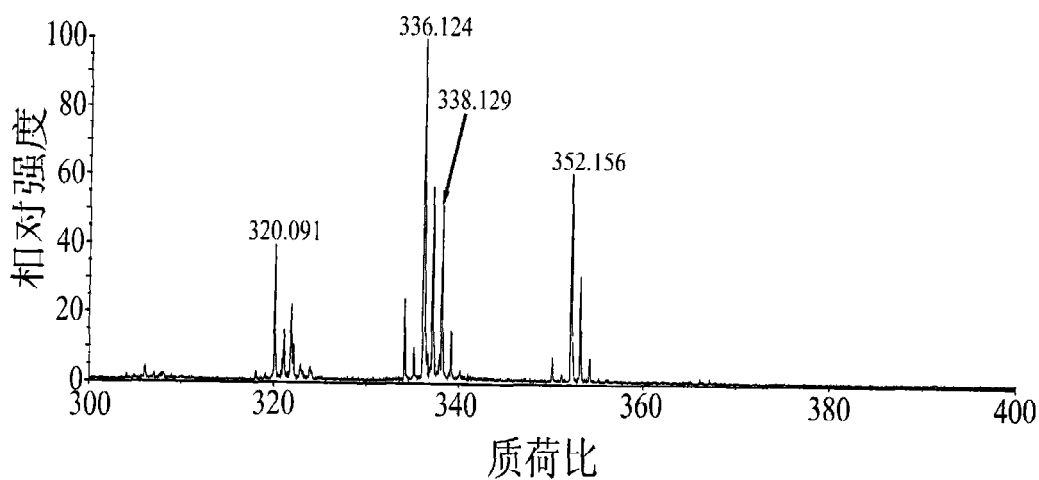


图 3

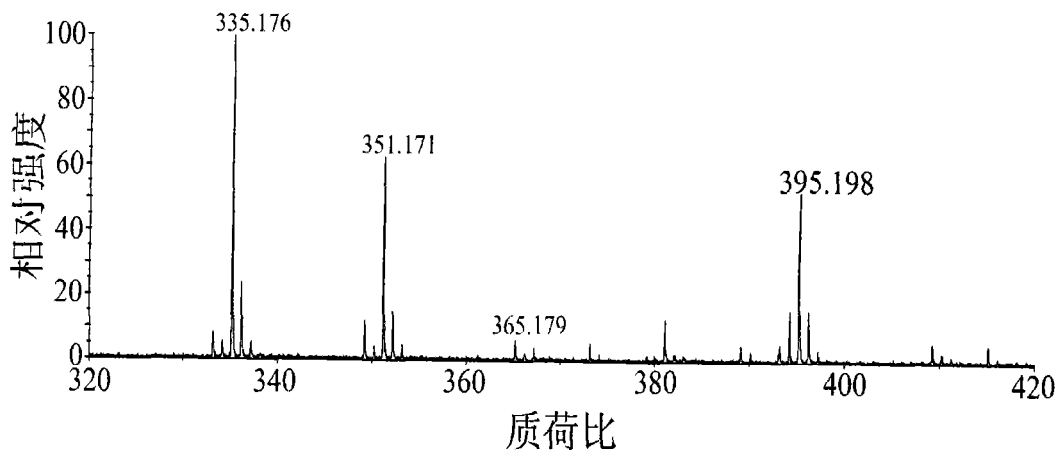


图 4