

# 超高效液相色谱和质谱联用在 药物研究领域的应用

黄 昆<sup>a, b</sup> 王文辉<sup>a</sup> 李宝才<sup>b</sup> 王 齐<sup>a</sup> 杨 俊<sup>a</sup> 李晚谊<sup>c</sup>

<sup>a</sup>(昆明理工大学分析测试研究中心 昆明市学府路 253 号 650093)

<sup>b</sup>(昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明市 650093)

<sup>c</sup>(云南省农业科学院 昆明市 650093)

**摘 要** 超高效液相色谱(UPLC)在分离能力、灵敏度和专属性等方面有着巨大优势,与质谱(MS)联用后可以展现出强大的定性、定量分析能力,并已经在药物研究的各领域得到广泛应用。本文综述近年来超高效液相色谱和质谱联用(UPLC-MS)在药物研究领域应用取得的成果,着重介绍在药代动力学、药物成分分析、药物活性筛选研究等方面的应用。

**关键词** 超高效液相色谱-质谱联用技术; 药代动力学; 药物成分分析; 药物筛选

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2009)04-0922-09

## 1 引言

超高效液相色谱(UPLC)技术作为近年来发展起来的分离技术,使用 1.7nm 颗粒度的色谱柱填料,与传统液相色谱(HPLC)相比较,能够获得更高的柱效,并且在更宽的线速度范围内柱效保持恒定,有利于提高流动相流速,能大幅度改善液相色谱的分离度、样品通量和灵敏度,使液相色谱的分离能力得到进一步的延伸和扩展,极大地提高分析工作的效率和质量,尤其与质谱联用更能显示其优越的性能<sup>[1]</sup>。

超高效液相色谱(UPLC)与质谱(MS)分别基于物质在两相之间的分配差异和带电粒子质荷比的差异而达到分离,两者联用可组成正交二维分离分析系统。UPLC 是质谱检测器的最佳液相色谱入口,除 UPLC 本身带来的速度、灵敏度和分离度的改善外, UPLC 的超强分离能力有助于目标化合物与之竞争电离的杂质的分离,从而可以使质谱检测器的灵敏度因离子抑制现象的减弱或克服而得到进一步的提高。同传统的高效液相色谱和质谱联用(HPLC-MS)相比, UPLC-MS 系统显著提高了定量分析的重复性和可靠性以及定性分析的准确性。UPLC 与 MS 联用,可以最大限度的充分发挥两者的优势,具有了卓越的分离性能和高通量的检测水平,可以成为复杂体系分离分析及化合物结构鉴定的良好平台,为研究测试分析工作带来了巨大便利,因此也受到了药学工作者的亲昵,现在已经开始应用于药物研究的各个领域<sup>[2-4]</sup>。

## 2 药物成分分析研究

色谱技术的优势主要体现在对复杂化合物的分离分析。药物中传统中药和中成药药剂一直以成分复杂著称,一般由多味中药或多种化合物按照指定比例混合后经若干化学或物理反应步骤后

云南省自然科学基金项目 2007c119m

联系人: 电话(0871)5119674; 手机: (0)13888519204; E-mail: kunhuang@yeah.net

作者简介: 黄昆(1983—),男,四川省内江市人,在读硕士研究生。主要研究现代分析仪器在医药领域中的应用。

收稿日期: 2009-01-23; 接受日期: 2009-02-12



制成。为了提高药效降低毒性, 确定其中成分是中药和中成药研究的重点。其中单一药材和成药(如复方汤剂、药丸等)中有效成分的确定更是目前研究的难点。传统研究方法很多是建立在常规 HPLC-MS 应用的基础上的。在多方面拥有更加出色性能的 UPLC 自然从一诞生起就进入药物研究人员的视角, 首先被应用于该领域。

大青叶是一种常用的传统中药, 具有抗菌, 抗病毒, 抗内毒素, 免疫调节和抗肿瘤等多种药理活性。Xiangyu Deng 等用 UPLC-MS 以水(0.1% 甲酸)-乙醇为流动性梯度洗脱, 质谱为 ESI<sup>+</sup>、ESI<sup>-</sup>、MRM 定性和定量分析大青叶中黄酮类成分, 总共分离提取得到 8 种类黄酮, 并对其质谱裂解组分进行了研究, 其中 3 种具有 1-3 糖苷键的 6-C 黄酮苷的裂解过程为首次报道。在这 8 种类黄酮成分中有 6 种难于用常规 HPLC 准确分离分析, 这是因为这 6 种类黄酮由 3 组同系物组成, 每组同系物具有相同的黄酮糖苷配基和单糖苷或双糖苷 C-6 结合位置, 具有较大相似性, 色谱分离需要很高灵敏度和分离度<sup>[5]</sup>。黄连具有抗病原微生物、调节心血管、抗炎、解热、解毒、抑制血小板聚集的功效。Junhui Chen 等使用酸提法后对有效成分用 UPLC-MS 以醋酸铵水溶液(含 0.5% 乙酸)-乙腈为流动性梯度洗脱, 质谱为 ESI<sup>+</sup>、MRM 定性和定量分析黄连中的生物碱成分, 得到 8 个主要成分, 建立了较 HPLC-MS 更为清晰的指纹图谱。金莲花拥有抗菌和抗病毒活性, 被应用于治疗感冒、发烧等<sup>[6]</sup>。Xiaoqin Li 用 UPLC-MS 方法对中药金莲花花朵化学成分进行了研究, 得到类似指纹图谱。其中进行了定量分析的 4 种成分检出限都低于同等条件下使用 HPLC-MS 的检出限<sup>[7]</sup>。

温脾汤由人参、甘草、大黄、附子、干姜等按比例熬制成的汤剂。Xintian Zheng 等以传统中药汤剂温脾汤为例使 UPLC-MS 为基础建立了一种对传统中药处方进行分析的方法, 该方法较 HPLC-MS 快速、经济、环保、准确。图 1 为 UPLC 和 HPLC 在相同条件下的色谱图比较。该方法样品用甲醇溶解, 流动相为水(0.05% 乙酸)-乙腈线性梯度洗脱, 质谱 ESI<sup>+</sup>、ESI<sup>-</sup> 检测, 对温脾汤中微量成分进行了确定, 并对 4 种类型主要成分(酚类, 生物碱, 三萜皂苷和黄酮苷)的特点进行了系统归纳分析<sup>[8]</sup>。

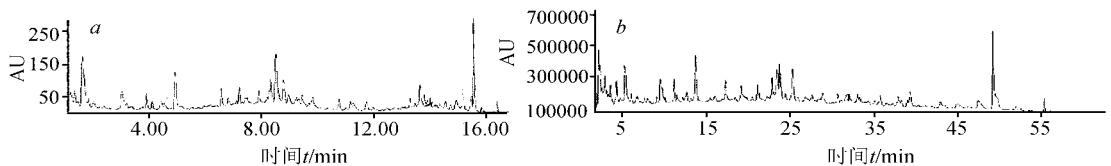


图 1 温脾汤 UPLC 和 HPLC 色谱图比较

a——UPLC-二极管阵列检测器色谱图; b——HPLC-二极管阵列检测器色谱图。

中成药制剂因为作用较缓和, 不良反应小, 受到了许多患者的喜爱, 但个别不法厂商利用中成药成分复杂而不易检测, 在中成药制剂中非法添加化学药品, 以增强疗效。患者在不知情下而长期服用此类中药, 易产生较大不良反应, 严重危害患者身心健康。姚羽等用 UPLC-MS 建立了镇静安神类中成药中常见的非法添加化学药品氯氮革、咪达唑仑、硝西泮、艾司唑仑、氯硝西泮、劳拉西泮、阿普唑仑、苯巴比妥、地西泮、三唑仑的快速检测方法<sup>[9]</sup>。张翠英采用 UPLC-MS 法, 离子源为 ESI 源, 正、负离子同时检测, 对补肾壮阳类中成药中非法添加的枸橼酸西地那非进行定性和定量检测<sup>[10]</sup>。上述检查方法比 HPLC-MS 法检测速度和灵敏度有明显提高, 并可实现 HPLC-MS 不能实现的多物质同时一步检测, 较 HPLC-MS 的工作特点(一次只能检测一个物质, 多个物质的检测需要多次检测)快速简便。

### 3 药代动力学研究

药物代谢动力学是定量研究药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄规律的一门学科。同时已

广泛拓展到药物体内整个处置过程(ADME)的机制性研究,复杂药物体系的相互作用及药物作用物质基础的动态研究等方面<sup>[11]</sup>。HPLC-MS 一直是进行药物代谢和生物处置研究的强有力手段,作为新兴的UPLC-MS 在药代动力学研究中的表现不俗,采用UPLC-MS 法进行药物代谢研究,不仅可以避免繁琐地分离纯化代谢物样品,而且能分离鉴定难于辨识的超痕量代谢物,同HPLC-MS 相比较许多方面都有质和量的飞跃,因此从诞生到现在极短时间内已经取得了不少成果。

### 3.1 西药药代动力学研究方面

华法林是最常见抗凝药物,可以预防和治疗静脉和动脉血栓疾病。Chenrong Huang 等用UPLC-MS 研究志愿者静脉滴注华法林后血浆中药代动力学。用乙酸乙酯萃取样品血浆,氯杀鼠灵(Coumachr)作为内标,0.1%甲酸/乙腈(1:1)为流动相,以多反应监测(MRM)方式负电离模式采集离子。定量下限(bq)为 $0.25 \times 10^{-6}$  mg/mL。批内和批间变异系数(CVs)分别是3.0%—10.2%,4.2%—12.0%,准确度(RE)85%—115%,平均萃取回收率为 $62.5 \pm 2.1\%$ <sup>[12]</sup>。Zydena(Udenafil) [5型磷酸二酯酶(PDE5)抑制剂]为新型男性勃起功能障碍(ED)治疗药物。Bae, Soo Kyung 等用UPLC-MS/MS 法测定韩国健康男性志愿者口服100mg Zydena 后的在人类血浆和尿液中药物浓度。样品用乙腈提取沉淀,以西地那非作为内标,乙腈和含0.1%甲酸(75:25)为流动相,ESHMS/MS 多反应监测模式。测定线性浓度范围 $1 \times 10^{-3}$ — $600 \times 10^{-3}$  mg/mL,定量下限为 $1 \times 10^{-6}$  mg/mL。变异系数的测定精度小于13.7%,准确性超过92.0%<sup>[13]</sup>。同等条件下UPLC-MS 测定法同HPLC-MS 相比较具有更快更好的分离分析能力,色谱峰图更为敏锐清晰,测定所需最低检测量也远低于后者。Johnson 用UPLC-MS 法检测健康志愿者口服对乙酰氨基酚后尿液中的代谢物,其谱图的平均基线峰宽为3s,窄于HPLC的4.8s,而峰高却是后者的3倍,可以检测到3个S-半胱氨酸结合物,其中一个为使用HPLC-MS 未曾发现(见图2)<sup>[14]</sup>。

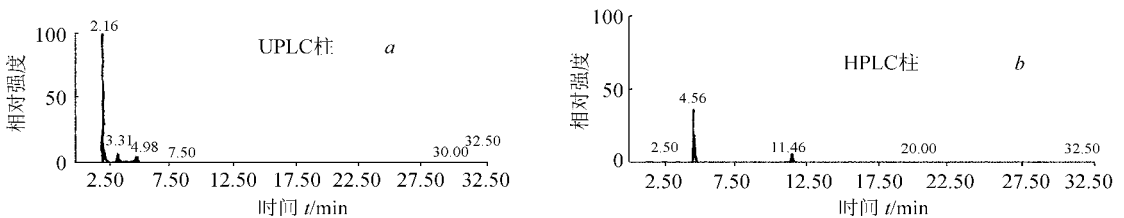


图2 对乙酰氨基酚后尿液中的代谢物色谱图比较

a—UPLC 色谱图; b—HPLC 色谱图。

在西药药物代谢研究应用方面UPLC-MS 法较HPLC-MS 的优势除了灵敏,最大的特点在于可以同时快速分离分析原来HPLC-MS 需要多次测定的多种生物化合物。Kun-Yan Li 等使用UPLC-ESHMS/MS 同时研究测定新型非典型抗精神病药哌罗匹隆(Pero spiro ne)、奎硫平(Quetiapine),阿立哌唑(Aripiprazole),奎的平亚砷(Quetiapine sulfoxide)等4种新型非典型抗精神病药体外药代动力学特性<sup>[15]</sup>。Wang 等使用UPLC-MS/MS 同时测定(雄激素)睾酮(T)在体外实验大鼠肝细胞微粒中代谢后的7种代谢产物16 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 6 $\beta$ , 和16 $\beta$ -羟基睾酮<sup>[16]</sup>。贾晓飞等使用UPLC-MS/MS 法测定动物尿液中9种 $\beta$ -受体激动剂<sup>[17]</sup>,多次单一测定向一次同时测定的转变大大降低了待测样品分析分离所需时间。对于一些同时按照相同步骤配制重现性较差,但又不能一次大量配制的待测样品尤为适用,例如因为化学和物理性质随着放置和保存时间的延长容易改变和存放困难而不能一次大量配制的样品。此外这还在很大程度上再次降低了所需配制待测样品或试剂的消耗量。最低检出限的降低和多次单一测定向一次同时测定的转变,都为难于获得的微量测试物或消耗昂贵试剂的样品的分离分析带来了极大的便宜。组胺参与了各种生理反应,如炎症反应, I型过敏,胃酸分泌和神经传递等,是一个重要的生物胺。Hiroyuki Kaw anishi 等用

UPLC-TOFMS快速同时测定组胺(HA)及其主要代谢物MHA,IAA,MIAA在小鼠体内代谢后毛发中的超微残留量。经过复杂前处理后,用DBD-HA-d4为内标,HCOONH<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>CN(8/2)为流动相,通过电喷雾离子化,检测正负离子。此法线性范围为1.0—25pmol( $r^2=0.998$ ),定量下限低于1pmol。HA,MHA,IAA,MIAA在1mg老鼠毛发中的平均提取回收率分别16.3pmol( $n=7$ ),21.6pmol( $n=3$ ),6.6pmol( $n=3$ )和7.1pmol( $n=3$ )<sup>[18]</sup>。

体育兴奋剂和其他违禁品种类繁多,传统方法检查不仅速度缓慢周期长,而且随着药物隐蔽技术的发展残留量甚微,传统检查方法的可靠性逐渐降低,已经不能完全满足大型体育赛事的需要。同等条件下因为UPLC-MS方法同HPLC-MS相比较具有明显的经济、环保、快速、准确、灵敏的特点,已经被应用于体育反兴奋剂和其他违禁品的检测。固醇类药物属于常见的兴奋剂,被列为重点尿检对象。M. E. Touber等用UPLC-MS法建立了同时检验17种糖皮质激素在尿液中残存量的方法,检测范围为0.1—3.3mg/mL,最低检出限范围为0.4—4.4mg/mL,一组17种物质检测所需时间不超过6min<sup>[19]</sup>。UPLC-MS在西药药物代谢研究方面的其他应用见表1。

表1 UPLC-MS在西药药物代谢研究方面的应用

药品种类	药物名称	研究样品	色谱流动相和内标 27-51	质谱检测器	文献
治疗老年性痴呆药	尼莫地平	人血浆	水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)梯度洗脱;尼群地平	ESI <sup>+</sup> MS/MS	20
$\beta$ -受体阻滞剂	普萘洛尔	大鼠尿液	水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)梯度洗脱;亮氨酸脑啡肽	ESI <sup>+</sup> MS	21
拟胆碱药物	(±)1-氧化 化槟榔碱	小鼠尿液	0.1%甲酸-乙腈(包含0.1%甲酸)为流动相;梯度洗脱;咖啡因	ESI <sup>+</sup> MS	22
降血脂药	普伐他汀	人血浆	乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸);	ESI <sup>+</sup> MS	23
	辛伐他汀	人血浆	乙腈-10mmol/L乙酸钠水溶液(85/15);洛伐他汀	ESI <sup>+</sup> MS	24
	洛伐他汀	人血浆	乙腈-10mmol/L乙酸钠水溶液(85/15);辛伐他汀	ESI <sup>+</sup> MS/MS	25
抗高血压药物	乐卡地平	人血浆	水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)(30/70);辛伐他汀	ESI <sup>+</sup> MS/MS	27
	氨氯地平	人血浆	水(0.3%甲酸)-乙腈(0.3%甲酸);尼莫地平	ESI <sup>+</sup> MS	28
	拉西地平	人血浆	醋酸铵-乙腈(18/82);硝苯地平	ESI <sup>+</sup> MS/MS	29
治疗心绞痛药	硝酸异山 梨酯	人血浆	乙腈-水(20/80);乙酰氨基酚	ESI <sup>+</sup> MS	30
消化系统药	莫沙必利	人血浆	乙腈-0.3%甲酸水溶液;梯度洗脱;坦洛新	ESI <sup>+</sup> MS	31
抗过敏药	非索非那	人血浆	乙腈-醋酸铵(91/9);特非那丁	ESI <sup>+</sup> MS/MS	32
抗炎解热镇痛类药	对乙酰氨基 酚	大鼠尿液	水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)梯度洗脱;	ESI <sup>+</sup> MS	33
抗肿瘤药	蟾毒灵华 蟾素和残余 蟾蜍配基	大鼠血浆	乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸),梯度洗脱;苯海拉明	ESI <sup>+</sup> MS	34
	氨柔比星	人血浆	A:乙腈-水(1/99)B:乙腈-水(99/1)都包含少量HCOOH;梯度洗脱;阿霉素	ESI <sup>+</sup> MS/MS	35
	克拉屈滨 安妥明	小鼠血浆	A:铵醋酸水溶液(0.1%甲酸)B:铵醋酸乙腈溶液(0.1%甲酸)梯度洗脱;酮康唑	ESI <sup>+</sup> MS/MS	36
抗生素	阿奇霉素	人血浆	醋酸铵-乙腈,梯度洗脱;罗红霉素	ESI <sup>+</sup> MS/MS	37
	西罗莫司	人血浆	乙腈-水(0.1%甲酸)溶液(40/50)他克莫司	ESI <sup>+</sup> MS/MS	38
抗寄生虫药	青蒿素	大鼠血浆	甲醇-0.3%甲酸(80/20,V/V);蒿乙醚	ESI <sup>+</sup> MS/MS	39
降血糖药	曲格列酮	小鼠血浆	水和甲醇,梯度洗脱;罗格列酮	ESI <sup>+</sup> MS/MS	40
	米格酸	人血浆	甲醇-10mmol/L铵醋酸(65/35);那格列奈	ESI <sup>+</sup> MS/MS	41
生理性原物质	辅酶Q10 雌二醇;	大鼠血浆	乙腈:2-丙醇:甲酸(90/10/0.1);CoQ9	ESI <sup>+</sup> MS	42
避孕药物	19-炔诺 酮;左炔诺 孕酮	人血浆	乙腈(0.1%甲酸)-乙腈-水(50/50)梯度洗脱;雌二醇-d4;19-炔诺酮-d6;左炔诺孕酮-d6	ESI <sup>+</sup> MS/MS	43
皮肤病用光敏剂	甲氧沙林	人血浆	甲酸和乙腈(60/40);酮康唑	ESI <sup>+</sup> MS/MS	44

### 3.2 中药和中成药药代动力学研究方面

在中药和中成药药代动力学研究方面, UPLC-MS 具有西药药代动力学的类似优点, 但由于中药和中成药组成成分本身已经具有的巨大复杂性, 体内代谢后带来更加复杂的化合物体系, UPLC-MS 强大的分离分析能力可以得到更为充分的体现。

窦志华等采用 UPLC-MS/MS 方法, 以乙腈-水(含 0.1 甲酸)为流动相梯度洗脱, MS 扫描范围:  $m/z$  300—1200, 分析治疗急慢性肝炎的复方制剂五仁醇胶囊大鼠灌胃后消化吸收进入血液的木脂素类成分, 最终确定五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素 5 个木脂素类成分进入血液, 其中五味子酯甲是原来 HPLC-MS 法检测未曾发现的<sup>[45]</sup>。Man Liu 等建立了同时测定大鼠口服给药骨舒丹后血浆中代谢产物淫羊藿甙, 淫羊藿黄酮次苷 II 和蛇床子素 UPLC-MS/MS 法。该法以卡马西平为内标, 0.1% 水醋酸-乙腈为流动相梯度洗脱, 电喷雾多反应监测正离子模式, 淫羊藿甙, 淫羊藿黄酮次苷 II 和蛇床子素线性曲线浓度范围分别为 2.00—200, 2.00—200 × 10<sup>-6</sup> 和 2.00—500 × 10<sup>-6</sup> mg/mL。日间及日内的精密度均小于 8.0% 和 14%, 准确度从 -6.0% 至 9.0%<sup>[46]</sup>。居文政等建立了同时测定志愿者静脉滴注注射用银黄后黄芩苷和绿原酸血药浓度的 UPLC-MS/MS 法, 该法以山柰素(Kaempferol)为内标, 水(0.1% 甲酸)-B 甲醇(0.1% 甲酸)为流动相梯度洗脱, 电喷雾多反应监测, 可得黄芩苷和绿原酸血药浓度的线性范围分别为 9.6—1540 × 10<sup>-6</sup> 和 7.5—1200 × 10<sup>-6</sup> mg/mL, 日内、日间精密度均小于 10.2%。同等条件下上述药物检测方法同 HPLC-MS 相比较测定数据明显好于后者<sup>[47]</sup>。UPLC-MS 在中药和中成药药物代谢研究其他方面的应用见表 2。

表 2 UPLC-MS 在中药和中成药药物代谢研究方面的应用

药物名称	研究样品	色谱流动相和内标	质谱检测器	文献
灯盏花乙素	胃肠道代谢物	乙腈-甲酸铵(含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱	ESI <sup>+</sup> MS/MS	48
人参皂甙	大鼠尿液	0.1% 甲酸溶液-乙腈; 梯度洗脱	ESI <sup>+</sup> MS	49
丹参素	大鼠血浆	0.02% 甲酸水溶液)-乙腈, 梯度洗脱; 对羟基苯甲酸	ESI <sup>+</sup> MS	50
茵陈蒿汤	大鼠尿液	0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱	ESI <sup>+</sup> MS/MS	51

## 4 早期药物开发中筛选研究

药物筛选是针对特定的要求和目的, 通过适当的方法和技术, 在一定的可选择范围内, 进行药物优选, 是早期药物开发的重要步骤。其药物筛选过程中考虑因数包括: 受体结合; 酶活性; 细胞活性, 代谢物质, 基因产物等众多内容。随着技术的发展, 药物高通量筛选技术已经取代传统技术, 成为发现创新药物的重要技术手段之一, 其技术核心是以灵敏快速的检测仪器采集实验结果数据给计算机进行批量分析。以灵敏快速著称的 UPLC-MS 检测技术也为药物高通量筛选带来了更高检测水平。

Yukifumi Dohta 等基于 UPLC-MS 系统开发建立了一种适合药物开发早期阶段药物溶解度高通量筛选的新方法。实验用新方法对氯丙嗪, 丙咪嗪, 氯氮平, 地尔硫卓, 联苯苄唑和雌二醇的溶解度进行了测定。同以往的 HPLC-UV, HPLC-MS 相比较在精确度和吞吐量上都具有明显的优势<sup>[52]</sup>。Jurgen Menscha 等将 UPLC-MS/MS 成功应用于早期药物开发中药物渗透性评估分析, 建立了一种新型的高通量平行人工渗透法。实验方法用咖啡因, 普萘洛尔, 氨苄西林, 氨酰心安, 灰黄霉素和卡马西平等化合物进行了验证, 分别测定其通过膜通过量, 表现良好, 检测线性范围在 3.05 nmol/L 到 12,500 nmol/L, 最低检测限范围在 0.61 nmol/L 到 12 nmol/L, 同 LC/MS 方法相比较吞吐量和灵敏度也都显著提高<sup>[53]</sup>。

## 5 结论

UPLC-MS 联用技术将UPLC 的高分离性能和MS 的高鉴别特点相结合,形成了更加完美的现代分析技术,能够充分适应现代药物研究新发展。随着科学技术的不断发展,UPLC-MS 必将药物研究领域展现更好的应用前景,成为推动其进步的重要动力。

## 参考文献

- [1] 安蓉, 薄美萍. 超高效液相色谱与质谱联用技术-改善药残和代谢物分析的结果质量[J]. 中国药科大学学报, 2007, **38**(4): 294—298
- [2] 金高娃, 章飞芳, 薛兴亚等. 超高效液相色谱在复杂体系中药物分离分析中的应用[J]. 世界科学技术, 2006, **8**(3): 110—111.
- [3] 艾华, 王广基, 顾轶等. 超高效液相色谱在现代药代动力学中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2007, **38**(4): 294—298
- [4] 谢跃生, 潘桂湘, 高秀梅, 等. 高效液相色谱技术在代谢组学研究中的应用[J]. 分析化学, 2006, **34**(11): 1644—1648
- [5] Deng X, Gao G, Zheng S *et al* Qualitative and Quantitative Analysis of Flavonoids in the Leaves of *Isatis Indigatica* Fort by Ultra-Performance Liquid Chromatography with PDA and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, **48**(3): 562—567.
- [6] Chen J, Wang F, Liu J *et al* Analysis of Alkaloids in *Coptis Chinensis* Franch by Accelerated Solvent Extraction Combined with Ultra-Performance Liquid Chromatographic Analysis with Photodiode Array and Tandem Mass Spectrometry Detections[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **613**(2): 184—195.
- [7] Li X, Xiong Z, Ying X *et al* A Rapid Ultra-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Method for the Qualitative and Quantitative Analysis of the Constituents of the Flower of *Trollius Ledibourii* Reichb [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **580**(2): 170—180
- [8] Zheng X, Shi P, Cheng Y *et al* Rapid Analysis of a Chinese Herbal Prescription by Liquid Chromatography-Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, **1206**(2): 140—146
- [9] 姚羽, 李慧义, 张启明等. 检测镇静安神类中成药中非法添加化学药品的方法研究[J]. 中国药理学杂志, 2007, **42**(3): 224—226
- [10] 张翠英, 李振国, 徐金铃等. UPLC/MS/MS 法检测补肾壮阳类中成药中非法添加枸橼酸西地那非的定性定量研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, **17**(10): 1741—1812
- [11] 刘开永, 张敏等. 中兽药代谢及药物代谢动力学研究动态[J]. 安徽农业科学, 2008, **22**(8): 301—305
- [12] Huang C R, Yang J, Du Y H *et al* Measurement of Free Concentrations of Highly Protein-Bound Warfarin in Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Correlation with the International Normalized Ratio[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2008, **393**(2): 85—89.
- [13] Bae S K, Kang M J, Yeo C W *et al* Simultaneous Determination of Udenafil and Its Active Metabolite, DA-8164, in Human Plasma and Urine Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study [J]. *Bioanalytical Chemistry*, 2008, **22**(9): 939—946
- [14] Johnson K A, Plumb R. Investigating the Human Metabolism of Acetaminophen Using UPLC and Exact Mass on-TOF MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, **39**(3—4): 805—810
- [15] Li K, Zhou Y, Ren H *et al* Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Atypical Antipsychotics and Some Metabolites in *In Vitro* Samples[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, **850**(1—2): 581—585.
- [16] Wang D, Zhang M. Rapid Quantitation of Testosterone Hydroxyl Metabolites by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, **855**(2): 290—294
- [17] 贾晓飞, 曲建强, 孟娟等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定尿液中 9 种  $\beta$ -受体激动剂[J]. 卫生研究, 2007, **36**(4): 489—492
- [18] Kawanishi H, Toshimasa T, Kenichi I *et al* Rapid Determination of Histamine and Its Metabolites in Meibum by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1132**(1—2): 148—156
- [19] Touber M E, Engelen M C, Georgakopoulos C *et al* Multi-Detection of Corticosteroids in Sports Doping and Veterinary Control Using High-Resolution Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry[J]. *Analytica Chimica*, 2007, **586**(1—2):

- 137—146
- [20] Qin F, Ma Y, Wang Y *et al* Determination of Nifedipine in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Pharmacokinetic Application[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, **46**(3): 557—562
- [21] Athersucha T J, Sison R L, Clarkson-Jones J A *et al* Evaluation of the use of UPLC-TOFMS with Simultaneous [<sup>14</sup>C]-Radioflow[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, **48**(1): 151—157.
- [22] Giri S, Krausz K W, Jeffrey R *et al* The Metabolism of (W)-A Recline 1-Oxide in the Mouse and Its Formation by Human Flavin-Containing Monooxygenases[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2007, **73**(4): 561—573
- [23] Lenz E M, Williams R E, Sidaway J, Smith B W *et al* The Application of Microbore UPLC/OA-TOFMS and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy to the Metabolic Analysis of Rat Urine Following the Intravenous Administration of Pravastatin[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **44**(4): 845—852
- [24] Cai S, Huo T, Feng W *et al* Quantitative Determination of Mitiglinide in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, **868**(1—2): 83—87.
- [25] Wang D, Qin F, Chen L Y *et al* Determination of Simvastatin in Human Plasma Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Se Pu*, 2008, **26**(5): 327—330
- [26] Yuan H, Wang F, Tu J *et al* Determination of Lovastatin in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and Its Application in a Pharmacokinetic Study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, **46**(4): 808—813
- [27] Kavbidouris M, Michalea S, Robola N *et al* Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Lercanidipine in Human Plasma[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**(19): 2939—2946
- [28] Ma Y Y, Qin F, Sun X H *et al* Determination and Pharmacokinetic Study of Amlodipine in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **43**(4): 1540—1545
- [29] Tang J, Zhu R H, Zhao R K *et al* Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Lacidipine in Human Plasma and Its Application in a Pharmacokinetic Study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, **47**(4—5): 923—928
- [30] Sun X H, Li X Q, Cai S A *et al* High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometric Determination of Isosorbide 5-Mononitrate in Human Plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, **846**(1—2): 323—328
- [31] 秦峰, 陈凌云, 马源源等. 高效液相色谱/质谱/质谱联用法测定人血浆中莫沙必利[J]. *药学学报*, 2007, **42**(8): 882—885
- [32] Yamane N, Tozuka Z, Sugiyama Y *et al* Microdose Clinical Trial: Quantitative Determination of Fexofenadine in Human Plasma Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, **858**(1—2): 118—128
- [33] Sun J, Schnackenberg L K, Holland R D *et al* Metabolism Evaluation of Urine From Rats Given Acute and Chronic Doses of Aacetaminophen Using NMR and UPLC/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, **871**(2): 328—340
- [34] Zhang Y, Tang X, Liu X L *et al* Simultaneous Determination of Three Bufadienolides in Rat Plasma After Intravenous Administration of Bufadienolides Extract by Ultra-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **610**(2): 224—231.
- [35] Li Y, Sun Y, Du F F *et al* Pulse Gradient, Large-Volume Injection, High-Throughput Ultra-Performance Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometry Bioanalysis for Measurement of Plasma Amrubicin and Its Metabolite Amrubicinol[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, **1193**(1—2): 109—116
- [36] Hsieh Y S, Duncan C J G, Lee S N *et al* Comparison of Fast Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Methods for Simultaneous Determination of Cladribine and Cofarabine in Mouse Plasma[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **44**(2): 492—497.
- [37] Chen L, Qin F, Ma Y Y *et al* Quantitative Determination of Azithromycin in Human Plasma by Ultraperformance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Its Application in a Pharmacokinetic Study[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, **855**(2): 255—261.

- [38] 祝仕清,牛长群,耿亚鹏 UPLC/MS/MS 联用技术测定全血中的西罗莫司[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(6): 347—349.
- [39] Li L, Pabbisetty D, Carvalho P *et al* Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for the Determination of Artemisinin in Rat Serum and Its Application in Pharmacokinetics[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 867(1): 131—137.
- [40] New LS, Saha S, Ong MM K *et al* Pharmacokinetic Study of Intraperitoneally Administered Troglitazone in Mice Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(6): 982—988.
- [41] Cai S, Huo T, Feng W *et al* Quantitative Determination of Mitiglinide in Human Plasma by Ultra-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 868(1—2): 83—87.
- [42] Li L, Pabbisetty D, Carvalho P *et al* Analysis of CoQ10 in Rat Serum by Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry After Oral Administration[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 46(1): 137—142.
- [43] Perez H L, Wang S, Bowen C L *et al* 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]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 852(1—2): 69—76.
- [44] Yadav M, Contractor P, Upadhyay V *et al* Automated Liquid-Liquid Extraction Based on 96-Well Plate Format in Conjunction with Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) for the Quantitation of Methoxsalen in Human Plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 872(1—2): 167—171.
- [45] 窦志华,丁安伟,居文政等. 复方五仁醇胶囊含药血清中木脂素类成分的UPLC/MS/MS分析[J]. 中成药, 2007, 29(4): 550—555.
- [46] Liu M, Liu H, Lu X *et al* Simultaneous Determination of Icariin, Icariside II and Osthole in Rat Plasma After Oral Administration of the Extract of Gushudan (a Chinese Compound Formulation) by LC-MS/MS [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 860(1): 113—120.
- [47] 居文政,刘芳,吴婷等. UPLC/MS/MS法同时测定人血浆中黄芩苷和绿原酸[J]. 药学报, 2007, 42(10): 1074—1077.
- [48] 居文政,储继红,谭仁祥等. UPLC/MS/MS联用法分析灯盏花乙素在胃肠道的代谢物[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(3): 292—295.
- [49] 汪江山,赵欣捷,郑育芳等. 超高效液相色谱/飞行时间质谱用于人参皂甙Rg<sub>3</sub>作用后大鼠尿液代谢物指纹图谱分析及标记物的鉴定[J]. 色谱, 2006, 24(1): 5—9.
- [50] 潘坚扬,赵筱萍,邵青. 丹参素大鼠体内药代动力学及生物利用度研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 146—149.
- [51] Wang X, Sun W, Sun H *et al* Analysis of the Constituents in the Rat Plasma After Oral Administration of Yin Chen Hao Tang by UPLC/Q-TOF-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 46(3): 477—490.
- [52] Yamashita T, Dohta Y, Nakamura T *et al* High-Speed Solubility Screening Assay Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Drug Discovery[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1182(1): 72—76.
- [53] Menscha J, Noppa M, Aperia J *et al* Novel Generic UPLC/MS/MS Method for High Throughput Analysis Applied to Permeability Assessment in Early Drug Discovery[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 847(2): 182—187.

## Applications of Combined Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC) and Mass Spectrometry (MS) in the Field of Drug Research

HUANG Kun<sup>a,b</sup> WANG Wen-Hui<sup>a</sup> LI Bao-Cai<sup>b</sup> WANG Qi<sup>a</sup> YANG Jun<sup>a</sup> LI Wan-Yi<sup>c</sup>

*a*(Research Center for Analysis and Measurement, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, P. R. China)

*b*(College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, P. R. China)

*c*(Yunnan Agricultural Academy, Kunming 650093, P. R. China)

**Abstract** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) in the capacity of separation, sensitivity and specificity have great advantages, and mass spectrometry (MS) can be combined to show strong qualitative and quantitative analysis capabilities, and they have been found widespread application in all drug research. This paper reviews recent years, ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry (UPLC-MS) applications in the field of drug research achievements highlighted in pharmacokinetics, drug analysis, drug activity, such as screening studies for the application.

**Key words** UPLC-MS; Pharmacokinetics; Drug Component Analysis; Screening of Drug Activity

## 穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主 ——真正意义上的世界一流大学

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”,教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐,励精图治,弦歌不辍,为人师表,一身正气,人格独立,不党不官,沉潜专注,甘于寂寞。一言以蔽之,“五·四”运动所倡导的“科学和民主”精神之传承与发扬光大也!因此,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。

拥有一流的教授阵容;运行一套科学高效的学校管理制度;推行一个通才教育的培养目标;有一位深受众望的校长——这些因素奠定了西南联大堪称世界一流大学的基础。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所消耗的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却又无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧俭朴的:拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一些重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学,一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家具仍是俭朴的:楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多的木制家具还在使用。而在我们这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家具早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!

清华大学前校长梅贻琦说过:“大学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也”。靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》等文)