

基于化学衍生化技术提高 LC-MSⁿ 在生物体液中 药物定量检测灵敏度的研究进展

李 迎, 徐丽丽, 阮金秀, 张振清*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 液相色谱-质谱联用 (LC-MSⁿ) 的高灵敏度和高专属性在药物研究特别是药物代谢研究中发挥着重要作用。但是随着高活性低剂量药物和特殊结构类型化合物的出现, 液质联用的应用也受到限制。通过衍生化改变药物的结构, 从而改变其理化性质, 在液质联用检测中可以提高离子化效率, 降低基质抑制和减少无机盐及内源性杂质的干扰。本文简要综述了衍生化和液质联用技术应用于生物体液中药物定量检测灵敏度提高方面的最新进展。

关键词: 化学衍生化; LC-MSⁿ; 官能团; 灵敏度提高

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0637-05

Research progress of enhancing quantitative sensitivity by using LC-MSⁿ with derivatization method in bio-matrices

LI Ying, XU Li-li, RUAN Jin-xiu, ZHANG Zhen-qing*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MSⁿ) has been essential to a large number of quantitative analytical applications in drug research, and especially in the drug PK/PD research, due to its high sensitivity and high specificity. But following the appearance of drugs with high activity and low dosage and the especial structural compounds, a number of limitations of LC-MSⁿ have been noted. Derivatization changes the structure of drugs and therefore changes their physical and chemical properties, resulting in high ionization efficiency, low matrix effect and low disturbance by inorganic salts and endogenous compounds in LC-MSⁿ. In this article, recent progress in the research of the chemical derivatization strategy with LC-MSⁿ is reviewed on breakthrough of some LC-MSⁿ limitations, in particular focusing on the applications involving some drugs in bio-matrices.

Key words: chemical derivatization; LC-MSⁿ; functional group; sensitivity enhancement

液相色谱-质谱联用 (LC-MSⁿ) 具有高灵敏度和高专一性, 在药物研究特别是药物代谢研究中发挥着极大的作用, 但是随着高活性低剂量药物和特殊

结构类型化合物的出现, 液质联用的应用也受到限制。应用衍生化反应将药物转化为适合液质联用识别和检测的新结构, 从而提高药物检测灵敏度和高专一性。本文简要综述了衍生化和液质联用技术应用于生物体液中药物定量检测灵敏度提高方面的最新进展。

1 药物中不同官能团的衍生化

1.1 醇羟基 生物样品分析领域中多数报道应用衍生化液质联用技术的含醇羟基类药物主要是甾体类。

收稿日期: 2011-01-13.

基金项目: “国家重大新药创制”科技重大专项综合性新药研究开发技术大平台资助项目 (2009ZX09301-002); 单元平台资助项目 (2009ZX09304-004); “国家重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09103-130).

*通讯作者 Tel: 86-10-66930632, Fax: 86-10-88270688,
E-mail: zqzhang55@yahoo.com

由于缺乏可电离的官能团, 未经结构修饰的醇羟基药物在 LC-MSⁿ 中不易被检测, 尤其在复杂生物基质中直接应用 LC-MSⁿ, 微量的醇羟基药物很难达到灵敏度检测要求。因此, 通过衍生化和 LC-MSⁿ 联用的方法, 在电喷雾电离 (ESI) 模式下, 应用醇羟基药物衍生化试剂在分子中引入可电离的基团, 包括磷、季胺盐等。如 Meesters 等^[1]应用叠氮-7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸酯叠氮化合物作为衍生化试剂, 衍生化马鞭草烯醇 (单萜醇类), 检测线性范围为 22~197 ng·L⁻¹。含胺基的衍生化试剂单-(二甲氨基乙基) 琥珀酸 (MDMAES) 能有效提高胆固醇和去氢胆固醇的检测灵敏度^[2], 应用此衍生化技术可以仅用 5 μL 人血浆即可使血浆中的定量限达到 0.12 mmol·L⁻¹。在大气压化学电离 (APCI) 模式下, 引入高亲质子原子 (如氮、氧) 可提高质子转移能力^[3]。Gao 等^[4]用苯甲酰氯衍生化丙烯乙二醇, 使其在大鼠血浆和肺的检测限分别为 0.27 μg·mL⁻¹ 和 1.1 μg·g⁻¹。引入苯甲酰基后, 离子的气体状态下碱度和丙烯乙二醇的质子转移能力均提高。另外, 向甾体中引入酯的结构也能提高 APCI 模式下的离子化效率。12.5% 乙酸酐和 12.5% 三甲胺的混合物用作衍生化试剂, 与醇羟基生成乙酰基衍生物。如布地奈德和氟替卡松丙酸酯的检测限分别为 25 和 10 pg·mL⁻¹^[5]。总之, 醇羟基由于活性不高, 反应条件较复杂。

1.2 酚羟基 相比醇羟基, 酚羟基的活性大大增加。在酚羟基的衍生化液质联用研究中, 应用丹磺酰氯的报道较多。因为其结构中含有 1 个碱性叔胺, ESI 模式下可提高离子化效率。Gong 等^[6]应用丹磺酰氯测定人血清中的痕量糖甙类药物淫羊藿苷, 线性范围在 10 pg·mL⁻¹~4 ng·mL⁻¹ 内, 灵敏度大为提高。Licca-Perez^[7]和 Liu 等^[8]分别应用丹磺酰氯测定血浆中的炔雌醇, 定量限均为 0.01 ng·mL⁻¹。还有应用其他新型的衍生化试剂, 如 1-(2, 4-二硝基-5-氟苯基)-4-甲基哌嗪 (PPZ) 和叠氮-4-(4-甲基-1-哌嗪)-3-硝基苯甲酸酯 (APZ), 它们可以显著提高睾酮的检测灵敏度, 且反应迅速、完全^[9]。

1.3 酮和醛 酮和醛是活性较高的官能团之一, 所以酮和醛的衍生化报道较多, 衍生化试剂种类也较多。但是衍生化试剂多是来源于原来的荧光、紫外衍生化反应的试剂, 真正应用于液质联用并可以显著提高液质联用检测灵敏度的还很少。归纳起来, 主要应用于 LC-MSⁿ 的有丹磺酰肼 (DNSH)^[10]、2-肼基-1-甲基吡啶 (HMP)、2, 4-二硝基苯肼 (DNPH)^[11] 和 3-硝基苯肼 (NPH)^[12] 等。它们的结构特征是含有叔胺

基团, 可以在目标药物结构中引入易电离基团, 提高检测灵敏度。Higashi 等^[13]研究发现, 经 HMP 衍生化, 检测唾液中的脱氢表雄酮可以达到 25 pg·mL⁻¹ (样品量 100 μL)。Uran 等^[12]应用 NPH 衍生化测定 ¹³C-丙酮酸盐, 检测范围为 4.5~4 500 μmol·L⁻¹。Al-Dirbashi 等^[14]应用 DNSH 测定尿中的琥珀酰丙酮的浓度, 尿的用量为 100 μL, 定量限为 5 nmol·L⁻¹。

1.4 羧酸 生物基质中羧酸基团在 ESI 正离子模式下通常干扰较大, 在负离子模式下也不易电离。因此, 羧基可以通过衍生化来改善其质谱检测灵敏度。羧基衍生化通常为酯化反应, 其中最简单有效的衍生化是甲基化和乙基化。Chen 等^[15]通过甲基化羧甲司坦, 改善其在质谱检测中峰形差、灵敏度低的问题, 实验使用 200 μL 人血浆, 定量限为 20 ng·mL⁻¹。Zhang 等^[16]研究发现未衍生化的三七素质谱检测灵敏度极低, 血浆样品中干扰也很大。应用甲基衍生化结构修饰后, 三七素在大鼠体内检测灵敏度可以提高 50 倍。另外, 还有其他酯化试剂, 如 Cheng 等^[17]应用 4-二甲氨基苄胺二盐酸盐作为衍生化试剂, 在三乙胺催化下, 衍生化和液质联用测定血浆中丙戊酸 (valproic acid, VPA) 和其代谢产物 2-丙基-4-戊烯酸 (2-propyl-4-pentenoic acid, 4-ene VPA), 结果表明 VPA 的定量限为 200 ng·mL⁻¹, 而 4-ene VPA 的定量限为 20 ng·mL⁻¹, 满足检测的要求。

2 糖类和肽类药物的衍生化

近十几年来, 糖类、肽类药物结构测定技术快速发展, 作用机制研究不断深入, 这两类药物的理化性质、结构特征、构效关系和作用机制等理论多已阐明。但目前应用常规液质联用技术定量测定糖类、肽类及修饰物尚有一定困难。原因主要有 3 点: ① 糖类结构中的多羟基和肽类结构中的多羧基使它们在 ESI 模式下电离差, 且糖、肽类药物的给药量低, 体内浓度极低, 需要高灵敏度的测定方法进行体内定量研究; ② 糖、肽类药物的相对分子量较大, 而质谱对待测药物的质量有范围限制, 对较高分子量的药物检测灵敏度有限; ③ 大多数糖、肽类及修饰物的水溶性较好, 而质谱对流动相的限制较多, 使得药物的色谱保留差, 进而产生较高的基质抑制效应, 引起定量分析的灵敏度和重现性差。

2.1 糖类 糖类药物由于没有显色基团, 早期的光谱和色谱技术都难以直接定量分析, 需要衍生化等前处理^[18]。后来, GC-MSⁿ 检测糖的醇醛酸衍生物具有高灵敏度、高特异性的特点, 一度成为糖类药物结构鉴定和定量分析的主要方法。但是, 很多糖类药物

不能耐高温, 在未达到其气化温度时就已分解, 限制了 GC-MSⁿ 技术的应用。近年来, 随着 LC-MSⁿ 的发展, LC-MSⁿ 已经完成了越来越多的糖类药物检测。但是糖类药物通常缺乏可电离的基团, 在 LC-MSⁿ 中难以生成 $[M+1]^+$, 通常只能生成 $[M-H]^-$ 和碱金属加合离子, 而且灵敏度较低。因此应用 LC-MSⁿ 定量测定糖类药物在生物基质中含量的文献报道还很少, 而且多是以定性为主。如 Liu 等^[19]应用 LC-ESI-MSⁿ 研究中药中的皂苷类成分结构, 成功地鉴定出 3 种皂苷。研究发现, 应用衍生化反应修饰糖类药物后, 有些单糖或寡糖类药物的灵敏度大大提高, 使生物基质中该类药物的定量成为可能。如有报道^[20, 21]表明在还原低聚糖分子中引入恒定的阳离子可以显著提高质谱检测灵敏度, 其中比较好的衍生化试剂是 Girard's 试剂 T (GT)。GT 通过和还原糖上的醛基反应, 在糖分子中引入叔胺基团而提高单糖和寡糖类药物的灵敏度。Jang 等^[22]应用 GT 衍生化中性和唾液酸化的 *N*-聚糖后再应用 MALDI-TOF-MS 测定, 研究中国仓鼠卵巢 (CHO) 两个细胞系中中性和唾液酸化 *N*-聚糖的差异, 结果证明 CHO-I 和 CHO-II 中唾液酸化 *N*-聚糖有显著差异, 分别含 22.5% 和 5.2%。Gouw 等^[23]和 Naven 等^[24]分别通过 GT 衍生化低聚糖中的醛基, 研究证明低聚糖在 MALDI-TOF-MS 和 ESI 质谱上的灵敏度均有显著提高。Gouw 等^[23]还将非还原糖分子的醇羟基与缩水甘油基三甲铵 (GTMA) 发生反应, 在葡萄糖分子中引入叔胺基团, 可显著提高糖分子在 MALDI-TOF-MS 的灵敏度和峰形。

2.2 肽类 对于肽类药物来说, 国外应用液质联用技术定量测定的报道相对较多。一些分子量较小而灵敏度能够满足体内研究需要的小肽类药物, 可以采用 LC-MSⁿ 直接测定。但是肽类药物常常由于给药剂量低或生物利用度差, 导致体内含量很低, 直接测定不能满足检测要求。通过衍生化法, 一些生物样品中肽类药物的检测难题得以解决。如 Li 等^[25]使用二硝基氯苯为衍生化试剂, 使硫普罗宁 (甘氨酸巯基衍生物) 的质谱检测灵敏度提高。Berna 等^[26]应用 1-氟-2, 4-二硝基苯基-5-*L*-丙氨酸酰胺 (Marfey's 试剂) 与丝氨酸的胺基发生衍生化反应, 成功分离并定量测定了大鼠脑组织微透析液中丝氨酸手性异构体。仅使用 25 μ L 的样品, 即可测定 10~7 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丝氨酸手性异构体。Kawasaki 等^[27]应用 1-氟-2, 4-二硝基苯基-5-*L*-亮氨酸酰胺 (*L*-FDLA) 为衍生化试剂, 结构修饰氨基酸的胺基, 再结合液质联用完成测定。该方法可靠、灵敏, 能够同时测定 6 种氨基酸。

总体来说, 糖和肽类药物的体内定量测定方法学依然是世界范围存在的难题, 目前国内外报道衍生化液质联用测定糖和肽类药物还主要以定性为主。

3 有机小分子的衍生化

有机小分子的检测是分析工作中的一大难题, 主要是: ① 相对分子质量小, 很难在色谱柱上保留; ② m/z 值低于 200 时, LC-MSⁿ 检测的背景噪音大; ③ 生物样品分析时, 内源性小分子的干扰。针对这些难题, 可以采用衍生化的方法, 增大相对分子质量, 改善色质谱行为。Barry 等^[28]报道了 7 个新季铵药物, 通过柱前衍生化, 将其连接到小分子伯胺、仲胺或羧酸上, 提高了 LC-MS 检测灵敏度。Xu 等^[29]使用丹磺酰氯为衍生化试剂, 成功实现了 4-DMAP 和血浆中类似物的分离, 并在此基础上完成了比格犬体内药代动力学研究。Xu 等^[30]用氯甲酸-9-苄基甲酯衍生化弗多司坦 (小分子胺类药物), 改善了其色谱保留, 避免了内源小分子的共洗脱干扰, LC-ESI-MS 检测, 人血浆中的检测限为 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

4 不稳定性药物的衍生化

一些在水中或生物样品中稳定性差的药物, 在应用 LC-MSⁿ 定量时常常因为药物的变性而使测定的结果不能反映药物在体内的实际情况。这种情况下, 通过衍生化提高药物的稳定性, 可以解决这一问题。如硫醇类药物不稳定, 在生物样品收集过程中或收集后极易被氧化成二硫化物, 给分析造成很大困难。通过与丙烯酸盐发生迈克尔加成反应, 含硫醇结构的化合物可生成丙烯酸衍生物, 此法在稳定硫醇官能团的同时可引入一个可离子化基团。Jemel 等^[31, 32]报道了用丙烯酸甲酯作稳定剂, 完成硫醇类药物的 LC-MS² 定量分析。Matsuura 等^[33]应用 7 个丙烯酸结构的衍生物衍生化硫普罗宁。在 ESI 正离子模式下, 由于引入了高亲核的二甲基氨基, 衍生化物的 $[M+H]^+$ 信号最强; 在 ESI 负离子模式下, 由于磺酸基结构的亲电性, 衍生化物的 $[M-H]^-$ 信号也最强。另外, 卡托普利结构中也含有不稳定的硫醇基, 为准确测定血中游离型卡托普利, 取血后必须立即加入稳定剂和衍生化试剂以阻止二硫化物的形成。Zhao 等^[34]用对溴苯甲酰甲基溴 (*p*-BPB) 衍生化卡托普利, 用 0.2 mL 人血浆, 经甲醇沉淀蛋白后衍生化, LC-ESI-MS² 检测, 定量限为 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该方法与以往的分析方法相比, 灵敏度显著提高, 分析时间大大缩短。

总之, 在 LC-MSⁿ 联用技术越来越普及的今天, 人们逐渐发现 LC-MSⁿ 联用也并非“万能工具”, 很

多药物在 LC-MSⁿ 测定中都有一定限制。尤其在复杂生物基质中, 常常由于药物浓度低、灵敏度差和干扰大的问题, 使 LC-MSⁿ 测定不能满足生物样品中药物的定量。通过衍生化和 LC-MSⁿ 联用的方法, 改变药物的化学结构, 进而改变其物理和化学特性, 可以改善药物在液质联用检测中的色谱与质谱行为, 最终达到提高检测灵敏度、降低生物基质内其他杂质干扰和降低基质抑制的目的。但是, 衍生化和 LC-MSⁿ 联用的方法研究的时间还不长, 国内外只见一些反应的实例, 但并未有 LC-MSⁿ 适合的衍生化试剂和反应的系统研究及理论体系。但是鉴于衍生化可以根本上解决一些 LC-MSⁿ 联用中药物稳定性差、色谱保留差、杂质干扰大和检测灵敏度不高等问题, 它定会随着 LC-MSⁿ 的发展而逐渐成熟和完善起来。

References

- [1] Meesters RJW, Duiskenb M, Jähnigen H, et al. Sensitive determination of monoterpene alcohols in urine by HPLC-FLD combined with ESI-MS detection after online-solid phase extraction of the monoterpene-coumarincarbamate derivatives [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 875: 444-450.
- [2] Johnson DW, Brink HJ, Jakobs C. A rapid screening procedure for cholesterol and dehydrocholesterol by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42: 1699-1705.
- [3] Higashi T, Shimada K. Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 875-882.
- [4] Gao SM, Wilson DM, Edinboro LE, et al. Improvement of sensitivity for the determination of propylene glycol in rat plasma and lung tissue using HPLC/tandem ms and derivatization with benzoyl chloride [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2003, 26: 3413-3431.
- [5] Li YN, Tattam B, Brown KF, et al. Quantification of epimeric budesonide and fluticasone propionate in human plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 2001, 761: 177-185.
- [6] Gong Y, Yip SC, Thamarai SK, et al. Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of *Epimedium* decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860: 166-172.
- [7] Licea-Perez H, Wang S, Bowen CL, et al. A semi-automated 96-well plate method for the simultaneous determination of oral contraceptives concentrations in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 69-76.
- [8] Liu XF, Ding CG, Ge QH, et al. Simultaneous determination of gestodene, etonogestrel and ethinylestradiol in plasma by LC-MS/MS following derivatization [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 87-92.
- [9] Nishio T, Higashi T, Funaishi A, et al. Development and application of electrospray-active derivatization reagents for hydroxysteroids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 786-795.
- [10] Visser SAG, Smulders CJGM, Gladdines WWFT, et al. High-performance liquid chromatography of the neuroactive steroids alphaxalone and pregnanolone in plasma using dansyl hydrazine as fluorescent label: application to a pharmacokinetic-pharmacodynamic study in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2000, 745: 357-363.
- [11] Chi Y, Feng Y, Wen S, et al. Determination of carbonyl compounds in the atmosphere by DNPH derivatization and LC-ESI-MS/MS detection [J]. *Talanta*, 2007, 72: 539-545.
- [12] Uran S, Landmark KE, Hjellum G, et al. Quantification of ¹³C pyruvate and ¹³C lactate in dog blood by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry after derivatization with 3-nitrophenylhydrazine [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 947-954.
- [13] Higashi T, Shibayama Y, Shimada K. Determination of salivary dehydroepiandrosterone using liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with charged derivatization [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846: 195-201.
- [14] Al-Dirbashi OY, Rashed MS, Brink HJT, et al. Determination of succinylacetone in dried blood spots and liquid urine as a dansylhydrazone by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 831: 274-280.
- [15] Chen X, Zhong D, Han Y, et al. Determination of carbocysteine in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry employing precolumn derivatization [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 192-196.
- [16] Zhang Y, Chen X, Li X, et al. Development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method with precolumn derivatization for the determination of dencichine in rat plasma [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 566: 200-206.
- [17] Cheng H, Liu Z, Blum W, et al. Quantification of valproic acid and its metabolite 2-propyl-4-pentenoic acid in human plasma using HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850: 206-212.
- [18] Kakita H, Kamishima H, Komiya K, et al. Simultaneous

- analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 961: 77–82.
- [19] Liu S, Cui M, Liu Z, et al. Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15: 133–141.
- [20] Ninonuevo MR, Ward RE, LoCascio RG, et al. Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2007, 361: 15–23.
- [21] Kameyama A, Kaneda Y, Yamanaka H, et al. Detection of oligosaccharides labeled with cyanine dyes using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 4537–4542.
- [22] Jang KS, Kim YG, Gil GC, et al. Mass spectrometric quantification of neutral and sialylated N-glycans from a recombinant therapeutic glycoprotein produced in the two Chinese hamster ovary cell lines [J]. *Anal Biochem*, 2009, 386: 228–236.
- [23] Gouw JW, Burgers PC, Trikoupis MA, et al. Derivatization of small oligosaccharides prior to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization using glycidyltrimethylammonium chloride and Girard's reagent T [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 905–912.
- [24] Naven TJP, Harvey DJ. Cationic derivatization of oligosaccharides with Girard's T reagent for improved performance in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1996, 10: 829–834.
- [25] Li J, Bi KS, Chen XH. Determination of tiopronin in human plasma by HPLC-MS with pre-column derivatization [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2006, 25: 421–423.
- [26] Berna MJ, Ackermann BL. Quantification of serine enantiomers in rat brain microdialysate using Marfey's reagent and LC/MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846: 359–363.
- [27] Kawasaki Y, Nozawa Y, Harad K, et al. Elution behavior of diaminopimelic acid and related diamino acids using the advanced Marfey's method [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1160: 246–253.
- [28] Barry SJ, Carr RM, Lane SJ, et al. Use of *S*-pentafluorophenyl tris (2, 4, 6-trimethoxyphenyl) phosphonium acetate bromide and (4-hydrazino-4-oxobutyl) [tris (2, 4, 6-trimethoxyphenyl) phosphonium bromide for the derivatization of alcohols, aldehydes and ketones for detection by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 484–497.
- [29] Xu LL, Xiao LL, Ruan JX. Determination of 4-dimethylaminophenol in rat blood by LC-MS and its application in pharmacokinetics [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 2008, 32: 162–164.
- [30] Xu F, Zhang Z, Jiao H, et al. Quantification of fudosteine in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry employing precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate [J]. *J Mass Spectrom*, 2006, 41: 685–692.
- [31] Jemal M, Hawthorne DJ. Quantitative determination of BMS-186716, a thiol compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry after hydrolysis of the methyl acrylate adduct by the native esterases [J]. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1997, 698: 123–132.
- [32] Jemal M, Hawthorne DJ. High performance liquid chromatography/ionspray mass spectrometry of *N*-ethylmaleimide and acrylic acid ester derivatives for bioanalysis of thiol compounds [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1994, 8: 854–857.
- [33] Matsuura K, Takashina H. Effects of functional groups of acrylic acid derivatives as derivatization reagents for thiol compounds on molecular ion responses in electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 1998, 33: 1199–1208.
- [34] Zhao LM, Hu LG, Jiang Y, et al. Determination of captopril in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34: 1599–1602.