

## 近代联用技术在生物大分子药物研究中应用进展

王铭章<sup>1</sup>, 陈执中<sup>2</sup>

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 复旦大学药学院, 上海 201203)

**摘要:** 20世纪90年代以来, 随着联用技术和基因研究的发展, 生物大分子药物的研究深受化学和医学工作者的关注, 成为研究热点之一。本文综述了表面等离子共振-环伏安法 (SPR-CV)、生物分子相互作用分析-质谱法 (BIA/MS)、微流路芯片毛细管电泳-质谱法 (Chip-CE-MS)、离线二维液相色谱综合串联质谱法 (2D-LC coupled MS/MS) 及液相色谱-质谱-核磁共振 (LC-MS-NMR) 联用技术在生物大分子药物中的研究应用进展。这些联用技术的应用将为生物大分子药物的研究开发开拓广阔的前景。

**关键词:** 近代联用技术; 生物大分子药物; 应用

**中图分类号:** Q71

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-979X (2011) 05-0209-04

### Progress on Studies and Applications of Modern Combined Techniques in Biomacromolecule Drugs

WANG Ming-zhang<sup>1</sup>, CHEN Zhi-zhong<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Molecule Engineering, East of China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Since the 1990s, following the development of new combined techniques and gene research, the biomacromolecule drugs were concerned by chemical and medical workers. Now, this subject has become a

**收稿日期:** 2011-03-07

**作者简介:** 王铭章 (1990-), 女, 浙江余姚人, 大学本科三年级在校生, 应用化学专业

**通讯作者:** 陈执中 (1928-), 男, 教授、主任药师, 从事近代仪器分析和基因工程药物研究 Tel: 021-51980000

E-mail: prof.z.z.chen@163.com

- 胞的影响[J]. 中草药, 2001, 32 (3): 230.
- [15] 罗学娅, 张学梅, 高卫, 等. 苦参碱的镇痛作用部位及机制研究[J]. 中草药, 2001, 32 (1): 41.
- [16] 胡振林, 张俊平, 余祥彬, 等. 苦参碱对脂多糖 / D-氨基半乳糖诱导的肝炎及离体巨噬细胞释放肿瘤坏死因子的影响[J]. 中国药理学报, 1996, 17 (4): 351.
- [17] 刘涛, 胡晋红, 蔡漆. 苦参碱抗肌纤维化机理的体外研究[J]. 解放军药学报, 2000, 16 (3): 119.
- [18] 鲍淑娟, 李淑芳, 周正文, 等. 苦参碱平喘作用机理探讨[J]. 中药药理与临床, 1995, 11 (5): 33.
- [19] 邓银华, 徐康平. 山豆根化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (2): 172.
- [20] Kajimoto S, Takanashi N, Kaimoto T, *et al.* Sophoranone, extracted from a traditional Chinese medicine Shandougen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores [J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(6):879-890.
- [21] Takeshita T, Yokoyama K, Ding Y, *et al.* Four new and twelve known sapogenols from Sophorae Subprostratae Radix [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39 (7): 1908-1910.
- [22] 董群, 方积年. 山豆根多糖的性质和化学组成[J]. 中国药学杂志, 2001, 36 (2): 85-87.
- [23] 胡庭俊, 程富胜, 陈灵然, 等. 山豆根多糖体外清除自由基作用的研究[J]. 中兽医医药杂志, 2004, 23 (5): 6-8.
- [24] 胡庭俊, 陈灵然, 程富胜, 等. 山豆根多糖的自由基药理学研究[J]. 中兽医医药杂志, 2005, (8): 53-58.
- [25] 帅学宏, 胡庭俊, 曾芸, 等. 山豆根多糖对免疫抑制模型小鼠免疫器官指数和自由基相关酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32 (2): 170-172.
- [26] 丁佩兰, 陈道峰. 山豆根酚性成分的研究[J]. 中草药, 2008, 39 (2): 186-188.
- [27] 范锡英, 任秀花, 张金莲. 山豆根中的微量元素含量分析[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22 (5): 69.
- [28] 王晓平, 陈聚涛, 肖倩, 等. 中药山豆根的神经毒性: 从人到动物[J]. 自然杂志, 2002, 24 (5): 286-289.
- [29] 焦万田. 中药不良反应与治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 123.
- [30] 孙蓉, 杨倩, 赵燕. 山豆根不同组分小鼠急性毒性比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7 (5): 257-262.

research hotspot. In this paper, the progress on studies and applications of some modern combined techniques in biomacromolecule drugs are reviewed, including surface plasmon resonance-cyclic voltammetry (SPR-CV), biomolecular interaction analysis-mass spectrometry (BIA/MS), microfluidics chip capillary electrophoresis-mass spectrometry (Chip-CE-MS), two-dimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (2D-LC coupled MS/MS) and LC-MS-NMR. The applications of these new combined techniques will open up broad prospect for the research and development of biomacromolecule drugs.

**Key Words:** modern combined techniques; biomacromolecule drugs; applications

2000年6月人类基因组计划完成了基因组草图<sup>[1]</sup>, 2003年4月人类基因组序列绘制成功<sup>[2]</sup>, 拉开了后基因时代的序幕。随着基因研究的深入发展, 目前生物大分子药物(包括: 天然大分子活性成分、核苷酸类、酶类、多肽类、蛋白质类及基因工程药物等)的研究已成为一项重要的科研课题, 近代联用技术在生物大分子药物中的应用更有了新的进展。

### 1 表面等离子共振-环伏安法联用技术

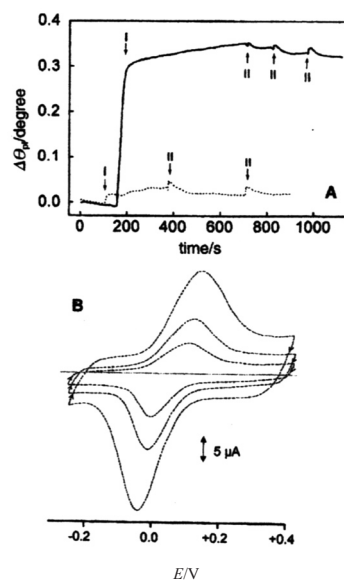
当入射光以临界角射入两个不同折射率的透明介质的界面时会产生反射, 每一角度反射光的强度都应相同, 但当两个界面之间镀上一层金属层, 则入射光的一部分和金属表面的自由电子作用引起共振从而导致反射光强度在一定角度大大减弱, 此现象称为表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)。SPR是一种表面灵敏的光学技术, 生物大分子化合物层在金属表面上的结合导致折射率变化, 可用于研究贵金属膜上超薄的有机化合物层<sup>[3]</sup>。

环伏安法(cyclic voltammetry, CV), 可用于通过产生氧化还原电位测定生物大分子中抗氧化剂的还原效能。

Schlereth<sup>[4]</sup>报道了SPR-CV联用技术用于研究生物大分子的特性。用Au[MPA](3-巯基-1-丙酸)电极测定细胞色素C(cytochrome c)吸附在金表面上的量和定向, 研究其氧化还原过程。相似的实验同样用于研究细胞色素C氧化酶(cytochrome c-oxidase)的氧化还原过程。细胞色素C SPR-CV见图1A及B。

### 2 生物分子相互作用分析-质谱法(biomolecular interaction analysis-mass spectrometry, BIA/MS)

BIA/MS中质谱法是用基体辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS), Nelson等<sup>[5]</sup>应用BIA/MS进行“配位垂钓”鉴定。“配位垂钓”(ligand fishing)是一种筛选确定孤儿受体(orphan-receptor)的未知配体的技术。以亲和性配位体作为“钓钩”(hook)垂钓生物系统中结合补体, 用MALDI-TOF MS测定保留的蛋白质质谱, 提供原始的结构信息(相对分子质量)。



A: SPR角度转移对时间曲线 B: 细胞色素C吸附在Au层的CV图

图1 细胞色素C SPR-CV<sup>[4]</sup>

Nedelkov等<sup>[6]</sup>应用BIA/MS联用技术鉴定人血浆中视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP)变异体。结果显示: 两个质谱信息的不同是由于RBP分子去除了C端亮氨酸残基所致。此截短的RBP变异体在临床上曾从慢性肾衰竭患者血清中发现。

Nelson等<sup>[7]</sup>和Nedelkov等<sup>[8]</sup>发展了BIA/MS技术, 应用芯片上保留的蛋白质酶解结合质谱法, 即生物芯片质谱法(biosensor chip mass spectrometry, BCMS)分析研究白介素1 $\alpha$ 。这一技术的应用使蛋白质结构分析从酶解肽图谱分析提高到生物分子相互作用-芯片酶解-质谱分析的新水平。

### 3 微流路芯片毛细管电泳-质谱法联用技术

微流路芯片(microfluidics chip)是20世纪90年代发展起来的用作微型毛细管分离的一类新的芯片, 在这种微流路芯片上进行微型毛细管电泳的技术称为微流路芯片毛细管电泳(microfluidics chip capillary electrophoresis, chip-CE)。

Xue等<sup>[9]</sup>报道了多通道芯片电喷雾离子化质谱法(microchip electrospray ionization mass spectrometry, Chip-

ESI-MS)用于肌红蛋白测定的微芯片质谱法,检出限度低于 $6 \times 10^{-8}$  mol/L。

用低死体积连续的微流路芯片毛细管电泳-质谱法联用技术(microfluidics chip capillary electrophoresis-mass spectrometry, Chip-CE-MS),微通道经7-辛烯-1-三甲氧硅烷(7-oct-1-enyltri-methoxysilane),硅烷化后再用氯化丙烯酰氨基三基铵[(acryloamino) propyl-trimethylammonium chloride]衍生物,进行蛋白质水解的快速分析。对催产素(oxytocin)、甲硫氨酸-脑啡肽(met-enkephalin)、亮氨酸-脑啡肽(leu-enkephalin)、蛙皮素(bombesin)、促黄体激素释放激素(LHRH)、精氨酸8-后叶加压素(arg8-vasopresin)、舒缓激肽1-5(bradykinin1-5)、P物质(substance P)及舒缓激肽(bradykinin)9种肽混合物进行了鉴定<sup>[10]</sup>。应用微流路芯片毛细管电泳-串联质谱(chip-CE-MS/MS),芯片通道用3-氨基丙基硅烷(3-aminopropyl silane)硅烷化后以电子计算机控制进行蛋白质的分析。此联用技术还用于蛋白质-配位体复合物的分析和蛋白质修饰的测定<sup>[10]</sup>。

#### 4 离线二维液相色谱综合质谱法

戴安公司(Dionex)推出自动化离线二维液相系统(off-line two dimensional liquid chromatography, 2D-LC),用于蛋白质和多肽分离<sup>[11]</sup>。自动化离线液相色谱系统见图2。分离的肽段可用MS/MS分析。2D-LC分离蛋白质及肽段的分析见图3。

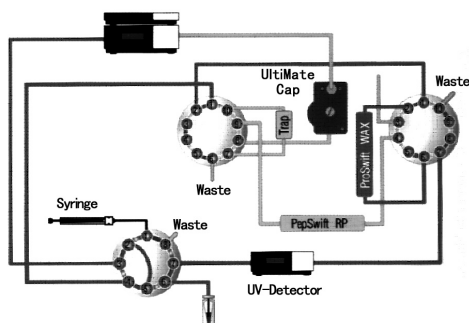


图2 自动化离线二维系统<sup>[11]</sup>

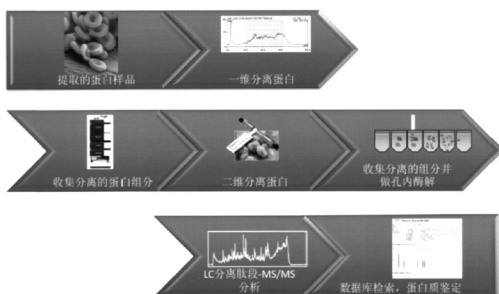


图3 2D-LC蛋白质与多肽分离MS/MS分析<sup>[11]</sup>

Eeltink等<sup>[12]</sup>报道了应用离线二维液相色谱分析肽类,并用离线二维液相色谱综合质谱法用于肽类的分析<sup>[13]</sup>,测定系统见图4。

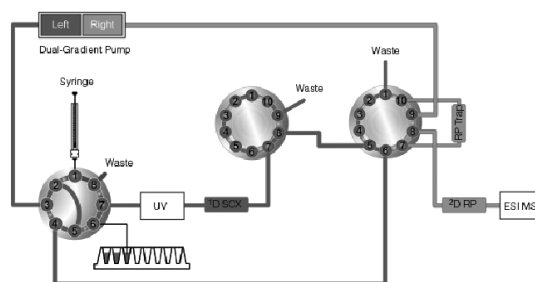


图4 离线二维液相色谱综合质谱法测定系统<sup>[13]</sup>

#### 5 LC-MS-NMR联用技术

液相色谱-质谱-核磁共振(LC-MS-NMR)联用技术有3种连接方式:(1)液相色谱-质谱(LC-MS)与液相色谱-核磁共振(LC-NMR)组合的联用技术 应用LC-MS进行天然粗提取物的分离和获得相对分子质量的信息,再与LC-NMR联用组合。结合活性分析实现了粗提取物靶向分离新型活性成分,成为活性筛选的有效补充,获得提取物活性成分结构信息。根据构效关系,初步获得存在活性成分,减少了无用的分离步骤,提高了筛选效率<sup>[14]</sup>;(2)高效液相色谱连接核磁共振和质谱的联用方式<sup>[14]</sup> 高效液相色谱柱流出物通过检测器流动池后,经分离器分为两个部分,主要部分(95%)直接进入核磁共振仪检测器,其余部分(5%)至质谱,在流产生质谱,用载流方法产生核磁共振波谱,用这连接方式的联用技术分离分析了天然药物贯叶连翘提取物中主要成分的结构<sup>[14]</sup>;(3)Moy等<sup>[15]</sup>提出液相色谱-质谱-核磁共振的联用技术 以分子排阻凝胶色谱法和质谱联用来鉴定键合复合物作为高通量筛选方法。LC-MS-NMR联用技术的流程图见图5。应用LC-MS-NMR联用技术结合活性分析,以成纤维细胞胶原酶(fibroblast collagenase)作为蛋白质靶点进行活性成分筛选研究。

Lommen等<sup>[16]</sup>用HPLC-NMR-MS联用技术分离分析了苹果皮提取物中的槲皮素糖苷类和根皮素糖苷类。槲皮素糖苷类被鉴定出为云香苷(芦丁, rutin)、金丝桃苷(hyperin)、异槲皮素苷(isoquercitrin)、瑞诺苷(reynoutrin)、蒿蓿苷(avicularin)及槲皮苷(quercitrin)。根皮素糖苷被鉴定出为根皮苷(phloridzin)及2'-β-D-木糖基(1→6)β-葡萄糖苷。

#### 6 结语

天然活性成分和基因工程药物与人类健康密切相关,

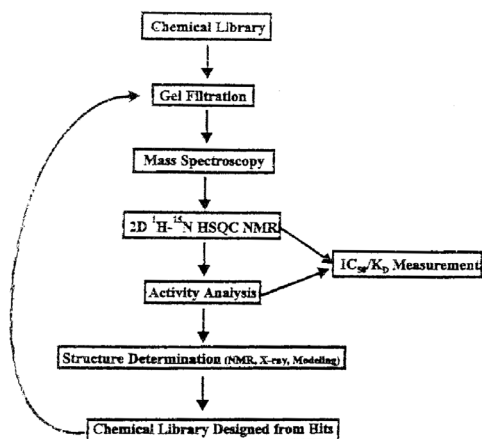


图5 LC-MS-NMR联用技术流程图<sup>[15]</sup>

因而这类生物大分子药物的分析研究具有重要的现实意义。近代联用技术的发展和應用可以获得生物大分子药物的结构信息和大量有关特性的信息，不仅可用于生物大分子天然活性成分的分离、鉴定和认证，而且可用于高通量的筛选。我们相信，随着现代联用技术的发展，将为天然活性成分和基因工程药物的研究开发开拓更加广阔的前景。

#### 参考文献

- [1] 强伯勤, 方福德. 中国人类基因组研究的现在与未来[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 455-460.
- [2] 骆建新, 郑岫村, 马用信, 等. 人类基因组计划与后基因组时代[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(1): 87-94.
- [3] 陈执中. 表面等离子共振监测系统研究进展[J]. 化学传感器, 2002, 22(1): 1-6.
- [4] Schlereth D D. Characterization of protein monolayers by surface plasmon resonance combined with cyclic voltammetry 'in situ' [J]. *J Electroanal Chem*, 1999, 464: 198-207.
- [5] Nelson R W, Nedelkov D, Tubbs K A. Biomolecular interaction analysis mass spectrometry BIA/MS can detect and characterize proteins in complex biological fluids at low to subfemtomole level [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(10): 404A-411A.
- [6] Nedelkov D, Nelson R W. Partical consideration in BIA/MS: optimizing the biosensor-mass spectrometry interface[J]. *J Mol Reconit*, 2000, 13(1): 140-145.
- [7] Nelson R W, Nedelkov D, Tubbs K A. Biosensor chip mass spectrometry: A chip based proteomics approach[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1155-1163.
- [8] Nedelkov D, Nelson R. Biomelecular interaction analysis mass spectrometry: A comprehensive microscale proteomics approach[J]. *Am Lab*, 2001, 13(12):22-25.
- [9] Xue Q, Foret F, Dunayevskiy Y M, et al. Multichannel microchip electrospray mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 1997, 69(3): 426-430.
- [10] 陈执中. 新的芯片毛细管电泳及其联用技术研究应用进展[J]. 药物生物技术, 2007, 14(1): 71-75.
- [11] Dionex, 戴安Ulimate®3000 Nano和RSLC nano微流量液相色谱[Z].2010: 3-4.
- [12] Eeltink S, Dolman S, Swart R, et al. Optimizing the peak capacity per unit time in one-dimensional and off-line two dimensional liquid chromatography for separation of complex peptide samples[J]. *J Chromatogr A*, 2009,1216(44): 7368-7374.
- [13] Eeltink S, Dolman S, Ursem M, et al. Maximizing the peak production rate in off-line comprehensive two-dimansional liquid chromatography with mass spectrometry detection[J]. *LC-GC Europe*, sep. 2009. <http://www.chromalographyonline.com>
- [14] 陈执中. HPLC-MS-NMR联用技术及其在天然药物活性成分研究中的应用进展[J]. 中国民族民间医药杂志, 2006, (4): 187-191.
- [15] Moy F J, Haraki K, Mobilie D, et al. MS/NMR: A structure-based approach for discovering protein ligands and for drug design by coupling size exclusion chromatography, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 571-581.
- [16] Lommen A, Godejohann M, Venema D P, et al. Application of directly coupled HPLC-MS to identification and confirmation of quercetin glycosides and phoretin glycosides in apple peel[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(7): 1973-1997.

## 投稿注意事项

来稿可通过电子邮件发至本刊，同时邮寄一份纸稿以及单位介绍信，附作者书面声明“来稿未投他刊”。请注明作者地址、E-mail和联系电话（最好能够短信联系以加快审稿进度）。

凡接到本刊收稿回执后3个月内未收到稿件处理通知，说明此稿件仍在审阅中。作者如欲改投他刊，须来信（书面）与我刊联系。

凡退回作者修改的稿件，务请1个月内修回，如有问题请通过电子邮件联系。

本刊收取稿件处理费，每篇50元，请通过邮局汇款至我刊编辑部，在汇款单上注明第一作者姓名和文题。对于决定录用的综述类稿件，本刊将收取版面费。实验研究类稿件免收版面费。稿件刊登后赠本刊。