

· 综述 ·

液-质联用中大气压电离接口技术及其在药物分析中的应用

王海荣, 张兰桐 (河北医科大学药物分析教研室, 河北 石家庄 050017)

[摘要] 目的:介绍液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)在药物分析中的应用。方法:通过介绍液相色谱-质谱技术原理,引入大气压电离接口技术,并综述了在药物分析中的应用。结果:液相色谱-质谱技术对药物的杂质检查与降解产物、药动学、药物代谢产物的分析和鉴定、生物大分子以及药物开发得到了广泛应用。结论:大气压电离接口技术,扩大了液相色谱-质谱联用技术的应用范围,促进了药物分析学科的发展。

[关键词] 液相色谱-质谱联用;大气压电离接口技术;药物分析;药物代谢

[中图分类号] R971.9 [文献标识码] B [文章编号] 1001-5213(2006)09-1137-03

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)集高效液相色谱技术的高分离能力与质谱技术的高灵敏度、高专属性于一体,已成为体内药物分析、代谢产物和结构研究等现代药学前沿领域中最强有力的分析工具之一,在各个领域得到了广泛应用。各种软离子化技术的引入,特别是大气压电离(API)技术解决了中高极性化合物的分析,已成功用于各种药物在人或实验动物体内的代谢研究,简化了样品处理过程,极大地扩展了LC-MS的应用范围^[1,2]。

1 大气压电离(atmospheric pressure ionization, API)接口技术

API接口是目前商品化LC-MS仪采用最广的接口,主要包括电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)、气动辅助电喷雾即离子喷雾电离(ionspray ionization, ISI)和大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)3种操作模式。电喷雾电离及大气压化学电离接口是一项实用、高效的常压“软”离子化技术,具有离子化效率高、离子化模式多样、可测定高分子量蛋白质和热不稳定化合物、易与大流量HPLC联机使用等优点,被人们称为LC-MS技术乃至质谱技术的革命性突破。

1.1 ESI接口 ESI属于“软”电离技术。该技术无碎片离子峰,只产生高丰度的准分子离子峰;可测定不稳定的极性化合物,并可直接分析混合物。ESI的离子化机制主要有两种理论解释^[3]:一种是离子蒸发理论,即来自LC毛细管的流出液由于同轴高速氮气的喷出而形成很细的雾,高电压加在毛细管上,在加热的干燥氮气的作用下,液滴中的溶剂被快速蒸发,直至表面电荷增大到库仑排斥力大于表面张力而爆炸,产生带电的子液滴。处于液滴表面的离子可以在一个对动力学或能量而言的临界点上由液相直接被发射进入气相,完成离子化过程。另一种是微滴的单离子理论或称裂变理论,即微滴在运动过程中溶剂迅速蒸发,微滴表面不断缩小,而电荷密度不断提高,达到Rayleigh极限时微滴总会因表面隆起从而在导电场的作用下裂变成更小的微珠。在裂变过程中质量和电荷发生不对称的重新分配,产生越来越小带电微珠,因而总有被分析物质以单电荷或多电荷离子形式进入气相。

1.2 APCI接口 APCI接口技术只产生单电荷的准分子离子峰,适用于弱极性的小分子化合物的分析;快速地分析流

动相含水量高或低的样品,适合做梯度洗脱;可通过调节接口内锥孔上的电压来控制分子离子在离子源内的断裂程度(源内CID),来获得结构信息。

APCI接口与传统的化学电离不同,它并不采用诸如甲烷一类的反应气体,而是借助电晕放电(corona discharge)启动一系列气相反应来完成离子化过程。电晕放电针发射自由电子轰击空气中O₂、N₂、H₂O产生O₂⁺、N₂⁺、NO⁺、H₂⁺O等初级离子(primary ion),再由这些初级离子与样品分子进行质子或电子交换而使其离子化并进入气相。对喷雾气体的加热以及APCI的离子化过程对流动相的组成依赖较小,使得APCI操作中可采用组成较为简单的,含水较多的流动相。

APCI离子化机制有3种理论阐述^[3]:经典意义的APCI(classical APCI),离子蒸发(ion evaporation)和摩擦电APCI(triboelectric APCI)。

ESI和APCI在实际应用中表现出它们各自的优势和弱点^[3]。使得成为两个相互补充的分析手段,见表1。

2 药物及其代谢物的分析

药物体内代谢复杂,分析困难。药物经二相代谢,结构和极性发生较大的改变,且热稳定性差,致使GC-MS的使用受到限制,LC-MS由于其自身优势在药物代谢中的到广泛应用。

2.1 LC/ESI/MS药物分析中的应用 ESI通过施加强电场使样品离子释放,产生高电荷离子,从而使其质荷比降低到普通质量分析仪器可以检测的范围,大大扩展了分子质量的分析范围。LC/ESI/MS在药物的杂质检查与降解产物、药动学、药物代谢产物的分析和结构鉴定、生物大分子研究以及新药开发等方面均获得了广泛应用。

2.1.1 复杂混合物及药物代谢产物鉴定 体内代谢物的研究,因其浓度较低,分离出代谢物纯品进行结构鉴定的难度很大。应用LC-MS联用技术可解决这一难题,同时分离鉴定生物体液中的药物及其代谢物。钟大放等^[4]采用电喷雾离子阱质谱法测定了人尿样中的罗红霉素,对其10种代谢物进行识别,结合其他碎片特征,对其结构作出了合理推断。顾景凯等^[5]应用LC/ESI/MSⁿ同时检测人尿液中艾司唑仑、阿普唑仑和三唑仑,可在一级质谱条件下获得很强的待测物准分子离子峰,几乎不产生碎片离子,并且可借助MSⁿ对准

[作者简介] 王海荣,女,硕士研究生,电话:0311-86266419, E-mail:wel_lw@163.com

表 1 ESI 和 APCI 不同方面比较

Tab 1 The comparison of ESI and APCI

比较项目	ESI	APCI
可分析样品	蛋白质、肽类、低聚核苷酸; 非极性/中等极性的小儿茶酚胺、季铵盐等; 含杂原子化合物如氨基甲酸酯等; 可用热喷雾分析的化合物	非极性/中等极性的分子, 如脂肪酸、邻苯二甲酸等; 含杂原子化合物如氨基甲酸酯、脲等; 可用热喷雾、粒子束技术分析的化合物
不能分析样品	极端非极性样品	非挥发性样品; 热稳定性差的样品
基质和流动相的影响	对样品的基质组成和流动相组成比 APCI 更敏感; 对挥发性很强的缓冲液也要使用较低的浓度, 出现 Na^+ , K^+ , Cl^- , CF_3COO^- 等离子的加成	对样品的基质和流动相组成的敏感程度比 ESI 小; 可以使用稍高浓度的挥发性强的缓冲液; 有机溶剂的种类和溶剂分子的加成影响离子化效率和产物
溶剂	溶剂 pH 对在溶剂中形成离子的分析物有重大的影响; 溶剂 pH 的调整会加强在溶液中非离子化分析物的离子化效率	溶剂选择非常重要并影响离子化过程; 溶剂 pH 对离子化效率有一定的影响
流动相流速	在低流速 ($< 100 \mu\text{L}$) 下工作良好; 高流速下 ($> 750 \mu\text{L}$) 比 APCI 差	在低流速 ($< 100 \mu\text{L}$) 下工作不好; 高流速下 ($> 750 \mu\text{L}$) 好于 ESI
碎片的产生	CID 对大部分的极性和中等极性化合物可产生显著的碎片	比 ESI 更为有效并常有脱水峰出现的碎片

分子离子进行多级裂解, 进而获得丰富的结构信息。克服了 HPLC、免疫分析法不能给出结构信息, 专属性和灵敏度较差、GC-MS 需衍生化, 操作复杂等优点。另外, Josefsson 等^[6]用 LC/ESI/MS 联用技术测定人血和尿样中 14 种忧虑分泌物及其代谢物; Nitao, James 等^[7]分析欧洲防风根幼虫中呋喃香豆素类化合物的代谢物; Saghir 等^[8]对大鼠口服 1-苯氧基-2-丁醇的吸收、代谢、排泄进行研究; Verzegnassi 等^[9]运用电喷雾串联质谱对不同地理区域蜂蜜中氯霉素进行了分析; 以 ESI⁺ 为电离源, 检测家兔灌胃给药后血样和尿样中阿普唑仑原形药及其羟基化代谢物、葡萄糖苷型结合物^[10]; 测定蜂蜜及水产品中硝基呋喃类抗菌药物代谢物残留量^[11]。

2.1.2 药动学研究中的应用 LC/ESI/MS 在快速测定血浆样品中的药物浓度、研究人体药动学方面具有广泛的应用。Baranda, Ana 等^[12]测定了人血浆中氮氯地平钙通道阻滞剂; Brown, Scott 等^[13]在测定环孢素 A 时, 采用 HPLC-ESI/MS/MS 对内标子囊霉素、环孢素 D 进行了评价。

2.1.3 生物大分子研究中的应用 ESI/MS 在多肽与蛋白质的相对分子质量、氨基酸序列和肽图谱、双硫键、后翻译修饰如糖基化、磷酸化以及蛋白质与小分子物质的非共价结合等方面均获得了应用^[14]。对蛋白和多肽而言, 反相色谱法具有较高的分离效能, 因其使用的多是易挥发的有机溶剂作流动相, 故与 ESI 质谱有较好的匹配性。在采集蛋白质和肽的质谱数据时, 经常需要考虑的问题是柱后修饰, 通过柱后修饰可使 ESI/MS 的响应改善。柱后修饰的作用有: 调节 pH 值以优化正或负离子检测; 添加异丙醇以利于含水溶剂的去溶剂化并稀释缓冲盐以达到 ESI/MS 正常工作可接受的程度; 添加醋酸钠 (约 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) 以使缺乏或弱离子化的样品阳离子化, 提高灵敏度; 柱后分流, 降低流速和柱后衍生化, 以提高质谱响应等。

2.2 LC/APCI/MS 研究小分子药物及其代谢物 APCI/MS 更为适合小分子化合物的定量分析, APCI 接口一般为加热喷雾方式, 适合大流量和广泛种类的溶剂, 有利于降低样品中的中性分子杂质的干扰; 另外, APCI 使用大流量, 有利于色谱分离。

徐友宣等^[15]建立高灵敏、简捷的 LC/APCI/MS 测定海洛因、6-乙酰吗啡、乙酰可待因和螺内酯 4 种药物及代谢产物的浓度。并比较了兴奋剂、麻醉镇静药、-阻断药、利尿药、类固醇和 β_2 -激动药 6 类小分子药物的电喷雾质谱 (ESI/MS) 和大气压化学解离质谱 (APCI/MS) 行为, 显示了 APCI/MS 在小分子药物测定中的潜力。刘蕾等^[16]采用 APCI 源测定人血浆中盐酸班布特罗及其代谢物特布他林的浓度, APCI 电离源, 一般只生成 $(M+H)^+$ 、 $(M-H)^-$ 单电荷分子离子, 选择性监测 (SIR) 准分子离子, 具有较高的灵敏度、专属性, LC/APCI/MS 具有色谱分离与质谱分离的双重功能, 可以依靠质谱的分辨能力区分不同物质的色谱峰, 抗干扰能力强。

2.3 LC-APFMS 在天然药物结构及代谢产物研究中的应用 质谱技术在天然药物结构的鉴定以及药物代谢物的研究具有重要的作用, 尤其 LC-APFMS 联用技术具有更高的选择性和可靠性, 它的应用显示出了非常广阔的前景。

Ndjoko 等^[17]用 HPLC-ESI/MS 法测定了银杏叶及其制剂中的痕量银杏酸, 从银杏果的氯仿提取物中分离得到 3 种主要银杏酸, 并以此 3 种银杏酸定量。李明等^[18]采用 LC-APFMS 技术研究了红豆杉中含有的 10-去乙酰基巴卡亭、巴卡亭、1-去羟基巴卡亭、1-去羟基巴卡亭等巴卡亭类化合物的质谱特征。这些化合物在 APCI 正离子全范围扫描中主要形成 $[M+H_3O]^+$, 在 ESI 正离子全范围扫描中主要形成 $[M+Na]^+$ 离子, 同时都会产生与结构相关的碎片离子。王祝伟等^[19]采用 LC-APFMS 技术得到了红毛五加的紫外 (UV) 色谱图、总离子流色谱图 (TIC) 和萃取离子色谱图 (EIC), 以及相应色谱峰的 EIC/MS² 的质谱图, 对其进行解析, 鉴别出红毛五加中的鸟苷、腺苷和紫丁香树脂苷成分。

3 讨论

LC/API/MS 作为高灵敏度的简捷方法被广泛应用于药物分析的各个领域, 尤其在药动学方面, 具有其他分析手段无法比拟的优势, 促进了药物代谢、药动学、毒物分析、蛋白质与多肽分析、抗菌药物分析及中药分析等分析科学得发展, 对毒物的快速分析和生命科学的发展具有重要意义。API 接口的研制成功, 解决了 LC 流速与 MS 仪在真空条件下工作的匹配问题, 扩大了 LC/MS 联用技术的应用范围, 为液质联用技术的革命性突破, 极大的促进了药物分析学科的发展。

参考文献:

- [1] Halket John M, Waterman Daniel, Przyborowska, Anna M, et al. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(410): 219.
- [2] Marquet, Pierre. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 24(2): 255.
- [3] 汪正范, 杨树民, 吴侔天, 等. 色谱联用技术[M]. 北京: 化学工

- 业出版社, 2001. 1.
- [4] 钟大放, 田蕾, 李雪庆, 等. 罗红霉素及其代谢物的电喷雾离子阱质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(1): 31.
- [5] 顾景凯, 夏荣, 钟大放, 等. LC/MSⁿ法同时检测人尿液中艾司唑仑、阿普唑仑和三唑仑[J]. 药学学报, 2002, 37(2): 138.
- [6] 周南. 国际质谱分析会议[J]. 分析试验室, 2004, 23(12): 91.
- [7] Nitao James K, Berhow Mark, Duval Sandra M, et al. Characterization of furanocoumarin metabolites in parsnip webworm *depressaria pastinacella* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2003, 29(3): 671.
- [8] Saghir SA, Brzak KA, Bartels MJ. Oral absorption, metabolism and excretion of 1-phenoxy-2-propanol in rats[J]. *Xenobiotica*, 2003, 33(10): 1059.
- [9] Verzeznassi L, Royer D, Mottier P, et al. Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2003, 20(4): 335.
- [10] 郭继芬, 孙璐, 钟大放. 用液相色谱-离子阱质谱联用法检测兔体液中阿普唑仑及其主要代谢产物[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(5): 358.
- [11] 余建新, 胡小钟, 林雁飞, 等. 液相色谱-串联质谱联用法测定蜂蜜及水产品中硝基喹啉类抗菌药物代谢物残留量[J]. 分析科学学报, 2004, 20(4): 382.
- [12] Baranda Ana B, Mueller Claudia A, Alonso Rosa M, et al. Quantitative determination of the calcium channel antagonists amlodipine, lercanidipine, nitrendipine, felodipine, and lacidipine in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2005, 27(1): 44.
- [13] Brown Scott R, Taylor Paul J, Cooper Donald P, et al. Evaluation of internal standards for the measurement of Cyclosporin A by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2005, 27(2): 243.
- [14] 韩俊, 杨仲元, 盛龙生, 等. 电喷雾离子化质谱法及其在药物与生物大分子分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(3): 212.
- [15] 徐友宣, 王超, 彭师奇, 等. 小分子药物的 APCI/MS 研究[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(5): 368.
- [16] 刘蕾, 李可欣, 史爱欣, 等. HPLC-MS 测定人血浆中盐酸班布特罗及其代谢物特布他林的浓度[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 316.
- [17] Ndjoko K, Wolfender J-L, Hostettmann K. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2000, 744: 249.
- [18] 李明, 陈建民. 红豆杉中巴卡亭类化合物的 ESI/MS 及 APCI/MS 比较研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 2004, 43(6): 1093.
- [19] 王祝伟, 孙毓庆. 中药红毛五加化学成分的高效液相色谱/电喷雾电离/质谱/质谱(HPLC/ESI/MS²)分析[J]. 色谱, 2003, 21(6): 554.

[收稿日期] 2005-11-19

天然药物治疗妇女绝经期综合征的研究概况

杨西晓, 侯连兵 (南方医科大学南方医院药学部, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 了解天然药物治疗妇女绝经期综合征的研究概况。方法: 通过查阅文献, 按中医理论对妇女绝经期综合征的认识、绝经期综合征的中药复方治疗、单一提取物治疗等三方面概述。结果: 综述了天然药物治疗妇女绝经期综合征的研究概况。结论: 目前无论是国外开发的植物雌激素产品还是国内的中药复方, 其临床效果并不令人满意。中药在治疗绝经期综合征上有一定的优势, 应加强基础研究。

[关键词] 天然药物; 中药; 绝经期综合征

[中图分类号] R971.9 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1001-5213(2006)09-1139-03

20 世纪 80 年代的临床研究发现越来越多的症状或疾病与妇女绝经相关, 如精神神经症状、中风、心血管疾病、骨质疏松、乳腺癌和子宫内膜癌及老年性阴道炎等。妇女绝经后, 孕激素水平可降低到正常卵泡期水平的 30%, 雌激素的水平通常低于 $20 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并保持相对稳定。研究发现雌激素替代疗法(ERT)在缓解绝经相关疾病的同时, 也有禁忌证和慎用证。对长期应用 ERT 可能增加乳腺癌危险性, 以及即使加用了孕激素的激素替代疗法(HRT), 并非在所有情况下均能克服雌激素致子宫内膜癌、子宫肌瘤、内膜异位症的危险, 限制了长期应用 HRT 的依从性。而且人工合成雌激素, 对肝脏有不良损害作用, 并可能导致某些妇女出现或加重高血压。

从植物药材中筛选具有类雌激素样活性的有效成分已

成为国际上研究的热点。本资料就中药治疗妇女绝经期综合征的研究综述如下。

1 中医理论对妇女绝经期综合症的认识

由于女性 49 岁前后卵巢功能开始衰退, 雌激素分泌减少, 从而引起内分泌紊乱, 植物神经功能失调而产生。在中医典籍中无确切的病名记载, 在对疾病的认识和治疗方法包括补肾虚; 在补肾同时, 兼柔肝养心健脾; 陆启滨^[1]认为: 肾及心肝, 阴虚火旺是根本, 心肝火旺, 神魂失宁是病变之标。也有人^[2]认为绝经期综合征属中医的郁证, 对该病辨证不应局限于肾虚及补肾的方法, 而应同时注重肝郁对该病的影响。运用疏肝清热、健脾和血治疗肝脾血虚, 肝郁化热型及柔肝缓急、清心安神治疗心虚肝郁, 神不守舍型等绝经期综合征患者亦取得了较好的疗效。

[基金作者] 广东省自然科学基金资助项目(编号: 020057) **[作者简介]** 杨西晓, 女, 博士, 副主任药师, 电话: 020-62787236, E-mail: yaxx@263.net