

【 评价方法学 】

D-赖氨酸、L-谷氨酰胺和 L-酪氨酸对格列美脲及其顺式异构体识别的电喷雾质谱法研究

耿颖, 张才煜, 戴田行, 何兰

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 使用电喷雾质谱技术, 研究 3 种氨基酸 (D-赖氨酸、L-谷氨酰胺和 L-酪氨酸) 作为手性选择探针针对格列美脲和格列美脲异构体的识别效应。方法 分别将 3 种氨基酸与格列美脲及其顺式异构体溶液混合, 用电喷雾/离子阱质谱提取非共价结合的复合物, 在二级质谱中通过碰撞诱导解离 (CID) 方法给予不同的碎裂能量, 考察碎片离子的丰度从而进行格列美脲及其顺式异构体的识别。结果 L-酪氨酸、D-赖氨酸和 L-谷氨酰胺对格列美脲及其顺式异构体均有识别效应, 识别率分别为 1.61、2.92 和 2.17。结论 以 3 种手性氨基酸作为立体异构区分探针, 首次实现了格列美脲和格列美脲顺式异构体的质谱法快速识别。

关键词: 顺反异构体; 手性氨基酸; 电喷雾离子化质谱法; 格列美脲; 碰撞诱导解离

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2017) 06-0792-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.012

Study on chiral recognition for the glimepiride and glimepiride-cis-isomer by applying three amino acid (D-Lysine, L-Glutamine and L-Tyrosine) as chiral probes based on electrospray ionization mass spectrometry

GENG Ying, ZHANG Cai-yu, DAI Tian-xing, HE Lan

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective Chiral recognition for the glimepiride and glimepiride-cis-isomer by applying three amino acid (D-Lysine, L-Glutamine and L-Tyrosine) as chiral probes based on electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was achieved. **Methods** glimepiride/glimepiride-cis-isomer solutions were mixed with three amino acid solutions. The complex was extracted by ESI-MS and then the fragmentation abundance was investigated applying collision induced dissociation (CID) by MS/MS, which is the basis of chiral recognition for glimepiride and glimepiride-cis-isomer. **Results** Chiral recognition effect was achieved with the recognition rate (R) 1.61, 2.92 and 2.17 for D-Lysine, L-Glutamine and L-Tyrosine respectively. **Conclusion** 3 kinds of chiral amino acids were used as probes to distinguish between stereoisomers, and rapid identification of glimepiride and glimepiride cis isomer by mass spectrometry come true for the first time.

Key words: cis/trans-isomer; chiral amino acid; electrospray ionization mass spectrometry; glimepiride; collision induced dissociation

格列美脲 (Glimepiride) 是第三代磺酰脲类抗糖尿病药, 具有副作用小、长效、高效和安全性的优点, 是临床评价很高的磺酰脲类降糖药^[1-3]。近年来, 研究发现格列美脲对于神经元损伤具有保护作用^[4-5], 有望用于治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD); 另外, 格列美脲对于保护骨骼系统药理作用也逐渐被研究发掘^[6]。格列美脲的高效液

相色谱分析法以及液相色谱-质谱联用分析方法已广泛的应用于原料药杂质控制、药动学检测以及降糖中药制剂中的非法添加^[7-11]。格列美脲与其顺式异构体杂质分子结构上的区别在于 1,4 取代-环己烷的顺反异构, 属于立体异构, 结构见图 1。由于异构体杂质常常在药效及毒性方面与药物具有差异, 因此控制异构体的含量对于药品质量有着重要的意

收稿日期: 2016-08-25

基金项目: 中国食品药品检定研究院青年基金 (2014A8)

作者简介: 耿颖, 研究方向为药物分析。Tel: 010 67095342 E-mail: gy-vera@163.com

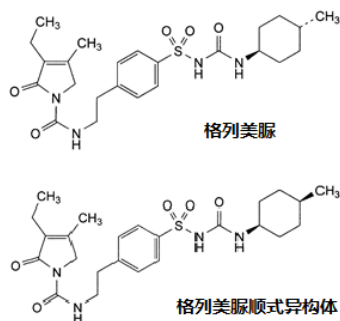


图1 格列美脲和格列美脲顺式异构体的结构式

Fig. 1 Structure of glimepiride and glimepiride-cis-isomer

义。格列美脲原料收载于2015年版《中国药典》二部，在检查项下对特殊杂质——格列美脲顺式异构体进行了控制，方法为采用二羟基丙烷键合硅胶为固定相[即二羟基(Diol)柱]的正相色谱法^[12]。另有文章报道了一种利用酰胺型手性固定相的高效液相色谱法对格列美脲和格列美脲顺式异构体进行分离和分析的方法^[13]。

质谱法近年来在立体异构体识别方面发展迅速^[14-15]。由于电喷雾电离(ESI)技术的应用^[16]，使离子化过程以非共价键结合的复合物的检测更加容易，推动了质谱技术在立体异构体识别中的应用。由于立体异构体具有相同的质量数，研究人员通过在体系中引入手性环境的方式^[17-20]，如手性氨基酸、环糊精、小分子手性探针等，使其通过非共价键作用或者通过原位化学反应的方法，与立体异构体分子形成复合物或非对映体，放大了立体异构体之间的结构差异，在质谱图中表现出离子丰度或碎裂途径的差异，从而达到对立体异构体进行识别和定量的目的。

本文以格列美脲和格列美脲顺式异构体为研究对象，以3种手性氨基酸作为立体异构区分探针，首次实现了格列美脲和格列美脲顺式异构体的质谱法快速识别。本文应用电喷雾离子化技术和离子阱质谱技术，首先在一级质谱中选择格列美脲/顺式异构体与手性氨基酸非共价配合物作为母离子；然后使其在二级质谱中碰撞诱导解离产生碎片离子。由于手性氨基酸探针能够放大顺反异构体结构上的差异，从而在二级质谱图中显示碎片离子的相对峰强度的差异，以此为基础建立了两者的质谱识别方法。与高相液相色谱法及毛细管电泳法相比，本文所述方法所需样品量极少，无需昂贵的手性固定相或手性添加剂，快速，灵敏，对环境无污染。该方法解

决了质谱对于立体异构体无法区分的问题，显示其在具有立体异构体的药物安全与质量控制中具有广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 仪器与质谱条件

Bruker amaZon 离子阱质谱仪(德国, Bruker 公司), 仪器配有电喷雾离子源和离子阱质量分析器数据通过 Compass DataAnalysis 软件处理。样品溶液通过进样泵 170 $\mu\text{L/h}$ 的体积流量注入离子源内。实验过程中采用的仪器操作参数为: 氮气做为干燥气, 体积流量为 5 L/min; 干燥气温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 氮气用作雾化气, 压力为 68.9 kPa; 电喷雾电压为正离子模式: +4 500 V、负离子模式: -4 000 V, 扫描速度为每秒 8 000 m/z ; 二级质谱碰撞诱导解离(CID)中碰撞气体为高纯氦气, 二级质谱母离子峰宽为 1。

1.2 试剂与样品配制

格列美脲对照品(质量分数为 99.6%)、格列美脲顺式异构体对照品(质量分数为 99.2%)均由中国食品药品检定研究院提供。*L*-酪氨酸(质量分数为 99%)、*L*-谷氨酰胺(质量分数为 99%)、*D*-赖氨酸(质量分数 $\geq 98\%$)均购自北京百灵威科技有限公司。甲醇为色谱纯, 美国 Fisher 公司产品。超纯水, 杭州娃哈哈集团产品。

配制 1 mg/mL 的格列美脲和格列美脲顺式异构体甲醇溶液。配制 2 mg/mL 的 *D*-赖氨酸、*L*-谷氨酰胺和 *L*-酪氨酸甲醇溶液。量取 50 μL 格列美脲/格列美脲顺式异构体溶液, 分别于 100 μL *D*-赖氨酸、*L*-谷氨酰胺和 *L*-酪氨酸溶液混合, 再加入 600 μL 甲醇稀释, 振摇 1 min 混匀, 静置 10 min。

2 结果与分析

2.1 格列美脲和格列美脲顺式异构体与氨基酸的非共价结合

图2为格列美脲和格列美脲顺式异构体分别与3种氨基酸混合溶液的一级质谱图, 由图可见, 3种氨基酸与格列美脲及其顺式异构体溶液的一级 ES^+ 质谱图中均出现 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 、 $[\text{复合物}+\text{H}]^+$ 离子峰。格列美脲和格列美脲顺式异构体分子中的磺酰脲基团与氨基酸中的 α -氨基羧酸的结构发生了分子间非共价键结合, 由于复合物中引入了手性氨基酸, 其立体结构放大了格列美脲和格列美脲顺式异构体的立体结构差异, 然而这种差异在一级质谱图中并不显著, 未能实现立体异构的识别, 需要进一步在二级质谱中识别其差异。

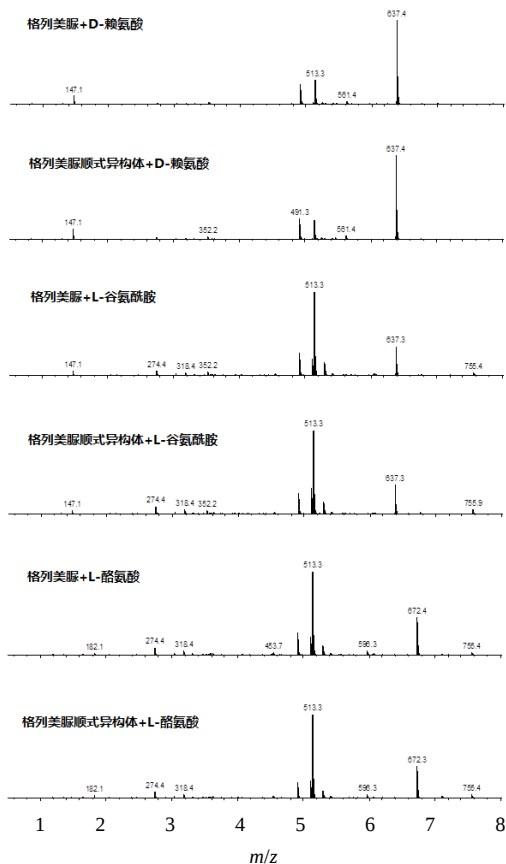


图2 格列美脲/格列美脲顺式异构体与3种氨基酸复合物一级质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of glimepiride/ glimepiride-cis-isomer and 3 kinds of amino acid complexes

2.2 二级质谱碰撞诱导解离 (CID)

图3显示,选择非共价结合的复合物进行二级质谱扫描,给予0.10~0.24 eV的不同能量进行碰撞诱导解离。在某一个特定的相同碰撞能量下,格列

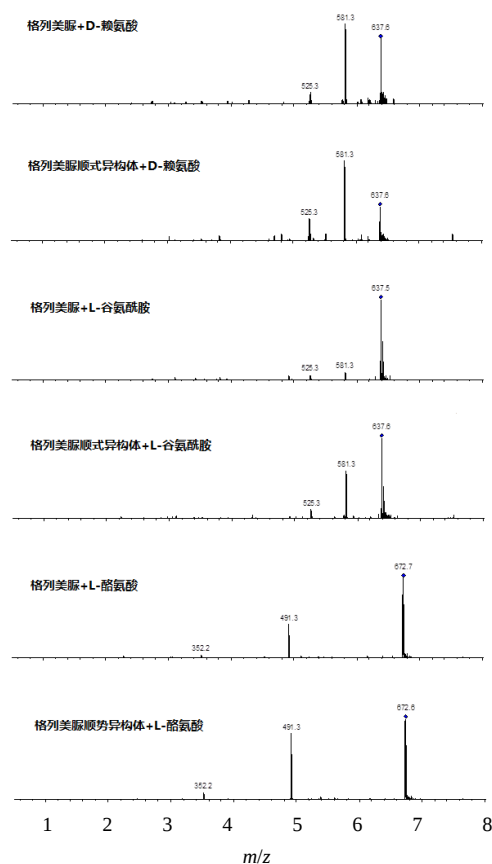


图3 格列美脲/格列美脲顺式异构体与3种氨基酸复合物的二级质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of glimepiride/glimepiride-cis-isomer and 3 kinds of amino acid complexes

美脲-氨基酸复合物与格列美脲顺式异构体-氨基酸复合物的二级碎裂图谱中的母离子与碎片离子的相对丰度显示出了差异。其中,3种复合物的母离子和碎裂离子见表1。

表1 3种手性氨基酸复合物的母离子和碎裂离子

Table 1 Parent ion and fragmentation ion of the three chiral amino acid complexes

手性氨基酸	相对分子质量	结构式	复合物离子质量数	碎片离子质量数
D-赖氨酸	146.2	<chem>NC(CCCNC(=O)O)C(=O)O</chem>	637.5	581.3, 525.3
L-谷氨酰胺	146.2	<chem>NC(CCCNC(=O)O)C(=O)O</chem>	637.5	581.3, 525.3
L-酪氨酸	181.2	<chem>NC(Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O</chem>	672.7	491.3, 352.2

D-赖氨酸和 *L*-谷氨酰胺的相对分子质量相同，且均为链状氨基酸，二级质谱中均显示 m/z 637.5 的[复合物+H]⁺峰，碎片离子峰均为 m/z 581.3 的-56 质量数的离子峰，推测为重排离子峰和 m/z 525.3 的脱去 4-甲基环己烷氨基离子峰。*L*-酪氨酸的二级质谱中，有 m/z 672.7 的[复合物+H]⁺，但碎片离子与 *D*-赖氨酸和 *L*-谷氨酰胺不同，呈现出 m/z 491.3 的[M+H]⁺峰和 m/z 352.2 碎片离子峰（裂解途径见图 4）。根据 *L*-酪氨酸的结构可知其为含有苯环的氨基酸，由于苯环与 α -氨基羧酸的位置较近，且为较稳定的刚性结构，阻止了重排反应的发生，因而裂解为格列美脲和格列美脲顺式异构体母体离子峰。

可见，手性氨基酸的引入在二级质谱中也具有不尽相同的碎裂途径，手性氨基酸的结构对于非共价结合的稳定性具有不同的影响，也造成了质谱碎裂具有不同的途径。手性氨基酸的引入放大了格列美脲与格列美脲顺式异构体碎裂能量的差异，即是实现立体异构质谱识别的基础。

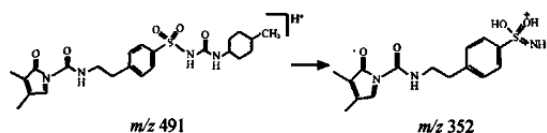


图 4 格列美脲裂解途径

Fig. 4 Cleavage pathway of glimepiride

2.3 3种氨基酸对于格列美脲和格列美脲顺式异构体的识别作用

氨基酸与格列美脲/格列美脲顺式异构体的识别率 (R) 可表示为:

$$R = \frac{\frac{\text{格列美脲+氨基酸复合物离子丰度}}{\text{格列美脲+氨基酸复合物碎片离子丰度}}}{\frac{\text{格列美脲顺式异构体+氨基酸复合物离子丰度}}{\text{格列美脲顺式异构体+氨基酸复合物碎片离子丰度}}} = \frac{R_{\text{格列美脲}}}{R_{\text{格列美脲顺式异构体}}}$$

其中, $R_{\text{格列美脲}}$ 、 $R_{\text{格列美脲顺式异构体}}$ 表示格列美脲和格列美脲顺式异构体对某种氨基酸的非共价结合率。 R 为两者的比值, 代表了该氨基酸对于格列美脲和格列美脲顺式异构体结合率的差异。 R 与 1 相差越大, 表明对两者的识别能力越高, 若 $R=1$, 说明对两者没有识别能力。*D*-赖氨酸、*L*-谷氨酰胺和 *L*-酪氨酸与格列美脲和格列美脲顺式异构体的非共价结合率以及 3 种氨基酸对于两者的识别率见表 2。由表 2 可见, 3 种氨基酸对格列美脲和格列美脲顺式异构体均有识别能力, 其中 *L*-谷氨酰胺 > *L*-酪氨酸 > *D*-赖氨酸。

表 2 3 种手性氨基酸对于格列美脲和格列美脲顺式异构体的非共价结合率和识别率

Table 2 Non covalent binding rate and recognition rate of three kinds of chiral amino acids for glimepiride and glimepiride-cis-isomer

复合物	非共价结合率	识别率
<i>D</i> -赖氨酸-格列美脲	0.89	
<i>D</i> -赖氨酸-格列美脲顺式异构体	0.56	1.61
<i>L</i> -谷氨酰胺-格列美脲	6.16	
<i>L</i> -谷氨酰胺-格列美脲顺式异构体	2.11	2.92
<i>L</i> -酪氨酸-格列美脲	2.81	
<i>L</i> -酪氨酸-格列美脲顺式异构体	1.29	2.17

3 讨论

本研究采用电喷雾离子化技术, 用 3 种手性氨基酸作为识别试剂形成非共价结合的复合物, 引入了手性环境。通过碰撞诱导解离方法, 在二级质谱中放大了格列美脲和格列美脲顺式异构体结构的差异, 通过对碎片离子和母离子的丰度比值, 考察三种氨基酸对于格列美脲和格列美脲顺式异构体的识别率, 实现了对格列美脲和格列美脲顺式异构体的立体异构的识别。本方法解决了质谱对于立体异构体无法区分的问题, 提供了一种快速、可靠的识别方法, 作为一种替代方法对格列美脲和格列美脲顺式异构体进行快速鉴别。

参考文献

- [1] Draeger E. Clinical profile of glimepiride [J]. Diabetes Res Clin Pract, 1995, 28(2): S139-S146.
- [2] Roskamp R, Wernickepanten K, Draeger E. Clinical profile of the novel sulphonylurea glimepiride.[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1996, 31 Suppl: S33-S42.
- [3] Tsumura K. Clinical evaluation of glimepiride (HOE490) in NIDDM, including a double blind comparative study versus gliclazide [J]. Diabetes Res Clin Pract, 1995, 28 Suppl: S147-149.
- [4] Osborne C, West E, Nolan W, et al. Glimepiride protects neurons against amyloid- β -induced synapse damage [J]. Neuropharmacology, 2016, 101: 225-236.
- [5] Liu F, Wang Y, Yan M, et al. Glimepiride attenuates A β production via suppressing BACE1 activity in cortical neurons [J]. Neurosci Lett, 2013, 557: 90-94.

- [6] Fronczek-Sokół J, Pytlik M. Effect of glimepiride on the skeletal system of ovariectomized and non-ovariectomized rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(3): 412-417.
- [7] Khan M A, Sinha S, Vartak S, et al. LC determination of glimepiride and its related impurities [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39(5): 928-943.
- [8] Qiu X, Wang H W, Yuan Y, et al. An UPLC-MS/MS method for the analysis of glimepiride and fluoxetine in human plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 980: 16-19.
- [9] Ni X J, Wang Z Z, Shang D W, et al. Simultaneous determination of glimepiride and pioglitazone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 960(6): 247-252.
- [10] 李晓燕, 刘 斐, 郑 静, 等. 液质联用检查降糖中药制剂中掺入的 7 种化学药品 [J]. *中国药事*, 2008, 22(11): 980-983.
- [11] 陈冬东, 马 微, 彭 涛, 等. 分散固相萃取/高效液相色谱一串联质谱法同时测定中药和保健食品中 7 种胰岛素分泌促进剂 [J]. *分析化学*, 2011, 39(2): 213-218.
- [12] 中国药典 [S]. 2015.
- [13] 宋雅茹, 王德发, 牛丽萍, 等. 利用酰胺型手性固定相高效液相色谱法对格列美脲顺反异构体的分离与测定 [J]. *分析化学*, 2004, 32(4): 435-438.
- [14] 于 擎, 曹 洁. 质谱动力学方法在手性识别及对映体过量值方面的原理及应用 [J]. *质谱学报*, 2009, 30(3): 179-190.
- [15] 陆豪杰, 郭寅龙. 手性分子识别的质谱研究进展 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2002, 8(2): 65-71.
- [16] 吴弼东, 谢剑炜. 电喷雾质谱技术在手性识别中的应用 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28(4): 381-384.
- [17] 张 敏, 史 真, 白银娟, 等. 环糊精对(R), (S)-2-丁醇手性分子识别的电喷雾电离质谱研究 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(5): 56-58.
- [18] 刘治岐, 王鸣刚, 刘 颖, 等. 两种 β -环糊精对苯环壬酯手性识别的串联四极杆质谱研究 [J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(1): 89-93.
- [19] 罗小雨, 王海星, 张 舒, 等. 4-羟基- α -氰基肉桂酸衍生物的设计合成及在质谱法手性识别氨基酸中的应用 [J]. *暨南大学学报 (自然科学版)*, 2013, 34(1): 106-114.
- [20] 徐括喜, 刘顺英, 何永炳. 含氨基酸单元的手性主体的合成及手性识别研究 [J]. *化学学报*, 2006, 64(21): 2205-2209.