



LC-MS 在体内药物分析方法学研究中常见问题及其对策

杨靖, 丁黎*, 刘文英

药品质量与安全预警教育部重点实验室; 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009

*通讯作者, E-mail: dinglidl@hotmail.com

收稿日期: 2010-01-07; 接受日期: 2010-01-21

摘要 液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)已成为体内药物分析及其相关研究领域不可或缺的工具。虽然该技术具有高选择性、高灵敏度以及高通量等特点,但在体内药物分析方法学研究中,仍然会面临诸如待测物需衍生化、复方制剂体内多组分同时测定时高浓度组分的质谱响应饱和、方法专属性误判、基质效应、残留效应等一系列挑战和问题,本文综述了这些常见问题的相应对策。

关键词

液相色谱-质谱联用
体内药物分析
衍生化
专属性
基质效应
残留效应

1 引言

液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)在药学等领域中的应用已愈益广泛,也是体内药物分析相关研究领域不可或缺的工具。随着仪器及其配套智能化软件的不断改进,建立一种生物样品中药物、代谢物或其他物质的测定方法逐渐变得简便起来。但是在实际应用中,体内药物分析方法学研究仍然面临许多挑战,例如待测物什么情况下需要采用衍生化,并且如何选择合适的衍生化试剂;如何有效地对体内多组分样品进行同时测定;如何正确地认识并且科学地评价基质效应和残留效应;如何正确处理高通量分析和专属性之间的关系等。本文通过总结作者课题组多年从事体内药物分析工作的经验以及近年来的文献报道,对上述问题及其对策进行讨论。

2 柱前衍生化 LC-MS 技术

虽然 LC-MS 技术在体内药物分析中的适用范围

极广,但是仍有一些类型的化合物不适合直接采用 LC-MS 进行测定,或者在特定的条件下直接采用 LC-MS 分析不能达到灵敏度等要求,而柱前衍生化技术便是解决这些问题的一条有效途径^[1, 2]。

2.1 小分子非极性化合物

目前利用大气压化学离子化(APCI)、大气压光电离化(APPI)等基于气相的离子化技术分析非极性化合物能够获得较为理想的质谱响应,但是对于某些极性极弱的小分子化合物,无论采用何种离子化模式均难满足测定的需求,其中比较有代表性的是一些小分子醛、酮类化合物。对于这类化合物,目前使用最多的衍生化试剂是硝基苯肼类化合物。该衍生化技术通过引入易质子化的含氮基团和能促进雾化的疏水芳香基团来提高离子化效率。Duan 等^[3]采用 2,4-二硝基苯肼衍生化 LC-MS 技术完成了对人血浆中鱼腥草素的测定。van Leeuwen 等^[4]则系统地研究了 2,4-二硝基苯肼衍生化 LC-MS 技术在醛、酮类化合物测定中的应用。另外,也有一些学者探索了其他的一些硝基苯类

的衍生化 LC-MS 技术及其应用, 例如 Teshima 等^[5]采用 3-硝基苯二甲酸酐衍生化 LC-MS 法研究了龙牛儿基龙牛儿醇在大鼠肝脏和睾丸中的分布情况。

2.2 小分子极性化合物

该类化合物中一些极性基团虽然能够有效地促进待测物解离, 但是疏水结构特征对于一个待测物在离子源中的有效雾化也极其重要。并且疏水基团的存在可以使待测物在常用的反相色谱柱上得到适当的色谱保留。因此, 在极性小分子化合物的体内分析工作中, 往往需要通过衍生化的方法引入一些疏水基团以提高待测成分的离子化效率并且增加色谱保留。

2.2.1 氨基酸类化合物

氨基酸分析对于许多疾病特别是代谢紊乱症的临床诊断具有重大意义。一些基于生理氨基酸结构改造的药物, 如用于治疗呼吸道疾病的司坦类药物, 其药代动力学研究也需要合适的体内分析方法。但该类化合物的结构中同时具有易质子化的基团(氨基)和易去质子化的基团(羧基), 因此在离子化过程中易发生反荷离子效应(counter ion effect)进而导致该类化合物的质谱响应极弱, 甚至没有质谱响应。这意味着对于这类化合物必须通过衍生化的手段逆转这种效应之后方能采用 LC-MS 进行有效测定。Chen 等^[6]通过简单的甲酯化反应掩蔽羧甲司坦结构中的两个羧基后采用正离子模式对人血浆中的该化合物进行测定(图 1)。Xu 等^[7]采用茚甲氧羰酰氯衍生化掩蔽福多司坦结构中的氨基后采用 LC-MS 法测定了人血浆中的该待测物(图 1)。最近 Shimbo 等^[8, 9]开发出一种适用于氨基酸 LC-MS 分析的新型衍生化试剂: 3-氨基吡啶-*N*-羟基丁二酰亚胺基氨基甲酸酯, 并且成功用于生物样本中多种生理氨基酸的同时测定。

2.2.2 羧酸化合物

大多数含有羧基的化合物在负离子条件下都能获得较高的质谱响应, 但是对于一些结构较小并且极性较大的羧酸化合物, 例如一些重要的生理羧酸小分子, 无论是质谱响应还是色谱保留行为均不理想。解决该问题的一种常用手段就是使用衍生化掩蔽羧基同时引入一些离子化能力较强的基团。Santa 等^[10-12]合成了含有苯并呋喃基团的一些衍生化试剂,

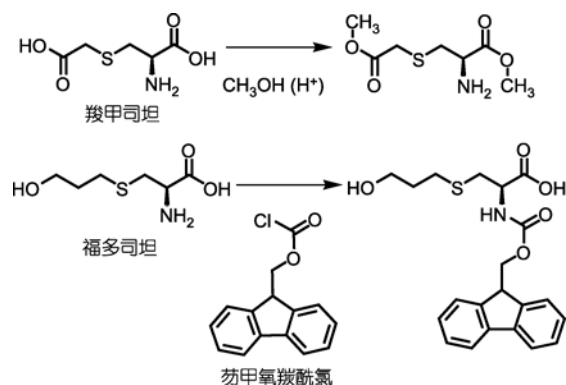


图 1 氨基酸类化合物 LC-MS 分析中的两种衍生化方法

可成功用于短链羧酸类生物标志物(biomarker)的 LC-MS 分析。此外, Yomota 等^[13]采用经典的确基苯肼类衍生化试剂实现了对维生素 H 的 LC-MS 分析。

2.2.3 嘌呤、嘧啶拮抗物

该类化合物通常是嘌呤、嘧啶的衍生物, 它们可以通过干扰 DNA 的合成抑制肿瘤发生发展过程中必经的代谢路径, 临床上通常用于白血病的治疗。鉴于该类化合物的治疗窗较窄, 治疗药物监测尤为必要。然而该类化合物极性很强, 且缺乏合适的离子化官能团, 因此给 LC-MS 分析带来很大困难。以生物体液中 5-氟尿嘧啶的测定为例, 虽然有些学者尝试用亲水相互作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)增加该待测物的色谱保留再进行质谱检测, 但是仍然不能很好地解决灵敏度的问题, 定量下限只能达到 5~10 ng/mL^[14, 15]。然而使用 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素衍生化 LC-MS 法进行分析, 最低定量限可达到 1 ng/mL^[16]。值得注意的是, 该类化合物结构中通常存在多个衍生化的反应位点(胺基), 因此在选择衍生化试剂及其反应条件优化时需要重点考虑反应产物的单一性, 否则将使定量的重现性极差。

2.3 痕量待测物

对于大多数易离子化的化合物甚至是一些非极性的化合物, 采用 LC-MS 法分析都能够获得相当高的灵敏度, 但是对于一些定量下限需要达到 pg 级甚至更高灵敏度的分析项目, 如激素类药物的检测, 衍生化也可以作为一种提高灵敏度的重要手段^[17, 18]。作者课题组^[19]曾建立了丹酰氯衍生化 LC-MS 法测定人血浆中超微量(10 pg/mL)炔雌醇, 并应用于人体药

代动力学研究. 其他研究者也采用同样的衍生化技术, 使用 LC-MS 法分析了生物体液中的丁香酚^[20]、淫羊藿苷^[21]等化合物, 证明这种经典的衍生化技术仍然能在质谱测定中得到新的应用.

另外, 一些痕量内源性物质的检测也经常需要采用衍生化 LC-MS 的方法, 所使用的衍生化试剂也更为丰富. 例如 Higashi 等采用 2-硝基-4-三氟甲基苯肼衍生化 LC-MS 法分析了大鼠脑内的 20-酮固醇^[22]以及一些神经甾体类化合物^[23]; Blair 等^[24, 25]采用五氟苯甲基衍生化 LC-MS 法分析了犬心肌组织中的类花生酸类物质; Yamashita 等采用新型甲代吡啶基衍生化 LC-MS 法分析了人血清中醛固酮^[26]以及人唾液中的 6 种主要的皮质激素^[27].

2.4 蛋白质以及多肽

如何准确地对机体中一些重要蛋白质和多肽进行定量测定, 并且研究其动态变化一直都是生命科学研究领域中的热点课题. 目前常用的手段之一就是待测蛋白质酶解为肽段后进行 LC-MS 分析. 然而该法在实际操作中极其困难, 其中一个主要的问题就是蛋白经酶解后生成的肽段亲水性太强, 不利于样品的处理和色谱保留. 近年来有不少研究者尝试采用衍生化 LC-MS 技术进行研究并取得了一定的成果. Imai 等采用 2-硝基苯磺酰氯衍生化 LC-MS 法成功地研究了抗肿瘤药物他莫昔芬所诱导的乳腺癌细胞中特征蛋白的含量变化^[28], 采用同样的方法还研究了小鼠小脑区域中的相关蛋白的增龄变化^[29].

2.5 不稳定化合物

对于一些不稳定的待测物, 尤其是那些极易氧化的药物或代谢物, 通过抗氧剂的加入或衍生化掩蔽不稳定的基团都是很好的选择. 虽然前者更为方便, 但往往难以取得理想的效果. 以人血浆中的佐芬普利及其活性代谢物佐芬普利拉的测定为例, 佐芬普利拉结构中含有一个游离的巯基, 极易被氧化成二硫化物, 采用多种抗氧剂均不能有效地避免其氧化, 因此作者课题组^[30]采用对溴苯甲酰甲基溴衍生化 LC-MS 法对其进行定量测定, 成功地评价了佐芬普利钙片在人体内的药代动力学特征.

2.6 小结

衍生化技术的经典分类方法是根据待测物结构中

参加反应的基团进行分类. 但是该分类法在 LC-MS 法中却无法表达出待测物难以直接分析的一些共性因素. 为了从提高离子化效率的本质出发, 更加有针对性地选择柱前衍生化试剂, 在本文中以待测物的结构特征分类进行柱前衍生化 LC-MS 技术的讨论(表 1). 尽管上文中提到了多种新型的衍生化试剂, 但在大多数情况下柱前衍生化 LC-MS 法无需另辟蹊径, 只需借助一些经典的衍生化方式便能取得理想的效果.

3 多种待测物同时测定时定量因素的兼顾

对于复方制剂, 当存在两种或多种药物的剂量相差悬殊的情况时, 通常会导致各个待测物在生物体液中的浓度相差巨大, 因而符合它们各自药代动力学研究的药物浓度的线性范围也相差甚远^[31]. 在复方制剂中多种成分的同时定量分析既要兼顾到血药浓度较低成分的定量下限能否满足药代动力学研究的要求, 又要考虑血药浓度过高成分可能产生的

表 1 待测物结构特征与柱前衍生化方法的选择

类别	代表性化合物	需衍生化的理由	衍生化原则
小分子非极性化合物	鱼腥草素等小分子酮、醛、醇类化合物	缺乏可解离的基团	引入易离子化基团
小分子极性化合物	5-氟尿嘧啶等嘌呤及嘧啶拮抗物、小分子羧酸类化合物等	缺乏在离子源中能有效形成单一气态离子的疏水结构特征	引入疏水基团, 提高待测物形成单一气态离子的能力, 同时增强其色谱保留, 即可采用更高有机相比例的流动相, 以提高待测物的离子化效率
氨基酸		存在反荷离子效应	掩蔽易质子化或易去质子化基团; 同时引入疏水基团增加待测物的色谱保留
大分子极性化合物	蛋白质和多肽	存在反荷离子效应; 亲水性太强不利于样品的处理和色谱保留	掩蔽易质子化或易去质子化基团; 引入疏水基团增加色谱保留, 即可采用更高有机相比例的流动相, 以提高待测物的离子化效率
痕量待测物	激素类药物、内源性物质	体内血药浓度极低, 对灵敏度要求甚高	引入离子化效率高的基团
不稳定化合物	含有巯基等不稳定基团的药物或代谢物	待测物稳定是准确定量的先决条件	掩蔽不稳定的基团

质谱响应饱和, 会导致标准曲线高浓度点脱离线性的问题。因此, 对于同时测定浓度相差悬殊的多种成分时, 需要对各个待测物的质谱响应、线性范围和灵敏度三者进行综合考虑。为了提高检测灵敏度通常需要对血浆样品中的待测物进行浓缩富集, 这样所有待测成分的质谱响应均会得到提高, 但测定的线性范围在某种程度上受限于质谱仪器的种类和性能, 过度的浓缩也可能导致含药浓度高成分的质谱响应产生饱和现象而脱离线性。虽然也有研究者尝试采用曲线回归法校正浓度与响应之间的非线性关系, 但是该法的耐用性如何仍然是个未知数。若不进行浓缩处理甚至为了保证良好的线性而稀释待测成分, 血药浓度低的成分的质谱响应就会降低, 可能不能满足药动力学研究所需要的灵敏度。虽然采用一些新型的质谱仪器如 AB 公司的 Q-Trap 串联四级杆线性离子阱质谱仪可以获得更宽线性范围(6 个数量级)和更高的灵敏度, 但在遇到这种问题时, 更为实际的办法是考虑对一些相关的条件进行优化, 如复溶提取物的溶剂体积、进样量等。以人血浆中曲马多和对乙酰氨基酚的 LC-MS 同时测定为例^[32], 氨酚曲马多片每片含曲马多 37.5 mg 和对乙酰氨基酚 325 mg, 两组分的标示量相差近 10 倍。在氨酚曲马多片的人体药代动力学研究中, 需要同时测定曲马多和对乙酰氨基酚两种成分。口服氨酚曲马多片后, 对乙酰氨基酚的血药浓度远远高于曲马多的血药浓度, 两者符合药代动力学研究所需的线性范围相差大的要求, 对乙酰氨基酚所需的线性范围在 30~16000 ng/mL, 而曲马多的线性范围在 5~600 ng/mL, 当血浆样品经过纯化并充分浓集后, 血浆样品的浓集导致了对乙酰氨基酚在高浓度区域内质谱响应与浓度不呈线性(见图 2)。但随着溶样溶剂体积的加大, 对乙酰氨基酚的线性也逐渐得到了改善, 最终采用流动相 2 mL 复溶, 进样体积为 5 μ L, 对乙酰氨基酚标准曲线的相关系数可达 0.9994。尽管这样的操作降低了曲马多的灵敏度, 但所确定的定量下限 5 ng/mL 仍能满足其药代动力学研究的要求。此方法能够同时测定两种待测物, 大大缩短了分析时间, 并已成功用于氨酚曲马多片的人体药代动力学研究。

4 基质效应

早在 LC-MS 技术发展的初期, 就有学者开始关

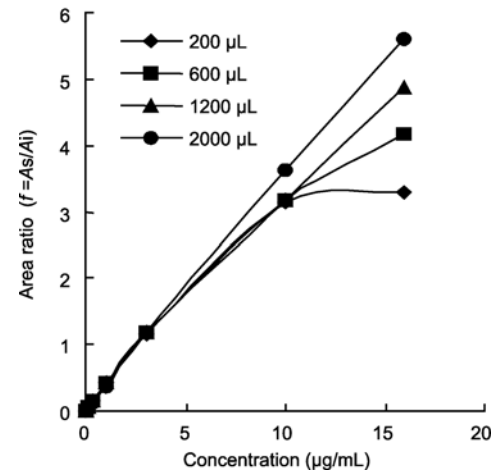


图2 不同体积溶样流动相复溶血浆样品后对乙酰氨基酚线性变化示意图

注由生物基质引起的待测物质谱响应与浓度之间的非线性问题^[33], 但直到 1998 年 Matuszewski 等^[34]将基质效应(Matrix effect, ME)作为一个正式的概念提出后才逐渐引起人们的关注。由于基质效应的出现可能在很大程度上破坏响应的稳定性以及结果的重现性, 因此许多学者将其视为 LC-MS 技术最大的软肋^[35]。尽管多年来有不少关于基质效应发生机制的探讨^[36], 但时至今日仍无定论。近年来, 人们把关注的焦点对准了生物基质中的磷脂类化合物, 并且认为该类化合物是基质效应产生的主要来源^[37, 38]。

消除基质效应的方法主要有如下几种: (1)改善样品前处理方法^[37, 39], 如采用合理的固相萃取(SPE)

表2 改善色谱条件消除基质效应的主要方法及其依据

方法	依据
调节色谱保留	适当的色谱保留可以使待测物与引起基质效应的内源性物质分开, 并使大多数内源性物质都在死时间附近被洗脱 ^[35, 51] , 不进入质谱系统
改善色谱峰形	内源性基质造成的竞争性离子化抑制往往具有浓度依赖性, 良好的色谱峰形可以保证待测物流出色谱柱时尽可能得到富集和浓缩, 进而降低基质效应产生的可能性 ^[46]
梯度洗脱	当基质效应是来自未完全洗脱的前一次或前几次进样引入的内源性物质时, 采用梯度洗脱是必需的。即等待测物出完色谱峰后, 大幅度提高流动相的洗脱能力, 将本次进样带入色谱系统的内源性物质全部洗脱下来, 以免干扰后续样品的分析(如洛伐他丁, 辛伐他丁的血药浓度测定)
加入添加剂	在流动相中加入少量添加剂, 如甲酸、乙酸、

醋酸铵等, 能够有效地降低基质带来的背景干扰^[1]

方法能够最大程度消除基质效应^[35]; (2)改善色谱条件^[40-42], 具体方法及其依据见表 2; (3)改变离子化方式, 液质联用中三种常用的大气压离子源的抗基质干扰能力依次为: APPI>APCI>ESI^[43], 如在维胺酯的血药浓度测定过程中改用 APCI 源可有效地避免采用 ESI 源时遇到的严重基质效应^[44], Cappiello 等^[45]最近开发出一种能用于液质联用的电子轰击离子源(EI)并且可以很好地避免基质效应; (4)减小进样量或稀释样品^[46, 47]; (5)用某一物质为基准补偿基质效应以适应多组分分析的需求^[48]; (6)采用同位素内标, 但是这种内标成本较高, 近年来也有研究表明此法不一定完全可靠^[49].

在实际工作中, 更应该关注是什么情况下易出现基质效应, 又如何有效地避免. 例如, 在进行体外代谢稳定性研究以及代谢酶诱导抑制试验时, 经常需要使用高浓度的无机缓冲盐. 若直接使用高有机相比例的流动相进行洗脱, 这些非挥发性无机盐易在柱头或柱中析出, 并且在流动相冲洗的过程中不断地溶出, 进而对待测物的质谱响应产生抑制作用. 因此在进行该类分析时需要先用高比例水相将这些无机盐充分洗脱下来以避免其对测定的干扰.

关于基质效应的评价问题, Matuszewski^[50]在 2003 年发表了一篇“基于 LC-MS/MS 定量分析方法基质效应评价策略”的论文, 对该问题系统地进行阐述. 虽然该文中提出的评价方法现已广为人们所接受, 但是其中提出的一些其他问题却长期以来被人们所忽视, 例如文中提出在体外药物相互作用研究时应注意受试药物及其在温孵体系中产生的代谢物对探针底物的代谢物测定的干扰, 以及服药后生物样本中代谢物的产生可能干扰其原型药物的测定等. Van Eeckhaut 等^[51]在最近的一篇综述中也提到, 即便在方法学的考察中证明了没有基质效应的存在, 在实际的样品测定中仍然需要对所得结果进行仔细的检验和分析, 因为不同批次的空白样本、不同的受试者样本以及长时间的连续分析等因素都可能造成“新的”基质效应. 对于基质效应的评价, 一个总的思路就是要根据待测物所处的环境(并不仅仅限于生物基质)来设计考察的项目. 例如在中药药代动力学研究中, 不仅要考虑生物样本引起的基质效应, 还应研究中药中大量未知成分对于待测物的质谱响应是否存

在抑制或增强的作用. 对于这种情况, 标准加入法^[52]不失为一种可行的评价方法, 即将一定量已知浓度的标准溶液加入待测中药提取液中, 测定加入前后样品的浓度并进行比较, 若测得浓度与实际加入浓度的差异较大, 则提示中药中的某种成分可能对待测物产生了基质效应.

尽管基质效应的出现会给 LC-MS 方法的建立带来一些麻烦, 但是通常情况下, 通过一些适当的样品前处理方法以及色谱分离, 大多数的待测成分都能够有效避免基质效应的干扰. 即便出现了一定程度的信号抑制或增强, 也不一定会对分析结果带来实质性的影响. 因此 Matuszewski 提出了相对基质效应(Relative ME)的概念, 用以判断由基质引起的信号抑制或增强作用是否存在较大变异^[50]. 相对基质效应实际上是一种对待测物在不同来源($n \geq 5$)生物基质中质谱响应值变异程度的度量, 通常用变异系数(coefficient of variation, CV)表示. 许多学者都认为对于相对基质效应的评价更具有现实意义^[35, 53]. 近年来, 这一观点逐渐得到了学术界的重视和认可. 例如 Zhan 等^[54]在使用 LC-MS 分析人血清中的亮丙瑞林时就发现该待测物在低和高两个浓度水平上均出现了明显的绝对基质效应(>140%), 但是相对基质效应却较小(<8.6%), 故可以认为这种基质效应并不影响定量的准确性.

5 专属性结果的可靠性

虽然目前质谱的选择性比其他检测器难以比拟的, 但高通量 LC-MS 分析有时会导致假阳性结果(false-positive results)的出现, 进而降低测定结果的可靠性^[55]. 特别是当待测样品中存在原型药物的 II 相代谢物时, 假阳性结果出现的几率会更高. 这是因为这类代谢物容易在离子源内发生中性丢失反应形成与母体药物相同的离子, 从而影响对后者的准确定量. Barricklow 等^[56]用一种新药(compound 1)作为模型研究了这种现象, 为了实现高通量的分析, 作者最初采用快速洗脱的色谱条件并且在专属性考察中未发现干扰存在, 但是当分析实际样品时却发现待测物的色谱峰与某一未知峰重叠(图 3(a)), 通过改善色谱分离后才发现这一未知色谱峰实际上包含了三个代谢物(图 3(b)), 进一步研究表明它们是原型药物的谷胱甘肽结合物的一些降解产物. 这种情况的出现主要源于对质谱的过度依赖从而忽视了 LC-MS 系

统中液相色谱仪的作用,所以适当的色谱保留不仅可以有效地消除基质效应还能大大降低假阳性结果出

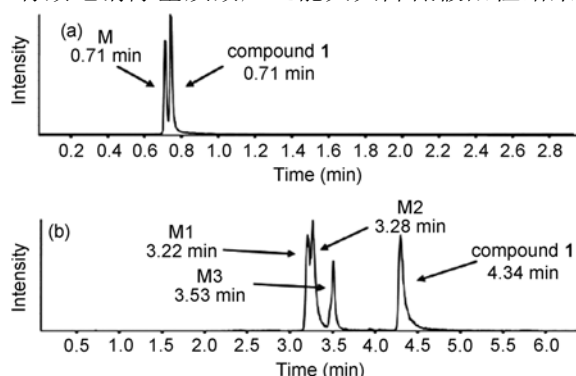


图3 LC-MS/MS 测定人尿样的一种新药(compound 1)所得MRM 色谱图。(a)初始条件;(b)改善色谱分离条件(M, 代谢物)^[56]

现的可能性。此外,质谱的专属性有时还会受到其自身分辨力的限制,尤其是当监测对象为单个离子^[57-59]或是伪离子对^[60]时,这种现象更为明显。因此,在选择检测离子/离子对时,不仅要考虑检测对象在质谱中的绝对响应,还应注意选择受生物基质干扰较少的监测离子或离子对^[61-63],例如一些小分子的中性丢失反应(如脱水反应)就不适合作为监测对象。

6 残留效应(carry-over effect)

质谱检测在带来高灵敏度的同时也难以避免地遇到一些问题,比如残留效应(carry-over effect, COE)。残留效应是指在高浓度的样品进样分析后,在进样系

统中残留了一定量的待测物,从而影响了下一次进样时低浓度样品测定结果的准确度。生物样品中待测物的浓度相差很大,高浓度样品与低浓度样品中待测物的浓度可能相差几百倍甚至几千倍,因此 COE 是 LC-MS 在体内药物分析中遇到的“常见问题”。其产生的原因可能是清洗自动进样针的溶剂选择不当、洗针和进样程序设计不合理或者是进样针座吸附了待测物。

通常情况下,采用甲醇-水(50:50, V/V)组成的洗针液就能够有效地清除进样针上的残留待测物。但对于一些疏水性极强的化合物,采用更高比例的甲醇能更有效地消除残留效应^[44]。Vallano 等^[64]则认为在自动进样器中产生残留的主要部位是进样阀,并且通过改变进样模式也可以很有效地消除残留效应。另外,各 LC-MS 仪器生产商也逐渐注意到这一问题,纷纷推出了能够减小残留效应的自动进样器。例如安捷伦公司的 1200 系列液相色谱系统中就采用了新的自动清洗针座程序并且提供了自动清洗进样阀的设定选项。戴安公司在其 UltiMate3000 型液相色谱中则采用了具备外针清洗功能的自动进样器。

目前,考察残留效应最主要的步骤是在连续分析完高浓度样品后(一般是指标准曲线或 QC 样品的最高浓度点, $n = 3$)紧接着分析空白溶剂^[65]或者空白生物样品^[66, 67]。笔者采用决策树的形式(图 4),用于判断残留效应是否存在以及如何进行相应的处理。通常情况下在方法学中考察残留效应即可,但是也有学者认为残留效应的评估应该贯穿于整个测定的过程中,即在所有的高浓度样品后均需分析空白样品^[64]。

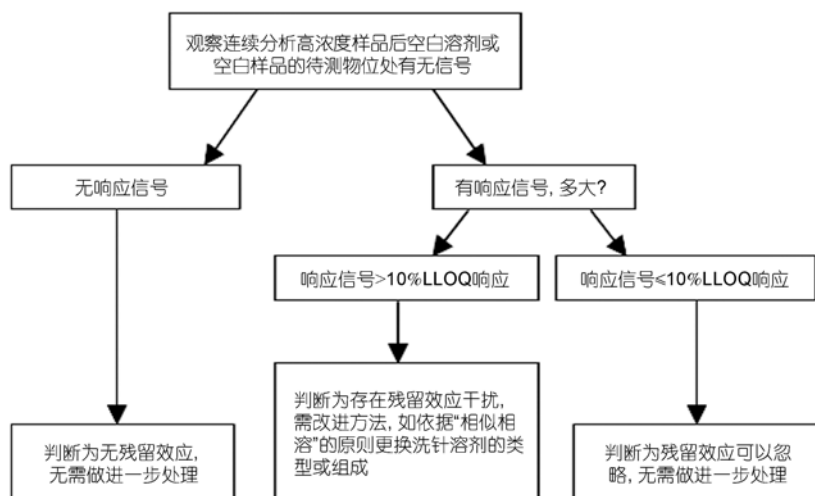


图 4 残留效应考察决策流程图

但是无论采用什么评估的方式, 其最终目的都是为了保证在实际样品分析中低浓度样品测定数据的准确性.

7 结语

一种基于 LC-MS 体内药物分析方法的成功建立不仅依赖于仪器本身的性能, 也与科研人员的专业

素质和经验密不可分. 在方法的建立和评价过程中往往需要根据不同待测物的性质及其在体内代谢的实际情况进行具体问题的具体分析, 只有不断总结实际工作中遇到的问题和获得的经验并且对 LC-MS 技术的仪器、配套软件、色谱-质谱条件选择以及方法学考察方式等方面持续进行改进, 该技术方能为体内药物分析以及相关领域的研究工作提供更有力的支持.

参考文献

- Gao S, Zhang ZP, Karnes HT. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 825(2): 98—110
- Santa T. Isothiocyanates as derivatization reagents for amines in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2010, DOI 10.1002/bmc.1352
- Duan XT, Zhong DF, Chen XY. Derivatization of beta-dicarbonyl compound with 2,4-dinitrophenylhydrazine to enhance mass spectrometric detection: application in quantitative analysis of houttuynin in human plasma. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(6): 814—824
- van Leeuwen SM, Hendriksen L, Karst U. Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, 1058(1-2): 107—112
- Teshima K, Kondo T. Analytical method for determination of allylic isoprenols in rat tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry following chemical derivatization with 3-nitroptalic anhydride. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(3): 560—566
- Chen XY, Zhong DF, Han Y, Xie ZY. Determination of carbocysteine in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry employing precolumn derivatization. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(3): 192—196
- Xu FG, Zhang ZJ, Jiao HY, Tian Y, Zhang BB, Chen Y. Quantification of fudosteine in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry employing precolumn derivation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J Mass Spectrom*, 2006, 41(5): 685—692
- Shimbo K, Oonuki T, Yahashi A, Hirayama K, Miyano H. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(10): 1483—1492
- Shimbo K, Kubo S, Harada Y, Oonuki T, Yokokura T, Yoshida H, Amao M, Nakamura M, Kageyama N, Yamazaki J, Ozawa SI, Hirayama K, Ando T, Miura J, Miyano H. Automated precolumn derivatization system for analyzing physiological amino acids by liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2010, DOI 10.1002/bmc.1346
- Santa T, Al-Dirbashi OY, Ichibangase T, Fukushima T, Rashed MS, Funatsu T, Imai K. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for carboxylic acids in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(11): 1207—1213
- Santa T, Al-Dirbashi OY, Yoshikado T, Fukushima T, Imai K. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for short chain carboxylic acids in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(4): 443—446
- Tsukamoto Y, Santa T, Saimaru H, Imai K, Funatsu T. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for carboxylic acids and its application to analysis of fatty acids in rat plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19(10): 802—808
- Yomota C, Ohnishi Y. Determination of biotin following derivatization with 2-nitrophenylhydrazine by high-performance liquid chromatography with on-line UV detection and electrospray-ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1142(2): 231—235
- Kosovec JE, Egorin MJ, Gjurich S, Beumer JH. Quantitation of 5-fluorouracil (5-FU) in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(2): 224—230
- Pisano R, Breda M, Grassi S, James CA. Hydrophilic interaction liquid chromatography-APCI-mass spectrometry determination of 5-

- fluorouracil in plasma and tissues. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(4): 738—745
- 16 Wang K, Nano M, Mulligan T, Bush ED, Edom RW. Derivatization of 5-fluorouracil with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1998, 9(9): 970—976
- 17 Higashi T. Trace determination of steroids causing age-related diseases using LC/MS combined with detection-oriented derivatization. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2006, 54(11): 1479—1485
- 18 Higashi T, Takayama N, Nishio T, Taniguchi E, Shimada K. Procedure for increasing the detection responses of estrogens in LC-MS based on introduction of a nitrobenzene moiety followed by electron capture atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(3): 658—665
- 19 谭文明, 丁黎, 杨劲, 张正行. 丹酰氯衍生化 LC-APCI MS 法测定人血浆中超微量炔雌醇及其片剂人体药代动力学研究. *分析测试学报*, 2005, 24(9): 111—112
- 20 Beaudry F, Guenette SA, Vachon P. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(11): 1216—1222
- 21 Gong Y, Yip SC, Thamarai SK, Zhang J, Lee HK, Yong EL. Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of Epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 860(2): 166—172
- 22 Higashi T, Takido N, Shimada K. Detection and characterization of 20-oxosteroids in rat brains using LC-electron capture APCI-MS after derivatization with 2-nitro-4-trifluoromethylphenylhydrazine. *Analyst*, 2003, 128(2): 130—133
- 23 Higashi T, Takido N, Shimada K. Studies on neurosteroids XVII. Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Steroids*, 2005, 70(1): 1—11
- 24 Lee SH, Blair IA. Targeted chiral lipidomics analysis by liquid chromatography electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC-ECAPCI/MS). *Methods Enzymol*, 2007, 433: 159—174
- 25 Mesaros C, Lee SH, Blair IA. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877 (26): 2736—2745
- 26 Yamashita K, Okuyama M, Nakagawa R, Honma S, Satoh F, Morimoto R, Ito S, Takahashi M, Numazawa M. Development of sensitive derivatization method for aldosterone in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry of corticosteroids. *J Chromatogr A*, 2008, 1200(2): 114—121
- 27 Yamashita K, Takahashi M, Tsukamoto S, Numazawa M, Okuyama M, Honma S. Use of novel picolinoyl derivatization for simultaneous quantification of six corticosteroids by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1173(1-2): 120—128
- 28 Imai K, Ichibangase T, Saitoh R, Hoshikawa Y. A proteomics study on human breast cancer cell lines by fluorogenic derivatization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(11): 1304—1314
- 29 Asamoto H, Ichibangase T, Uchikura K, Imai K. Application of an improved proteomics method, fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, to differential analysis of proteins in small regions of mouse brain. *J Chromatogr A*, 2008, 1208(1-2): 147—155
- 30 吴飞, 高芳, 丁黎, 毛小明, 马鹏程. 衍生化 LC-MS 法测定人体内佐芬普利及其活性代谢物以及药代动力学研究. *中国药科大学学报*, 2009, 40(4): 353—358
- 31 Lin N, Chen XY, Song B, Zhong DF. Determination of ambroxol and clenbuterol in human plasma by LC-MS/MS method. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2007, 42(3): 308—313
- 32 Zhu T, Ding L, Guo XF, Yang L, Wen AD. Simultaneous Determination of Tramadol and Acetaminophen in Human Plasma by LC-ESI-MS. *Chromatographia*, 2007, 66(3/4): 171—178
- 33 Brown FR, Draper WM. The matrix effect in particle beam liquid chromatography/mass spectrometry and reliable quantification by isotope dilution. *Biol Mass Spectrom*, 1991, 20(9): 515—521
- 34 Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem*, 1998, 70(5): 882—889
- 35 Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*, 2005, 38(4): 328—334
- 36 King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(11): 942—950

- 37 Pucci V, Di Palma S, Alfieri A, Bonelli F, Monteagudo E. A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5): 867—871
- 38 Xia YQ, Jemal M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(14): 2125—2138
- 39 Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14(11): 1290—1294
- 40 Tiller PR, Romanyshyn LA. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(2): 92—98
- 41 Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18(3): 347—357
- 42 De Nardi C, Bonelli F. Moving from fast to ballistic gradient in liquid chromatography/tandem mass spectrometry pharmaceutical bioanalysis: matrix effect and chromatographic evaluations. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(18): 2709—2716
- 43 Theron HB, van der Merwe MJ, Swart KJ, van der Westhuizen JH. Employing atmospheric pressure photoionization in liquid chromatography/tandem mass spectrometry to minimize ion suppression and matrix effects for the quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(10): 1680—1686
- 44 Cao L, Ma PC, Liu WY, Ding L, Sun D, Yang Q, Zheng F, Yu P, Hang TJ, Di B, Wang Y. Quantitative determination and pharmacokinetics of retinamido-ester in rat plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, 43(10): 1040-6
- 45 Cappiello A, Famiglini G, Palma P, Pierini E, Termopoli V, Trufelli H. Overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, 80(23): 9343—9348
- 46 Korfmacher WA. *Using Mass Spectrometry For Drug Metabolism Studies*. Boca Raton: CRC Press, 2005. 131—143
- 47 Qian WJ, Ding L, Wen AD, Gong B, Leng Y, Yun CH, Yang, L. Establishment of HPLC-ESI-MS method for the determination of eplerenone in human plasma and its pharmacokinetics. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2009, 44(7): 771—777
- 48 Stahnke H, Reemtsma T, Alder L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS. *Anal Chem*, 2009, 81(6): 2185—2192
- 49 Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(2): 701—707
- 50 Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3019—3030
- 51 Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(23): 2198—2207
- 52 Ito S, Tsukada K. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr A*, 2002, 943(1): 39—46
- 53 Niessen WMA. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 310
- 54 Zhan Y, Chen XY, Zhao XH, Zhong DF. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of leuprolide in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(27): 3194—3200
- 55 Sauvage FL, Gaulier JM, Lachatre G, Marquet P. Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected reaction-monitoring mode for drug analysis. *Clin Chem*, 2008, 54(9): 1519—1527
- 56 Barricklow J, Ryder TF, Furlong MT. Quantitative interference by cysteine and N-acetylcysteine metabolites during the LC-MS/MS bioanalysis of a small molecule. *Drug Metab Lett*, 2009, 3(3): 181—190
- 57 Ding L, Chen Y, Yang L, Wen AD. Determination of palonosetron in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 575—580
- 58 Zhao LH, Ding L, Wei X. Determination of moxonidine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(1): 95—99
- 59 Ding L, Gong B, Chu XX, Hu JJ, Zheng H. Sensitive and rapid LC-ESI-MS method for the determination of trimetazidine in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 526—531
- 60 Liu J, Duan XT, Chen XY, Zhong DF. Determination of eptifibatide concentration in human plasma utilizing the liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(5-6): 527—532

- 61 Li P, Chen XY, Dai XJ, Wen AD, Zhang YF, Zhong DF. Application of a sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method to pharmacokinetic study of nalmefene in humans. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1-2): 479—484
- 62 Gao J, Zhong DF, Duan XT, Chen XY. Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of rosuvastatin in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 856(1-2): 35—40
- 63 Zhong S, Zhong DF, Chen XY. Improved and simplified liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized glucosamine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 854(1-2): 291—298
- 64 Vallano PT, Shugarts SB, Woolf EJ, Matuszewski BK. Elimination of autosampler carryover in a bioanalytical HPLC-MS/MS method: a case study. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 36(5): 1073—1078
- 65 Huang Y, Ding L, Liu Y, Liu H, Wen AD, Yang L. Determination of montelukast in human plasma by LC-ESI-MS and its application in pharmacokinetic study. *J Chin Pharma Sci*, 2009, 18(3): 261—266
- 66 Li W, Luo S, Li S, Athill L, Wu A, Ray T, Zhou W, Ke J, Smith HT, Tse FL. Simultaneous determination of ribavirin and ribavirin base in monkey plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 846(1-2): 57—68
- 67 Song Q, Naidong W. Analysis of omeprazole and 5-OH omeprazole in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS)-eliminating evaporation and reconstitution steps in 96-well liquid/liquid extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 830(1): 135—142

LC-MS in biomedical analysis: Common issues and counterplan

YANG Jing, DING Li & LIU WenYing

Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education; Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is currently the method of choice for the biomedical analysis. The advantages of this technique include high specificity, sensitivity and throughput. However, in practical terms, we still face many challenges and/or problems, such as derivatization, MS response saturation to high content components in simultaneous determination of the multi-component, false-positive results of specificity, matrix effect and carry-over effect. In this review, these issues and their counterplan in bioanalytical LC-MS method development and validation are discussed and illustrated with some examples.

Keywords: liquid chromatography-mass spectrometry, biomedical analysis, derivatization, specificity, matrix effect, carry-over effect