



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101710097 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910217943.9

(22) 申请日 2009.12.02

(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 刘淑莹 王曦烨 宋凤瑞 刘志强

(74) 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任
公司 22001

代理人 马守忠

(51) Int. Cl.

G01N 27/64 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外
代谢产物的方法

(57) 摘要

本发明提供了利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外代谢产物的方法。该方法将乌头碱加入含有健康大鼠新鲜粪便的普通厌氧菌培养基中培养一周,得到培养液,培养液以二氯甲烷萃取,二氯甲烷萃取液经离心,上清液经过微孔滤膜过滤后,利用基质辅助激光解吸质谱分析其中的乌头碱体外代谢产物。该方法分析出了 18 种乌头碱的体外代谢产物,具有简单易行,快速高效的特点。

1. 利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外代谢产物的方法,步骤和条件如下:

将 0.5 ~ 1.5 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基中,37°C 厌氧条件下培养 4 ~ 7 日,取 100 ~ 200 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取,二氯甲烷萃取液以 3000 ~ 5000 转 / 分钟速率离心,所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后,上清液与基质混合,上清液与基质的体积比为 1 : 0.5 ~ 1 : 2,所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析;

所述的基质为如下方法得到的:(1) 取 α -氰基-4-羟基肉桂酸 2 ~ 3 毫克,加入到 200 ~ 300 微升的乙腈和水的体积比为 3 : 7 ~ 7 : 3 的混合溶剂中,最后加入 8 ~ 10 微升三氟乙酸;或者,

(2) 取 2,5-二羟基苯甲酸 2 ~ 3 毫克,加入到 200 ~ 300 微升的乙腈和水的体积比为 3 : 7 ~ 7 : 3 的混合溶剂中,最后加入 8 ~ 10 微升三氟乙酸。

利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外代谢产物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外代谢产物的方法。

技术背景

[0002] 毛茛科乌头属植物附子,川乌和草乌是常用的中药材,具有强心,止痛及消炎等多种药理活性,同时也具有一定毒性。乌头碱是其中的主要有效成分和毒性成分之一。由于中药一般多为口服用药,其有效成分在到达吸收的靶器官之前,在肠道内均会受到肠内菌群的作用。乌头碱能够在肠内菌群的作用下代谢为单酯型生物碱,双酯型生物碱及脂类生物碱。(赵宇峰等,高等学校化学学报:Vol. 28(11),2007,2051-2055)现代药理学研究证明,双酯型生物碱活性较强,但毒性也较大。脂型生物碱具有镇痛,消炎等显著的生物活性,与双酯型生物碱比较,其毒性较小,是一类具有广泛药理活性的化学成分,具有重要的研究价值和广阔的应用前景。由于乌头碱的体外代谢过程极其复杂,代谢产物种类繁多,因此要求有一种快捷且准确的方法对代谢产物予以分析。

发明内容

[0003] 本发明是利用基质辅助激光解吸质谱(MALDI-MS)检测乌头碱体外代谢产物的方法。本发明方法可对乌头碱体外代谢产物予以快速准确的分析。

[0004] 利用基质辅助激光解吸质谱(MALDI-MS)检测乌头碱体外代谢产物的方法,步骤和条件如下:

[0005] 将 0.5 ~ 1.5 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基(GAM 培养基)中,37℃厌氧条件下培养 4 ~ 7 日,取 100 ~ 200 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取,二氯甲烷萃取液以 3000 ~ 5000 转/分钟速率离心,所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后,上清液与基质混合,上清液与基质的体积比为 1 : 0.5 ~ 1 : 2,所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析;

[0006] 所述的基质为如下方法得到的:(1)取 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)2 ~ 3 毫克,加入到 200 ~ 300 微升的乙腈和水的体积比为 3 : 7 ~ 7 : 3 的混合溶剂中,最后加入 8 ~ 10 微升三氟乙酸;或者,

[0007] (2)取 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)2 ~ 3 毫克,加入到 200 ~ 300 微升的乙腈和水的体积比为 3 : 7 ~ 7 : 3 的混合溶剂中,最后加入 8 ~ 10 微升三氟乙酸。

[0008] 有益效果:本发明提供的利用基质辅助激光解吸质谱检测乌头碱体外代谢产物的方法,经基质辅助激光解吸质谱分析后表明,乌头碱(质谱中的相对质荷比为 m/z 646)经体外代谢后可得到以下十八种代谢产物,包括:单酯型生物碱:去乙酸乌头碱(m/z 586),苯甲酰乌头原碱(m/z 604);双酯型生物碱:去氧乌头碱(m/z 630),16-O-去甲基乌头碱(m/z 632),10-OH-乌头碱(m/z 662);脂类生物碱:8-丙酰-苯甲酰乌头原碱(m/z 660),8-丁酰-苯甲酰乌头原碱(m/z 674),8-戊酰-苯甲酰乌头原碱(m/z 688),8(3-羟

基)-丁酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 690), 8-己烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 700), 8-己酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 702), 8-十四烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 814), 8-十五烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 828), 8-十六烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 842), 8-十七碳烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 854), 8-甲基十六烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 856), 8-十八碳烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 868), 8-十八烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 870)。实验结果表明, 利用基质辅助激光解吸质谱分析乌头碱代谢产物的方法具有简单易行, 高效准确的特点。

附图说明

[0009] 图 1 是实施例 1 的质谱谱图。图中: 质荷比 604 (苯甲酰乌头原碱) 为典型的单酯型生物碱, 质荷比 630 (去氧乌头碱) 为典型的双酯型生物碱, 质荷比 700 (8-己烯酰-苯甲酰乌头原碱) 为典型的脂类生物碱。

具体实施方式

[0010] 实施例 1: 将 0.5 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 4 日, 取 100 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 3000 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 0.5, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0011] 基质为: α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 2 毫克, 加入 200 微升乙腈和水的体积比为 3 : 7 的混合溶剂中, 最后加入 8 微升三氟乙酸。

[0012] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物, 包括: 单酯型生物碱: 去乙酰乌头碱 (m/z 586), 苯甲酰乌头原碱 (m/z 604); 双酯型生物碱: 去氧乌头碱 (m/z 630), 16-O-去甲基乌头碱 (m/z 632), 10-OH-乌头碱 (m/z 662); 脂类生物碱: 8-丙酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 660), 8-丁酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 674), 8-戊酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 688), 8(3-羟基)-丁酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 690), 8-己烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 700), 8-己酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 702), 8-十四烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 814), 8-十五烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 828), 8-十六烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 842), 8-十七碳烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 854), 8-甲基十六烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 856), 8-十八碳烯酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 868), 8-十八烷酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 870)。

[0013] 实施例 2: 将 1.5 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 7 日, 取 200 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 5000 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 2, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0014] 基质为: α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 3 毫克, 加入 300 微升乙腈和水的体积比为 7 : 3 的混合溶剂中, 最后加入 10 微升三氟乙酸。

[0015] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物 (同实施例 1)。

[0016] 实施例 3: 将 1 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培

培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 5 日, 取 150 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 3500 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 1, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0017] 基质为: α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 2.5 毫克, 加入 250 微升乙腈和水的体积比为 1 : 1 的混合溶剂中, 最后加入 9 微升三氟乙酸。

[0018] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物 (同实施例 1)。

[0019] 实施例 4: 将 0.85 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 6 日, 取 120 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 3600 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 0.8, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0020] 基质为: 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 2.2 毫克, 加入 220 微升乙腈和水的体积比为 3 : 7 的混合溶剂中, 最后加入 8 微升三氟乙酸。

[0021] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物 (同实施例 1)。

[0022] 实施例 5: 将 1.2 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 7 日, 取 100 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 4500 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 1, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0023] 基质为: 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 3 毫克, 加入 300 微升乙腈和水的体积比为 7 : 3 的混合溶剂中, 最后加入 10 微升三氟乙酸。

[0024] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物 (同实施例 1)。

[0025] 实施例 6: 将 1.4 毫克乌头碱放入 10 毫升含有 0.2 克健康大鼠粪便的普通厌氧菌培养基 (GAM 培养基) 中, 37°C 厌氧条件下培养 5 日, 取 200 微升培养液以 1 毫升二氯甲烷萃取, 二氯甲烷萃取液以 4000 转 / 分钟速率离心, 所得上清液经 0.45 微米微孔滤膜过滤后, 上清液与基质混合, 上清液与基质的体积比为 1 : 0.6, 所获得的混合液利用基质辅助激光解吸质谱进行分析。

[0026] 基质为: 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 2.7 毫克, 加入 270 微升乙腈和水的体积比为 1 : 1 的混合溶剂中, 最后加入 9 微升三氟乙酸。

[0027] 经质谱检测, 得到乌头碱的十八种体外代谢产物 (同实施例 1)。

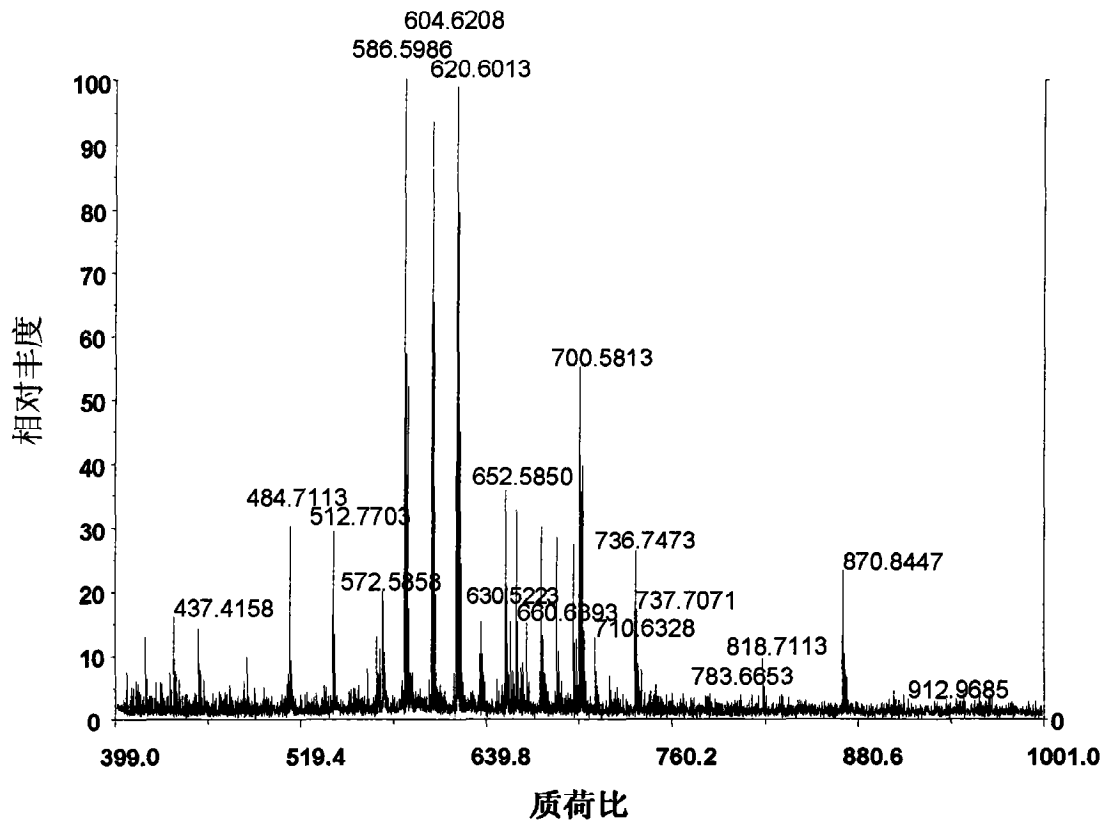


图 1