

普洛迪药物主要成分及其结合形式的质谱分析

代冬梅, 张瑞萍, 贺玖明, 再帕尔·阿不力孜*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

Analysis of the Main Components and Their Interactions from Puluodi Injection by Mass Spectrometry

DAI Dong-mei, ZHANG Rui-ping, HE Jiu-ming, Zeper Abliz*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: In order to explain the reason why the clinical effects of “Puluodi” are better than those of cerebroprotein hydrolysate and troxerutin injections used individually, the components of “Puluodi” were analysed by electrospray ionization mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and cold-spray ionization mass spectrometry, as well as amino acid analysis. The existing state of the main components such as the interaction between amino acids and troxerutin was studied emphatically.

Key words: cerebroprotein hydrolysate; troxerutin; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); cold-spray ionization mass spectrometry (CSI-MS)

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-61-02

普洛迪即曲克芦丁脑蛋白水解物注射液, 主要成分为曲克芦丁、多肽、氨基酸等, 临床用于治疗脑血管病、神经损伤性疾病。为了科学地解释普洛迪临床疗效优于曲克芦丁与脑蛋白水解物分别单独给药的原因^[1], 运用电喷雾质谱 (ESI-MS)、冷喷雾质谱 (CSI-MS) 和 LC-MSⁿ 等质谱技术, 结合氨基酸分析对普洛迪中主要成分及其结合形式进行了分析研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器

QTRAPTM 型四极杆-线性离子阱串联质谱仪: 美国应用生物系统公司产品, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Analyst1.3.2 数据处理系统; Agilent1100 四元梯度泵, DAD 检测器; AccuT-OF JMS-T100CS 型冷喷雾质谱仪 (JEOL, 日本); YMC-Pack ODS-AQ 150 × 2.0 mm 色谱柱; 日立 L-8500 氨基酸自动分析仪, 日立 2622SC 4.6 × 60 mm 分析柱。

1.2 主要材料与试剂

脑蛋白水解液样品(批号 20051208)、普洛迪(批号 20051013)由诺氏制药(吉林)有限公司提供;曲克芦丁,由诺氏制药(吉林)有限公司提供;甲醇:色谱纯,德国 Merck 公司产品;水为纯净水。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件^[2] 色谱柱: YMC-Pack ODS-AQ 150×2.0 mm, 5 μm;流动相: A: 0.1% 甲酸, B: 80% 甲醇, 梯度洗脱, B 的比例 0~2 min 为 0, 2~15 min 增加到 20%, 20~50 min 增加到 100%, 50~60 min 为 100%, 进样量 10 μL。

1.3.2 质谱条件 ESI 离子源;喷雾电压: 5.5 kV; DP 电压 60 V; EP 电压 10 V; 扫描范围 m/z 50~1700。CSI 离子源;喷雾电压: 2 kV; 锥孔 1 电压: 50 V; 喷雾温度 -20~20 ℃; 进样速度 10 μL/min, 扫描范围 m/z 50~2 000。

2 结果与讨论

2.1 脑蛋白水解液的成分分析

在脑蛋白水解液直接进样的 ESI-MS 谱中, 低质量端可以观察到明显的游离氨基酸 $[M+H]^+$ 离子峰, 其主要质谱峰的归属, 与氨基酸分析结果相符合。HPLC-MS 分析结果表明, 除了氨基酸, 脑蛋白水解液中还含有一些低分子质量的肽, 含量较高的是分子质量在 200~300 u 和 500~600 u 的多肽类, 而且发现存在大量的同

分异构体多肽类成分。多肽的氨基酸序列分析采用 Analyst 1.3.2 中的 Swissprot 数据库进行检索, 对每一种同分异构体给出了可能的氨基酸组成。

2.2 曲克芦丁的质谱分析

精密称定适量曲克芦丁, 用 50% 甲醇定容至 10 mL, 制成浓度为 0.050 μmol/μL 的样品溶液, 用 0.1% 甲酸溶液稀释后直接进样分析。曲克芦丁的 ESI-MS 谱中, m/z 743 为 $[M+H]^+$ 峰, m/z 435 为曲克芦丁失去糖链后的黄酮甙元部分, m/z 1 485 为 $[2M+H]^+$ 峰。

2.3 曲克芦丁与脑蛋白水解液成分结合方式的实验研究

分别对按处方比例混合的曲克芦丁脑蛋白水解液样品和普洛迪样品, 进行了 CSI-MS 谱分析, 结果一致。同时与脑蛋白水解液、曲克芦丁单独进样的 CSI-MS 谱相比较, 考察曲克芦丁与脑蛋白水解液中游离氨基酸或多肽的结合情况。分析发现 m/z 874, m/z 889, m/z 908 和 m/z 917 离子峰为普洛迪注射液中的氨基酸与曲克芦丁结合形成的加合物峰。进一步利用 MS/MS 和 HR-MS 的测定, 验证了 m/z 874 为 $[\text{曲克芦丁} + \text{Ile/Leu} + H]^+$, m/z 889 为 $[\text{曲克芦丁} + \text{Lys} + H]^+$, m/z 908 为 $[\text{曲克芦丁} + \text{Phe} + H]^+$, m/z 917 为 $[\text{曲克芦丁} + \text{Arg} + H]^+$ 的一系列加合物离子。氨基酸与曲克芦丁的结合是否有助于其越过血脑屏障, 还需要结合体内实验证实。

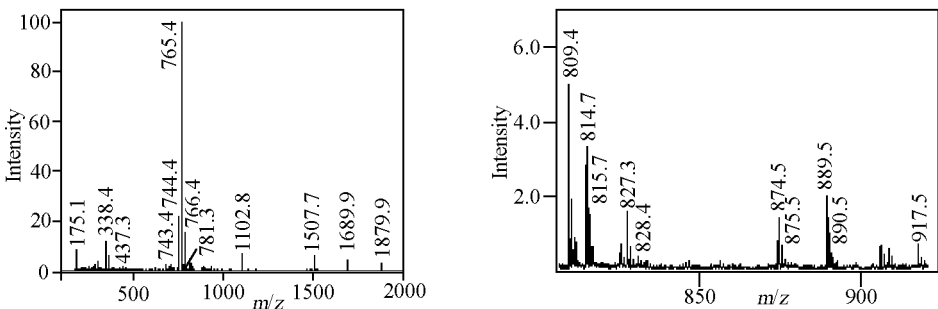


图 1 普洛迪 CSI-MS 谱(左图为全谱,右图为局部放大) (20 ℃)

Fig. 1 CSI-MS spectra of Puluodi (the left is full spectrum, the right is magnified) (20 ℃)

参考文献:

[1] 任 惠,梁迎春. 普洛迪在缺血性脑卒中的应用[J]. 中国医刊,2005,40(12):29-30.

[2] 吴 萍,何 斌,彭新君. 羚羊角和羚羊角塞针剂中氨基酸和多肽成分的分析[J]. 湖南中医药导报,2004,10(5):78-81.