

基于敞开式质谱检测的药物高压液相色谱高通量筛选研究

陈波*

(湖南师范大学“化学生物学及中药分析”教育部重点实验室, 长沙 410081)

摘要: 药物筛选是整个药物发现过程的起点。在高通量和超高通量筛选中, 建立准确、快速、微型化和无标记的分析化学方法是其核心内容。敞开式(常温常压)质谱于2004年提出后, 因其可实现无需样品预处理的快速质谱分析而得到迅速发展; 相对于电喷雾电离质谱, 其基质效应小, 分析速度快, 已在不同形态样品快速分析、生物成像分析等领域发挥出重要作用。本研究将敞开式质谱作为高通量筛选的快速、无标记检测方法, 结合高压液相色谱法分离在线结构鉴定及电雾式检测, 获得分离化合物的分子量及绝对质量, 结合活性筛选结果获取分离化合物的活性量效关系及活性动力学行为, 从而建立针对天然产物复杂体系的新型高通量酶抑制剂筛选系统。

关键词: 高压液相色谱; 敞开式质谱; 高通量筛选; 天然产物

Study on high pressure liquid chromatography-high-throughput screening for drugs based on ambient mass spectrometry

CHEN Bo*

(Key Laboratory of Chemical Biology & Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

ABSTRACT: Lead compound screening is the key procedure for the drug discovery. In the high-throughput screening (HTS) and ultra-high throughput screening (UHTS) process, the development of accurate, rapid, miniaturized and label-free screening detection methods has been the core research field. After development of ambient mass spectrometry in 2004, the technique has been widely studied and applied because of its particular strongpoints such as low matrix effect, rapid analysis etc. It has been applied in different research fields such as bio-imaging, rapid analysis. In this paper, we will use ambient mass spectrometry as a universal and label-free detection tool for the HTS. Combining the ambient MS screening system with HPLC-multi-detection system, a HPLC high-throughput screening for drugs based on ambient mass spectrometry will be developed. The purpose of the paper is to develop a HTS for drug lead compounds from the natural products and traditional Chinese medicine.

KEY WORDS: high pressure liquid chromatography; ambient mass spectrometry; high-throughput screening; natural product

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275049)

*通讯作者: 陈波, 博士, 教授, 湖南师范大学化学化工学院院长, 主要研究方向为分离分析化学, 针对的具体分析对象为食品和中药。E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com

药物筛选是整个药物发现过程的起点^[1]。近年来,高通量(high throughput screening, HTS)和超高通量(ultra-high throughput screening, UHTS)筛选技术的发展非常迅速,其中,准确、快速、微型化和无标记的分析化学方法是该技术的核心内容,作为与均相荧光互补的质谱分析技术已引起了广泛关注^[2,3]。

质谱法是药物研究中应用最为广泛的分析技术之一^[4]。应用质谱法进行药物筛选可以同时检测剩余底物量和生成产物量,因而与光学检测技术相比,该技术能够提供更多的样品信息^[5]。如 Deng 等应用质谱检测技术进行了 MurC 酶抑制剂的筛选,方法灵敏度高、线性范围宽,与传统的比色法相比避免了大量的假阳性筛选结果^[6]。正是具备这些优点,质谱检测技术已经在以酶、RNA、受体蛋白为靶点的高通量药物筛选中得到了应用^[7-9]。在 HTS 中应用最多的还是 ESI 离子源及与之类似的 APCI 离子源,但这类离子源难以与高离子强度、含不挥发性盐的溶液兼容,而药物筛选的生化反应体系本身就是一个含有大量缓冲盐的系统,因此质谱直接流动注射分析技术并不适合于高通量药物筛选,样品检测前需经过分离步骤以除去干扰组分^[10]。

敞开式常温常压质谱(ambient mass spectrometry)于 2004 年由 Cooks 等提出^[11],是在实验室开放环境中并维持被分析物本身性质的条件下,直接完成对样品的离子化以及进样的质谱方法。其典型特征是无需或只需要简单的样品制备过程就可以完成对样品的分析。因此它提供了更为简单的工作流程,大大提高了质谱仪器的易用性,由此开启了由传统封闭式到敞开式新型离子源质谱在快速质谱分析领域的研究热潮,针对不同样品、不同分析目的的各类敞开式离子源,如:解吸附电喷雾离子源(DESI)、实时直接分析离子源(DART)、解吸附电晕束离子源(DCBI)^[12-14]等被陆续研究成功。同时,利用敞开式质谱进行各类分析鉴定的工作被报道,展示了该技术强大的应用潜力^[15]。过去,样品的前处理一直是困扰分析化学工作者的难题,样品的前处理过程不仅耗时耗力,在一些活体生物分析的过程中,样品前处理过程还会导致无法对生物的某种生理特征进行实时的监测。在大气压下无需复杂的样品前处理过程,具备了实时监测的能力,又由于质谱本身的准确性的特点,使得敞开式质谱在生物分析方面具有独特的优势。此外,敞开式质谱离子源独特的机械设计可

实现高通量的分析检测。在利用质谱进行样品分析时,从样品分子的离子化到获得样品分子的检测信号所需的响应时间通常在毫秒之内。因此,敞开式质谱离子化的成功开发,使得超快速、高通量质谱分析及生物成像成为可能。其无需样品预处理及超快分析特性也为药物 HTS 提供了新的、强有力的快速、微型化和无标记检测手段。

针对天然产物、中药等大型混合物库的 HTS,因涉及分离、制备及筛选的巨大工作量问题,前沿亲和色谱(Forefront affinity chromatography,FAC)或体积排阻色谱(Size exclusion chromatography,SEC)与质谱(mass spectrometry, MS)联用技术、亲和选择性质谱技术、毛细管电泳(Capillary Electrophoresis,CE)等方法引起了广泛的关注。Schreimer 等人提出将 FAC 与 MS 联用发展成为一种新的药物筛选工具^[16]。这一技术的优点在于将 FAC 的分子识别功能与 MS 的通用型检测相结合,只通过一次分离就能直接测定出一组混合物中每个化合物与靶标蛋白的结合常数。发展无标记和无需固定化的药物筛选技术一直是药物筛选发展的趋势。亲和选择 MS 的选择性是依靠与 MS 连接的 SEC 实现的。直接将靶标蛋白与一组小分子化合物混合孵育,然后用 SEC 柱将蛋白质与未与蛋白结合的小分子进行分离。结合有小分子化合物的靶标蛋白经 SEC 分离后,用切换阀切入反相液相色谱柱,用极端的流动相解离出结合在蛋白质上的小分子,通过 MS 给出的质量信息得到确认。近年来,国内在药物筛选方法研究方面做了一些工作。比较有代表性的工作有:徐筱杰等将生物活性化合物的多克隆抗体固定后,采用 FAC-MS 技术筛选中药提取物中的活性化合物^[17,18];邹汉法等研究的基于 MALDI-TOF-MS 的小分子-蛋白质相互作用研究技术^[19];康经武研究组发展的基于 CE 微反应器的酶抑制剂的筛选方法^[20]。然而,基于亲和色谱的筛选方法往往难以消除基质材料的非特异性吸附造成的假阳性结果,而在线微反应器法则难以将混合物中各分离化合物的活性同步表征。

因此针对天然产物、中药等大型混合物库进行药物先导化合物筛选,必须建立新的方法,将成分的高通量分离、结构鉴定及对靶点活性同时筛选进行有效的集成,从而形成新型的混合物分离-结构鉴定-活性筛选的 HTS 系统,这将对从天然产物中高效挖掘新的药物先导化合物有着极为重要的意义^[21]。

基于此,本研究组在对敞开式质谱进行了前期研究,并对其在药物筛选研究领域进行了探索,提出了拟将敞开式质谱作为高通量筛选的快速、无标记检测方法,结合高压液相色谱分离在线结构鉴定,从而建立针对天然产物复杂体系的新型高通量酶抑制剂筛选系统的策略。

参考文献

- [1] Li J, Vederas J. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? [J]. *Science*, 2009, 325: 161–165.
- [2] Macarron R. Critical review of the role of HTS in drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11: 277–279.
- [3] Snowden M, Green D. The impact of diversity-based, high-throughput screening on drug discovery: “chance favours the prepared mind”[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2008, 11: 553–558.
- [4] de Boer A, Lingeman H, Niessen W, *et al.* Mass spectrometry-based biochemical assays for enzyme inhibitor screening[J]. *Trends Anal Chem*, 2007, 26: 867–883.
- [5] Gurard-Levin Z, Scholle M, Eisenberg A, *et al.* High-throughput screening of small molecule libraries using SAMDI mass spectrometry[J]. *ACS Comb Sci*, 2011, 13: 347–350.
- [6] Deng G, Gu R, Marmor S, *et al.* Development of an LC-MS based enzyme activity assay for MurC: application to evaluation of inhibitors and kinetic analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35: 817–828.
- [7] Langsdorf E, Malikzay A, Lamarr W, *et al.* Screening for antibacterial inhibitors of the UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) using a high-throughput mass spectrometry assay[J]. *J Biomol Screen*, 2010, 15: 52–61.
- [8] Sannes-Lowery K, Drader J, Griffey R, *et al.* High performance mass spectrometry as a drug discovery tool: A high throughput screening assay to identify RNA-binding ligands[J]. *Genomics and Proteomics Technologies*, 2001, 27–36.
- [9] Muckenschnabel I, Falchetto R, Mayr L, *et al.* Label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-throughput screening for the discovery of orphan protein ligands[J]. *Anal Chem*, 2004, 32: 241–249.
- [10] Niessen W. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1000: 413–436.
- [11] Takáts Z, Wiseman J, Gologan B, *et al.* Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. *Science*, 2004, 306: 471–473.
- [12] Cody R, Laramee J, Durst H. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions[J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 2297–2302.
- [13] Wang H, Sun W, Zhang J, *et al.* Desorption corona beam ionization source for mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2010, 135: 688–695.
- [14] Li X, Wang H, Sun W, *et al.* Desorption corona beam ionization coupled with a poly(dimethylsiloxane) substrate: broadening the application of ambient ionization for water samples[J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 9188–9193.
- [15] Venter A, Nefliu M, Cooks R. Ambient desorption ionization mass spectrometry[J]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27: 284–290.
- [16] David C, Schriemer D. Micro-scale frontal affinity chromatography with mass spectrometric detection: A new method for the screening of compound libraries[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37: 3383–3387.
- [17] Zhu L, Chen L, Luo H, *et al.* Frontal affinity chromatography combined on-line with mass spectrometry: A tool for the binding study of different epidermal growth factor receptor inhibitors[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 6388–6393.
- [18] Luo H, Chen L, Li Z, *et al.* Frontal immunoaffinity chromatography with mass spectrometric detection: A method for finding active compounds from traditional Chinese herbs[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 3994–3998.
- [19] Zou H, Zhang Q, Guo Z, *et al.* A mass spectrometry based direct-binding assay for screening binding partners of proteins[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 646–648.
- [20] Tang Z, Wang T, Kang J. Immobilized capillary enzyme reactor based on layer-by-layer assembling acetylcholinesterase for inhibitor screening by CE[J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 2981–2987.
- [21] Mishra K, Ganju L, Sairam M, *et al.* A review of high throughput technology for the screening of natural products, a review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2008, 62: 94–98.

(责任编辑:张宏梁)

作者简介



陈波, 博士, 教授, 湖南师范大学化学化工学院院长, 主要研究方向为分离分析化学, 针对的具体分析对象为食品和中草药。

E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com