

# 电喷雾质谱法研究人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与 细胞色素 c 的非共价复合物

张华蓉, 张寒琦, 王玉堂, 李 丹, 丁 兰  
(吉林大学化学学院, 长春 130012)

**摘要** 用质谱法研究了人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 的非共价相互作用, 证明主-客体之间形成了多种化学计量比的复合物, 用直接计算的方法得出人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 形成的非共价复合物的各级解离常数  $K_0$ , 用竞争体系验证了计算结果, 二者结果相互吻合.

**关键词** 电喷雾离子化质谱; 人参皂苷; 细胞色素 c; 非共价复合物

**中图分类号** O657      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2006)11-2061-05

人参皂苷是人参的主要有效成分, 具有确切的抗肿瘤活性, 并具有增强人体免疫力、抗衰老、抗疲劳和降低血浆中过氧化脂质含量等功效, 对心血管疾病有较好的疗效. 细胞色素 c 是一种存在于所有含线粒体呼吸链的生物体内起电子传递体作用的蛋白质, 是目前结构较清楚的蛋白质之一, 且因其分子量大小适合普通的电喷雾质谱质荷比检测范围而被用作研究与药物相互作用的主体蛋白<sup>[1]</sup>. 通常药物与蛋白的相互作用主要是非共价相互作用<sup>[2]</sup>.

质谱因其具有快速、特异性和灵敏性, 且能直观地给出化学计量信息等特点而被广泛用于非共价复合物的研究<sup>[3~8]</sup>. 电喷雾软电离技术能使非共价复合物离子化而不破坏其非共价相互作用, 且能使分子量大的蛋白及多肽等生物大分子以多电荷离子形式被检测出来, 所以电喷雾质谱可用于研究蛋白与药物非共价相互作用.

本文采用电喷雾质谱法研究了人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 的非共价相互作用, 建立了一种计算解离常数的新方法, 无需进行曲线拟合, 用竞争反应对实验结果进行验证, 所得结果能很好地吻合.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 购于中国药品生物制品检定所, 马心细胞色素 c 购于 Sigma 公司. 水为 Milli-Q 纯化水, 电阻率为 18.2 MΩ. 其它试剂均为 HPLC 级.

### 1.2 仪器与实验条件

ABI Q-Trap 质谱仪(美国应用生物系统公司), 采用电喷雾离子源, Analyst 1.4 数据记录系统, 拟合软件为 Bio-analyst.

质谱条件: 气帘气和雾化气均为 N<sub>2</sub> 气, 压力为 172 375 Pa, 喷雾电压 3 000 V, 解簇电压 30 V, 入口电压 10 V, 碰撞能 10 eV, 进样速度 3 μL/min, 数据采集 3 min 后取平均值.

### 1.3 样品制备

分别将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 溶于甲醇, 配制成  $4.48 \times 10^{-4}$  和  $5.28 \times 10^{-4}$  mol/L 的贮备溶液. 将细胞色素 c 溶于水, 配制成  $6.78 \times 10^{-4}$  mol/L 的贮备溶液. 实验中固定细胞色素 c 的浓度, 改变药物浓度, 配制成一系列溶液, 于 20 °C 放置平衡后进样.

收稿日期: 2006-01-12.

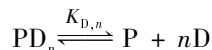
基金项目: 吉林省科技发展计划项目(批准号: 20050560)资助.

联系人简介: 丁 兰(1967 年出生), 女, 博士, 副教授, 主要从事液相色谱-质谱方面的研究. E-mail: analchem@mail.jlu.edu.cn

## 2 理论部分

### 2.1 一种蛋白一种药物体系

细胞色素 c(P) 与药物(D)形成的非共价复合物  $PD_n$  解离反应为



解离常数  $K_{D,n}$  可表示为

$$K_{D,n} = \frac{[P][D]^n}{[PD_n]} \quad (1)$$

$[P]$ ,  $[D]$  和  $[PD_n]$  分别为细胞色素 c、药物以及二者按 1:n 的化学计量比形成的复合物的平衡浓度。细胞色素 c 与药物的总浓度分别为  $[P]_0$  和  $[D]_0$

$$[P]_0 = [P] + [PD] + [PD_2] + \cdots + [PD_n]$$

$$[D]_0 = [D] + [PD] + 2[PD_2] + \cdots + n[PD_n]$$

$$K_{D,n} = \frac{[P][D]^n}{[PD_n]} = \frac{([P]_0 - [PD] - [PD_2] - \cdots - [PD_n]) ([D]_0 - [PD] - 2[PD_2] - \cdots - n[PD_n])^n}{[PD_n]} \quad (2)$$

前人<sup>[9~12]</sup>已提出了一些假设:(1)非共价复合物在质谱离子化过程中不受到破坏;(2)质谱峰强度与溶液中物质的浓度成正比,即

$$[PD_n] = k_n \sum I_{PD_n}$$

式中,  $\sum I_{PD_n}$  指细胞色素 c 的与药物形成的 1:n 的复合物的峰高;(3)P 与  $PD_n$  具有相同的离子化效率,即  $k = k_1 = k_2 = \cdots = k_n$ . 根据上述假设,得出

$$a_n = \frac{[PD_n]}{[P]_0} = \frac{\sum I_{PD_n}}{\sum I_P + \sum I_{PD} + \sum I_{PD_2} + \cdots + \sum I_{PD_n}} \quad (3)$$

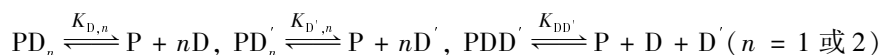
将式(3)带入式(2),得

$$K_{D,n} = \frac{(1 - a_1 - a_2 - \cdots - a_n) ([D]_0 - a_1[P]_0 - 2a_2[P]_0 - \cdots - na_n[P]_0)^n}{a_n} \quad (4)$$

由质谱图中 P, PD 及  $PD_n$  等各离子丰度可求出  $a_n$  值,将实验求得的  $a_n$  以及  $[P]_0$  和  $[D]_0$  代入式(4),能计算出  $K_{D,n}$ .

### 2.2 一种蛋白两种药物体系

为简便起见,只考虑两种药物(D 和 D')两个结合点位的情况,即



根据上述相同假设,有

$$a_n = \frac{[PD_n]}{[P]_0} = \frac{\sum I_{PD_n}}{\sum I_P + \sum I_{PD} + \sum I_{PD_2} + \sum I_{PD'} + \sum I_{PD'_2} + \sum I_{PDD'}} \quad (5)$$

$$b_n = \frac{[PD'_n]}{[P]_0} = \frac{\sum I_{PD'_n}}{\sum I_P + \sum I_{PD} + \sum I_{PD_2} + \sum I_{PD'} + \sum I_{PD'_2} + \sum I_{PDD'}} \quad (6)$$

$$c = \frac{[PDD']}{[P]_0} = \frac{\sum I_{PDD'}}{\sum I_P + \sum I_{PD} + \sum I_{PD_2} + \sum I_{PD'} + \sum I_{PD'_2} + \sum I_{PDD'}} \quad (7)$$

$$K_{D,n} = \frac{(1 - a_1 - a_2 - b_1 - b_2 - c) ([D]_0 - a_1[P]_0 - 2a_2[P]_0 - c[P]_0)^n}{a_n} \quad (8)$$

$$K_{D',n} = \frac{(1 - a_1 - a_2 - b_1 - b_2 - c) ([D']_0 - b_1[P]_0 - 2b_2[P]_0 - c[P]_0)^n}{b_n} \quad (9)$$

$$K_{DD'} = \left\{ (1 - a_1 - a_2 - b_1 - b_2 - c) ([D]_0 - a_1[P]_0 - 2a_2[P]_0 - c[P]_0) \right. \\ \left. ([D']_0 - b_1[P]_0 - 2b_2[P]_0 - c[P]_0) \right\} / c \quad (10)$$

同样, 由质谱图中的 P, PD, PD' 及 PDD' 等各离子的丰度可求出  $a_n$ ,  $b_n$  和  $c$  值, 将求得值以及  $[P]_0$ ,  $[D]_0$  和  $[D']_0$  代入式(8)~(10), 可直接计算出  $K_{D,n}$ ,  $K_{D',n}$  和  $K_{DD'}$ .

### 3 结果与讨论

#### 3.1 细胞色素 c 及其与药物形成的复合物的电喷雾质谱

根据细胞色素 c 的质谱图, 拟合细胞色素 c 的分子量为 12 363.0. 图 1(A) 为人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与细胞色素 c 混合物的质谱图, 其中  $m/z$  1 131.8 和 1 147.8 分别为人参皂苷  $[Rb_1 + Na]^+$  和  $[Rb_1 + K]^+$  的峰. 从图 1(B) 可见, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与细胞色素 c 形成多种复合物.  $m/z$  12 363.0, 13 472.0, 14 581.0, 15 690.0 和 16 799.0 分别为细胞色素 c 与 0~4 个人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 所形成的非共价复合物的峰.

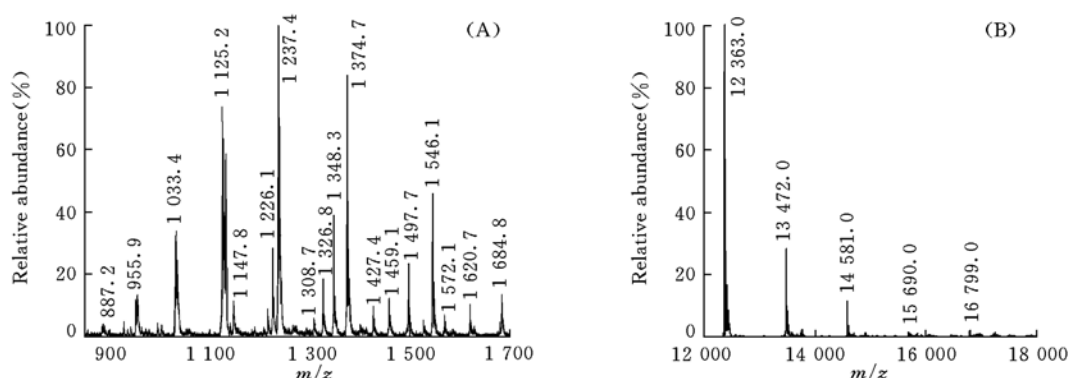


Fig. 1 ESI-MS spectrum of the mixture of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and cytochrome c(A) and the corresponding deconvoluted spectrum transformed from  $m/z$  to actual mass values(B)

图 2(A) 为人参皂苷 Rd 与细胞色素 c 混合物的质谱图, 其中  $m/z$  969.7 和 985.8 分别为人参皂苷  $[Rd + Na]^+$  和  $[Rd + K]^+$  的峰. 从图 2(B) 可见, 人参皂苷 Rd 与细胞色素 c 形成了多种复合物.  $m/z$  12 364.0, 13 309.0, 14 255.0, 15 202.0 和 16 149.0 依次为细胞色素 c 结合 0~4 个人参皂苷 Rd 所形成的非共价复合物的峰.

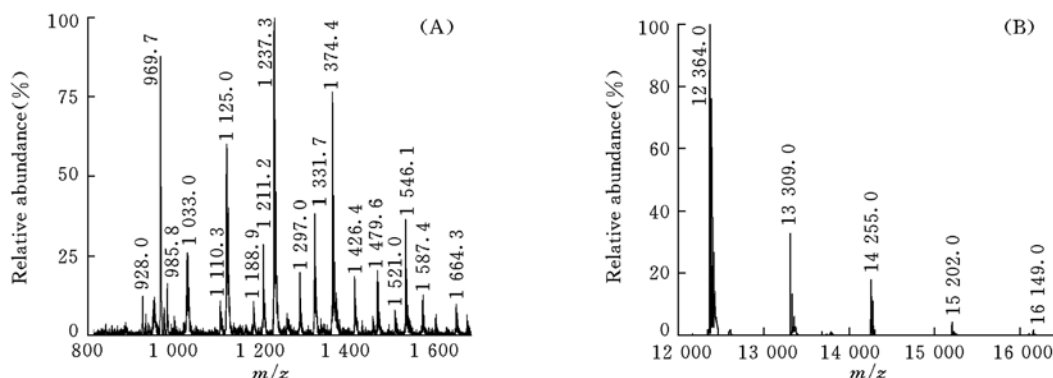


Fig. 2 ESI-MS spectrum of the mixture of ginsenoside Rd and cytochrome c(A) and the corresponding deconvoluted spectrum transformed from  $m/z$  to actual mass values(B)

图 3(A) 为人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 混合物的质谱图. 从图 3(B) 和 (C) 可见, 两种药物与细胞色素 c 形成了多种复合物.

#### 3.2 质谱法测定人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 形成的复合物的解离常数

3.2.1 一种药物一种蛋白体系 在不同药物浓度下测得不同离子的丰度, 根据式(1)~式(3)计算出所形成的非共价复合物的解离常数. 由于人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和 Rd 与细胞色素 c 形成的多配体复合物的丰度很低, 所以只计算细胞色素 c 与人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 或 Rd 按 1:1 和 1:2 化学计量比形成的复合物的解离常

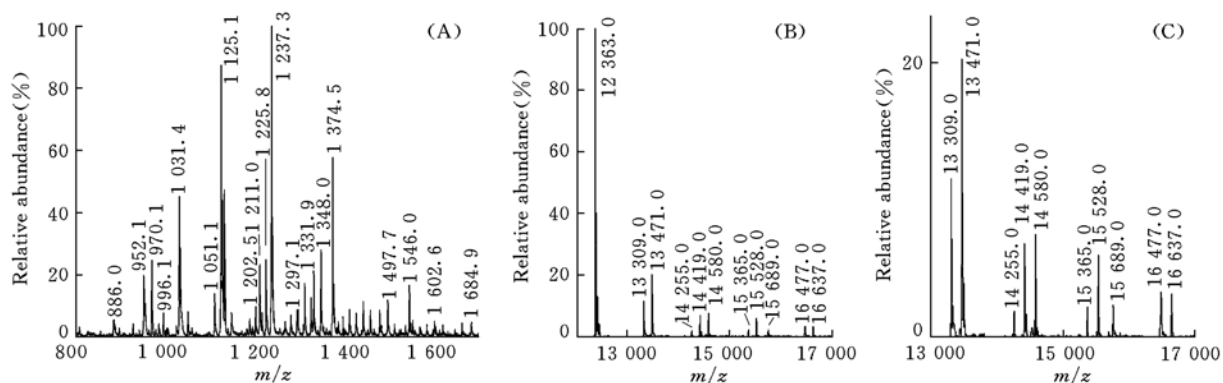


Fig. 3 ESI-MS spectrum of the mixture of ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rd and cytochrome c(A) and the corresponding deconvoluted spectrum transformed from  $m/z$  to actual mass values(B and C)

数. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与细胞色素 c 体系的计算结果见表 1. 实验结果显示, 在每一个固定的主-客体浓度下, 5 次实验所得的结果具有较好的精密性, 但是固定蛋白浓度, 增加药物浓度时, 所计算的解离常数也呈递增趋势, 且 RSD 值较高. 文献[13]也报道过类似的趋势. 产生这一现象的原因可能是药物浓度高时药物本身易形成多聚物, 相当于降低了药物的有效浓度, 而且可能会增加非特异性结合的几[14], ESI 产生的小液滴可能不会完全离子化. 用同样方法得到人参皂苷 Rd 与细胞色素 c 形成的 1:1 和 1:2 化学计量比的复合物的解离常数分别为  $2.30 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 36.82%) 和  $2.14 \times 10^{-8}$  (mol/L)<sup>2</sup> (RSD 为 49.71%).

Table 1  $K_D$  values of noncovalent complexes of ginsenoside Rb<sub>1</sub> (D) and cytochrome c(P)\*

$10^5 [D]_0 /$ (mol · L <sup>-1</sup> )	$\sum I_P$	$\sum I_{PD}$	$\sum I_{PD_2}$	$10^4 K_{D,1} /$ (mol · L <sup>-1</sup> )	RSD (%) (n=5)	$10^7 K_{D,2} /$ (mol · L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	RSD (%) (n=5)
3.34	100	18.74	4.08	1.55	8.25	0.206	12.60
6.69	100	23.73	5.94	2.59	3.14	0.634	12.58
10.0	100	27.48	6.32	3.42	1.99	1.40	22.09
13.4	100	29.03	7.87	4.39	6.00	2.06	20.82
16.7	100	32.92	13.86	4.82	5.35	1.82	18.00
20.1	100	34.57	17.32	5.55	4.93	2.12	19.54
23.4	100	39.58	21.16	5.65	9.24	2.37	19.04
26.7	100	44.92	28.87	5.68	11.07	2.25	12.79
30.1	100	53.37	55.76	5.34	11.86	1.46	17.54
Average				4.33		1.59	
RSD (%)				34.53		47.04	

\* The concentration of cytochrome c was constant at  $2.02 \times 10^{-5}$  mol/L.

3.2.2 两种药物一种蛋白体系 Rb<sub>1</sub>(D)与 Rd(D')同时加入时, 二者发生竞争反应, 生成多种复合物. 根据式(5)~式(10), 在不同浓度下测得的各种离子的丰度, 计算出各种复合物的解离常数, 结果见表 2. 竞争反应与一种蛋白一种药物体系所计算出来的结果吻合得较好. 在固定的细胞色素 c 与药物浓度下, 多次实验所得的 RSD 值令人满意, 但是随着药物浓度的增加, 细胞色素 c 的峰始终为基峰,

Table 2  $K_D$  values of noncovalent complexes of ginsenoside Rb<sub>1</sub>(D) and Rd(D') and cytochrome c(P)\*

$10^4 [D]_0 /$ (mol · L <sup>-1</sup> )	$\sum I_P$	$\sum I_{PD}$	$\sum I_{PD_2}$	$\sum I_{PD'}$	$\sum I_{PD'_2}$	$\sum I_{PDD'}$	$10^4 K_{D,1} /$ (mol · L <sup>-1</sup> )	$10^7 K_{D,2} /$ (mol · L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$10^4 K_{D',1} /$ (mol · L <sup>-1</sup> )	$10^8 K_{D',2} /$ (mol · L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$10^7 K_{DD'} /$ (mol · L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
0.396	100	18.85	8.11	10.42	7.55	1.82	5.78	1.47	3.59	1.85	2.24
0.528	100	19.68	7.19	12.43	8.40	2.62	5.54	1.66	4.04	3.01	2.09
0.660	100	16.88	5.33	15.49	9.78	4.28	6.49	2.25	4.06	4.05	1.61
0.792	100	21.79	7.29	23.35	15.37	7.18	5.00	1.63	3.21	3.66	1.14
0.924	100	20.79	5.72	26.69	16.03	8.81	5.26	2.09	3.29	4.82	1.09
Average							5.61	1.82	3.64	3.48	1.63
RSD (%)							10.17	18.26	11.05	32.24	32.32

\* The concentrations of cytochrome c and ginsenoside Rb<sub>1</sub> (D) were constant at  $1.19 \times 10^{-5}$  and  $1.12 \times 10^{-4}$  mol/L, respectively.

复合物的丰度逐渐增加,且复合物种类可能增多,由于各种复合物的丰度较低,故根据上述假设计算出来的解离常数的 RSD 值也较高.以上实验条件均为含有 45% (体积分数)乙腈和 20% (体积分数)甲醇的溶液.

不同溶剂的实验结果也有所不同.在含有乙酸的溶液中,人参皂苷 Rb<sub>1</sub>和 Rd 与细胞色素 c 只形成 1:1 的复合物,Rb<sub>1</sub>和 Rd 与人参皂苷形成的复合物的解离常数分别为  $1.16 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 12.51%) 和  $1.03 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 13.53%).在含有 2% (体积分数)乙酸的溶液中,Rb<sub>1</sub>和 Rd 与人参皂苷形成的复合物的解离常数分别为  $1.40 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 16.11%) 和  $1.12 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 21.22%).在含有 1% (体积分数)乙酸和 5% (体积分数)乙腈的溶液中,Rb<sub>1</sub>和 Rd 与人参皂苷形成的复合物的解离常数分别为  $1.52 \times 10^{-4}$  mol/L (RSD 为 14.78%) 和  $8.50 \times 10^{-5}$  mol/L (RSD 为 30.21%).不同离子化条件下所得的解离常数也不相同,当离子喷雾电压、解簇电压和碰撞能增加的时候,解离常数也增加.所以在实验中需控制在比较软的条件,以防止非共价复合物的解离.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yang G. S. , Miao R. , Jin C. *et al.* . J. Mass Spectrom. [J] , 2005 , **40** (8) : 1005—1016
- [ 2 ] Lu H. J. , Guo Y. L. , Yang P. Y. . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2004 , **15** (11) : 1612—1615
- [ 3 ] YUE Gui-Hua(岳贵花) , XU Cong-Feng(许崇峰) , BIAN Li-Ping(卞利萍) *et al.* . Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J] , 2000 , **16** (6) : 495—502
- [ 4 ] CHEN Yong(陈 勇) , QI Chun-Hua(祁春华) , HAN Feng-Mei(韩凤梅) . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2005 , **26** (10) : 1829—1831
- [ 5 ] SONG Feng-Rui(宋凤瑞) , LIU Ning(刘 宁) , YAN Cun-Yu(闫存玉) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2004 , **25** (10) : 1830—1832
- [ 6 ] CUI Meng(崔 勳) , LIU Zhi-Qiang(刘志强) , SONG Feng-Rui(宋凤瑞) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2001 , **22** (7) : 1111—1113
- [ 7 ] YU Chong-Tian(余翀天) , GUO Yin-Long(郭寅龙) , ZHANG Zun-Jian(张尊建) *et al.* . Acta Chim. Sinica(化学学报)[J] , 2001 , **59** (4) : 615—618
- [ 8 ] Yu C. T. , Guo Y. L. , Chen G. Q. *et al.* . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2004 , **15** (6) : 792—802
- [ 9 ] Bligh S. W. A. , Haley T. , Lowe P. N. . J. Mol. Recognit. [J] , 2003 , **16** (3) : 139—148
- [ 10 ] Peschke M. , Verkerk I. H. , Kebarle P. . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2004 , **15** (10) : 1424—1434
- [ 11 ] Jürg M. D. , Sebastian D. F. , Sudha R. *et al.* . Int. J. Mass Spectrom. [J] , 2002 , **216** (1) : 1—27
- [ 12 ] Zhang H. R. , Chen G. , Wang L. *et al.* . Int. J. Mass Spectrom. [J] , 2006 , **252** (1) : 1—10
- [ 13 ] Liang H. R. , Foltz R. L. , Meng M. *et al.* . Rapid Commun. Mass Spectrom. [J] , 2003 , **17** (24) : 2815—2821
- [ 14 ] Silke W. , Gregor M. , Jürg D. *et al.* . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2003 , **14** (12) : 1470—1476

## Studies on Ginsenoside Rb<sub>1</sub> and Rd Binding to Cytochrome c by Electro spray Ionization Mass Spectrometry

ZHANG Hua-Rong, ZHANG Han-Qi, WANG Yu-Tang, LI Dan, DING Lan\*  
(College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract** Electro spray ionization mass spectrometry was applied to investigating the noncovalent interaction between ginsenosides and cytochrome c. Several noncovalent complexes with different stoichiometric relationships were observed from the mass spectra. The competition experiment was performed to validate the results. The dissociation constants of the complexes obtained by different systems are consistent with each other.

**Keywords** Electro spray ionization mass spectrometry; Ginsenoside; Cytochrome c; Noncovalent complex  
(Ed. : A, G)