

质谱技术的新进展及其在药物研究中的应用

程纯儒^{1a,1b}, 丁杰^{1a,1b}, 杨义^{1a,1b}, 杨敏², 周振星³, 李再新^{1a,1b}

(1. 四川理工学院 a. 化学与制药工程学院;b. 制药工程技术与应用研究所, 四川 自贡 643000;
2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203;3. 四川省食品药品检验所, 成都 610097)

摘要:近年来,随着对药品安全问题的重视,药品检测部门和药物研发机构对分析方法的要求越来越高。质谱由于具有高灵敏度、高选择性的优点,在药物分析和药物代谢等研究领域获得了广泛的应用。质谱技术的发展也非常迅速,各种类型的杂交质谱、高端质谱层出不穷。针对质谱仪器构造结构和应用的问题,概述了目前常用和最新的质谱仪器,以及它们在药物研究中的应用。

关键词:药物研究;质量控制;质谱技术;杂交质谱

中图分类号:R91

文献标志码:A

自从 J. J. Thomson 发明第一台质谱仪以来,质谱技术获得了巨大的发展,先后有数位科学家因对质谱仪的杰出贡献而获得了诺贝尔奖。特别是田中耕一和 Fenn 发明软电离技术后的近二十年来,质谱技术的发展突飞猛进,各种商业质谱大量涌现。在现代药物研究中,分析样品往往具有样品量大、样品成分复杂、样品含量低的特点。质谱以其快速、准确、灵敏等优点而受到科研人员的青睐,在药物分析、药物代谢等领域获得了广泛的应用,逐渐成为分析人员手中不可或缺的工具。

1 质谱仪概述

质谱仪的结构主要由样品接口、离子源、质量分析器和检测器构成。

样品接口是将样品引入仪器的重要部件。最常见的方法是通过液相或气相色谱将样品引入质谱的离子源部分。常用的软电离接口放置模式主要有两种,一种是垂直正交转移模式,另外一种是同轴转移模式。在垂直转移模式中,喷雾的方向与质谱仪入口轴成垂直正交。同轴转移模式中,喷雾方向与质谱入口共轴或偏一小角度。

离子源多种多样,有的要求在真空环境下工作,有的要求在低压下工作,而有的则可以在大气压下工作。在真空状态下工作的离子源主要有电子轰击源(EI)、化学电离源(CI)等;低压下工作的有辉光放电离子源(GDI);大气压下工作的有电喷雾源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)等。在气质联用仪中,离子源通常为电子轰击源^[1]或化学电离源^[2]。而在液质联用仪中,常用的离子源为电喷雾离子源^[3,4]、大气压化学电离源^[5]、大气压光电离源(APPI)^[6-7]、基体辅助激光解析电离源(MALDI)^[8,9]等。近几年还开发了电喷雾解析电离源(DES⁺)^[10]、实时直接分析电离源^[11-13]、纳流电喷雾离子源(NSI)^[14-15],使得药物样品的分析更方便和快捷。

质量分析器是质谱仪中最核心最重要的部分。常见的分析器基本类型有磁偏转、四级杆、离子阱、飞行时间和离子回旋共振。不同的质量分析器之间相互杂交形成不同的组合,不同的分析器和离子源也有不同的组合,而不同组合的仪器有不同的功能,这样就构成了质谱仪器庞大的家族。

检测器是质谱的最后部分,它用于检测离子的存在和强度。通常使用的是电子倍增器,而飞行时间质谱使

收稿日期:2013-03-13

基金项目:国家自然科学基金项目(81001630);四川理工学院人才引进项目(2012RC15, 2012RC17);自贡市科技局项目(11GC016)

作者简介:程纯儒(1981-),男,四川自贡人,讲师,博士,主要从事药物化学、药物分析和药物代谢方面的研究,(E-mail)pharmaceutics@163.com

用的是微通道板(由一组电子倍增器组成)。

2 质谱仪及其应用

四级杆质谱是目前最常用的质谱仪。它具有体积小、质量轻、性能好等优点^[16]。但普通的单四级杆质谱在药物分析,特别是药物的定性分析中的应用有限,因为其灵敏度和分辨率都相对较差,且不能进行二级质谱的测定,提供不了更多关于化合物结构的信息。三重四级杆质谱的开发大大改善了选择性和信噪比,使得这种质谱在药物分析、药物代谢领域广泛使用。目前,它在药物研究中最常见的应用是对药物样品进行含量测定,特别是对一些含量较低的药物代谢样品的测定,其含量测定的线性范围最低点很容易达到纳克级甚至更低,完全可以满足低浓度样品的测定要求。关于这方面的研究报道非常多,例如 Cui 等运用液相串联三重四级杆质谱测定了药物匹卡米隆(picamilon)在人体中的血药浓度^[17];Deng 等运用液相串联三重四级杆质谱测定了药物寡核苷酸在大鼠体内的血药浓度^[18]。

三重四级杆质谱非常有利于定向寻找低含量或结构相似的物质,适合药物的定量分析研究。但在进行全扫描和二级质谱分析时,它的灵敏度就相对较低,而离子阱质谱在这方面却具有高的灵敏度。因此,离子阱质谱特别适合于药物的定性分析,例如 Cheng 等运用液相色谱串联多级离子阱质谱,从灵芝药材的甲醇提取物中鉴定了 73 个三萜类成分^[19]。传统的三维离子阱只有一个部件——阱,所有操作都在其中进行,做二级质谱的过程为时间上连续的过程。其缺点是具有“1/3 丢失效应”,即在二级质谱测定时,质量数为母离子质量数 1/3 的碎片离子不易被检测到。因此,经常需要做三级质谱来观测低质量数的碎片离子。最近,为了改善离子丢失效应,科研人员开发了二维线性离子阱质谱,它的优点是能增大气相离子的储量,减少空间电荷效应^[20-21]。

在分析药物代谢样品时,由于待测物处于基质中,微量的代谢物往往难以检测到。离子阱质谱如果还能具有选择性扫描,如子离子扫描或中性丢失扫描(即既有三重四级杆质谱的功能,又有离子阱质谱的功能),那么定性能力就会进一步加强。最近,科研人员开发了四级杆和线性离子阱的杂交质谱(Q-trap)。这种质谱既具有三重四级杆质谱的高选择性和高灵敏度,又具有离子阱强大的全扫描能力。因此 Q-trap 质谱被称作是“既可以做定量,又可以做定性”的质谱^[22]。关于 Q-trap 在药物分析中的定性定量应用研究非常多,例如 Le Blanc 等将 Q-trap 技术运用到药物蛋白质组学的研究

中,显示了卓越的定性功能^[23];Yang 等运用 Q-trap 技术对药材北沙参中的香豆素类成分进行定性分析,从中鉴定了 41 个化学成分^[24]。

飞行时间质谱(TOF)是常见的高分辨质谱,它能准确测定样品的精确分子量。飞行时间质谱可检测的分子量范围大,扫描速度快,仪器结构简单。在飞行时间质谱的系列商业机器中,近期开发的质谱仪有四级杆串联飞行时间质谱(Q-TOF)、离子阱串联飞行时间质谱(IT-TOF)和飞行时间串联飞行时间质谱(TOF-TOF)等。Q-TOF 仪器在全扫描和二级质谱分析过程中具有非常高的灵敏度。另外,由于它可以测得母离子和子离子的精确质量数,这样就非常有利于鉴定未知化合物的结构。Q-TOF 质谱仪常常与超高效液相色谱仪(UPLC)串联,通过 UPLC 的高分离效率和 Q-TOF 的高灵敏度和高检测速度相结合,一次进样分析,同时获得待测化合物的母离子和碎片离子信息。近年,Q-TOF 质谱仪逐渐成为药物分析研究中的重要仪器,特别是应用于药物质量控制和药物代谢产物的鉴定。例如 Xiang 等运用液相色谱串联四级杆飞行时间质谱,从灌胃给药甘草水提液后的大鼠体内鉴定了 104 个代谢产物^[25];Cheng 等运用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱从灌胃给药灵芝酸 D 的大鼠体内鉴定了 27 个代谢产物^[26]。另外,也有报道将 Q-TOF 质谱运用到药物的定量分析研究中,例如 Van Nieuwerburgh 等运用液相串联四级杆飞行时间质谱对青蒿中的青蒿素及其生物合成前体进行定量分析^[27]。IT-TOF 质谱也是性能非常好的高端杂交质谱,也经常用于药物分析中。例如 Liang 等运用液相色谱串联离子阱飞行时间质谱对中草药复方进行了定性和定量分析^[28]。TOF-TOF 质谱也是功能强大的高分辨高端质谱,主要用于蛋白质大分子的定性分析,也有一些在药物研究应用方面的报道,例如,Notari 等运用 TOF-TOF 测定了抗艾滋病药物在人体中的血药浓度^[29]。

高分辨质谱的基本类型除前述的飞行时间质谱外,还有磁质谱、傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR)和傅立叶变换静电场轨道阱质谱(Orbitrap)。在这些高分辨质谱仪器中,由于质量分析器结构和检测器的不同,性能上有很大差异。磁质谱经典、稳定性好,但扫描速度慢;飞行时间质谱分辨率相对较低,且测量数据的准确性受操作条件影响大。而傅立叶回旋共振质谱具有超高分辨率和高质量精度。FT-ICR 在药物分析中也有一些应用,例如 Huang 等运用 FT-ICR 对中药材五味子中的木质素类成分进行定性分析,总结了木质素类

成分的质谱裂解规律^[30]。但该仪器价格昂贵、体积庞大、运转费用高、操作复杂,这些缺点限制了它的推广和使用。Orbitrap 的操作性能低于 FT-ICR,但优于 TOF。由于采用了静电场轨道阱作为离子的旋转振荡,没有 FT-ICR 所需的超高磁场,因而没有 FT-ICR 质谱维持超导磁体工作所需的大量液氮和液氦的消耗,使维持仪器运转相对简化,显著降低了使用成本。现在商业化的 Orbitrap 为杂交质谱,即 LTQ-Orbitrap。它由两种不同类型的质谱杂交构成,前级为二维线性离子阱质谱,提供结构碎片信息;后面为 Orbitrap 高分辨质谱,提供元素组成。和其它杂交质谱相比,前端的二维线性离子阱是可独立工作的低分辨质谱,可完成所有离子阱质谱的一级、二级甚至多级分析。在进行高分辨质谱分析时,二维线性离子阱的作用是富集离子和产生多级碎片。在高分辨扫描时,二维线性离子阱可同时进行多个数据关联的二级质谱或多级质谱扫描,是真正的高低分辨双质谱同时分析。LTQ-Orbitrap 已经逐步运用到药物分析中,例如, Su 等运用液相色谱串联 LTQ-Orbitrap 对中药复方制剂——柴胡舒肝散中抗氧化成分进行定性分析,从中鉴定了 33 个化学成分^[31]。

也有一些正处于研发阶段的质量分析器,如飞行距离质谱。飞行距离质谱是一种高分辨质谱,它的基本原理与飞行时间质谱类似,是通过在固定时间内测定待测物离子飞行的距离来测定其质量数^[32]。这种质量分析器目前仍处于开发阶段,暂无商业化机器出现。

3 展 望

近年,质谱技术的发展越来越快。随着它在各个领域的应用,特别是医药研究领域的应用,人们逐步认识到它的强大功能。反过来,各个行业的应用也推动了该仪器的进一步开发和改进。随着技术的进步,质谱仪会越来越完美,功能会越来越完善,为药物研究的分析工作提供强大的技术支持。

参 考 文 献:

[1] Dongre V G, Karmuse P P, Nimbalkar M M, et al. Application of GC-EI-MS for the identification and investigation of positional isomer in primaquine, an anti-malarial drug[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 39(1-2): 111-116.

[2] Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, et al. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chro-

matography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005, 826(1-2): 17-25.

[3] Fenn J B, Mann M, Meng C K, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules[J]. *Science*, 1989, 246(4926): 64-71.

[4] Kebarle P, Verkerk U H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28(6): 898-917.

[5] Zaikin V G, Halket J M. Derivatization in mass spectrometry-soft ionization mass spectrometry of small molecules[J]. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 12(2): 79-115.

[6] Hanold K A, Fischer S M, Cormia P H, et al. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(10): 2842-2851.

[7] Wang G F, Hsieh Y, Korfmacher W A. Comparison of atmospheric pressure chemical ionization, electrospray ionization, and atmospheric pressure photoionization for the determination of cyclosporin A in rat plasma[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(2): 541-548.

[8] Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix assisted ultraviolet laser desorption ionization[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 193(1): 280-295.

[9] Karas M, Bahr U, Ingendoh A, et al. Principles and applications of matrix assisted UV laser desorption ionization mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1990, 241(2): 175-185.

[10] Takats Z, Wiseman J M, Cooks R G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, 40(10): 1261-1275.

[11] Cody R B, Laramée J A, Durst H D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(8): 2297-2302.

[12] McEwen C N, McKay R G, Larsen B S. Analysis of sol-

- ids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77 (23): 7826-7831.
- [13] Williams J P, Patel V J, Holland R, et al. The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, 20(9): 1447-1456.
- [14] Ramanathan R, Zhong R, Blumenkrantz N, et al. Response normalized liquid chromatography nanospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(10): 1891-1899.
- [15] Wickremsinhe E R, Singh G, Ackermann B L, et al. A review of nanoelectrospray ionization applications for drug metabolism and pharmacokinetics [J]. *Current Drug Metabolism*, 2006, 7(8): 913-928.
- [16] Dawson P H. Quadrupole mass analyzers-performance, design and some recent applications [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 1986, 51(1): 1-37.
- [17] Cui W Q, Chen X Y, Zhan Y, et al. Determination of picamilon concentration in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, 878(15-16): 1181-1184.
- [18] Deng P, Chen X Y, Zhang G D, et al. Bioanalysis of an oligonucleotide and its metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 52(4): 571-579.
- [19] Cheng C R, Yang M, Wu Z Y, et al. Fragmentation pathways of oxygenated tetracyclic triterpenoids and their application in the qualitative analysis of *Ganoderma lucidum* by multistage tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25(9): 1323-1335.
- [20] Hager J W. A new linear ion trap mass spectrometer [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16(6): 512-526.
- [21] Schwartz J C, Senko M W, Syka J E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, 13(6): 659-669.
- [22] Hager J W, Le B J. High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1020(1): 3-9.
- [23] Le Blanc J C, Hager J W, Ilisiu A M, et al. Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q-TRAP) used for high sensitivity proteomics applications [J]. *Proteomics*, 2003, 3(6): 859-869.
- [24] Yang W, Ye M, Liu M, et al. A practical strategy for the characterization of coumarins in *Radix Glehniae* by liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(27): 4587-4590.
- [25] Xiang C, Qiao X, Wang Q, et al. From single compounds to herbal extract: a strategy to systematically characterize the metabolites of licorice in rats [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2011, 39(9): 1597-1608.
- [26] Cheng C, Yang M, Yu K, et al. Identification of metabolites of ganoderic acid D by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2012, 40(12): 2307-2314.
- [27] Van Nieuwerburgh F C, Vande Castele S R, Maes L, et al. Quantitation of artemisinin and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1118(2): 180-187.
- [28] Liang Y, Hao H, Kang A, et al. Qualitative and quantitative determination of complicated herbal components by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a relative exposure approach to herbal pharmacokinetics independent of standards [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(30): 4971-4979.

- [29] Notari S, Mancone C, Tripodi M, et al. Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006, 833(1):109-116.
- [30] Huang X, Song F, Liu Z, et al. Structural characterization and identification of dibenzocyclooctadiene lignans in *Fructus Schisandrae* using electrospray ionization ion trap multiple stage tandem mass spectrometry and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance multiple-stage tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 615(2):124-135.
- [31] Su Z H, Zou G A, Preiss A, et al. Online identification of the antioxidant constituents of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shu-Gan-San by LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry and microplate spectrophotometer [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53(3):454-461.
- [32] Graham A W G, Ray S J, Enke C G, et al. First distance-of-flight instrument: opening a new paradigm in mass spectrometry [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2011, 22(1):110-117.

Recent Progresses on Mass Spectrometry and Their Progresses Applications in Pharmaceutical Analysis

CHENG Chun-ru^{1a,1b}, DING Jie^{1a,1b}, YANG Yi^{1a,1b}, YANG Min², ZHOU Zhen-xing³, LI Zai-xin^{1a,1b}

(1a. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering; 1b. Institute of Pharmaceutical Engineering Technology and application; Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai 201203, China; 3. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610097, China)

Abstract: Recent years, government pays much attention to the issues of drug safety. In order to assure the quality of the drugs, better analytical methods are required. Mass spectrometry has the advantages of high sensitivity and selectivity, and has been widely used in the pharmaceutical analysis and drug metabolism. It has developed quickly for the last two decades and various types of hybrid and high-end mass spectrometry are emerging in an endless. Therefore, the new instrumentations and their applications in the drug analysis were summarized to solve the structure and application problems of mass spectrometry instrument.

Key words: drug development; quality control; mass spectrometry; hybrid mass spectrometry