

液相層析質譜術在藥物分析之應用

沈振峰 何國榮*

台灣大學 化學系

摘 要

大氣壓下離子化法是液相層析質譜術近來最重要的發展，本文介紹電灑法(ESI)及大氣壓化學游離法(APCI)兩種大氣壓離子化法的基本原理與特性。電灑法離子化的過程在溶液中進行，樣品在離子化前不需先受熱揮發成氣態分子，適合高極性及熱不穩定的樣品。電灑法一般較佳的流速範圍在40-200 μ L/min，流速上限為1mL/min。大氣壓化學游離法利用流動相成分及大氣中的水氣做為化學離子化的試劑氣體，適合低極性到中極性的樣品。大氣壓化學游離法可接受比電灑法更高的流速，可配合傳統4.6mm ID的填充管柱(1-2mL/min)而不需分流。最後我們以兩個實例來說明液相層析大氣壓下離子化質譜術在藥物分析上應用的潛力。

前 言

藥物分析，乃是與人們生活息息相關的分析領域，目前氣相層析質譜術(gas chromatography/mass spectrometry; GC/MS)在這方面已被廣泛接受並應用得十分成功。然而，許多藥物的化學結構中有許多屬高極性，不易揮發或是熱不穩定，而不適合直接以氣相層析質譜儀進行分析。這類化合物通常必須先衍生化(derivatization)，改變其化性，如此一來，不僅增加前處理的步驟，同時對於每一個藥物也未必有適合的衍生化反應可供應用。

受到氣相層析質譜儀連線成功的鼓舞，以及樣品應用上的需要，液相層析和質譜儀連線的研究工作，近年來也在快速進展中。傳統上液相層析使用的偵測器(如：紫外光、折射率、螢光等偵測器)所得到資料，僅有化合物的滯留時間(retention time)，分析者往往必須猜測訊號峰的成份，以標準品混合注射(co-injection)來判定分析物成分，或製備性的收集成份峰以進行其他鑑定工作。相對而言，層析質譜偵測除了可提供滯留時間以外，更可同時提供化合物的分子量、特定裂解離子等豐富的

資料，可使得分析的結果更明確。液相層析和質譜儀在連線的過程中，所面臨的主要問題是：以流速1mL/min而言，液相層析所造成的質量流量(mass flow)大約是氣相層析的1000倍，如何在質譜真空幫浦有限的容忍度下，選擇性的把過多的流動相溶劑分子移去，同時又能盡量減少分析物離子的損失。解決這個問題有許多技術上的困難，使得液相層析質譜儀的發展較氣相層析質譜儀慢了許多。

過去10年間曾有許多液相層析質譜連線系統被開發和應用，如：傳輸帶(moving belt; MB)、直接液體注入(direct liquid inlet; DLI)、分子束(particle beam; PB)、連續流動快速原子撞擊(continuous-flow fast-atom bombardment; CF-FAB)和熱灑法(thermospray; TSP)等。這些系統各有其特色，但由於機械過於複雜、殘留效應(memory effect)、所能容忍的流速太低、靈敏度不夠、操作困難、及穩定性不佳等缺陷，一直未能像氣相層析質譜儀一樣的普遍。近年來大氣壓下離子化質譜儀系統(atmospheric pressure ionization mass spectrometry; API/MS)突破了傳統儀器的缺點，表現出極佳的靈敏度及較好的穩定性，儀器本身較簡

單而易於操作，同時有兩種離子化法可供選擇，以配合不同的層析條件和樣品，雖然在應用上仍不如GC/MS方便，但已有日漸普遍的趨勢。

本文僅介紹近年來日漸普遍的大氣壓下離子化質譜儀系統及兩種離子化法（電灑法⁽¹⁻²⁾、大氣壓下化學游離法⁽³⁾），並舉例說明其在藥物分析上的應用。

一、大氣壓下離子化法

質譜儀可應用於各類的樣品，實應歸功於各種不同的離子化法的發明與普及。目前一般應用在大氣壓下的離子化法有電灑游離法(electrospray ionization; ESI)和大氣壓化學游離法(atmospheric pressure chemical ionization; APCI)兩種。

(一) 電灑游離法 electrospray ionization(ESI)

電灑現象是指當液體流出一前端施以高電壓的毛細管時，液體受電場影響，被分散成細小帶電的液滴噴灑而出的現象，於1917年首先由Zeleny提出⁽⁴⁾。而在1968年由Dole首先應用到樣品離子化方面⁽⁵⁾，應用於大氣壓下產生生化大分子的離子。1984年Yamashita和Fenn報導可將電灑游離和質譜結合⁽⁶⁻⁷⁾，次年(1985年)Whitehouse等人將電灑介面應用至液相層析質譜連線上⁽⁸⁾，1987年Bruins、Covey及Henion發表了氣體輔助霧化(pneumatic assisted nebulizer)的電灑介面“ionspray”⁽⁹⁾。

圖1.是電灑介面的示意圖，液相層析的沖出液流入中央的不鏽鋼管，管上施以高電壓(一般約3 KV)，對面的金屬片則當作相對電極(counter electrode)施以接地(0 KV)。如此，在不鏽鋼管前端便可產生電灑現象，形成帶電的

微小液滴(直徑約 $1\mu\text{m}$)，再經過一連串的離子生成過程(ion production)產生分析物離子，進入質量分析器，再到達偵測器。另外在和不鏽鋼管同軸的管路中通入氮氣流(約150 mL/min)用來幫助液體霧化成更細小的液滴，使電灑更穩定，同時使系統可接受更高的液體流速。這種氣體輔助的電灑介面被稱為ionspray，透過氣體的輔助使得電灑的離子化效率較穩定，而較不受實驗參數變異的影響。

電灑離子化法對質譜術來說，是一種不同於傳統電子撞擊及化學離子化法的離子化方式，它不須分析物先揮發成氣態分子再被離子化，而是分析物先以離子態存於溶液中，再以電場將分析物離子自溶液中分離出來。對於電灑使分析物離子化的機制⁽¹⁰⁻¹¹⁾，一般的描述是(圖2.)：毛細管前端的樣品溶液表面受高電場影響，進行電荷分離，在液面累積電荷，並向外形成液錐(liquid cone)。當表面電荷累積足夠多時，庫倫斥力將大於表面分子間的黏附力，而開始噴灑出微小的帶電液滴，此即電灑的現象。從帶電液滴到分析物離子的生成，其過程是隨著溶劑分子的蒸發(desolvation)，帶電液滴的半徑逐漸縮小，液滴表面電場逐漸增大，超過雷利安定極限(Rayleigh stability limit)時，液滴便分裂成更小的液滴，重複分裂至極小液滴時，分析物離子便經由一般所謂“離子揮發(ion evaporation)”的機制，即分析物離子受液滴表面電場逐漸增大的影響，自液滴表面跳脫(escape)出來，或者是在持續的分裂過程中，產生分析物離子，完成電灑離子化的過程。事實上，對於離子產生的機制，目前仍在研究討論的階段，尚無清楚的定論⁽¹²⁾。

這種離子化法，最著名的特色，便是具有

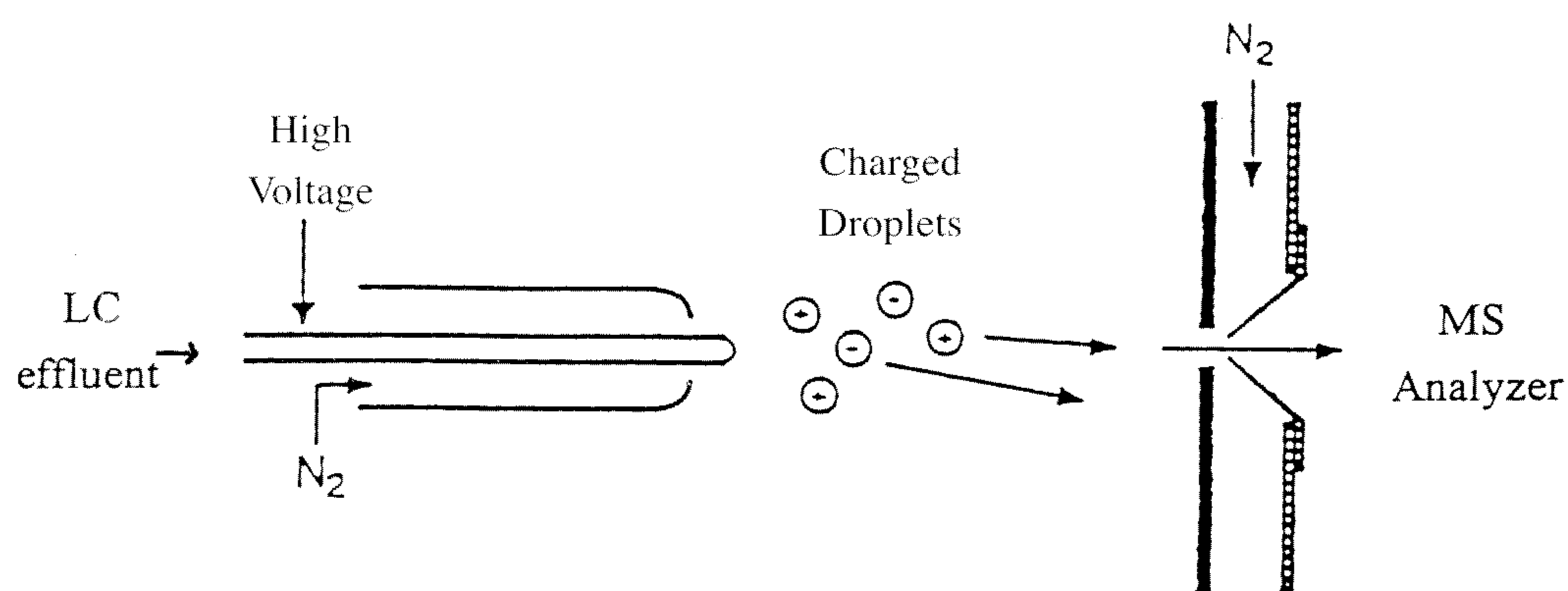


Figure 1. Pneumatically-assisted electrospray ionization system, the ion spray LC/MS interface.

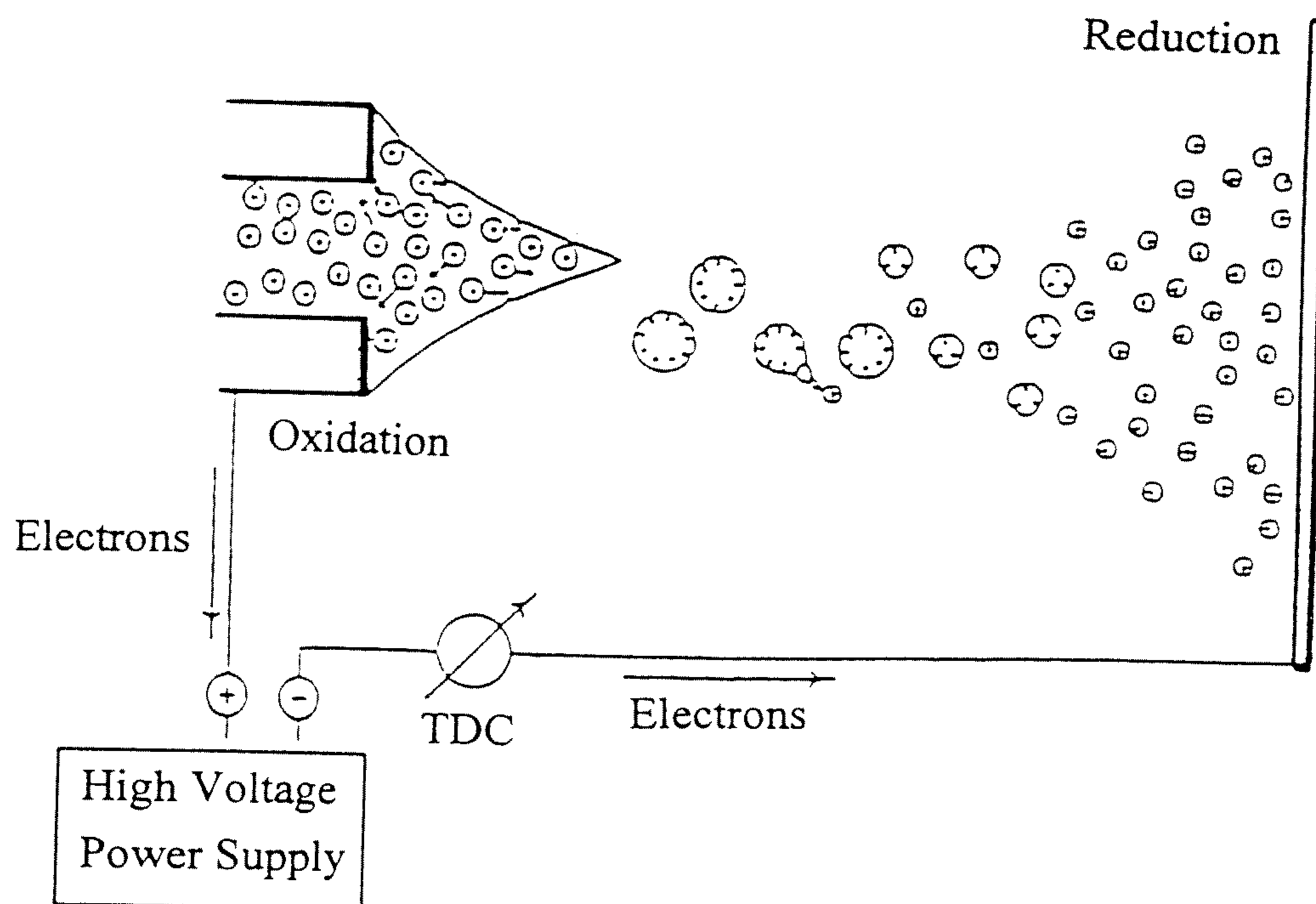


Figure 2. Schematic representation of the electrospray process.

使生化大分子帶多電荷(multiple charge)的能力⁽¹³⁾，如分子量20000的大分子，若帶20個電荷，則其荷質比便落在 m/z 1000。這樣一來，祇要用一般的四級棒質譜儀便可以用來分析分子量超出分析器質量上限的樣品。另外一個好處是，整個離子化過程在較低的溫度下($\sim 70^\circ\text{C}$)進行，對於熱不穩定的化合物，較不會造成熱分解的問題。這一點對許多熱敏感的藥物及其代謝物有著分析上的優勢。

(二)大氣壓化學游離法 Atmospheric Pressure Chemical Ionization(APCI)

大氣壓化學游離法，是在大氣壓下的離子源中，藉離子-分子反應(ion-molecule reaction)或電子捕捉反應(electron capture reaction)所進行的化學游離法(chemical ionization)。圖3.是液相層析質譜儀大氣壓化學離子化介面(APCI interface)的示意圖，左方應用了加熱氣體輔助霧化器(heated pneumatic-assisted nebulizer)的技術，引入霧化氣體(nebulizer gas)來分散液相層析的沖出液，使之霧化成小液滴，之後利用一加熱套管造成一段加熱區來使溶劑和樣品揮發成氣態分子，接著大氣壓化學離子化的過程由

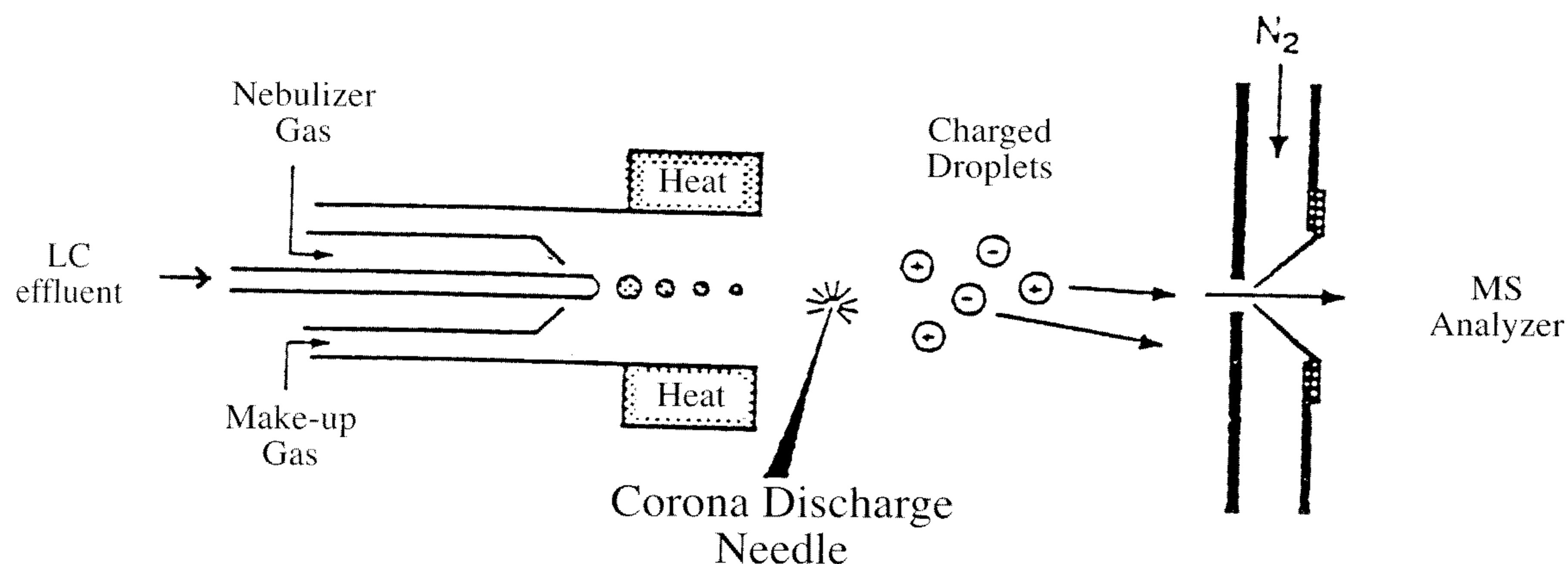


Figure 3. Atmospheric-pressure chemical ionization interface.

一施有高電壓的針端(corona discharge needle)進行電暈放電而引發，一般針端上電壓約1-10 KV之間(正離子模式接正電壓；負離子模式接負電壓)，所造成的電流約幾個微安培($\sim \mu\text{A}$)。於是透過各種離子-分子反應，如：質子傳遞(proton transfer)、加成物生成(adduct formation)、脫氫反應(proton abstraction)、陰離子加成(anion addition)、電荷轉移(charge transfer)和電子捕捉的反應，形成分析物和試劑氣體的正負離子。

大氣壓下所進行的化學離子化反應在分子-離子反應方面，主要是基於氣相的酸鹼化學⁽¹⁴⁾。對正離子模式來說，其試劑離子可以看成是酸(圖4.)，左邊是酸、右邊是鹼；左邊的

試劑離子可看成右邊鹼的共軛酸，其酸性自上而下由強至弱。強酸，如： CH_5^+ 是屬於高反應性無選擇性的試劑離子， H_3O^+ 、 CH_3OH_2^+ 、 CH_3CNH^+ 等是較弱的酸，同時也是較具選擇性的試劑離子。對負離子模式來說，其試劑離子是鹼(圖5.)， OH^- 是強鹼， CH_3O^- 、 CH_2CN^- 是中等的鹼， CH_3COO^- 、 Cl^- 是弱鹼。當混合的試劑氣體一起存在於離子源時，最終可能形成的試劑離子是最弱的酸和鹼，例如：以酸為例，當甲醇氣體加入甲烷中時，原來的 CH_5^+ 將轉移質子到甲醇上，形成新的 CH_3OH_2^+ 試劑離子，當氨再加入時，先前 CH_3OH_2^+ 轉移質子到氨分子，形成新的 NH_4^+ 離子。這表示酸性或鹼性太強的試劑離子如： CH_5^+ 和 NH_2^- 是無法在存在於

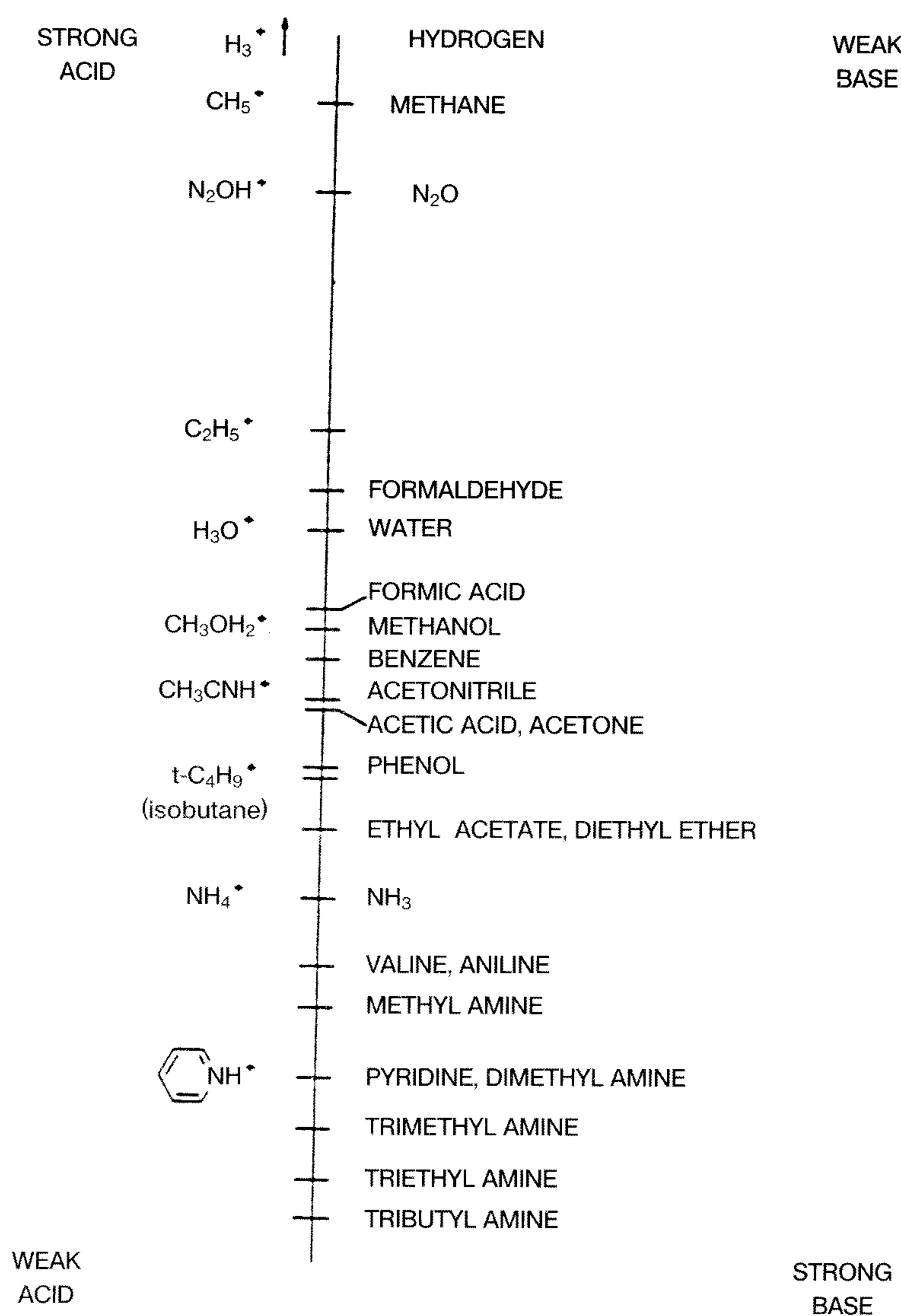


Figure 4. Acid-Base scale for positive ions and neutral molecules in the gas phase.

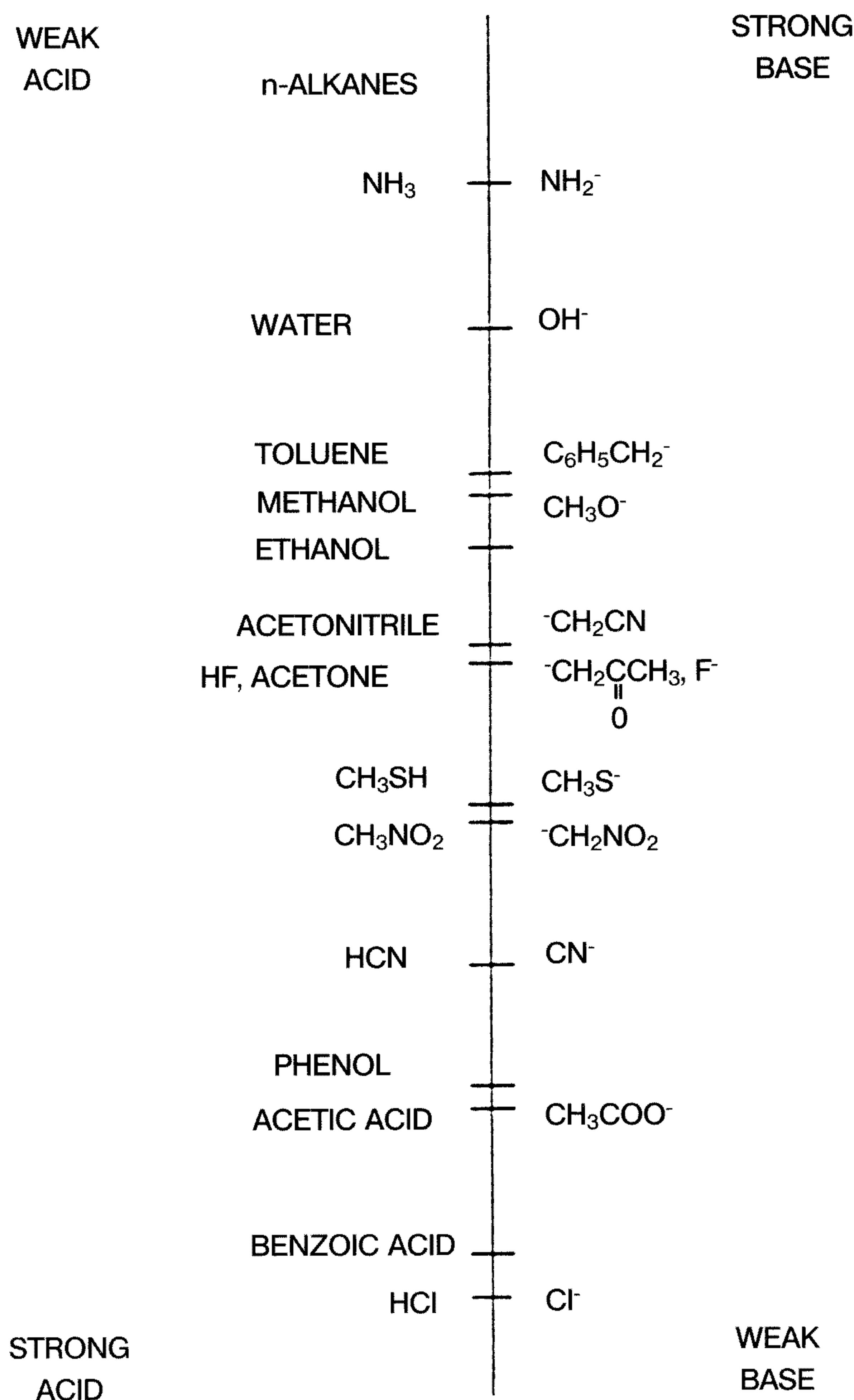


Figure 5. Acid-Base scale for negative ions and neutral molecules in the gas phase.

液相層析質譜儀的離子源中，因其必然和環境中不虞匱乏的氣態溶劑分子作用形成較弱的酸、鹼試劑離子。氣相的酸鹼化學對液相層析質譜而言，是十分的重要，為了分離效率而加入流動相的添加劑(buffer、acid...etc)，可能改變整個化學離子化過程。

大氣壓下所進行的化學離子化反應和一般中、低壓下的化學離子化大致相同(proton transfer、electron capture...etc)，不過在液相層析質譜儀系統中，其所產生的試劑離子

(reagent ion)卻受層析流動相組成及空氣中水氣的影響，例如：加有醋酸銨的水/甲醇沖提液，所形成的試劑離子是銨根離子、醋酸根離子以及他們與水分子、氨分子、甲醇分子、醋酸分子和其它極性分子的叢化離子(cluster ions)。另外，中、低壓下的化學離子化測得的訊號，所反應的是反應的速率，而大氣壓下所進行的化學離子化測得的訊號，所反應的卻是平衡的狀態⁽¹⁰⁾。這表示；若引入甲烷(methane)和吡啶(pyridine)進入中、低壓的離子化源則可

看到質子化甲烷的和吡啶(CH_5^+ 、 $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$)，在大氣壓離子化源的條件下，卻只能看見質子化的吡啶。一般用大氣壓下化學離子化法，偵測正離子時，分析物大多測得質子化的分子離子($\text{M}+\text{H}^+$)或是銨根離子、鹼金屬離子的加成物離子(adduct ion; $\text{M}+\text{NH}_4^+$ 、 $\text{M}+\text{Na}^+$...etc)或是他們接上溶劑分子、水分子和其它極性分子的叢化離子($\text{MH}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 、 $\text{MH}^+(\text{CH}_3\text{OH})_n$..etc)。偵測負離子時，一般看到($\text{M}-\text{nH}$) $^-$ 、($\text{M}+\text{Cl}$) $^-$ 、($\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}$) $^-$ 、($\text{M}-\text{Na}$) $^-$ 等準分子離子。

二、大氣壓離子化室和質量分析器之介面

大氣壓離子化⁽¹⁴⁻¹⁶⁾，顧名思義，其使分析物游離化的過程是在大氣壓下(約 760 torr)進行，有別於一般離子化法在真空(電子撞擊 10^{-6} torr或化學游離 1 torr)下進行使分析物帶電的離子化過程。如此一來，離子源(ion source)和質量分析器(analyzer; 10^{-6} torr)之間便有 $10^7 \sim 10^8$ 倍的壓力差異，連接他們一般是藉著一些小孔(orifice)、金屬或玻璃小管(一般約 $20 \text{ cm} \times 0.5 \text{ mm ID}$)及分段抽氣(differential pumping)的設計來達成。

圖6.是利用三階段真空步驟及小孔做區隔，來連接大氣壓離子源和質量分析器的概念圖。離子源中的氣態分子及離子通過第一個取樣孔(sampling cone)進入第一段真空室(約 1 torr)，此處真空由一轉動幫浦(rotary pump)維持。大部分中性氣態分子在此被抽去，帶電的離子則藉電場力的導引和小部分中性的氣態分子，繼續通過一頂端有小孔的漏杓(skimmer)進入第二段真空室(約 10^{-3} torr)。第二段真空室

除了以擴散幫浦(diffusion pump)或渦輪分子幫浦(turbomolecular pump; TMP)維持其真空度及抽去中性分子以外並安置一些離子光學鏡片(ion optic lens)來使離子束聚焦，增加穿過孔洞進入質量分析器(第三段真空室; $10^{-5} \sim 10^{-6}$ torr)的離子數目，使儀器的靈敏度提高。通過分析器的離子最後以電子倍增管偵測之。

大氣壓下游離會使離子和中性分子互相結合形成叢化離子(cluster ions)如: H_3O^+ 和 H_2O 、 CH_3CN 形成 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n(\text{CH}_3\text{CN})_m$ ，這些叢化離子會對背景及圖譜造成嚴重干擾，因此去叢化(declustering)顯然有其必要性。一般可利用(1)加熱離子源(2)氣體盾(gas curtain)(3)碰撞引致裂解，三種方式配合使用來進行此工作。藉著加熱離子化室，可減少離子和中性溶劑分子反應數目。氣體盾(圖7.)在取樣孔(plate 2)前再加一具較大孔洞的金屬片(plate 1)，夾層中間通入加熱的氮氣(3-6 L/min)，造成和進樣方向相反的氣流。這股反向氣流可吹走一部分的中性溶劑分子，不僅可減少叢化的現象，亦可保護取樣孔不受污染，帶電的離子則受電場導引，繼續飛入真空區。較小的離子-溶劑叢化物可進一步利用和氣體分子碰撞來使其裂解，圖8.樣品離子和水分子的叢化物進入取樣孔後，受到一介於取樣孔及漏杓的加速電壓(cone voltage)加速，加速過程中和空間中的氣態分子發生碰撞，如此一來，叢化物的內能升高，造成離子-溶劑分子的裂解。這種過程稱作碰撞引致裂解(collision-induced dissociation; CID)，碰撞的猛烈程度可由兩板之間電位差大小來控制，加大電位差甚至可令樣品本身斷

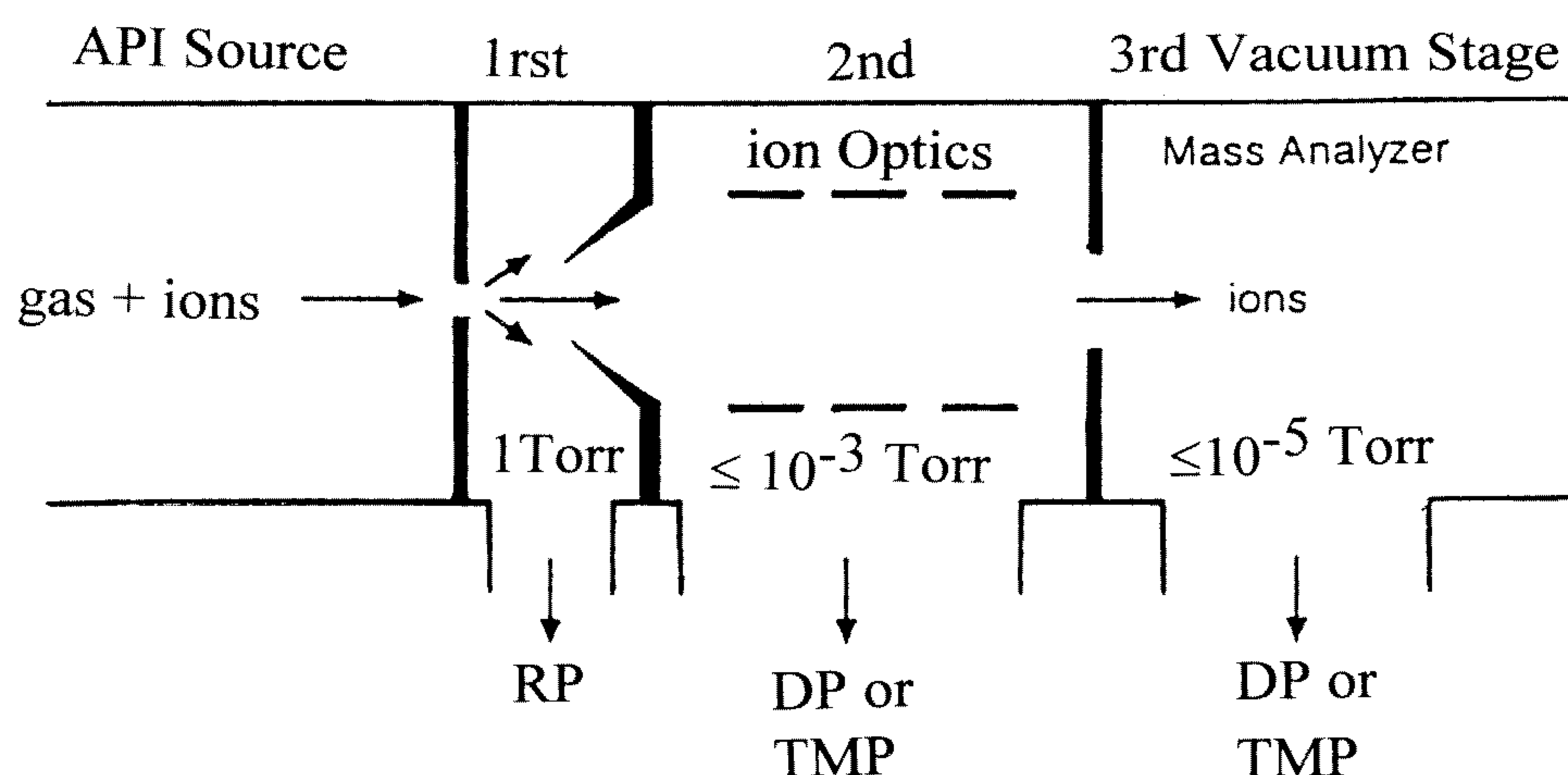


Figure 6. Atmospheric-pressure-ionization source coupled to a mass analyzer, equipped with three vacuum stages. RP=rotary pump; DP=diffusion pump; TMP=turbomolecular pump.

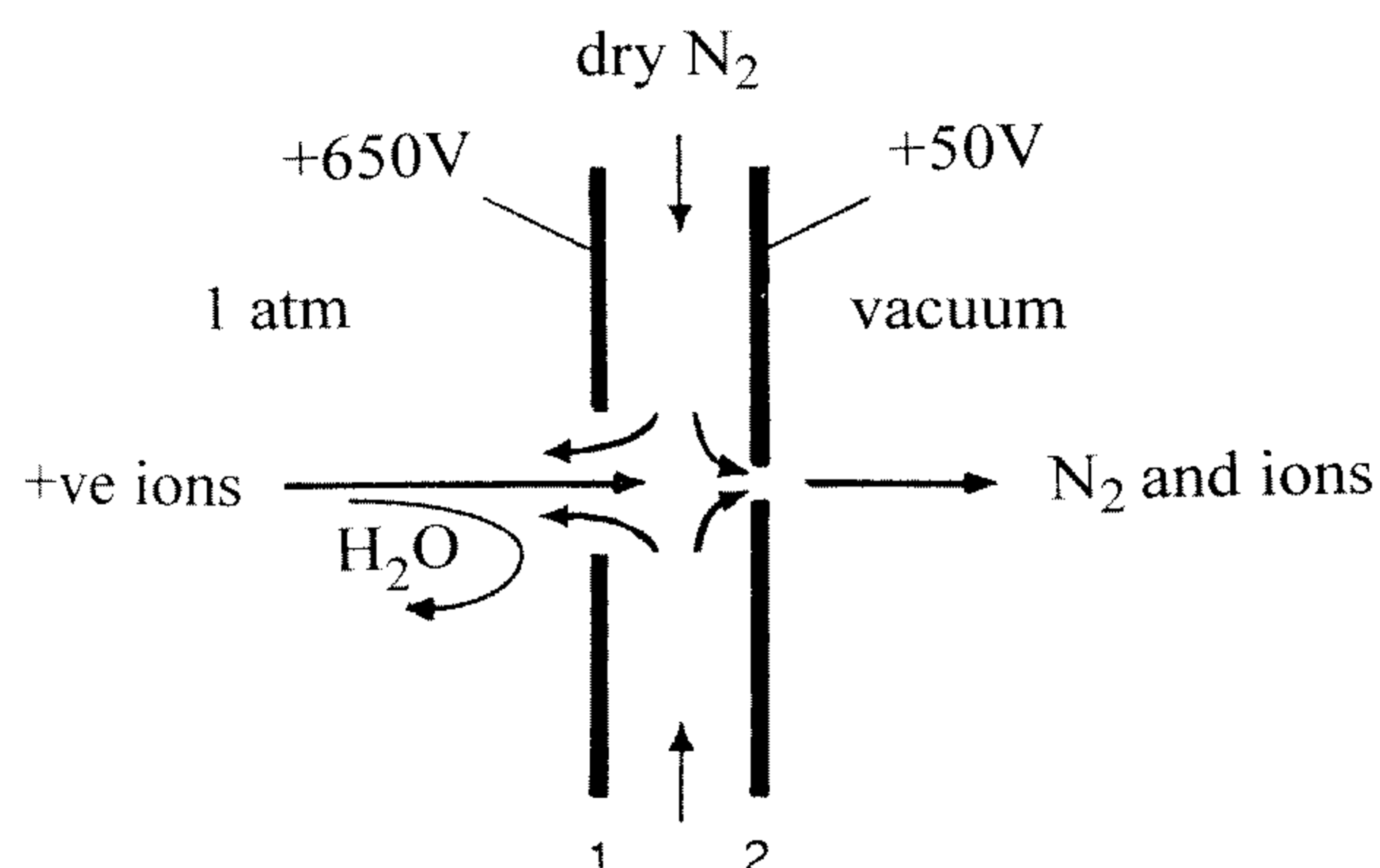


Figure 7. Ion source equipped with a nitrogen gas curtain. The region between plate 1 and 2 is at atmospheric pressure and is flushed with dry nitrogen.

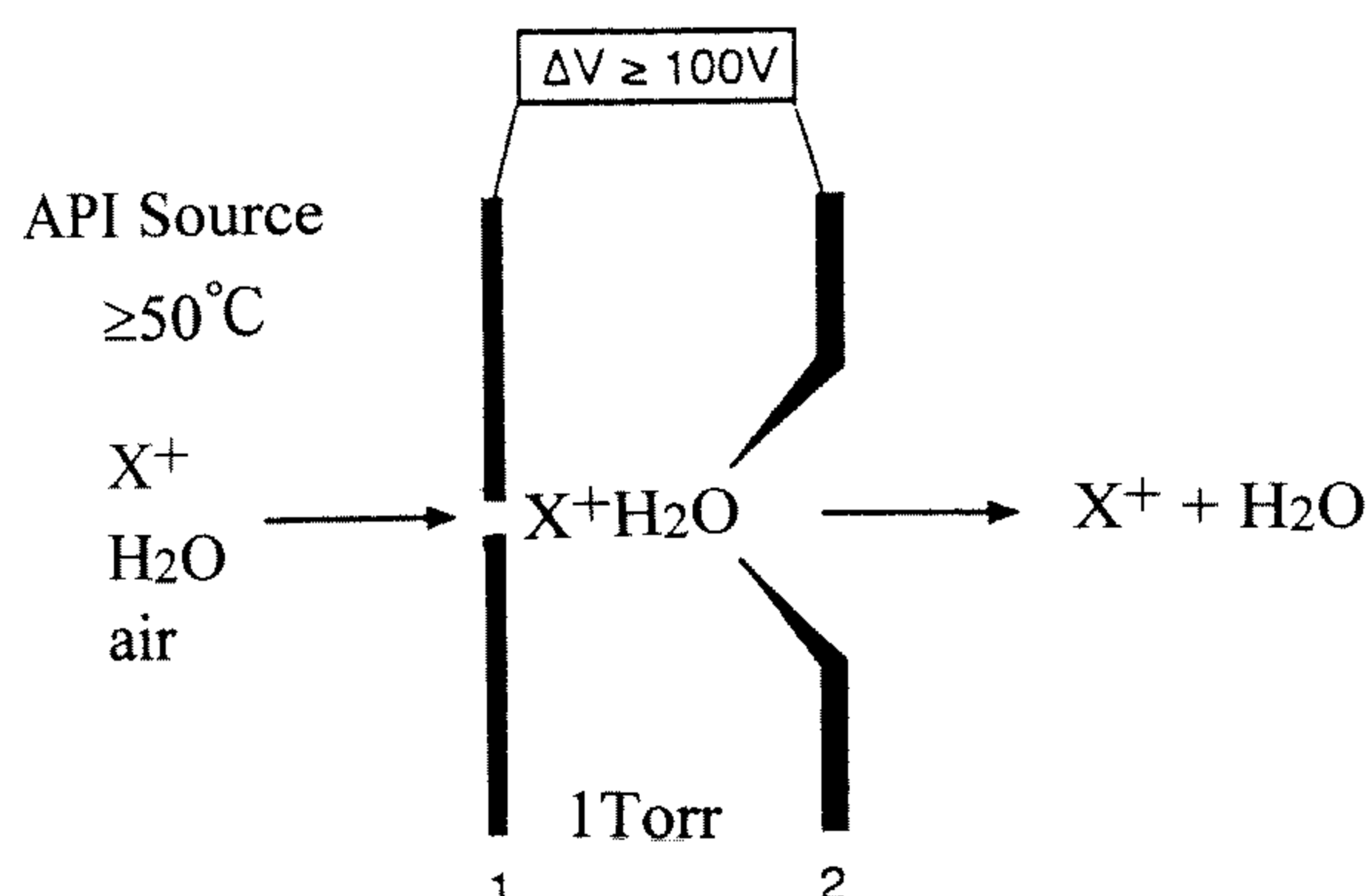


Figure 8. Schematic representation of declustering the X^+H_2O ion by collision-induced dissociation.

裂，從離子源到偵測器之前，只要條件合適，都可以產生CID的現象。

三、應用與實例

(一) 質譜和液相層析搭配上的限制

液相層析質譜術是結合液相層析術及質譜分析術的分析方法，由於層析分離條件影響分析物離子化效率高低，直接關係到質譜儀偵測的靈敏度。因此選擇層析分離條件時，便要注意和質譜的搭配問題。目前一般常用的為逆相(reversed phase)的層析系統，常見的流動相組成為水/甲醇(H_2O/CH_3OH)和水/乙腈(H_2O/CH_3CN)，緩衝溶液目前較通用的只有醋酸銨(ammonium acetate)溶液，有時亦添加一些酸如：三氟醋酸(trifluoroacetic acid)、鹽酸(hydrochloric acid)、甲酸(formic acid)等，目

的是為促進分離或提高分析物的訊號。流動相的流速必須控制，使之能與不同的質譜條件配合；一般純粹的電灑離子化法，容許的流速在 $1-20 \mu L/min$ 之間，可搭配毛細管柱的層析，或者可搭配較大口徑的管柱，但須分流(split)。氣體輔助電灑離子化(pneumatic assisted electrospray；ionspray)容許的流速可大於 $200 \mu L/min$ ，可直接和微管徑管柱(microbore column；1mm ID)相結合，或者搭配較大口徑的管柱，再適度的分流。大氣壓下化學游離法則可以完全接受傳統4.6mm內徑填充管柱的流速($1-2 mL/min$)。

不揮發性的buffer如：phosphate、borate buffer，一般是不適合使用的，因其容易產生離子電流降低及造成取樣孔的堵塞的現象。即使是揮發性的buffer如：ammonium acetate，其濃度亦不宜過高。另外，流動相的含水比例亦不宜過高，一般皆小於60%，過高則可能使液體不易電灑或霧化成細小的液滴，降低離子化效率。理想上，當然是希望質譜能完全配合液相層析最佳的分離條件，但是往往需要在質譜性能與分離效率之間作一番協調取捨。

(二) 偵測模式的選擇

一般來說，大氣壓下離子化質譜儀，有二種離子化法(ESI；APCI)和正、負離子二種離子模式可供搭配使用。在正、負離子模式的選擇上，一般具有鹼性官能基的分析物，如含有鹼性氮原子的amino group，易於被質子化形成 $M+H^+$ ，可採正離子偵測。而具有酸性官能基的分析物，如含有COOH者，易於失去氫離子形成 $M-H^-$ ，可採負離子偵測。不過許多時候，分析物本身既含有酸性的部分又含有鹼性的部分，使得正、負離子的生成效率不易預測，這時最好是兩種模式都嘗試並比較那一種較好。

在離子化法的選擇上，一般電灑法對離子性及極性高的樣品，有著較好的靈敏度，同時對熱不穩定的分析物不會引起熱分解的結果。大氣壓化學離子化法較適用於中極性到低極性的分析物，一般希望分析物至少有一些揮發性，可被加熱揮發成氣態分子。一般熱灑法(thermospray)可分析的樣品，大氣壓化學離子化法也可應用，圖9.是三種離子化法一般所應用的化合物極性範圍⁽¹⁷⁾。

(三) 質譜分析

質譜的TIC(total ion current)圖，類似GC/FID的層析圖可提供分析物的滯留時間資

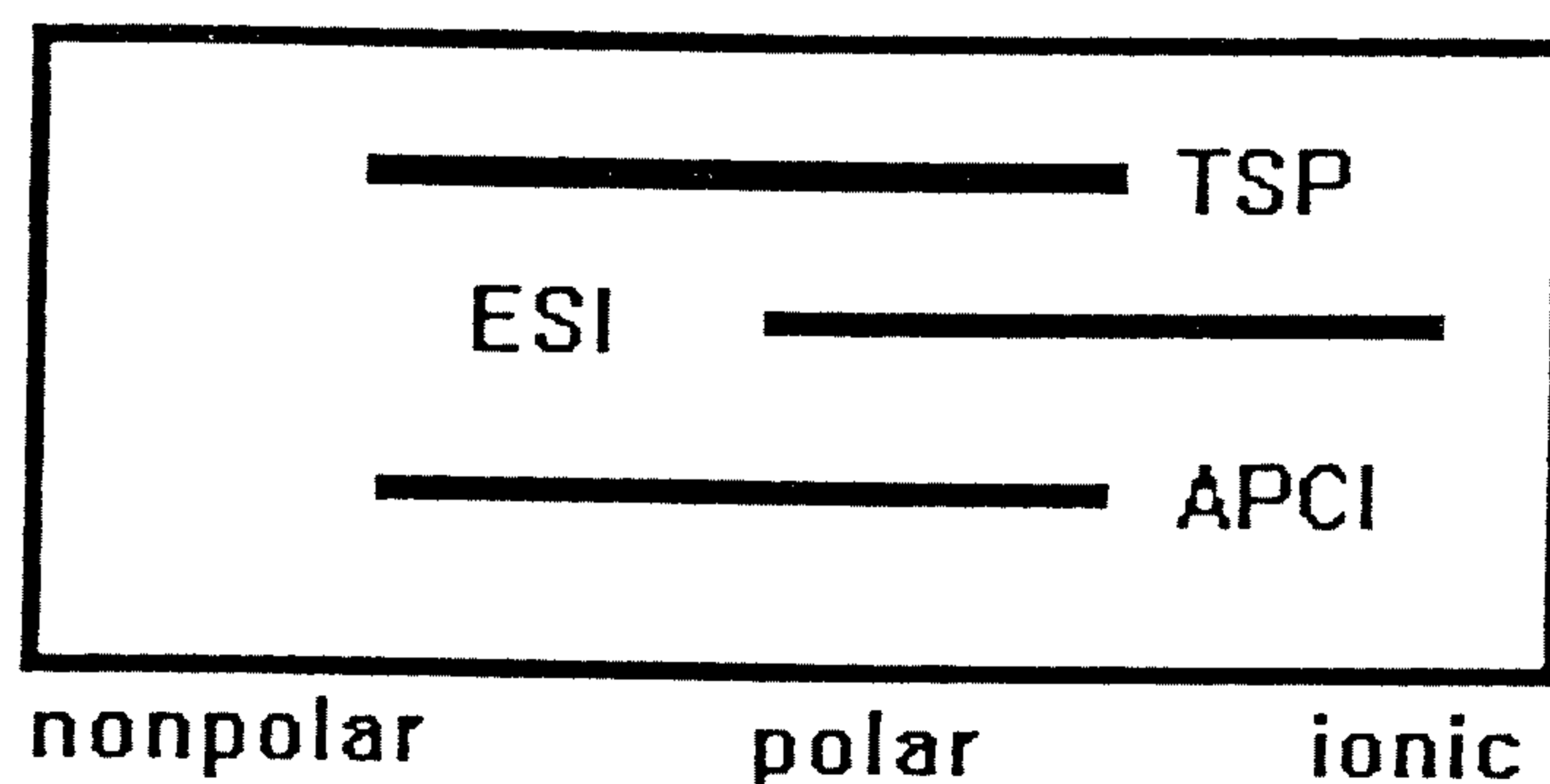


Figure 9. Schematic representation of sample polarity range amenable to three LC/MS interfaces. TSP=thermospray; ESI=electrospray; APCI=atmospheric pressure chemical ionization.

料。質譜儀的質量掃描有兩種方式：全掃描(full scan)和選擇離子掃描(selected-ion monitoring; SIM)，全掃描是對質量範圍內所有的質量循序監視，因此可獲得分析物分子量、同位素比例、特性裂解離子的資料，在訊號峰的成份及結構鑑定上可提供更可信的証據和參考資料。選擇離子掃描是質量分析器被設定只選擇一個或數個特定的質量來監測，這樣質譜便毋須浪費時間在沒有意義的質量範圍上，提高了分析的選擇性與靈敏度，一般用選擇離子掃描可比全掃描，在偵測極限上低上百倍或更多，故其經常用於微量定量分析方面。

更具威力的串聯質譜儀(MS/MS)，亦被應

用在液相層析質譜術的分析上，如圖10.是三重四極棒式串聯質譜儀，Q0只施以交流電壓(RF only)有聚焦的功能，Q1、Q3是用來分析不同質量的質量分析器，Q2也只施以交流電壓，是進行碰撞反應的地方，其基本的操作模式有(1)子代掃描(daughter ion scan)(2)母代掃描(parent ion scan)(3)中性丟失(neutral loss)(4)選擇反應偵測(selected reaction monitoring; SRM)。子代掃描是利用Q1篩選一母離子，在Q2和氬氣分子進行碰撞引致裂解(CID)，將所選的母離子撞碎成子代離子，再用Q3掃描子代離子，如此便可確切地得到特定離子的裂解離子圖譜；母代掃描是固定Q3的頻道在某一特定裂解離子，

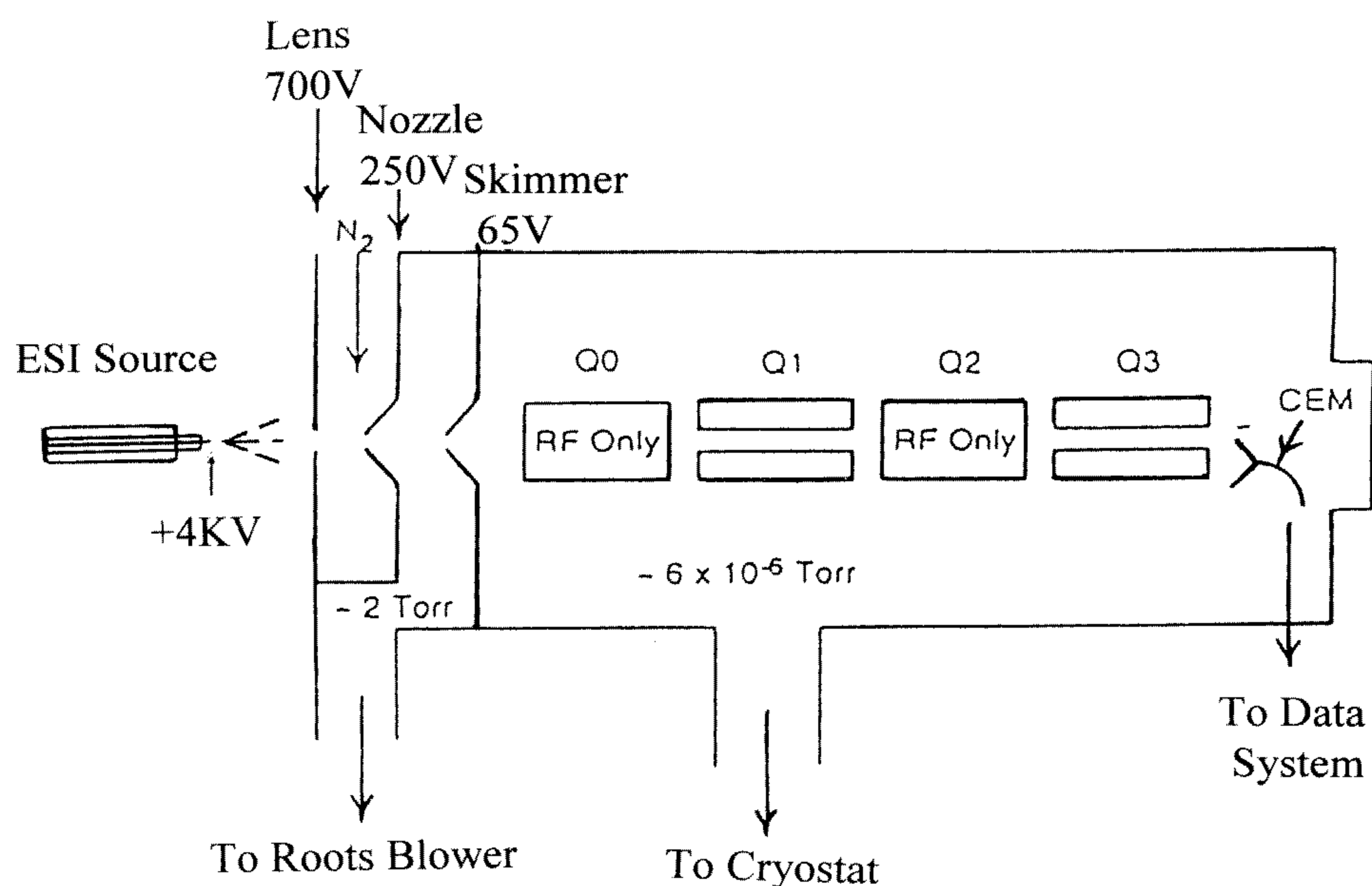


Figure 10. Schematic diagram of a triple quadrupole tandem mass spectrometer.

Q2進行CID，由Q1掃描所有可產生某一特定裂解離子的母離子。中性丢失是Q1和Q3保持一固定差值，可用來偵測有那些化合物具有相同的官能基或特性結構，此法經常應用於藥物代謝物的分析。選擇反應偵測類似選擇離子掃描，對於某一特定化合物Q1通常選擇其準分子離子，Q3則選其準分子離子的特性裂解離子，一次可設定多個Q1/Q3配對，同時監看數個分析物，此種偵測模式有極佳的選擇性與靈敏度，除了應用在定量分析之外，亦可用來確認上述三種掃描方式的結果。

電灑法及大氣壓化學離子化法皆屬於軟離子化法，質譜圖上常常只看到準分子離子的訊號，缺乏足夠的裂解離子資料。利用串聯質譜的子代掃描雖可得到子代離子質譜，但串聯質譜儀卻非價廉的儀器。對於一般單一質量分析器的質譜儀而言，我們可很方便的利用CID的方式來增加分析物的裂解離子，祇要加大離子源的電位差即可，如圖11.是Sulfadimidine的電灑法圖譜⁽¹⁸⁾，(a)是電位差為60V的質譜圖，(b)是電位差為120V的質譜圖，很明顯的下方的圖譜多了許多裂解離子。這種CID碰撞引致裂解

(有時叫collision-activated dissociation; CAD)的方式實行起來相當簡便，同時可產生和串聯質譜或電子撞擊法非常類似的碎片離子圖譜，不過這種CID並非真正的MS/MS，碎片離子圖譜中可能有來自其他母離子的碎片離子或混有較小分子的母離子。

單就質譜儀本身而言，即有將不同質量的分析物利用質量的不同加以分離的功能。因此在實際應用上，可將混合物以直接注入(direct infusion)的方式，先不經過液相層析儀，直接打入質譜儀作快速的檢驗(screening)，之後再以液相層析質譜儀作進一步的分析。

(四)實例

液相層析質譜術(LC/MS)，在藥物分析應用的方向有：(1)製葯工業上，藥物本身及其副產物的鑑定與定量分析；(2)血漿、尿液或其他生化樣品中藥物及其代謝物分析；(3)違禁藥物檢驗；(4)天然藥物成份分析；(5)藥物分解後產物之鑑定等⁽¹⁰⁾。而液相層析大氣壓下離子化質譜(LC/API/MS)在藥物分析方面的應用，目前正快速增加之中。本文僅舉一些實例，說明液相層析大氣壓下離子化質譜術在藥物分析方

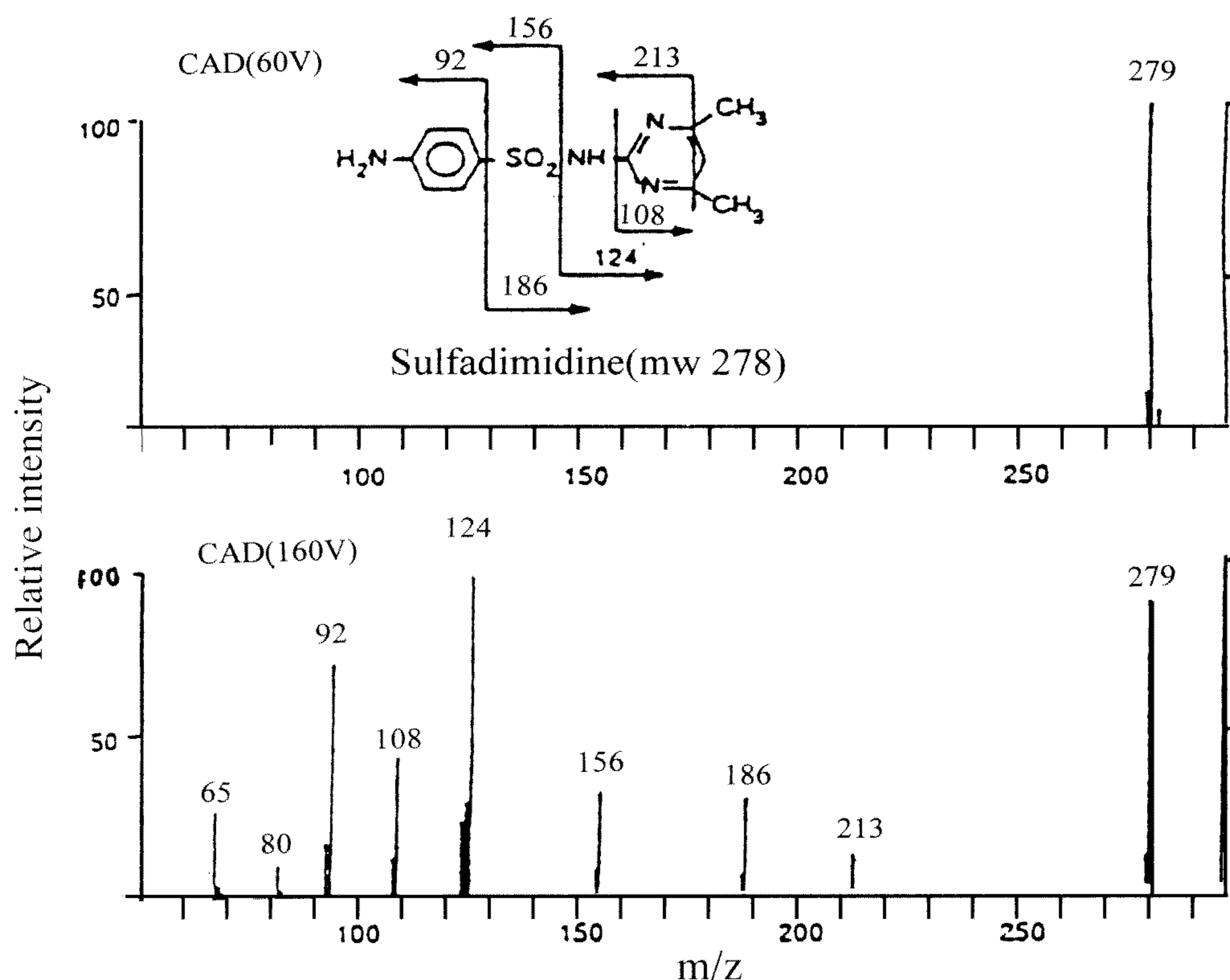


Figure 11. Electrospray CID spectra of sulfadimidine. Top, mass spectrum obtained at potential difference of 60 V.

面的實際應用情況。

sulfonamide antibiotics是一類廣泛應用在防止牲畜病毒感染的抗生素，然而卻經常在牛奶、肉類中發現殘留的情形。由於sulfonamide antibiotics會造成嚙齒類動物的甲狀腺腫大，因此引起大家的注意。D. R. Doerge等人⁽¹⁹⁾以LC/APCI-MS搭配固相萃取(solid phase extraction)和傳統4.6mmID的填充管柱分析牛奶中六種sulfonamide antibiotics，偵測極限0.25-2.5ppb、線性範圍1.25-20ppb。作者在該文章中，靈活的應用了單一四極棒式(single quadrupole)儀器的離子源內碰撞引致裂解(in source CID)技術：圖12.是sulfamethazine(SMZ)在不同的電壓下的CID全掃描圖譜，由圖中可看到電壓大於60V時，準分子離子(m/z 279； MH^+)完全裂解成裂解離子，而控制電壓在中等強度(約50V)時，可使準分子離子和三個裂解離子同時存在。另外，對於具有相同特性裂解離子的同類化合物，可在強CID的條件之下(80V)，只選擇共同的特性裂解離子，作同類物的選擇離子偵測。如sulfonamide antibiotics在結構上具有相同的sulfonamide部分，而具有

不同的heterocyclic base部分(圖13.)，在強CID的條件之下，這一類的化合物會裂解出共同的裂解離子 m/z 156(見圖13.)，因此在強CID的條件下，祇要針對 m/z 156做選擇離子偵測便可對同類的分析物做分析。圖14.便是加入六種sulfonamide antibiotics的牛奶樣品在80V下，對 m/z 156做選擇離子偵測所得的質譜層析圖。在中等強度的CID條件下，對目標分析物的分子離子及特性裂解離子同時做選擇離子掃描，所得兩離子的訊號峰高度比或面積比，可和標準品的結果比較(ratio check)，此比較結果的相似程度可做為定性上的參考依據。

MK-434(圖15.)是一種新的5 α -reductase抑制劑(inhibitor)，在對攝護腺疾病的處置上有潛在的價值，由於其本身不揮發、揮發性的衍生化產物又不穩定，因此並不適合用氣相層析質譜分析，Olah等人曾以大氣壓化學離子化法液相層析質譜成功地分析MK-434和它兩個代謝物(L-691,919、L-694,579；圖15.)在血漿中的濃度及濃度隨時間的變化情形⁽²⁰⁾。在其分析的方法中，應用了固相萃取前處理技術，碳十八50mm $\times$ 4.6mm ID的填充管柱、1mL/min的動

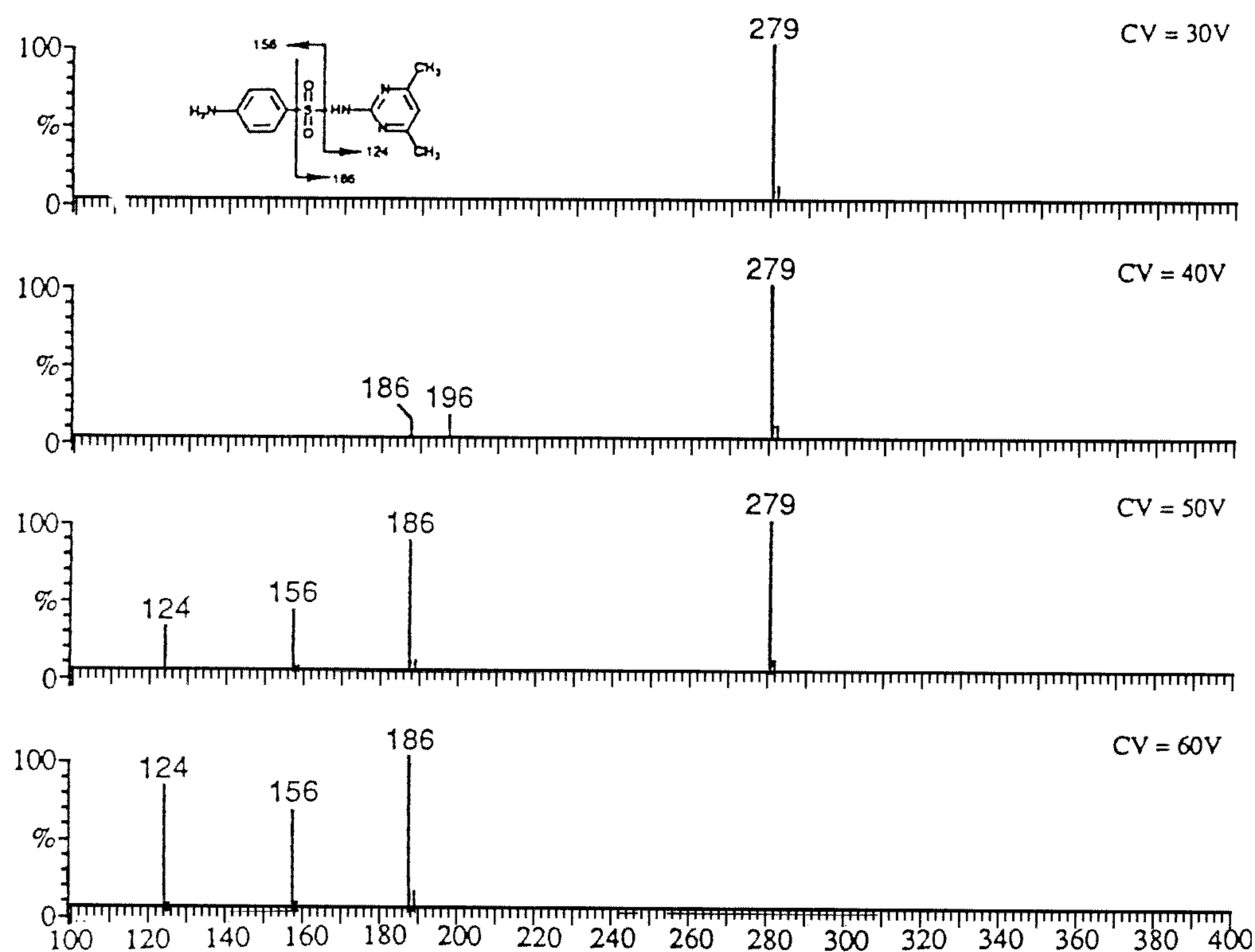


Figure 12. Voltage-dependent fragmentation of SMZ. The mass spectrum of SMZ was acquired in full-scan mode and determined using 100 ng injections at different cone voltage.

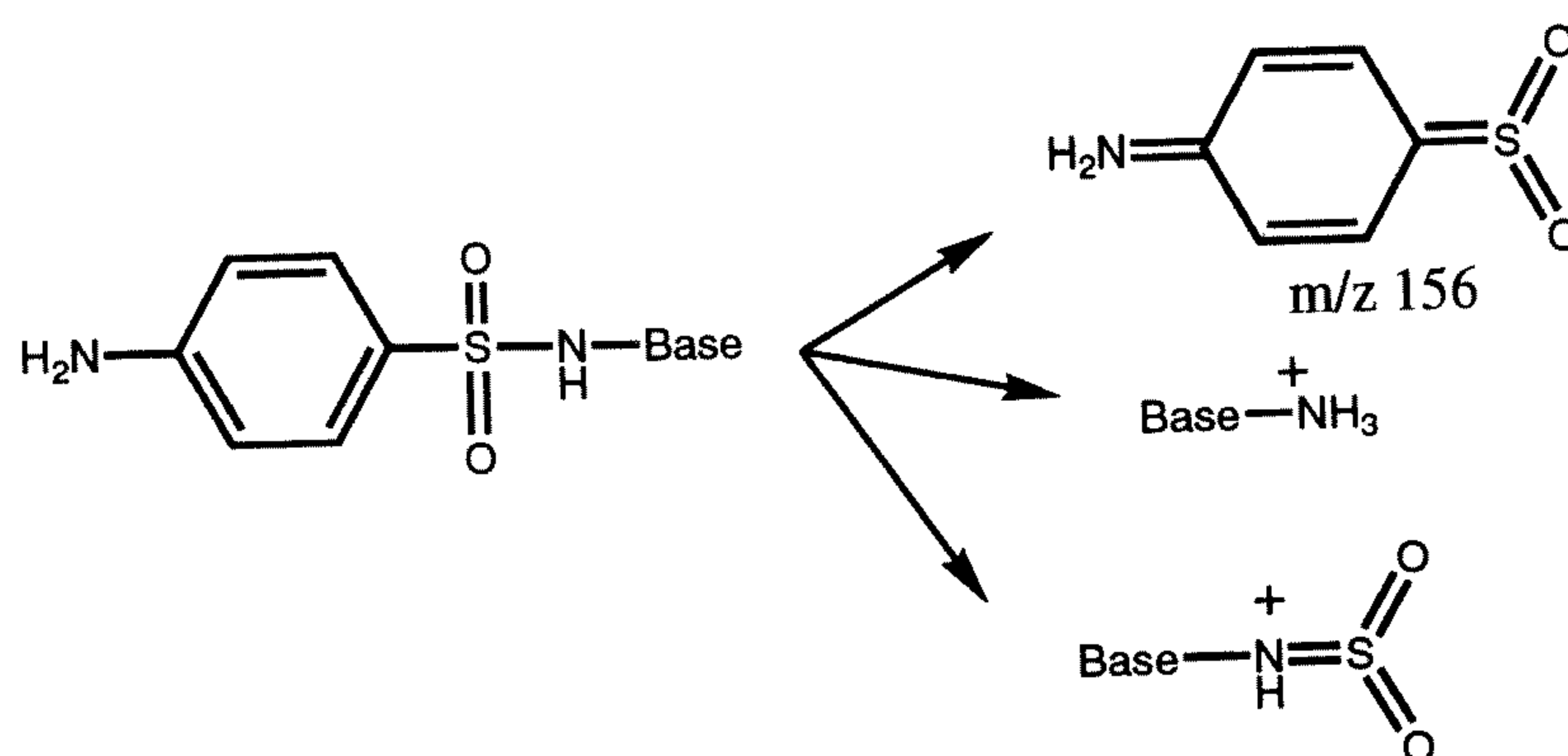


Figure 13. Common fragmentation reactions for sulfonamides produced by CID.

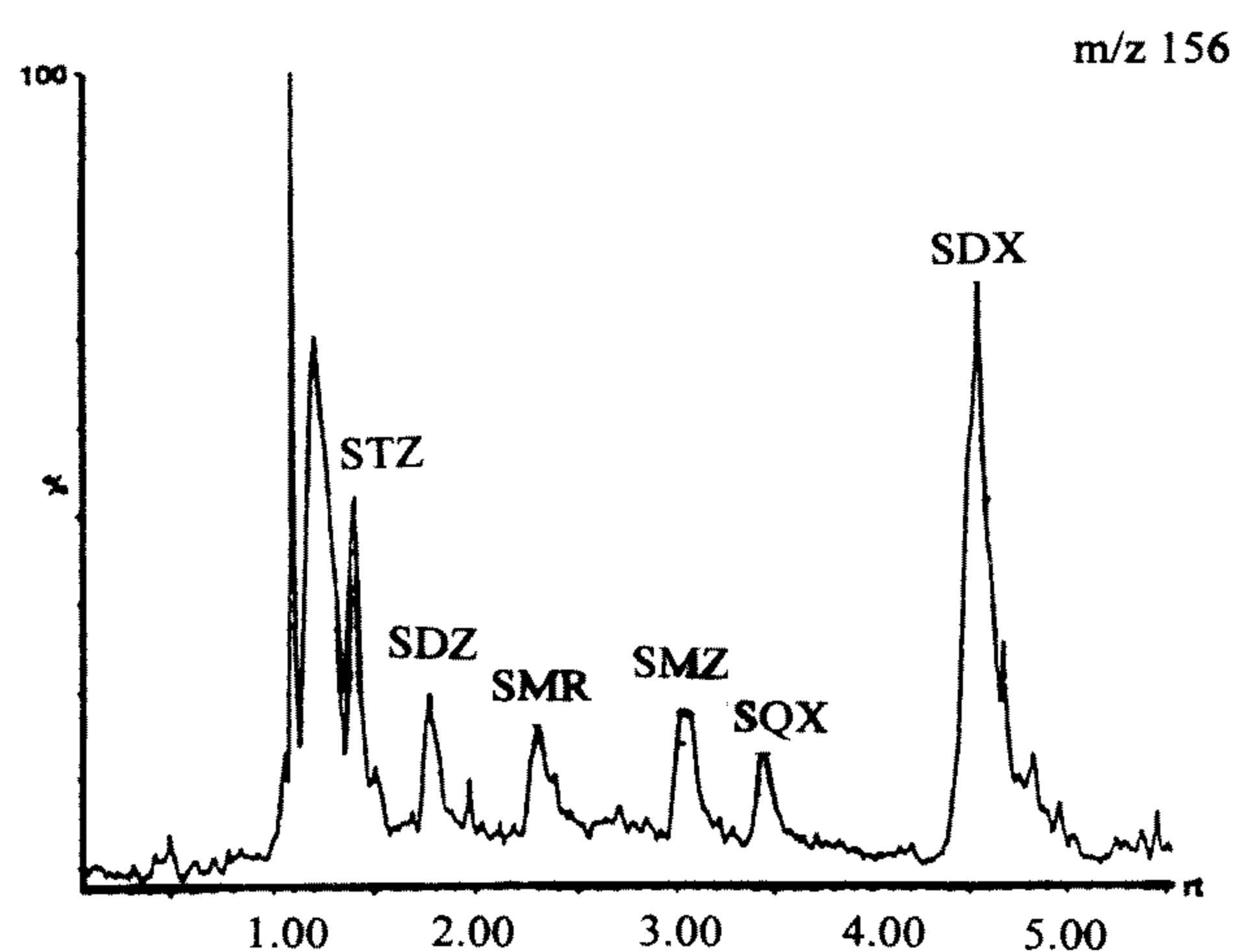


Figure 14. Class-specific multiresidue detection of sulfonamides in spiked milk extracts using high cone voltage. Milk extracts were processed by solid-phase extraction and analyzed by APCI-MS using selected-ion monitoring of the m/z 156 fragment ion formed by CID at a cone voltage of 80 V.

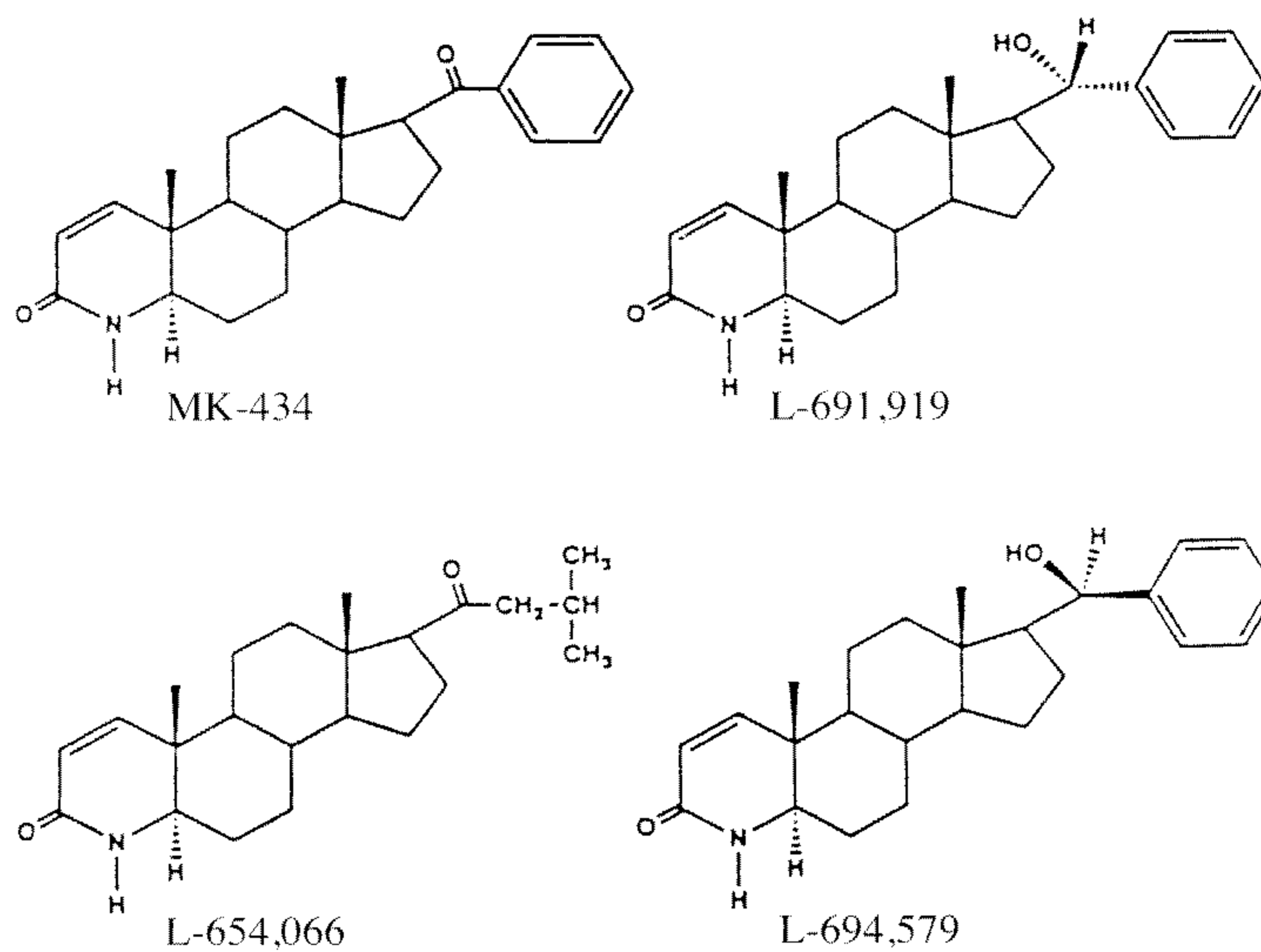


Figure 15. Structures of MK-434, its metabolites L-694, 579 and L-691,919, and the internal standard L-654,066.

相流速，大氣壓化學離子化法及三重四極棒 (triple quadrupole) 串聯質譜儀，分析臨床上血漿樣品中MK-434及它兩個代謝物在0.5ng/mL-50ng/mL的濃度範圍，層析分離時間少於5分鐘，同時還具有相當的精確度(precision)。圖16.是MK-434與它兩個代謝物(兩立體異構物，相同質譜圖)和用做內標準物(internal standard)

的L-654,066的正離子子代掃描圖譜，顯示出各成分的特性裂解離子的資料，如：MK-434有m/z 310、105的特性裂解離子，代謝物、內標準物分別有m/z 312、290的特性裂解離子。圖17.是根據圖16. 特性裂解離子的資料，設定串聯質譜儀多重選擇反應偵測的頻道，所測得口服藥物前(上圖)和服用後(下圖)具有高特異性

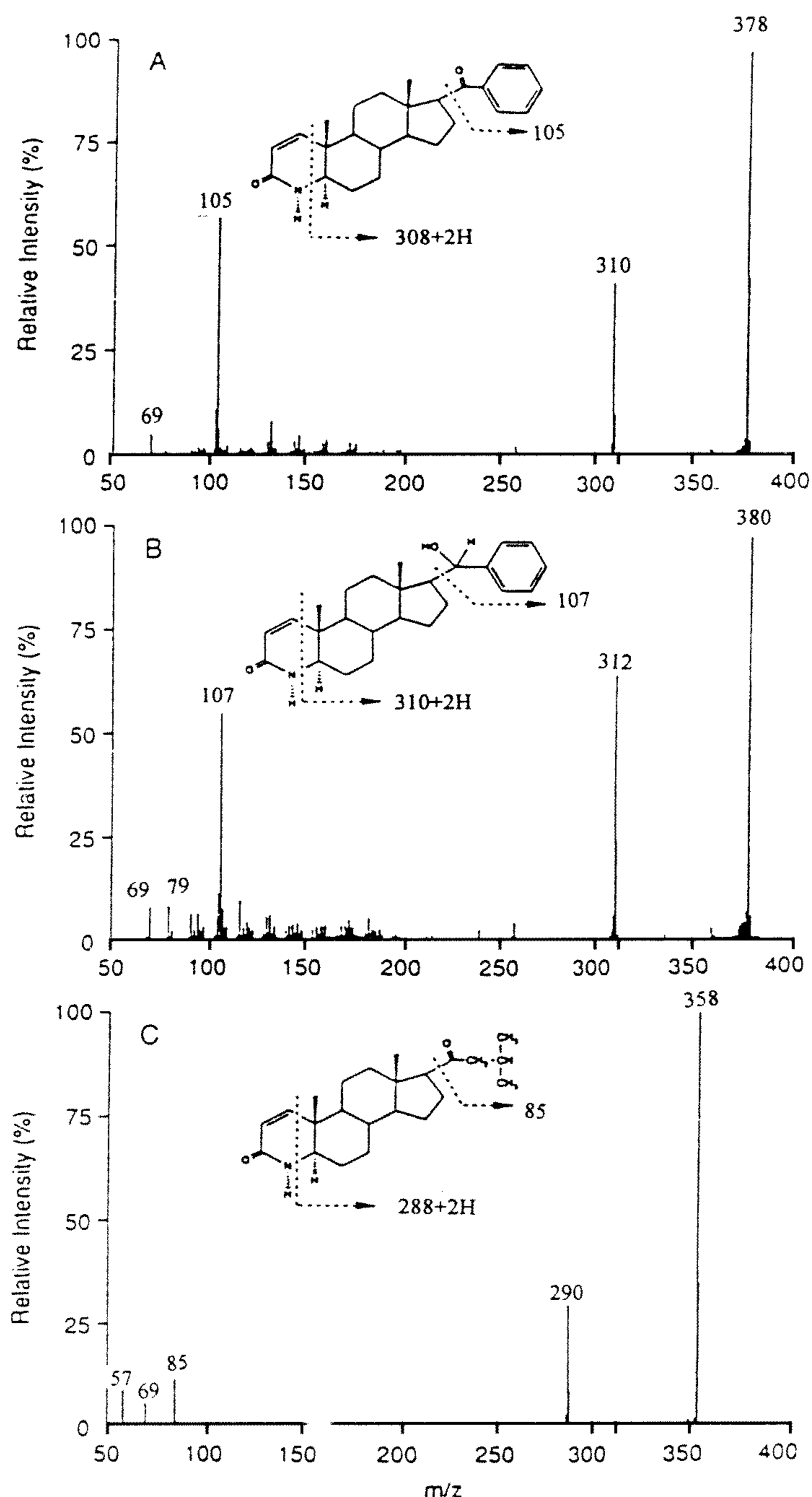


Figure 16. LC/APCI-MS/MS positive product ion mass spectra(background subtracted) of the protonated molecular ions of (a) MK-434(m/z 378), (b)L-691,919(m/z 380), (c) the internal standard L-654,066(m/z 358). The mass spectrum of L-691,919 is identical to that of its diastereomer L-694,579.

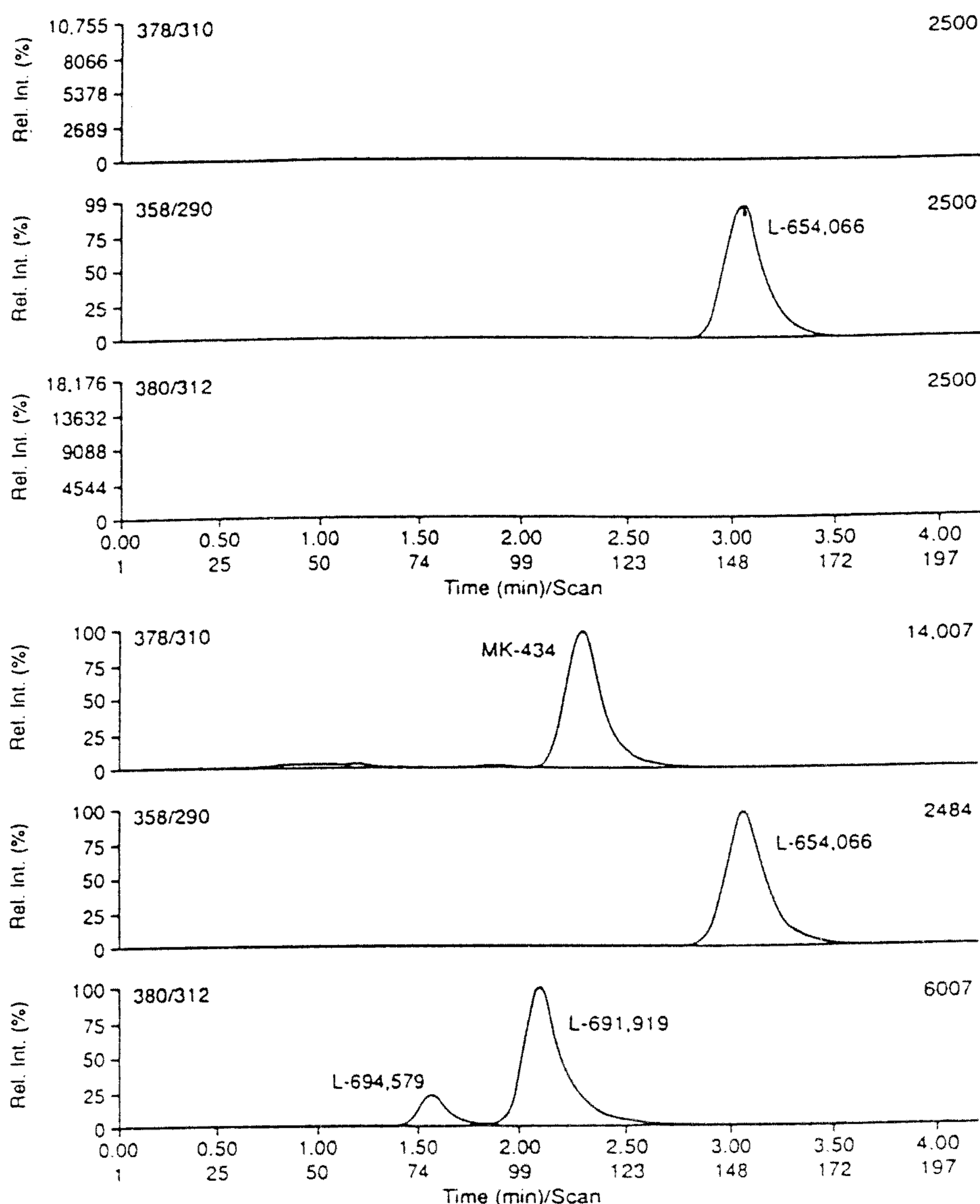


Figure 17. Chromatograms obtained by multiple reaction monitoring of extracts of plasma from a volunteer receiving 25mg (p.o.) of MK-434. Channel A, m/z 378/310=MK-434; Channel B, m/z 358/290=internal standard; Channel C, m/z 380/312=L-694,579 and L-691,919. Top: extract of a plasma sample collected prior to drug administration. Bottom: extract of a plasma sample, collected 6h after administration containing 25 ng/ml MK-434, 15.8 ng/ml L-691,919 and 3.7 ng/ml L-694,579.

和訊雜比的質譜層析圖，由圖中可得到各成分滯流時間及訊號峰面積的資料。圖18.是臨床上真實血漿樣品中MK-434及其兩個代謝物濃度隨時間的變化圖。

四.結論

從液相層析的角度來看，使用質譜儀當偵測器，對分離條件的選擇是受到部分限制的，這也是目前液相層析質譜術在應用上的限制。從偵測器的角度來看，傳統的光學偵測器，構

造較簡單，在定量分析上表現較穩定，但若考慮質譜儀的特異性、靈敏性、及可提供的資料，則是傳統的光學偵測器所不能比較。

以目前商業化的大氣壓下離子化質譜儀來說，大多可配備電灑法、大氣壓化學游離法和毛細電泳三種界面，只要簡單地更換不同界面的探針(probe)，便可搭配不同的離子化法和分離條件，應用到各類的樣品，尤其是電灑法的普遍，使得以往較困難的樣品(離子性、不揮

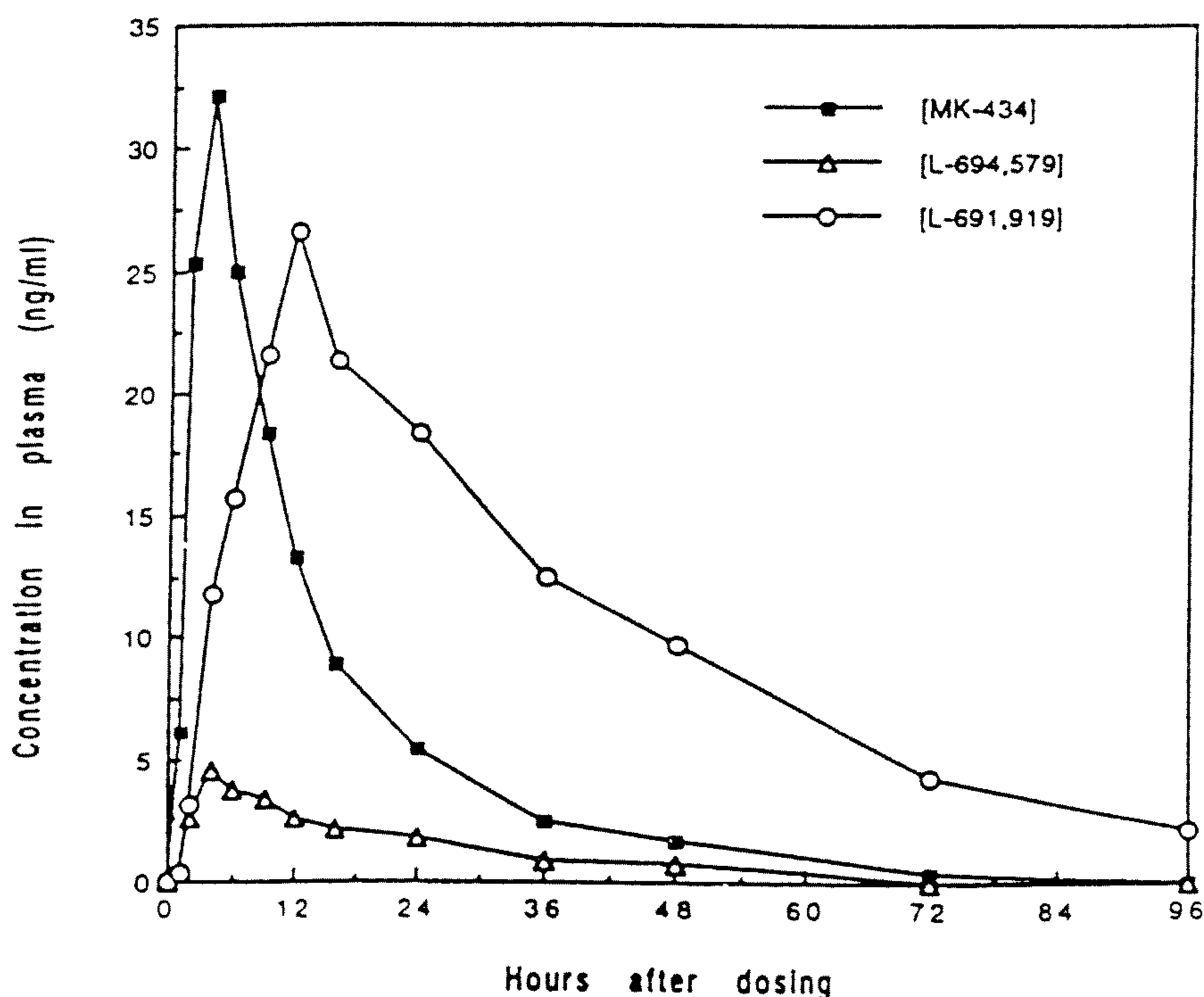


Figure 18. Concentration-time profiles of MK-434 and its metabolites in the plasma of a subject receiving 25 mg of the drug.

發性、熱不穩定性)，有了分析的利器。隨著更多的研究人員，投注在液相層析質譜術的發展上，系統將愈能和各種液相分離技術與條件配合，同時硬體也愈趨簡單。近年液相層析質譜儀的價格及使用困難度，正快速降低中，相信未來數年桌上型液相層析質譜儀，會如桌上型氣相層析質譜儀一樣，價廉且易於使用。

參考文獻

1. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.k., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. 1990. Electrospray Ionization-principles and Practice. *Mass Spectrom. Rev.* 9 : 592-602.
2. Bruins, A.P., Covey, T.R. and Henion, D. 1987. Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 59 : 2642-2646.
3. Sakairi, M. and Kambara, H. 1988. Chromatograph/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 60 : 774-780.
4. Nissen, W.M.A. and Greef, J.V.D. 1992. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Principle and Application.* (Chromatographic Science ;v. 58) pp.229. MARCEL DEKKER, INC. New York.
5. Dole, M., Mack, L.L., Hines, Mobley, R.C., Ferguson, L.D. and Alice, M.B. 1968. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49 : 2240-2249.
6. Yamashita, M. and Fenn, J.B. 1984. Electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* 88 : 4451-4459.
7. Yamashita, M. and Fenn, J.B. 1984. Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* 88 : 4671-4675.
8. Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M. and Fenn, J.B. 1985. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* 57 : 675-679.
9. Bruins, A.P., Covey, T.R. and Henion, D. 1987. Ion Spray Interface for Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 59 : 2642-2646.

10. Nissen, W.M.A. and Greef, J.V.D. 1992. Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Principle and Application. (Chromatographic Science ;V. 58) pp.235-239. MARCEL DEKKER, INC. New York.
11. Tang, L. and Kebarle, P. 1993. Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of Analysis in the Electrosprayed Solution. Anal. Chem. 65 : 3654-3666.
12. Hager, D.B., Dovichi, N.J., Klassen, J. and Kebarle, P. 1994. Dropet Electrospray Mass Spectrometry. Anal. Chem. 66 : 3944-3949.
13. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. 1989. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. Science 246 : 64-71.
14. Bruins, A.P. 1991. Mass Spectrometry with Ion Sources Operating at Atmospheric Pressure. Mass Spectrom. Rev. 10 : 53-77.
15. Huang, E.C., Wachs, T., Conboy, J.J. and Henion, J.D. 1990. Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry-Detection for the Separation Sciences. Anal. Chem. 13 : 713A-725A.
16. Bruins, A.P. 1994. Atmospheric-pressure-ionization Mass Spectrometry I. Instrumentation and Ionization Techniques. Trends Anal. Chem. 13 : 37-43.
17. Creaser, C.S. and Stygall, J.W. 1993. Particle Beam Liquid Chromatography- Mass Spectrometry : Instrumentation and Applications. 118 : 1467-1480.
18. Voyksner, R.D. 1992. Electrospray LC/MS- Can It Be Used to Determine Lower Weight Molecules? Nature 356 : 86-87.
19. Doerge, D.R., Bajic, S. and Lowes, S. 1993. Multiresidue Analysis of Sulfonamides Using Liquid Chromatography with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 7 : 1126-1130.
20. Olah, T.V., Gibert, J.D., Barrish, A., Greber, T.F. and Mcloughlin, D.A. 1994. A Rapid and Specific Assay, Based on Liquid Chromatography-atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, for the Determination of MK-434 (A 5 α - Reductase Inhibitor) and Its Metabolites in Plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 12 : 705-712.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Drug Analysis

JENN-FENG SHEEN AND GUOR-RONG HER*

*Department of Chemistry, National Taiwan University,
Taipei, Taiwan, Republic of China*

ABSTRACT

Atmospheric ionization is the most important development for LC/MS in recent years. Two atmospheric pressure ionization methods, electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) are described. Electrospray is most suited to compounds of high polarity or thermolabile because ionization of electrospray is performed in solution, and vaporization of analyte before ionization is not necessary. The optimal flow rate of electrospray, in general, is in the range of 40-200 $\mu\text{L}/\text{min}$,

although the upper limit is about 1 mL/min . Atmospheric pressure chemical ionization utilizes the constituent of mobile phase and water vapor as the reagent gas for chemical ionization. This method is best suited for compounds of low to medium polarity. APCI can take higher flow rate than ESI and it can directly couple with conventional 4.6 mm ID packed column (1-2 mL/min) without splitting. Two examples are used to illustrate the potential of using LC-API/MS system in drug analysis.

Key words: Atmospheric ionization, LC/MS, electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization.